Campbell Early 잎 추출물이 Isoprenaline 유발 심근병증 랫트에서 심장-신장 개선에 미치는 영향

홍미현^{1,2} · 김혜음^{1,2}

¹원광대학교 한의과대학 생리학교실

²한방심신증후군연구센터

Effect of Campbell Early Leaves Extract on Heart-Kidney Improvement Cardiomyopathy in Isoprenaline-Induced Rats

Mi Hyeon Hong^{1,2} and Hye Yoom Kim^{1,2}

¹Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

²Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center

ABSTRACT Many studies have shown that grapes have antioxidant, nerve protection, liver protection, and anti-cancer effects, but their effectiveness on leaves is not known. The study was conducted to identify the effectiveness of Campbell early leaves (CEL) in heart and kidney dysfunction. Cardiomyopathy was induced by a treatment with isoprenaline (ISO) in rats to confirm the improved effect of cardiac-kidney dysfunction (cardio-renal syndrome). ISO (10 mg/kg/d) was administered intraperitoneally for two weeks and was divided into five groups: CONT, control; ISO, isoprenaline 10 mg/kg/d; PRO, ISO+propranolol 10 mg/kg; CEL100, ISO+CEL 100 mg/kg/d; CEL200, ISO+CEL 200 mg/kg/d. The experiment was conducted for four weeks. As a result, the CEL groups showed an improvement in the value of the left ventricle mass index after exposure to ISO compared to the control group. Furthermore, the echocardiogram measurements showed that the CEL groups could recover the decrease in ejection fraction, fractional shortening, and stroke volume. To identify the heart-kidney functionality, albumin, osmotic, and blood nitrogen was measured in each group, which showed a significant increase in the ISO group, decreasing in the CEL group. The fibrosis of the kidneys also recovered in the CEL group. In conclusion, in cardiomyopathy caused by ISO-induced rats, CEL improves the heart and kidney function. Therefore, grape leaves and fruit are considered useful for improving the heart-kidney functional disorders in grape leaves.

Key words: Campbell early leaves, cardiomyopathy, cardiorenal syndrome, heart-kidney dysfunction, functional food

서 론

고령화 인구에서 고혈압 관련 사망은 현대사회의 주요 원인으로 심혈관 손상과 밀접한 관련이 있으며, 좌심실비대 및 심부전을 동반한 고혈압은 심혈관 관련 환율 및 사망률에 대한 중요한 위험 요소로 작용한다(Katholi와 Couri, 2011). 또한 고혈압은 좌심실비대, 좌심방비대, 좌심실 수축기 및 이완기 기능의 손상과 같은 심장의 구조적 및 기능적 변화에 기인한다(Messerli 등, 2017). 심장비대를 일으키는 원인은 두 가지 형의 신호, 즉 신장결찰과 같은 기계적 자극에 의한 신호와 교감신경계의 자극 및 신경 호르몬성 자극(angio-

tensin II, cytokine, endothelin 등) 신호가 있다(Tanai와 Frantz, 2015). 본 연구에 사용한 isoprenaline(ISO)은 비선택적 β -아드레날린성 자극제로 심장의 비대화에 영향을 미쳐 심장질환을 유발시키는 약물로 소개된 이후 심장질환을 실험적으로 유도할 목적으로 많은 연구에서 사용되고 있다(Johnson과 Antoons, 2018). 좌심실비대는 증가한 콜라겐 함량으로 인해 심근섬유증을 유발해 심근 구조의 재구성 과정이 시작되고 더 진행되면 심부전을 일으킨다(Creemers와 Pinto, 2011). 심부전이 발생한 경우 신장으로 가는 혈류가 줄어들며, 신장에서 염분과 수분이 정상적으로 제거되지 못하여 신장의 기능이 떨어지게 된다(Llauger 등, 2018). ISO 유도 심근병증은 신장 기능 장애를 유도하며, 이는 심장 과 신장의 기능부전이 병합된 경우 병태 생리가 서로의 장기에 기능 이상을 초래하여 더욱더 악화시킬 수 있다는 것을 의미한다(Liu 등, 2015; Wang 등, 2014). 따라서 2009년 각 분야 전문가들의 합의로 심장과 신장 동반 이상에 대해 심신증후군(cardio-renal syndrome, CRS)이라 명하고, 5

Received 22 Dec 2020; Revised 2 Feb 2021; Accepted 3 Feb 2021

Corresponding author: Hye Yoom Kim, Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea, hyeyoomc@naver.com

