



Original Article / 원저

Atorvastatin으로 유도된 근위축 세포모델에서 상황-오미자박 고상발효물 열수추출물의 보호효과

김영숙¹, 황수진², 박광일³, 임종민¹, 천다미¹, 정유진⁴, 전병엽⁵, 곽경태⁵, 오테우^{2*}

¹(주)글루칸, ²한국한의학연구원 한의기술응용센터, ³경상국립대학교 수의과대학,
⁴한국화학연구원 정밀화학융합기술연구센터, ⁵(주)큐비엠

Protective Effect of water extract *Phellinus linteus*-discard *Schisandra chinensis* solid fermented extracts on improvement of sarcopenia by Atorvastatin-induced muscle atrophy cell model

Young-Suk Kim¹, Su-Jin Hwang², Kwang-Il Park³, Jong-Min Lim¹, Da-Mi Cheon¹,
Yu Jin, Jung⁴, Byeong Yeob Jeon⁵, Kyeong Tae Kwak⁵ and Tae Woo Oh^{2*}

¹Glucan Co. Ltd.

²Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental
Medicine (KIOM)

³Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine,
Gyeongsang National University

⁴Research Center for Advanced Specialty Chemicals, Korea Research Institute of
Chemical Technology (KRICT)

⁵QBM Co.,Ltd.

ABSTRACT

Objectives : This study is to effect of improving muscle atrophy through water extract on the solid-phase fermentation extraction with *Phellinus linteus* of discarded *Schisandra chinensis* in an atorvastatin-induced atrophy C2C12 cell.

Methods : C2C12 myoblast were differentiated into myotube by 2% horse serum medium for 6 days, and then treated solid-phase fermentation(S-P) extract at different concentrations for 24h. To investigate the effect of S-P extract on the induction of muscle atrophy and expression of atrophy-related genes and apoptosis in differentiated C2C12 myotubes using a GSH, ROS, real-time PCR, western blots analysis.

Results : As a result of treatment with atorvastatin at concentrations of 5, 10, and 20 μM on the 6th day of differentiation in C2C12 myotube cells, it was confirmed that the cell morphology was damaged in a concentration-dependent manner, and the length and thickness of the myotube also decreased in a concentration-dependent manner. Treatment with S-P extract (50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) increased of GSH and inhibited ROS in the atorvastatin-induced muscle atrophy cell model at a concentration that did not induce toxicity. In addition, it was confirmed that it has an effect on muscle reduction by inhibiting apoptosis of muscle cells as well as being involved in protein production and degradation of muscle cells.

Conclusions : Atorvastatin-induced atrophy C2C12 cell, S-P extract activates related to differentiation/generation and proteolysis, and inhibits cell death of atrophy in C2C12 cell. Based on this, it is necessary to prove its effectiveness through animal models and human application test, but it is considered to be discarded *Schisandra chinensis* can present the potential for development as a recycling industrial material.

Key words : *Phellinus linteus*, *Schisandra chinensis*, C2C12 myotubes, solid-phase fermentation, anti-atrophic effect.

I. 서론

근 위축증이란 근육의 위축이나 소모를 의미하는 말로, 근육골격의 쇠약이나 퇴화를 특징으로 한다. 근 위축증은 대부분 유전적인 결함을 가진 유전질환의 발병으로 나타나지만, 오랫동안 침상생활을 하거나, 골절부위에 대한 고정 등으로 신체부위를 장기간 사용하지 않았을 때, 근위축도 발생한다¹⁾. 이 기간동안 골격근에 대한 섬유 위축이 나타나면서, 전반적인 근육의 약화가 이루어진다. 최근 근 위축증은 근감소증에 대한 원인이 되기도 하는데, 앞서 설명한 바와 같이 근력의 저하를 유발하게 되어 각종 신체기능의 장애 및 감소를 일으키게 되고, 삶의 질을 악화시킨다²⁾. 근육량과 근력의 감소는 30대부터 시작되며, 60대에서는 15%, 80세 이상은 40%의 유병율을 보이고 있다. 특히, 인구 고령화와 함께 근감소증을 보이는 노인 인구는 매년 증가하는 추세에 있으며, 노년 전기에 비하여 노년 후기로 갈수록 생리적 노화의 정도가 증가할수록, 신체적, 심리적, 사회적 건강상태가 더욱 악화 되어감에 따라 유병율 역시 높아지고 있는 추세이다³⁾. 이러한 근감소는 근감소성 비만(sarcopenic obesity)을 비롯한 심혈관계 질환에 대하여 위험도를 증가시킴으로 근감소 질환 자체도 문제가 되기도 하지만, 만성질환에 대한 이환율을 증가시켜 신체장애와 사망률 및 합병증을 증가시킴으로써 노년사회에서 그 심각성이 대두되고 있는 상황이다.

노화과정에 대한 한의학적 개념들을 살펴보면, 『황제내경(黃帝內經)』⁴⁾에서는 노화의 과정을 연령별로 구분하여 나이가 들어감에 따라 신체의 각 구조 및 기능의 변화에 대하여 기술해 놓았다. 특히 『천년편(天年編)』에서는 40세에 오장육부와 12경맥이 모두 대성하여 평정하며, 주리(周理)가 성기어져 영화한 것이 퇴락하기 시작한다고 하였으며, 50세에 간(肝)의 기가 약해지고 소엽이 쪼어지며, 담즙이 줄어 시야가 흐려진다고 하였으며, 60세에 심(心)의 기가 약해지고, 우수가 많으며 혈기가 해타(懈惰)하여 늙는 것을 자주 한다고 기재하여 연령별로 100세까지 기술을 해놓았다. 이처럼, 노화는 근육의 저하를 비롯한 신체기능에 대하여 전반적인 약화를 초래함으로써 기능 회복이 점점 어려워져 결국 자신 몸의 항상성을 유지할 수 없게 되고 끝내는 죽음에 이르게 되는 특징을 가지고 있다⁵⁾.

한편, 스타틴(statin)은 대체적으로 안전성이 있으며 부작용이 적은 약물로 알려져있지만, 대다수의 치료제가 side effect를 가지고 있는 만큼, 장기간의 복용, 용량의 과다로 인하여 스타틴 역시, 부작용을 가지고 있다⁶⁾. 가장 흔한 부작용으로는 위장관계 증상과 근육통이 있으며 드문 부작용으로는 근육병증, 발진, 말초신경병증, 불면증, 수면이나 집중력과 관련된 증상 등이 있다. 스타틴과 관련하여 가장 관심을 가지고 있는 부작용으로는 간 독성과 근육병증이 있으며, 이들 부작용은 알레르기 반응에 기인한다기보다 약물 투여용량과 장기간의

*Corresponding author : Tae Woo Oh, CKorean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70, Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea
Tel : +82-53-940-3833, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr

•Received : November 18, 2021 / Revised : November 24, 2021 / Accepted : November 25, 2021



