Salvianolic acid B가 고강도 운동부하에 의한 흰쥐 골격근과 뇌조직의 Oxidative Stress에 미치는 영향

이현준^{1#}, 강성한¹, 권수현¹, 김대경¹, 김지호¹, 문지홍¹, 신정원¹, 이종수², 손낙원^{1*}

1 : 경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공, 2 : 경희대학교 한의과대학 한방재활의학과

Effects of Salvianolic Acid B Against Oxidative Stress in Skeletal Muscle and Brain Tissue following Exhaustive Exercise in Rats

Hyun-Joon Lee^{1#}, Sung-Han Kang¹, Su-Hyeon Kweon¹, Dae-Kyung Kim¹, Jeeho Kim¹,
Ji-Hong Moon¹, Jung-Won Shin¹, Jong-Soo Lee², Nak-Won Sohn^{1*}

1 : Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University,

2 : Department of Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : Salvianolic acid B (SAB) is an active ingredient in *Salvia miltiorrhiza* frequently used for cardiovascular and cerebrovascular diseases. The present study investigated the antioxidant effects of SAB on the skeletal muscle and the brain tissue of rats following exhaustive exercise.

Methods : The rats were treated with oral administration of SAB (30 mg/kg) daily for 5 days prior to the exhaustive exercise. The exhaustive exercise was performed as swimming for 150 min with 5% body weight attached to the tail on the 5th day. The antioxidant effects of SAB was evaluated by measuring the superoxide generation in the gastrocnemius and the 4-HNE expression in the hippocampal tissue. In addition, c-Fos-expressing cells in the brain tissue was observed using immunohistochemistry.

Results : Histological features and muscle fiber type composition were not different between the SAB group and the exhaustive exercise group. SAB significantly reduced the upregulation of superoxide generation in the muscle tissue. SAB significantly reduced the increase of c-Fos-expressing cells in the cerebral cortex, paraventricular thalamic nucleus, dorsomedial hypothalamic nucleus, the CA1, CA3, and DG regions of hippocampus. SAB significantly reduced the upregulation of 4-HNE expression in the CA1 and DG regions of hippocampus caused by the exhaustive exercise.

Conclusions : The results suggest that SAB exerts antioxidative effect against oxidative stress in the skeletal muscle and the brain tissue following exhaustive exercise, while SAB may has an anti-stress effect on stress responses in the brain.

Key words : Salvianolic acid B, Oxidative stress, Skeletal muscle, Brain tissue, Exhaustive exercise, Superoxide, c-Fos

*Corresponding author : Nak-Won Sohn, Dept. of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

· Tel : +82-31-202-2747 · E-mail : sohnw@khu.ac.kr

#First author : Hyun-Joon Lee, Dept. of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

· Tel : +82-31-202-2747 · E-mail : karakmj@hanmail.net

· Received : 9 August 2016 · Revised : 22 August 2016 · Accepted : 20 September 2016

I. 서 론

신체 건강유지와 관련하여 과도하지 않은 적절한 운동의 유의한 효과에 대해서는 오래 전부터 잘 알려져 있다. 적절한 운동은 혈액 내 지질 상태를 개선하고 골밀도를 증가시키며 체중을 감소시키므로 심혈관질환, 당뇨병, 암, 고혈압, 비만, 골다공증 등 다양한 만성적인 질병을 예방하는데 효과적이라는 연구 보고는 매우 많다^{1,2)}. 그러나 운동이 과도하면, 특히나 산발적인 과도한 운동은 근육세포의 구조적인 손상이나 근육조직 내에 염증반응을 유발한다. 격렬한 운동은 전신적으로, 특히 근육조직에서 산소 활용을 급격히 증가시키므로 근육조직에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 생성이 증가하게 되고, 과도하게 생산된 ROS가 근육조직에 산화스트레스 (oxidative stress)를 가하므로 근육조직과 근육세포의 손상이 유발된다^{3,4)}. 나아가 적절한 운동은 퇴행성 뇌질환과 우울증, 불안 장애 등 정신질환을 개선하는 작용이 있으며^{1,5)}, 인지기능을 개선하는데도 효과적이라고 하였다⁶⁾. 그럼에도 불구하고 과도한 운동은 뇌조직에도 산화적 손상을 유발하며, 인지기능을 악화시킨다고 하였다⁷⁾. 그러므로 적절한 운동으로 산화스트레스에 대한 내성을 증강시키는 것과 함께 항산화 효능을 가진 약물에 대한 연구는 과도한 운동에 의한 산화적 손상을 예방하는데 매우 의의가 있다고 하였다^{8,9)}.

