



Original Article / 원저

심근 경색 유발 심부전 모델에서 강리 추출물의 심장 보호 가능성

장윤재^{1,2,3}, 김혜음^{1,2}, 윤정주^{1,2}, 한병혁^{1,2}, 유제국³, 조남근³, 이호섭^{1,2,3}, 강대길^{1,2,3*}

¹원광대학교 한방심신증후군연구센터

²원광대학교 한의과대학 생리학교실,

³원광대학교 한의학전문대학원

Cardioprotective Potential of *Gracilaria Verrucosa* Extract in Myocardial Infarction-Induced Heart Failure Model

Youn Jae Jang^{1,2,3}, Hye Yoom Kim^{1,2}, Jung Joo Yoon^{1,2}, Byung Hyuk Han^{1,2}, Je Kuk Yu³,
Nam Geun Cho³, Ho Sub Lee^{1,2,3}, Dae Gill Kang^{1,2,3*}

¹Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University,

²Department of Physiology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

³Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT

Gracilaria Verrucosa (GV), a seaweed used in traditional Korean medicine, was studied for its effects on MI-induced heart failure in rats. MI is caused by a blocked coronary artery, leading to severe cardiac dysfunction. The study used a rat model to assess cardiac changes over time and evaluate the impact of GV on heart failure. Ischemia was induced through LAD ligation surgery, and the extent of ischemic area was measured as a prognostic factor. GV extract administration significantly improved cardiac morphology and reduced cardiac weight compared to the MI group. GV treatment also improved cardiac function, as evidenced by positive effects on chamber dilation during MI-induced heart failure. Parameters such as ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were measured. The MI group showed decreased EF and FS compared to the sham group, while these parameters improved in the GV group. GV treatment also reduced levels of LDH, CPK, and CK-MB in the serum, indicating reduced myocardial damage. Histological analysis revealed that GV treatment attenuated cardiac hypertrophy and fibrosis, with reduced collagen deposition in the myocardium. Immunohistochemistry analysis showed suppressed expression of TGF-β1 and

© 2023 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

collagen 1, involved in fibrosis. In conclusion, GV showed potential in improving cardiac function in a rat model of MI-induced heart failure. It alleviated myocardial damage, attenuated cardiac hypertrophy and fibrosis, and suppressed fibrotic markers. Further studies are needed to explore its clinical efficacy and underlying mechanisms in cardiac diseases beyond animal models.

Key words : *Gracilaria Verrucosa*, myocardial infarction, heart failure, cardiac function, cardiac fibrosis.

I. 서론

허혈성 심장 질환의 주요 원인인 심근경색(Myocardial Infarction, M/I)은 관상 동맥 중 하나가 막혀 심장 마비가 발생할 때 발생한다. 이러한 사건은 심장 기능의 심각한 중단을 유발하여 궁극적으로 심장 기능 감소 및 잠재적으로 치명적인 결과를 초래한다^{1,2)}. 심근경색은 또한 비정상적인 심장 리듬의 발달과 관련이 있으며 종종 불리한 심장 리모델링 및 기능 장애로 이어져 심부전(heart failure)으로 이어진다³⁾

심근경색 동물 모델은 장기간에 걸쳐 발생하는 진행성 심근 변화를 연구하기 위해 일반적으로 사용된다⁴⁾. 쥐에서 관상 동맥 결찰을 유도함으로써 우리는 인간 허혈성 심장 질환에서 관찰되는 병태생리학적 변화를 밀접하게 복제할 수 있다⁵⁾. 허혈을 유도하기 위해 사용되는 다양한 수술 방법 중 좌전하행동맥(left anterior descending artery, LAD) 결찰술이 가장 많이 시행되는 기법이다^{6,7)}. 심근경색 동물 모델에서 경색 부위의 범위는 심부전과 좌심실(left ventricle, LV) 리모델링 후 합병증에 대한 예후 인자로 작용할 수 있다. 더욱이, 심근경색으로 인한 심부전은 수축기 메커니즘 내의 비정상적인 신호로 인한 좌심실 수축기 말기(left ventricular end-systolic, LVSD) 수축기 기능 장애를 특징으로 한다⁸⁾. 이러한 손상된 수축성은 불완전한 심실 출력으로 인해 박출량(stroke volume, SV)의 감소로 이어지며 결과적으로 증가된 좌심실 확장기말 용적 및 압력(left ventricular end-diastolic volume and pressure, LVEDP)이 발생한다⁹⁾. 이에 따라 박출률(ejection fraction, EF) 및 구획단축률(fractional shortening, FS)의 실질적인 감소가 나타나며, 심근경색에 대한 반응으로 심장 기능 저하를 나타내는 압력 발달의 최대 피크 속도도 감소한다^{10,11)}. 경색 후 심실 확장과 직접적으로 관련된 심실 리

모델링은 좌심실 기능에 중대한 영향을 미치며 장기 생존 결과에도 영향을 미칠 수 있다¹²⁾. TGF- β 는 세포 성장 및 분화, 세포 사멸 및 세포외 기질 생산과 같은 다양한 생리학적 과정에 관여하는 성장 인자 중 하나이다¹³⁾. 특히 TGF- β 는 손상된 조직이나 염증의 치유와 재생 과정에서 중요한 역할을 한다¹⁴⁾. 심근경색 동물 모델에는 심장 근육으로의 혈액 공급이 갑자기 차단되어 심근 세포가 손상되는 질병이다¹⁵⁾. 이 경우 손상된 부위에서 TGF- β 의 분비가 증가한다. TGF- β 는 심근 세포 사멸 및 생존, 심근 조직 재생 및 다른 과정에서 중요한 역할을 합니다¹⁶⁾. 그러나 TGF- β 의 과도한 활성화는 심근 섬유증, 심근 세포 사멸 및 심근 조직 경화증을 유발하여 심장 기능 저하를 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

한의학에서는 강리(江籬, *Gracilaria Verrucosa*)라고도 알려진 용수채(龍鬚菜)는 한의학에서 사용되는 해조류로 본초강목(本草綱目)에 기록되어 있다¹⁸⁾. 강리는 맛이 달며 독이 없고 소변 배출을 촉진시키며 내장의 열을 제거하는 성질을 가지고 있다고 기록되어 있다^{19,20)}. 강리는 전 세계에서 분포하고 있으며, 불포화지방산인 eicosapentaenoic acid 및 arachidonic acid 등이 풍부하며 항산화, 항염증, 항산화 미백효과 등의 생리활성에 대한 보고가 되어 있다²¹⁻²⁶⁾. 그러나 강리의 심장 보호 효과에 대한 정확한 메커니즘은 아직 파악하기 어렵다. 이러한 지식 격차를 해결하기 위해 본 연구는 심근경색 유발 심부전에 대한 강리의 영향을 조사하기 위해 설계되었다.

