

흰쥐를 이용한 심근경색모델에서 진피(秦皮)의 심장손상 보호효과

임선하, 이종원*

대구가톨릭대학교 의과대학 생화학교실

Protective Effect of Cortex Fraxini on Heart Injury in a Rat Model of Myocardial Infarction

Sun Ha Lim, Jongwon Lee*

Department of Biochemistry, School of Medicine, Catholic University of Daegu

ABSTRACT

Objectives : Myocardial infarction is caused by heart cell death in a region where coronary arteries supplying blood to the region are occluded. In the present study, we determined whether ethanol extract of Cortex fraxini (HY5053) could attenuate heart injury by inhibiting apoptosis.

Methods : Improvement of survival of HepG2 cells, a human hepatocellular carcinoma cell line, and reduction of apoptosis under hypoxic conditions (3% O₂) were assessed by trypan blue staining and DNA fragmentation assay, respectively. To assess the impact of HY5053 on the heart injury, Sprague-Dawley rats underwent 1 day of the left anterior descending coronary artery occlusion. HY5053 was given by intraperitoneal injection (200 mg/kg) 1 hr prior to the occlusion. Subsequently, the heart were harvested, excised into 4 slices, and the slices were stained with 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride. Finally, the extent of heart injury represented as ischemic index (%) was assessed.

Results : Addition of HY5053 (400 µg/mL) into the culture medium for 1 day under ischemic conditions improved the cell survival by 50%, compared with control (0 µg/mL), consequently delayed apoptosis in 6 hr difference. Also, HY5053 (200 mg/kg) reduced the ischemic index by 44%, compared with control (0 mg/kg).

Conclusions : These findings suggested that HY5053 attenuated myocardial infarction by inhibiting apoptosis. Thus, Cortex fraxini could be developed as a novel cardioprotectant to complement a currently available treatment, coronary angioplasty.

Key words : Cortex fraxini, myocardial infarction, apoptosis, cardioprotectant

서 론

세계적으로 주 사망원인 중의 하나인 심근경색(myocardial infarction, MI)은 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 막힘으로써 심근세포가 광범위하게 죽어 발생하며, 이러한 세포의 사멸과정에서는 세포자살(apoptosis)이 일부 기여한다¹⁾. 이러한 심근경색을 방지하기 위해서 관상동맥이 막힌 12시간 이내에 심장동맥성형술 등에 의해 막힌 관상동맥을 뚫어 재관류시키는 것이지만, 이러한 폐색시간 이내에 재관류시키는 것이 현실적으로 쉽지 않다²⁾. 따라서, 관상동맥이 막혀 발생하는 허혈상태에서 심근세포의 생존을 개선시키는

심근보호제(cardioprotectant)를 개발하여 재관류 치료법의 효능을 더욱 높일 필요성이 있다³⁾. 본 저자는 사람 간세포암종(hepatocellular carcinoma) 세포주인 HepG2 세포를 활용하여 세포자살을 억제함으로써 허혈조건에서 세포생존을 개선시키는 식물추출물을 탐색하는 탐색법을 개발하고⁴⁾, 이를 활용하여 작약(*Peonia lactiflora*)⁵⁾, 차폴(*Cassia mimosoides* var. *nomame*)⁶⁾ 및 눈개승마(*Aruncus dioicus*)⁷⁾가 심근경색뿐만 아니라 뇌경색을 예방하고 치료하는데 효능을 나타내는 것을 발견하였다. 이러한 탐색방법을 적용한 결과 또 다른 세포생존 보호제 후보로 진피(秦皮)(Cortex fraxini)가 탐색되었다. 진피(秦皮)는 물푸레나무

*교신저자 : 이종원. 대구광역시 남구 대명4동 3056-6 대구가톨릭대학교 의과대학 생화학교실.
· Tel : 053-650-4471, · Fax : 053-621-9206, · E-mail : leejw@cu.ac.kr.
· 접수 : 2011년 8월 24일 · 수정 : 2011년 11월 30일 · 채택 : 2011년 12월 16일

(*Fraxinus rhynchophylla*)의 껍질로 예로부터 눈병과 이질, 여성의 대하 및 냉증 등에 사용되어 왔다⁸⁾.

