

자하거약침액과 산삼약침액의 C2C12 근아세포에서의 AMPK/SIRT1 신호전달을 통한 근 분화 유도 및 에너지 대사 증진 효과 비교

황지혜 · 정효원¹

가천대학교 한의과대학 침구의학과, ¹동국대학교 한의과대학 본초학교실

Comparison of the Effects of Pharmacopuncture Extracts with *Hominis placenta* Pharmacopuncture and Wild Ginseng Pharmacopuncture on the Differentiation of C2C12 Myoblasts into Myotubes through Regulation of the AMPK/SIRT1 Signaling Pathway

Ji Hye Hwang, Hyo Won Jung¹

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University, ¹Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University

Received: August 21, 2023
Revised: September 11, 2023
Accepted: September 19, 2023

Correspondence to: Hyo Won Jung
Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, 123, Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do 38066, Korea
Tel: +82-54-770-2667
Fax: +82-54-770-2647
E-mail: tenzing2@hanmail.net

Copyright © 2023 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: This study was conducted to compare the effects of *Hominis placenta* (Jahage, J) and wild ginseng (SanSam, S) pharmacopuncture drugs on muscle differentiation and energy metabolism regulation in C2C12 myotubes.

Methods: The C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes for 5 days by replacing in medium containing 2% horse serum and then treated with J and S pharmacopuncture extract at different concentrations for 24 hr. The expression of myosin heavy chain and energy metabolism-regulating factors, myosin heavy chain (MHC), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), and proliferator-activated receptor γ coactivator-1 alpha (PGC-1 α) were determined in C2C12 myotubes by western blot. Additionally, the phosphorylation of AMPK and the expression of mitochondrial biogenesis, including sirtuin 1 (SIRT1) were determined in the myotubes.

Results: As a result, treatment with J and S pharmacopuncture extract at 0.1 and 1 mg/mL increased the MHC expression in C2C12 myotubes compared with non-treated cells, but only S pharmacopuncture was shown a significant and distinct increase in the expression. Expression of TFAM and NRF-1 was also shown significant increases in S and J pharmacopuncture in C2C12 myotubes compared to non-treated cells. The phosphorylation of AMPK and the expression of PGC-1 α and SIRT1 showed increased expression in S and J pharmacopuncture compared to non-treated cells. The effect of low-dose of J pharmacopuncture on the phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and PGC-1 α expression was greater than that of S pharmacopuncture.

Conclusions: In conclusion, both J and S pharmacopuncture promote muscle differentiation in C2C12 myoblasts into myotubes and energy metabolism through the AMPK/SIRT1 signaling pathway. This indicates that the pharmacopuncture with tonic herbal medicines can help to improve skeletal muscle function.

Key Words: *Hominis placenta*, Wild ginseng, Pharmacopuncture, Skeletal muscle, C2C12 cell

서론

근감소증(sarcopenia)은 질병이나 노화 등에 의한 근육량의 감소 및 근력의 저하, 신체 수행능력 감소가 점진적이고 전반적으로 진행되는 질환이다. 근감소증은 노화와 연관된 진행성 증후군(age-related progressive syndrome)으로 60세 이후 발병률이 급격히 증가하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 노인성 근감소증은 운동능력 및 신체기능 저하, 일상생활 수행능력 저하, 낙상 및 골절 위험 증가, 사망 위험 증가 등으로 삶의 질을 떨어뜨리고 의료비를 증가시키고 있어서²⁾ 현재 노인의 건강한 노화를 위한 핵심 과제가 되고 있다³⁾. 이에 최근 근감소증의 병태생리에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 미토콘드리아의 에너지 대사(mitochondrial biogenesis) 증진을 통한 근 기능 개선을 목표로 근육에서의 에너지 균형 조절이 잠재적 대체 전략이 될 수 있다고 보고되고 있다⁴⁾.

한의학에서는 노인들의 건강관리를 위해 보약(restorative medicine) 개념의 한약을 많이 사용하고 있으며, 대표적인 한의 강장약(強壯藥)으로 자하거(紫河車, *Hominis placenta*)와 산삼(山蔘, *Panax ginseng* C. A. Meyer)이 빈용되고 있다. 자하거는 허손(虛損)을 보익(補益)하고 기혈(氣血)과 정(精)을 보(補)하여 허손극(虛損極), 오칠상(五七傷) 등 허손(虛損)과 관련한 병증에 많이 사용되고 있고^{5,6)}, 산삼은 오장(五臟)을 보(補)하고 활력을 증가시키며 오래 복용하면 수명을 연장할 수 있다고 알려져 있어 만성질환, 피로, 허약한 기능이나 장부와 같은 다양한 질병에서 기허(氣虛) 상태를 치료하는데 사용되고 있다^{7,8)}.

