

염화제2철이 유도하는 경동맥 손상 랫트 모델에서 상엽 추출물의 혈행개선 효과

강현주 · 전인화 · 권태오¹ · 최지원² · 김성주³ · 장선일*

전주대학교 보건관리학과, 1: 원광대학교 생명자원과학대학, 2: 전주대학교 방사선학과, 3: 전북대학교 의과대학 생리학교실

Effect of Mori Folium Extract on Improvement of Blood Flow in Ferric Chloride-Induced Carotid Artery Damage Rat Model

Hyun Ju Kang, In Hwa Jeon, Tae Oh Kwon¹, Jiwon Choi², Sung Zoo Kim³, Seon Il Jang*

Department of Health & Science, Jeonju University, 1: College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University,
2: Department of Radiological Sciences, Jeonju University, 3: Department of Physiology, School of Medicine, Chonbuk National University

In a previous study, we have shown that mulberry leaves (Mori Folium) extract MFE and its compounds have the antioxidant effect in human red blood cells. However, the possible effect of MFE and its compounds on improvement of blood flow were not reported. Therefore, the aim of this study is to investigate the effects of MFE and its compounds on improvement of blood flow in a rat model of topical ferric chloride (FeCl₃)-induced carotid artery damage. The FeCl₃ treatment seriously damaged the carotid artery: the walls of the artery, blood flow rate, blood vessel diameter, blood vessel area and blood flow amount. However, administration of MFE or its compound has ameliorated the blood flow and suppressed thrombus in blood vessels. Moreover, the concentrations of serum total cholesterol, triglycerides, and LDL cholesterol in the MET and its compound groups were remarkably reduced in comparison to the control group, and HDL cholesterol concentration was higher in the MET and its compound groups than in the control group. These results suggest that MFE and its compounds ameliorate the thrombosis against blood vessel damage.

keywords : Mori Folium, ferric chloride, carotid artery, blood flow improvement

서 론

최근 생명과학기술이 발달되면서 인간의 수명이 연장되고 있으나, 혈행장애와 관련된 질환이 급증하고 있다¹⁾. 이와 같이 혈행장애와 관련된 질환의 증가는 생체가 노화되면서 대사과정에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 스트레스로 인하여 혈관의 손상과 더불어 혈전(thromobus)이 과다하게 형성되기 때문이다²⁻⁴⁾.

사실 혈액의 응고는 혈관 손상에 따른 과다 출혈에 의한 사망을 방지하기 위해서 일어나는 자연적인 생리현상이다⁴⁾. 건강한 상태에서 우리 몸의 혈액은 혈액을 응고시킬 수 있는 인자와 이를 억제시킬 수 있는 인자가 동시에 존재하면서 균형을 이루어 혈액의 흐름에 아무런 문제를 일으키지 않지만, 혈소판의 기능장애가 있을 때 혈액응고인자가 과다하게 생성되거나 항응고인자가 부족하면 혈전이 형성될 수 있다⁴⁻⁷⁾. 혈전의 주요 원인은 혈관 손상에 따른 복원과정에서 나타나는 염증반응과 평활근세포의 과대한 증식으로 인해서

혈소판 응집능력이 향진되어 형성되는데, 혈전은 혈행장애를 일으키는 대표적인 임상적 증례라 할 수 있다⁴⁾. 즉, 죽상동맥에 혈전이 형성되면, 혈행장애를 유발하여 뇌졸중과 심근경색과 같은 심각한 질환으로 이어질 수 있다⁵⁻⁸⁾. 혈행과 관련된 연구에서 주로 동물모델을 사용하는데, 일반적으로 랫트를 이용하여 염화제2철(ferric chloride: FeCl₃)로 경동맥을 손상을 유발하는 실험모델이 사용된다⁹⁾. 염화제2철이 혈관에 노출되면 산화적 스트레스를 유발하여 혈관의 손상과 함께 혈전을 야기하게 하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 우리가 건강한 몸 상태를 유지하기 위해서는 혈행장애를 유발하는 혈전을 사전에 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 대상으로 염화제2철로 혈관을 손상시키고 혈전을 유발한 모델에서 효능을 평가해야 할 필요성이 있다¹⁰⁻¹³⁾.

지금까지 혈전과 같은 혈행장애와 관련된 질환을 치료하기 위해서 사용되는 대표적인 약물은 rivaroxaban, enoxaparin, warfarin, vitamin K antagonist와 aspirin 등이 있는데, 이들 약

* Corresponding author

Seon Il Jang, Department of Health & Science, Jeonju University, 303, Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : sonjjang@jj.ac.kr Tel : +82-63-220-3124

Received : 2014/07/30 Revised : 2014/11/17 Accepted : 2014/11/19

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.17208/kjopp.2014.12.28.6.607

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

물을 장기간 복용하면 약물 내성과 함께 부작용이 유발될 수 있다^{10,11)}. 그러므로 인체에 부작용이 최소화된 식품과 한약을 비롯한 천연물을 대상으로 혈행개선에 관련된 물질을 발굴해야할 필요성이 있다.

뽕잎(mulberry leaves)은 한약명으로 상엽(Mori Folium)이라 하는데, 상엽에는 flavones, triterpenes, steroids, 무기질 성분 및 식이섬유가 풍부하여 당뇨뿐만 아니라 혈관질환을 예방하거나 치료하는데 활용되어 왔다¹³⁾. 상엽에는 resveratrol과 같은 stilbenoid계 성분과 morusin, mulberrin, merberochromene, quercetin, kaempferol 및 astragalinal과 같은 flavonoid 계열의 성분이 풍부하게 함유되어 있어 항당뇨, 항산화 및 항염증, 항고지혈증 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다¹³⁻¹⁷⁾. 최근 저자는 상엽을 대상으로 quercetin, kaempferol 및 astragalinal과 같은 flavonoid계열의 물질을 분리하여 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)가 유도하는 산화적 스트레스로부터 적혈구의 손상을 보호할 수 효과가 있음을 보고한 바 있다¹⁸⁾. 그러나 상엽 추출물과 그 유래물질인 quercetin, kaempferol 및 resveratrol을 대상으로 혈행개선과 관련된 보고는 없는 실정이다.

