

남향(*Vitis romaneti*) 유래 포도잎 추출물과 Resveratrol의 항산화 및 혈행개선 효과

강현주¹ · 김현수¹ · 전인화¹ · 목지예¹ · 한경수² · 장선일^{1*}

¹전주대학교 보건관리학과
²한스올가닉

Effects of Antioxidant and Blood Flow Improvement of Grape Leaf Extract and Resveratrol from *Vitis romaneti*

Hyun Ju Kang¹, Hyeon Soo Kim¹, In Hwa Jeon¹, Ji Ye Mok¹,
Kyeong Soo Han², and Seon Il Jang^{1*}

¹Dept. of Healthcare & Science, Jeonju University, Jeonbuk 560-759, Korea

²Hansorganic, Jeonbuk 580-913, Korea

ABSTRACT The purpose of this study is to investigate the effects of 80% ethanol grape leaf extract (VGLE) and resveratrol (VGLR) from *Vitis romaneti* on antioxidant of red blood cells (RBC) of rat and efficacy of blood flow improvement in a rat model of topical ferric chloride (FeCl₃)-induced carotid artery damage. RBC oxidative hemolysis and plasma lipid peroxidation induced by the aqueous peroxy radical generator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride were significantly suppressed by VGLE or VGLR in a dose-dependent manner. The FeCl₃ treatment seriously damaged the carotid artery: the walls of the artery and blood flow. However, VGLE or VGLR administration has ameliorated the blood flow and suppressed thrombus in blood vessels. These results suggest that VGLE or VGLR ameliorates the oxidative stress of RBC and thrombosis against blood vessel damage.

Key words: *Vitis romaneti*, grape leaf extract, resveratrol, antioxidant, blood flow improvement

서 론

최근 인간의 수명이 연장되면서 노화 및 혈행과 관련된 생활습관병(lifestyle related disease)이 급증하고 있는데(1), 이러한 원인은 생체의 대사과정에서 발생하는 하이드록시 라디칼($\cdot\text{OH}$), 슈퍼옥사이드 라디칼($\cdot\text{O}_2^-$), 과산화수소(H_2O_2) 등과 같은 활성산소류(reactive oxygen species, ROS)에 의한다고 알려졌다(2,3). ROS는 세포 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 뇌졸중과 파킨슨병 등과 같은 뇌질환은 물론 심장질환, 허혈, 동맥경화 등과 같은 심혈관계 질환 등 각종 인체질환과 노화의 주원인이 된다고 알려져 있다(4,5).

적혈구는 세포막에 불포화 지방산이 다량 포함되어 있고, 세포질에 높은 농도의 산소와 철(Fe)이 부착된 헤모글로빈이 다량 함유되어 있어 매우 민감하게 산화적 손상을 받기 쉽다(6). 산화적 스트레스의 결과물 중 하나인 지질과산화(lipid peroxidation)는 세포손상과 사멸에 대한 일반적인

기전으로 알려졌는데, 지질과산화의 최종산물인 malondialdehyde(MDA)가 적혈구에 일시에 노출될 경우 세포 구성물과 반응성이 높아 적혈구에 치명적 손상을 주게 된다(7,8).

이러한 ROS는 생체가 정상적인 상태라면 체내에 존재하는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소와 glutathione, 비타민 E 등과 같은 항산화 물질에 의하여 제거된다. 그러나 대사과정에 있어 문제가 발생되거나 염증과 관련된 인체질환이 야기된다면, 체내에 존재하는 항산화 물질이 고갈되어 효과적으로 ROS를 제거하는데 실패할 수 있기 때문에 외부로부터 항산화 물질을 섭취할 필요가 있다(2,3,9).

혈전(thrombus)은 혈관 속에서 피가 굳어진 덩어리를 말하는데, 혈전으로 인해 생기는 질환을 혈전증(thrombosis)이라 한다(10). 우리 몸은 여러 가지 혈전형성인자와 조절인자가 균형을 이루고 있어서 정상인은 과도한 혈전이 만들어지지 않지만, 혈전형성억제에 관여하는 인자들의 균형이 깨지게 되면 혈전이 형성될 수 있다. 뇌졸중과 심근경색과 같은 죽상동맥혈전은 혈관의 평활근 세포 증식, 혈관 내피세포 염증, 혈소판 응집에 영향을 미친다(10-12). 일반적으로 혈행장애와 관련된 심혈관계질환에 사용되고 있는 대표적인

Received 7 June 2013; Accepted 11 October 2013

*Corresponding author.

E-mail: sonjjang@jj.ac.kr, Phone: 82-63-220-3124

약물은 rivaroxaban, enoxaparin, warfarin, vitamin K antagonist와 aspirin 등이 자주 사용되는데, 장기간 복용하면 약물 내성과 함께 부작용이 유발될 수 있다(13). 그러므로 최근에는 천연물에서 혈행개선에 관련된 물질을 발굴하기 위해서 연구가 활발히 전개되고 있다(14,15).

남향(*Vitis romaneti* Roman. du Caill. ex Planch.)은 중국에 주로 분포하는 야생종으로 현재 개량하여 재배하고 있는 포도과(Vitaceae) 식물의 야생 품종으로 열매는 생식으로 이용되거나 음료, 와인, 잼, 포도씨유 등으로 가공되어 활용될 수 있다(16). 지금까지 재배 포도를 이용한 연구로는 심혈관질환이나 항암활성, 면역 조절 활성을 가진다는 연구가 많다(17-19). 그러나 남향 포도 잎 추출물을 대상으로 항산화 효과와 혈행개선에 대한 생리활성 연구는 없는 실정이다.