Author information: Mi Hyeon Hong (Graduate student), Hye Yoom Kim (Researcher)

가지 형태로 분류하여 심장과 신장의 상호작용에 관하여 공식적으로 발표했다(Ronco 등, 2009). 심신증후군은 일반적으로 심장이상에 의해 나타나는 이차적 신장이상이나 그 반대의 경우를 말하며, 심장-신장의 상호양방향성을 가진다고 볼 수 있다. 따라서 일차적으로 발병한 기관을 중심으로 심신(cardio-renal) 혹은 신심(reno-cardial) 증후군으로 나누게 된다. 제1형(급성 심장이상에 따른 신장이상, acute cardiorenal syndrome type 1), 제2형(만성 심장이상에 따른 신장이상, chronic cardiorenal syndrome type 2), 제3형(급성 신장이상에 따른 심장이상, acute renocardiac syndrome type 3), 제4형(만성 신장이상에 따른 심장이상, chronic renocardiac syndrome type 4), 마지막으로 제5형(전신질환이 원인이 되어 이차적으로 심장과 신장의 동반 이상이 발생한 경우, secondary cardiorenal syndrome type 5)으로 심신증후군을 분류했다(Jo, 2016). 신장질환 환자가 심장으로 인해 사망할 확률은 일반인의 6~7배로 만성 신장질환 환자의 경우 심혈관계 질환으로 인한 사망률이 정상인에 비해 최대 8배가 높은 것으로 나타나기 때문에 신장질환에 있어 신장의 기능도 확인이 필요하다(Gudsoor-kar와 Thakar, 2019). 따라서 본 연구는 심장-신장의 상호 기능 장애 개선 효과를 확인하기 위해 ISO를 랫트에 처리하여 심장질환 유발 동물모델을 제작하였다.

다양한 연구 보고서에 따르면 포도, 특히 와인은 관상동맥혈관 확장, 내인성 합성 감소, 저밀도 지단백질, 저혈압 및 항산화제를 통해 유익한 보호 효과가 있는 것으로 보고되었다(Stephan 등, 2017; Pignatelli 등, 2006; Chiva-Blanch 등, 2013). Campbell early(*Vitis labrusca*)는 오늘날 미국보다 아시아에서 더 인기가 있으며, 특히 한국에서 선호하는 품종으로 국내에서 재배되는 전체 포도 품종의 2/3를 차지하고 있다(Haseeb 등, 2019; Dani 등, 2007). 또한, 본 연구에서 사용된 Campbell early는 항산화, 항암, 신경 보호, 간 보호 및 심장 보호 특성을 갖는 것으로 알려져 있으며(Dani 등, 2010; Oliboni 등, 2011; Scola 등, 2013), 포도 껍질 추출물은 고혈압을 개선시키는 것으로 보고되기도 했다(de Moura 등, 2002). 이처럼 포도 자체나 와인 및 레스베라트롤(포도의 주성분)에 대한 연구는 활발히 이루어져 다양한 결과가 발표되고 있지만 포도 잎에 대한 연구는 미미한 실정이다. 또한 Campbell early 잎에서의 심혈관 기능 장애 및 신장 기능 장애 발생에 대한 보호 효과를 설명한 이전 보고서는 없다. 따라서 본 연구에서는 ISO를 이용한 심근 병증 랫드에서 신장에 미치는 영향과 Campbell early 잎(CEL) 추출물이 이를 개선시키는 효능이 있는지 알아보기 위해 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

Campbell early 잎 추출물의 제조 및 정량분석

Campbell early 잎 추출물(HP-01)은 한풍제약(Wanju,

Table 1. HPLC quantitative analysis results of compounds from Campbell early leaves extract

Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	
Contents (mg/g)	14.05±0.13 ¹⁾
Calibration curve ²⁾	y = 26,693.0x - 494.659
R ² ³⁾	0.999

¹⁾Results are presented as the mean±SD.

^{2),3)}Data acquisition and integration were performed with Shimadzu software.