II. 재료 및 방법

1. 강리 추출물 시료 추출

강리(*Gracilaria Verrucosa*)를 물에 불린 후 100 g을

*Corresponding author: Dae Gill Kang, Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, Republic of Korea
Tel : +82-63-850-6933, E-mail : dgkang@wku.ac.kr

•Received : July 11, 2023 / Revised : August 1, 2023 / Accepted : August 18, 2023



취하여 6 L의 증류수와 함께 2시간 동안 끓였다. 용액을 4°C에서 10분 동안 3,000 rpm으로 원심 분리하여 상등액을 얻을 수 있었다. 상등액은 회전 진공 증발기(N-11, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였으며 동결건조기(FD-8508, ILSHIN, Korea)를 이용하여 분말로 제조되었다(추출 수율: 40.8%). 건조된 강리 추출물(GV) 분말은 사용할 때까지 4°C로 보관되었다. 생체 내 실험을 위해 이 분말을 적절한 용량으로 증류수에 용해한 후 사용하였다.

2. 심근경색 유발 심부전 동물모델

수컷 Sprague-Dawley 쥐(Koatech, Pyeongtaek, Korea)를 대상으로 1주일 적응 후 실험을 진행하였다. 쥐는 증류수에 자유롭게 접근할 수 있는 정상적인 설치류 먹이를 공급받았고 규칙적인 명/암 일정(명12시간/암12시간)으로 일정한 온도 및 상대 습도 조건 하에 수용되었다. 심근경색 유도는 체중이 200-250g인 약 7주령의 쥐에서 수행되었다. 동물을 4% 이소플루란으로 마취하고, 삽관하고, 일회 호흡량 1~2 mL/100 g으로 분당 80-90 사이클의 속도로 기계 환기(Harvard Apparatus, Small Animal Ventilator, MA, USA)했습니다. 그 후 흉곽 위의 피부를 사선으로 절개하고 근육을 절개한 후 5번째 갈비뼈 사이에 개흉술을 시행하였다. 심근경색 모델(M/I)은 2호 봉합사를 사용하여 좌전하행동맥(left anterior descending, LAD)의 결찰로 유도했다. sham군은 LAD 결찰 없이 동일한 절차를 거쳤다. 수술 후, 회복을 위해 동물을 매일 모니터링 하였으며, 약물은 수술 다음날부터 8주 동안 동물에게 경구 투여되었고 Sham 그룹은 증류수만 투여 받았다. 그룹은 다음과 같이 구성되었다 (Fig. 1): (1) sham군; (2) M/I + 증류수 투여군; (3) M/I + DIL (증류수에 용해된 diltiazem 35 mg/kg/day, 양성대조군); (4) M/I + GV (증류수에 용해된 강리 추출물 200mg/kg/day). 본 연구에서 양성대조군으로 사용된 Diltiazem은 심혈관 질환의 치료에 사용되는 칼슘 채널 차단제이며 혈관 확장 및 산소 공급 개선 효과를 통해 심근 손상 완화와 심장 기능 개선을 기대할 수 있다. 또한, 협심성 동맥 경련 완화에 의한 혈류 개선도 심근 경색 모델에서 유용하게 작용할 수 있다²³. 이러한 이유로 Diltiazem을 양성대조군으로 선택하게 되었다. 모든 실험동물은 원광대학교의 기관동물 관리 및 사용 위원회(WKU22-51)의 승인을 받았다.

3. 심 초음파를 통한 심장 기능 평가

심장초음파는 LAD 폐색전 재관류 8주 후에 수행했다. 초음파 장치는 1-4 MHz의 주파수 범위를 가진 프루브를 이용하여 심장 구조 및 기능을 평가되었다 (VINNO6, Vinno Corporation, China). 동물을 산소와 혼합된 4% 이소플루란 (Isoflurane, HANA Pharm Co., Korea)으로 마취시켰으며, 심초음파 시행동안 이소플루란 농도를 1L/min의 유속으로 1.5%로 감소시켜 마취상태를 유지시켰다. 심장의 운동 기능을 평가하고 심장 질환의 진단과 추적에 도움을 받고자 수축기능의 두가지 매개변수인 심박출계수 (ejection fraction, EF)와 구획단축률 (fractional shortening, FS)을 측정했다.

4. 심장 손상 바이오마커 평가

실험동물을 희생시켜 얻은 혈액은 1 mg/ml 에틸렌디아민테트라 아세트산 (ethylenediamine tetra acetic acid, EDTA) 튜브에 수집되었다. 수집한 혈액은 3000 rpm, 15분, 4°C에서 원심 분리하여 혈청만 분리하였다. 젖산탈수소효소 (Lactate dehydrogenase, LDH), 크레아틴 인산 분해효소(Creatine Phosphokinase, CPK), 및 CK동질효소 (creatin kinase MB Isoenzyme, CK-MB)의 혈청 농도는 자동 임상 화학 분석기(FUJI DRI-CHEM NX700, FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정되었다.

5. 조직학적 분석

심장을 광학 현미경적 검사를 위해 10% 중성 포르말린 용액으로 고정한 후 절단했다. 이후 일반적인 방법에 따라 수세 및 파라핀 포매 과정을 거쳐 5 μM 간격의 연속 절편을 만들었고, 이를 슬라이드에 부착하였다. 조직 병리학적 비교를 위해 H&E (Hematoxylin and Eosin staining) 및 Picrosirius Red Stain Kit(Picrosirius Red stain, Polysciences, USA) 염색을 사용하여 슬라이드를 분석했다. 면역조직화학 (Immunohistochemistry, IHC) 염색은 심장 조직 슬라이드를 마우스 및 토끼 특이적 HRP/DAB (ABC) 검출 IHC kit (ab6464, Abcam, Cambridge, Cambs, UK)로 면역 염색하였다. TGF-β 및 콜라겐 I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 1차 항체 1:1000농도로 4°C에서 밤새 배양하였다. 배양한 슬라이드는 실온에서 1시간 동안 비오틴화된 이차 항체로 제조업체 프로토콜에 따라 수행되었다. 슬라이드를 마지막으로 자일렌으로 세척하고

덜게유리로 밀봉했습니다. 염색된 슬라이드를 광학 현미경 (EVOSTM M5000, Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA, USA)을 사용하여 시각화했다. 발현량을 정량화 하기위해 이미지J (무료 이미지 처리 소프트웨어)를 이용해 프로그램의 프로토콜을 따라 수행되었다.

