

마늘추출물이 운동부하 흰쥐의 심장내 MAPK signaling 활성화에 미치는 영향

이준혁 · 정경태¹ · 이용태² · 최영현³ · 최병태^{4*}

특허청 화학생명공학심사국, 1: 동의대학교 자연과학대학 임상병리학과, 2: 동의대학교 한의과대학 생리학교실, 3: 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 4: 부산대학교 한의학전문대학원

Effect of Garlic Extract on the Activation Pattern of MAPK Signaling in the Rat Heart After a Bout Exercise

Jun Hyuk Lee, Kyung Tae Chung¹, Yong Tae Lee², Yung Hyun Choi³, Byung Tae Choi^{4*}

Chemistry and Biotechnology Examinations Bureau, Korean Intellectual Property Office,

1: Department of Biomedical Laboratory Science, College of Natural Science,

2: Department of Physiology, 3: Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University,

4: School of Oriental Medicine, Pusan National University

Since exercise training induces mechanical stress to the heart, we examined the activation pattern of mitogen-activated protein kinase(MAPK)s signaling pathway by immunohistochemistry. The immunoreactions of MAPKs signaling with c-fos and Schiff's reaction were increased in the cardiac muscle of exercised rat compared to normal one except immunoreaction for MEK1/2 and ERK1/2 and p38. However, the immunoreaction of phospho-JNK and phospho-p38 with early gene c-fos were arrested markedly in water extract of *Allium sativum* (WEAS) treated rat compared to exercised one. Since MAPKs signaling does play a protective role in response to pathological stimulus in the heart, results in the present study suggest that WEAS may act as a alleviating agent for exercise-induced stress to heart through regulating MAPKs signaling activation.

Key words : *Allium sativum*, cardiac muscle, c-fos, mitogen-activated protein kinase

서 론

마늘(*Allium sativum*)은 중앙아시아가 원산지인 파과에 속하는 다년생 식물로 오래전부터 조미향신료 등 식품과 의료용으로 널리 쓰여 왔다. 고대 기록에서 이집트 피라미드 건축노동자나 로마 병사들에게 마늘 또는 이를 함유한 음료를 제공했다는 기록으로 보아 다양한 효능 중 심한 육체적 노역이나 훈련에 대한 피로 회복 효능을 가지고 있음을 알 수 있다¹⁾. 마늘의 항피로 기능에 대한 연구는 현재에도 다방면으로 이루어지고 있으며 육체적 운동의 강도 또는 스트레스와 피로로부터 회복 정도에 초점을 맞추고 있다.

Mitogen-activated protein kinase(MAPK)s는 세포증식, 분

* 교신저자 : 최병태, 부산 금정구 장전동 산 30 부산대학교 한의학전문대학원

· E-mail : choibt@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-7379

· 접수 : 2008/06/26 · 수정 : 2008/07/29 · 채택 : 2008/08/10

화, 생존 등에 관여하는 일련의 연속적인 활성화 kinase로 구성되는 signaling protein으로 MAPK family는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun NH2-terminal kinase(JNK), p38 MAPK(p38)가 주된 일원으로 MEK1/2, SEK, MKK3/6에 의한 인산화를 통해 활성화 된다^{2,3)}.

심근세포에서 MAPKs signaling cascade는 G protein-coupled receptor와 연계된 angiotensin II, endothelin-1, receptor tyrosine kinases를 포함한 다양한 자극에 의해 개시된다⁴⁾. 또한 육체적 운동도 MAPKs를 활성화 시키는 강력한 촉진자이다⁵⁾. 일회성 운동은 심장에 대한 물리적 부담이나 스트레스를 주나 지속적인 운동에 의한 심맥관계에 대한 적절한 자극은 궁극적으로 생리적인 심근비대를 형성한다⁶⁾.

운동을 비롯한 물리적 자극에 대한 반응과 함께 고혈압 등 병리적 심근세포 환경에서 MAPK signaling cascade활성화가 관여하고 있다^{7,8)}.

