한방비만학회지 제17권 제2호, 2017
J Korean Med Obes Res 2017;17(2):77-86
https://doi.org/10.15429/jkomor.2017.17.2.77
pISSN 1976-9334, eISSN 2288-1522

JKOMOR
Original Article

고강도 운동부하에 의한 흰쥐의 심장근육 손상에 대한 Salvianolic Acid B의 효능에 대한 연구

임웅진 · 이종수

경희대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Effect of Salvianolic Acid B on Cardiac Muscle Damage Following Exhaustive Exercise in Rats

Ung-Jin Im, Jong-Soo Lee

Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

Received: November 4, 2017
Revised: November 27, 2017
Accepted: November 27, 2017

Correspondence to: Jong-Soo Lee
Department of Korean Medicine Rehabilitation, Kyung-Hee University Medical Center, 23 Kyungheedae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Korea
Tel: +82-2-958-9214
Fax: +82-2-963-4983
E-mail: jslee@khu.ac.kr

Copyright © 2017 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: This study examined the effects of salvianolic acid B (SAB) on exhaustive exercise-induced cardiac muscle damage to rats.
Methods: The study was carried out with 12-week-old young adult male Sprague-Dawley rats. Thirty-six rats were divided into 3 groups; normal (n=12), exhaustive exercise group (ExS, n=12) and exhaustive exercise with SAB (ExS+SAB, n=12). Five days before exhaustive exercise, SAB were medicated for 5 days in ExS+SAB group. Rats in ExS and ExS+SAB group were forced to swim for 150 minutes and then they were sacrificed, while rats in normal group were sacrificed at rest. After that, blood was collected and cardiac muscle tissue damage indices were analyzed.
Results: Serum aspartate transaminase activity and lactate dehydrogenase activity were significantly lower in ExS+SAB group than in ExS group. Serum creatine phosphokinase activity of ExS+SAB was significantly lower than ExS group. However, the content of serum creatinine had no difference between ExS and ExS+SAB group. In the H&E stained left ventricle myocardium, ExS group showed signs of myocardial damage such as sporadic fragmentation of myocardial fibers, interstitial edema, cytoplasmic eosinophilia and neutrophils infiltration. However, ExS+SAB group alleviated the severity of the signs of myocardial damage. In the myocardial dihydroethidium staining, optical density was remarkably decreased in ExS+SAB group compared to ExS group. Furthermore, the up-regulation of Bax/Bcl-2 ratio was observed in ExS+SAB group compared with ExS group.
Conclusions: The above results suggest that SAB may protect cardiac muscle damage via antioxidant activity and prevention of apoptosis.

Key Words: *Salvia miltiorrhiza*, Salvianolic acid, Cardiac muscle, Antioxidant, Apoptosis

서 론

심혈관 질환 또는 뇌혈관 질환의 치료에 많이 사용되는 丹蔘 (*Salvia miltiorrhiza*)의 가장 주된 생리활성 성분 중 하나가 salvianolic acid이다[1]. Salvianolic acid는 수용성으로 salvianolic acid A (SAA)와 salvianolic acid B (SAB)로 구분되며 간 보호효능[2], 신경손상 보호효능[3], 항암 효능[4] 등이 있는 것으로 보고되어 있다. SAA와 SAB 모두 높은 항산화 작용이 있는 것으로 보고되고 있으며[5], 특히 SAB는 혈관내피세포, 혈관 평활근세포 및 심근세포에 대한 연구들

을 통해 심혈관 보호(cardiovascular protection)와 심장손상 보호(cardioprotection)의 효능이 있다고 하였다[6].

심장손상 보호작용에 대한 연구를 살펴보면 in vitro 연구에서 SAB는 심근세포의 일종인 H9c2 세포에 대해 산화적 손상을 억제하고[7], arsenic trioxide에 의한 손상에 대해 Bax 발현의 억제와 Bcl-2 발현의 증가를 통해 보호효능을 발휘한다고 하였다[8]. 또한 SAB는 poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase-1 발현의 억제를 통해 angiotensin II로 유발된 어린 흰쥐의 심근세포 손상을 보호한다고 하였으며[9], embryonic stem cell로부터 분화된 심근세포에서 세포자연사 기전을 억제한다는 보고[10] 등 많은 연구들을 통해 심장손상 보호효능을 설명하고 있다. 이러한 SAB의 보호효능에 대해 실험동물을 사용한 in vivo 연구들을 살펴보면 실험동물의 관상동맥 결찰에 의한 심근경색에 대해 심근세포의 자연사를 억제하고[11], matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 작용을 억제하며[12], malondialdehyde 활성을 억제하고[13], 사이토카인 분비를 억제하는 작용에 의해 심근경색의 크기를 줄이며 심장의 기능과 구조적 손상을 보호한다고 하였다[14,15]. 그러나 심근경색 이외의 다양한 심장손상에 대한 SAB의 작용에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

한편으로 급격하고 과도한 운동은 심근세포의 산소 소모를 증가시키므로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 증가시키고 심장의 구조적, 기능적 및 대사적 장애를 초래한다[16,17]. 그러므로 본 연구에서는 SAB가 고강도 운동부하에 의한 심장근육의 손상에 대한 효능을 관찰하고자 하였다. 흰쥐에 SAB를 5일간 투여하고 고강도유영을 실시한 다음 혈중 aspartate transaminase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) 및 creatine phosphokinase (CPK) 활성도와 심장근육의 조직학적 변화, superoxide 생성의 변화, Bax와 Bcl-2 발현의 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍(Nara Biotechnology, Seoul, Korea)에서 구입한 12주령, 약 280 g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도(21°C～23°C), 습도(40%～60%), 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

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 경구투여하였다.