6. 통계 분석

통계적 분석은 다중 비교를 위해 t-test를 사용하여 수행되었으며 $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 측정 데이터는 Student's post-test와 함께 Student's t-test 반복 측정을 사용하여 분석되었다.

III. 결과

1. 심장 형태 및 무게 개선 효과

심근경색 유발 심부전 쥐 모델에서 강리 추출물의 심장 형태에 미치는 효과를 조사하기 위해, 심장 비대에 대한 강리 추출물 투여 후 실험동물의 심장 무게를 측정하였다. 이를 몸무게로 나눈 결과, M/I 군은 sham군과 비교했을 때 유의하게 증가한 반면, DIL과 GV 군은 유의하게 감소하여 개선효과가 있는 것으로 확인되었다. 이 결과로부터 강리 추출물이 심장 비대를 개선하는 효과를 가지고 있음을 알 수 있다 (Fig. 2).

2. 심장 기능 장애 개선 효과

심장 기능 매개변수를 평가하기 위해 다용도 영상 양식인 심초음파를 사용했다. M/I로 유발된 쥐 심장의 심초음파 M-모드 이미지를 분석한 결과, GV 군에서는 M/I로 유발된 심부전 동안 넓어지는 챔버의 내경을 개선하는 유의한 효과를 확인할 수 있었다. M/I로 유발된 쥐는 sham 그룹에 비해 심박출계수 (EF)와 구획단축률 (FS)에서 상당한 감소를 보였다. 이러한 결과는 GV가 심근 경색 후 심장 리모델링 및 기능 장애를 개선하는 효과를 나타냈다 (Fig. 3).

3. 혈액학적 분석에 대한 개선 효과

혈액학적 및 혈청 생화학적 분석은 M/I로 인해 발생하는 심부전을 평가하는 데 중요한 정보를 제공한다. M/I 모델에서는 혈청 내에서 LDH, CPK 및 CK-MB의 수치가 증가하는 경향이 있다. 우리의 연구 결과에서는 M/I 군에서 LDH, CPK 및 CK-MB 수준이 sham군에 비해 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

그러나 GV군에서는 수준이 크게 감소한 것으로 나타났다. 이로써 GV 투여가 M/I로 인해 유발된 심부전 개선에 효과적임을 입증했다 (Fig. 4).

4. 심장 비대 개선 효과

H&E 염색을 사용하여 심근의 심비대 개선 정도를 분석했다. H&E 염색은 세포와 조직 구조를 시각화하기 위해 일반적으로 사용되는 조직학적 염색 기법이다. 헤마톡실린은 세포의 핵을 청자색으로 염색하고, 에오신은 세포질과 세포 외 성분을 분홍색으로 염색한다. 실험 결과, H&E 염색을 통해 M/I 군에서 심근세포의 심비대가 관찰되었으며, 이는 심장 비대의 증가를 나타냈다. 그러나 GV군에서는 이러한 심비대 현상이 개선되는 것으로 확인되었다. 분석 결과, GV이 심장 비대를 개선시키는 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

5. 심장 섬유증 개선 효과

M/I 유발 쥐의 좌심실 조직에서 콜라겐 침착을 검출하고 정량화하기 위해 조직학적 분석을 수행했다. 콜라겐 섬유 양과 섬유화 정도를 측정하기 위해 picrosirius red staining (콜라겐 섬유에 대한 적색 염색)을 사용했다. 분석 결과, M/I 그룹에서는 좌심실 내 콜라겐 침착이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 GV 그룹 및 DIL 그룹에서는 적색 염색이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 GV가 심장 섬유증을 개선하는 효과가 있음을 시사한다 (Fig. 6).

또한, IHC를 사용하여 TGF- β 1 및 콜라겐 1의 발현 정도를 조사했다. IHC 분석 결과, M/I 그룹에서는 TGF- β 1 및 콜라겐 1의 양이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 반면, GV 그룹에서는 TGF- β 1 및 콜라겐 1의 수준이 감소한 것으로 나타났다(Fig. 7, 8). 이러한 결과는 GV 투여가 TGF- β 1 및 콜라겐 1의 과도한 발현을 억제하고 심장 섬유증을 개선하는 데 기여할 수 있음을 시사한다.

IV. 고찰

심근경색은 심혈관 손상과 밀접한 관련이 있으며, 심부전을 동반한 심근경색은 심혈관 관련 사망률과 중요한 위험 요소로 작용한다²⁷⁾. 심부전은 심장 구조와 기능에 변화를 일으킬 수 있는데, 이는 좌심실비대, 심장



기능 장애, 심부전 등을 포함하며 심부전을 동반한 심근경색은 심장의 구조적 및 기능적 변화와 관련이 있다²⁸⁾. 이 연구의 목적은 GV가 심근경색으로 인한 심부전이 있는 쥐의 심장 기능 장애를 개선할 수 있는지 여부를 평가하는 것이었다. 따라서, 본 연구는 심근경색과 심부전을 동반한 동물 모델을 사용하여 GV가 심부전의 개선에 어떤 영향을 미치는지 조사하고, 이를 통해 혈압 강하 효과와 심장 구조 및 기능 개선에 대한 잠재력을 평가하고자 했다.