그러므로 본 연구는 남향 포도잎 추출물(VGLE)과 남향 포도잎 유래 resveratrol(VGLR)을 대상으로 랫트 적혈구 및 혈장의 산화적 손상에 대한 항산화 및 랫트 경동맥 혈전 모델에서 혈행개선에 대한 효과를 비교하여 조사한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Heparin sodium salt, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH), Drabkin's reagent, Brij® L23 solution, iron(II) chloride hexahydrate(FeCl_3), potassium ferricyanide, potassium persulfate, trichloroacetic acid(TCA), 2-thiobarbituric acid(TBA), phosphoric acid, tetraethoxypropane, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), sodium citrate, meta-phosphoric acid, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), sodium chloride(NaCl), sodium phosphate dibasic(Na_2HPO_4), zoletil 및 기타 시약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

포도 잎 추출물 준비

실험에 사용한 포도 잎은 전라북도 정읍시 신대인읍 백산리 희망농원에서 재배된 남향(*Vitis romaneti* Roman. du Caill. ex Planch.) 품종으로 2012년 5월 말~6월 초에 채취하였다. 채취된 포도 잎은 즉시 신선한 물로 세척한 후 건조하여 분말화 하였고 1,000 g을 정량하여 80% 에탄올 7 L와 혼합하여 실온에서 7일간 방치하여 추출하였다. 7일간 방치한 후 용액을 취하여 3,000 rpm으로 원심 침전시키고 상층액만 취하여 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하였다. 회전진공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압농축 한 후, 동결건조기(Eyela, FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co.)로 -70°C 에서 동결 건조하였으며 약 95.7 g 얻은 후 -20°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

포도 잎 유래 resveratrol의 분리

추출물을 증류수에 현탁시키고 동량의 *n*-hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc 및 *n*-BuOH의 순으로 용매 분획하여 13.2 g, 1.48 g, 1.32 g 및 6.31 g의 분획물을 각각 얻었다. 이중에 EtOAc 분획물(1.2 g)을 Sephadex LH-20와 메탄올로 column chromatography(35×3.0 cm)를 실시하여 TLC(silica gel 60F₂₅₄, 전개용매 toluene : EtOAc : formic acid=5:4:1, v/v) 패턴에 따라 6개의 분획(E1~E6)으로 나누었다. 이 중 주요 E2(156 mg)분획에서 분취용고속크로마토그래피(pre-HPLC)를 GS310 column, MeOH 용매 및 203 nm의 UV 검출기 이용하여 화합물(7.3 mg) 분리를 하였다. 분리된 화합물은 ^1H -, ^{13}C -NMR 등의 이화학 장비들을 이용하여 구조 분석하고 함량을 조사하였다.

실험동물 사육

용혈 및 지질과산화 실험에 사용할 혈액채취와 혈전 유발 동물모델 제작에 필요한 실험동물은 무균환경에서 사육된 8주령 수컷 Sprague Dawley rat(SD rat, 240~290 g)로 중앙실험동물(서울)로부터 구입하였다. 1주일의 순화기간을 거친 후 무작위로 군을 배정한 다음 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 $23\pm 3^\circ\text{C}$, 밤 낮주기(12시간)가 조절되는 환경에서 사육하였으며 전주대학교 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실행하였다(#2011-005).

식이섭취량 및 체중 변화

식이섭취량은 전 실험기간 동안 매일 일정시간에 측정하였다. 체중은 실험기간 동안 일주일에 한 번씩 측정하였다.

적혈구 부유액의 제조

랫트는 에테르로 마취시켜 간문맥으로부터 헤파린이 처리된 주사기를 이용하여 채혈하였다. 적혈구(red blood cells, RBC)는 10분간 $1,500\times g$ 로 원심분리한 후 인산완충액(phosphate buffered saline, pH 7.2)으로 3회 세척하고 인산완충액에 hematocrit가 5% 유지되도록 다시 부유하였다.

적혈구 용혈 측정

RBC 부유액은 VGLE(12.5~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 VGLR(0.781~25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 가하여 37°C 에서 30분간 전 처리한 후 RBC의 자유유리기 사슬 산화를 유도하기 위해서 AAPH(최종농도 50 mM)를 주입하고 0~6시간 동안 37°C 에서 반응시켰다. 대조군은 인산완충액으로 적정된 적혈구 부유액만 같은 온도 및 시간 조건으로 방치하고 실험하였다. 대조군과 각 실험군의 반응액은 2분간 $3,000\times g$ 로 원심분

리 하여 상층액을 얻은 후 Hseu 등(20)의 방법에 따라 ELISA reader(Molecular Devies, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 적혈구 용혈에 대한 참고 값(100% 용혈)은 AAPH(50 mM)의 흡광도를 기준으로 하여 정하였다.

혈장의 지질과산화 측정

헤파린이 처리된 랫트 혈액을 1,500×g에서 10분간 원심분리 하여 혈장(plasma)을 얻었고, 혈장의 지질과산화의 지표물질로 알려진 TBARS(MDA)는 Hseu 등(20)의 방법에 따라 측정하였다. 간단히 요약하면, 1 mL 반응액에 250 µL의 TBA(0.67%)와 100 µL의 H₃PO₄(0.44 M)를 첨가하여 1시간 동안 95°C에 방치한 다음 150 µL의 TCA(20%)를 주입하였다. 표준물질로 tetraethoxypropane을 사용하였고, 원심분리(12,000×g, 10분) 후 상층액의 과산화물질의 양은 MDA의 몰 흡광계수(OD₅₃₅)를 이용하여 결정하였다.