3. 고강도유영의 부여 및 실험군의 구분

SAB 투여 5일째에 각각 체중의 5% 무게추를 꼬리에 매단 흰쥐를 온수(30°C±1°C)를 가득 채운 원통형 스테인리스 수조(직경 90 cm, 높이 32 cm)에 넣어 150분간 동일하게 고강도유영(exhaustive swimming)을 실시하였다. 각 실험동물은 48시간 전에 유영 적응훈련을 5분간 1회 실시하였으며, 유영하는 동안 약 3초 이내에 수면으로 올라오지 못하는 개체는 실험자가 수면으로 올라올 수 있도록 유도하였다. 실험군은 고강도유영을 실시하지 않은 정상군(normal), 고강도유영을 실시한 대조군(exhaustive exercise, ExS) 및 SAB를 5일간 투여한 다음 고강도유영을 실시한 약물군(ExS + SAB)으로 구분하였으며, 각 군당 12마리의 실험동물을 사용하였다.

4. 혈액 채취 및 심장 적출

고강도유영 2시간 후에 실험동물을 ketamine으로 마취한 다음 개흉하고, 심장으로부터 약 3 ml의 혈액을 채취하여 혈청분리관에 담은 후 원심분리기로 4°C, 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이후 곧바로

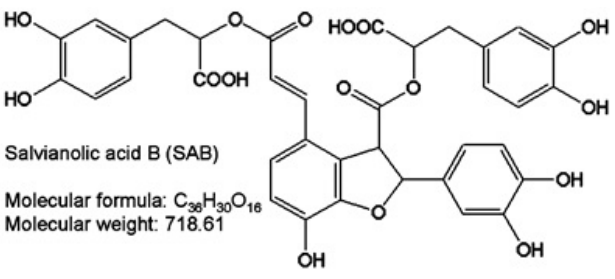

Fig. 1. Chemical structure of SAB.

심장을 적출하여 무작위로 선정한 6마리는 조직표본 제작용으로, 6마리는 Western blotting 측정용으로 사용하였다.

5. 혈액지표의 측정

분리된 혈청으로부터 AST, LDH 및 CPK 활성도와 creatinine 함량을 각각의 전용 측정키트(Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)를 사용하여 생화학적으로 측정하였다.

6. 심장근육조직의 염색 및 관찰

심장근육조직을 cryocut을 사용하여 20 μm 두께의 절편으로 제작한 다음 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 염색에 사용하였다. 심장근육조직의 산발적 분열(sporadic fragmentation)을 관찰하기 위해서 심조직에 일반적인 H&E 염색을 실시한 다음 CCD카메라(DP70; Olympus, Tokyo, Japan)가 장착된 광학현미경(BX51; Olympus)을 사용하여 관찰하고 영상을 저장하였다. Superoxide 형성을 관찰하기 위해서는 oxidative fluorescent dye인 dihydroethidium (DHE) 염색을 실시하였다. DHE 염색은 어두운 습식 상자 내에서 1 μM DHE (in phosphate-buffered saline; pH 7.4) 용액에 30분간 반응시키고, 탈수 봉합하여 조직표본을 제작하였으며, 형광염색된 조직을 공초점현미경(LSM 510 META laser-scanning microscope; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 관찰하고 영상을 저장하였다.

7. 영상분석

심장근육조직의 산발적 분열에 대한 정량적 자료를 위해 그 비율을 H&E 염색된 조직으로부터 ImageJ software ver. 1.44p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 측정하였다. 저장된 컬러영상(Fig. 2A)을 흑백이치 영상(black-white binary image)으로 변환시키고(Fig. 2B), 다시 흑백전환 영상(inverted image)으로 변환한 다음(Fig. 2C) 결정된 gray value보다 높은 값의 pixel들의 면적비율을 측정하였다(Fig. 2D). DHE에 형광염색된 조직에서는 ImageJ software를 사용하여 적색형광의 발현강도를 측정하였다. 각 실험동물 당 4장의 조직표본에서 영상분석을 실시하여 그 평균값을 각 실험동물의 측정치로 사용하였다.

8. 심장근육의 Bax와 Bcl-2 발현 측정

분리된 심장근육 조직을 각각 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS] 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 넣어 균질화하고 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 총량은 Bradford 방법을 사용하여 정량하였으며, 50 μg의 단백질을 포함한 표본을 SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 세분하고, Western blotting을 시행하였다. 1차항체는 anti-Bax (AB7977; Abcam, Cambridge, MA, USA)와 anti-Bcl-2 (SC7382; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 및 anti-β-actin antibody (MAB1501; Merck Millipore, Burlington, MA, USA)를 사용하였다.