본 연구에서는 GV의 심부전 개선 효과를 평가하기 위해 심근경색 동물 모델을 쥐를 대상으로 활용하였다. 이를 위해 쥐의 LAD 동맥에 외과적 결찰을 수행하여 심근경색을 유도했다²⁸⁾. 이 모델은 이미 60년 이상의 역사를 가지고 기술적인 개선을 제외하고는 크게 변화하지 않고 사용되어 왔으며 심혈관 질환 및 심근의 생리학적 및 병리학적 변화를 연구하는 데 사용되어 왔다²⁹⁻³¹⁾. 이 모델은 심근경색에 따른 심근 손상, 심근 조직의 염증 및 변성, 혈류 장애 등을 조사하고 심근경색 관련 치료법을 개발하기 위한 연구에 이용되어³²⁾ 왔기에 우리 연구에서 GV의 심장 기능 개선 효능을 평가하고자 활용하고자 했다. LAD 결찰을 통한 심근경색 유도 후 심부전 발생을 확인하기 위해 8주가 경과한 시점에서 다양한 매개변수를 평가했다³³⁾. 이 중에는 심장 기능 장애와 관련된 것을 대상으로 평가했다³⁴⁾. 이전 연구와의 비교 결과, 심부전 유도를 위한 수술을 통해 심장중량, 심장중량/체중비와 같은 매개변수의 상당한 증가가 확인됐다. 이는 수술을 통해 성공적으로 심부전을 유도하였음을 나타냈다. 또한, 심초음파 분석을 활용하여 심장 기능 및 리모델링을 종합적으로 평가했다^{35,36)}. 심초음파 분석을 진행한 결과 sham군에 비해 M/I 군에서 EF와 FS이 유의하게 감소였다. 그러나 GV 치료는 감소된 EF를 상당히 약화시키는 것으로 밝혀졌다. 또한, M/I 군의 FS는 sham군에 비해 크게 감소한 것으로 나타났다. 하지만, GV 추출물 치료에서는 크게 증가했다. GV로 치료한 경우, 심부전 매개변수가 개선되어 심근경색 이후에 발생하는 심장 리모델링 및 기능 장애가 개선되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 GV 추출물의 치료 효과가 심장 기능과 리모델링에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. GV 추출물의 사용은 심근경색으로 인한 심장 손상을 개선하고 심장 기능을 회복하는 데에 도움을 줄 수 있는 잠재적인 임상적 전망을 제시한다.

심근경색으로 인한 심근 손상은 주로 심근 효소인 LDH, CPK 및 CK-MB와 같은 효소들이 혈류를 통해 방출되어 심근 손상 정도를 반영, 혈액학적으로 분석이 가능하다^{37,38)}. 이러한 효소들은 심근세포 손상으로 인해 증가하며, 심근경색 후에는 특히 높은 수준에서 검출된다. GV를 이용한 치료는 LDH, CPK 및 CK-MB의 수준을 상당히 억제하여 심근경색 유발 심근 손상에 대한 GV의 잠재적 보호 효과를 나타냈다. 이는 GV가 심근 손상을 억제하고, 심근세포의 보호를 도모하는 잠재적인 기작을 가지고 있을 수 있음을 시사한다.

콜라겐 침착 및 섬유화는 심근경색 후 심근 리모델링 과정에서 중요한 역할을 수행한다. 심근경색은 심근 손상을 유발하고, 이로 인해 염증 반응과 조직 손상이 시작된다. 이후 조직 손상부에는 세포의 손실 및 염증 반응에 의해 콜라겐이 침착되고 섬유화 과정이 진행된다. 이는 심근 리모델링의 핵심 과정 중 하나로 알려져 있다^{39,40)}. TGF- β 는 세포의 성장 및 분화에 영향을 주는 다기능성 성장 인자로 알려져 있다. TGF- β 는 심장 조직에서도 중요한 역할을 수행하며, 심근경색 후 심근 리모델링 과정에서 콜라겐 침착과 섬유화를 조절하는데 관여한다. 이 과정에서 TGF- β 는 콜라겐 합성을 촉진하고 섬유화 과정을 유도하는 신호를 전달한다⁴¹⁾. 심근경색 후 심근 리모델링에서 주요한 콜라겐 유형은 collagen-1이다. collagen-1은 심장 조직의 구성 요소로 작용하며, 심근 리모델링 과정에서 증가하는 경향을 보인다. GV가 심장 조직의 섬유화에 미치는 영향을 알아보기 위해 picrosirius red와 IHC 염색을 시행하였다. 그 결과 심근섬유증은 M/I 군에서 증가하였으나 GV군의 치료에 의해 현저하게 감소하였다. collagen-1 및 TGF- β 와 같은 섬유증 마커의 단백질 발현은 M/I 군에서 증가했지만, 이 단백질 발현은 두 GV군에서 감소했다. 이러한 결과는 GV 치료가 심근경색에 의해 유발된 심장 섬유증을 예방한다는 것을 시사한다. 이에 따라 심부전 개선을 위한 치료 전략은 심장 조직의 섬유화를 억제하고 심실 확장을 제한하는 것이 중요하다. 이러한 결과는 GV가 심근경색 유발 심근 손상을 억제하고, 심부전으로 인한 심장 부정맥을 개선하는 잠재적인 효과를 가질 수 있음을 시사한다. 이는 GV가 심근경색 및 심부전 관련 합병증을 개선하는 잠재적인 치료제로서의 역할을 탐구함에 있어 중요한 통찰을 제공할 수 있다.

요약하자면, 한국의 의학 문헌에 기록된 전통 한약제

제인 GV는 심부전이 동반된 심근경색 쥐 모델에서 심장 기능 장애를 개선하는 잠재력을 보여줬다. 이 연구는 동물 모델을 사용하여 확립된 방법으로 심장 기능을 종합적으로 평가하였으며, 강리추출물의 심장 질환 개선 효과를 유망하게 나타냈다. 반적으로, 이러한 연구 결과는 심근경색 및 심부전의 맥락에서 GV의 치료 효과에 대한 귀중한 통찰력을 제공한다. 그러나 동물 모델을 사용한 연구에는 일부 한계가 있다. 동물 모델은 인간 심장 질환을 완벽히 대표하지는 않으며, 심장 리모델링과 관련된 기전을 완전히 이해하기에도 한계가 있다. 따라서, 심장 질환 치료를 위한 GV의 임상적 효과와 분자 기전을 더 자세히 규명위해 추가 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

결론적으로 GV는 심부전을 동반한 심근경색 쥐 모델에서 심장 기능 장애를 개선하는 잠재력을 보였다. 이 연구 결과는 GV가 심근경색 및 심부전 관련 합병증을 개선하는 잠재적인 치료제로서의 역할을 탐구함에 있어 중요한 통찰을 제공한다. 심근경색 후 심근 리모델링에서 콜라겐 침착과 섬유화의 억제를 통해 심장 기능을 개선할 수 있는 잠재력을 보여주었고, 심근 손상을 억제하고 심근세포의 보호를 도모하는 잠재적인 기작을 가질 수 있음을 시사한다. 또한, GV는 심부전으로 인한 심장 부정맥을 개선하고 심장 리모델링을 억제하는 효과를 나타내었다. 이러한 연구 결과는 GV의 임상적 활용 가능성을 탐구하기 위한 추가 연구를 촉진할 것이다. 그러나 동물 모델을 사용한 연구에는 한계가 있으므로, 심장 질환 치료를 위한 GV의 임상적 효과와 분자 기전을 더 자세히 규명하기 위해 추가 연구가 필요하다.