마늘의 항피로 효과는 말초순환, 항산화, 면역조절 및 영양학적 다양한 측면과 관련이 있는데 특히 운동 후 피로나 근육통을 유발하는 노폐물은 혈류로 방출되므로 순환계와 밀접한 관련성을 가지고 있다¹⁾. 항피로와 연관한 마늘의 성분이 순환계에 미치는 영향은 혈구응집 또는 혈소판 응집 그리고 free radical로부터 순환계를 보호한다는 등 다양하다^{9,10)}.

본 연구에서는 마늘의 항피로 효과가 순수 분리된 단일 성분이 아닌 복합적 작용에 의해 그 효능이 나타날 가능성이 높으므로 마늘추출액이 운동 부하를 주었을 때 일차적으로 부담을 주는 심장내 심근세포의 signaling pathway의 활성패턴에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험 동물은 6주령의 체중 130 g 내외의 Sprague/Dawley계 암컷 흰쥐(대한실험동물센터, 한국)를 구입하여 고행사료(삼양 배합사료 실험동물용, 삼양유지사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(온도: 20±2 °C, 습도: 40~60 %, 명암: 12 시간 주기)에서 2주 적응시킨 후 사용하였다.

2. 마늘 추출물

본 실험에 사용한 마늘은 창녕 영농조합에서 구입한 마늘을 1 Kg을 정선하고 세척한 후, 100°C 15분 스팀 살균처리한 후 식품용 효소 cellulase 5% 용액에 30 분간 침지한 후 습도가 95~98% 유지되는 발효실에서 15일 동안 온도를 달리 하면서 발효 숙성시켜 400 g 원액을 얻었으며 다시 농축하여 16 g의 농축액을 얻었으며 이를 실험에 사용하였다.

3. 마늘 추출물의 투여 및 운동부하

흰쥐 각각 10 마리씩을 정상군, 운동군, 마늘추출물투여 후 운동군으로 나누고, 마늘추출물투여 후 운동군은 흰쥐 체중 100 g 당 50, 100, 150 mg을 실험 시작 5일 전부터 1일 1회 경구투여 하였고 마지막 날에는 운동부하 1시간 전에 경구투여 하였고, 운동군은 생리식염수를 동량 경구투여 하였다. 정상군을 제외한 각군의 흰쥐를 약물투여 1시간 후에 23°C의 물을 채운 원형욕(지름 70 Cm, 깊이 78 Cm)에 깊이 빠뜨려 강제로 10분간 수영 후 5분간 휴식, 다시 10분간 수영시켰다. 시간은 예비실험을 통하여 초기 급격한 운동으로 혈중 lactate량이 최고에 달하는 시간을 선택하였다.

4. 면역조직화학적 검색

심장의 좌심실부분을 절취하여 4% paraformaldehyde에 4°C 12시간 고정하여 순차적인 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6 µm 연속절편을 얻었다. 심장의 조직병리학적 관찰을 위하여 연속절편을 탈파라핀한 후 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff염색을 실시하였다. 면역조직화학적 관찰을 위해 탈파라핀한 후 10 mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에서

95°C 5분간 처리하였고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다.

PBS로 세척한 후 goat normal serum(Vector Lab.)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 MEK1/2, phospho-MEK1/2(Cell Signaling Technology Inc.), ERK1/2, phospho-ERK1/2, JNK1, phospho-JNK1, p-38, phospho-p38(Santa Cruz Biotechnology Inc.)을 200:1로 희석하여 4°C 습실에서 16시간 동안 반응시켰다.

PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Lab.)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit(Vector Lab.)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit(Vector Lab.)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체대신 10% BSA/PBS를 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

결과

정상군, 운동군 및 마늘추출물투여 후 운동군의 MAPKs에 대한 면역조직화학적 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 글리코겐 검색을 위한 PAS염색에서 심근세포에 정상군은 약한 반응만을 보이며 운동군에서는 증가된 염색성 특히 세포막부분에 중등도의 반응을 보였으나 마늘추출물투여에 의해 감소하였다.