Korea)에서 제공받았다. Campbell early 잎은 2019년 7~8월 경기도 화성과 김제 백구에서 채취하여 건조하고, 50% 에탄올 및 3% 아세트산으로 85°C에서 3시간 동안 2회 환류 추출하여 여과 후 여액을 3,000 rpm, 10°C 조건으로 15분간 원심분리(HANIL Combi 514R, Hanil Scientific Inc., Kimpo, Korea)하고 60°C 이하에서 감압 농축 및 진공 건조시켰다. HPLC 정량 분석은 Shimadzu LC-2030C 3D HPLC 기기 및 PDA 검출기(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 수행되었다. 성분 중 quercetin-3-*O*-glucuronide의 분석은 Waters Xbridge Shield RP18(150×4.6 mm I.D.; 3.5 μm, Waters, Milford, MA, USA) 컬럼을 사용하여 수행되었다. Campbell early 잎 추출물에서 quercetin-3-*O*-glucuronide를 계산하기 위해 y = 26,693.0x - 494.659 (R²=0.999) 이상의 검량선을 사용했으며, 1 g Campbell early 잎 추출물에는 14.05±0.13 mg의 quercetin-3-*O*-glucuronide가 포함되어 있었다(Table 1). Campbell early 잎 추출물의 자세한 성분분석은 선행 연구 결과에도 언급되어 있다(Kwon 등, 2016; Kim 등, 2020).

실험동물 준비

동물실험은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 심의를 받은 후 진행하였으며, 동물관리 규정을 준수했다(승인번호 WKU20-25). 7주령 수컷 SD계의 랫드는 썬타코(Seontaeco, Osan, Korea)에서 구입하여 온도(23±2°C), 습도(50~60%), 12시간 동안 암기와 명기 주기를 유지하며 적응기 3일을 거친 후, 심근병증을 유도하기 위해 isoprenaline(10 mg/kg/d, β-아드레날린성 수용체 자극제, Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)을 증류수에 녹여 복강에 2주간 투여했으며, 2주 후 각 군을 랜덤하게 나눈 다음 약물을 2주간 경구 투여했다. 양성대조군으로는 propranolol(10 mg/kg/d, 비선택적 β-아드레날린성 수용체 차단제, Millipore Sigma)를 사용했다. 본 추출물의 이전 연구 결과를 바탕으로(Kwon 등, 2016; Kim 등, 2020) Campbell early 잎 추출물의 농도를 100, 200 mg/kg/d로 설정했다. 군은 다음과 같이 5군으로 나누어 총 4주간 실험을 진행했으며, CONT(control), ISO(isoprenaline 10 mg/kg/d, I.P.), PRO(양성대조군, ISO+propranolol 10 mg/kg/d, O.P.), CEL100(ISO+Campbell early 잎 추출물 100 mg/kg/d, O.P.), CEL200(ISO+Campbell early 잎 추출물 200 mg/kg/d,

O.P.) 각 군의 개체 수는 9마리였다. Propranolol 및 Campbell early 및 추출물은 독성이 나타나지 않는다고 알려진 3%의 dimethyl sulfoxide(Thuning 등, 1983)에 녹여서 사용했으며, 용매 대조를 위해 CONT 역시 같은 용량으로 경구 투여했다.

심장초음파 분석

호흡 마취기에 isoflurane(1.5%, HANA Pharm Co., Ltd., Seoul, Korea)을 사용하여(95% 산소와 5% 이산화탄소) 각 군의 랫트를 마취하고, 초음파 검사 전 제모크림을 사용하여 가슴 털을 제거했다. 심초음파 평가는 고해상도 초음파 영상시스템(VINNO 6, Vinno Co., Ltd., Suzhou, China)을 이용하여 생체 내 심장 기능을 확인하기 위해 수행되었으며, M-모드 기록은 parasternal short-axis view에서 얻었다. 좌심실구혈률(ejection fraction, EF), 분획단축률(fractional shortening, FS), 일회박출량(stroke volume, SV)을 측정하고 기록했다. 심초음파는 최소 5회 관독 값의 평균을 측정하여 계산했다.

신장 기능 분석

실험을 마무리하기 전, 각 군의 랫트를 metabolic cage에서 적응시킨 후 뇨를 수집했다. 수집한 뇨를 이용하여 뇨 삼투질 농도, 뇨 전해질 농도를 측정했다. 뇨 삼투질 농도는 빙점 방식 삼투압 측정 방법을 이용하여(3900 Osmometer, Advanced Instruments, Norwood, MA, USA) 측정했으며, 전해질은 electrolyte analyzer(NOVA 5⁺, Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정했다. 그리고 뇨 크레아티닌 농도는 Jaffe 방법(피크르산 알칼리법, alkaline picrate method, Greenberg 등, 2012)을 이용하였으며, 뇨의 크레아티닌과 피크르산을 반응시켜 495 nm 파장에서 microplatereader(Milton Roy, Rochester, NY, USA)를 이용해 흡광도를 측정했다.

