

골격근 손상에 대한 “麝香舒活精” 치료 효과에 대한 조직형태학적 관찰

김진항 · 송제호^{1*}

한양대학교 체육대학, 1:원광대학교 생활과학대학 뷰티디자인학부

Histological Analysis Effect of "Sexiang Shuhuo Jing" for after Skeletal Muscle in Rats

Jin Hang Kim, Je Ho Song^{1*}

College of Physical Education Hanyang University,

1: Department of Beauty Design College of Human Environmental Science Wonkwang University

The aim of this experiment was to observe and analysis clinical effect of the "Sexiang Shuhuo Jing" on histological change for 14days after skeletal muscle injury in rats. The gastrocnemius muscles of rats were damaged by electromechanical and serial cryosections of the damaged muscle were prepared at 1, 5, 10, 14 days after injury. Muscle sample of the both control and "Sexiang Shuhuo Jing" treated group were prepared for histological analysis by optical microscope and electron microscopy. "Sexiang Shuhuo Jing" treatment group's skeletal muscle recovery was much more faster than control group. After 5 day's "Sexiang Shuhuo Jing" treatment group's basically recovery normal structure of muscle fiber. After 14 day's control group's damaged muscle were basically recovery structure of muscle fiber but still has some factor of pathological impression but in Sexiang Shuhuo Jing treatment group's can't be found that.

Key words : Sexiang Shuhuo Jing treatment; skeletal muscle injury; histological analysis

서 론

골격근은 손상의 요인에 따라 근섬유의 변성, 위축 및 재생 과정에서 나타나는 양상이 다양한 것으로 알려져 있다. 골격근에 물리적 손상을 주면 근섬유들은 변성과 동시에 재생이 일어난다¹⁾.

일반적으로 근섬유의 파열이나 외상에 의한 조직 손상은 세포막이나 소포체 등을 손상시키며, 수축단백질이나 막의 붕괴를 초래한다²⁾. 급성손상에 있어서 조직 내 반응을 보면 조직의 온도를 상승시키는 등 일련의 염증 반응을 일으키며^{3,4)}, 염증 반응의 특징은 혈류의 증가 및 백혈구를 손상부위 주변에 침윤시키는 것이라고 할 수 있다. 염증에 의한 혈류의 증가는 국소적으로 부종과 종창을 일으키며, 활성화된 백혈구는 혈관 밖으로 누출액(transudate)을 형성해 국소 상해 등을 일으키는 것으로 알려져 있다^{5,6)}.

근육의 재생과정은 근발생(myogenesis)과정을 반복한다. 근육이 손상되면 근형질막(sarcolemma)과 기저막(basal lamina) 사이에 위치한 근위성세포(myosatellite cell)가 근모세포(myoblast)로 분화된다. 근모세포들은 융합되어 근관(myotube)을 형성하고 이어 성숙한 근섬유로 재생된다⁷⁾.

일반적으로 골격근 손상은 직접적인 근육의 외상(trauma)에 의한 타박상(contusions), 열상(laceration), compartment syndrom과 근육의 과도한 신장성 수축(eccentric contraction)에 의한 국소적 상해(micro injury)로 구분되어 진다⁸⁾. 골격근은 손상의 요인에 따라 근섬유의 변성, 위축 및 재생 과정에서 나타나는 양상이 다양한 것으로 알려져 있다^{9,10)}. 골격근에 물리적 손상을 주면 근섬유들은 변성과 동시에 재생이 진행 된다⁸⁾. 이러한 골격근 손상 후 치료와 재생을 위한 물리요법(초음파, 냉각, 마사지 등), 약물요법(마취요법, 근육안정제, 외용약 등) 등의 임상적 수단이 활용되고 있으나 근섬유 구조의 특성과 비 개방성의 손상 등의 이유로 효과적인 치료 방안이 미미한 실정이다.