FeCl₃ 유도 경동맥 혈전 유발과 VGLE 및 VGLR의 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(MyLab™ 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 측정한 후, 70% FeCl₃를 적신 filter paper(3×5 mm)를 10분간 접촉시켜 유지하였다. 그 후 filter paper를 제거하고 초음파를 측정하여 혈전유발을 확인하고 수술부위를 봉합하였다. 혈전이 유발된 랫트에서 항혈전 효과를 관찰하기 위해서 Normal(정상군), Control(혈전유발군), VGLE(혈전유발+VGLE 투여군)와 VGLR(혈전유발+VGLR 투여군) 그룹으로 나누어 실험하였고, VGLE는 체중 kg당 200 mg, VGLR은 체중 kg당 5 mg씩 1일 1회 20일 동안 경구투여 하였다.

항혈전 효능 평가 및 경동맥 혈관 적출

20일 간의 VGLE 또는 VGLR 투여기간 종료 후 doppler flow probe(MyLab™ 25, Esaote)를 이용하여 혈류 속도, 혈관 지름, 혈관 면적, 혈류량을 측정하여 각 그룹별 개선 정도를 비교하였다. 혈전유발 부위 혈관의 조직학적 관찰을 위해 혈관 양쪽을 단단히 고정하고 경동맥을 3~4 mm 적출하여 4% paraformaldehyde(pH 7.4)에 고정하고 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.

혈액채취 및 혈청학적 분석

혈액은 혈관 초음파 측정 후에 복대정맥에서 채취하여 실온에서 30분간 방치한 후 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 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 식(21) {총 콜레스테롤 - (HDL-콜레스테롤 + 중성지방/5)}에 의하여 계산하였다.

통계처리

모든 실험값은 3반복 실험한 값을 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 P<0.05로 정하였다.

결과 및 고찰

포도 잎 유래 resveratrol 분리 결과

포도 잎으로부터 resveratrol 7.3 mg을 분리하여 ¹H-, ¹³C-NMR 등의 이화학장비들을 이용하여 구조 분석한 결과는 Fig. 1과 같다.

White needles, EI/MS *m/z*: 228[M⁺], ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.34(2H, d, *J*=8.6 Hz, H-2, 6), 6.95(1H, d, *J*=16.4 Hz, H-α), 6.78(1H, d, *J*=16.4 Hz, H-β), 6.75(2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3, 5), 6.41(2H, d, *J*=2.2 Hz, H-2', 6'), 6.13(1H, m, H-4'). ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD): δ 159.7(C-3', 5'), 158.4(C-4), 141.2(C-1'), 130.5(C-1), 129.3(C-α), 128.9(C-2, 6), 127.1(C-β), 116.5(C-3, 5), 105.3(C-2', 6'), 102.7(C-4'), 116.25(C-3', 5'), 104.51(C-10), 99.23(C-6), 94.45(C-8).

더불어 남향 포도 잎 추출물로부터 분획된 resveratrol의 함량은 mL당 8.6 mg이 함유되어 있었다.

항혈전 작용에 미치는 VGLE 및 VGLR의 영향

적혈구는 세포막에 포함되어 있는 다량의 불포화 지방산과 세포질에 고 농도로 함유된 산소와 철이 부착된 헤모글로불린이 있어 매우 민감하게 산화적 손상을 받게 되어 자체의 항산화 체계가 교란되어 혈색소증을 비롯한 각종 빈혈을 유

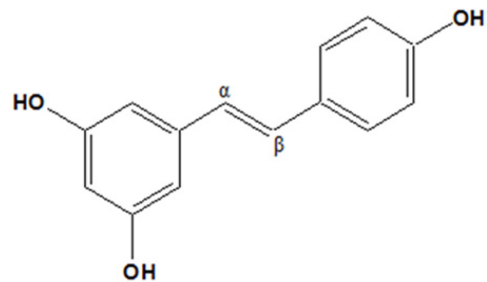


Fig. 1. Chemical structure of resveratrol from grape leaves of *Vitis romaneti*.