약침(pharmacopuncture)은 약침 주입용 주사기를 통해 경혈에 정제한 한약을 전달함으로써 침술과 약물요법을 결합하여 신체기능과 병리 상태를 개선하는 새로운 유형의 침술 요법이다. 약침 요법은 효과가 빠르게 나타나며 소화기가 좋지 않은 환자에게 사용 가능하다는 장점이 있다^{7,9)}. 따라서 자하거와 산삼을 이용한 약침 요법은 노화로 인해 근육 기능 및 소화 기능 등 전반적 인체 기능이 저하된 노인 환자들에게 적용하기 좋은 치료 방법으로 사료된다. 자하거약침은 부인과 질환에 널리 사용되는 치료법으로 산부인과 한의 임상에서 오랫동안 내복약이나 약침으로 활용되고 있다. 자하거는 세포 내 다양한 증식 인자들과 혈액 응고 인자 및 호르몬과 그 전구체들을 풍부하게 함유하고 있으며, 항산화, 상처회복, 항염증, 조직

세포 신진대사 증진, 신경성장촉진 등의 효능이 보고된 바 있다¹⁰⁻¹³⁾. 또한, 근감소증과 관련된 자하거의 효능은 2022년 전통의학 치료 관련 체계적 고찰에서 3건의 임상 연구가 보고되었고³⁾, 기타 관절질환 관련 전임상 연구¹⁴⁾와 증례 보고들^{15,16)}에서 자하거약침의 개선 효과가 보고된 바 있다. 그러나, 근육세포에서의 근 분화 조절이나 에너지 대사 조절 관련 효능 연구는 보고된 바 없다. 한편, 산삼약침은 최근 근관세포(myotube)에서 근육 분화와 에너지 대사 증진 효과가 보고된 바 있다⁴⁾.

따라서 본 연구에서는 대표적 강장 약침액인 자하거와 산삼의 마우스 골격근 세포에서의 근 분화 유도 효과 및 미토콘드리아에서 에너지 대사를 조절하는 분자들의 발현 증가 효과를 확인하고, 두 약침액 간 골격근에서의 효과를 비교해보고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약침액

본 실험에 사용된 자하거약침액과 산삼약침액은 모두 100 mg/mL 농도로 바이알(2 ml)에 담은 멸균 및 밀봉된 상태로 보건복지부 인증 약침 원외탕전원인 남상천원의 탕전원(용인, 한국)에서 조제되었다. 준비 과정은 다음과 같다. 자하거약침액은 100 L 생산 시 10 kg 인태반응모조직 원료를 사용하는 자하거약침액 원액(유니메드제약, 서울, 한국)을 희석하지 않고 자동충진기에 넣고 일정 용량(2 mL/vial)씩 충전 및 실링한 후 121 °C에 25분간 습식 멸균을 하였다. 산삼약침액은 북미산 산삼(우민농산, 충북) 100 g을 저온진공추출기에서 주사용 정제수 1 L와 함께 열수 추출하고 여과 과정을 거친 후 0.9% NaCl로 교반하여 용해시켰다. 이를 pH 7.4로 보정한 후 clean booth로 반입하여 자동충진기에서 일정 용량(2 mL/vial)씩 충전 및 실링을 하여 121 °C에 25분간 습식 멸균하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험에서 hoes serum (HS), fetal bovin serum (FBS) (Merck Millipore, Temecula, CA, USA), Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin/streptomycin (Corning, NY, USA), mitochondrial transcription factor A (TFAM), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), Anti-mitochondrial bio-

genesis, including sirtuin 1 (SIRT1), phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMPK (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Anti-myosin heavy chain (MHC), Anti-proliferator-activated receptor γ coactivator-1 alpha (PGC-1 α) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 등의 시약을 사용하였으며, Microtiter plate reader (ASYS, Austria), 자동감광장치(ChemiDoc; Biorad, USA) 등의 기기를 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 준비

자하거약침액과 산삼약침액은 냉장 보관하면서 실험 직전 적정 농도의 phosphate-buffered saline (PBS)에 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

마우스의 골격근 세포주(mouse myoblast cell line)를 ATCC사(CRL-1772™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며, 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 함유된 DMEM 배지에서 37 °C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 근아세포들이 약 85~95% 정도 성장하였을 때 2% HS이 함유된 DMEM을 분화 배지로 하여 총 5일 동안 1일 1회 교체함으로써 근관세포(myotube)로의 분화를 유도하였다. 여기에 자하거약침액과 산삼약침액(0.1, 1 mg/mL)을 각각 처리한 후 24시간 배양하여 효능평가 실험을 진행하였다.

3) 세포독성 평가

C2C12 세포에서 두 약침액의 독성 농도를 확인하기 위해 EZ-Cytox (DoGenBio, Seoul, Korea)를 이용한 assay를 수행하였다. 먼저, C2C12 myoblasts (2×10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 분주하고 37 °C, 5% CO₂에서 하루 동안 배양 후 자하거약침액과 산삼약침액을 다양한 농도(0.1, 1, 2, 5, 10 mg/mL)로 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 EZ-Cytox 10 μ l를 첨가하고 2시간 배양한 후, microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 세포 독성정도는 세포만 배양한 대조군의 100% 생존도를 기준으로 하여 상대적 세포생존도(cell viability)를 계산하였다.