본 연구에서는 허혈조건에서 세포생존을 개선시키는 진피의 에탄올추출물이 세포자살을 억제하여 세포생존을 개선시키고 아울러 쥐의 관상동맥을 묶어 발생시킨 허혈조건에서 심근 조직의 손상을 억제하는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 추출물의 제조

대한민국이 원산지인 진피는 대홍약업사 (대구, 대한민국)를 통하여 구매하였다. 진피를 깨끗하게 씻은 후 진피 200 g에 물 2 L를 넣고 약 2시간 동안 전기 약탕기 (대웅약탕기 DWP-2000, 대웅, 서울, 대한민국)에서 2회 반복 추출하였다. 추출물을 여과한 후 감압농축기 (NP-1, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축하여 진피 에탄올추출물 (HY5053) 54 g을 얻었다.

2) 동물

체중 170-230 g인 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)는 효창사이언스사 (서울)로부터 구입하여, 대구가톨릭 의대 동물사육실에서 일정한 온도 (19-23 °C)와 명암주기 (12시간) 하에서 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하면서 적응시켰다. 실험은 대구가톨릭 의대 자체 (Institutional Animal Care and Research Advisory Committee)에서 허가된 실험지침에 따라 수행되었다.

3) 시약

최소필수배지 (Minimum Essential Medium, MEM), 트립판 블루 (trypan blue) 용액 및 protease K는 Gibco BRL (Gaithersburg, MD)로부터, Triton X-100, EDTA 및 자일라진 (xylazine)은 Sigma Co. (St. Louis, MO)로부터 각각 구입하였다. 그리고, Tris는 Boehringer Ingelheim GmbH (Ingelheim, Germany), 케타민 (ketamine)은 유한양행 (서울, 대한민국)로부터 각각 구입하였다.

2. 방법

1) 세포배양

12 well-plate의 well당 사람유래 간세포암종 세포주인 HepG2 (ATCC HB 8065) 세포를 2×10^5 세포수로 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 10% 첨가된 최소필수배지에서 37 °C, 5% CO₂ 상태로 48시간 동안 배양기 (Forma Scientific, Inc., Marietta, OH) 내에서 부착되도록 두었다. 부착 후 각 well을 새 배지로 교체를 한 다음 공기 내의 산소 농도를 조절할 수 있는 저산소 배양기 (Vision Scientific Co. LTD., 서울, 대한민국)를 이용하여 온도와 이산화탄소의 농도는 일정하게 유지하면서 실험 목적에 따라 산소 분압을 3% (저산소 조건)로부터 21% (정상산소 조건)까지로 변화시

키면서 48시간 동안 실험을 시행하였다. 이 배양조건에서 배양을 시작하기 직전에 진피의 에탄올추출물 (HY5053)을 50% 에탄올에 용해시켜 100 및 1,000 µg/mL 농도로 배양배지에 첨가한 실험군과 아무 것도 첨가하지 않은 음성대조군 (negative control)으로 나누어 배양하였다.

2) 세포 생존율 측정

세포의 생존율 측정은 트립판 블루 염색법을 사용하였다. 이를 위해 배지를 제거한 후에 먼저 인산염 완충 식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)로 한 번 씻어내고 트립신 (trypsin)으로 처리하였다. 세포를 포함하는 이 용액을 원심분리를 하여 세포를 모은 다음 새로운 배지를 더해 세포 혼탁액을 만들었다. 그리고 0.4% 트립판 블루 용액과 세포 혼탁액을 동량으로 섞어서 5분이 지난 뒤에 혈구계 (hemocytometer)를 사용하여 살아 있는 세포의 수를 측정하였다. 이러한 세포 수의 측정은 동일 배양 well로부터는 2회를 측정하여 평균을 구하고, 이러한 것을 3 개의 다른 배양 well에 대해 구한 다음 이 3 개의 배양배지에 대한 세포수의 평균과 표준편차를 구하였다.