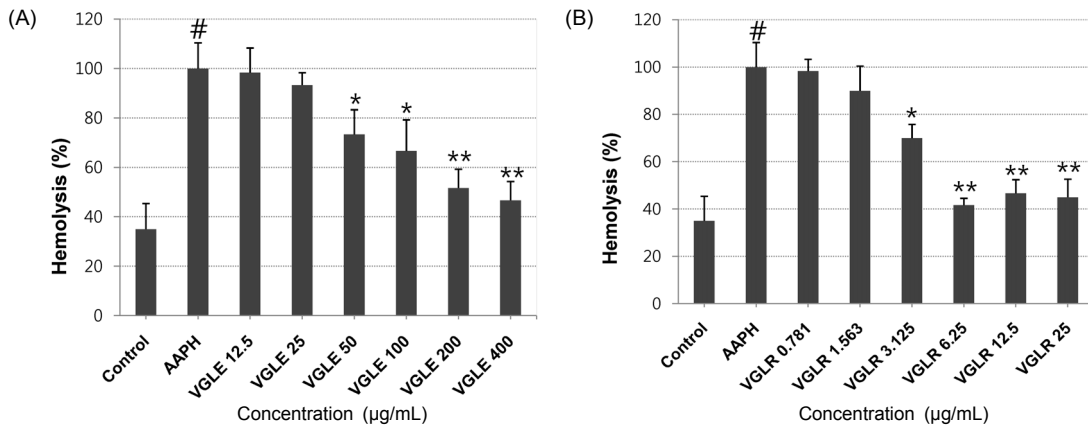


Fig. 2. Effects of 80% ethanol grape leaf extract (VGLE) (A) and resveratrol (VGLR) (B) from *V. rotundifolius* on AAPH-induced hemolysis in RBC. RBC suspension at 5% hematocrit was incubated with PBS (control), or preincubated with the different VGLE concentration (12.5~400 µg/mL) or VGLR (0.781~25 µg/mL) for 30 min. Then it was incubated with and without 50 mM AAPH for 4 h at 37°C. Values are means±SD of three independent experiments. #*P*<0.001 versus the non-treated control group. **P*<0.05 and ***P*<0.01 versus AAPH-treated control group.

발한다(6). 그러므로 본 연구는 수용성 자유유리기 유도생성 물질로 잘 알려진 AAPH를 사용하여 적혈구의 용혈을 유도 하였다(20). 즉 대조군의 경우 AAPH로 4시간 동안 처리하였을 때 적혈구가 100% 용혈되었다. 그러나 VGLE 또는 VGLR을 농도별로 30분 동안 처리하고 AAPH를 처리한 후 적혈구의 용혈률을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 농도 의존적으로 현저히 억제되었다. VGLE 50.0 µg/mL와 100 µg/mL 처리하였을 때 각각 26.7%(*P*<0.05), 33.3%(*P*<0.05)가 억제되었고 200 µg/mL와 400 µg/mL 처리하였을 때 각각 48.3%(*P*<0.01), 53.3%(*P*<0.01)가 억제된 것으로 나타났다. VGLR을 3.125 µg/mL 처리하였을 때에는 30%(*P*<0.05)가 억제되었으며 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25.0 µg/mL 처리하였을 때 각각 58.3%(*P*<0.01), 53.3%(*P*<0.01), 55.0%(*P*<0.01)가 억제되어 항용혈 효과가 우수하였다.

APPH 유도 지질과산화(MDA)에 대한 VGLE 및 VGLR의 영향

다음은 혈장의 APPH 유도 지질과산화(MDA: 지질과산화의 최종산물)에 대한 VGLR 및 VGLR의 농도별 억제 효과를 알아보았다. 그 결과 Fig. 3과 같이 AAPH를 2시간 처리하였을 때 1 L당 혈장의 MDA가 38.9±1.5 µM로 높게 형성된 반면, VGLE 및 VGLR을 처리한 결과 농도 의존적으로 MDA 생성이 현저히 억제되었다. VGLE를 각각 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 처리하였을 때 MDA 생성이 각각 16.9%(*P*<0.05), 26.0%(*P*<0.01), 46.8%(*P*<0.01) 억제되었고, VGLR을 3.125 µg/mL, 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL 처리하였을 때 MDA 생성이 각각 11.7%(*P*<0.05), 23.4%(*P*<0.05), 35.1%(*P*<0.01) 억제되었으며 특히 25.0 µg/mL 처리하였을 때에는 52.0%(*P*<0.001)로 현저하게 억제되어 지질과산화에 대한 억제 효과가 매우 우수한 것을 확인

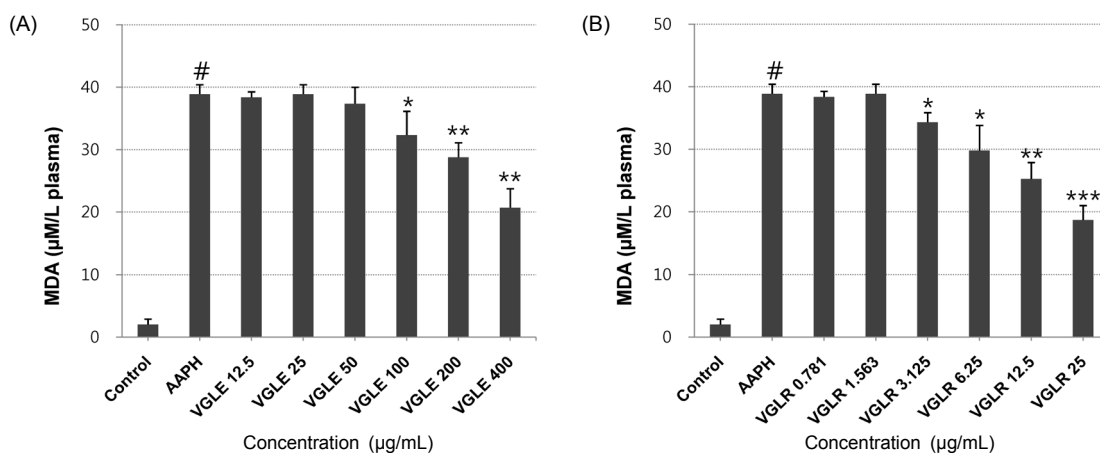


Fig. 3. Effects of VGLE (A) and VGLR (B) from *V. rotundifolius* on AAPH-induced MDA in plasma. Plasma (1:50 v/v in PBS) was incubated with PBS (control), or preincubated with the different VGLE concentration (12.5~400 µg/mL) or VGLR (0.781~25 µg/mL) for 30 min. And then, it was incubated with and without 50 mM AAPH for 4 h at 37°C. Values are means±SD of three independent experiments. #*P*<0.001 versus the non-treated control group. **P*<0.05 and ***P*<0.01 versus AAPH-treated control group.