Table 1. Immunoreaction of MAPKs in the left ventricular myocardium of normal and a bout exercised rat

Group	Normal	Exercised	WEAS pre-treated		
			50 mg	100 mg	150 mg
PAS	+	+++	+	+	+
c-fos	0+	0+,++	0+	0+	0+
MEK1/2	0+	0+	0+	0+	0+
p-MEK1/2	0	0+	0+	0+	0+
ERK1/2	++	++	++	++	++
p-ERK1/2	0	0+	0+	0+	0+
JNK	0+	+	+	+	+
p-JNK	+	++++	+++	+++	+++
p38	+	+	+	+	+
p-p38	0+	0++	0+	0+	0+

0+++ indicate the relative intensity of immunoreaction: 0, faint and negligible; +, weak; ++, moderate; +++, intense. WEAS, water extract of *Allium sativum*.

단기적인 운동에 의해 유발되는 심장내 c-fos 발현은 운동군에서 증가하나 마늘투여 후 운동군에서는 정상군과 유사한 반응을 보였다. 정상군의 MEK1/2는 약한 반응성만을 보이며 운동군에서 변화가 없는 반면 phospho-MEK1/2는 정상군에 비해 모든 운동군에서 증가하였다.

ERK1/2는 중등도의 반응을 보이며 각 군에 따른 변화를 보이지 않으나 phospho-ERK1/2는 정상군에 비해 모든 운동군에서 다소 증가하였다. JNK는 정상군에 비해 모든 운동군에서 증가하며 phospho-JNK는 운동군에서 현저히 증가하며 마늘추출물 투여에 의해 감소하였다. p 38은 모든 군에서 약한 반응만을 보이나 phospho-p38은 정상군에 비해 운동군에서 증가하며 이는 마늘추출물의 투여에 의해 감소하였다.

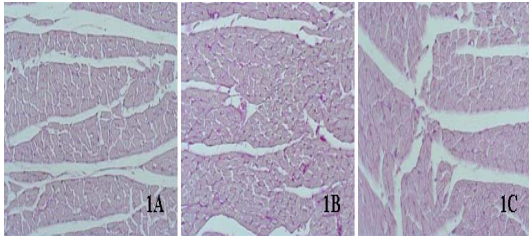


Fig. 1. PAS reaction of the myocardium in the normal(A), a bout exercised(B) and a bout exercised rat with WEAS pre-treatment(C). Note slightly increased reactions in the myocardium of a bout exercised rats compared with normal and WEAS pre-treated ones. X200.

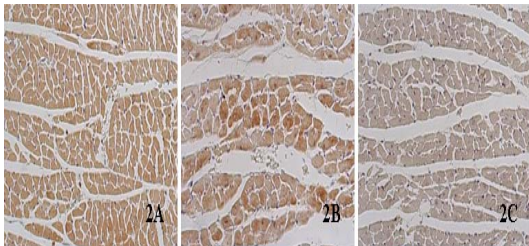


Fig. 2. Immunohistochemical localization of c-fos in the myocardium of normal(A), a bout exercised(B) and a bout exercised rat with WEAS pre-treatment(C). Note the strong reactions in the myocardium of a bout exercised rats compared with normal and WEAS pre-treated ones. X200.

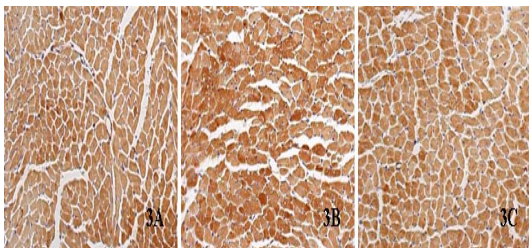


Fig. 3. Immunohistochemical localization of phospho-JNK in the myocardium of normal(A), a bout exercised(B) and a bout exercised rat with WEAS pre-treatment(C). Note the strong reactions in the myocardium of a bout exercised rats compared with normal and WEAS pre-treated ones. X200.