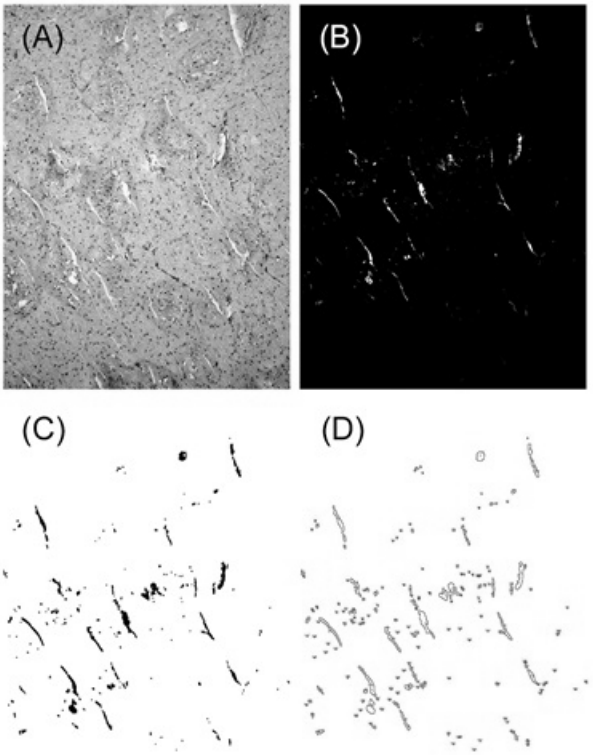

Fig. 2. Illustration of measurement of sporadic fragmentation percentage of myocardial muscles. (A) Original image, H&E stained. (B) Black and white binary images, (C) Inverted binary image, (D) Results from the measurement of sporadic fragmentation.

9. 통계처리

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

결 과

1. 혈중 AST 및 LDH 활성도의 변화

혈중 AST 활성도는 정상군은 64.4±4.8 U/L였고, ExS군은 132.0±7.8 U/L로 정상군에 비해 205.0%로 $P<0.001$의 유의성 있는 활성도 증가를 나타내었다. 이에 비해 ExS+SAB군은 106.8±7.3 U/L로 정상군에 비해 165.9% 증가하고, ExS군에 비해 $P<0.05$의 유의성 있는 활성도의 감소가 관찰되었다(Table 1, Fig. 3). 혈중 LDH 활성도는 정상군은 80.5±13.8 IU/L였고, ExS군은 222.4±22.5 IU/L로 정상군에 비해 276.3%로 $P<0.001$의 유의성 있는 활성도 증가를 나타내었다. 이에 비해 ExS+SAB군은 130.2±15.3 IU/L로 정상군에 비해 161.7% 증가하고, ExS군에 비해 $P<0.01$의 유의성 있는 활성도의 감소가 관찰되었다(Table 1, Fig. 4).

2. 혈중 CPK 활성도 및 creatinine 함량의 변화

혈중 CPK 활성도는 정상군은 245.4±51.7 U/L였고, ExS군은 786.3±74.6 U/L로 정상군에 비해 320.4%로 $P<0.001$의 유의성 있는 활성도 증가를 나타내었다. 이에 비해 ExS+SAB군은 426.8±64.6 U/L로 정상군에 비해 173.9% 증가하고, ExS군에 비해 $P<0.01$의 유의성 있는 활성도의 감소가 관찰되었다(Table 2, Fig. 5). 혈중 creatinine 함량은 정상군은 0.709±0.012 mg/dl였고, ExS군은 0.716±0.016 mg/dl, ExS+SAB군은 0.711±0.019 mg/dl로 각 군간에 유의한 변화는 없었다(Table 2, Fig. 6).

Table 1. Effects of SAB on Serum AST and LDH Activity after Exhaustive Swimming in Rats

	AST (U/L)	LDH (IU/L)
Normal	64.4±4.8	80.5±13.8
ExS	132.0±7.8††† (205.0)	222.4±22.5††† (276.3)
ExS+SAB	106.8±7.3* (165.9)	130.2±15.3** (161.7)

Values are presented as mean±standard error (%)
SAB: salvianolic acid B, AST: aspartate transaminase, LDH: lactate dehydrogenase, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment.
Total number=12 in each group; $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.001$ compared between Normal and ExS; *$P<0.05$; **$P<0.01$ compared between ExS and ExS+SAB.

3. 심장근육의 조직학적 변화 및 산발적 분열 비율의 변화

정상군의 심장근육조직에 비해 ExS군은 심장근육세포의

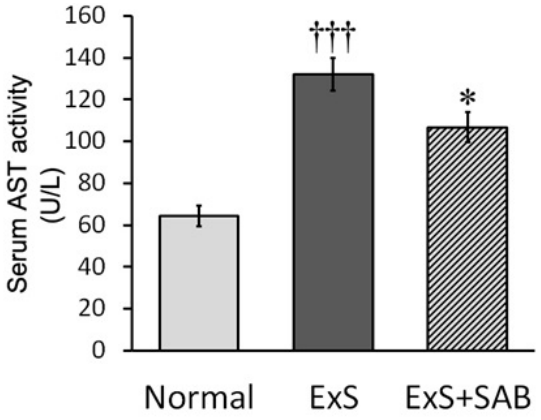

Fig. 3. Effect of SAB on serum AST activity after exhaustive swimming in rats. SAB: salvianolic acid B, AST: aspartate transaminase, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment. Data presented mean± standard error (n=12 in each group; $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.001$ compared between Normal and ExS; *$P<0.05$ compared between ExS and ExS+SAB).

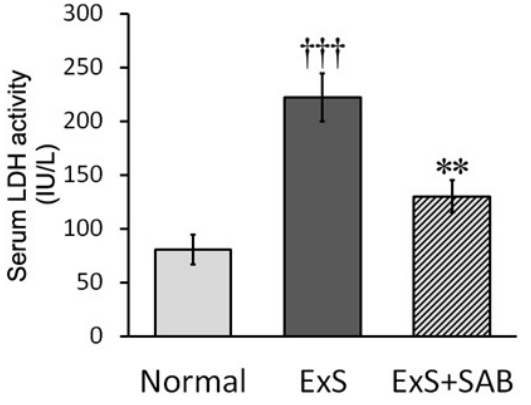

Fig. 4. Effect of SAB on serum LDH activity after exhaustive swimming in rats. SAB: salvianolic acid B, LDH: lactate dehydrogenase, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment. Data presented mean± standard error (n=12 in each group; $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.001$ compared between Normal and ExS; **$P<0.01$ compared between ExS and ExS+SAB).