복용과 관련된 것으로 생각하고 있다⁷⁾. 근육병증(myopathy)은 근육에 발생하는 모든 질환을 말하며 특히 근육의 1차성 염증성 질환을 근염이라 하고, 크레아틴키나제(creatine kinase)의 수치가 상승한 경우 이를 근육염(myositis)라고 한다. 이러한 근육염의 가장 심한 질병은 횡문근융해증(rhabdomyolysis)이며, 이는 골격근의 괴사로 인해 세포 안에 있는 근육성분이 혈액으로 방출되면서 나타나는 질환으로, 근육세포에서 나오는 크레아티닌 키나아제(creatinine kinase) 근육 효소의 혈중 농도가 상승하고, 근육염을 비롯한 근육통을 동반하면서 경증상태에서 급성 신손상, 전해질 불균형으로 인하여 심하면 사망에 이르는 경우도 발생한다. 스타틴을 투여받는 환자 중 약 5%에서 비특이적인 관절통을 비롯한 근육통을 호소하는 경우는 있으나, 일반적으로 크레아티닌 키나아제의 상승을 동반한 경우는 지극히 드물며, 스타틴의 복용으로 인한 크레아티닌 키나아제 증가의 위약을 투여했을 경우와 유사한 정도로 발생하는 것으로 알려져있다. 드물기는 하지만, 일부 환자들에게서는 경도에서 중등도까지의 크레아티닌 키나아제의 상승과 함께 근육통을 동반한 증상을 호소하는 경우도 있는데, 이 경우에는 비특이적이긴 해도, 스타틴의 부작용이 아니라고는 정의하기 어렵다⁸⁻⁹⁾. 따라서 본 논문에서는 스타틴으로 근육세포에서 근육세포의 분화에 스타틴이 영향을 미치는지 살펴보고, 이에 대하여 상황-오미자박 고상발효 추출물의 효능을 살펴보았다.

오미자(五味子)는 다섯가지의 맛, 과육의 단맛과 껍질의 신맛, 씨의 맵고 쓴맛과 더불어 전체적으로 짠맛을 나타낸다고 하여 붙여진 이름이다. 과거에는 목련과(木蓮科) Magnoliaceae에 속하는 다년생 낙엽목으로 분류되어오나, 현재는 오미자과(Schizandraceae) 오미자속(genus Schisandra)에 속하는 낙엽성 목본의 식물로 등근형태의 붉은색 과실을 오미자라 한다. 신농본초경 상품에 기재된 본초로 예전부터 널리 약용되어지고 있는 한약재료, 오미자의 성미는 산(酸), 온(溫), 무독(無毒)하며, 귀경(歸經)은 폐신(肺腎)의 2경(經)으로 폐와 신장에 작용하는 것으로 알려져있다. 한약재로 사용할 때는 수증기에 찌거나 불에 살짝 볶는 수치(修治)를 하여 사용한다. 오미자에 관련된 연구는 다른 한약재와 비교해 볼 때 많은 연구가 진행되었는데, 오미자 에탄올 분획물은 최면 활성 및 강한 진정효과를 보였으며¹⁰⁾, 불면상태에서 신경전달물질의 농도를 증가시켜 수면유도 작용¹¹⁾ 및 스트레스에 대한 효과¹²⁾, 항균활성¹³⁾,

뇌혈류량 및 혈압에 대한 효과¹⁴⁾, 항당뇨¹⁵⁾, 장내 미생물 개선¹⁶⁾, 간보호 및 중추억제 작용¹⁷⁻¹⁹⁾ 등의 약리효능이 보고되었다. 또한 오미자에는 주로 정유성분과 lignan이 함유되어있으며, lignan 성분은 schizandrin A-C, schisandrol A, B, Gomisin N, B으로 이에 대한 다양한 약리작용이 보고되고 있다²⁰⁾. 이와 더불어 오미자는 한약재로 사용되는 것 뿐만 아니라, 떡, 과자, 음료 등에 첨가되면서 오미자에 대한 공급 및 수요가 증가하고 있는 추세이며, 그로 인하여 오미자 재배 농가 수가 증가함은 물론, 관련 제품에 대한 생산이 확대되면서 고부가가치 작물로 부상하고 있다. 하지만, 대부분 오미자에 대한 가공품은 착즙과 같은 음료형태의 제품이 주를 이루기에, 착즙 후 버려지는 박의 증가로 인한 사회적 문제가 제기되고 있으며, 탄소중립에 대한 리사이클링 산업 소재로서 본 연구에서는 오미자박 활용도를 가능해보고자 하였다. 이에 본 연구에서는 오미자박에 대한 상황버섯 고상발효물을 제조하여 추출한 열수추출물로부터 근감소증에 대한 효과를 알아보고자, atorvastatin으로 유도된 근 위축 세포모델에서 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 상황-오미자박 고상발효 추출물 제조

본 연구에 사용한 상황버섯균은 *Phellinus linteus* (KCCM 60261)으로 본 실험에 사용된 상황-오미자박 추출물은 (주)글루칸에서 제조한 추출물을 제공받아 사용하였다. 추출물의 제조 방법은 오미자박(오미자추출 후 잔여물)을 60°C에서 48hr 건조(열풍)하고 건조된 오미자박을 분쇄기를 이용해 분쇄하였다. 분쇄된 오미자박을 고상발효 용기에 설탕물(5%)과 5대 50의 비율로 혼합하고 이를 121°C, 1.1kg/cm² 으로 30분 동안 멸균시킨 후 7°C/min의 속도로 25°C까지 냉각시켰다. 냉각된 오미자박에 상황(*Phellinus linteus*)균 5%를 접종하고 배양기 24±2°C에서 50일 동안 고상발효시켜 상황-고상발효 오미자를 제조하였다. 발효가 끝난 상황-오미자박 고상발효물을 121°C, 1.1kg/cm² 으로 30분 동안 멸균하고 균을 모두 사멸한 고상발효물을 -40°C에서 동결건조하여 분쇄기(분쇄기 파워 3000W)로 1분간 분쇄하여 고상발효 분말을 획득하였다(S-P). 고상발효분말(S-P)을 20g에 증류수 180g(1:9) 비율로 혼합한 후 100°C, 2.5hr 열수

추출하였고, 추출한 고상발효액을 종이필터(100mm)를 이용해 필터하고 여액을 다시 한번 0.45um 필터하고 이를 동결건조(-40°C) 후 시료로 사용하였다.

2) 사용된 시약

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 근감소를 유발하기 위한 statin 계열의 약물인 Atorvastatin은 (calcium salt hydrate, Cayman, MO, USA) cayman에서 구입하였다. Total RNA 분리를 위한 RNeasy® mini kit는 Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany)에서 구입하였으며, PCR을 위한 Maxima first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR는 Thermo에서(Thermo scientific, Waltham, USA), Western blotting에 사용한 antibody로 Bax, Bcl-2는 Novus (Novus Biologicals, USA)에서 구입하였고, cleaved caspase-3, caspase-3, β -actin는 Cell Signaling (Beverly, MS, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 세포배양 및 근 손실 유도

Myoblast cell line인 C2C12 cells은 ATCC®를 통하여 구입하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, 1% penicillin(100 U/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) 배지로 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식시켰다. 충분히 증식된 myoblast를 myotube로 분화를 유도하기 위하여 2% horse serum 및 1% penicillin이 첨가된 DMEM 배지로 6일 동안 배양 2일 간격으로 교체하여 유도하였다. 한편 근 위축 유도하기 위하여 statin계열인 Atorvastatin (calcium salt hydrate, Cayman, MO, USA)을 5, 10, 20 uM 농도로 처리하여 근 위축을 유도하였으며, Yeh 등³⁰⁾의 실험 방법을 참고하여 근 손상정도에 대하여 myotube의 길이와 두께를 광학현미경(Olympus CKX41; Olympus) 측정하여 atorvastatin에 대한 근 위축의 손상 정도를 결정하였다.