3) DNA 분절 분석 (DNA fragmentation assay)

60 mm 배양접시 하나당 사람의 HepG2 세포를 1×10^6 세포수로 방법 1)의 “세포배양”에서와 같이 저산소 상태에서 HY5053을 400 µg/mL로 첨가하거나 또는 전혀 첨가하지 않은 조건 (Control)에서 배양하였다. 세포의 염색체 DNA를 얻기 위해 배양 접시에 배양된 세포들로부터 배양액을 제거한 후 용해 완충액 [0.5% Triton buffer, 5 mM Tris buffer (pH 7.4), 20 mM EDTA]를 넣은 다음 생긴 용해질을 eppendorf tube에 모았다. 이것을 원심 분리하여 얻은 상등액을 protease K로 처리한 후 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액을 이용하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 들어 있는 DNA를 에탄올 침전법을 이용하여 얻은 후 1.5% 에가 로즈 젤 (agarose gel)에 전기영동을 실시하였다.

4) 심근경색 모델

심근경색모델은 이전에 발표된 방법⁹⁾에 기초하여 다음과 같이 실시하였다; 흰쥐 (Sprague-Dawley)에 케타민 (ketamine, 10 mg/kg)과 자이라진 (xylazine, 5 mg/kg)을 투여하여 마취를 유도하고 기도에 삽관한 후 전신마취를 시켰다. 이 쥐의 세 번째와 네 번째 늑골을 절제하여 흉부를 열고 심장을 늑간 내부로부터 도출시켰다. 좌전하행관상동맥을 5-0 프로렌 (prolene) 봉합사로 묶은 다음 심장을 흉부 속으로 재배치하고 피하조직과 피부를 봉합하였다. HY5053은 좌관상동맥을 묶어 허혈을 유발하기 1시간 전에 200 mg/kg의 용량으로 1 mL 생리식염수에 섞어 복강에 주사하고, 음성대조군으로 동일 부피 (1 mL)의 생리식염수만을 복강에 주사한 후 1일 동안 허혈상태로 방치하였다. 음성대조군과 HY5053 투여군에 사용된 쥐의 수는 각각 6마리와 7마리였다.

5) 경색부피의 산정

쥐를 희생시켜 심장을 적출한 후 약 3 mm 두께로 4 조각으로 나누고, 이 조각들을 인산염 완충 식염수로 씻었다. 이 조각들을 1 mL의 2.0% 2,3,5-triphenyl tetrazolium

chloride (TTC) 용액에 37 °C에서 10분간 담구어 염색하였다. 이러한 조각들 모두에서 희게 나타나는 죽은 부분의 면적을 Image J software를 이용하여 측정된 후 이를 심장 전체 면적으로 나눈 허혈지수 (ischemic index)를 계산하여 심장의 손상정도를 결정하였다.

6) 통계처리

측정치들은 means ± SD로 표시하였으며, 통계분석은 SPSS 소프트웨어 (SPSS 12.0 KO for Windows)를 사용하여 이루어졌다. 평균치의 분석은 Student's *t*-test로 이루어졌으며, *P* < 0.05이면 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 진피의 에탄올추출물 (HY5053)이 세포생존에 미치는 영향

진피의 에탄올추출물 (HY5053)이 사람의 간암세포주인 HepG2 세포에 대해 저산소 조건 (3% 산소농도)에서 세포생존을 개선시키는지 조사하기 위해 0 (Control), 100 및 1,000 µg/mL의 HY5053을 첨가한 조건에서 세포의 생존율을 조사하였다 (Fig. 1A). 저산소 조건에 들어가기 직전의 세포수를 1로 두었을 때 배양을 시작하지 1일이 지났을 때 살아남은 세포수 (Ratio)는 HY5053을 첨가하지 않은 대조군 (0.17 ± 0.02)에 비해 HY5053을 100 및 1,000 µg/mL을 첨가한 경우에 첨가된 HY5053의 농도가 높을수록 더 높게 나타났다 (각각 0.38 ± 0.07 및 0.79 ± 0.22). 이 HY5053이 심근경색 치료제로 사용되기 위해서는 독성을 나타내지 않아야 하므로 HY5053이 독성을 나타내는지 여부를 조사하기 위해 정상산소 조건에서도 세포의 생존율을 조사하였다 (Fig. 1B). 배양 2일 후 세포 수 (Ratio)는 HY5053을 첨가하지 않는 대조군 (1.91 ± 0.46)에 비해 HY5053을 100 µg/mL을 첨가한 경우에는 Ratio가 1.92 ± 0.56으로 대조군과 차이가 없었으나, 1,000 µg/mL을 첨가한 경우에는 Ratio가 1.1 ± 0.23으로 적었다. 이러한 결과는 저산소 조건에서는 세포생존 개선 효과를 나타내면서 정상산소 조건에서는 세포독성을 나타내지 않기 위해서는 첨가되는 HY5053의 농도가 100에서 1,000 µg/mL 사이에서 이루어져야 하는 것을 알 수 있다. 이러한 연구결과를 근거로 DNA 분절 분석실험에서 HY5053의 농도는 400 µg/mL 조건에서 실시하였다.