4) 단백질 발현 분석

C2C12 세포에서 근 분화 단백질(Myogenin, MHC) 및

에너지 대사 조절 단백질(PGC1 α , SIRT1, NRF1, TFAM, acetyl-CoA carboxylase, AMPK)의 발현 변화에 대한 자하거약침액과 산삼약침액의 효과 비교, 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 먼저, 60 mm culture dish에 C2C12 세포를 배양하여 근관세포로 분화시킨 후 0.1 mg/mL과 1 mg/mL의 자하거약침액 및 산삼약침액을 처리하였다. 24 시간 후 각 세포를 수집하고 3000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포만 수거하였다. 각 세포에 RIPA lysis buffer 100 μ l를 넣고 용해시킨 후 4 °C, 14000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 상청액을 수거하였다. 각 세포 상청액 내 단백질 농도를 Bradford's assay 용액으로 측정한 후 30 μ g 단백질을 SDS PAGE 방법으로 분리하였다. 분리된 gel을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 5% skim milk를 이용하여 실온에서 3시간 동안 반응시킴으로써 blocking 하였다. 이후 5% skim milk에 희석한 각 단백질의 1차 항체와 함께 4 °C에서 하룻밤 반응시키고, 0.1% Tween 20이 포함된 1x TBS buffer (TBST, pH 7.5)를 사용하여 15분씩 3회 세척하였다. 이를 다시 HRP conjugated 2차 항체와 실온에서 2시간 교반기를 통해 반응시키고, 1x TBST로 3회 세척하였다. 각 membrane을 ECL 용액으로 염색한 후 자동감광장치(Bio-Rad ChemiDoc)를 이용하여 밴드를 확인 및 수집하였다. 각 단백질의 발현은 Image J program (NIH, USA)을 사용하여 β -actin 대비 발현율을 계산하여 histogram으로 나타내었다.

3. 통계분석

본 실험에서의 결과들은 GraphPad Prism version 5.0 (La Jolla, CA, USA)을 이용하여 히스토그램으로 나타내었으며, 유의성은 t-test로 검정하였으며, 95% 신뢰구간 이상을 유의미한 것으로 판정하였다.

결과

1. 세포생존도에 대한 효과

C2C12 세포에서 자하거약침액과 산삼약침액의 독성정도를 평가한 결과, Fig. 1과 같이 세포만 배양한 경우의 세포생존율(cell viability) 100%를 기준으로 자하거약침액 0.1, 1, 2, 5, 10 mg/mL 처리 농도에서 각각 105.02 \pm 0.16%, 104.48 \pm 1.35%, 108.97 \pm 0.65%, 115.71 \pm 0.16%, 117.88 \pm 0.60%로 측정되었으며, 산삼약침액 0.1, 1, 2, 5, 10 mg/mL 처리

농도에서 각각 98.77±3.57%, 100.07±2.01%, 102.86±1.77%, 106.89±1.37%, 109.82±2.25%로 측정되었다. 따라서, 처리한 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

2. 근 분화 조절 단백질 발현에 대한 효과

자하거약침액 및 산삼약침액의 근 분화 유도 효과를 확인하기 위해 C2C12 근관세포에 약물을 처리한 후 성숙한 근육세포에서 증가하는 MHC 단백질의 발현을 western blot 방법으로 확인하였다. 그 결과, Fig. 2와 같이 약침액을 처리하지 않은 세포에 비해 산삼약침액과 자하거약침액을 처리한 세포에서 모두 무처리군에 비해 유의적으로(P<0.05) MHC의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 자하거약침액과 산삼약침액은 모두 근육세포에서

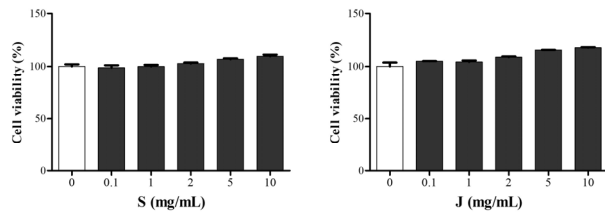


Fig. 1. Effect of S and J pharmacopuncture drugs on cell viability in C2C12 mouse myoblasts. Cells were treated with S and J extract at 0.1, 1, 2, 5, and 10 mg/mL, respectively, for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. The histogram values were given as the mean±standard deviation of three independent experiments. S: wild ginseng, J: *Hominis placenta*.

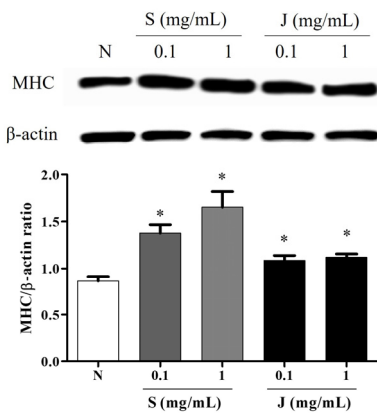


Fig. 2. Effects of S and J pharmacopuncture drugs on the expression of MHC in C2C12 myotubes. Cells were treated with S (0.1 and 1 mg/mL) or J (0.1 and 1 mg/mL) for 24 hr. The expression of MHC was determined by western blot. All data were presented as the mean±standard deviation of three independent experiments. S: wild ginseng, J: *Hominis placenta*, N: non-treated cells. *P<0.05 vs. non-treated cells.

의 근육 분화를 촉진하는 효능이 있으며, 자하거약침액보다 산삼약침액이 보다 효과적임을 알 수 있었다.

3. NRF-1과 TFAM 발현에 대한 효과

근육세포에서 미토콘드리아의 에너지 대사 조절에 관여하는 NRF-1과 TFAM 단백질의 발현에 대한 자하거약침액과 산삼약침액의 효과를 확인하기 위해 western blot을 실시하였다. 그 결과, Fig. 3과 같이 C2C12 근관세포에 산삼약침액과 자하거약침액 처리한 후 무처리군에 비해 TFAM과 NRF-1의 발현이 모두 증가하는 것으로 나타났다. TFAM의 발현은 산삼약침액과 자하거약침액 모두 1 mg/mL 처리군에서 유의적으로(P<0.05) 증가하였고, NRF-1의 발현은 산삼약침액 1 mg/mL (P<0.01) 및 자하거약침액 1 mg/mL (P<0.05) 처리 후 유의적인 증가를 나타내었다. 따라서 자하거약침액과 산삼약침액은 근육세포에서 미토콘드리아의 에너지 대사기능을 증진시켜 줄 수 있음을 알 수 있었다.