하였다.

FeCl₃를 이용한 경동맥 혈전 유발에 대한 혈관 doppler 비교

한편 설치류에서 동맥과 정맥에서 혈전을 유발할 때 일반적으로 사용되는 약물은 FeCl₃로 알려졌다(22,23). 그러므로 본 연구에서는 VGLE와 VGLR의 투여가 혈행 개선에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 경동맥에 FeCl₃를 처리하고 20일간 VGLE(200 mg/kg/day)와 VGLR(5 mg/kg/day)을 투여하고 초음파 장비를 활용하여 먼저 doppler 양상을 비교하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 경동맥 혈관 손상 및 혈전을 유발하기 전의 Normal군의 혈관상태와 혈류는 정상 상태의 doppler를 보였지만, FeCl₃를 처리하여 혈관 손상 및 혈전을 유발한 후 doppler는 정상에 비해 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 VGLE 및 VGLR을 20일 동안 1일 1회 투여한 후 doppler를 관찰한 결과 Control군에 비해 혈관 및 혈류가 개선된 것을 확인하였다.

혈류속도, 혈관지름, 혈관면적, 혈류량에 대한 VGLE 및 VGLR의 효과

다음은 FeCl₃ 처리에 의한 혈전을 유발하고 VGLE 및 VGLR을 투여한 후 최종일에 초음파 장비를 이용하여 혈류

속도, 혈관 지름, 혈관 면적, 혈류량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 Normal군에 비해 Control군에서 모든 수치가 유의하게 감소하였고, VGLE군 및 VGLR군에서 유의적으로 혈행이 개선된 것을 확인하였다. 특히 VGLR을 투여한 군에서는 4가지 지표 모두 Normal군과 비슷한 수준으로 혈행이 개선되었음을 확인하였다. 포도 유래 resveratrol은 만성적 허혈증(chronic ischemia) 모델동물에서 경구투여 할 경우 혈관 내피세포 성장인자를 자극하여 혈관 손상을 개선시키는 것으로 알려져 있으며(24), 인체에 resveratrol을 투여할 경우 대의 피질 혈관의 혈행을 개선시키는 것으로 알려져 있다(25). 그러므로 본 연구에서 사용된 남향 유래 resveratrol인 VGLR은 FeCl₃ 처리에 의한 혈관 손상 및 혈전에 대해서 효과적으로 개선시킬 수 있다는 것을 제시해 주었다. 더불어 VGLE는 FeCl₃ 처리에 의한 혈관 손상 및 혈전에 대해서 그 효과가 VGLR에 비해서 약간 낮았을 지라도 Control군에 비해 모든 지표가 개선되는 효과가 있었다. 이와 같은 VGLE의 혈행개선 효과는 포도 잎에 함유된 미량의 resveratrol뿐만 아니라 quercetin과 kaempferol과 같은 flavonoid 계열의 화합물을 함유하고 있기 때문일 것으로 사료된다. 따라서 이들 물질은 FeCl₃가 유도하는 혈관손상을 복원하는 기능과 함께 혈전을 용해하는 항응고 관련 인자를 활성화 시키는 기능이 우수하기 때문이라 사료된다.