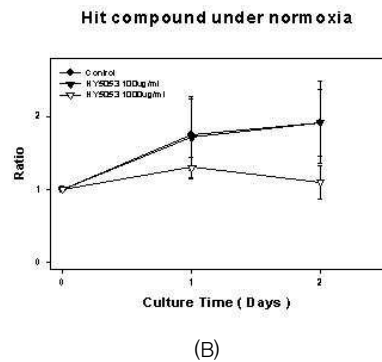
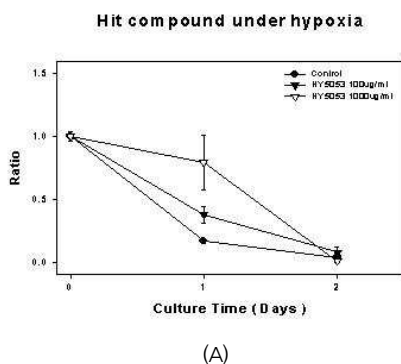


Fig. 1. Effect of the ethanol extract of Cortex fraxini (HY5053) on the cell viability
Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were plated at 2×10^5 cells/12well-plate culture dish and grown in 0.8 mL of minimum Eagles' s medium (MEM) at 37 °C for 48 hr under normoxic condition (5% CO₂, balanced with air) in a humidified chamber. The cells were cultured either under hypoxic (3% O₂, 5% CO₂, balanced with N₂) (A) or normoxic conditions (B) in a humidified chamber for another 48 hr, following exchange of the culture medium with a fresh medium containing 100 or 1,000 µg/mL of the ethanol extract (HY5053 100 and HY5053 1000, respectively) pre-dissolved in 50% ethanol, or that containing no ethanol extract (Control), respectively. At various time points of cell culture, viable cells were stained with 0.4% trypan blue dye and counted using hemocytometer. Error bars represent the standard deviation of at least three samples.

2. 진피의 에탄올추출물 (HY5053)이 DNA 분절에 미치는 영향

HepG2 세포가 저산소 조건에서 세포자살에 의해 죽는다는 것이 DNA 분절 분석 등을 활용하여 밝혀졌으므로¹⁰⁾, HY5053이 저산소 조건에서 세포생존을 개선시키는 것이 세포자살을 억제하여 일어나는 것인지를 DNA 분절 분석을 이용하여 조사하였다 (Fig. 2). 이를 위해 저산소 조건에서 HY5053을 400 µg/mL를 첨가한 후 18, 24, 30 및 36시간이 지났을 때 세포생존을 개선시키는지 조사한 결과 Fig. 1에서와 마찬가지로 세포생존 개선효과가 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 2A). 즉, Fig. 1에서와 마찬가지로 HY5053을 첨가하지 않은 대조군인 경우에 Ratio는 0.19 ± 0.05인데 반해 HY5053을 400 µg/mL로 첨가한 경우에 Ratio는 0.69 ± 0.15로 높았다. 이러한 조건에서 세포로부터 DNA를 추출하여 에가로즈 젤 전기영동을 실시한 결과 HY5053을 투여하지 않은 대조군인 경우에는 배양 18시간에 최대의 진하기로 DNA가 관찰되며 세포가 조금이라도 살아있는 배양 24 시간에도 DNA 사다리 (ladder)가 여전히 관찰되는 반면에 세포가 완전하게 죽은 배양 30 및 36시간인 경우에는 DNA 사다리 자체가 관찰되지 않았다 [Fig. 2B(a)]. 반면에 HY5053을 400 µg/mL 농도로 투여한 경우에는 배양 24시간에 최대의 진하기로 DNA가 관찰되며 배양 30시간에도 여전히 DNA 사다리가 관찰되었다 [Fig. 2B(b)]. 이러한 결과는 진피의 에탄올추출물이 세포자살을 억제하는 효능을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