혈액 생화학적 분석

실험동물을 희생시켜 나온 혈액은 항응고제인 EDTA(ethylenediamine tetra acetic acid, 1 mg/mL)가 처리되어 있는 튜브에 수집했다. 수집한 혈액은 원심분리(3,000 rpm, 15분, 4°C)를 이용해 분리한 후 상층액인 혈장만 수집해 -80°C에 보관했다. 신장 기능검사를 위하여 혈장 내 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 알부민(albumin, ALB), 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH), CK-MB(creatine kinase myocardial band) level을 자동 임상화학 분석기(FUJI DRI-CHEM NX700, FUJIFILM Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정했다.

조직학적 분석

4주간의 실험이 마무리된 후, 희생시킨 동물의 신장조직은 4°C에서 5일간 paraformaldehyde(10%, Tech & Inno-

vation, Seoul, Korea)에 고정했으며, 이후 수화와 탈수과정을 거쳐 조직 내 남아있는 포르말린을 제거한 후 파라핀 embedding을 시행해 블록을 제작했다. 신장조직은 파라핀 블록을 회전형 박절기(Microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 3 µm로 자른 뒤 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 부착시켜 절편을 만들고, periodic acid Schiff(PAS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 염색을 시행하여 광학현미경(EVOSTM M5000, Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA, USA)으로 조직학적 변화를 관찰했다.

통계 분석

실험군 간의 유의성은 Systat사의 SigmaPlot(Version 10.0, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 Student's t-test나 one-way ANOVA test를 통하여 *P*값이 0.05 미만인 경우를 유의한 결과로 판정하였고, 실험 결과에서 Table은 mean±SD, Figure는 mean±SE로 표기하였다.

결 과

심근병증 모델에서 Campbell early 및 추출물에 의한 조직무게의 변화

실험동물 희생 후 심장 및 신장의 무게를 측정한 결과, 몸무게 대비 심장의 무게가 ISO를 처리한 군에서 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며(*P*<0.01), 좌심실의 무게 역시 뚜렷한 증가를 보였다(*P*<0.01). 이러한 결과는 ISO에 의한 심비대증이 나타났음을 의미한다. 반면, 양성대조군인 PRO군과 CEL 고농도 군에서 ISO군에 비해 유의한 감소 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었으며(*P*<0.05), Campbell early 및 추출물은 저농도보다 고농도에서 효과가 더 좋은 것을 알 수 있었다(Fig. 1A, 1B). 그러나 신장의 무게에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1C).

심근병증 모델에서 Campbell early 및 추출물이 심장 기능에 미치는 영향

Campbell early 및 추출물이 심근병증 동물 모델에 있어 좌심실 수축기능에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해 심장초음파 검사를 수행했다. Fig. 2A는 대표적인 심초음파 M-모드 대표 이미지이며 좌심실구혈률, 분획단축률, 일회박출량은 대조군에 비해 ISO군에서 유의성 있게 감소하여 LV 기능 장애를 일으킨 것을 확인할 수 있었다(*P*<0.05)(Fig. 2B~2D). 반면에 양성대조군인 PRO군과 CEL 저농도 군에서 ISO군에 비해 유의한 감소 효과를 보이며 CONT군 수준으로 개선되는 것을 확인할 수 있었다(*P*<0.05). 따라서 ISO에 의해 심장 장애를 일으켰으며 Campbell early 및 추출물이 이를 개선시키는 효능이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 1. Effects of Campbell early leaves on organ weight in isoprenaline-induced cardiomyopathy rats. Heart weight/body weight ratio (A), left ventricle/body weight ratio (B), kidney weight (C). CEL, Campbell early leaves; ISO, isoprenaline 10 mg/kg/d; PRO, propranolol. Values were expressed as mean±SE. ** $P<0.01$ vs CONT, # $P<0.05$ and ## $P<0.01$ vs ISO.

Fig. 2. Effect of Campbell early leaves on left ventricle function in isoprenaline-induced cardiomyopathy rats. Representative image of M-mode echocardiography obtained with two-dimensional guidance (A). Ejection fraction (B), fractional shortening (C), and stroke volume (D) data of echocardiography measurements in each group. CEL, Campbell early leaves; ISO, isoprenaline 10 mg/kg/d; PRO, propranolol. Values were expressed as mean±SE. ** $P<0.01$ vs CONT, # $P<0.05$ and ## $P<0.01$ vs ISO.