2) 세포독성평가 (cell cytotoxicity assay)

S-P(상황-오미자박) 추출물에 대한 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay 방법을 이용하여 세포독성을 검증하였다. 배양한 C2C12 cell를 96 well plate에 1×10⁵ cell/ml 농도로 200 μ l씩 분주하여 24시간 동안 배양한

후, C2C12 cell에 각각 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml 농도의 추출물을 처리한 후 24시간 배양하였다. 24시간 후 5 mg/ml (DPBS)의 MTT 시약을 media에 5배 희석하여 각 well 당 100 μ l/well 씩 분주하였다. MTT 시약으로 반응 시킨 96 well을 하여 incubator에서 1시간 반응시킨 후 상층액을 제거하였으며, 이후 formazon을 DMSO 100 μ l씩 분주하여 용해시킨 후, plate를 마이크로 판독기(SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Reactive Oxygen Species(ROS) 함량 및 Glutathione(GSH) 함량 측정

C2C12 근육세포에서 세포 내 ROS 수준을 측정하기 위해, 24 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 분주하여 24시간 배양하였다. 세포가 90% 자랐을 때 2% HS 및 1% P/S를 함유한 DMEM으로 교체하여 분화를 유도하였으며, 배지는 2일마다 교체해주었다. 분화가 완료된 6일째에 S-P 추출물을 각각 50, 100, 200 (μ g/ml)의 농도로 처리하였으며, 24시간 뒤에 PBS로 씻어주고 10 uM atorvastatin 을 처리하여 근 위축을 유도하였다. 그 후 PBS로 씻어주고 각 well에 10 uM DCF-DA 1 mL씩 분주하여 30분 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양 후 PBS로 washing 하여 microplate reader(SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 excitation 485/20nm, emission 528/20nm에서 형광도를 측정하여 세포 내 ROS 수준을 측정하였다. 한편, GSH는 Glutathione assay kit(Cayman Co, USA)를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. S-P 추출물을 각각 50, 100, 200 (μ g/ml)의 농도로 처리하였으며, 상층액 50 μ g씩에 kit 내에 있는 assay cocktail을 150 μ g씩 넣어 암 조건에서 microplate shaker로 교반 후, microplate reader 를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Quantitative RT-PCR

C2C12 cell를 3×10⁵ cells/well로 6-well culture dish에 분주해 24시간 동안 배양하였고, 이후 6일 동안 분화를 유도하였으며, 근손실을 유도하기 24시간 전 S-P 추출물을 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 처리하였다. 근 손실이 유도된 후 media를 제거한 뒤 PBS를 이용하여 세척하고 RNeasy® mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용



하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 Spectrophotometer (Nanodrop)을 통하여 정량해, 1 μ g RNA를 Maxima frist strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR(Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. PCR bio syGreen blue Mix(PCR Biosystems, Pennsylvania, USA) 10 μ l와 primer 2 μ l가 포함된 혼합물 19 μ l와 cDNA 1 μ l를 polymerase chain reaction (PCR) 사이클을 40회 수행 하였다. 증합 효소 반응에 쓰인 primer의 정보는 Table 1에서 나타내었다.

5) Western blot

C2C12 cell로부터 분화 및 근 손실 관련 단백질의 발현을 Western blot으로 측정하였다. 먼저, C2C12 cell에 독성이 없는 농도범위에서 S-P 추출물을 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 처리한 후 근 손실을 유도하기 위하여 atorvastatin 을 24시간 처리하였다. 각 세포를

1× PBS로 3회 세척 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin) 0.1 ml로 lysis시킨 후 12,000 rpm에서 20 분 원심분리함으로써 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질의 농도를 protein assay solution으로 정량한 다음, 30 μ g 단백질을 5×sample buffer와 섞어 8-15% SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 분리된 gel상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각 membrane은 5% BSA로 실온에서 1시간 blocking 하였다. membrane에 분화 및 세포사멸, 근손실 관련 일차항체를 넣어 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척하였다. Membrane에 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체를 넣은 후 1시간 동안 실온에서 반응시키고 0.05% Tween이 포함된 TBS(1×TTBS)로 3회 세척한 후 ECL용액을 이용해 ChemiDoc™ touch imaging system (BioRad, California, USA)으로 분석하였다.

Table 1. Specific primer sequences for PCR

Target	Primer Sequences	
MyoD	Forward	5'-GATGGCATGATGGATTACAG-3'
	Reverse	5'-CTCCACTATGCTGGACAGG-3'
Myogenin	Forward	5'-AGTACATTGAGCGCCTACAG-3'
	Reverse	5'-GACGTAAGGGAGTGCAGATT-3'
MEF2	Forward	5'-TCCATCAGCCATTTCAACAA-3'
	Reverse	5'-GTTACAGAGCCGAGGTGGAG-3'
Myf5	Forward	5'-TGAGGGAACAGGTGGAGAAC-3'
	Reverse	5'-AGCTGGACACGGAGCTTTTA-3'
Myf6	Forward	5'-ATTCTTGCGGGTGC GGATTT-3'
	Reverse	5'-ACGTTTGCTCCTCCTTCCTT-3'
Atrogin-1	Forward	5'-CTGCCTGTGTGCTTACAAC-3'
	Reverse	5'-TGCTCTCTTCTGGGTAACA-3'
FoxO3 α	Forward	5'-ACAAACGGCTCACTTTGTCC-3'
	Reverse	5'-GTGCCGATGGAGTTCCTC-3'
Myostatin	Forward	5'-CTGTAACCTTCCCAGGACCA-3'
	Reverse	5'-GCAGTCAAGCCCAAAGTCTC-3'
MuRF1	Forward	5'-TGCCTACTTGCTCCTTGTGC-3'
	Reverse	5'-CACCAGCATGGAGATGCAGT-3'
Caspase-3	Forward	5'-TGGTGATGAAGGGGTCATTT-3'
	Reverse	5'-AGCCTCCACCGGTATCTTCT-3'
Bax	Forward	5'-CCTTTTTGCTACAGGGTTTC-3'
	Reverse	5'-TCCATATTGCTGTCCAGTTC-3'
Bcl-2	Forward	5'-GATTTCTCCTGCTGTCTCT-3'
	Reverse	5'-TGTGTGTGTGTGTTCTGCTT-3'

6) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean±SD)로 계산하였다. 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA로 분석하였고, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

Ⅲ. 결과

1. 근육세포 분화 및 근감소 세포모델 구축

먼저, S-P 추출물의 근감소에 대한 효과를 살펴보기

전, C2C12 cell의 근아세포(myoblast) 상태에서 이를 근관세포(myotube)로 분화시켜 근관세포의 형태를 관찰하였다. 2% HS(Horse Serum)으로 근아세포를 근관세포로 분화하는데, 8일까지 세포의 형태를 살펴본 결과, 2일째부터 근관세포로 분화되는 것을 관찰할 수 있었고, 6일차에서는 완전한 근관세포의 형태를 이루는 것을 알 수 있었다(Fig. 1A). 또한 8일차 부터는 근관세포로 분화된 myotube의 길이의 변화는 6일차와 비교하였을 때, 큰 변화는 없었지만, 두께는 감소하는 것으로 보아(Fig. 1B)근관세포의 분화 조건은 6일차로 고정하고, 이후 실험을 진행하였다.