4. AMPK/SIRT1 신호전달기전에 대한 효과

C2C12 근육세포에서 자하거약침액과 산삼약침액의 에너지대사 증진 효과에 대한 신호전달기전을 알아보기 위해 AMPK, SIRT1 및 PGC-1α의 발현 변화를 western blot으로 확인하였다. 그 결과, Fig. 4와 같이 AMPK의 인산화 발현에서 산삼약침액 0.1 mg/mL (P<0.01), 1 mg/mL (P<0.05) 및 자하거약침액 0.1 mg/mL (P<0.01), 1 mg/mL (P<0.01)

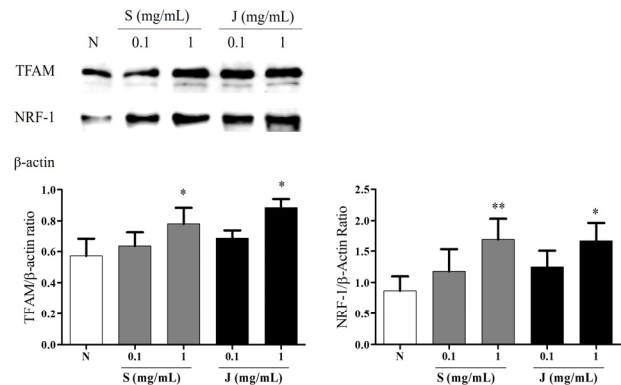


Fig. 3. Effects of S and J pharmacopuncture drugs on the expression of TFAM and NRF-1 in C2C12 mouse myoblasts. Cells were treated with S (0.1 and 1 mg/mL) or J (0.1 and 1 mg/mL) for 24 hr. The expressions of TFAM and NRF-1 were determined by western blot, respectively. All data were presented as the mean±standard deviation of three independent experiments. S: wild ginseng, J: *Hominis placenta*, N: non-treated cells. *P<0.05 and **P<0.01 vs. non-treated cells.

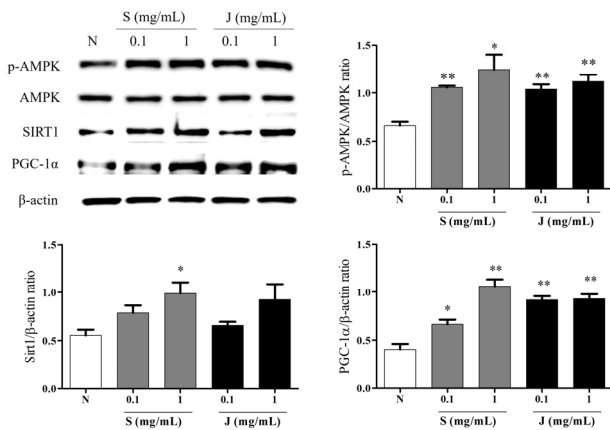


Fig. 4. Effects of S and J pharmacopuncture drugs on the AMPK phosphorylation and the expression of SIRT1 and PGC-1 α in C2C12 mouse myoblasts. Cells were treated with S (0.1 and 1 mg/mL) or J (0.1 and 1 mg/mL) for 24 hr. The AMPK phosphorylation and the expression of SIRT1 and PGC-1 α were determined by western blot, respectively. All data were presented as the means \pm standard deviation of three independent experiments. S: wild ginseng, J: *Hominis placenta*, N: non-treated cells. *P<0.05 and **P<0.01 vs. non-treated cells.

처리는 무처리군에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 한편, SIRT1 발현에서는 자하거약침액 및 산삼약침액 처리 후 모두 증가하였으나 자하거약침액 보다 산삼약침액 처리에 의해 조금 더 증가되는 것으로 나타났다. 또한, 산삼약침액 1 mg/mL 처리는 무처리군 대비 유의적인(P<0.05) 증가를 나타내었으며, 자하거약침액은 증가하는 패턴은 관찰되었으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. PGC-1 α 의 발현에서는 자하거약침액 및 산삼약침액 처리 후 모두 증가하였고, 자하거약침액 0.1 mg/mL (P<0.01)과 1 mg/mL (P<0.01) 처리에서 무처리군 대비 유의적 증가를 나타내었다. 또한, 산삼약침액 0.1 mg/mL (P<0.05)과 1 mg/mL (P<0.01) 처리는 용량 의존적으로 무처리군 대비 유의적인 증가를 나타내었다. 따라서 자하거약침액과 산삼약침액은 근육세포에서 AMPK/SIRT1 및 PGC1 α 기전 활성화를 통해 에너지 대사를 조절할 수 있으며, 자하거약침액 보다 산삼약침액이 보다 효과적임을 알 수 있었다.