감사의 글

본 논문의 연구는 원광대학교 (2023)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SAR, Zornoff AML. Heart Failure after Myocardial

Infarction: Clinical Implications and Treatment. *Clin Cardiol.* 2011;34:410-414.
2. Velagaleti R, Vasani RS. Heart Failure in the 21st Century: Is it a Coronary Artery Disease Problem or Hypertension Problem? *Cardiol Clin.* 2007;25:487-495.
3. Schirone L, Forte M, Palmerio S, Yee D, Nocella C, Angelini F, et al. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3920195.
4. Martin GS, John S, Norman S. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation.* 2000;101(25):2981-2988.
5. Ilayaraja M, Marleen L, Frank J, Bart DG. Permanent Ligation of the Left Anterior Descending Coronary Artery in Mice: A Model of Post-myocardial Infarction Remodeling and Heart Failure. *J Vis Exp.* 2014;(94):52206.
6. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial Ischemia and Reperfusion: A Murine Model. *Am J Physiol.* 1995;269(6 Pt 2):H2147-H2154.
7. Feng Y, Hemmeryckx B, Frederix L, Lox M, Wu J, Heggermont W, et al. Monitoring Reperfused Myocardial Infarction with Delayed Left Ventricular Systolic Dysfunction in Rabbits by Longitudinal Imaging. *Imaging Med Surg.* 2018;8:754-769.
8. Gheorghiad M, Fonarow GC. Management of Post-Myocardial Infarction Patients with Left Ventricular Systolic Dysfunction. *Am J Med.* 2007;120:109-120.
9. Brienesse SC, Davies AJ, Khan A, Boyle AJ. Prognostic Value of LVEDP in Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2018;11:33-35.
10. Sjöblom J, Muhrbeck J, Witt N, Alam M, Frykman-Kull V. Evolution of Left Ventricular Ejection Fraction After Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2014;130:743-748.
11. Ishikawa K, Chemaly RE, Tilemann L, Fish K,



- Ladage D, Aguero J, et al. Assessing Left Ventricular Systolic Dysfunction After Myocardial Infarction: Are Ejection Fraction and dP/dtmax Complementary or Redundant? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H1423-H1428.
12. French BA, Kramer MC. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. *Today Dis Mech.* 2007;4:185-196.
 13. de Jong S, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Monitoring cardiac fibrosis: a technical challenge. *Neth Heart J.* 2012, 20(1):44-8.
 14. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology.* 2006, 118(1):10-24.
 15. Hata A, Chen YG. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016, 8(9):a022061.
 16. Buwaneka P, Ralko A, Gorai S, Pham H, Cho W. Phosphoinositide-binding activity of Smad2 is essential for its function in TGF- β signaling. *J Biol Chem.* 2021, 297(5):101303.
 17. Goumans MJ, Ten Dijke P. TGF- β Signaling in Control of Cardiovascular Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018, 10(2):a022210.
 18. Jeon US, Jeong JG. A Herbological Study on the Phaeophyta Growing in the Korean Coastal Waters. *Kor J Herbol.* 2021 ; 36(4) : 9-22.
 19. Ryu DH, Roh SS. A Systematic Review of Clinical Researches of Korean Medicine for Alopecia. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 2017;30(2):1-18.
 20. Park EK, Kim HW, Ji YH, Park SH. Moisturizing and Skin Improvement Effect of Polysaccharides from *Gracilariaopsis* sp. *J Mar Biosci Biotechnol.* 2017:58-64.
 21. Choi MH, Kim YW, Kim MS, Shin HJ. Development of Cosmetic Emulsion Using Blueberry Fruit Extract and Agarose from *Gracilaria verrucosa*. *KSBB J.* 2016; 31(4):256-262.
 22. Hong SM, Cho HD, Kim JH, Lee JH, Song WS, Lee ST, Lee MK, Seo KI. Anti-proliferative Effects of Acid Extract of *Gracilaria Verrucosa* on Primary Human Prostate Cancer Cells. *J Life Sci.* 2016;26(10):1130-1136.
 23. Dang HT, Lee HJ, Yoo ES, Shinde PB, Lee YB, Hong JK, Kim DH, Jung JH. Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J Nat Prod.* 2008;72:232-240.
 24. Imbs AB, Bologodskaya AA, Nevshupova NV, Kho-timchenko SV, Titlyanov EA. Response of prostaglandin content in the red alga *Gracilaria verrucosa* to season and solar irradiance. *Phytochemistry.* 2001;58:1067-1072.
 25. Shin JH, Choi DJ, Lim HC, Seo JK, Lee SJ, Choi SY, Sung NJ. Nutrients and antioxidant activity of red seaweeds. *J Life Sci.* 2006;16: 400-408.
 26. JX LIU, Z YU, XZ LI, JJ FU, XH SHANG, AG YAN, Y SHI, YL MA. Cardioprotective effects of diltiazem reevaluated by a novel myocardial ischemic model in Chinese miniature swine. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(1):52-57.
 27. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2022; 145(8):e153-e639.
 28. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation.* 2005;111(21): 2837-2849.
 29. Wu Y, Yin X, Wijaya C, Huang MH, McConnell BK. Acute Myocardial Infarction in Rats. *J Vis Exp.* 2011;(48):2464.
 30. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954;140(5):675-682.
 31. Kogan ME, Belov LN, Leont'eva TA, Zolotareva AG. Modeling of myocardial pathology in mice with the surgical methods. *Kardiologiya.* 1977; 17(6):125-128.
 32. Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction

- in mice. *Cor Vasa*. 1978;20(4):308-314.
33. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-265.
 34. Kirkpatrick JN, Vannan MA, Narula J, Lang RM. Echocardiography in Heart Failure: Applications, Utility, and New Horizons. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:381-396.
 35. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, et al. Critical Appraisal of the Mouse Model of Myocardial Infarction. *Exp Physiol*. 2004;89:497-505.
 36. Shioura KM, Geenen DL, Goldspink PH. Assessment of Cardiac Function with the Pressure-Volume Conductance System Following Myocardial Infarction in Mice. *Heart Circ Physiol*. 2007;293:H2870-H2877.
 37. Bastos MB, Burkhoff D, Maly J, Daemen J, den Uil CA, et al. Invasive Left Ventricle Pressure-Volume Analysis: Overview and Practical Clinical Implications. *Eur Heart J*. 2020;41:1286-1297.
 38. Bodor GS. Biochemical Markers of Myocardial Damage. *Int EJIFCC*. 2016;27:95-111.
 39. Khalil ML, Ahmmed I, Ahmed R, Tanvir EM, Afroz R, Paul S, et al. Amelioration of Isoproterenol-Induced Oxidative Damage in Rat Myocardium by *Withania Somnifera* Leaf Extract. *Biomed Res Int*. 2015;624159.
 40. Zong J, Zhang H, Li FF, Liang K, Liu JL, Xu LH, Qian WH. NLRP1 promotes TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation in neonatal rat cardiac fibroblasts. *J Mol Histol*. 2018;49(5):509-518.
 41. McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, Bradshaw AD. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(3):544-549.
 42. Frangogiannis NG. Transforming growth factor- β in myocardial disease. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19(7):435-455.

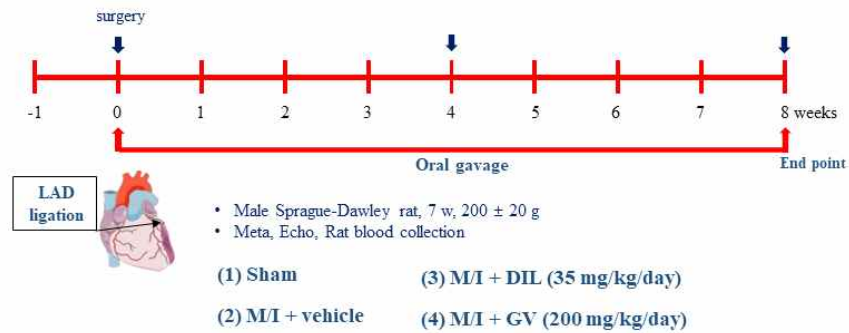


Fig. 1. Schematic diagram of a study on the cardioprotective potential of *Gracilaria Verrucosa* extract in a myocardial infarction-induced heart failure model. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*.

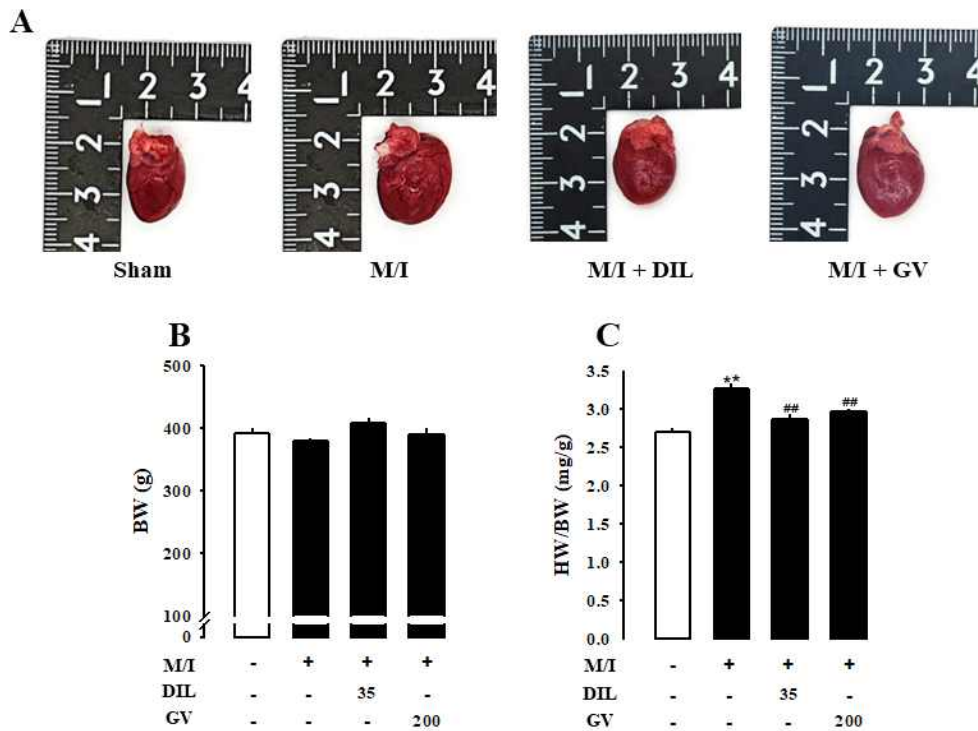


Fig. 2. Evaluation of the impact of GV on cardiac morphology in rats with MI-induced heart failure. (A) Representative gross appearance of the heart from each group of rats. (B) BW of each group and (C) Bar graphs showing the ratio of HW to BW. The graph shows the relative change in heart size with respect to body weight. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*; HW, heart weight; BW, body weight; LV, left ventricle. Data values are presented as means ± SE. **P < 0.01 vs. Sham; ##P < 0.01 vs. M/I group.