Salvianolic acid B (SAB)는 活血祛瘀하고 涼血消癰하며 養血安神의 효능으로 심혈관질환과 뇌혈관질환에 많이 사용되는 丹蔘 (*Salvia miltiorrhiza*)의 가장 주된 생리활성 성분 중 하나이며^{10,11)}, SAB는 심혈관과 심장 손상에 대해 보호효능이 있고¹²⁾, 혈관내피세포 손상¹³⁾, 동맥경화¹⁴⁾, 심장근육의 허혈¹⁵⁾, 뇌허혈¹⁶⁾과 척수의 허혈손상¹⁷⁾ 등에 대해 항산화 효능을 통해 보호효능을 발휘한다고 하였다. 그러므로 본 연구에서는 다양한 허혈 상태에서 항산화 효능을 발휘하는 SAB가 과도한 운동에 의한 근육조직과 뇌조직의 산화스트레스에 대해서도 유의한 효능이 있을 것으로 생각되어 그 영향을 면역조직화학염색 방법을 통해 관찰해보고자 하였다.

흰쥐에 SAB를 5일간 투여하고 고강도 수영을 실시한 다음 뒷다리의 비복근 (gastrocnemius)에서 근섬유의 굵기와 myosin heavy chain I (MyHC-I)에 대한 근섬유형 비율 및 superoxide 생성의 변화, 뇌조직에서 c-Fos 발현세포와 4-hydroxynoneal (4-HNE) 발현을 관찰한바 유의한 효능을 관찰하였으므로 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Seoul, Korea)에서 구입한 12주령, 약 280g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 경희대학교의 실험동물윤리규정 (KHUASP-10-008)에 적합하게 전과정을 처리하였다.

2. 약물 및 투여

본 실험에 사용한 SAB (Fig. 1)는 Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, China)에서 구입하였으며, 생리식염수에 녹여 30 mg/kg을 1일 1회, 5일 동안 경구투여 하였다.

Fig. 1. Chemical structure of salvianolic acid B.

3. 고강도 수영 및 실험군의 구분

고강도수영 (exhaustive swimming)은 Oláh 등¹⁸⁾의 방법에 따라, SAB 투여 5일째에 각각 체중의 5% 무게추를 꼬리에 매단 흰쥐를 온수 (30±1℃)를 가득 채운 원통형 스테인리스 수조 (직경 90 cm, 높이 32 cm)에 넣어 150분간 동일하게 실시하였다. 각 실험동물은 고강도수영 실시 48시간 전에 수영 적응훈련을 5분간 1회 실시하였으며, 수영하는 동안 약 3초 이내에 수면으로 올라오지 못하는 개체는 실험자가 수면으로 올라올 수 있도록 유도하였다. 실험군은 고강도 수영을 실시하지 않은 정상대조군 (Control), 고강도 수영을 실시한 대조군 (ExE) 및 SAB를 5일간 투여한 다음 고강도 수영을 실시한 약물군 (ExE+SAB)으로 구분하였으며, 각 군 당 12마리의 실험동물을 사용하였다.

4. 근육 및 뇌의 적출

각 군의 실험동물을 6마리 씩 무작위로 선택하여 6마리는 근육조직 실험용으로, 6마리는 뇌조직 실험용으로 사용하였다. 근육조직 실험용은 고강도수영 2시간 후에 실험동물을 ketamine으로 마취한 다음 곧바로 단두하여 희생시키고 뒷다리의 비복근을 분리하여 -40℃의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시켰다. 뇌조직 실험용은 마취 후 개흉하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하고 뇌를 적출하여 24시간 동안 post-fixation하고, sucrose 용액에 담가 침전시킨 다음 뇌조직을 -40℃의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시켰다. 각각의 동결조직은 cryocut으로 20 μm 두께의 조직절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

5. 근육 및 뇌조직의 염색

근육조직은 일반적인 조직학적 관찰을 위해서 hematoxyrine & eosin (H&E) 염색을 실시하였고, 근섬유형 구분을 위해서는 MyHC-I에 대한 면역조직화학염색을, 산화적 손상에 의한 superoxide 형성을 관찰하기 위해서는 oxidative fluorescent dye인 dihydroethidium (DHE) 염색을 실시하였다. DHE 염색은 어두운 습식 상자 내에서 1 μM DHE (in PBS; pH 7.4)