고찰

의학과 기술의 발달로 인간의 수명은 점차 늘어나고 있으며, 전 세계 인구의 고령화 추세가 더욱 뚜렷해지고 있다. 의심할 여지 없이 근감소증 환자의 수는 앞으로 수

십 년 동안 계속해서 증가할 것이다. 근감소증은 환자의 삶의 질에 심각한 영향을 미치며, 근력 저하로 인해 원활한 움직임이 제한되고 일상에서 쉽게 넘어질 위험 등 다양한 불안 요소가 있다. 근감소증의 가능한 병인 및 영향 요인은 현재 논의 중이며, 다양한 신호 경로와 영향 요인을 포함한다. 현재 MyoD, myogenin 및 MHC의 발현과 atrogen-1 및 muscle RING-finger 1의 억제는 치료적 관점에서 중요한 문제이며, 대부분 연구의 관심 주제이지만, 근감소증을 직접 유발하는 특정 표적이나 분자 기전은 아직 명확하지 않으며 추가 연구가 계속 진행되고 있다. 현재는 운동요법이 근감소증을 지연시키고 골격근 복구 및 재생을 가속화하는 가장 효과적인 방법으로 활용되고 있으며, 근감소증을 치료하기 위한 식의약품 시장은 아직 이렇다 할 효과적인 제품이 없어 더 많은 소재발굴과 연구가 필요한 상황이다¹⁷⁾.

자하거는 익기양혈(益氣養血), 보정(補精) 효능으로 구병(久病)으로 인한 신체허약 혹은 체질허약, 기혈부족 및 신허정후(腎虛精虧) 등을 치료하며, interferon, macroglobulin, urokinase inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1, 각종 호르몬, erythropoietin, 인지질, 아미노산 다당류, 간세포증식인자, 상피세포증식인자, 신경세포증식인자 등을 함유하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 자하거는 보통 단방(單方)으로 다용 되고, 인체 저항력을 향상시킬 수 있어 현재 신경쇠약, 빈혈, 기관지천식 등 만성병에 강장약(強壯藥)으로 사용되고 있다¹⁹⁾. 인태반 추출물로서의 자하거약침은 단백질, 펩타이드, 아미노산, 핵산, 사이토카인, 에스트라디올, 난포자극호르몬 등의 호르몬을 함유한다²⁰⁾. 자하거 추출물은 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS) 조절 및 항산화 작용을 통한 항스트레스 효과, 조직세포 증식촉진, 항염증 효과, 자가면역질환 조절효과 등이 알려져 있다¹⁹⁾. 자하거 약침 관련 고찰 연구에서 자하거 약침 제제에 대하여 한의학적 효능 및 성분, 약리, 독성, 제조사 등 다양한 분야에서 분석하였고, 이후 부인과 질환, 불면증, 신경정신과 임상 고찰 연구가 있었으며¹⁹⁾, 근골격계 질환 관련 관절질환 *in vivo* 연구¹⁴⁾, 중풍 하지경직²¹⁾, 방아쇠수지¹⁵⁾ 및 족관절 질환¹⁶⁾, 척추관협착증²²⁾ 등 임상 증례 연구가 보고된 바 있다.

산삼은 인삼이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 삼을 말하며, 강장(強壯), 강심(強心), 건위보정(健胃補精), 진정약(鎮靜藥)으로 사용된다. 산삼약침에는 수십 종의 사포

닌과 정유, 아미노산, 펩타이드 부류의 비타민, 포도당, 과당 플라보노이드 등이 함유되어 있다²³⁾. 최근 인삼의 근감소증 치료제 가능성에 대한 리뷰 논문에서 인삼 추출물은 여러 연구에서 근육 기능을 유지하고 근육 회복 및 성장을 촉진하는 것으로 나타났다고 하였으며, 운동 전에 인삼 추출물을 섭취하면 운동으로 인한 근육 손상을 완화하고 지질 과산화를 줄이고 염증 적응을 강화하여 운동 지구력과 근육 회복을 향상시킬 수 있다고 보고되었다^{17,24,25)}. 산삼의 근감소증 관련 연구에서 산삼은 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor)에 의한 FoxO3 동원을 효과적으로 감소시키고, 근육 위축을 억제하며, 근모세포의 MHC 단백질 수준을 증가시켜 분화를 촉진하고, 근관의 직경을 증가시키며, 근섬유 형성을 촉진하는 동시에 myostatin 길항제인 follistatin의 발현을 촉진하여 근육량을 효과적으로 증가시킬 수 있으며, dexamethasone 유도 마우스 모델에서 근육 손상을 완화하고, 골격근의 결합 조직 손상 및 콜라겐 침착을 막을 수 있다고 보고되었다²⁶⁾. 또한, 국내 재배 산삼과 북미 야생산삼 약침액이 노인의 근육기능 유지를 지원하는 phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin 경로와 AMPK를 활성화하여 근육 분화를 개선하고, 미토콘드리아의 기능을 조절함으로써 에너지대사를 증진시킨다고 보고되었다⁴⁾. 2022년 근감소증에 대한 한의학 치료 관련 21편에 대한 체계적 고찰 논문³⁾에서는 한약과 기공요법이 근감소증 노인의 신체 능력과 근력에 긍정적 영향을 미치며, 침 치료 관련해서는 근거가 부족하다고 보고하였다. 또한, 6편의 한약 관련 연구에 언급된 한약은 2가지로, 팔진탕과 보중익기탕이 각각 3편이었는데, 팔진탕처방에 자하거가 가미되어 있었고, 보중익기탕에는 인삼이 포함되어 있었다. 비록 복합 처방의 한 가지 구성 약물이지만, 자하거와 인삼의 근감소증 관련 임상 효능 가능성을 엿볼 수 있었다. 2편의 침 치료 관련 연구를 비교해보면, 한 연구에서는 근감소증에 대한 유의미한 효과는 없었지만, 체내 염증성 사이토카인 interleukin-6 및 tumor necrosis factor-alpha를 조절하는 데 도움이 된다고 하였고, 다른 한편에서는 족삼리(ST36)를 포함하는 경혈 그룹이 보행 속도 측면에서 다른 그룹보다 우수한 것으로 보고하였으며, 자연적 노화로 인한 골격근 위축과 병태생리가 다소 다르긴 하지만 골격근 위축 동물실험에서도 침의 치료 근거들이 제시되고 있다고 하였다. 본 연구의 저자들은 약침요법이 침