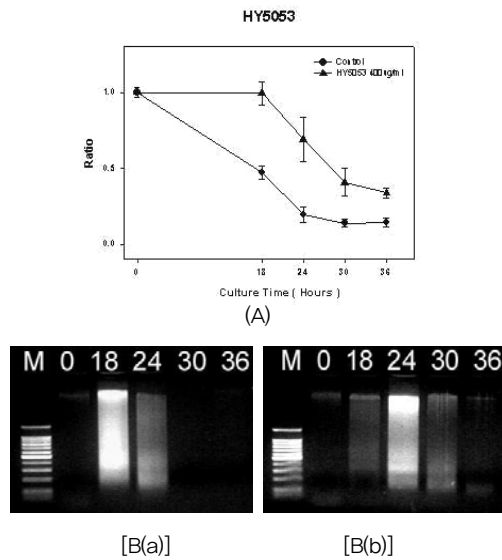


Fig. 2. Effect of the ethanol extract of *Cortex fraxini* (HY5053) on the cell viability and DNA fragmentation under hypoxic condition. The HepG2 cells were plated at 1×10^6 cells/60 mm culture dish and grown in 4 mL of culture medium, as described in Fig. 1. Forty eight hours after the cell culture under normoxic condition, the cells were cultured under hypoxic conditions in the presence of 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HY5053 400) or in the absence of the ethanol extract (Control). The viable cells at various time points of cell culture were counted with trypan blue dye method (A), and also lysed in the lysis buffer. The lysate was centrifuged to get supernatant, and then DNA was isolated and electrophoresed on a 1.5% agarose gel [B; (a) Control, (b) the ethanol extract (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)]. Lane M (100 bp DNA marker), Lane 1 (0), Lane 2 (18), Lane 3 (24), Lane 4 (30) and Lane 5 (36) hours of culture under hypoxic condition.

3. 진피의 에탄올추출물 (HY5053)이 경색크기에 미치는 영향

진피의 에탄올추출물 (HY5053)이 심근경색에 미치는 영향을 조사하기 위해 흰쥐의 좌전하행관상동맥 (left anterior descending coronary artery)을 묶어 허혈조건을 1일 간 유발한 심장에 대해 HY5053으로 전처치하였을 때 심장의 손상이 줄어드는지를 조사하였다. 결과 2의 DNA 분절실험에서 HY5053을 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가한 경우에 세포자살을 억제하여 세포생존을 개선시키는 효과가 관찰되었으므로 이 농도에 근사하도록 하면서 독성이 나타날 가능성을 줄이기 위해 투여용량을 200 mg/kg로 하였으며, 투여는 좌관상동맥을 묶기 1시간 전에 복강으로 주사하였다. 좌관상동맥을 묶어 발생한 허혈 1일째 심장을 적출하여 절편을 만든 후 손상된 정도를 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)로 염색하였다 (Fig. 3A). TTC 염색에서 죽은 조직은 회색 나타나고 살아있는 조직은 붉게 나타난다. 이를 근거로 전체 심장을 적출하여 잘라서 만든 절편에서 아무 것도 투여하지 않은 대조군 [Fig. 3A(a)]에 비해 HY5053을 투여한 실험군 [Fig. 3A(b)]에서 조직 손상이 줄어들었다. 이러한 결과를 정량적으로 나타내기 위해 대조군 (6마리)과 HY5053 투여군 (7마리)에 대해 죽은 부위의 정도를 나타내는 허혈지수 (Ischemic Index) (%)로 표시한 결과 아무 것도 투여하지 않은 대조군에 비해 HY5053을 200 mg/kg을 투여한 경우에 허혈지수가 44% 감소하였다 (4.87 ± 0.16 vs. 2.74 ± 0.20 , $P < 0.05$) (Fig. 3B).