용액에 30분간 반응시키고, 탈수 봉합하여 조직표본을 제작하였으며, 형광염색된 조직을 공초점현미경 (LSM 510 META laser-scanning microscope, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 관찰하였다. 뇌조직에서는 c-Fos와 4-HNE에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 각각의 조직 절편을 0.05 M PBS로 10분간 2회 씻어내고, 3% H₂O₂에서 30분간 반응시킨 다음 다시 2회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 2회 씻어 낸 후, MyHC-I의 면역조직화학염색을 위해서 mouse anti-MyHC-I antibody (1:10,000, M-8421, Sigma, USA), 뇌조직에 대해서는 rabbit-anti-Fos (1:200, NM_005252, OriGene, USA)와 mouse anti-4-HNE (1:200, ab48506, Abcam, UK)를 1차항체로 사용하여 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 반응시켰다. 이후 2차항체에 반응시키고, avidin-biotin complex (Vector Laboratories, USA) 방법에 따라 0.05% DAB (Sigma-Aldrich, USA)으로 발색한 다음 통상적인 면역조직화학염색법에 따라 조직표본을 제작하였다.

6. 영상분석

영상분석은 ImageJ software (Ver. 1.44p, NIH, USA)를 사용하여, MyHC-I 염색조직에서 근섬유형별 근섬유의 굵기와 근섬유형 비율을 측정하였으며, DHE 염색조직에서는 DHE 반응 적색형광의 강도를 측정하였다. 뇌조직에서는 대뇌피질 (cerebral cortex, CC), 뇌실방시상핵 부위 (paraventricular thalamic nucleus, PVT), 배내측시상하부핵 부위 (dorsomedial hypothalamic nucleus, DMH)와 해마의 cornu ammonis area 1 (CA1), cornu ammonis area 3 (CA3), 치상회 (dentate gyrus, DG) 부위에서 c-Fos 발현세포 수와 4-HNE 발현 강도를 측정하였다. c-Fos 발현세포 수는 CC, PVT, DMH 부위에서는 100,000 μm^2 당, CA1, CA3, DG 부위에서는 50,000 μm^2 당 세포 수로 정량화 되었으며, 모든 영상분석은 각 실험동물 당 4장의 조직표본, 조직표본 당 4시야에서 영상분석을 실시하여 그 평균값을 각 실험동물의 측정치로 사용하였다.

7. 통계처리

본 논문에 제시된 자료들은 mean $\pm$ standard error로 표시되었으며, 각 자료의 통계적 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하여 $p < 0.05$ 이상의 유의수준으로 검정하였다.

III. 결 과

1. 근섬유 굵기와 근섬유형 구성 비율의 변화

비복근에서 고강도 수영에 따른 근섬유의 변화를 관찰한바 Control군, ExE군과 ExE+SAB군 모두에서 근섬유의 일반적인 조직학적 형태에서 큰 변화가 없었다 (Fig. 2-A). 근섬유

굵기를 측정한 결과 Control군에서 type I 근섬유는 $2,327.6 \pm 242.4 \mu\text{m}^2$, type II 근섬유는 $3,956.8 \pm 278.5 \mu\text{m}^2$ 이었고, ExE군과 ExE+SAB군 모두 이 범위 내에서 변화가 없었다 (Fig. 2-B, C, D). Type I과 type II 근섬유의 구성 비율을 측정한 결과 Control군에서 type I 근섬유가 $28.5 \pm 1.6 \%$, type II 근섬유가 $71.5 \pm 1.6 \%$ 이었고, ExE군과 ExE+SAB군 모두 이 범위 내에서 변화가 없었다 (Fig. 2-B, C, D).

Fig. 2. Representative photographs of H&E stained (A) and MyHC-I immuno-stained sections of the gastrocnemius muscle (B; control group, C; ExE group, D, ExE+SAB group). In the sections, the "I" indicates type I muscle fiber and the "II" indicates type II muscle fiber. Scale bars are 200 μm .