그러므로 본 연구는 염화제2철이 유도하는 경동맥 손상 랫트 모델에서 상엽 추출물과 그 유래물질인 quercetin, kaempferol 및 resveratrol을 대상으로 혈행개선 효과를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Ferric chloride ($FeCl_3$), quercetin (QC), kaempferol (KF), resveratrol (RV), hematoxylin & eosin(H&E) 및 기타 분석급 식약은 Sigma-Aldrich사(MO, USA)로부터 구입하였다. Activated partial thromboplastin time (aPTT)와 prothrombin time (PT) 등 진단시약과 tryglyceride (TG), total cholesterol (TC) 그리고 혈액학적 진단 kit는 아산제약(경기도, 대한민국)으로부터 구입하였다.

2) 상엽의 준비

상엽(Mori Folium)은 전라북도 부안군에서 2013년 5월 20일에 채취하여 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김흥준 교수로부터 동정하여 확인 하였고, 그 표본(#MF2013-05-20)은 전주대학교 보건관리학과 연구실에 보관하였다.

3) 실험동물

실험동물은 무균환경에서 사육된 8주령 수컷 Sprague Dawley (SD) rat (240~290 g)로 중앙실험동물(서울)로부터 구입하였다. 스트레스를 해소하기 위해서 1주일의 순화기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 전 실험기간 동안 중앙실험동물에서 구입한 일반 고형사료[Purina Lab. Rodent Chow(#38057), carbohydrates: 63.07%, fat: 12.41%, protein: 24.52%]와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사육환경 온도 $23 \pm 3^\circ C$, 밤낮주기(12시간)가 조절되는 환경에서 사육하였으며 전주대학교 실험동물위원회 실험 규정 준하여 실행하였다.

2. 방법

1) 상엽 추출물과 그 유래물질의 분리

채취된 상엽은 즉시 신선한 물로 세척한 후 약 5분간 증기 쪄낸 후 건조하여 분말화 하였고 1.230 g을 정량하여 메탄올 10 L와 혼합하여 실온에서 7일간 방치하여 추출하였다. 그 후 추출액을 1,900 x g로 20분간 원심 침전시키고 상층액만 취하여 0.45 μm 필터를 사용하여 여과한 후 회전진공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압농축 하였으며, 동결 건조기(Eyela, FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co.)로 $-70^\circ C$ 에서 동결 건조하여 추출물을 약 190 g 얻은 후 $-20^\circ C$ 에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 또한 건조된 상엽(1.23 kg)으로부터 MeOH(10 L)을 충분히 주입하여 10일간 방치하여 추출하였고, 추출물을 대상으로 n-hexane에 7일 동안 분획 추출한 후 Choi 등¹⁸⁾의 방법에 따라 high-performance liquid chromatography (HPLC Agilent 1200 series)을 활용하여 QC (34 mg) 및 KF (24.7 mg)를 분리하였으며, Song 등¹⁴⁾의 방법에 따라 RV (11 mg)을 분리하여, Choi 등¹⁸⁾ 및 강 등¹⁹⁾의 방법에 따라 Sigma-Aldrich사로부터 구입한 표준 지표물질과 HPLC profiling을 비교(Fig. 1)한 후 분리된 각물질의 양이 소량으로 표준물질을 사용하여 랫트에 20일간 투여하는데 사용하였다.

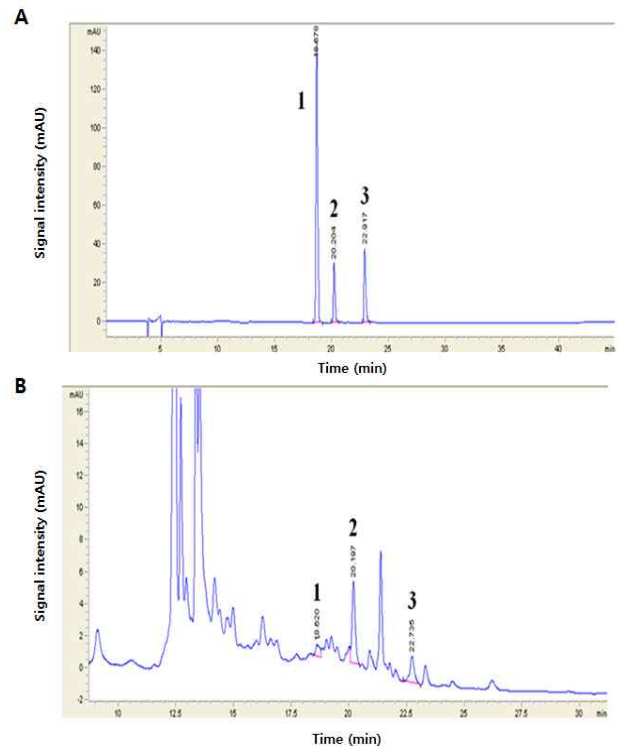


Fig. 1. HPLC chromatogram in standard compounds (A) and MFE detected at 254 nm.