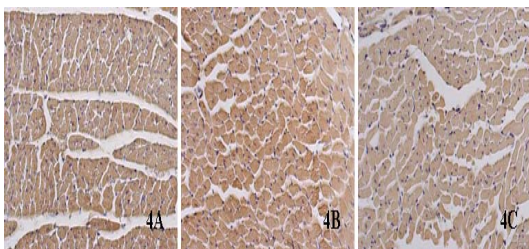


Fig. 4. Immunohistochemical localization of phospho-p38 in the myocardium of normal(A), a bout exercised (B) and a bout exercised rat with WEAS pre-treatment(C). Note the strong reactions in the myocardium of a bout exercised rats compared with normal and WEAS pre-treated ones. X200.

고찰

마늘의 주성분은 결정상의 비단백질성 유황아미노산인 alliin[(+)-S-allyl-cysteine suloxide]과 그 분해산물인 alliin(allyl 2-propenylthiosulenic acid) 등으로 향암, 항균, 항염증, 항진균,

혈전방지, 지질대사 개선 등에 효능이 있으나 빈혈, 위궤양, 혈액 응고 지연, 요생성 촉진 등 내재적 부작용 또는 관련성을 가지고 있다¹¹⁾. 마늘에 대한 이용은 다양한 방법으로 이루어지나 단리 성분이 아닌 전성분을 이용하는 방법으로 마늘분말이나 마늘기름 등을 사용하는데 마늘분말에는 alliin과 건조온도 같은 환경에 활성영향을 받는 alliinase를 가지며, 마늘기름은 allyl sulfides를 가진다¹⁰⁾.

육체적 운동에 의한 근세포내 노폐물 축적은 피로와 근육통을 야기하며 이는 말초순환계를 통해 제거 된다. 피로회복에 사용되어져 온 마늘의 효능도 혈관확장을 통한 혈압감소¹²⁾, 혈액지질 성분변화로 인한 혈류순환 증진¹³⁾, 자유유리기에 의한 혈관손상의 보호¹⁰⁾ 등 말초 순환계에 의한다. 또한 마늘의 항산화 작용, 면역 조절 및 영양학적 측면도 피로회복 기능에 일조를 하고 있다¹⁾.

심장의 심근세포에서 MAPKs signaling cascade는 neuroendocrine effector, G protein-coupled receptor agonists, receptor tyrosine kinase agonist를 비롯한 다양한 자극에 의한다^{4,14)}. MAPKs 활성화는 운동에 의한 일시적인 심장에 대한 부담이 원인이 되고 이는 생리적 심장비대로 이어진다^{7,15)}. 그리고 고혈압과 같은 심장에 대한 과도한 병리적 부담으로도 MAPKs 활성화가 형성되며 이로 인한 심근비대에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{8,16)}.

한번 활성화된 ERK, JNK, p38은 심근세포 유전자활성에 영향을 미치는 전사인자를 포함한 다양한 세포내 목표물에 영향을 미치며 ERK1/2의 주된 upstream 활성화는 MEK1/2로 알려진 MAPK kinase로 ERK1/2를 직접 인산화한다¹⁷⁾. 그리고 MAPKs는 dual-specificity phosphatase의 특이적 subclass에 의해 탈인산화되어 비활성화되며 재순환하게 된다¹⁸⁾.

MAPKs에 대한 면역조직화학적 반응을 보면 p-p38, p-ERK1/2 등이 퇴행성 심근섬유나 diastrophic lesion 부위에 강한 반응을 나타내나 p-JNKs는 반응이 감소되는데 이는 육체적 운동이 심근세포에 대한 영양결핍적 특성을 촉진시키며 이로 인한 ERK1/2, p 38의 현저한 활성화를 유도하는 것으로 보았다⁹⁾.