2. 근육조직 superoxide 생성의 변화

Superoxide 형성을 관찰하기 위해 DHE 형광염색을 실시한 근육조직에서 적색형광 강도를 측정한 결과, Control군에서 type I 근섬유는 2.7 ± 0.3 형광강도, type II 근섬유는 2.6 ± 0.2 형광강도를 나타내었다. ExE군에서는 type I 근섬유는 35.5 ± 2.3 형광강도로 Control군에 비해 매우 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였고, type II 근섬유는 7.1 ± 1.6 형광강도로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다. 이에 비해 ExE+SAB군에서는 type I 근섬유는 21.1 ± 1.6 형광강도로 ExE군에 비해 매우 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였고, type II 근섬유는 3.1 ± 0.4 형광강도로 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하여 superoxide 형성이 유의하게 감소된 것이 관찰되었다 (Fig. 3).

3. 대뇌피질, 뇌실방시상핵, 배내측시상하부핵에서 c-Fos 발현세포의 변화

뇌조직에서 c-Fos 발현세포 수를 측정한 결과, 대뇌피질에서 Control군은 5.3 ± 3.3 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$ 이었고, ExE군은 173.7 ± 16.6 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$ 로 Control군에 비해 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 100.7 ± 14.0 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$ 로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있는 c-Fos 발현세포 수의 감소가 관찰되었다. 뇌실방시상핵 부위

에서 Control군은 45.3 ± 11.2 개/ $10^5 \mu m^2$ 이었고, ExE군은 145.0 ± 14.0 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 Control군에 비해 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 95.7 ± 14.8 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 c-Fos 발현세포 수의 감소가 관찰되었다. 배내측시상하부핵 부위에서 Control군은 33.0 ± 3.8 개/ $10^5 \mu m^2$ 이었고, ExE군은 166.7 ± 19.4 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 Control군에 비해 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 84.3 ± 12.4 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있는 c-Fos 발현세포 수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 4).

Fig. 3. Representative photographs of dihydroethidium (DHE) fluorescence staining in the gastrocnemius muscle after the exhaustive swimming. Intensity of red fluorescence of DHE demonstrates the superoxide formation in the muscle fibers (A). The “I” indicates type I muscle fiber and the “II” indicates type II muscle fiber. SAB significantly reduced superoxide formation in the gastrocnemius muscle after the exhaustive swimming (B). Data presented mean $\pm$ standard error ($n = 6$ in each group; *, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$; ‡, $p < 0.001$ compared between Control and ExE; §, $p < 0.05$; ||, $p < 0.01$; ¶, $p < 0.001$ compared between ExE and ExE+SAB).

Fig. 4. Representative photographs of c-Fos immunostaining in the brain tissue after the exhaustive swimming (A). Arrows indicate the c-Fos-expressing cells. Scale bar is $200 \mu m$. CC, cerebral cortex; PVT, paraventricular thalamic nucleus; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus. SAB significantly reduced c-Fos-expressing cells in the brain tissue after the exhaustive swimming (B). Data presented mean $\pm$ standard error ($n = 6$ in each group; *, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$; ‡, $p < 0.001$ compared between Control and ExE; §, $p < 0.05$; ||, $p < 0.01$; ¶, $p < 0.001$ compared between ExE and ExE+SAB).

4. 해마의 CA1, CA3, DG에서 c-Fos 발현세포의 변화

해마 조직에서 c-Fos 발현세포 수를 측정한 결과, CA1에서 Control군은 4.3 ± 0.9 개/ $5 \times 10^4 \mu m^2$ 이었고, ExE군은 17.7 ± 1.8 개/ $5 \times 10^4 \mu m^2$ 로 Control군에 비해 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 $11.0 \pm 2.1 / 5 \times 10^4 \mu m^2$ 로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 c-Fos 발현세포 수의 감소가 관찰되었다. CA3에서 Control군은 6.7 ± 1.8 개

$/5 \times 10^4 \mu m^2$ 이었고, ExE군은 24.0 ± 1.5 개/ $5 \times 10^4 \mu m^2$ 로 Control군에 비해 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 16.3 ± 2.7 개/ $5 \times 10^4 \mu m^2$ 로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 c-Fos 발현세포 수의 감소가 관찰되었다. DG에서 Control군은 7.7 ± 0.9 개/ $5 \times 10^4 \mu m^2$ 이었고, ExE군은 58.3 ± 4.1 개/ $5 \times 10^4 \mu m^2$ 로 Control군에 비해 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 45.0 ± 2.9 개/ $5 \times 10^4 \mu m^2$ 로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 c-Fos 발현세포 수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 5).