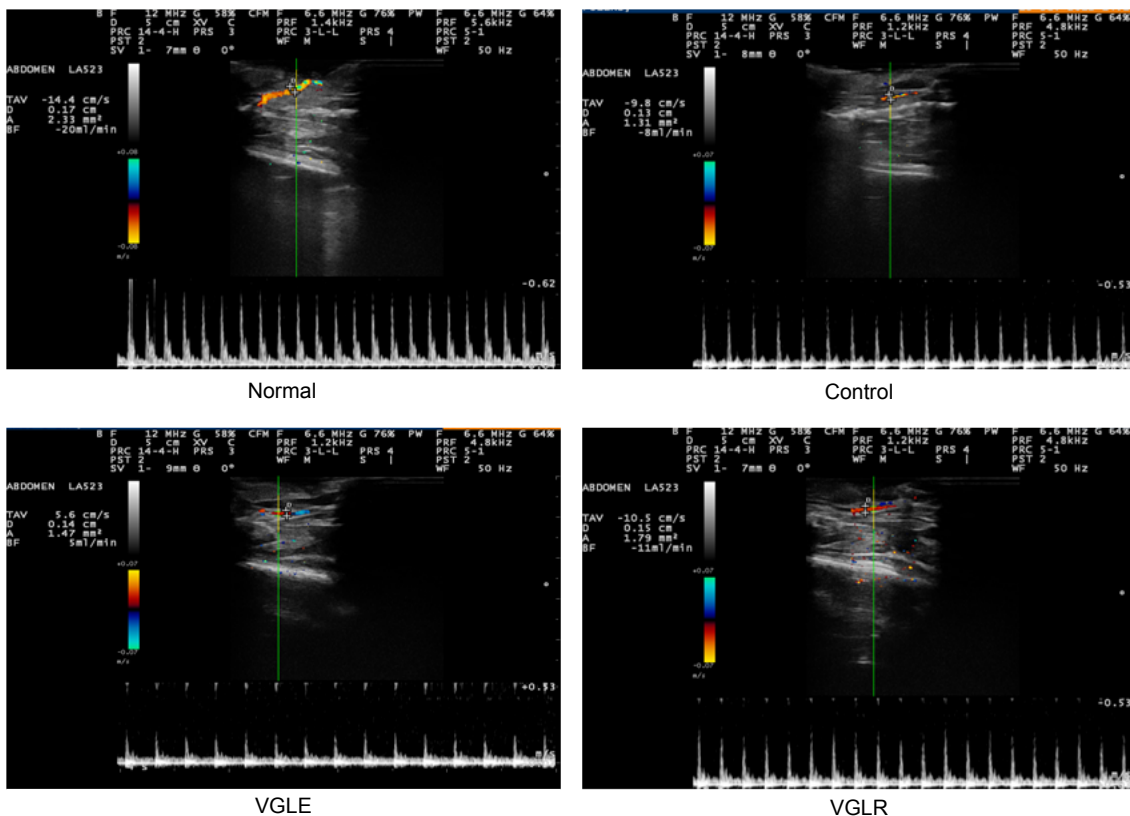


Fig. 4. Effects of VGLE and VGLR from *V. romaneti* on vessel doppler in topical FeCl₃-induced carotid artery injury. Rats were orally administrated with VGLE (200 mg/kg) or VGLR (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. Vessel doppler was measured as described in the section of Materials and Methods.

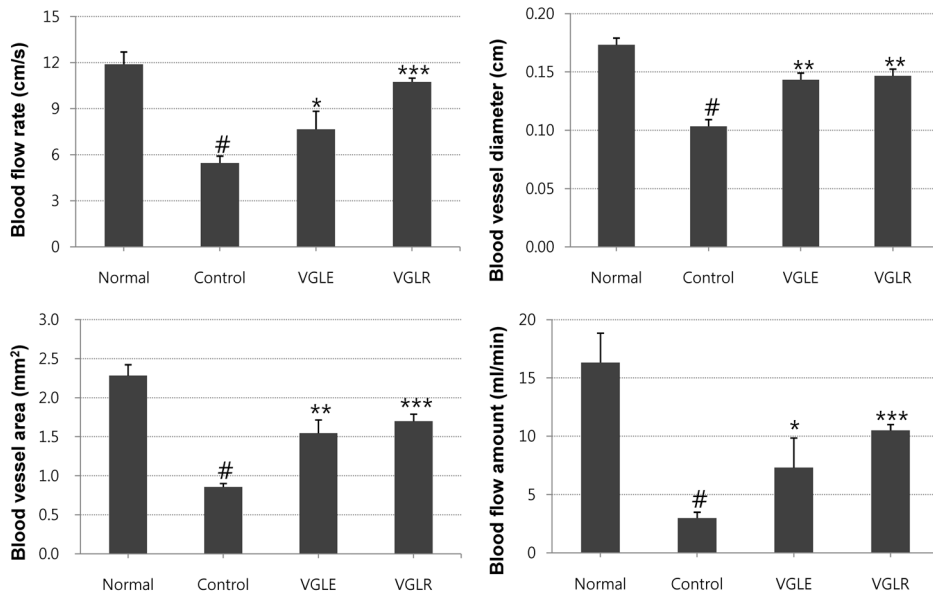


Fig. 5. Effects of VGLE and VGLR from *V. rotundifolius* on blood flow rate, vessel diameter, vessel area and flow amount in topical FeCl₃-induced carotid artery injury. Rats were orally administrated with VGLE (200 mg/kg) or VGLR (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. Values are means±SD of three independent experiments. #*P*<0.001 versus the non-treated control group. **P*<0.05 and ***P*<0.01 versus AAPH-treated control group.

FeCl₃ 유도 경동맥 혈관 손상에 대한 조직학적 관찰

혈관질환은 크고 작은 크기의 근육성 동맥의 병리학적 상태이고 혈관내피세포의 기능장애에 의해 유발된다. 이러한 혈관 손상은 병원체, 산화된 저밀도지방(low density lipid, LDL)과 기타 염증 자극 면역세포와 같은 요소들이 활성화되기 때문이다(12,22,26). 일반적으로 혈행장애와 관련된 심혈관계질환에 사용되고 있는 대표적인 약물은 rivaroxaban, enoxaparin, warfarin, vitamin K antagonist와 as-

pirin 등이 자주 사용되는데, 장기간 복용하면 약물 내성과 함께 부작용이 유발될 수 있다(13). 그러므로 비교적 부작용이 없는 식품 유래 혈행개선 물질을 복용할 필요가 있다(18).

본 연구는 FeCl₃를 이용한 경동맥 혈관 손상 후 20일 동안 VGLE 및 VGLR을 투여한 후 경동맥의 조직학적 변화를 알아보기 위하여 H&E 염색을 실시하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 Control군은 Normal군에 비해 혈관내의 교원 섬유 부분이 상당히 손상되고 두터워졌으며 혈관 내에 상당량의 혈