과 한약이 결합되어 있어 자하거약침과 산삼약침이 근감소증 치료 시 단순 약물만으로 치료하는 방법보다 좋은 치료 효과를 얻을 수 있다고 보며, 근감소증에 효과적인 혈자리에 약침액을 주입한다면 보다 효과적일 것으로 기대한다.

최근 근감소증의 병태생리를 연구하기 위해 다양한 골격근 세포 배양 모델이 개발되고 있으며, 골격근 세포의 분자적 측면을 연구하기 위한 일반적 체외 모델로 마우스의 골격근 L6 세포와 C2C12 세포가 사용되고 있다^{27,28)}. 비록 기존 문헌에서 근육 기능 개선에 대한 긍정적 효과를 기대할 수 있지만, 자하거약침액 관련 골격근세포에서의 효과를 직접 연구한 바는 없기에, 본 연구에서 강장약 중 보양약에 속하는 자하거약침액과 기존 효과가 확인된 보기약에 속하는 산삼약침액의 C2C12 근아세포에서 근육 분화와 미토콘드리아 합성에 대한 효과를 평가 및 비교하였다. 근세포는 미분화 위성세포나 근육아세포에서 성숙한 근관으로 분화되며²⁹⁾ 근분화 과정에서 근분화 유도 인자들의 발현 변화와 미오신 구성 단백질의 일종인 MHC의 발현 증가를 동반한다³⁰⁾. 본 연구에서는 대표적인 근분화 유도 단백질인 MHC의 발현을 확인하였다. 결과적으로 골격근세포에서 자하거약침액 및 산삼약침액이 근세포 분화마커인 MHC의 발현을 유의하게 증가시켜 근분화를 촉진할 수 있음을 확인하였다. 본 연구에서 자하거약침액은 처리 농도별 효능 차이가 크지 않았으며, 산삼약침액이 자하거약침액 보다 더 MHC의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 한편, NRFs는 미토콘드리아에서의 산화적 인산화 과정의 구성물질을 전사하는 조절인자이고, TFAM은 미토콘드리아 복제 및 전사를 조절하는 미토콘드리아 DNA의 프로모터에서 작용하는 전사인자이다³¹⁾. 본 연구에서 골격근 세포에 산삼약침액과 자하거약침액을 처리하였을 때 모두 미토콘드리아의 에너지 합성에 관여하는 NRF-1과 TFAM 단백질의 발현이 증가하였으며, 특히 고농도에서 모두 유의적인 증가를 나타내었다. NRF-1의 발현에서는 산삼약침액과 자하거약침액 모두 비슷한 증가 현상을 나타내었고, TFAM은 자하거약침액이 산삼약침액에 비해 증가되는 발현 변화를 나타내었다.

PGC-1 α 는 근육 세포에서 운동에 의해 발현이 증가하며, 미토콘드리아의 에너지 합성(biogenesis)을 촉진하고, 산화성 근섬유의 함량을 증가시킨다. 미반 또는 노화 개체의 근육에서는 PGC-1 α 발현이 저하되는 것으로 알려져 있는

데, PGC-1 α 결핍 마우스에서는 산화성 근섬유의 감소와 미토콘드리아 기능 저하가 관찰되며 근육 능력 저하와 더불어 비만으로 인한 대사질환 유발과 연관되는 것으로 보고되고 있다³²⁾. 또한, PGC-1 α 는 미토콘드리아 증식, 에너지 항상성 조절 및 호흡에 영향을 미치는 NRF-1, TFAM, SIRT1과 같은 전사인자를 활성화시키는 것으로 알려져 있다^{33,34)}. 본 연구에서 자하거약침액과 산삼약침액은 모두 유의적으로 PGC-1 α 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, 자하거약침액은 농도별 발현에 차이가 없었다. 이를 통해 자하거약침액과 산삼약침액이 근육세포에서 미토콘드리아 생성에 관여하는 PGC-1 α , NRF-1, TFAM의 발현을 유도함으로써 근감소증 개선에 긍정적 효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다.