Fig. 5. Representative photographs of c-Fos immuno-staining in the hippocampal tissue after the exhaustive swimming (A). Arrows indicate the c-Fos-expressing cells. Scale bar is $200 \mu m$. CA1, cornu ammonis area 1; CA3, cornu ammonis area 3, DG; dentate gyrus. SAB significantly reduced c-Fos-expressing cells in the brain tissue after the exhaustive swimming (B). Data presented mean $\pm$ standard error ($n = 6$ in each group; *, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$; ‡, $p < 0.001$ compared between Control and ExE; §, $p < 0.05$; ||, $P < 0.01$; ¶, $p < 0.001$ compared between ExE and ExE+SAB).

5. 해마의 CA1, CA3, DG에서 4-HNE 발현의 변화

해마 조직에서 4-HNE 발현을 측정된 결과, CA1에서 Control군의 100.7 ± 1.9 %에 비해 ExE군은 168.1 ± 11.8 %로 Control군에 비해 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 128.4 ± 9.5 %로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 4-HNE 발현의 감소가 관찰되었다. CA3에서는 Control군은 100.2 ± 1.7 %에 비해 ExE군은 123.9 ± 12.0 %, ExE+SAB군은 117.0 ± 5.2 %로 각 군들 사이에 유의한 변화가 없었다. DG에서 Control군은 101.1 ± 1.2 %에 비해 ExE군은 132.1 ± 9.4 %로 Control군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었으며, ExE+SAB군은 106.3 ± 6.3 %로 ExE군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 4-HNE 발현의 감소가 관찰되었다 (Fig. 6).

Fig. 6. Representative photographs of 4-HNE immuno-staining in the hippocampal tissue after the exhaustive swimming (A). Arrows indicate the 4-HNE expression. Scale bar is $200 \mu m$. CA1, cornu ammonis area 1; CA3, cornu ammonis area 3, DG; dentate gyrus. SAB significantly reduced 4-HNE expression in the CA1 and DG regions of hippocampal tissue after the exhaustive swimming (B). Data presented mean $\pm$ standard error ($n = 6$ in each group; *, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$; ‡, $p < 0.001$ compared between Control and ExE; §, $p < 0.05$; ||, $P < 0.01$; ¶, $p < 0.001$ compared between ExE and ExE+SAB).

IV. 고 찰

사람과 실험동물 모두에서 과도한 운동이 근육조직에서 ROS 생성을 증가시켜 산화적 손상을 유발한다는 것은 많이 연구 보고되어 있다^{19,20)}. ROS 생성과 항산화효소 작용 사이의 불균형은 산화적 손상을 유발하며, 산화적 손상의 강도는 운동의 강도와 비례적인 상관관계에 있으므로 고강도의 운동은 더 심한 산화적 손상을 유발한다고 하였다²¹⁾. 특히 적응훈련이 되지 않은 고강도의 운동은 단시간의 운동으로도 근육조직에 산화적 손상을 유발한다고 하였다²²⁾. 본 실험에서는 흰쥐에 150분간의 고강도 수영을 실시한 다음 일차적으로 비복근의 조직학적 변화를 관찰하였다. 그 결과, 골격근섬유의 일반적인 조직학적 형태는 큰 변화가 없었으며, type I 근섬유와 type II 근섬유의 구성 비율 역시 변화가 없었다. 이는 한 차례의 격렬한 운동으로 근육조직의 구조-조직학적 손상까지는 유발되지는 않았다는 것을 보여준다.