이에 본 연구는 한약재를 이용한 골격근 손상의 치료와 효

* 교신저자 : 송제호, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 생활과학대학

· E-mail : sjhao@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6895

· 접수 : 2006/10/04 · 수정 : 2006/10/27 · 채택 : 2006/11/21

과를 관찰하기 위하여 비 개방형의 골격근 손상 모형을 제작 한 후 14일간에 걸쳐 한약제를 이용한 치료를 수행한 후 골격근의 조직형태학적 관찰하여 골격근 손상에 대한 한약재 치료의 효과를 관찰함으로써 골격근 손상의 치료에 대한 대안 제시의 기초 자료를 제공하는데 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에 사용된 실험동물은 생후 7주령(200±14.03g)의 Sprague-Dawley계 54마리의 Rat으로 하였다. 실험동물의 사육실 온도는 21.0±2.0℃, 습도는 60%를 유지하였으며, 명암의 주기는 12시간씩 되도록 하였다.

2. 실험방법

1) 집단분류

1주일 동안의 적응 기간과 골격근 손상 모형을 제작한 후 한약제 치료의 효과를 관찰하기 위하여 각 시기별로 6마리씩의 실험쥐를 대조군(자연회복)과 실험군(한약재 치료)으로 무선배정하였으며, 손상직후 및 손상 후 1일, 5일, 10일, 14일 등 14일간 골격근 손상에 대한 치료와 관찰을 실시하였다.

2) 골격근 손상 모형의 제작

골격근 손상 모형의 제작을 위하여, 먼저 실험용 쥐의 복강에 마취약(pentobarbital sodium; 6.5mg/100g)을 투여하여 마취시킨 후, 본 연구자에 의하여 제작된 동물용 거치대 위에 상지부위를 고정시켰다. 손상을 유발 시킬 우측하지는 45도 각도로 고정시킨 후 발목 부위를 유리시켜 발바닥 부위를 넓직한 발판대에 고정시켰다. 쥐의 발판대를 무탄력성의 끈으로 연결하여 동일 높이의 머리부위에 있는 지지대를 통과시켜 쥐 체중의 150%(300g)에 해당하는 추와 연결시켰다.(Fig. 1)

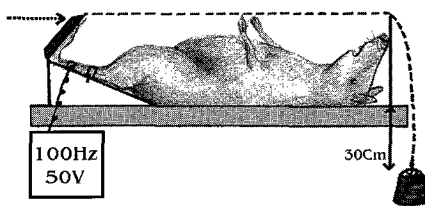


Fig. 1. 골격근 손상 제작 모형도

쥐의 고정이 완료된 후 생리전기자극기를 이용하여 쥐의 비복근에 전류(100Hz, 50V)를 흐르게 하여 강한 단축성 수축(concentric contraction)을 일으키게 함과 동시에 쥐의 발판과 연결된 추를 30cm 높이로 강하시켜 수축 방향과 정반대의 방향으로 강제 수축(eccentric contraction)토록 하여 골격근 손상이 유발되도록 하였다. 골격근 손상의 확인을 위하여 근섬유의 조직절편에 대한 조직형태학적 관찰을 실시하였다.

3) 한약제 및 치료방법

본 실험에 사용된 한약제는 무한체육대학(중국) 제약장에서

제작한 “麝香舒活精”으로 사향, 생지황, 장뇌, 당귀, 박하, 삼철로 구성되었으며, 益氣補血 등의 성능을 지닌 분사형의 한약제이다. 골격근 손상 모형이 완료된 후 14일간의 실험기간동안 한약제 치료군의 실험쥐들에 대하여 매일 3회씩 손상 부위에 한약제를 직접 분사하는 방법으로 진행하였다.

4) 조직채취

실험일정에 따라, 쥐들을 마취 시킨 후 손상을 유발 시킨 우측 비복근을 적출하였다.