Table 2. Effects of SAB on Serum CPK Activity and Creatinine Content after Exhaustive Swimming in Rats

	CPK (U/L)	Creatinine (mg/dl)
Normal	245.4±51.7	0.709±0.012
ExS	786.3±74.6††† (320.4)	0.716±0.016 (101.0)
ExS+SAB	426.8±64.6** (173.9)	0.711±0.019 (100.3)

Values presented as mean±standard error (%).
SAB: salvianolic acid B, CPK: creatine phosphokinase, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment.
Total number=12 in each group; †††P<0.001 compared between Normal and ExS; **P<0.01 compared between ExS and ExS+SAB).

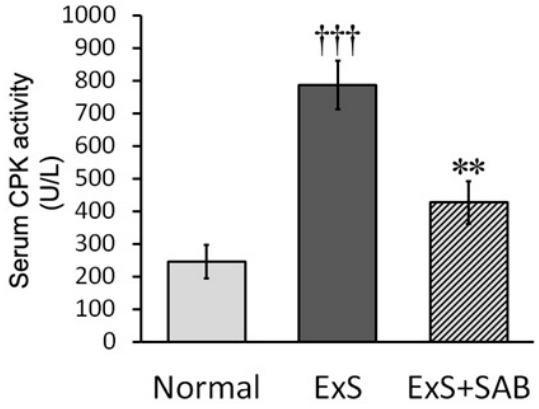

Fig. 5. Effect of SAB on serum CPK activity after exhaustive swimming in rats. SAB: salvianolic acid B, CPK: creatine phosphokinase, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment. Data presented mean±standard error (n=12 in each group; †††P<0.001 compared between Normal and ExS; **P<0.01 compared between ExS and ExS+SAB).

호산염색성 증가가 다수 관찰되었으며, 심장근육섬유들 사이에 산발적 분열이 유발된 것이 다수 관찰되었고, 그러한 분열들 사이에 중성백혈구의 침윤이 관찰되었다(Fig. 7). 이에 비해 ExS+SAB군은 ExS군에 비해 심장근육세포의 호산염색성, 심장근육섬유들 사이의 산발적 분열, 중성백혈구의 침윤 모두가 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 7). 산발적 분열 비율을 정량적으로 측정한 결과, 정상군은 0.4%±0.1%였고, ExS군은 6.5%±0.6%로 정상군에 비해 P<0.001의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 ExS+SAB군은 4.7%±0.5%로 ExS군에 비해 P<0.05의 유의성

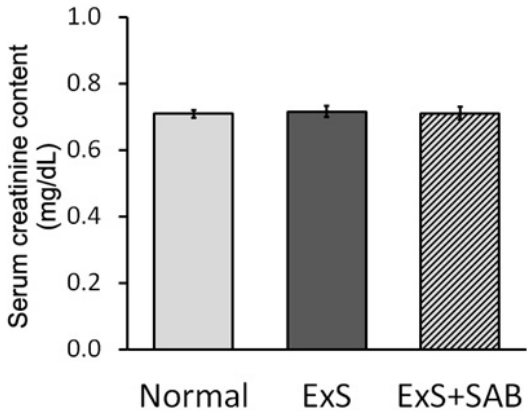

Fig. 6. Effect of SAB on serum creatinine content after exhaustive swimming in rats. Data presented mean±standard error (n=12 in each group; no difference between groups). SAB: salvianolic acid B, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment.

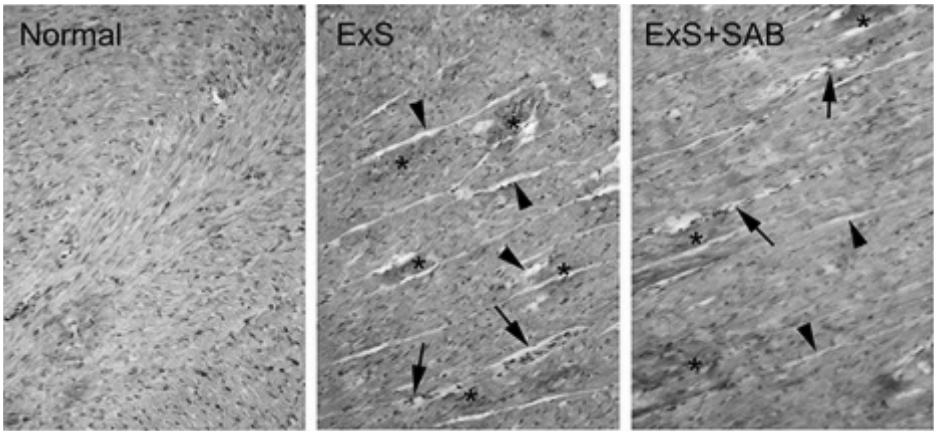

Fig. 7. Representative photographs of H&E stained left ventricle myocardium. ExS group showed signs of myocardial damage (sporadic fragmentation of myocardial fibers [arrowheads], interstitial edema, cytoplasmic eosinophilia (star symbols), and neutrophils infiltration [arrows]). SAB treatment (ExS+SAB group) alleviated the severity of the signs of myocardial damage induced by the exhaustive swimming. SAB: salvianolic acid B, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment.