근섬유는 에너지대사와 근육수축, 피로 저항력 등의 특성 및 MyHC의 발현에 따라 주로 type I과 type IIa, IIx, IId 등의 근섬유형으로 구분된다²³⁾. Type I 근섬유는 수축 강도가 약하고 수축 속도가 느린 반면에 피로 저항력이 강하며 유산소대사에 의해 에너지를 얻으므로 slow-twitch fiber 또는 oxidative fiber로 알려져 있고, type II 근섬유들은 빠르고 강한 수축력에 비해 피로 저항력이 약한 특성을 가지므로 fast-twitch fiber로 불리고, 무산소대사에 의해 에너지를 얻으므로 glycolytic fiber로 알려져 있다²⁴⁾. 한편으로 superoxide 표지물질인 DHE는 oxidative fluorescent dye로서 자유롭게 세포막을 통과하여 세포 안으로 들어가 축적되며, 미토콘드리아의 DNA와 RNA에 작용하여 ethidium이 ROS에 의해 산화될 때 적색형광을 발산한다²⁵⁾. 그러므로 세포내 superoxide의 생성을 관찰하는 간접적인 방법으로 DHE 염색이 사용되고 있다²⁶⁾. 본 연구에서 고강도 수영 후 비복근에서 superoxide 생성을 관찰한 결과, 고강도 수영은 type I 근섬유에서 DHE 적색형광의 발현 강도를 매우 증가시켜 superoxide 생성이 현저하게 증가한 것으로 관찰되었으며, type II 근섬유에서의 적색형광 발현에 비해서도 매우 확연하였다. 이는 type I 근섬유가 oxidative fiber이므로 glycolytic한 type II 근섬유에 비해 superoxide의 생성이 더욱 촉진된 것으로 판단된다. 이에 비해 SAB투여는 type I 근섬유의 superoxide 생성을 유의하게 감소시켰으며, type II 근섬유에서도 superoxide 생성이 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 SAB가 과도한 운동에 의한 근육조직의 ROS 생성을 억제하여 산화스트레스를 완화하는 작용이 있음을 추측하게 한다.

과도한 운동은 뇌조직에도 스트레스 반응을 유발한다고 하였으므로⁷⁾, 본 연구에서는 고강도 수영 후 뇌조직의 각 부위에서 c-Fos 발현세포를 관찰하였다. c-Fos는 다양한 자극에 의해 중추신경계에서 발현되는 immediate early genes (IEGs)의 일종으로²⁷⁾, 생리적인 상태에서 IEGs 발현은 매우 낮은 상태이나 자극이 있을 경우 그 자극에 대해 기능적으로 대응되는 뇌부위의 신경세포 활성화로 IEGs 발현이 증가하며, 병리적인 상태에서는 중추신경계의 광범위한 부위에서 IEGs 발현의 증가가 나타난다^{28,29)}. 또한 신체 운동자극에 대해서도 운동의 강도에 따라 뇌조직에서 c-Fos 발현이 증가한

다고 하였다³⁰⁾. 본 연구의 결과, 고강도 수영은 대뇌피질과 뇌실방시상핵 및 배내측시상하부핵 부위에서 c-Fos 발현세포 수를 매우 증가시키고, SAB투여는 이들 c-Fos 발현세포 수를 유의하게 억제하였다. 대뇌피질은 모든 뇌기능의 최고위 중추이고, 뇌실방시상핵은 스트레스에 특별히 민감한 뇌부위로 다양한 신체적, 정신적 스트레스에 의해 강하게 c-Fos 발현이 증가하는 부위로 알려져 있다^{31,32)}. 배내측시상하부핵은 스트레스에 대한 심혈관계통의 반응으로써 심박동과 혈압을 조절하는 뇌부위로 알려져 있다³³⁾. 그러므로 본 연구의 결과는 SAB가 과도한 운동에 의한 스트레스 반응을 완화시키는 작용이 있는 것을 추측하게 한다.

또한 이전의 연구 보고에서 운동스트레스가 해마의 DG에서 c-Fos 발현을 증가시킨다고 하였고³⁴⁾, 또한 해마에서 c-Fos 발현은 운동의 강도와 시간에 비례한다고 하였다³⁰⁾. 본 연구의 결과, 고강도 수영은 해마의 CA1, CA3과 특히 DG 부위에서 c-Fos 발현세포 수를 매우 증가시키고, SAB투여는 이들을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 SAB가 과도한 운동에 의한 해마 신경세포의 스트레스 반응을 억제한 것을 보여주는 결과이다. 이전의 연구 보고들에서 적절한 운동은 인지 기능을 개선하는 작용이 있으나 과도한 운동은 스트레스로 작용하여 인지 기능을 악화시킨다는 보고^{6,7)}를 참고하면, SAB가 해마 신경세포의 스트레스 반응 조절에 유익한 작용을 하는 것으로 추측할 수 있다.