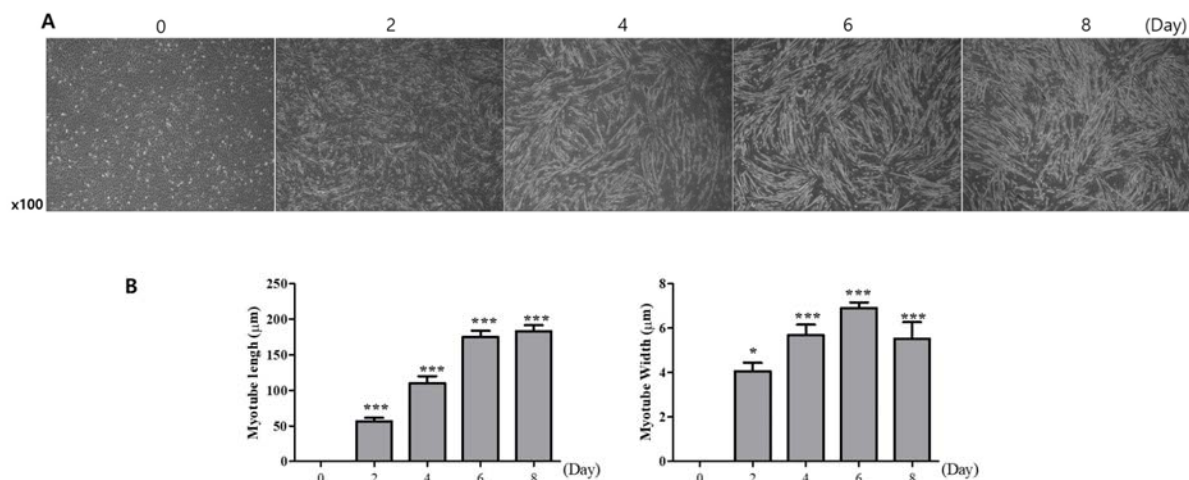


Fig. 1. Differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. (A) Differentiation of myoblasts was induced for 8 days in differentiation medium containing 2% HS, and differentiation medium was changed every 2 days (B) Myotube length and widths in C2C12 myotubes. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. CTL group.

또한 근 손실 모델을 구축하기 위하여 atorvastatin을 처리하여 근감소를 일으키는지에 대하여 알아보았다. 근관세포로 분화된 6일차에 atorvastatin을 5, 10, 20 uM 농도로 처리한 결과 세포의 형태는 농도 의존적으로 손상을 받는 것을 확인하였으며(Fig. 2A), myotube의 길이 및 두께 역시 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 2B). 하지만, atorvastatin 10 uM 과 20 uM을 비교하였을 때, 길이와 폭의 감소가 그다

지 차이가 없었기에 본 연구에서는 atorvastatin 10 uM로 처리하였다. 이후, atorvastatin을 10 uM을 처리하여 24시간, 48시간 배양했을 때, 근감소에 대한 영향을 살펴보았다. 그 결과 24시간과 48시간을 처리하였을 때 myotube의 길이 및 두께는 큰 변화는 없는 것으로 보아(Fig. 2C,D) 본 연구에서는 atorvastatin 10 uM을 24시간 처리하여 근 손실 모델을 구축하였다.

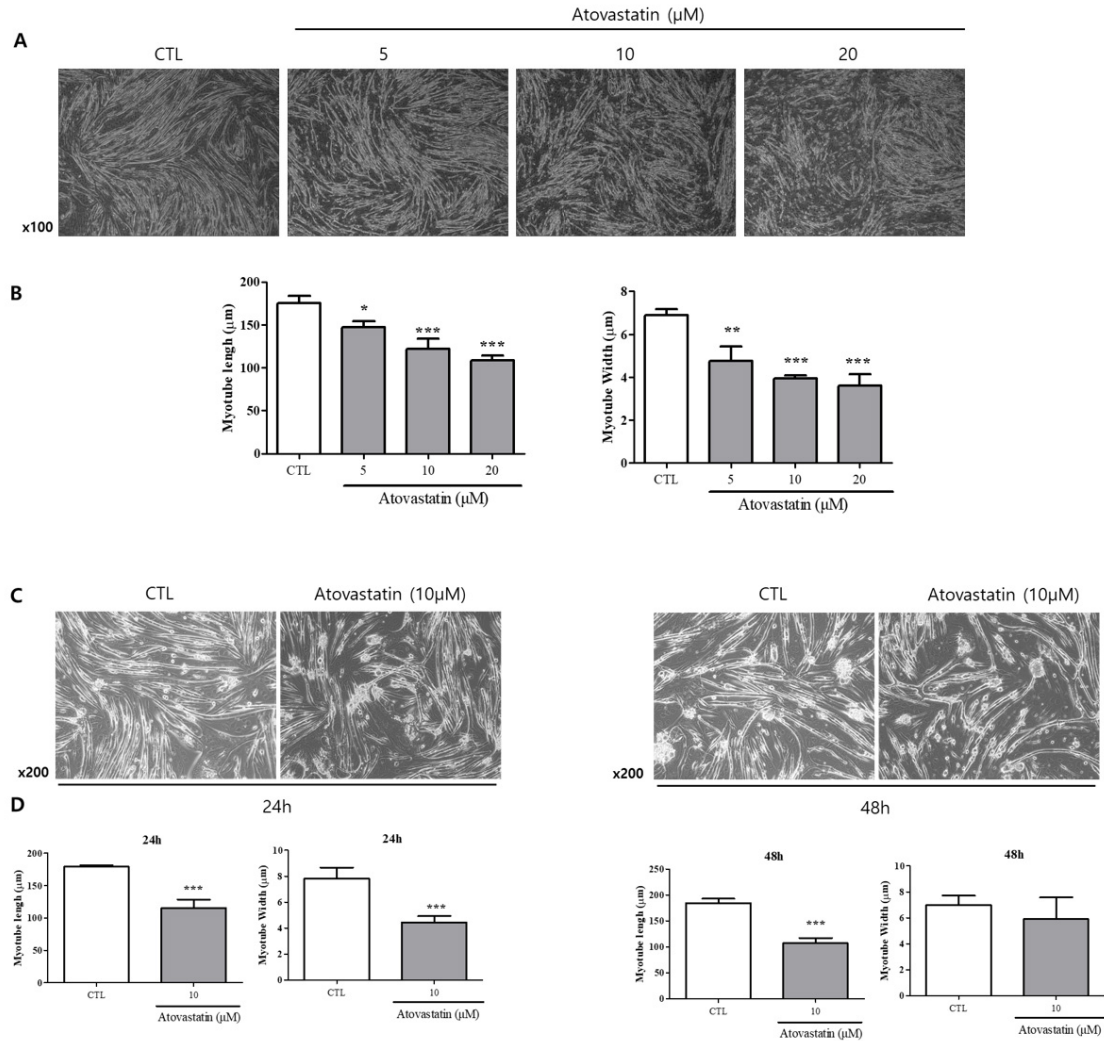


Fig. 2. Atorvastatin(ATV) treatment after differentiation induced myotube atrophy. (A) Change of cell morphology C2C12 myotubes treated with 0, 5, 10, and 20 uM ATV after differentiation. (B) Measurement of Myotube length and widths treated ATV in C2C12 myotubes. (C) Changes of cell morphology treated with ATV for 24 h and 48 h in C2C12 cell. (D) Measurement of Myotube length and widths treated ATV for 24 h and 48 h in C2C12 cell. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. ** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. CTL group.

2. S-P 추출물의 세포 독성평가 및 세포 형태 관찰

S-P 추출물에 대한 세포 독성 및 적정 농도의 범위를 알아보기 위하여 S-P 추출물을 C2C12 cell에 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 µg/ml 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 MTT assay 방법으로 세포독성을 측정하였다. 그 결과, C2C12 근아세포의 생존율에는 영향을 미치지 않았으며 (Fig. 3A) 이후의 실험에서는 최

대 200 µg/ml 까지 사용하였다. 또한, C2C12 근관세포에도 S-P추출물은 200 µg/ml를 처리한 후, 근관세포의 형태를 관찰 한 결과, atorvastatin 에 의해 근 감소가 유도되었음을 확인하였고, S-P추출물은 처리한 그룹에서는 myotube의 길이 및 두께가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3 B,C).