5) 형태학적 관찰

(1) 광학현미경 관찰

손상부위의 근조직을 Susa 고정액에 24시간 고정한 후 95% 알코올을 이용하여 24시간동안 탈수시켰다. 이를 다시 2시간 동안 100%의 알코올에 처리한 후 90분 동안 dimethylanilin과 90분 동안 paraffin처리를 하였으며, 7µm의 두께로 절편한 후 Hematoxylin-Eosin 염색을 한 후 광학현미경(Canon)을 이용하여 관찰하였다.

(2) 전자현미경 관찰

각 실험군의 쥐들을 ether로 마취시킨 뒤 손상부위의 비복근을 채취하여 3%의 glutaric acid(0.1M phosphate buffer, ph 7.4)에 4℃에서 4시간동안 침윤 고정시켰다. 0.18M의 phosphate buffer(PB, ph7.4)로 15분씩 3차례 수세한 후 1% osmium teroxide(phosphate buffer, ph 7.4, 4℃)에서 90분 동안 고정시켰다. 고정된 시료는 각각 50%, 70%, 90%의 ethylalcohol을 이용하여 10분씩 탈수하고 다시 100%의 ethylalcohol로 10분씩 3차례 탈수 시켰다. 100%의 ethylalcohol과 포매제의 1:1비율로 2시간 동안 침윤시킨 후 통상적인 방법에 따라 포매하였다. 포매된 조직은 ultramicrotome을 이용하여 1µm 크기로 세절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경하에서 검경하여 초박 절편을 위한 부위를 설정하였다. Diamond knife(Dupont)를 사용하여 ultramicrotome(Sorvall MT5000)으로 초박 절편으로 grid에 올려 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)로 관찰하였다.

결 과

1. 골격근 손상 모형

본 연구자의 설계에 의한 실험쥐의 골격근 손상 유무를 확인하기 위하여 손상 유발 근육에 대하여 조직형태학적 관찰 결과는 Fig. 2, 3과 같다.

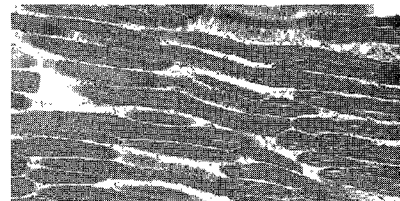


Fig. 2. 골격근 손상의 광학현미경 관찰(×25)

골격근 손상 유무에 대한 조직절편의 광학현미경 및 전자현

미경 관찰 결과, 골격근 섬유조직의 파열 모습이 선명하게 나타났다.

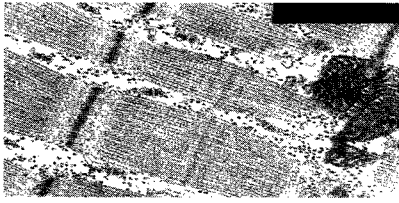


Fig. 3. 골격근 손상의 전자현미경 관찰($\times 29,000$)

전자현미경에 의한 관찰에서도 근섬유 마디의 Z라인 유실과 미토콘드리아의 손상 및 변형이 발생되었음을 관찰할 수 있었다.

골격근 손상부위에 대한 조직형태학적 관찰 결과, 비 개방형의 실험동물 골격근 손상 모형이 성공적으로 제작됨을 확인 할 수 있었다.

2. 한약재 치료 효과의 조직형태학적 관찰

실험쥐의 골격근 손상에 대한 한약재 치료의 효과에 대한 조직형태학적 관찰의 결과는 Fig. 4, 5와 같다.