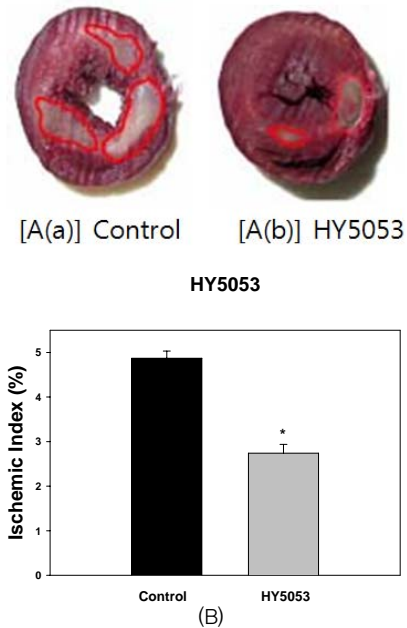


Fig. 3. Effect of the ethanol extract of *Cortex fraxini* (HY5053) on the myocardial infarction

Sprague-Dawley (SD) rats received 0 (Control) and 200 mg/kg of ethanol extract (HY5053) once (1 hr prior to occlusion) by intraperitoneal injection. Myocardial infarction was produced by ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD). One day after ligation, the hearts were harvested and excised into 4 slices about 3 mm thick. The slices were stained in 1 mL of 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC). A. Dead (inside the circle) and live area (outside the circle) in the heart tissue were shown in the representative TTC-stained slices. (a), Control group; (b), HY5053-treated group. B. Ischemic Index (%) was defined as the ratio between the area with TTC not stained and the area of the whole slice. The number of rats used in the Control and HY5053-treated group were 6 and 7, respectively. Each column represents the means \pm SD. * $P < 0.05$ vs. Control.

고찰

심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 막히게 되면 심장에 혈액공급이 차단되고 이에 따라 심근세포에 산소와 포도당의 공급도 부족하게 되는 허혈상태가 된다. 이러한 상황에서는 산소를 필요로 하는 산화적인산화에 의해 주로 ATP를 얻는 심근세포는 에너지가 부족하여 죽게 된다¹¹⁾. 이러한 허혈상태에서 심근세포가 광범위하게 죽어 발생하는 심근경색을 방지하기 위해서는 혈관이 막힌 후 가능하면 빠른 시간 (늦어도 12시간) 내에 심장동맥성형술 등을 이용하여 막힌 곳을 뚫어 혈액을 재관류시키는 것이다²⁾. 하지만 이러한 시간 내에 시술을 받기가 쉽지 않으므로 이를 보완하기 위한 방법으로 허혈상태에서도 세포생존을 개선시키는 심장보호제의 개발이 필요하다³⁾. 현재로서는 재관류가 허혈에 따른 손상을 방지하기 위한 최상의 방법이지만^{12,13)} 허혈상태에서부터 축적되어 온 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 재관류시 급격하게 증가하여 이에 의한 손상이 유발되는 문제점도 가지고 있다^{14,15)}. 다행스럽게도 최근에는 cyclosporine A 등 재관류에 따른 손상을 방지하는 약제를 개발하기 위한 시도가 이루어지고 있어¹⁵⁾, 허혈상태에서 세포사멸을 방지할 수 있는 심

장보호제를 안전한 천연물로부터 개발하는 것이 더욱 절실한 형편이다.