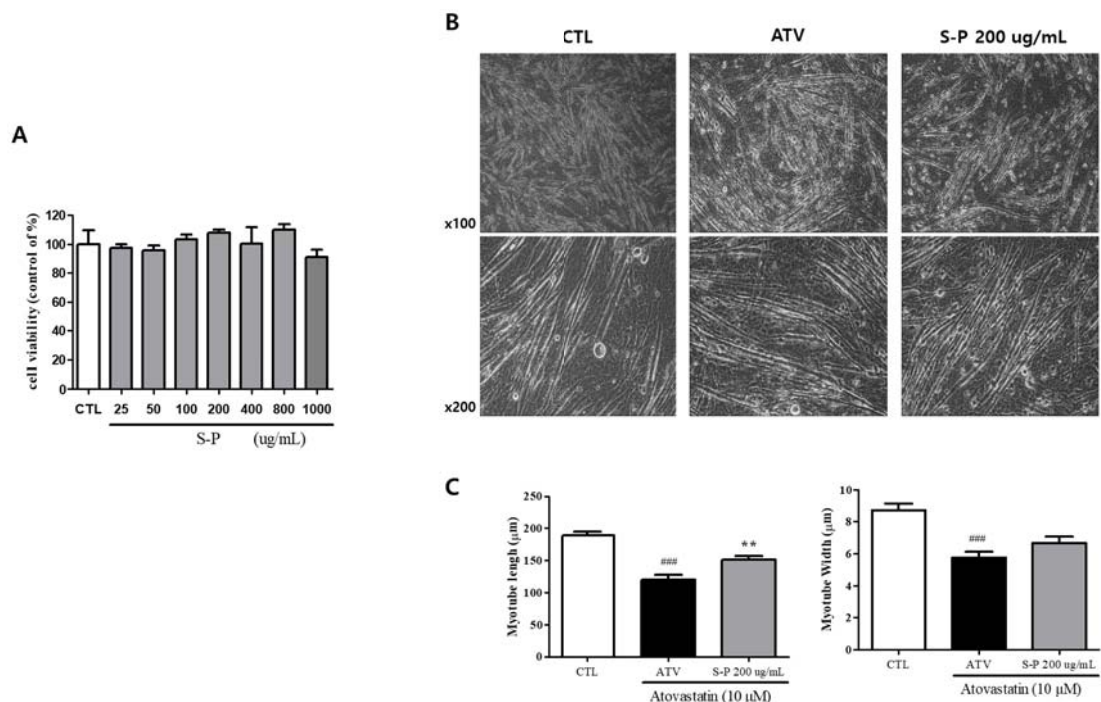


Fig. 3. Cell viability of C2C12 cells treated S-P extract. (A) Cytotoxic effects of S-P extract in C2C12 cell. (B) Change of cell morphology in C2C12 myotubes treated with 10 uM ATV and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ S-P extract after differentiation. (C) Measurement of Myotube length and widths treated ATV for 24 h and 48 h in C2C12 cell. C2C12 cells were treated with ATV (10 uM) with S-P extract (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. ###p<0.001 vs. CTL ; **p<0.01 vs. ATV group.

3. 근관세포에서 S-P 추출물의 Glutathione 및 ROS 생성에 대한 효과

S-P추출물에 대하여 ROS 및 glutathion의 생성에 대한 영향을 살펴보기 위하여 S-P추출물을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하였다. atorvastatin 을 처리한 그룹에서는 Control군과 비교하였을 때, GSH 농도가 40% 감소하였음을 확인하였고(Fig. 2A), 추출물을 처리한 그룹에서는 유의하게 GSH의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서는 $67.60 \pm 2.32\%$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서는 $73.67 \pm 4.59\%$ 로 회복되는 것을 확

인하였다(Fig. 4A). 또한 ROS의 생성량은 atorvastatin 을 처리한 그룹에서는 control군과 비교하였을 때, ROS의 수치가 178.56 ± 5.16 으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 추출물을 처리한 그룹에서는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서는 $140.28 \pm 2.82\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서는 $108.35 \pm 7.50\%$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서는 $105.67 \pm 6.26\%$ 로 추출물의 농도의존적으로 유의하게 ROS의 생성량을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4B).

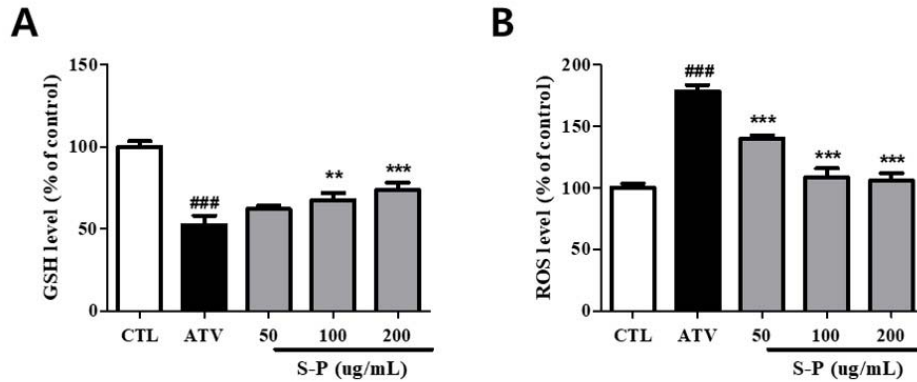


Fig. 4. The Effect of S-P extract on GSH(A) and ROS(B) levels in C2C12 myotubes. C2C12 cells were treated with ATV (10 μ M) with various concentration of S-P extracts (50, 100 and 200 μ g/ml) for 24h. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. ###p<0.001 vs. CTL ; **p<0.01 and ***p<0.001 vs. ATV group.

4. S-P추출물의 근육 생성/분해에 관련된 mRNA 발현 변화에 대한 효과

C2C12 cell을 myotube로 분화시킨 후 atorvastatin 으로 근 위축을 유도한 모델에 S-P 추출물이 근육세포 생성 및 단백질 분해 인자에 영향을 미쳤는지 확인하기 위해 근위축 유도 24시간 전 S-P 추출물을 50, 100, 200 μ g/ml을 처리하여 mRNA의 발현을 살펴보았다. Fig. 5A는 근육세포 생성에 관여하는 전사인자에 대한 mRNA의 발현양을 조사한 것으로, Myo-D, Myogenin, MEF2, Myf5, Myf6의 mRNA의 발현양이 atorvastatin 을 처리하였을 때, control군과 비교하였을 때, 모든 인

자에서 약 50%정도 감소하는 경향을 보였으며, S-P 추출물을 농도별로 처리하였을 때, 100 μ g/ml 농도 이상에서는 대부분 농도 의존적으로 발현양이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 5A). 또한, 근육세포 단백질 분해에 관여하는 인자인 Atrogin-1, MuRF-1, FoxO3 α 및 Myostatin에 대하여 mRNA 발현량 변화를 검토해 본 결과, atorvastatin 처리에 의해 모든 인자에서 발현양이 증가됨을 확인 할 수 있었으며, S-P 추출물 처리시, 대부분의 농도에서 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B).