또한, 심장세포 손상의 지표로 사용되는 혈액 내 LDH와 CK-MB는 ISO군에서 현저하게 증가하였으며, CEL군에서 감소하는 것으로 확인할 수 있었다. 이는 심장세포 손상을 Campbell early 잎 추출물이 개선시키는 효능이 있다고 볼 수 있다(Fig. 3A, 3B).

심근병증 모델에서 Campbell early 잎 추출물이 신장 기능에 미치는 영향

심비대 유도 모델에서 Campbell early 잎 추출물이 신장 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물의 채뇨를 위해 metabolic cage에 넣어 실험을 진행했다. Metabolic cage에 실험동물이 들어있는 동안 섭취한 사료와 물의 양을 측정

했으나 유의적인 차이는 보이지 않았다(Table 2). 적응기를 거친 후 채뇨하여 신장 손상 지표인 뇨알부민 배설량(urinary albumin excretion) 및 삼투질 농도(osmolality)를 측정된 결과, ISO군은 CONT군에 비해 유의하게 증가했고($P<0.05$), PRO군, CEL군은 ISO군과 비교했을 때 회복되는 경향을 보였다(Fig. 4A, 4B). 혈액에서 신장 기능 지표인 혈장 내 혈액요소질소(BUN)를 측정된 결과, ISO군은 CONT군과 비교했을 때 유의하게 농도가 증가하였고($P<0.01$), PRO군, CEL군은 ISO군과 비교했을 때 유의하게 BUN 농도가 감소하였다($P<0.05$, Fig. 4C). 따라서 ISO에 의해서 심장에 손상이 일어났을 때 신장 기능 또한 영향을 준다는 것을 확인했고, Campbell early 잎 추출물이 이를 개선시키는

Fig. 3. Effect of Campbell early leaves on hematological changes in isoprenaline-induced cardiomyopathy rats. Changes in plasma lactate dehydrogenase (A) and creatine kinase myocardial band (B) levels. CEL, Campbell early leaves; ISO, isoprenaline 10 mg/kg/d; PRO, propranolol. Values were expressed as mean±SE. ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs CONT, # $P<0.05$ and ## $P<0.01$ vs ISO.

Table 2. Effects of Campbell early leaves (CEL) on food intake and water intake in isoprenaline-induced cardiomyopathy rats

	CONT	ISO	PRO	CEL100	CEL200
Food intake (g/100 g)	5.22±0.79	5.94±0.74	5.12±1.16	5.74±2.35	5.54±0.87
Water intake (mL/100 g)	7.07±2.94	7.81±1.67	7.31±1.85	7.28±0.84	7.25±7.05

CONT, control; ISO, isoprenaline 10 mg/kg/d; PRO, ISO + propranolol 10 mg/kg; CEL100, ISO + Campbell early leaves 100 mg/kg/d; CEL200, ISO + Campbell early leaves 200 mg/kg/d.

Fig. 4. Effect of Campbell early leaves on kidney dysfunction in isoprenaline-induced cardiomyopathy rats. Changes in urine albumin (A), osmolality (B), and plasma blood urea nitrogen (C). CEL, Campbell early leaves; ISO, isoprenaline 10 mg/kg/d; PRO, propranolol. Values were expressed as mean±SE. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$ vs CONT, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, and ### $P<0.01$ vs ISO.

효능이 있다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

심근병증 모델에서 Campbell early 잎 추출물이 신장 섬유화에 미치는 영향

심근병증으로 인한 신장 기능에 미치는 영향을 알아본 후 신장조직의 형태학적인 측면과 섬유화의 개선에 미치는 영향을 보기 위해 PAS staining을 시행하여 신사구체 기저막이 적색으로 염색되어 손상이 일어났는지 확인했다. 현미경 촬영은 cortex, outer medulla, 그리고 inner medulla로 나누어 시행했다. 그 결과 ISO군은 CONT군과 비교했을 때 사구체 확장을 보였으며, 세뇨관의 주변이 빨강게 염색되는 것으로 확인되어 섬유화를 확인할 수 있었다. 반면 PRO군, CEL군은 ISO군과 비교했을 때 사구체 확장 및 세뇨관의 섬유화가 개선되었다(Fig. 5).