산화스트레스는 ROS 생성에 의해 뇌 신경세포의 세포막 지질을 과산화시키고, DNA를 손상시킨다³⁵⁾. 또한 과도한 운동은 간세포와 근육세포 및 뇌 신경세포에서 지질과산화를 증가시킨다고 하였다^{7,36)}. 그러므로 해마 조직에서 지질과산화의 산물인 4-HNE 발현³⁷⁾을 면역조직화학염색으로 관찰한 결과, 해마 CA3 부위에서는 4-HNE 발현이 유의한 변화가 없었으나, CA1과 DG 부위에서 유의한 증가를 보였고, SAB투여는 이러한 해마 CA1과 DG 부위의 신경세포에서 4-HNE 발현을 유의하게 억제하였다. 이전의 연구에서 SAB가 뇌혈액 손상에서 해마 신경세포의 지질과산화를 억제하는 작용이 있다는 보고된 바 있다³⁸⁾. 이러한 이전의 보고와 함께 생각해 보면, SAB는 과도한 운동에 의한 해마 신경세포의 산화스트레스를 억제하는 작용이 있는 것으로 생각할 수 있다.

본 연구의 결과들을 종합하면, SAB는 고강도 수영에 의한 뇌조직의 c-Fos 발현세포를 억제하는 항스트레스 작용을 나타내었으며, 근육조직에서 superoxide 생성을 억제하고, 뇌 해마에서 4-HNE 발현을 억제하는 항산화 작용을 나타내었다. 그러므로 SAB는 과도한 운동에 의한 근육조직과 뇌조직의 산화스트레스를 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과는 근육과 뇌 조직에 대한 면역조직화학염색 방법에 의해 얻어진 것으로 丹蔘 또는 SAB의 과도한 운동에 의한 산화적 손상을 예방하는 약물 개발의 기초적인 자료가 될 것이며, SAB의 과도한 운동에 의한 산화적 손상을 예방하는 효능과 기전을 명확히 설명하기 위해서는 보다 진전된 연구가 필요한 것으로 생각된다.

V. 결 론

丹蔘의 주요 성분인 SAB가 고강도 운동부하에 의한 골격근과 뇌조직의 산화스트레스에 대한 영향을 관찰하기 위해 흰쥐에 SAB를 5일간 경구투여하고 고강도 수영을 실시한 다음 비복근에서 조직학적 변화, superoxide 생성의 변화와 뇌조직에서 c-Fos 발현세포 및 4-HNE 발현을 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. SAB와 고강도 운동부하에 의해 비복근의 근섬유 굵기와 근섬유형의 구성 비율은 유의한 변화가 없었다.
2. SAB는 고강도 운동부하에 의한 근육조직의 superoxide 생성을 유의하게 억제하였다.
3. SAB는 고강도 운동부하에 의한 대뇌피질, 뇌실방상핵, 배내측시상하부핵, 해마의 CA1, CA3, DG 부위의 c-Fos 발현세포의 증가를 유의하게 억제하였다.
4. SAB는 고강도 운동부하에 의한 해마 CA1과 DG 신경세포의 4-HNE 발현 증가를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로 보아, SAB는 과도한 운동에 의한 근육조직과 뇌조직의 산화스트레스를 억제하는 작용이 있으며, 뇌조직의 스트레스반응을 억제하는 작용이 있음을 생각할 수 있다.