최근 AMPK, SIRT1 및 PGC-1 α 분자들이 신진대사 적합성을 개선하기 위한 조율된 네트워크 역할을 할 수 있음이 보고된 바 있으며³⁵⁾, 포유동물의 sirtuin 중 SIRT1은 주로 장수, 신진대사 및 기타 노화 관련 과정에 미치는 영향 때문에 강력한 과학적 관심을 불러일으키고 있다. SIRT1은 체장의 인슐린 분비, 간 및 골격근의 지방산 산화, 단식 중 간 포도당 생성, 백색지방조직의 지방 축적 억제 및 골격근의 인슐린 감수성 향상에 관여하며, AMPK와 상호작용한다. 그동안의 집중적인 연구 노력은 이제 노화 및 연령대 관련 대사장애 발생 및 퇴행성 질환에 대한 약리학적 개입을 위해 SIRT1을 목표로 하고 있다. 또한, 대사 스위치인 AMPK는 ATP를 생산하는 이화 경로를 활성화하는 동시에 ATP를 소비하는 단백 동화 과정을 차단하기 때문에 ATP가 고갈된 상태로 유지되면 AMPK는 PGC-1 α 를 포함하여 유전자 발현을 조절하는 전사인자와 보조 활성화 인자의 인산화를 유도하게 된다³⁶⁾. SIRT1과 마찬가지로 AMPK 또한 포유류의 장수 조절에 관여하는 여러 분자 중 하나로 제안되고 있으며, 노화 과정이 SIRT1과 AMPK의 활동 감소와 관련이 있다고 보고 있다³⁷⁾. 두 경로 간의 연관성은 AMPK는 PGC-1 α 활성 조절을 통해 미토콘드리아 및 지질 대사 유전자의 발현을 조절하며, PGC-1 α 의 활성화는 AMPK에 의한 PGC-1 α 의 직접적인 인산화와 SIRT1에 의한 PGC-1 α 의 탈아세틸화 과정 모두를 포함한다.^{37,38)} 본 연구에서도 두 약침액의 약리기전을 좀 더 알아보기 위해 AMPK와 SIRT1의 발현을 관찰하였다. 자하거약침액과 산삼약침액은 모두 AMPK 및 SIRT1의 발현을 증가시켰으며, SIRT1 발현에서 산삼약침액에서 자하

거약침액에 비해 좀 더 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, PGC-1 α 발현에서도 두 약침액은 농도 의존적인 증가를 나타내었다.

결론적으로 산삼약침액과 자하거약침액은 모두 근육세포의 분화를 촉진시키며, 이는 AMPK/SIRT1 기전 활성화를 통해 이루어짐을 알 수 있었다. 이는 두 약침액이 모두 근감소증이나 근육 기능 저하의 개선에 긍정적 효과를 줄 수 있음을 의미한다. 두 가지 약침 간 효과를 비교해보면, 근육 분화 및 SIRT1 발현에서는 산삼약침액이 자하거약침액 보다 효과적인 것으로 보이며, 근육 분화에서 자하거약침의 효과가 두드러지지 않은 것은 근육에서 산삼약침액과는 다른 작용기전이 있을 것으로 예상되어 추가연구가 필요할 것으로 사료된다. TFAM과 NRF-1 발현에서는 두 약물 간 효과가 유사하였고, AMPK와 PGC-1 α 발현에서는 자하거약침액이 산삼약침액 보다 효과적인 것으로 나타났다. 자하거약침액의 경우 농도 별 효능에 차이가 나타나지 않아서 실험농도 범위의 재설정 및 본 연구에서의 근 분화유도 분자들 외 다양한 조절분자들의 발현 변화와 유전자 수준에서의 변화를 확인해 볼 필요가 있다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2022R1A2C1013518).

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

1. Pereira AF, Silva AJ, Matos Costa A, Monteiro AM, Bastos EM, Cardoso Marques M. Muscle tissue changes with aging. *Acta Med Port.* 2013 ; 26(1) : 51-5.
2. Kim M, Kim H, Park S, Cho I, Yu W. A study on the analysis of physical function in adults with sarcopenia. *J Korean Soc Integr Med.* 2020 ; 8(2) : 199-209.
3. Guo CY, Ma YJ, Liu ST, Zhu RR, Xu XT, Li ZR, et