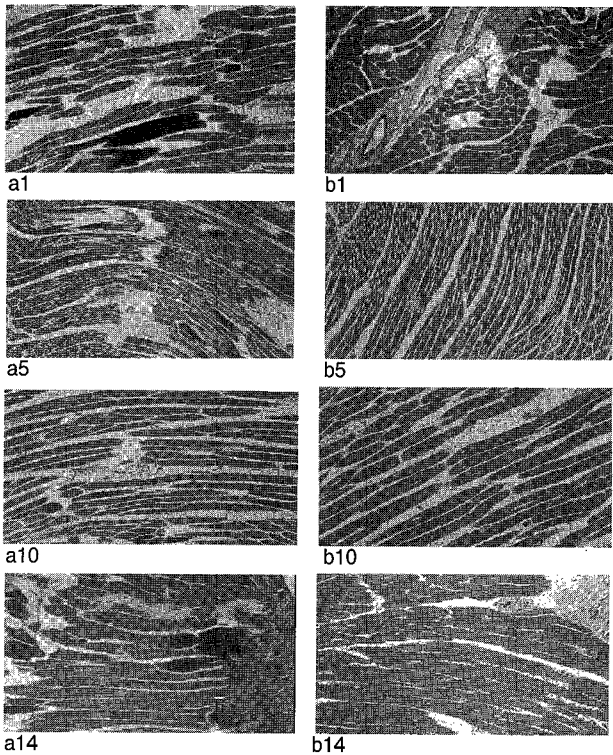


Fig. 3. 골격근 손상 및 한약재 치료의 광학현미경 관찰($\times 25$) a1, 5, 10, 14 : 대조군 손상 후 1, 5, 10, 14일; b1,5,10,14 : 한약재 치료군 손상 후 1, 5, 10, 14일

골격근 손상의 발생 후 1일째 대조군 실험쥐의 손상부위에 대한 광학현미경에 의한 관찰 결과, 선명한 근섬유 조직 파열이 나타났으며, 손상 직후에 비하여 손상의 병리학적 현상이 가중된 것으로 관찰되었다. 한약재 치료군의 경우에도 근섬유 손상에 의한 근파열 및 정맥출혈 등의 현상이 관찰되었으나 핵증가 및 근섬유 재생활동이 비교적 활발하게 진행된 것으로 나타났다.

손상 후 5일째, 대조군의 경우 골격근의 세포핵이 증하였으 며, 간헐적으로 염증세포들이 발견되었다. 반면 한약재 치료군의 경우 대조군에 비하여 빠른 회복세를 보였다.

손상 후 10일째, 대조군의 경우 근섬유중 중위핵이 여전히 존재하고 있었으며, 성섬유세포의 증가와 근조직의 교원섬유에 의한 대체가 이루어 졌음이 관찰되었다. 한약재 치료군의 경우에는 중위핵의 현저한 감소와 함께 뚜렷한 회복세를 보였다.

손상 후 14일째, 대량의 疎松結締組織의 증가와 성섬유세포의 활약, 陰影세포의 출현 등 병리학적 현상이 여전히 하였다. 한약재 치료군의 경우 재생능력의 근섬유조직은 結締組織에 의한 대체와 癍痕組織의 출현 등 비교적 양호한 조직재생이 관찰되었다.