2) $FeCl_3$ 유도 경동맥 혈전 유발과 상엽추출물 및 그 유래물질의 투여

혈전을 유발하기 전 랫트의 체중을 측정하고 Zoletil(100 μL /체중 100 g, 복강투여)로 마취한 후 체온조절장치에 고정하여 수술을

진행하였다. 어깨선이 이어지는 목 부근의 피부와 근육을 절개하고 미주신경이 손상되지 않도록 주의하여 왼쪽 경동맥을 노출시킨 후 유발 전 Doppler flow probe (MyLabTM 25, Esaote, Genova, Italy)를 이용하여 초음파를 측정하여 혈류 속도(blood flow rate), 혈관 지름(blood vessel diameter), 혈관 면적(blood vessel area), 혈류량(blood flow amount)을 측정 후, 70% FeCl₃를 적신 filter paper(3×5 mm)를 10분간 접촉시켜 유지한다. 그 후 filter paper를 제거하고 초음파를 측정하여 혈전유발을 확인하고 수술부위를 봉합하였다. 혈전이 유발된 랫트에서 항혈전 효과를 관찰하기 위해서 정상군, 혈전유발 대조군, MFE 400 (혈전유발+상엽 추출 투여군), MFE 800 (혈전유발+상엽추출 투여군), QC(혈전유발+quercetin 투여군), KF(혈전유발+quercetin 투여군), RV(혈전유발+resveratrol 투여군) 및 참고약물인 aspirin (혈전유발+aspirin 투여군) 등으로 나누어 실험하였고, MFE는 체중 kg당 400 mg과 800 mg을, QC, KF 또는 RFC는 체중 kg 당 5 mg씩 매일 1회씩 20일 동안 경구투여 하였다.

3) 항혈전 효능 평가 및 경동맥 혈관 적출

20일 간의 상엽추출물과 flavonoid 계열 물질 투여기간 종료 후 doppler flow probe (MyLabTM 25, Esaote)를 이용하여 혈류 속도, 혈관직경, 혈관면적, 혈류량을 측정하여 각 그룹별 개선정도를 비교하였다. 혈전유발 부위 혈관의 조직학적 관찰을 위해 혈관 양쪽을 단단히 고정하고 경동맥을 3-4 mm 적출하여 인산완충액(pH 7.4, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 27 mM KCL)에 4% paraformaldehyde에 고정하고 12시간 이상 고정 한 다음 파라핀에 포매한 후 절편(두께 5 μm)을 제작하였다. 혈관 조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 binocular microscopy (Leica DMRB, Wetzlar, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

4) 혈액채취 및 혈청학적 분석

혈액은 혈관 초음파 측정 후에 복대정맥에서 채취하여 실온에서 30분간 방치한 후 1,500×g에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 얻었고 분석 시까지 -80°C에서 보관하였다. 혈청 내 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도는 표준 효소비색법에 의한 kit(Asan Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였고 LDL-콜레스테롤은 Friedewald 방법에 따라 {총 콜레스테롤 - (HDL-콜레스테롤 + 중성지방/5)}으로 계산하였다²⁰⁾. 더불어 동맥경화지수(AI, atherogenic index)와 TG/HDL-C는 Tan 등²¹⁾의 방법과 TC/HDL-C는 Grover 등²²⁾의 방법에 따라 조사하였다. AI는 (TC-HDL-C)/HDL-C로 계산하였다.

6) 항응고 활성 측정

aPTT측정은 시료를 함유한 100 μL 혈장(plasma)을 다음 37°C에서 미리 가온된 20 mM CaCl₂ 100 μL를 주입한 후 응고가 될 때까지 시간을 기록하였다. PT 측정은 시료를 함유한 100 μL 혈장(plasma)을 37°C에서 3분간 가온한 다음 37°C의 PT 진단시약을 100 μL를 주입한 후 응고가 될 때까지 시간을 기록하였다. 정상군은 정상 랫트의 혈장을 활용하여 응고시간을 측정하였다.

7) 통계처리

모든 실험값은 3반복 실험한 값을 평균±표준오차로 표시하였으

며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 P<0.05로 정하였다.

결 과

1. FeCl₃를 이용한 경동맥 혈전 유발에 대한 혈관 doppler 비교

본 연구에서는 강 등¹⁹⁾의 실험방법과 같이 랫트의 경동맥 주위를 깊게 해부하여 경동맥을 노출시킨 후 초음파 doppler를 확인한 결과 정상군의 초음파 doppler(Fig. 2A)와 다르게 경동맥에 FeCl₃ 흡수 여과지를 밀착시켜 처리하여 혈관을 손상과 함께 혈전을 유발시킨 대조군의 초음파 doppler는 Fig. 2B와 같이 현저히 혈액의 흐름이 억제되는 결과를 얻어 혈행장애가 유발되었음을 확인하였다. 이와 같이 정상상태와 혈전상태를 초음파 doppler 상에서 뚜렷한 차이점을 확인 한 후 다음 실험을 수행하였다.

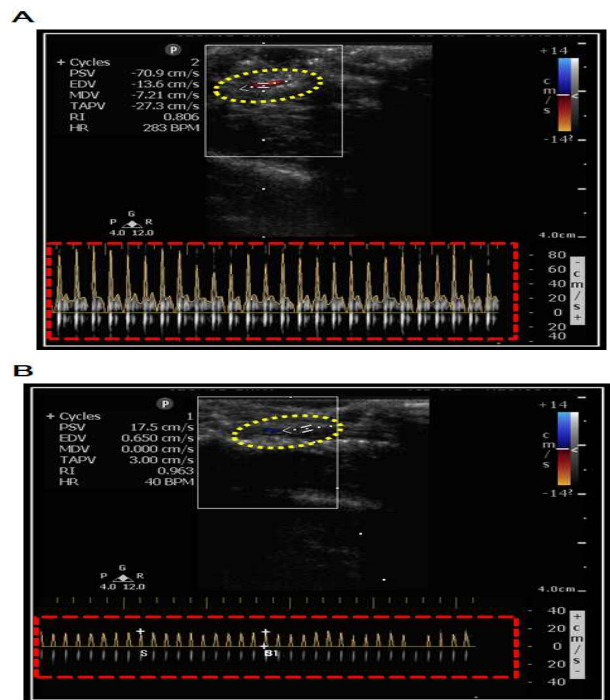


Fig. 2. Monitoring of carotid artery blood flow in topical FeCl₃-induced carotid artery injury rat model. A 3×5 mm strip of filter paper saturated with or without 10% FeCl₃ was applied to surface of surgically exposed left carotid artery as described in "Materials and Methods." After 20 days, carotid artery blood flow was measured using doppler flow probe (7.2 MHz). A: Normal (non-treated group). B: Control (topical FeCl₃-treated group).