관상동맥이 막혀 발생하는 허혈상태에서 심근세포는 괴사(necrosis)뿐만 아니라 세포자살에 의해서도 세포사멸이 일어나므로 세포자살을 억제하는 물질이 심장보호제의 후보로 될 수 있다^{1,16)}. 본 연구자는 이미 사람유래 간세포암종 세포주인 HepG2를 저산소 조건에서 배양을 하면 배양액 내의 포도당이 감소하고 이에 따라 발생하는 허혈상태에서 세포사멸이 세포자살에 의해 발생하는 것을 확인하였으며⁴⁾ 후속연구에서 이러한 조건에서 세포생존을 개선시키는 식물추출물들이 심근경색 또는 뇌경색에 대해서 효능을 나타낸다는 것을 쥐를 이용한 동물실험을 통해 확인하였다^{5,6,7)}. 본 연구에서는 이와 동일한 허혈조건에서 HepG2 세포의 생존을 개선시키는 진피가 심근경색을 예방하고 치료하는 효과가 있는지를 조사하는 실험을 실시하였다. HepG2 세포가 허혈조건에서 세포자살에 의해 죽을 때 DNA 사다리를 형성하는 것이 확인되었으므로^{4,10)}, 이 방법을 적용한 결과 진피가 DNA 사다리의 형성을 억제하였으며 이로서 진피가 세포자살을 억제하여 세포사멸을 방지한다는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이러한 세포실험을 근거로 허혈조건만 나타내는 심근경색모델을 이용하여 조사한 결과 진피가 경색부피를 감소시켜 효능을 나타내었다 (Fig. 3). 강황 등 한약재들 중에서 세포자살을 억제하여 심근경색 모델에서 효능을 나타내는 후보들이 다수 발견되었으므로¹⁶⁾, 추가연구를 통해 진피도 이러한 효능을 나타내는 한약재 중의 하나로 인정될 수 있을 것으로 사료된다.

진피는 물푸레나무의 껍질로 동의보감에서는 눈병과 이질, 여성의 대하 등에 효능이 있는 것으로 보고되어 있으며⁸⁾, 이외에도 만성기관지염과 세균성 설사의 치료에도 이용되고 있다¹⁷⁾. 본 연구팀은 선행연구에서 진피의 에탄올추출물을 유기용매의 분획으로 얻은 부탄올층과 이 층으로부터 분리정제된 phenylpropanoid glucoside 계열의 syringinin이 알츠하이머병을 유발하는 베타아밀로이드 (A β)에 의한 세포독성을 세포자살을 억제함으로써 완화시킨다는 것을 DNA 분절분석 등을 이용하여 확인하였다¹⁸⁾. 진피추출물이 항산화효과를 가진다는 이전의 보고와 마찬가지로^{19,20)}, 이 부탄올층과 syringinin도 활성산소종을 소거하는 항산화효과가 관찰되었다. 이에 근거하여 진피추출물이 심근경색을 억제하는 효능을 나타내는 것은 허혈에 의해 발생하는 활성산소종을 진피추출물이 제거하는 항산화효과에 의한 것으로 추론되었다.

본 연구는 진피가 심근경색을 억제하는 효능을 가지는 것을 최초로 밝힘으로써 진피의 적응증을 넓힌 것에 의미가 있으며, 향후 진피추출물을 심근경색 예방 및 치료제로 개발하기 위해 경구투여시 효능을 나타내는지 여부와 활성을 나타내는 성분을 밝히는 연구가 추가로 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 진피 (秦皮)의 에탄올추출물이 저산소조건 (산소분압 3%)에서 사람유래 간세포암종인 HepG2 세포의 세포생존을 개선시키는지를 조사하기 위해 진피의 에탄올추출물을 배양배지에 400 μ g/mL 농도로 첨가하였다. 배양 1일 후 생존 세포수를 트리판 블루 염색법을 이용하여 조사한 결과

에탄올 추출물 투여군이 대조군에 비해 세포 생존수를 50% 증가시켰다. 이러한 세포생존을 증가시키는 것이 세포자살을 억제하여 일어나는 것인지를 DNA 분절 분석을 이용하여 조사한 결과 세포자살이 마지막으로 관찰되는 시점도 배양 24 시간에서 30시간으로 늦추어졌다. 이를 근거로 에탄올추출물이 심근경색을 억제하는 효능을 나타내는지 흰쥐의 좌전하행관상동맥을 묶어 발생시킨 심근경색모델을 이용하여 조사하였다. 그 결과 이 추출물을 200 mg/kg로 허혈유발 1시간 전에 복강주사를 시행한 결과 TTC 염색법을 이용하여 확인한 경색면적이 44% 감소하였다. 이러한 결과는 에탄올추출물이 관상동맥이 막힌 상태에서 심장의 손상을 줄이는 심장보호제로 개발될 수 있다는 것을 시사한다.