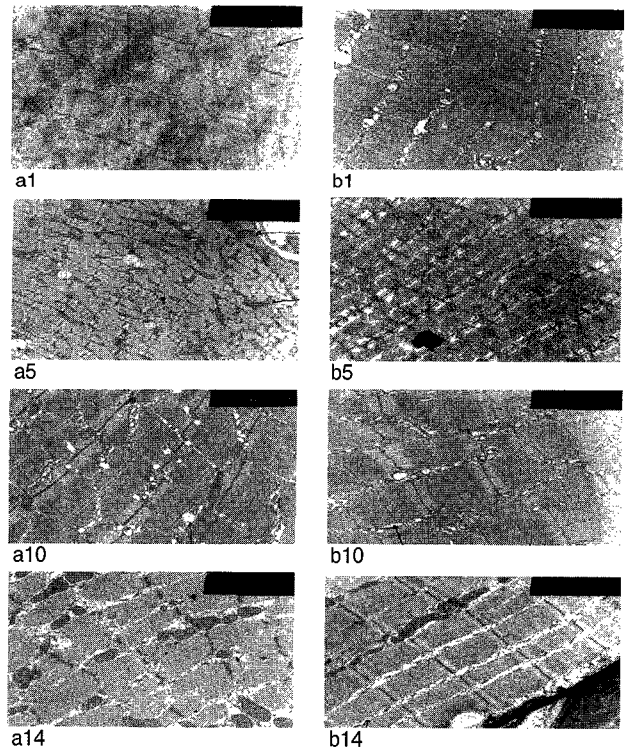


Fig. 4. 골격근 손상 및 한약재 치료의 전자현미경 관찰 a1, 5, 10, 14 : 대조군 손상 후 1, 5, 10, 14일; b1,5,10,14 : 한약재 치료군 손상 후 1, 5, 10, 14일

골격근 손상의 발생 후 1일째 대조군 실험쥐의 손상부위에 대한 전자현미경에 의한 미세조직의 관찰 결과, Z 선의 折曲 및 불규칙적인 배열, 미토콘드리아 변형 및 부종 등이 발견되었다. 한약재 치료군의 경우 근섬유간에 대량의 空泡 출현 및 리보스 과립 증가에 의한 치밀전자물의 출현이 관찰되었다.

손상 후 5일째, 대조군의 경우 대량의 空泡가 산재되어 분포 되어 있었으며, 한약재 치료군은 근섬유 미세 구조의 기본적인 회복이 이루어 졌음을 알 수 있었다.

손상 후 10일째, 대조군의 空泡가 감소되기 시작하였으나 리보스 핵단백의 비대 현상은 여전히하였다. 한약재 치료군은 空泡의 존재가 거의 소실되었으며, 정상 골격근 미세구조의 기본적인 회복이 이루어 졌음을 알 수 있었다.

손상 후 14일째, 대조군의 경우에도 근원섬유와 근섬유 조직 이 비교적 정상 수준으로 회복 되었으며, 한약재 치료군의 경우

교배율 하에서만 소량의 空泡과 미토콘드리아의 증대가 발견되었으며 정상적인 조직의 회복이 관찰되었다.

고찰

근육은 근육병증 뿐만 아니라 과도한 운동이나 교통사고 등 물리적인 요인에 의해서도 쉽게 손상되며 이로 인해 운동장애가 빈번히 유발되기 때문에 임상적 측면에서 이에 대한 연구의 필요성이 중요하다¹¹⁻¹³. 최근, 많은 연구자들에 의해 질병이나 국소진혈(ischemia), 신경제거(denervation), 충격상해(crushing injury), 국소마취(local anesthetic) 또는 근위축(dystrophy) 등과 같은 다양한 상황에서 근육의 재생과정을 연구하여 왔다^{8,12,13}.

근육은 직접적인 외상, 혈관 결찰, 화학적 요소나 기생충 감염 등 손상요인에 따라 다소 다를 수 있지만 일반적으로 근섬유(myofiber)의 근형질이 부풀어 오른 뒤 총괄적인 과사가 일어나는 변성 과정을 거치게 된다¹⁴. 물리적인 손상을 입은 근섬유들은 일반적으로 손상 2일 후 작은 분절로 나뉘게 되며 이것들은 식작용(phagocytosis)에 의해 2주안에 걸쳐 지속적으로 제거된다¹⁵. 본 연구의 결과에서도 물리적인 충격에 의한 실험쥐의 근섬유 손상 후 조직학적인 관찰 결과, 손상 후 근과열 및 정맥출혈 등의 현상이 관찰되었으며 Z 선의 折曲 및 불규칙적인 배열, 미토콘드리아 변형 및 부종 현상 등이 발견되었다. 근섬유 손상의 병리적인 현상은 손상 후 5일째에 이르기까지 비교적 선명하게 관찰되었으며, 10일째에 이르러 회복 현상이 활발히 진행되었음을 알 수 있었다.