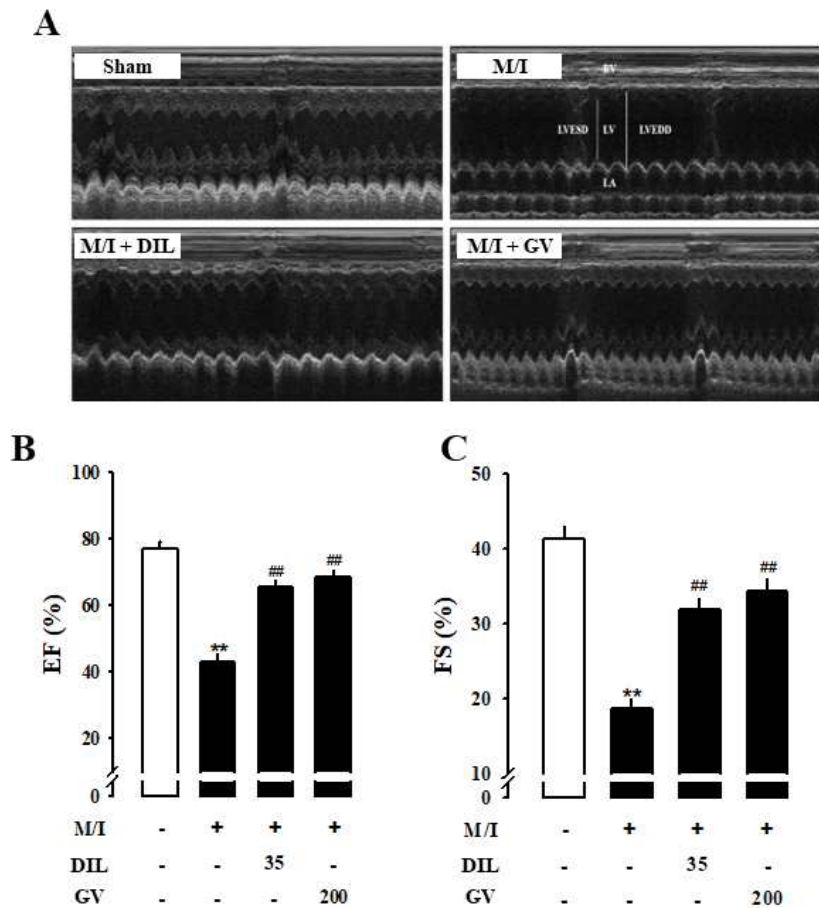


Fig. 3. Effect of GV on echocardiographic parameters in rats with MI-induced heart failure was evaluated. (A) M-mode echocardiography was performed, and representative images were obtained from each experimental group. The effects of GV on (B) EF and (C) FS were assessed. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening. Data values are presented as means \pm SE. **P < 0.01 vs. Sham; ##P < 0.01 vs. M/I group.

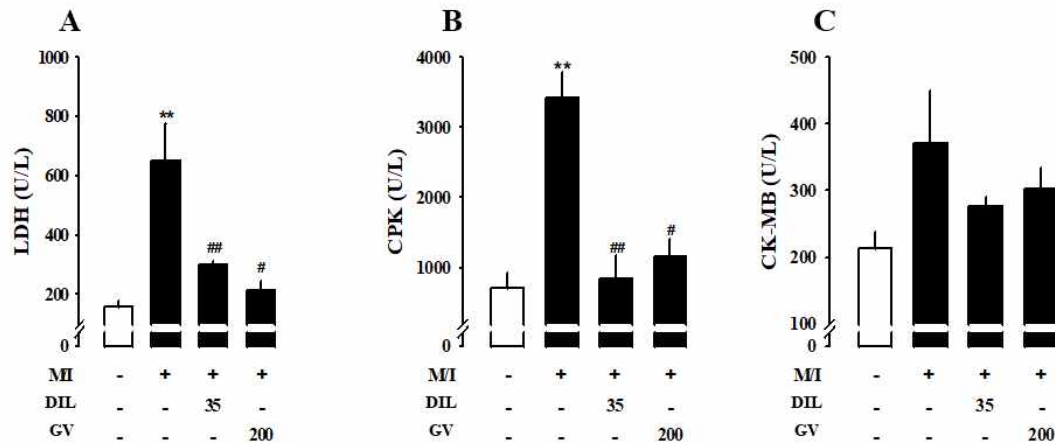


Fig. 4. Effects of GV on hematology analysis in rats with MI-induced heart failure were evaluated. Plasma analysis was performed to assess the levels of (A) LDH, (B) CPK, and (C) CK-MB, which are biomarkers used for evaluating heart failure. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*; LDH, lactate dehydrogenase; CPK, creatine phosphokinase; CK-MB, creatine kinase-MB. Data values are presented as means \pm SE. **P < 0.01 vs. Sham; #P < 0.05 and ##P < 0.01 vs. M/I group.

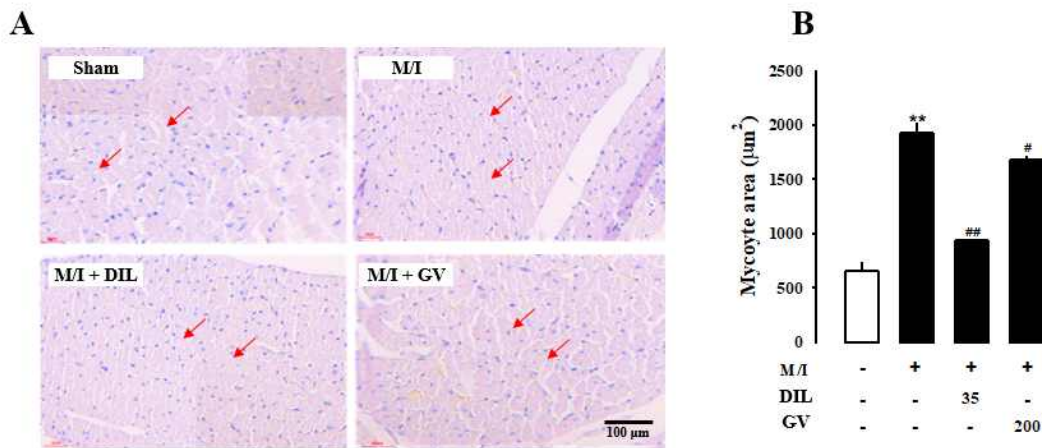


Fig. 5. Evaluation of the impact of GV on cardiac morphology in rats with MI-induced heart failure. Cardiac fibrosis analysis was performed using H&E staining of the myocardium. (A) Representative images of the stained tissues were obtained and analyzed (magnification 400x, scale bar: 100 μ m). (B) Quantitative analysis of myocyte cross-sectional areas. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*; H&E, hematoxylin & eosin. Data values are presented as means \pm SE. **P < 0.01 vs. Sham; #P < 0.05 and ##P < 0.01 vs. M/I group.