또한 심장벽에 대한 스트레스 증가 또는 일시적인 운동은 심장내 early gene(c-fos, c-jun, c-myc) 발현을 증가시키며 궁극적으로 심근비대에 이르는 관련 분자에 대한 발현에 연관된다^{7,15,19)}.

본 연구에서는 일시적 운동 부하에 대한 마늘추출물의 투여가 심근세포내 MAPKs 활성화에 미치는 영향을 면역조직화학적 으로 살펴보았다. 선행 연구와 유사하게 정상군에 비해 운동군에서 p-MEK1/2, p-ERK1/2, p-JNK, p-p38의 면역반응이 증가하여 운동이 주는 심장 부하로 인한 면역반응 증가를 알 수 있었다. 또한 심장벽에 대한 스트레스 증가 또는 일시적인 운동에 의해 발현되는 c-fos도 증가하였다. 이러한 운동부하에 의한 면역반응 증가는 마늘추출물의 투여에 의해 감소하였는데 특히 c-fos를 포함한 p-JNK, p-p38의 감소가 현저하였다.

일시적인 운동은 MAPKs(ERK, JNK, p38) 및 MAPKKs(MEK1/2, SEK and MKK3/6)의 활성화를 시간 비례적으로 증가시키며 증가된 MAPKs 수준은 운동 후 24시간내에 감소하는데 MAPK signaling cascade활성 증가는 심장적응과 연관

된 분자조절 유도로 보인다²⁰⁾. 그러나 사전에 4주 훈련 쥐는 일회성 운동 시 운동 후 30분에 증가하나, 8주 훈련된 쥐는 감소하였으며 12주 훈련된 쥐에서는 변화가 없었다²⁰⁾. 주기적인 운동은 심장내 MAPKs 경로활성이 유도하며 운동에 의한 생리적 심장비대와 더불어 MAPKs 활성이 점차 감소됨을 알 수 있다.

본 실험에서 마늘추출물을 투여한 후 일시적인 운동 부하를 주었을 때 나타나는 MAPKs 면역반응을 살펴보았는데 모든 운동군에서 c-fos를 포함한 MAPKs 면역반응이 증가하나 p-JNK 및 p-38의 면역반응은 마늘 추출물의 투여에 의해 감소하였다.

마늘의 항피로에 대한 연구는 대부분 마늘 추출물을 투여하였을 때 운동 강도와 회복정도에 효과를 나타내거나 호기성 글루코스대사율 등 산소 공급촉진 등에 대한 연구가 주를 이루며 세포내 MAPK signaling에 대한 기전적 연구는 드물다^{21,22)}.

그러나 이상의 결과는 MAPK signaling pathway 활성화가 운동과 같은 심장의 물리적 부담에 대한 방어 기전으로 형성되는 것으로 보아 마늘의 투여에 의한 면역반응 감소는 마늘 추출물의 심장부하를 덜어 주는 기능을 가진 것으로 사료되나 정확한 기전 규명을 위해서는 보다 심도 있는 연구가 요구된다.

결 론

마늘추출물이 운동에 의한 심장부하에 미치는 영향을 살펴보기 위해 MAPKs signaling pathway에 관여하는 효소를 면역조직화학적으로 살펴보았다. 운동에 의해 조기발현유전자인 c-fos가 증가하였으며 마늘추출물의 투여에 의해 감소하였다.

MAPKs에 대한 면역반응을 보면 phospho-MEK1/2, phospho-ERK1/2, JNK에 대한 반응이 운동군에서 증가하였으며 마늘추출물의 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 phospho-JNK 및 phospho-p38은 운동군에서 증가하나 마늘 투여에 의해 현저히 감소하였는데 이는 마늘추출물의 투여가 운동에 의해 가해지는 심장에 대한 운동 부하를 완화시키는 것으로 유추된다.

감사의 글

본 논문은 2007년 부산테크노파크 공모과제로 지원되는 연구비로 조성되었습니다.