2. 혈류속도, 혈관지름, 혈관면적, 혈류량에 대한 상엽 추출물과 그 유래물질의 효과

본 연구는 상엽추출물과 그 유래 물질인 quercetin, kaempferol 및 resveratrol 등을 대상으로 FeCl₃로 유도된 랫트 혈전모델에서 20일 동안 상엽추출물(400 mg/kg과 800 mg/kg), quercetin (5 mg/kg), kaempferol(5 mg/kg), resveratrol(5 mg/kg) 또는 참고약물인 aspirin(5 mg/kg) 등을 경구 투여한 후 초음파 장비를 이용하여 혈류속도, 혈관직경, 혈관면적, 혈류량 등

을 측정하여 혈행과 관련된 지표의 변화를 알아보았다. 그 결과 Fig. 3와 같이 정상군(혈류속도: 26.64 ± 1.64 cm/sec; 혈관직경: 0.245 ± 0.057 cm; 혈관면적: 2.32 ± 0.16 mm; 혈류량: 17.12 ± 1.71 mL/min)에 비해 혈전유발 대조군은 모든 수치(혈류속도: 2.49 ± 0.84 cm/sec; 혈관직경: 0.191 ± 0.011 cm; 혈관면적: 1.45 ± 0.08 mm, 혈류량: 2.29 ± 0.63 mL/min)가 현저하게 감소하였다($p < 0.05$). 그러나 상엽 추출물 투여군, quercetin, kaempferol 과 resveratrol 투여군은 혈행과 관련된 모든 수치에서 대조군보다 유의하게 높아 손상된 혈관 및 혈전을 개선시키는 효과가 있었다($p < 0.05$). 상엽추출물(400 mg/kg)과 플라보노이드 계열의 물질은 참고약물로 사용한 aspirin 투여군 보다는 개선되는 효과가 낮았지만, 상엽추출물(800 mg/kg) 투여군은 혈관 면적을 제외하고 혈류속도(16.67 ± 0.83 cm/sec), 혈관직경(0.141 ± 0.056 cm)과 혈류량(9.71 ± 1.42 cm/sec)에서 참고약물로 사용한 aspirin(혈류속도: 15.83 ± 1.25 cm/sec; 혈관직경: 0.143 ± 0.011 cm/sec; 혈류량: 11.43 ± 1.71 cm/sec) 투여군과 효과가 유사하여 혈행개선 효과가 가장 우수하였다(Fig. 3).

3. FeCl₃ 유도 경동맥 손상 및 혈전에 대한 상엽추출물과 그 유래물질의 조직학적 개선효과

본 연구는 상엽추출물 및 그 유래물질들이 FeCl₃에 의한 혈행 장애로부터 개선시킨 효과를 혈관 조직학적 수준에서 알아보았다. 즉, FeCl₃으로 경동맥 혈관 손상 후 상기와 같이 20일 동안 상엽추출물, 그 유래물질 또는 참고약물인 등을 투여한 후 경동맥을 적출한 후 파라핀 절편(5 μm)을 제작하여 H&E 로 염색하고 조직학적 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 4과 같이 FeCl₃로 유발된 혈전 혈관 대조군의 혈관은 정상군에 비해 혈관 조직의 손상으로 인한 복구과정에서 교원 섬유가 발달되어 혈관벽이 두터워졌 있고 혈전이 형성되어 혈관이 막혀있었다. 그러나 상엽 추출물 투여군, quercetin, kaempferol 및 resveratrol 투여군은 혈관 손상 및 교원질의 발달이 감소되었고 혈전 형성이 억제되는 효과가 있었다. 상엽추출물(400 mg/kg)과 플라보노이드 계열의 물질은 참고약물로 사용한 aspirin 투여군 보다는 혈관 개선과 혈전 형성 억제 효과 보다는 낮았지만, 상엽추출물(800 mg/kg) 투여군은 aspirin 투여군과 유사하게 혈관 손상 및 혈전이 현저히 억제되는 효과가 있었다(Fig. 4).

4. 혈액응고에 미치는 상엽추출물과 그 유래물질의 효과

본 연구는 FeCl₃를 이용한 경동맥 혈관 손상 후 상기와 같이 20일 동안 상엽추출물, 그 유래물질 또는 참고약물인 등을 경구 투여한 후 혈액을 채취하여 혈액의 응고 속도를 조사하였다. 그 결과 Table 1과 같이 대조군의 PT와 aPPT는 각각 21.40 ± 0.25 sec와 82.23 ± 2.98 sec로 정상군에 비해서 혈액응고 속도가 매우 빨랐다($p < 0.05$). 그러나 상엽 추출물 투여군, quercetin, kaempferol 또는 resveratrol 투여군의 PT와 aPT 등 혈액응고 속도는 대조군에 비해서 유의하게 지연되었다($p < 0.05$). 특히 상엽추출물(800 mg/kg)과 quercetin 투여군은 aspirin에 비해서 약간 빠른 시간에 혈액이 응고 되었지만, 정상군보다 혈액의 응고 시간이 지연되는 효과를

보였다($p < 0.05$).