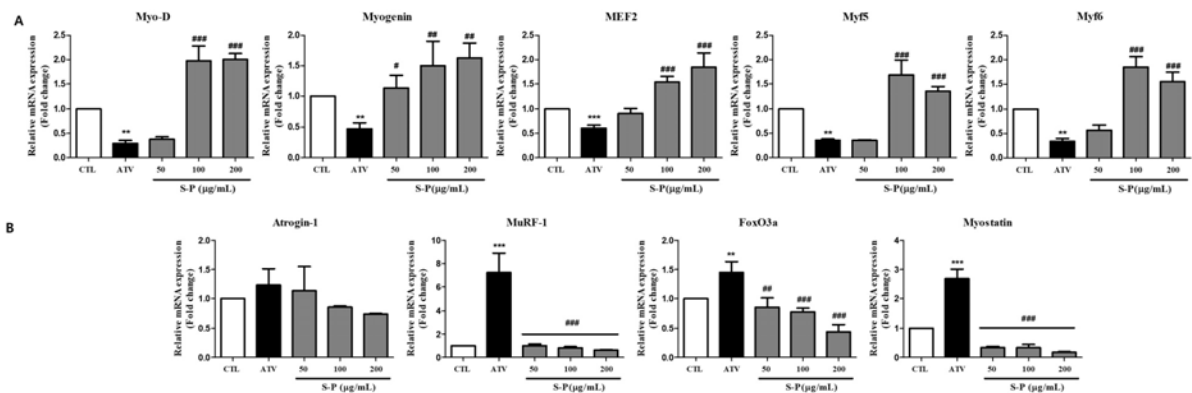


Fig. 5. Effect of S-P extract on the Atorvastatin induced muscle atrophy in C2C12 myotube. Total RNAs were extracted using Trizol reagent and mRNA was measured using qRT-PCR. The fold changes relative to the control were calculated using the $\Delta\Delta CT$ method for mRNA expression levels of muscle-specific transcription genes. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. **p<0.01 and ***p<0.001 vs. CTL ; #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. ATV group.

5. 근관세포에서 S-P 추출물의 세포사멸 관련 인자들의 발현 변화에 대한 효과

일반적으로 노화 골격근에서 활성산소는 근감소증을 유발하는데 핵심적인 원인으로 이는 근육세포의 미토콘드리아의 기능을 저하시키고, 결국에는 세포사멸을 유발하게 된다. 본 연구에서도 atorvastatin 으로 유도된 근감소 세포모델에서 S-P 추출물이 근육세포의 세포사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포사멸과 관련된 주요한 조절인자인 bax, bcl-2, caspase-3, cleaved-caspase-3의 발현양을 살펴보았다. 그 결과, atorvastatin 으로 유도된 근감소 그룹에서는 caspase-3 및 Bax의 mRNA 발현양을 증가시켰으며, Bcl-2의 발현은 감소하는 것으로 나타났다. 또한, Bax/Bcl-2의 비율을 비교해

봤을 때, S-P 추출물에 의하여 mRNA의 발현양이 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6A) 한편, S-P 추출물의 세포사멸과 관련된 단백질의 발현양을 살펴보기 위하여 C2C12 근관세포에 S-P 추출물과 atorvastatin 을 처리한 후, 관련 단백질을 western blot 을 통하여 확인해 보았다. 예상된 바와 같이, atorvastatin 을 처리한 그룹에서는 cleaved-caspase-3의 발현양과 caspase-3의 발현양 및 Bax/Bcl-2의 발현양을 control 그룹과 비교해 봤을 때, 세포사멸과 관련된 단백질의 발현양을 유의하게 증가시켰으며, S-P 추출물을 처리한 그룹에서는 농도의존적이지는 않지만 추출물 처리군에서 유의하게 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

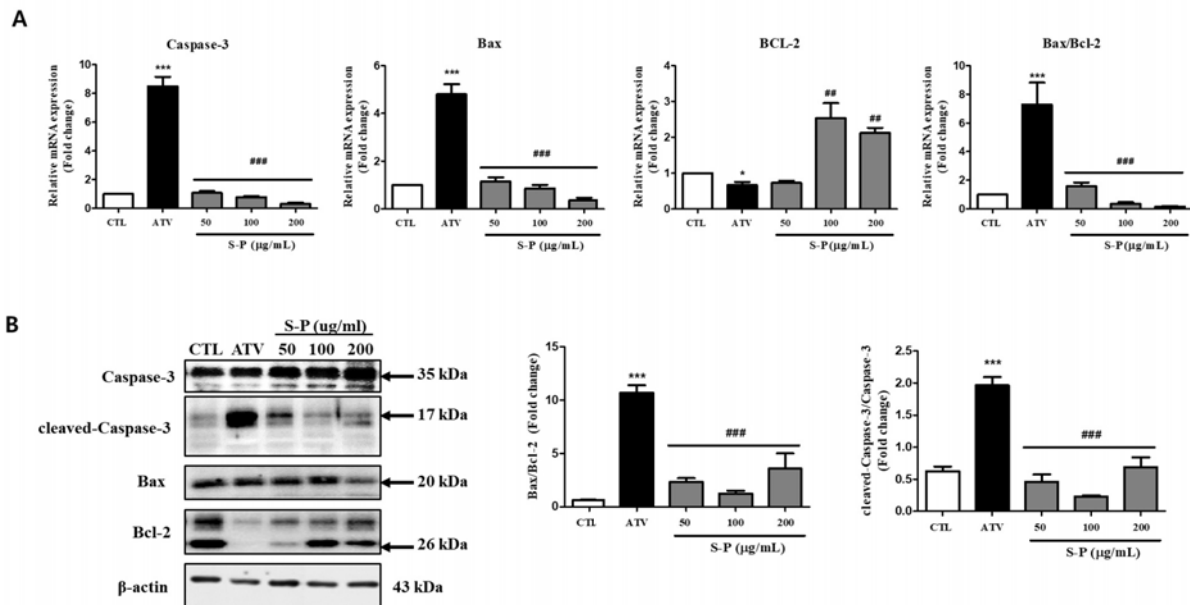


Fig. 6. Atrophy-related apoptosis in ATV treated C2C12 myotubes. The expression of Bax/Bcl2 and cleaved-caspase-3/caspase-3 mRNA and proteins expression by qRT-PCR and western blot. Cells treated with S-P extract (50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the absence or presence of 10 μM ATV for 24 h. The fold changes relative to the control were mRNA expression levels of apoptosis genes and the intensity of the protein band was normalized against the internal control β -actin. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. *** $p < 0.001$ vs. CTL ; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. ATV group.



IV. 고찰

고령화는 전세계적인 문제로, 나이가 들어감에 따라 신체적으로는 근육과 관련된 단백질 합성에 대한 능력이 감소되고, 운동량이 부족해지면서 신경 근육의 퇴화, 근육 대비 지방량 변화 등의 원인으로 근감소증이 발생한다¹⁾. 이러한 근감소증은 2016년 세계보건기구(WHO)에 정식적으로 질병코드가 부여되면서, 주목을 받고 있는 질환이지만, 현재 치료제는 딱히 없는 실정이다. 근감소(근육손실)는 대략 30세에 시작되면서 평생동안 진행되는 과정으로 이러한 진행단계에서 근육량과 근력의 점진적인 손실로, 노화의 영향을 많이 받는다. 한편, 고령화의 추세와 더불어 우리나라의 심혈관 질환과 관련된 사망자의 수도 증가하는 추세에 있다²¹⁾. 특히, 콜레스테롤이 풍부한 지단백이 축적되면서 발생하는 동맥경화증은 전세계적으로 중요한 사망 원인이며 동맥경화증에 의한 성인의 사망률의 비율은 미국, 일본의 경우 약 50%, 한국의 경우 약 35% 정도에 이른다²²⁾. 동맥경화로 진단이 되면 동맥경화의 진행을 막기 위해 금연, 저지방식, 혈당조절, 혈압조절 등의 환자 본인의 자기 관리가 필요하지만, 대부분 약물로 예방적 치료를 받게 되는데, 이러한 약물의 종류는 아토바스타틴(atorvastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로바스타틴(lovastatin), 심바스타틴(simvastatin) 등이 있다. 이러한 스타틴 계열의 약물은 대체로 안전성이 있으며, 저밀도 지단백의 혈중 농도를 탁월하게 낮추기는 하지만, 횡문근용해증이나, 근육병증과 같은 부작용이 알려지면서, 이에대한 부작용의 연구도 활발히 진행 중에 있다. 본 연구에서도 분화가 유발된 myotube에서 atorvastatin을 이용하여 인위적인 근위축이 유도되는지 확인을 하였고(Fig. 2), 근위축이 유도된 세포모델에서 S-P(상황-오미자박 고상발효물) 추출물에 대하여 근 감소와 관련된 기전연구를 수행하였다.