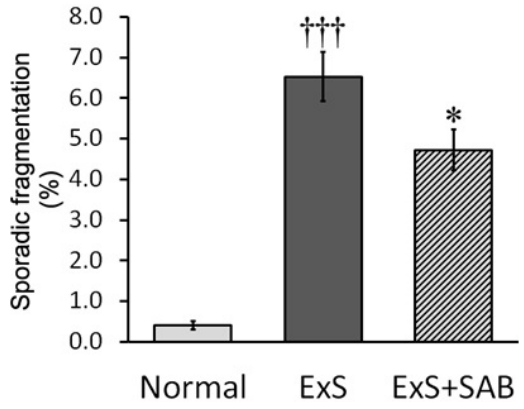

Fig. 8. Effect of SAB on sporadic fragmentation of myocardium after exhaustive swimming in rats. SAB: salvianolic acid B, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment. Data presented mean±standard error (n=6 in each group; †††P<0.001 compared between Normal and ExS; *P<0.05 compared between ExS and ExS+SAB).

있는 심장근육섬유의 산발적 분열 비율 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

4. 심장근육조직 superoxide 생성의 변화

Superoxide 형성을 관찰하는 DHE 형광염색의 적색형광의 발현 강도(Fig. 9A)를 측정한 결과, 정상군의 100.0%±2.9%에 비해 ExS군은 190.6%±17.6%로 정상군에 비해 P<0.001의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 ExS+SAB군은 130.9%±11.4%로 ExS군에 비해 P<0.05의 유의성 있는 적색형광의 발현 강도 감소, 즉 superoxide 형성의 감소를 나타내었다(Fig. 9B).

5. 심장근육조직의 Bax 및 Bcl-2 발현의 변화

심장근육조직에서 Bax 발현을 Western blotting 방법으로 측정한 결과, 정상군의 100.0%±1.9%에 비해 ExS군은 188.5%±7.8%로 정상군에 비해 P<0.001의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 ExS+SAB군은 165.3%±6.2%로 ExS군에 비해 P<0.05의 유의성 있는 Bax 발현의 억제가 관찰되었다(Fig. 10). Bcl-2 발현은 정상군의 100.0%±1.6%에 비해 ExS군은 117.9%±3.6%로 정상군에 비해 P<0.01의 유의성 있는 증가를 나타내었으나 ExS+SAB군은 122.6%±1.8%로 ExS군에 비해 유의한 변화가 없었다(Fig. 10). Bax 발현에 대한 Bcl-2 발현 비율을 계산

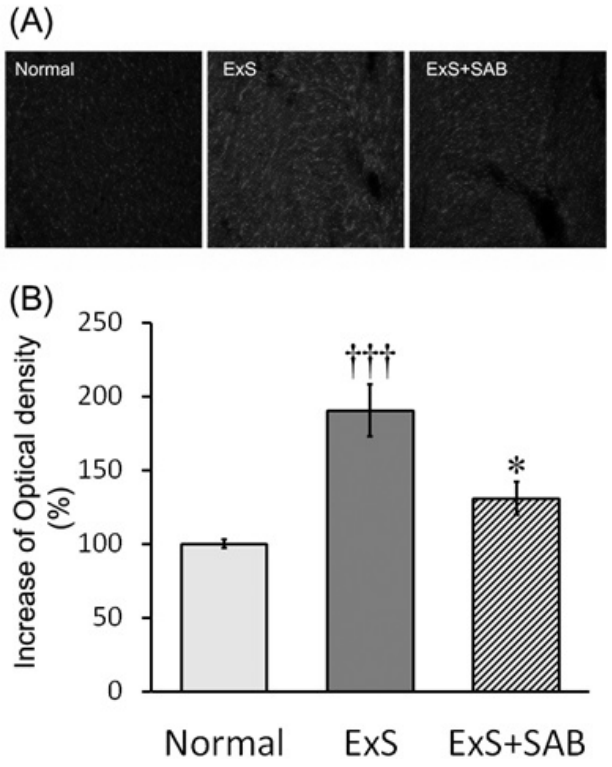

Fig. 9. Effect of SAB on superoxide formation in myocardium after exhaustive swimming in rats. (A) Representative photographs of myocardial DHE staining. (B) Intensity of red fluorescence signal of DHE staining. SAB: salvianolic acid B, DHE: dihydroethidium, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg salvianolic acid B treatment. Data presented mean±standard error (n=6 in each group; †††P<0.001 compared between Normal and ExS; *P<0.05 compared between ExS and ExS+SAB).

한 결과는 ExS군은 63.1%±2.4%, ExS+SAB군은 74.2%±2.6%로 ExS군에 비해 ExS+SAB군에서 Bcl-2의 상대적 발현 비율이 유의성(P<0.05) 있게 높은 것으로 관찰되었다 (Fig. 11).

고 찰

적절한 신체적 운동은 다양한 심혈관 질환과 관상동맥 질환의 예방과 치료에 도움이 된다. 한편으로 적절한 운동이 심혈관 및 심장 질환의 위험요소들을 감소시키는 역할이 있음에도 불구하고 장시간 또는 급격하고 과도한 운동은 심장 손상을 유발한다[18]. 과도한 운동에 의해 생성된 ROS가 심장근육세포에 산화적 손상(oxidative damage)을 유발하