참고문헌

1. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006 ; 174 : 801-9.
2. Kruk J. Physical activity in the prevention of the most frequent chronic diseases: an analysis of the recent evidence. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2007 ; 8 : 325-38.
3. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*. 1988 ; 5 : 156-70.
4. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*. 1995 ; 18 : 1079-86.
5. Goodwin RD. Association between physical activity and mental disorders among adults in the United States. *Prev Med*. 2003 ; 36 : 698-703.
6. Petrovitch H, White L. Exercise and cognitive function. *Lancet Neurol*. 2005 ; 4 : 690-1.
7. Rosa EF, Takahashi S, Aboulafia J, Nouailhetas VL, Oliveira MG. Oxidative stress induced by intense and exhaustive exercise impairs murine cognitive function. *J Neurophysiol*. 2007 ; 98 : 1820-6.
8. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*. 2008 ; 44 : 126-31.
9. Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015 ; 31 : 916-22.
10. Kim HC. Herbal pharmacology. Seoul, Jipmoon-dang. 2001 ; 332-4.
11. Ho JH, Hong CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J Biomed Sci*. 2011 ; 18 : 30.
12. Wang J, Xiong X, Feng B. Cardiovascular effects of salvianolic Acid B. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013 ; 2013 : 247948.
13. Tang Y, Jacobi A, Vater C, Zou X, Stiehler M. Salvianolic acid B protects human endothelial progenitor cells against oxidative stress-mediated dysfunction by modulating Akt/mTOR/4EBP1, p38 MAPK/ATF2, and ERK1/2 signaling pathways. *Biochem Pharmacol*. 2014 ; 90 : 34-49.
14. Lee HJ, Seo M, Lee EJ. Salvianolic acid B inhibits atherogenesis of vascular cells through induction of Nrf2-dependent heme oxygenase-1. *Curr Med Chem*. 2014 ; 21 : 3095-106.
15. Xue L, Wu Z, Ji XP, Gao XQ, Guo YH. Effect and mechanism of salvianolic acid B on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian Pac J Trop Med*. 2014 ; 7 : 280-4.
16. Jiang YF, Liu ZQ, Cui W, Zhang WT, Gong JP, Wang XM, Zhang Y, Yang MJ. Antioxidant effect of salvianolic acid B on hippocampal CA1 neurons in mice with cerebral ischemia and reperfusion injury. *Chin J Integr Med*. 2015 ; 21 : 516-22.
17. Fu J, Fan HB, Guo Z, Wang Z, Li XD, Li J, Pei GX. Salvianolic acid B attenuates spinal cord ischemia-reperfusion-induced neuronal injury and oxidative stress by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway in rats. *J Surg Res*. 2014 ; 188 : 222-30.
18. Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Ruppert M, Merkely G, Szabó G, Merkely B, Radovits T. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. *Int J Cardiol*. 2015 ; 182 : 258-66.
19. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*. 2005 ; 35 : 1045-62.
20. Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boehme C, Hoidal JR, Wang L, Rajasekaran NS. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med*. 2012 ; 52 : 366-76.

21. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN. Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1987 ; 56 : 313–6.
22. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*, 2005 ; 19 : 276–85.
23. Ennion S, Sant'ana Pereira J, Sargeant AJ, Young A, Goldspink G. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995 ; 16 : 35–43.
24. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 2011 ; 91 : 1447–531.
25. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006 ; 103 : 15038–43.
26. Pearson T, Kabayo T, Ng R, Chamberlain J, McArdle A, Jackson MJ. Skeletal muscle contractions induce acute changes in cytosolic superoxide, but slower responses in mitochondrial superoxide and cellular hydrogen peroxide. *PLoS One*, 2014 ; 9 : e96378.
27. Curran T, Morgan JI. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol*, 1995 ; 26 : 403–12.
28. Morgan JI, Curran T. Stimulus–transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci*, 1989 ; 12 : 459–62.
29. Kiessling M, Gass P. Stimulus–transcription coupling in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol*, 1994 ; 4 : 77–83.
30. Lee TH, Jang MH, Shin MC, Lim BV, Kim YP, Kim H, Choi HH, Lee KS, Kim EH, Kim CJ. Dependence of rat hippocampal c-Fos expression on intensity and duration of exercise. *Life Sci*, 2003 ; 72 : 1421–36.
31. Spencer SJ, Fox JC, Day TA. Thalamic paraventricular nucleus lesions facilitate central amygdala neuronal responses to acute psychological stress. *Brain Res*, 2004 ; 997 : 234–7.
32. Hsu DT, Price JL. Paraventricular thalamic nucleus: subcortical connections and innervation by serotonin, orexin, and corticotropin-releasing hormone in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 2009 ; 512 : 825–48.
33. Stotz-Potter EH, Willis LR, DiMicco JA. Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci*, 1996 ; 16 : 1173–9.
34. Hong H, Kim CJ, Kim JD, Seo JH. β -glucan reduces exercise-induced stress through downregulation of c-Fos and c-Jun expression in the brains of exhausted rats. *Mol Med Rep*, 2014 ; 9 : 1660–6.
35. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*, 2005 ; 75 : 207–46.
36. Hara M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Nakamura N, Suzuki T, Reiter RJ, Hirata K. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol Signals*, 1997 ; 6 : 90–100.
37. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 1991 ; 11 : 81–128.
38. Du GH, Qiu Y, Zhang JT. Salvianolic acid B protects the memory functions against transient cerebral ischemia in mice. *J Asian Nat Prod Res*, 2000 ; 2 : 145–52.