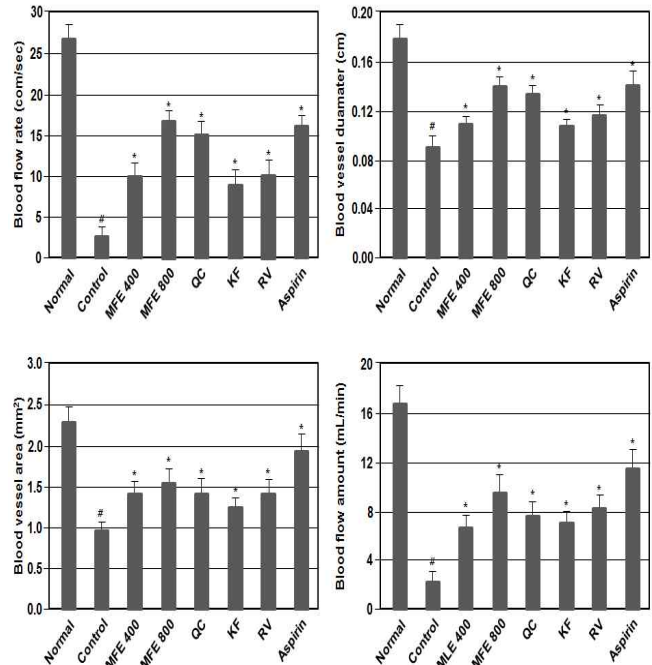


Fig. 3. Effects of MFE and flavonoids on blood flow rate, vessel diameter, vessel area and blood flow amount in topical FeCl₃-induced carotid artery injury rat model. Rats were orally administrated with MFE (400 mg/kg or 800 mg/kg), 5 mg/kg of flavonoid (QC, KF or RV) and aspirin (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. Carotid artery blood flow was measured using doppler flow ultrasound probe. Values are means \pm SE of three independent experiments. # $p < 0.05$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$ versus FeCl₃ treated control group.

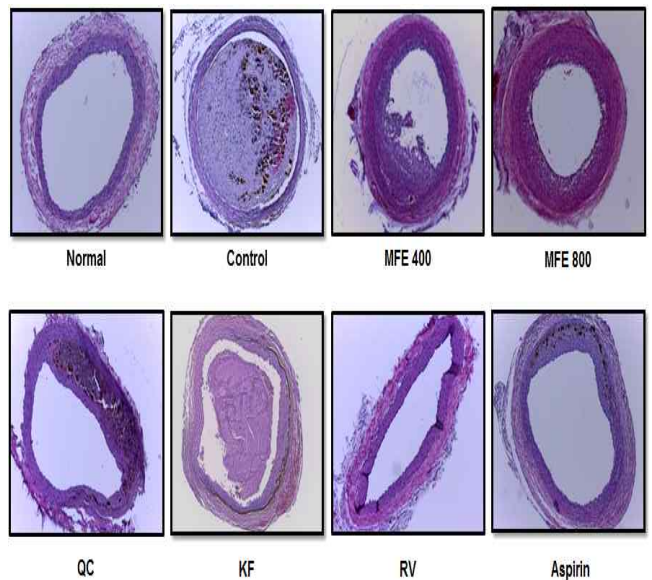


Fig. 4. Effects of MFE and flavonoids on histological changes of blood vessels in topical FeCl₃-induced carotid artery injury rat model. Rats were orally administrated with MFE (400 mg/kg or 800 mg/kg), 5 mg/kg of flavonoid (QC, KF or RV) and aspirin (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. Blood vessels were stained using H&E (Original magnification: $\times 100$).

Table 1. Effects of MFE and flavonoids on blood clotting time in topical FeCl₃-induced carotid artery injury rat model

Group	Blood clotting time (sec)	
	PT	aPTT
Normal	20.52±0.86	81.60±3.51
Control	9.08±0.17#	18.06±2.80#
MFE (400 mg/kg)	21.40±0.25*	82.23±2.98*
MFE (800 mg/kg)	23.73±0.15*#	96.42±3.12*#
QC (5 mg/kg)	23.80±0.25*#	93.72±2.51*#
KF (5 mg/kg)	20.61±0.53*	59.80±2.78*
RV (5 mg/kg)	22.72±0.42*	76.68±3.24*
Aspirin (5 mg/kg)	24.92±0.39*#	109.40±2.87*#

Rats were orally administrated with or without MFE (400 mg/kg or 800 mg/kg), 5 mg/kg of flavonoid (QC, KF or RV) and aspirin (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. Blood clotting time was measured by PT or aPTT assay. Values are means±SD of three independent experiments. #p<0.05 versus the non-treated control group. *p<0.05 versus FeCl₃ treated control group.

Table 2. Effects of MFE and flavonoids on food intake and body weights in topical FeCl₃-induced carotid artery injury rat model

Groups	Food intake (g/day)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/3 weeks)
Normal	26.02±3.36	356.27±6.73	435.47±4.37	26.33±3.58
Control	27.01±3.17	359.53±3.56	464.13±3.58#	35.83±2.71#
MFE 400	24.67±4.02	350.11±7.03	436.63±3.25*	28.68±3.37*
MFE 800	25.45±3.20	357.03±5.29	430.38±5.35*	24.33±3.51*
QC	24.87±3.29	353.21±5.29	435.17±4.38*	27.35±3.19*
KF	25.95±3.38	359.01±4.34	431.67±5.67*	24.13±2.91*
RV	26.48±3.37	356.11±5.29	429.38±6.25*	24.32±3.35*
Aspirin	27.45±3.28	358.21±4.28	427.33±4.24*	23.15±2.81*

Rats were orally administrated with or without MFE (400 mg/kg or 800 mg/kg), 5 mg/kg of flavonoid (QC, KF or RV) and aspirin (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. Values are means±SD (n=10) #p<0.05 versus the non-treated control group. *p<0.05 versus FeCl₃ treated control group.