참고문헌

- Morihara, N., Nishihama, T., Ushijima, M., Ide, N., Takeda, H., Hayama, M. Garlic as an anti-fatigue agent. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1329-1334, 2007.
- Seger, R., Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726-735, 1995.
- Heineke, J., Molkentin, J.D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 589-600, 2006.
- Sugden, P.H., Clerk, A. Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades in the heart. *Adv. Enzyme Regul.* 38: 87-98, 1998.
- Nakamura, A., Yoshida, K., Takeda, S., Dohi, N., Ikeda, S. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS Lett.* 520: 18-24, 2002.
- Maeda, S., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Tanabe, T., Yokota, T., Goto, K., Yamaguchi, I., Matsuda, M. Effects of exercise training on expression of endothelin-1 mRNA in the aorta of aged rats. *Clin. Sci.* 103: 1185-1235, 2002.
- Ruwhof, C., Laarse, A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc. Res.* 47: 23-37, 2000.
- Fischer, T.H., Brittain, J., Trabalzini, L., Banes, A.J., White, G.C., Smith, C.J., Nichols, T.C. The ras-binding domain of ral GDS-like protein-2 as a ras inhibitor in smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 934-940, 2003.
- Lim, H., Kubota, K., Kobayashi, A., Seki, T., Ariga, T. Inhibitory effect of sulfur-containing compounds in *Scorodocarpus borneensis* Becc. on the aggregation of rabbit platelets. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 298-301, 1999.
- Morihara, N., Ide, N., Sumioka, I., Kyo, E. Aged garlic extract inhibits peroxynitrite-induced hemolysis. *Redox Rep.* 10: 159-165, 2005.
- Pearson, W., Boermans, H.J., Bettger, W.J., McBride, B.W., Lindinger, M.I. Association of maximum voluntary dietary intake of freeze-dried garlic with Heinz body anemia in horses. *Am. J. Vet. Res.* 66: 457-465, 2005.
- Pedraza-Chaverri, J., Tapia, E., Medina-Campos, O.N., Angeles G.M., Franco, M. Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci.* 62: 71-77, 1998.
- Yeh, Y.Y., Yeh, S.M. Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. *Lipids* 29: 189-193, 1994.
- Bueno, O.F., Molkentin, J.D. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res.* 91: 776-781, 2002.
- Komuro, I., Kudo, S., Yamazaki, T., Zou, Y., Shiojima, I., Yazaki, Y. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J.* 110: 631-636, 1996.
- Takeishi, Y., Huang, Q., Abe, J., Che, W., Lee, J.D., Kawakatsu, H., Hoit, B.D., Berk, B.C., Walsh, R.A. Activation of mitogen-activated protein kinases and p90 ribosomal S6 kinase in failing human hearts with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 53: 131-137, 2002.

17. Nishimoto, S., Nishida, E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep.* 7: 782-786, 2006.
18. Farooq, A., Zhou, M.M. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16: 769-779, 2004.
19. Cornelius, T., Holmer, S.R., Müller, F.U., Riegger, G.A., Schunkert, H. Regulation of the rat atrial natriuretic peptide gene after acute imposition of left ventricular pressure overload. *Hypertension* 30: 1348-1355, 1997.
20. Iemitsu, M., Maeda, S., Jesmin, S., Otsuki, T., Kasuya, Y., Miyauchi, T. Activation pattern of MAPK signaling in the hearts of trained and untrained rats following a single bout of exercise. *J. Appl. Physiol.* 101: 151-163, 2006.
21. Saxena, K.K., Gupta, B., Kulshrestha, V.K., Srivastava, R.K., Prasad, D.N. Effect of garlic pretreatment on isoprenaline-induced myocardial necrosis in albino rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 24: 233-236, 1980.
22. Morihara, N., Ushijima, M., Kashimoto, N., Sumioka, I., Nishihama, T., Hayama, M., Takeda, H. Aged garlic extract ameliorates physical fatigue. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 962-966, 2006.