먼저 atorvastatin에 대하여 근위축을 유발하는지 확인하기 위하여 C2C12 세포를 myotube로 6일 동안 분화를 유도한 후 농도/시간별로 처리하였다. Atorvastatin에 의하여 분화된 근육세포들이 길이와 굵기가 약해지는 것을 확인하였으며, 본 연구에서 10 uM의 농도로 24시간 처리를 하였을 때, atorvastatin이 독성 없이 근 감소를 유도하는 것으로 확인되었다(Fig. 1, 2). 또한 S-P 추출물의 근감소에 대한 관련 기전을 알아보기 전에 추출물에 대하여 독성에 대한 영향이 있는지를 확인을 하

기 위하여 S-P 추출물을 농도별로 처리한 결과, 추출물 농도 범위인 25 ~ 1000 µg/ml 범위에서 세포생존율에 대하여 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인하였으며, 약물의 효능평가를 위하여 200 µg/ml에서 myotube의 길이 및 두께를 측정해 보았을 때, S-P 추출물이 근위축에 대한 효능이 확인되어 (Fig. 3) S-P 추출물 200 µg/ml을 최대 용량으로 하여 실험을 진행하였다.

노화와 관련된 여러 질환을 살펴보면, 근력의 부족과 깊은 관계가 있는 것을 알 수 있다. 골격근 세포는 분화과정에서 자발적인 세포 융합과정을 통하여 근관조직을 이루게 되는데, 근 감소증이 나타나게 되면, 근육세포에 활성산소가 증가하게 되고, 이는 산화스트레스로 이어지게 된다. 특히 glutathione과 항산화 효소인 SOD는 산화스트레스와 관련된 대표적인 인자로서, glutathione은 대사효소 중의 하나로 Glutathione-S-Transferase (GST)와 같은 효소의 작용으로 체내 독성물질들을 제거하며, SOD는 항산화 기전에 관여하고 있는 효소로, 활성산소에 의한 세포손상에 대응하는 가장 강력한 항산화 작용을 한다²³⁾. 본 연구에서는 atorvastatin으로 유도한 근감소 세포모델에서 GSH 및 SOD의 함량을 측정 한 결과 atorvastatin에 의해 GSH는 감소하였으며, SOD는 증가하는 것으로 보아, 근육의 분화가 atorvastatin에 의해 감소되는 것을 확인 할 수 있었으며, S-P 추출물에 의해 atorvastatin에 의해 감소된 GSH 함량이 농도 의존적으로 증가하였고(Fig. 4A), ROS의 경우, atorvastatin이 myotube 세포 내 ROS의 생성을 증가시켰으나, S-P 추출물을 전처리 함으로써, 증가된 ROS를 GSH와 마찬가지로 추출물에 대하여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4B).

근육분화(Myogenesis)는 골격근이 여러 분화단계를 거치면서 근섬유를 이루는 과정을 일컫는다. myoblast가 myotube로 분화하는 첫단계는 MyoD와 Myf-5의 발현이 증가하게 되고, 이는 근육모세포로 유도하는 역할을 하며, 이로서 myogenin의 발현을 시작으로 1차 융합(Primary fusion)이 일어나면서 신생 근관을 형성하게 된다²⁴⁾. 이후 MRF4의 발현이 증가되고 이차 근육 생성 조절인자인 Myf-6, myocyte enhancer factor 2(MEF2)에 의해 2차 융합(secondary fusion)이 진행되면서 myotube를 형성하게 되고, maturation이 일어나면서 myofibril이 형성된다. 한편, 근감소에 따른 기전은 근육단백질 분해, 근육세포의 세포사멸, 유비퀴틴 단백질의 분해, 위성세포의 활성 저하 등 여러 기전이 관

여하게 된다²⁵). 근육이 생성되는 과정에서 근육 단백질 분해에 미치는 대표적인 분해기전은 ubiquitination system으로, myostatin은 골격근에 의해 생성되는 (TGF- β) protein family의 일종으로, 골격근이 일정 크기 이상으로 비대해지거나 과도하게 성장되는 것을 조절하는데 관여한 myokine이다²⁶). 또한 Forkhead Box O Transcription Factors (FoxOs)는 전사인자로서 myostatin이 mad 2/3의 전사인자를 매개로 하여 FoxO를 활성화하게 되고, 세포 핵내로 이동하게 되면, Muscle Ring Finger-1(MuRF-1) 및 atrogen-1의 발현을 활성화하여 근육 단백질의 분해를 유발하게 된다²⁷). 따라서 본 연구에서는 atorvastatin에 의하여 유발된 근위축 현상에서 S-P 추출물이 근육세포 분해와 더불어 생성에 관여하는 인자들에 대하여 어떤 영향을 미치는지를 확인하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 atorvastatin 처리에 의하여 근손상이 유발되어 근육의 위축 일어나는 조건하에서 근육세포 생성 및 분화에 관여하는 전사인자인 Myo-D, myogenin, MEF2, Myf5, Myf6의 경우 control 그룹에 비하여 mRNA의 발현이 유의하게 감소함을 확인할 수 있었으며(Fig. 5A), S-P 추출물을 처리한 그룹에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 대부분 근육세포 생성에 관여하는 전사인자들의 발현을 증가시켰다. 또한 근육세포 단백질 분해에 관여하는 전사인자인 atrogen-1, MuRF1, FoxO3 α 및 myostatin의 mRNA 발현양을 살펴본 결과, atorvastatin에 의하여 증가된 전사인자들이 S-P 추출물을 처리함으로써 감소함을 확인하였다(Fig. 5B). 이를 통해 S-P 추출물은 근육세포 위축과 관련된 근육세포 분화/생성인자 및 근육세포 단백질 분해를 억제함으로써 atorvastatin에 의한 근위축을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