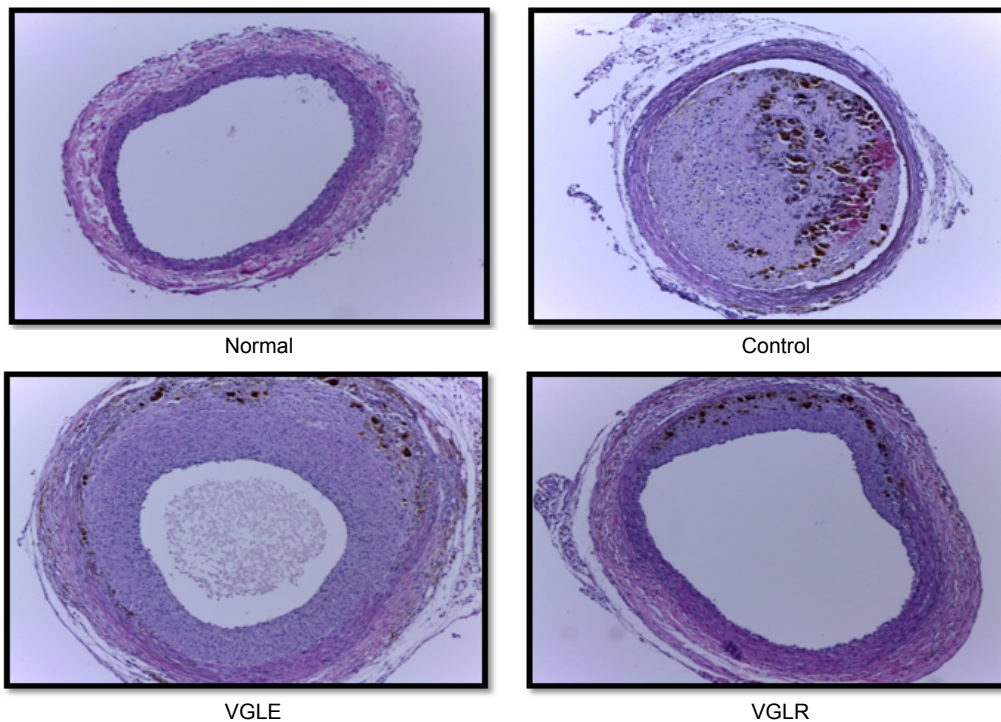


Fig. 6. Histological changes of VGLE and VGLR from *V. rotundifolius* on blood vessel in topical FeCl₃-induced carotid artery injury. Rats were orally administrated with VGLE (200 mg/kg) or VGLR (5 mg/kg) once daily for 20 days after topical FeCl₃ treatment at carotid artery injury. Blood vessel tissues were stained with H&E. Original magnification ×100.

Table 1. Effects of VGLE and VGLR on food intake, body weight and serological changes in SD rats

Groups	Food intake (g/day)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/3 weeks)	Serological changes			
					Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)
Normal	27.00±3.57	356.27±8.73	444.37±3.37	29.37±3.29	58.91±6.34	40.74±4.14	19.26±3.43	9.70±2.76
Control	29.07±4.17	361.67±2.56	469.13±3.87 [#]	35.82±1.70 [#]	73.72±3.77 [#]	52.12±1.86 [#]	16.01±1.45	21.36±2.46 [#]
VGLE	24.67±4.02	362.10±7.03	452.63±3.25 [*]	30.18±3.37	62.24±5.54 [*]	41.27±3.98 ^{**}	16.24±0.70	12.58±1.37 [*]
VGLR	22.45±3.20	357.47±6.27	443.37±4.20 ^{**}	28.63±3.38 [*]	56.19±1.81 ^{**}	38.36±2.61 ^{**}	17.91±4.16	9.21±6.08 [*]

All values are mean±SD (n=10).

[#]P<0.05 versus the non-treated normal group. ^{*}P<0.05 and ^{**}P<0.01 versus control group.

전이 침착되었으나, VGLE를 투여함으로써 혈전 생성이 감소되고 혈관내의 교원 섬유질의 손상도 억제되는 것을 확인하였다. 특히 VGLR을 투여한 군은 혈관 손상 및 혈전이 현저하게 억제된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험을 통해 VGLE 및 VGLR 투여에 따라 항혈전 효과가 우수하였음을 확인할 수 있었다.

FeCl₃ 유도 경동맥 혈관 손상에 대한 VGLE 및 VGLR의 체중 및 혈액학적 변화

본 연구는 FeCl₃를 이용하여 경동맥 혈관 손상을 유발한 후 20일 동안 VGLE 및 VGLR을 투여한 후 식이섭취량과 체중의 변화 및 혈액학적 특성을 조사하였다. 그 결과 Table 1과 같이 Normal군, Control군, VGLE군 및 VGLR군에 있어서 식이섭취량은 유의한 변화가 없었지만, 20일간 체중 증가량(body weight gain)은 Normal군(29.37±3.29 g)에 비해서 Control군은 35.82±1.70 g으로 증가하였다(P<0.05). 그러나 VGLE가 아닌 VGLR을 투여한 경우 Control군에 비해서 유의하게 체중이 감소되었다(P<0.05). 이러한 이유를 알아보기 위해서 본 연구는 혈청학적인 변화를 조사한 결과 Normal군에 비해서 Control군은 고밀도지단백(high density lipoprotein, HDL) 콜레스테롤은 큰 차이가 없었지만, 중성지방(triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol) 및 저밀도지단백(low density lipoprotein, LDL) 콜레스테롤은 유의하게 증가하였다. 그러나 VGLE 또는 VGLR을 투여한 실험군에서는 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 유의하게 감소되었다. 특히 VGLR을 투여한 실험군의 혈청 중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 Normal군과 유사하였다. 이러한 결과는 VGLE 또는 VGLR의 혈행개선 관련 지표와 일치하였다.