5. FeCl₃ 유도 경동맥 혈관 손상 모델에서 상업추출물과 그 유래물질 투여에 의한 체중 및 혈액학적 변화

마지막으로 FeCl₃를 이용한 경동맥 혈관 손상 후 20일 동안 상업추출물과 그 유래물질을 경구 투여한 후 식이섭취량과 체중의 변화 및 혈액학적 변화를 알아보았다. 그 결과 Table 2와 같이 정상군, 대조군, 상업추출물 및 그 유래물질을 투여한 군에 있어서 식이섭취량은 유의한 변화가 없었지만, 정상군(26.33±3.58 g)에 비해서 대조군은 35.83±2.71g으로 증가하였다(P<0.05). 그러나 상업추출물을 비롯한 그 유래물질과 aspirin을 투여한 군은 대조군에 비해서 유의하게 체중이 감소되었다(P<0.05). 이러한 이유를 알아보기 위해서 마지막으로 본 연구는 혈청학적인 변화를 조사한 결과 Table 3과 같이 정상군에 비해서 대조군은 중성지방(triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC) 및 저밀도지단백(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 콜레스테롤은 유의하게 증가(P<0.05)한 반면, 고밀도지단백(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 콜레스테롤은 현저히 낮았다(P<0.05). 그러나 상업추출물을 비롯한 flavonoid계열 물질과 aspirin을 투여한 군은 대조군에 비해서 중성지방, 총 콜레스테롤 및 저밀도지단백 콜레스테롤이 대조군에 비해서 유의하게 억제되었고(P<0.05), 고밀도지단백 콜레스테롤은 증가하였다(P<0.05).

동맥경화지수와 TC/HDL-C 및 TG/HDL-C을 조사한 결과 Table 4에서 나타낸바와 같이 정상군에 비해서 대조군은 각각의 지수가 현저히 높아진 반면, 상업추출물(400 mg/kg과 800 mg/kg)을

비롯한 그 유래물질은 유의하게 억제된 효과가 있었다.

Table 3. Effects of MFE and flavonoids on serological changes at 20 days in topical FeCl₃-induced carotid artery injury rat models

Groups	Serological changes (mg/dL)			
	TG	TC	HDL-C	LDL-C
Normal	58.91±6.34	42.67±3.91	19.26±2.43	13.71±1.75
Control	76.82±6.78#	54.02±2.89#	14.11±1.45#	19.85±2.46#
MFE 400	65.28±5.57*	47.27±3.79*	17.24±1.71*	14.59±1.39*
MFE 800	61.32±4.83*	42.35±3.64*	18.92±1.16*	10.25±2.01*
QC	63.19±4.83*	43.57±3.39*	17.93±0.91*	11.57±1.81*
KF	64.61±3.91*	39.61±3.78*	17.91±2.16*	13.25±2.18*
RV	64.05±4.98*	44.20±2.99*	18.28±0.81*	12.11±1.09*
Aspirin	58.25±5.04*	44.96±3.63*	18.95±1.17*	12.67±3.10*

Rats were orally administrated with or without MFE (400 mg/kg or 800 mg/kg), 5 mg/kg of flavonoid (QC, KF or RV) and aspirin (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. TG: triglyceride, TC: total cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol. Values are means±SD (n=10) #p<0.05 versus the non-treated control group. *p<0.05 versus FeCl₃ treated control group.

Table 4. Effects of MFE and flavonoids on atherogenic index (AI) at 20 days in topical FeCl₃-induced carotid artery injury rat models

Groups	AI	TC/HDL-C	TG/HDL-C
Normal	1.23±0.32	2.26±0.29	3.02±0.34
Control	2.83±0.29#	3.91±0.27#	5.46±0.32#
MFE 400	1.74±0.20*	2.75±0.29*	3.79±0.37*
MFE 800	1.25±0.17*	2.34±0.21*	3.77±0.26*
QC	1.44±0.15*	2.42±0.19*	3.53±0.27*
KF	1.23±0.11*	2.24±0.18*	3.61±0.34*
RV	1.43±0.14*	2.43±0.17*	3.51±0.15*
Aspirin	1.37±0.15*	2.38±0.15*	3.09±0.31*

AI was calculates as (TC-HDL-C)/HDL-C. Values are means±SD (n=10), #p<0.05 versus the non-treated control group. *p<0.05 versus FeCl₃ treated control group.

고찰

혈관에 FeCl₃을 노출하면 혈관이 경화되면서 혈전을 유발하는 것으로 알려져 있기 때문에 설치류의 혈행장애와 관련된 혈전 유발 실험에 FeCl₃가 주로 이용된다. 일반적으로 사용되는 약물은 FeCl₃로 알려졌다^{9,19,23}. 그러므로 본 연구에서는 강 등¹⁹의 실험방법과 같이 랫트의 경동맥 주위를 깊게 해부하여 경동맥을 노출시킨 후 초음파 doppler를 확인한 후 실험을 수행하였다.