세포 사멸사는 조직의 재생, 항상성 유지 및 성장과 관련하여 매우 중요한 생리 과정이지만, 나이가 들어감에 따라 나타나는 생리적 변화는 근육세포의 세포사멸사를 급격히 가속화 한다는 특징이 있다. 이는 노인 인구에서 나타나는 근감소와 상관성이 매우 높지만, 이와 관련하여 세포사멸사가 가속화되는 기전은 아직 완전하게 알려지지는 않았다. 하지만, 앞서 설명한 산화스트레스를 비롯한 만성 염증 등이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 다핵세포로 구성된 근육세포들의 수가 감소하는 것을 특징으로 하는 근핵세포 사멸(myonuclear apoptosis)가 나타난다²⁸⁻²⁹). 이러한 세포사멸은 caspase가 가장 중요하게 인자로 세포사멸에 필수적인 역할을 한다. 특히, caspase-3는 다양한 기질을 파괴하는 주된

effector caspase로 알려져 있다. cell membrane으로부터 세포사멸이 일어나게 되면 pro-apoptosis factor인 bax(bcl-2-associated X protein) 활성이 증가하게 되고 상대적으로 anti-apoptosis factor인 Bcl-2의 발현은 억제됨으로써 미토콘드리아 외막에 있는 cytochrome c의 방출을 유도하게 된다. 방출된 cytochrome c는 pro-caspase-9과 APAF(apoptotic protease activating factor)-1과 함께 apoptosome을 형성하게 되고 이는 caspase-3의 활성을 증가함으로써 PARP cleavage를 일으키고, DNA fragmentation이 증가됨으로써 세포사멸이 일어나게 되는 것이다. 본 연구에서는 atorvastatin에 의하여 유발된 근위축 현상에서 S-P 추출물이 근육세포의 세포사멸에 관련된 Bax/Bcl-2 및 cleaved-caspase-3/caspase-3의 발현양을 살펴본 결과, S-P 추출물을 처리한 그룹에서 유의하게 세포사멸을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

이상의 결과들로 분화된 근육세포에 atorvastatin으로 유도한 근위축 세포모델에서 S-P 추출물에 대한 근감소 효능을 확인하였다. S-P 추출물은 근육세포 분화/생성 및 단백질 분해와 관련된 인자들을 활성화하고, 근육세포의 사멸을 억제함으로써 atorvastatin에 의해 유도된 근위축 세포모델에서 근감소를 회복시키는 것을 확인할 수 있었다.

V. 결론

본 연구에서는 atorvastatin에 의해 유도된 근위축 세포모델에서 상황-오미자박 추출물인 S-P 추출물에 대하여 근 감소에 대한 효능을 확인하였다. S-P 추출물은 근육세포에서 독성을 유발하지 않은 농도에서 atorvastatin으로 유도된 근위축 세포모델에서 근육세포의 단백질 생성 및 분해에 관여함은 물론 근육세포의 세포사멸을 억제함으로써 근감소에 대한 효능을 가진다는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 추후 동물모델 및 인체적용시험을 통한 유효성의 입증에 필요하겠지만, 오미자를 활용한 후 남은 오미자박을 이용한 소재로서 기능성을 확인하였고, 이러한 소재에 대한 활용도를 증가시키므로써, 친환경 추세에 맞춰 탄소 중립 목표를 기반으로 한 리사이클링 산업 소재로의 개발 가능성을 제시할 수 있다고 사료된다.



감사의 글

본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 야생생물 유래 친환경 신소재 및 공정기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다. (RE202101318, 한국한의학연구원 ERT2111080).

References

- Fried LP, Xue QL, Cappola AR, Ferrucci L, Chaves P, Varadhan R, et al. Nonlinear multisystem physiological dysregulation associated with frailty in older women: implications for etiology and treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009; 64:1049-1057.
- Wilson D, Jackson T, Sapey E, Lord JM. Frailty and sarcopenia: The potential role of an aged immune system. *Ageing Res Rev* 2017;36:1-10.
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *J Gerontol: Series A.* 2001;56:M146-M157.
- Habukuihakwon. youngchu-kyungkyosuk. Beijing: Inminwisheng publisher; 1982:161,24.
- SJ Hwang, JM Lim, BH Ku, DM Cheon, YJ Jung, YS Kim, TW Oh. Effects of polysaccharide (polycan) derived from black yeast in dexamethasone-induced muscle atrophy cell model. *Herb Formula Sci.* 2021;29(1):45-55.
- Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, et al. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1623-30.
- Shelina MJ, Mark JE, Stavroula C. Rhabdomyolysis associated with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Am Heart J.* 2004;147: 956-965.
- Stamler J, Wnetworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screens of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986;256:2823-2828.
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003; 361:2005-2016.
- Huang F, Xiong Y, Xu L, Ma S, Dou C. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from *Fructus Schisandrae* in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2007;4:110(3):471-475.
- Wei B, Li Q, Su D, Fan R, Zhao L, Geng L, He B, Chen X, Jia Y, Bi K. Development of a UFLC-MS/MS method for simultaneous determination of six lignans of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. in rat plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and insomnic rats. *J Pharm Biomed Anal.* 2013; 15:77:120-127.
- Panossian A, Wikman G. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol.* 2008; 23:118(2):183-212.
- Lee JY, Min YK, Kim HY. Isolation of antimicrobial substance from *Schizandra chinensis* Baillon and antimicrobial effect. *Korean J Food Sci Technol.* 2001;33:389-394.
- Yeo SG, Ahn CW, Lee YW, Lee TG, Park YH, Kim SB. Antioxidative effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J Korean Soc Food Nutr.* 1995;24:299-304.
- Ko BS, Park SK, Choi SB, Jun DW, Choi MK, Park SM. A study on hypoglycemic effects of crude extracts of *Schizandrae Fructus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2004;47:258-264.
- Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. Antimicrobial activity of Omija (*Schizandra chinensis*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2001;30:127-132.
- Zhu M, Lin KF, Yeung RY, Li RC. Evaluation of the protective effects of *Schisandra chinensis* on phase I drug metabolism using a CCl4 intoxication model. *J Ethnopharmacol.* 1999;67:61-68.

18. Xing J, Guo Y, Hu H, Qu XL, Sun XZ, Liu SH, Wang H. A herbal composition of Semen Hoveniae, Radix Puerariae, and Fructus Schisandrae shows potent protective effects on acute alcoholic intoxication in rodent models. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;638197. doi: 10.1155/2012/638197.
19. Cheng N, Ren N, Gao H, Lei X, Zheng J, Cao W. Antioxidant and hepatoprotective effects of Schisandra chinensis pollen extract on CCl₄ induced acute liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 2013;55:234-240.
20. Lu Y, Chen DF. Analysis of Schisandra chinensis and Schisandra sphenanthera. *J Chromatogr A.* 2009;13(11):1980-1990.
21. Cebron Lipovec N, Schols AMWJ, van den Borst B, Beijers RJHCG, Kosten T, Omersa D, Lainscak M. Sarcopenia in advanced COPD affects cardiometabolic risk reduction by shortterm high-intensity pulmonary rehabilitation. *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17(9):814-820.
22. Park SH, Park JH, Song PS, Kim DK, Kim KH, Seol SH, Kim HK, Jang HJ, Lee JG, Park HY, Park JS, Shin KJ, Kim DI, Moon YS. Sarcopenic obesity as an independent risk factor of hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2013;7(6):420-425.
23. Esther A, Joan AB, Josep R, Jose CF. Glutathione Depletion Impairs Myogenic Differentiation of Murine Skeletal Muscle C2C12 Cells through Sustained NF- κ B Activation. *Am J Pathol.* 2004;165(3):719-728.
24. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2). pii: a008342.
25. Gomes MD, Lecker SH, Jague RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14440-14445.
26. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-1708.
27. Williamson DL, Raue U, Slivka DR, Trappe S. Resistance exercise, skeletal muscle FOXO3A, and 85-year-old women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010;65:335-343.
28. Braga M, Sinha Hikim AP, Datta S, et al. Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. *Apoptosis* 2008;13:822-832.
29. Dupont-Versteegden EE. Apoptosis in muscle atrophy:relevance to sarcopenia. *Exp Gerontol* 2005;40:473-481.
30. Yeh TS, Hsu CC, Yang SC, Hsu MC, Liu JF. Angelica Sinensis promotes myotube hypertrophy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14(1):144.