- al. Traditional Chinese medicine and sarcopenia: a systematic review. *Front Aging Neurosci.* 2022 ; 14 : 872233.
4. Hwang JH, Kang SY, Jung HW. Effects of American wild ginseng and Korean cultivated wild ginseng pharmacopuncture extracts on the regulation of C2C12 myoblasts differentiation through AMPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2022 ; 25(6) : 192.
 5. Sin MK. Clinical traditional herbalogy. *Younglimsa.* 2002 : 191-2.
 6. Lee JH, Yang TJ, Kim SW, Jeong JY, Ma YH, Oh JS, et al. Efficacy between Hwangryunhaedoktang pharmacopuncture therapy and Hominis placenta pharmacopuncture therapy on peripheral facial paralysis: retrospective comparison study. *Korean J Acupunct* 2015 ; 32(4) : 199-207.
 7. Nam SC. Immune pharmacopunctureology. *Meridian Medicine Publishing Company.* 2009 : 1-475.
 8. Lee IS, Kang KS, Kim SY. Panax ginseng pharmacopuncture: current status of the research and future challenges. *Biomolecules.* 2019 ; 10(1) : 33.
 9. Jeong JH, Ku J, Hwang JH. A study on the significance of acupuncture and pharmacopuncture therapy for cold accumulation through a literature review on the historical development process in cold accumulation treatment. *J Acupunct Res.* 2022 ; 39(4) : 267-74.
 10. Choi SJ, Kim DI. The review on trend of clinical studies of Hominis placenta pharmacopuncture on obstetrics & gynecology diseases. *J Korean Obstet Gynecol.* 2019 ; 32(1) : 15-25.
 11. De D, Datta Chakraborty P, Mitra J, Sharma K, Mandal S, Das A, et al. Ubiquitin-like protein from human placental extract exhibits collagenase activity. *PLoS One.* 2013 ; 8(3) : e59585.
 12. De D, Chakraborty PD, Bhattacharyya D. Regulation of trypsin activity by peptide fraction of an aqueous extract of human placenta used as wound healer. *J Cell Physiol.* 2011 ; 226(8) : 2033-40.
 13. Choi SJ, Kim DI, Yoon SH, Choi CM, Yoo JE. Randomized, single-blind, placebo-controlled trial on Hominis placenta extract pharmacopuncture for hot flashes in peri-and post-menopausal women. *Integr Med Res.* 2022 ; 11(4) : 100891.
 14. Hwang JH, Cho HS, Lee HJ, Lee DG, Jeong WJ, Jung CY, et al. Effect of inhibition macrophage migration inhibitory factor activation by Hominis placenta herbal acupuncture on rheumatic arthritis. *J Acupunct Res.* 2008 ; 25(3) : 41-51.
 15. Kim JW, Kim CY, Choi SP, Han SW, Lee JC, Kim DH. The case report of trigger finger improved with Hominis placenta pharmacopuncture treatment. *J Pharmacopunct.* 2010 ; 13(4) : 139-47.
 16. Lee DE, Park WH, Cha YY. The case report of chronic ankle sprain improved with Hominis placenta pharmacopuncture treatment. *J Korean Med Rehabil.* 2016 ; 26(3) : 171-81.
 17. Zha W, Sun Y, Gong W, Li L, Kim W, Li H. Ginseng and ginsenosides: therapeutic potential for sarcopenia. *Biomed Pharmacother.* 2022 ; 156 : 113876.
 18. Korean pharmacopuncture institute. Outline of herbal acupuncture therapy. *Korean Pharmacopuncture Institute.* 1999 : 318-23.
 19. Shin H, Lee JH, Kang HW. A systematic review of placenta pharmacopuncture for neuropsychiatric diseases in practice. *J Orient Neuropsychiatry.* 2022 ; 33(2) : 157-80.
 20. Carotti D, Allegra E. An approach to chemical characterization of human placental extracts: proteins, peptides, and amino acids analyses. *Physiol Chem Phys.* 1981 ; 13(2) : 129-36.
 21. Noh JH, Park JA, Youn HM, Jang KJ, Song CH, Ahn CB, et al. The effect of Hominis placenta pharmacopuncture on leg spasticity of stroke patients (a pilot study, double blind, randomized, controlled clinical trial). *J Pharmacopunct.* 2009 ; 12(4) : 97-110.
 22. Song GC, Seo JY, Cho MU, Song SB, Choi BS, Ryu WH, et al. Case report of patients diagnosed with spinal stenosis treated by Hominis placenta megadose pharmacopuncture combined with Korean medicine treatment. *J Physiol Pathol Korean Med.* 2018 ; 32(2) : 141-7.
 23. Baek SH, Lee IH, Kim MJ, Kim EJ, Ha IH, Lee JH, et al. Component analysis and toxicity study of combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture. *J Int Korean Med.* 2015 ; 36(2) : 189-99.
 24. Lin CH, Lin YA, Chen SL, Hsu MC, Hsu CC. American ginseng attenuates eccentric exercise-induced muscle

- damage via the modulation of lipid peroxidation and inflammatory adaptation in males. *Nutrients*. 2021 ; 14(1) : 78.
25. Jung HC, Lee NH, Kim YC, Lee S. The effects of wild ginseng extract on psychomotor and neuromuscular performance recovery following acute eccentric exercise: a preliminary study. *Appl Sci*. 2010 ; 10(17) : 5839.
26. Seok YM, Yoo JM, Nam Y, Kim J, Kim JS, Son JH, et al. Mountain ginseng inhibits skeletal muscle atrophy by decreasing muscle RING finger protein-1 and atrogin1 through forkhead box O3 in L6 myotubes. *J Ethnopharmacol*. 2021 ; 270 : 113557.
27. Favero G, Rodella LF, Nardo L, Giugno L, Cocchi MA, Borsani E, et al. A comparison of melatonin and α -lipoic acid in the induction of antioxidant defences in L6 rat skeletal muscle cells. *Age (Dordr)*. 2015 ; 37(4) : 9824.
28. Mankhong S, Kim S, Moon S, Kwak HB, Park DH, Kang JH. Experimental models of sarcopenia: bridging molecular mechanism and therapeutic strategy. *Cells*. 2020 ; 9(6) : 1385.
29. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 ; 4(2) : a008342.
30. Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'Emilio A, Biagiotti L, et al. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J Cell Biochem*. 2009 ; 108(6) : 1302-17.
31. Kim BS. The effects of endurance exercise and selenium treatment on mitochondrial transcription factors expression in old GK rats. *Dev Reprod*. 2010 ; 14(2) : 75-82.
32. Cho S, Kang J, Park S, Lee Y, Kim H, Lee H, inventor; Samsung Electronics Co., Ltd., Sungkyunkwan University Research & Business Foundation, assignee. Composition comprising indoprofen and use thereof. KR20170039452A. 2015 Oct 1.
33. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*. 2005 ; 25(4) : 1354-66.
34. Wagatsuma A, Sakuma K. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. *ScientificWorldJournal*. 2013 ; 2013 : 593267.
35. Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009 ; 20(2) : 98-105.
36. Lee DH. Sirt1 as a new therapeutic target in metabolic and age-related diseases. *Chonnam Med J*. 2010 ; 46(2) : 67-73.
37. Fulco M, Sartorelli V. Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues. *Cell Cycle*. 2008 ; 7(23) : 3669-79.
38. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009 ; 458(7241) : 1056-60.