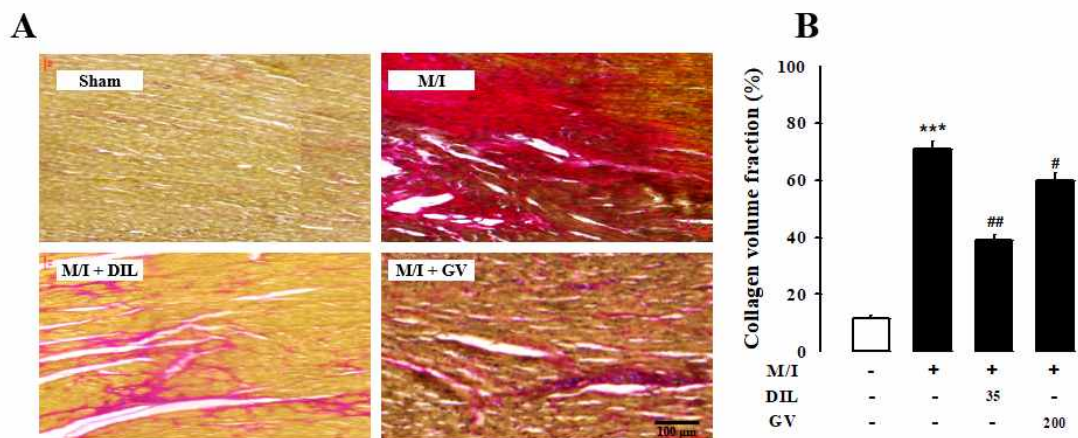


Fig. 6. Effect of GV on cardiac morphology and fibrosis in rats with MI-induced heart failure was evaluated. Cardiac fibrosis analysis was performed using picosirius red staining (collagen fibers stained red) of the myocardium. (A) Representative images of the stained tissues were obtained and analyzed (magnification 400x, scale bar: 100 μ m). (B) The extent of fibrosis in each experimental group was quantified and illustrated in the bar graph. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*. Data values are presented as means \pm SE. ***P < 0.001 vs. Sham; #P < 0.05 and ##P < 0.01 vs. M/I group.

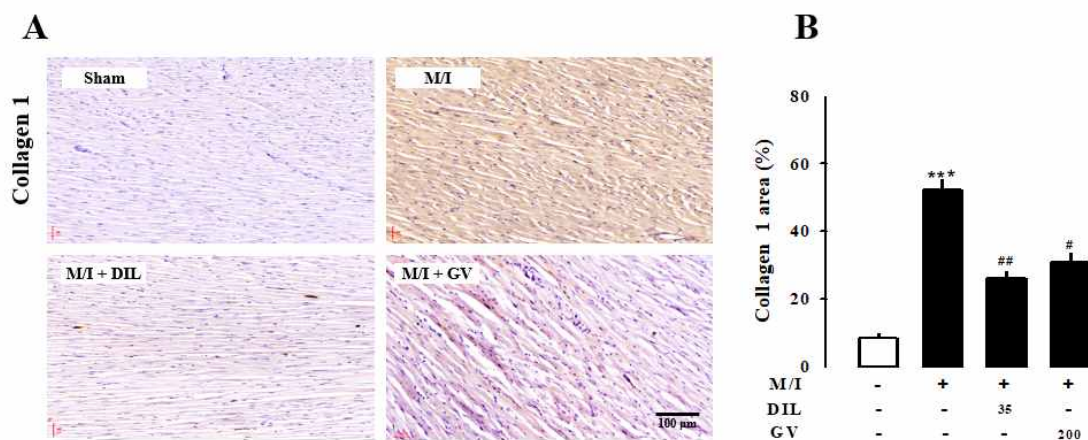


Fig. 7. Effect of GV on collagen I expression in rats with MI-Induced heart failure. (A) Pathologic morphology on collagen I deposition were assessed using IHC staining (Magnification x200, protein is specifically stained brown). (B) The extent of fibrosis in each experimental group was quantified and illustrated in the bar graph. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*. Data values are presented as means \pm SE. ***P < 0.001 vs. Sham; #P < 0.05 and ##P < 0.01 vs. M/I group.

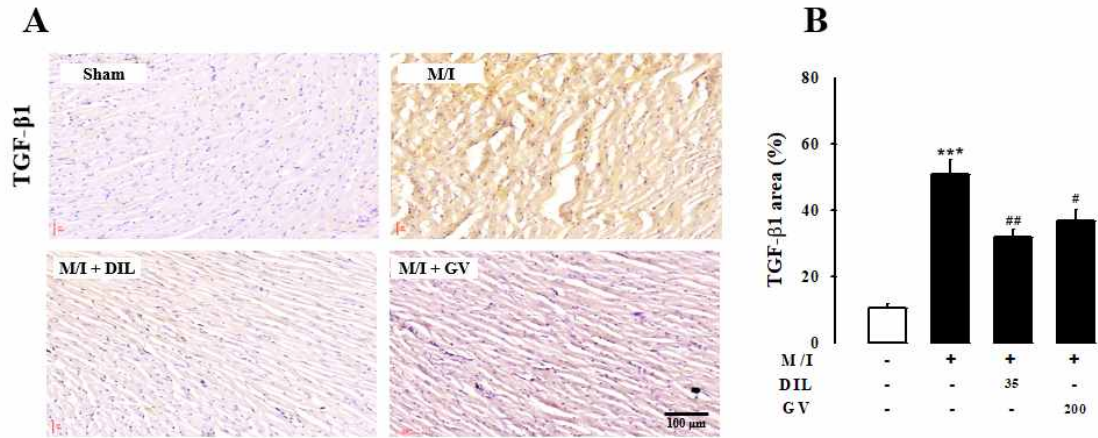


Fig. 8. Effect of GV on TGF-β1 deposition expression in rats with induced MI. (A) Pathologic morphology on TGF-β1 deposition were assessed using IHC staining. (Magnification x200, protein is specifically stained brown) (B) The extent of fibrosis in each experimental group was quantified and illustrated in the bar graph. M/I, myocardial infarction; DIL, diltiazem; GV, *Gracilaria Verrucosa*; TGF-β1, transforming growth factor beta 1. Data values are presented as means ± SE. ***P < 0.001 vs. Sham; #P < 0.05 and ##P < 0.01 vs. M/I group.