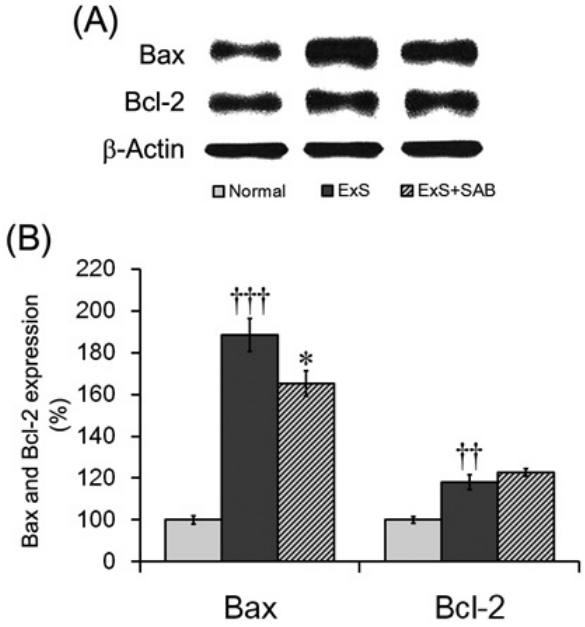

Fig. 10. Effect of SAB on Bax and Bcl-2 expression in myocardium after exhaustive swimming in rats. (A) Representative western blots illustrating differences in the bands of Bax and Bcl-2. (B) % intensity of Bax and Bcl-2 expression in myocardium. SAB: salvianolic acid B, Normal: group without exhaustive swimming, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg SAB treatment. Data presented mean±standard error (n=6 in each group; ††P<0.01, †††P<0.001 compared between Normal and ExS; *P<0.05 compared between ExS and ExS+SAB).

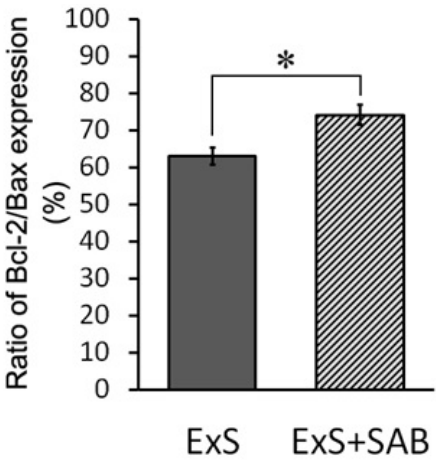

Fig. 11. Effect of SAB on ratio of Bcl-2 vs. Bax expression in myocardium after exhaustive swimming in rats. SAB: salvianolic acid B, ExS: group exercised with exhaustive swimming, ExS+SAB: group exercised with exhaustive swimming and 30 mg/kg salvianolic acid B treatment. Data presented mean±standard error (n=6 in each group; *P<0.05 compared between ExS and ExS+SAB).

고, 세포의 기능장애와 단백질 및 지질의 과산화, DNA 손상 등을 통해 심장근육세포가 사멸하기 때문이다[19,20]. 급격하고 과도한 운동은 골격근과 심장근육 모두에서 무산소 에너지대사를 유발하므로 lactate 생성을 증가시키고, 증가된 lactate를 pyruvic acid로 환원시키기 위해 LDH 활성도가 증가하며, creatine phosphate로부터 adenosine triphosphate를 생성하기 위하여 CPK 활성도가 증가한다[21,22]. 또한 근육세포에 손상이 유발되면 그 결과로 AST 활성도가 증가한다[22].

흰쥐에 150분간의 고강도유영을 실시한 결과 혈중 AST, LDH 및 CPK 활성도가 매우 유의하게 증가하였으며, SAB 투여가 이들 활성도의 증가를 유의하게 감소시키는 효능이 관찰되었다. 이러한 결과는 SAB가 심장근육과 골격근을 포함하여 과도한 운동에 의한 근육의 손상 또는 근육의 피로를 억제하는 효능이 있다는 것을 추측하게 한다. 이전의 연구 보고들에서 SAB가 과도한 운동스트레스 부여 후 행동실험에서 실험동물의 활동성을 증가시키는 효능이 있었다는 보고[23]를 제외하고는 과도한 운동으로 유발된 골격근의 피로회복 효능에 대한 연구는 찾아보기 어렵다. 하지만 본 실험의 결과와 SAB가 미세혈류 장애를 개선하는 작용이 있다는 보고[24]를 함께 고찰해보면 SAB가 일정의 근육피로 회복의 효능을 발휘하는 것도 추정할 수 있으며, 본 실험의 결과가 그에 대한 기본적인 자료를 처음으로 제공하는 것이다.

본 연구에서는 SAB의 심장손상 보호효능을 관찰하고자 하였으므로 심장의 조직학적 변화를 관찰하였다. 그 결과 고강도유영은 부분적으로 심장근육세포의 호산염색성을 증가시키고, 심장근육섬유들 사이에 산발적인 분열들이 다수 관찰되었고, 그러한 분열들 사이에 중성백혈구가 침윤되어 있는 것이 관찰되었다. 이는 과도한 운동에 의해 심장근육세포에 조직학적 손상과 염증반응이 유발되었다는 것을 보여주는 것이며, SAB 투여군에서는 이러한 손상지표들이 억제된 것으로 관찰되었다. 이러한 작용에 대한 정량적 관찰을 위해 조직학적 영상분석기법을 통해 심장근육섬유들 사이의 산발적 분열 비율을 정량적으로 측정한 결과에서도 SAB 투여군이 심장근육섬유 사이의 산발적인 분열이 차지하는 면적비율을 유의하게 감소시키는 효능을 나타내었다. SAB가 심근경색에 미치는 영향을 연구한 이전의 보고들에서도 SAB가 심근경색의 크기를 감소시키고[13-16], 좌심실 벽

의 섬유화와 벽두께 감소를 억제하는[11] 등 심장의 구조적인 손상을 억제하는 효능이 있다고 하였다. 또한 이러한 구조적인 심장손상의 억제 효능은 세포자연사 기전의 억제[11]와 MMP-9 작용의 억제[12] 및 심장근육의 산화적 손상을 억제하는 기전에 의한다고 하였다[13,25].