감사의 말씀

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한인대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Abbate A, Bussani R, Amin MS, Vetovec GW, Baldi A. Acute myocardial infarction and heart failure : role of apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 ; 38 : 1834-1840.
2. Cohen M, Boiangiu C, Abidi M. Therapy for ST-segment elevation myocardial infarction patients who present late or are ineligible for reperfusion therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2010 ; 55 : 1895-1906.
3. Nadtochiy SM, Redman EK. Mediterranean diet and cardioprotection : the role of nitrite, polyunsaturated fatty acids, and polyphenols. *Nutrition*. 2011 ; 27 : 733-744.
4. Lee YT, Han MJ, Lim SH, Park SH, Suh HS, Park JB, Kim YI, Lee JW. Effect of antibiotics on the survival of human hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions. *J Korean Surg Soc*. 2006 ; 71 : 31-38.
5. Lim SH, Han HS, Park JH, Lee JW. Methanol extract of peony root (*Peonia lactiflora*) and its ethyl acetate fraction attenuate heart and brain injury in a rat model of ischemia-reperfusion. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2011 ; 54 : 799-801.
6. Kim KH, Lee JW. Methanol extract of *Cassia mimosoides* var. *nomame* and its ethyl acetate fraction attenuate brain damage by inhibition of apoptosis in a rat model of ischemia-reperfusion. *J Food Sci Nutr*. 2010 ; 15 : 255-261.
7. Han HS, Lee JW. Attenuation of brain injury by water extract of goat's-beard (*Aruncus dioicus*) and its ethyl acetate fraction in a rat model of ischemia-reperfusion. *J Food Sci Nutr*. 2011 ; 16 :

- 217–223.
8. Yang EJ, Lee DG, Lee JW, Kim YS, Lim SH, Song KS. The chemical constituents of the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla*. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2007 ; 50 : 348–351.
 9. Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IMC. Expression of G_{α} and PLC- β in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. Circulation, 1998 ; 97 : 892–899.
 10. Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. Oncogene, 2000 ; 19 : 4621–4631.
 11. Zucchi R, Ghelardoni S, Evangelista S. Biochemical basis of ischemic heart injury and of cardioprotective interventions. Current Med Chem, 2007 ; 14 : 1619–1637.
 12. Downey JM, Cohen MV. Why do we still not have cardioprotective drugs? Circ J, 2009 ; 73 : 1171–1177.
 13. Miura T, Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting : current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. Basic Res Cardiol, 2008 ; 103 : 501–513.
 14. Wu J, Hecker JG, Chiamvimonvat N. Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic disease. Adv Drug Deliv Rev, 2009 ; 61 : 351–363.
 15. Ivanes F, Mewton N, Rioufol G, Piot C, Elbaz M, Revel D, Croisille P, Ovize M. Cardioprotection in the clinical setting. Cardiovasc Drugs Ther, 2010 ; 24 : 281–287.
 16. Ahmad R, Javed S, Bhandari U. Antiapoptotic potential of herbal drugs in cardiovascular disorders : an overview. Pharm Biol, 2010 ; 48 : 358–374.
 17. Jeong GS, Yoon KH, Kim HC, Oh SH, Kim MJ, Kang DG, Lee HS, Kim YC. Cytoprotective constituents of the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla* on mouse hippocampal HT22 cells and their antioxidant activity. Kor J Pharmacog, 2007 ; 38 : 287–290.
 18. Yang EJ, Kim SI, Ku HY, Lee DS, Lee JW, Kim YS, Seong YH, Song KS. Syringinin from stem bark of *Fraxinus rhynchophylla* protects $A\beta$ (25–35)-induced toxicity in neuronal cells. Arch Pharm Res, 2010 ; 33 : 531–538.
 19. Kim DG, Lee BG, Kim HY. Use of *Fraxinus rhynchophylla* Hance bark as antioxidant. J Kor For En, 2003 ; 22 : 69–76.
 20. Pan Y, Zhu J, Wang H, Zhang X, Zhang Y, He C, Ji X, Li H. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Cortex fraxini* and use in peanut oil. Food Chem, 2007 ; 103 : 913–918.