상업은 alkaloids, polyphenols, flavonoids 및 anthocyanins 과 같은 물질이 풍부히 함유되어 있어 당뇨병과 동맥경화 및 고지혈증과 같은 인체 질환을 예방하거나 치료하는데 효과적인 천연물로 알려지고 있다¹³⁻¹⁸. 최근 저자는 상업을 대상으로 상업추출물과 flavonoid 계열의 물질인 quercetin, kaempferol 및 astragaline을 분리 동정한 후 AAPH가 유도하는 적혈구의 산화적 스트레스에 의한 손상을 보호할 수 효과가 있음을 보고한 바 있으며¹⁸, 더불어 남향(Vitis romaneti) 포도잎 유래 resveratrol을 분리 동정한 후 혈행개선에 효과가 있음을 보고한 바 있다¹⁹. 그러므로 상업추출물에 있어서 400 mg/kg 투여군보다 800 mg/kg 투여군에서 혈행개선 지표가 우수한 것은 상업추출물에 함유된 quercetin, kaempferol 및 resveratrol 같은 물질의 함량이 높아졌기 때문인 것으로 사료된다(Fig. 3). 사실 저자는 상업추출물에 함유된 quercetin, kaempferol 및 resveratrol은 각각 0.603 ± 0.032 mg/g 0.503

± 0.026 mg/g 및 0.113 ± 0.072 mg/g임을 보고한 바 있다¹⁸⁾. 이와 같이 상업추출물이 FeCl₃로 유도된 혈행장애를 개선시킬 수 있는 것은 quercetin, kaempferol 및 resveratrol 등의 작용에 의한 것으로 해석할 수 있다.

혈관질환은 근육성 동맥의 병리학적 상태이고 혈관내피세포의 기능장애에 의해 유발되는데^{7,8)}, 혈행장애와 관련된 심혈관계 질환에 사용되고 있는 약물은 rivaroxaban, enoxaparin, warfarin, vitamin K antagonist와 aspirin 등이 자주 사용되는데, 장기간 복용하면 약물 내성과 함께 부작용이 유발될 수 있다^{10,11)}. 그러므로 비교적 부작용이 없는 식품 유래 혈행개선 물질을 복용할 필요가 있다¹²⁾. 본 연구 결과 Fig. 4과 같이 상업 추출물과 그 유래물질이 혈관의 손상을 복구하는 효과와 더불어 혈전을 용해하는 기능을 발휘함을 나타내주었다.

FeCl₃와 같은 현관손상 및 혈전 유발물질에 노출되면, 체내의 항응고인자와 응고인자의 평형상태가 깨지면서 혈액 중의 혈소판이 점착되고 활성화되어 혈액 응고속도가 빨라져 급속한 혈전을 형성하게 된다²³⁾. 이와 같이 혈관내에 혈전이 형성되면 혈액의 흐름을 방해하여 뇌졸중 및 심근경색 등 심각한 심혈관계질환을 일으키는 주요원인이다. 혈전은 혈소판 응집반응과 혈액응고 반응이 같은 영역에서 진행되는데, PT는 외인성 응고계에서 fibrin응고를 형성시킬 때까지의 시간 나타내고, aPTT는 내인성 응고계에서 fibrin 응고를 형성시킬 때까지의 시간을 의미하는 것으로 정상적인 상태에서는 활성화된 plasminogen에 의해서 혈전이 용해됨으로써 정상 혈관으로 회복되지만, 비정상적인 상태에서는 혈전증을 유발하게 된다²⁰⁻²⁴⁾. 본 연구 결과 Table 1과 같이 상업 추출물과 그 유래물질이 혈행 개선과 관련된 기능을 발휘하는 데는 혈액 응고시간을 지연시키기 때문인 것을 알 수 있었다.

한편 Table 3의 결과를 바탕으로 동맥경화지수와 TC/HDL-C 및 TG/HDL-C를 조사한 결과 Table 4에서 나타낸바와 같이 정상군에 비해서 대조군은 각각의 지수가 현저히 높아진 반면, 상업추출물(400 mg/kg과 800 mg/kg)을 비롯한 그 유래물질은 유의하게 억제된 효과가 있었다. 혈액학적 변화에 있어서 동맥경화지수와 TG/HDL-C는 관상동맥질환(coronary artery disease)의 위험인자²¹⁾를 나타내는 중요한 지표로 사용되고 있으며, TC/HDL-C는 고지혈증(hyperlipidemia)의 판정에 중요한 임상적 위험인자²²⁾로 인식되고 있다. 그러므로 산화된 저밀도지단백 콜레스테롤은 혈관질환의 주요 요인이기 때문에 정상적인 혈행을 유지하기 위해서는 이 물질을 제어할 수 있는 물질을 섭취해야할 필요성이 있다^{10-14,21)}.

이상의 결과를 종합해 보면 상업추출물과 그 유래물질은 혈행장애와 관련된 혈관 질환을 예방 및 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

이상의 결과를 종합해볼 때, 상업추출물과 quercetin, kaempferol, resveratrol 등 그 유래물질들은 FeCl₃로 유도된 렛트 경도맥 손상 및 혈전에 대해서 혈관손상 및 혈전을 억제시켜 혈행 속도, 혈관직경, 혈관면적 및 혈류량이 유의하게 개선되는 효과를

보였다. 특히 상업추출물(800 mg/kg) 투여군은 참고약물로 사용한 aspirin과 유사한 혈행개선 효과가 있었다. 또한 상업추출물과 quercetin, kaempferol 및 resveratrol 등 그 유래물질들은 혈액 응고시간을 지연시키는 효과를 나타냈었고, 상업추출물과 quercetin, kaempferol, resveratrol 등은 고밀도지단백 콜레스테롤을 높이는 반면, 저밀도지단백 콜레스테롤을 억제하는 효과가 있었다. 더욱이 관상동맥질환과 고지혈증의 혈청학적 위험요소인 동맥경화지수와 TG/HDL-C 그리고 TC/HDL-C의 지수가 개선된 결과는 상업추출물과 그 유래물질의 유용성을 증명해 주었다. 그러므로 상업추출물과 그 유래물질은 혈행장애로 유발될 수 있는 혈관질환을 예방하거나 개선할 수 있는 물질이라는 것을 제시해주었다.