Schultz 등¹⁶은 쥐들을 대상으로 골격근에 충격상해(crush injury)를 야기 시킨 후 EDL(extensor digitorum longus) 근의 재생과정을 살펴본 결과, 15시간이 경과한 후에 직접 상해를 입은 근섬유 부위에 위성세포가 증가된 것으로 보고하고 있다.

Fisher 등¹⁷도 단일 충격상해(crush injury)에 의한 쥐들의 gastrocnemius근의 재생과정을 연구한 결과 24-48시간 후에 위성 세포로부터 유래한 근막의 핵(sarcolemmal nuclei)의 수가 증가한 것으로 보고하였다. 특히 상해를 입은 근섬유는 48시간 내에 심한 단백질의 이화작용이 일어났고 3일이 경과한 후에야 단백질 합성이 시작되어 완전한 근 단백질의 재생이 이루어 지는데는 21일이 소요되는 것으로 보고하였다. 특히, Harris 등¹⁸은 작은 크기의 근섬유 형성과 근핵밀도가 높은 것은 성장하는 근섬유(development fiber)의 한 특징으로 새로운 작은 섬유는 최근에 과사된 섬유(necrotic fiber)를 대신하여 생성된 것이거나 Local lesions의 복구(repair)에 의해서 생겨난 것으로 보고하였다.

위와 같은 선행 연구들의 결과에 기초 하여 골격근 섬유의 손상에 대한 실험동물 모형을 제작한 후 재생 과정에 대한 한약재의 효과에 대한 조직학적 관찰을 수행한 결과 손상된 근섬유 조직의 재생에 있어서 한약재의 작용이 효과적인 것으로 나타났다.

손상 후의 병리적인 현상은 대조군과 한약재 치료군에서 동일하게 나타났으나, 한약재 치료군의 경우 치료1일째부터 핵증가 및 재생활동이 대조군에 비하여 빠르게 진행된 것으로 관찰되었다. 이러한 빠른 회복세는 손상 후 5일째에 이르러 전자현미

경하에서의 근섬유 미세조직의 기본적인 회복으로 이어졌다. 대조군의 경우 10일째에 근섬유간의 空泡 등이 감소하는 등 회복의 양상을 보였으나, 리보스 핵단백의 비대 현상이 여전히었으며, 한약재 치료군의 경우 空泡의 존재 거의 소실되고 근섬유의 미세구조가 거의 정상 수준으로 회복되었다. 14일에 이르러 대조군의 경우에도 손상된 근섬유 조직이 정상 수준으로 회복되었음이 관찰되었다.

본 연구 결과, 실험쥐의 골격근 섬유의 손상 후 한약재를 이용한 치료가 근섬유의 재생을 효과적으로 추진하는 것으로 관찰되었다. 이는 손상조직에 대한 한약재의 처치가 손상으로 인한 과사 조직에 대한 신속한 식작용(phagocytosis)과 Local lesions의 빠른 복구(repair)와 염증발생의 억제, 근위생세포의 신속한 활동 개시 등이 근섬유 단백질의 합성과 재생에 있어서 대조군에 비하여 효과적으로 진행되어진 것으로 사료된다.

골격근 섬유의 손상에 대한 한약재의 처치가 손상으로 인한 병리현상의 억제 및 근섬유 재생 과정에서 근섬유의 변형 및 재생을 촉진하는데 효과적인 치료수단으로서 임상적인 가치와 효용성이 높을 것으로 사료된다.

결론 및 제언

골격근 손상에 대한 실험동물 모형의 제작과 한약재 치료의 효과를 조직학적 관찰 통한 결론은 다음과 같다.

골격근 섬유의 손상에 대한 한약재의 처치가 손상 초기 대조군에 비하여 염증세포, 정맥출혈 등의 병리적 현상의 억제에 효과적인 것으로 나타났다. 한약재 치료의 효과에 대한 광학현미경을 통한 관찰 결과, 중위핵의 감소와 재생능의 근섬유조직에 대한 結締組織에 의한 대체 및 癭痕組織 등의 형성이 대조군에 비하여 빠르게 진행되는 것으로 나타났다. 한약재 치료의 효과에 대한 전자현미경을 통한 관찰 결과, 유실 또는 折曲된 Z선의 복원과 근섬유 간의 空泡 감소 미토콘드리아의 복원 등이 대조군에 비하여 빠르게 진행되는 것으로 나타났다.