과도한 운동이 근육조직에 ROS 생성을 촉진하고 산화적 손상을 유발한다는 것은 사람과 실험동물 모두에서 잘 연구되어 있다[19,26]. 산화적 손상은 ROS 생성과 항산화효소 작용의 불균형에 의해 유발되는 것으로 운동의 강도와 산화적 손상의 강도가 비례하므로 고강도의 운동이 더 큰 산화적 손상을 유발한다고 하였다[27]. 특히 훈련되지 않은 운동 강도와 운동시간의 상황에서는 단기간의 운동도 산화적 손상을 유발한다고 하였다[28]. 한편으로 적절한 운동은 근육조직의 항산화 능력을 증가시켜 급격한 운동에 의한 산화적 손상을 예방하는 작용이 있다고도 보고되어 있다[29]. 이러한 과도한 운동에 의한 근육조직의 산화적 손상은 골격근뿐만 아니라 심장근육조직에서도 동일한 기전으로 유발된다[30]. 심장근육조직에서 ROS의 일종인 superoxide 생성은 oxidative fluorescent dye인 DHE를 사용한 형광염색으로 관찰할 수 있다. DHE는 자유롭게 세포막을 통과하는 물질로서 세포 안으로 들어가 DNA 사이에 끼어들어 있는 ethidium이 ROS에 의해 산화될 때 적색 형광을 발산한다[31]. 본 실험의 결과, 고강도유영은 심장근육조직에서 superoxide 생성을 현저하게 증가시켰으며, SAB 투여군에서는 DHE 적색형광의 발현 강도의 감소, 즉 superoxide 생성의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 이전의 연구들에서 SAB가 항산화 작용을 통해 심장손상 보호효능을 발휘한다는 보고들과 일치하는 결과로 판단된다.

과도한 운동에 의해 생성된 ROS는 심장근육세포의 DNA와 미토콘드리아를 손상시키고, 세포자연사 유발기전을 촉진한다[32]. Bax는 Bcl-2와 함께 세포자연사 기전을 조절하는 인자로서 Bax는 세포자연사 유발인자, Bcl-2는 세포자연사 억제인자로 알려져 있다[33]. Bax 발현의 증가와 Bcl-2 발현의 감소는 세포자연사를 촉진하고, Bax 발현의 억제와 Bcl-2 발현의 증가는 세포자연사를 억제하는 기전이 된다[34]. 본 실험의 결과, 심장근육조직에서 Bax 발현의 증가가 SAB 투여에 의해 유의하게 억제된 것을 관찰할 수 있었다. Bcl-2 발현은 유의한 변화가 없었으나 Bax 발현에 대한 Bcl-2 발현 비율을 계산한 결과에서 Bcl-2의 상대적 발현 비율이 유의성 있게 높은 것으로 관찰되었다. 이는 SAB가 과도한 운동으로 인한 심장근육세포의 자연사를 억제하는 효능이 있은 것을 추정하게 하며, 이러한 결과 역시 이전의 연구 결과들과 일치하는 것이다.

본 연구의 결과들을 종합하면, SAB는 과도한 운동에 의한 혈액 AST, LDH 및 CPK 활성도의 증가를 유의하게 억제하였으며, 심장근육세포 손상을 억제하였다. 이러한 억제 효능은 SAB가 심장근육세포에서 superoxide 생성과 Bax 발현 억제를 통한 항산화 작용과 세포자연사 기전 억제를 통해 발휘된 것으로 생각된다.

결 론

SAB가 고강도 운동부하에 의한 심장근육의 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위해 흰쥐에 SAB를 5일간 경구투여하고 고강도유영을 실시한 다음 혈중 AST, LDH 및 CPK 활성도와 심장근육의 조직학적 변화, superoxide 생성의 변화, Bax와 Bcl-2 발현의 변화를 관찰한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. SAB는 고강도 운동부하에 의한 혈중 AST 활성도, LDH 활성도 및 CPK 활성도 증가를 유의하게 억제하였다.

2. SAB는 고강도 운동부하에 의한 심장근육세포의 호산염색성 증가, 심장근육섬유들 사이에 산발적 분열 및 중성백혈구 침윤을 억제하고, 심장근육섬유의 산발적 분열 비율을 유의하게 감소시켰다.

3. SAB는 고강도 운동부하에 의한 심장근육조직의 superoxide 형성을 유의하게 억제하였다.

4. SAB는 고강도 운동부하에 의한 심장근육조직의 Bax 발현 증가를 유의하게 억제하고, Bcl-2의 상대적 발현 비율을 유의하게 증가시켰다.

이러한 결과들은 SAB가 항산화 작용과 세포자연사 억제 작용을 통해 심장근육세포 손상을 보호하는 효능이 있음을 추정하게 한다.