감사의 글

이 논문은 농업과학 및 기술개발을 위한 협동연구사업(PJ009663032014)으로 농진청연구과제의 지원을 받아 수행하였다.

References

1. Tanaka, H., Dinunno, F.A., Monahan, K.D., Clevenger, C.M., DeSouza, C.A., Seals, D.R. Aging, habitual exercise and dynamic arterial compliance. *Circulation* 102: 1270-1275, 2000.
2. Yates, K.F., Sweat, V., Yau, P.L., Turchiano, M.M., Convit, A. Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32: 2060-2067, 2012.
3. Fimognari, F.L., Scarlata, S., Conte, M.E., Incalzi, R.A. Mechanisms of atherothrombosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 3: 89-96, 2008.
4. Kleinegris, M.C., Ten Cate-Hoek, A.J., Ten Cate, H. Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn.* 122: 557-566, 2012.
5. Xiromeritis, K., Dalainas, I., Stamatakos, M., Katsikas, V., Martinakis, V., Stamateopoulos, K., Psarros, V. Acute carotid stent thrombosis after carotid artery stenting. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 16: 355-362, 2012.
6. Marques, M.A., Murad, F.F., Ristow, A.V., Silveira, P.R., Pinto, J.E., Gress, M.H., Massière, B., Cury, J.M., Vescovi, A. Acute carotid occlusion and stroke due to antiphospholipid antibody syndrome: case report and literature review. *Int Angiol.* 29: 380-384, 2010.
7. Xu, W., Wang, T.Y., Becker, R.C. Hematologic diseases: from within the heart. *Rev Esp Cardiol.* 64: 606-613, 2011.
8. Ogata, J., Yamanishi, H., Ishibashi-Ueda, H. Review: role of cerebral vessels in ischaemic injury of the brain.

- Neuropathol Appl Neurobiol. 37: 40-55, 2011.
9. Lockyer, S., Kambayashi, J. Demonstration of flow and platelet dependency in a ferric chloride-induced model of thrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 33: 718-725, 1999.
 10. Xian, X., Ding, Y., Zhang, L., Wang, Y., McNutt, M.A., Ross, C., Hayden, M.R., Deng, X., Liu, G. Enhanced atherothrombotic formation after oxidative injury by FeCl₃ to the common carotid artery in severe combined hyperlipidemic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 385: 563-569, 2009.
 11. Warner, T.D., Nylander, S., Whatling, C. Anti-platelet therapy: cyclo-oxygenase inhibition and the use of aspirin with particular regard to dual anti-platelet therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 72: 619-633, 2011.
 12. Williams, M.J., Sutherland, W.H., McCormick, M.P., Yeoman, D.J., de Jong, S.A. Aged garlic extract improves endothelial function in men with coronary artery disease. *Phytother Res.* 19: 314-319, 2005.
 13. Lee, J.J., Yang, H., Yoo, Y.M., Hong, S.S., Lee, D., Lee, H.J., Lee, H.J., Myung, C.S., Choi, K.C., Jeung, E.B. Morusinol extracted from *Morus alba* inhibits arterial thrombosis and modulates platelet activation for the treatment of cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb.* 19: 516-522, 2012.
 14. Chan, K., Ho, H., Peng, C., Lan, K., Lin, M., Chen, H., Wang, C. Polyphenol-rich extract from mulberry leaf inhibits vascular smooth muscle cell proliferation involving upregulation of p53 and inhibition of cyclin-dependent kinase. *J Agric Food Chem.* 58: 2536-2542, 2010.
 15. Song, W.L., Wang, H.J., Bucheli, P., Zhang, P.F., Wei, D.Z., Lu, Y.H. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *J Agric Food Chem.* 57: 9133-9140, 2009.
 16. Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsube, T., Kitajima, K., Anuurad, E., Yamasaki, M., Yamane, Y. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* 135: 729-734, 2005.
 17. Asano, N., Yamashita, T., Yasuda, K., Ikeda, K., Kizu, H., Kameda, Y., Kato, A., Nash, R.J., Lee, H.S., Ryu, K.S. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem.* 49: 4208-4213, 2001.
 18. Choi, J., Kang, H.J., Kim, S.Z., Kwon, T.O., Jeong, S.I., Jang, S.I. Antioxidant effect of astragalins isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. *Arch Pharm Res.* 36: 912-917, 2013.
 19. Kang, H.J., Kim, H.S., Jeon, I.H., Mok, J.Y., Han, K.S., Jang, S.I. Effects of Antioxidant and Blood Flow Improvement of Grape Leaf Extract and Resveratrol from *Vitis rotundifolia*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 42: 1736-1743, 2013.
 20. Friedwald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, with use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18: 499-502, 1972.
 21. Tan, M.H., Johns, D., Glazer, N.B. Pioglitazone reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes. *Clin Chem.* 50: 1184-1188, 2004.
 22. Grover SA1, Levinton C, Paquet S. Identifying adults at low risk for significant hyperlipidemia: a validated clinical index. *J Clin Epidemiol.* 52: 49-55, 1999.
 23. Wang, X., Cheng, Q., Xu, L., Feuerstein, G.Z., Hsu, M.Y., Smith, P.L., Seiffert, D.A., Schumacher, W.A., Ogletree, M.L., Gailani, D. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost.* 3: 695-702, 2005.
 24. Mancini, M., Rubba, P. Ischemic cardiopathy: risk factors and their biological role. *Ital Heart J.* 2: 17-22, 2000.