요 약

본 연구에서 사용한 남향(*Vitis rotundifolia*)은 중국에 주로 분포하는 야생종으로 현재 개량하여 재배하고 있는 포도 품종이나, 그 기능에 대해서는 아직까지 알려지지 않았다. 그러므로 본 연구는 남향 포도 잎 추출물(VGLE)과 본 품종 유래 지표물질인 resveratrol(VGLR)을 활용하여 AAPH로 유도된 적혈구 및 혈장의 산화적 손상에 대한 항산화 효과와

FeCl₃로 유도된 경동맥 혈전 모델에서 혈행개선과 혈청학적 변화에 대한 효과를 조사하였다. 그 결과 VGLE 및 VGLR은 적혈구 및 혈장의 산화적 손상과 혈전을 억제함으로써 혈행을 개선할 수 있는 효과가 있었다. 특히 VGLR은 혈청학적으로 혈전모델에서 Normal군과 유사한 혈청학적 개선 효과를 보였다. 이러한 결과는 VGLE 및 VGLR은 항산화제로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 혈행장애로 유발될 수 있는 심혈관계 및 뇌혈관계질환을 예방하거나 개선할 수 있는 물질이라는 것을 제시해주었다. 이와 관련된 VGLE 및 VGLR의 기능성에 대해서는 앞으로 분자생물학적 수준에서 더 연구해야 할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 산학연공동기술개발사업(C0021959)으로 중소기업청의 지원을 받아 수행되었다.

REFERENCES

1. Tanaka H, Dinverno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR. 2000. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* 102: 1270-1275.
2. Wiseman H. 1996. Dietary influences on membrane function: Impotent in protection against oxidative damage and disease. *Nutr Biochem* 7: 2-6.
3. Bouayed J, Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3: 228-237.
4. Kawashima S. 1969. The possible role of lipoperoxide in aging. *Nagoya J Med Sci* 32: 303-326.
5. Decker EA, Crum AD, Calvert JT. 1992. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J Agric Food Chem* 40: 756-759.
6. Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
7. Sadrzadeh SM, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW. 1984. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J Biol Chem* 259: 14354-14356.
8. Clemens MR, Ruess M, Bursa Z, Waller HD. 1987. The relationship between lipid composition of red blood cells and their susceptibility to lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun* 3: 265-271.
9. Kang HJ, Mok JY, Cho JK, Jeon IH, Kim HS, Park JM,

- Jeong SI, Shim JS, Jang SI. 2012. Protective effects of leaf and flower extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* on oxidative damage in normal human erythrocytes and plasma. *Kor J Pharmacogn* 43: 66-71.
10. Xiromeritis K, Dalainas I, Stamatakos M, Katsikas V, Martinakis V, Stamatelopoulos K, Psarros V. 2012. Acute carotid stent thrombosis after carotid artery stenting. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16: 355-362.
 11. Marques MA, Murad FF, Ristow AV, Silveira PR, Pinto JE, Gress MH, Massière B, Cury JM, Vescovi A. 2010. Acute carotid occlusion and stroke due to antiphospholipid antibody syndrome: case report and literature review. *Int Angiol* 29: 380-384.
 12. Xu W, Wang TY, Becker RC. 2011. Hematologic diseases: from within the heart. *Rev Esp Cardiol* 64: 606-613.
 13. Warner TD, Nylander S, Whatling C. 2011. 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.
 14. Williams MJ, Sutherland WH, McCormick MP, Yeoman DJ, de Jong SA. 2005. Aged garlic extract improves endothelial function in men with coronary artery disease. *Phytother Res* 19: 314-319.
 15. Lee JJ, Yang H, Yoo YM, Hong SS, Lee D, Lee HJ, Lee HJ, Myung CS, Choi KC, Jeung EB. 2012. Morusinol extracted from *Morus alba* inhibits arterial thrombosis and modulates platelet activation for the treatment of cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb* 19: 516-522.
 16. Li CL, Cao YL, He YH, Gu J, Zhang Z, Zhou MD. 1996. Collecting wild *Vitis* in China. *Plant Genetic Resources Newsletter* 106: 41-42.
 17. God JM, Tate P, Larcom LL. 2007. Anticancer effects of four varieties of muscadine grape. *J Med Food* 10: 54-59.
 18. Renaud S, de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523-1526.
 19. Formica JV, Regelson W. 1995. Review of biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33: 1061-1080.
 20. Hseu YC, Chang WC, Hseu YT, Lee CY, Yech YJ, Chen PC, Chen JY, Yang HL. 2002. Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sci* 71: 469-482.
 21. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
 22. Lockyer S, Kambayashi J. 1999. Demonstration of flow and platelet dependency in a ferric chloride-induced model of thrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 718-725.
 23. Wang X, Cheng Q, Xu L, Feuerstein GZ, Hsu MY, Smith PL, Seiffert DA, Schumacher WA, Ogletree ML, Gailani D. 2005. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost* 3: 695-702.
 24. Chu LM, Robich MP, Lassaletta AD, Feng J, Laham RJ, Burgess T, Clements RT, Sellke FW. 2011. Resveratrol supplementation abrogates pro-arteriogenic effects of intramyocardial vascular endothelial growth factor in a hypercholesterolemic swine model of chronic ischemia. *Surgery* 150: 390-399.
 25. Kennedy DO, Wightman EL, Reay JL, Lietz G, Okello EJ, Wilde A, Haskell CF. 2010. Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Am J Clin Nutr* 91: 1590-1597.
 26. Mancini M, Rubba P. 2000. Ischemic cardiopathy: risk factors and their biological role. *Ital Heart J* 2: 17-22.