References

1. Ho JH, Hong CY. Salvianolic acids: small compounds with

multiple mechanisms for cardiovascular protection. J Biomed Sci. 2011 ; 18 : 30.
2. Yan X, Zhou T, Tao Y, Wang Q, Liu P, Liu C. Salvianolic acid B attenuates hepatocyte apoptosis by regulating mediators in death receptor and mitochondrial pathways. Exp Biol Med (Maywood). 2010 ; 235(5) : 623-32.
3. Chen T, Liu W, Chao X, Zhang L, Qu Y, Huo J, et al. Salvianolic acid B attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in mice. Brain Res Bull. 2011 ; 84(2) : 163-8.
4. Hao Y, Xie T, Korotcov A, Zhou Y, Pang X, Shan L, et al. Salvianolic acid B inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo via cyclooxygenase-2 and apoptotic pathways. Int J Cancer. 2009 ; 124(9) : 2200-9.
5. Sun Y, Zhu H, Wang J, Liu Z, Bi J. Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from Salvia miltiorrhiza by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity. J Chromatogr B. 2009 ; 877(8-9) : 733-7.
6. Wang J, Xiong X, Feng B. Cardiovascular effects of salvianolic acid B. Evid Based Complement Alternat Med. 2013 ; 2013 : 247948.
7. Wang Y, Zhao X, Gao X, Nie X, Yang Y, Fan X. Development of fluorescence imaging-based assay for screening cardioprotective compounds from medicinal plants. Anal Chim Acta. 2011 ; 702(1) : 87-94.
8. Wang M, Sun GB, Sun X, Wang HW, Meng XB, Qin M, et al. Cardioprotective effect of salvianolic acid B against arsenic trioxide-induced injury in cardiac H9c2 cells via the PI3K/Akt signal pathway. Toxicol Lett. 2013 ; 216(2-3) : 100-7.
9. Liu M, Ye J, Gao S, Fang W, Li H, Geng B, et al. Salvianolic acid B protects cardiomyocytes from angiotensin II-induced hypertrophy via inhibition of PARP-1. Biochem Biophys Res Commun. 2014 ; 444(3) : 346-53.
10. Huang CY, Chen SY, Fu RH, Huang YC, Chen SY, Shyu WC, et al. Differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes used to investigate the cardioprotective effect of salvianolic acid B through BNIP3 involved pathway. Cell Transplant. 2015 ; 24(3) : 561-71.
11. Xu L, Deng Y, Feng L, Li D, Chen X, Ma C, et al. Cardio-protection of salvianolic acid B through inhibition of apoptosis network. PLoS One. 2011 ; 6(9) : e24036.
12. Jiang B, Chen J, Xu L, Gao Z, Deng Y, Wang Y, et al. Salvianolic acid B functioned as a competitive inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and efficiently prevented cardiac remodeling. BMC Pharmacol. 2010 ; 10 : 10.
13. Jiang B, Wu W, Li M, Xu L, Sun K, Yang M, et al. Cardioprotection and matrix metalloproteinase-9 regulation of salvianolic acids on myocardial infarction in rats. Planta Med. 2009 ; 75(12) : 1286-92.
14. Deng Y, Zhang T, Teng F, Li D, Xu F, Cho K, et al. Ginsenoside Rg1 and Rb1, in combination with salvianolic acid B, play different roles in myocardial infarction in rats. J Chin Med Assoc. 2015 ; 78(2) : 114-20.
15. Deng Y, Yang M, Xu F, Zhang Q, Zhao Q, Yu H, et al. Combined salvianolic acid B and ginsenoside Rg1 exerts cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in rats. PLoS One. 2015 ; 10(8) : e0135435.
16. Wang Y, Xu P, Wang Y, Liu H, Zhou Y, Cao X. The protection of salidroside of the heart against acute exhaustive injury and molecular mechanism in rat. Oxid Med Cell Longev. 2013 ; 2013 : 507832.
17. Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, Birtalan E, et al. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. Int J Cardiol. 2015 ; 182 : 258-66.
18. Scharhag J, George K, Shave R, Urhausen A, Kindermann W. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. Med Sci Sports Exerc. 2008 ; 40(8) : 1408-15.
19. Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boeheme C, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. Free Radic Biol Med. 2012 ; 52(2) : 366-76.
20. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 ; 301(6) : H2181-90.
21. Essen-Gustavsson B, Tesch PA. Glycogen and triglyceride utilization in relation to muscle metabolic characteristics in men performing heavy-resistance exercise. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1990 ; 61(1-2) : 5-10.
22. Jacobs I, Sjodin B. Relationship of ergometer-specific VO2 max and muscle enzymes to blood lactate during submaximal exercise. Br J Sports Med. 1985 ; 19(2) : 77-80.
23. Feng Y, You Z, Yan S, He G, Chen Y, Gou X, et al. Antidepressant-like effects of salvianolic acid B in the mouse forced swim and tail suspension tests. Life Sci. 2012 ; 90(25-26) : 1010-4.
24. Wang MX, Liu YY, Hu BH, Wei XH, Chang X, Sun K, et al. Total salvianolic acid improves ischemia-reperfusion- induced microcirculatory disturbance in rat mesentery. World J Gastroenterol. 2010 ; 16(42) : 5306-16.
25. Jiang B, Zhang L, Li M, Wu W, Yang M, Wang J, et al. Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress. Food Chem Toxicol. 2008 ; 46(5) : 1510-5.
26. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress:myths, realities and physiological relevance. Sports Med. 2005 ; 35(12) : 1045-62.
27. 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(3) : 313-6.
28. 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(2) : 276-85.
29. Miyazaki H, Ohishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur J Appl Physiol. 2001 ; 84(1-2) : 1-6.
30. Balcı SS, Pepe H. Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. Chin J Physiol. 2012 ; 55(4) : 236-44.
31. Csont T, Bereczki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara A, et al. Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. Cardiovasc Res. 2007 ; 76(1) : 100-9.
32. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. Antioxid Redox Signal. 2003 ; 5(6) : 731-40.
33. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Develop. 1999; 13(15): 1899-911.
34. Gibson ME, Han BH, Choi J, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Parsadanian M, et al. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways. Mol Med. 2001 ; 7(9) : 644-55.