이상의 연구 결과 골격근 섬유의 손상에 있어서 한약재의 처치가 근섬유의 손상으로 인한 병리현상의 억제와 근섬유의 재생에 효과적으로 작용하는 것으로 나타났으며, 향후 근섬유 재생과 관계가 깊은 단백질(중간세사단백)발현 및 미토콘드리아 추적자인 NADH-TR의 활성화 등을 통한 한약재의작용 기전에 대한 후속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. Grounds, M.D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract*, 187:1-22, 1991.
2. Nair, S.V., Kee, A.J., Joya, J.E., Lucas, C.A., Hoh, J.F.,

- Hardeman, E.C. Myofiber adaptational response to exercise in a mouse model of nemaline myopathy. *Muscle Nerve*, 30: 470-480, 2004.
3. He, P., Wang, J., Zeng, M. Leukocyte adhesion and microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278:H1686-H1694, 2000.
 4. Valeski, J.E., Baldwin, A.L. Effect of early transient adherent leukocytes on venular permeability and endothelial actin cytoskeleton. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278:H569-H575, 1999.
 5. Curl, W.W., Smith, B.P., Marr, A., Rosencrance, E., Holden, M., Smith, T.L. The effect of contusion and cytotherapy on skeletal muscle microcirculation. *J Sports Med Phys Fitness*, 37:279-286, 1997.
 6. Lieven, P, Leduc, A. Cryotherapy and sports. *Int J Sports Med*, 5:37-39, 1984.
 7. 김형섭, 유기수, 김병환, 손성금. 물리적 손상에 따른 흰쥐 하지 골격근의 변성 및 재생 과정에서 나타나는 중간세포 단백질의 발현 변화. *대한정형외과학회지*, 36(6):613-621, 2001.
 8. 김진해, 강찬금. 근손상 후 근핵의 수와 마이오신 중사슬의 변화. *한국체육학회지*, 39(4):444-452, 2000.
 9. Kakulas, B.A., Adams, R.D. *Disease of muscle : Pathological oundations of clinical myology*. 4th ed, Harper & Row, Philadelphia, pp 131-163, 1985.
 10. Carlson, B.M. The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am J Anat*, 137:119-149, 1973.
 11. Maier, F., Bornemann, A. Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve*, 22:578-583, 1999.
 12. Rantanen, J. Hurme, R., Heino, J., Kalimo, H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle:evidence for two different populations of satellite cell. *Lab Invest*, 72:341-347, 1995.
 13. Yoshimura, K., Harii, K., Ueda, K., Yamada, A. Immunohistochemical analysis of clinical transplanted muscles. *J Surg Res*, 79:31-38, 1998.
 14. Grounds, M.D. The proliferation and fusion of myoblast in vivo. *Adv Exp Med Biol*, 280:101-104, 1990.
 15. Hughes, J.T. *Pathology of muscle*. WB Saunder, Philadelphia, pp 131-163, 1974.
 16. Shultz, E., Jaryszak, D.L., Valliere, C.R. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve*, 8(3):217-222, 1985.
 17. Fisher, B.D., Baracos, V.E., Shnitka, T.K., Mendryk, S.W., Reid, D.C. Ultrastructural events following acute muscle trauma. *Med. Sci. Sports Exer*. 22:185-193, 1990.
 18. Harris, J.B., Johnson, M.A. Future obsevatons on the pathological response of rat skeletal muscle to toxins isolated from venom of the Australian tiger snake. *Cli. Exp. Pharmacol. Physiol*, 5:587-600, 1978.