본 연구를 통하여 Campbell early 잎 추출물이 ISO에 의해 유도된 심근병증 모델을 개선시키는 효과가 있다는 것을 입증했다. 또한, 우리의 결과는 Campbell early 잎 추출물이 심근병증으로 인한 신장 기능 이상을 개선시키는 효능이 있었으며, 특히 고농도의 Campbell early 잎 추출물이 신장 기능 장애로 인한 신장 장애를 개선시키는 역할을 한다는 것을 확인했다. 본 추출물의 선행 연구에서 혈소판응집 억제 효과(Kwon 등, 2016), 고지혈증 모델에서 혈행개선 효과(Chang 등, 2020), 본태성 고혈압 모델에서 심혈관 기능개선 효과(Kim 등, 2020), Campbell early 잎 추출물에서 분리된 Q3OG가 BV2 미세 아교세포에서의 항염증 효과(Yoon 등, 2014) 및 scopolamine에 의한 기억력 장애 개선

Fig. 5. Effect of Campbell early leaves on kidney fibrosis in isoprenaline-induced cardiomyopathy rats. Periodic acid Schiff staining of kidney in the inner medulla, outer medulla, and cortex in each group. The histological damages were in terms of glomerular fibrosis and tubular expansion in ISO groups, while administered CEL improved tubular damage (Magnification $\times 200$). CONT, control; ISO, isoprenaline 10 mg/kg/d; PRO, ISO + propranolol 10 mg/kg; CEL100, ISO + Campbell early leaves 100 mg/kg/d; CEL200, ISO + Campbell early leaves 200 mg/kg/d.

효과(Pariyar 등, 2019)에 관하여 보고한 바 있다. 본 연구는 그 후속 연구로 Campbell early 잎 추출물이 심근병증 모델에서 심장-신장 기능 장애 개선에 미치는 영향을 조사하기 위해 설계되었다. 두 선행 연구에서 100 mg/kg/d의 Campbell early 잎 추출물이 효능을 보였기에 100, 200 mg/kg/d 농도를 사용하여 연구를 수행했다.

본 연구에 사용한 ISO 주입으로 인한 동물모델은 β -아드레날린성 수용체 자극으로 인한 좌심실 섬유증을 유발한다고 알려져 있으며, 심근병증 혹은 심장비대에 미치는 영향에 관한 연구를 위한 표준화된 모델로 사용되고 있다(Tang 등, 2011; Samuel 등, 2014). 설치류의 심근재형성(cardiac remodeling)은 대부분(70~80%)이 3~5주 이내에 발생하기 때문에(Samouillan 등, 2020) 본 연구의 실험 기간은 총 5주로 설정되었다. ISO를 사용한 동물 모델의 경우 심장비대(hypertrophy)를 유도한다는 보고(Leenen 등, 2001)에 따라 심장비대 정도를 반영할 수 있는 지표로써 몸무게 대비 심장의 무게를 확인했다. ISO 그룹에서 CONT군 대비 13% 증가했기 때문에 성공적인 심근 병증 모델로 간주할 수 있었다. 양성대조군으로 사용된 propranolol은 비선택적 β -아드레날린성 수용체 차단제의 하나로, 심장 박동을 조절하여 고혈압, 부정맥 치료 등 심혈관계 질환을 치료하는 데 사용되는 약물이다(Srinivasan, 2019). 따라서 ISO에 의해 증가한 좌심실의 무게를 PRO군 및 Campbell early 잎 추출물군에서 감소시킴으로써 심장비대를 제어하는 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었기에 심장질환이나 구조적 이상 등을 확인하기 위하여 심초음파검사를 시행했다. 심혈관계의 역

학 연구에서 심초음파의 가장 중요한 유용성은 좌심실비대의 발견을 들 수 있으며, 심혈관계 위험률을 높인다고 알려져 있다(Thavendiranathan 등, 2012). 심초음파를 이용한 좌심실비대의 패턴과 좌심실 질량의 증가 정도의 확인은 이완 기능이상, 심장의 생리학적 이상, 비정상적 수축기능, 내피세포의 기능부전 등에 의한 심혈관계 유병률의 예측 인자로 작용할 수 있다(You 등, 2018).

본 연구에서 M-모드 심초음파를 이용하여 전반적인 기능을 평가하는 기본 변수들을 확인하고자 좌심실구혈률, 분획단축률, 일회박출량을 확인해본 결과, ISO군에서 심장 기능이 감소하였으며, Campbell early 잎 추출물이 이를 개선시키는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 ISO에 의해 유도된 심근병증은 Campbell early 잎 추출물에서 심장 리모델링을 약화시키고 심장 기능을 향상시키는 데 역할을 할 수 있음을 관찰할 수 있었다. 또한, 젖산탈수소효소(LDH)는 체내 거의 모든 세포에 존재하는 효소이지만, LDH는 세포가 손상되거나 파괴될 때 혈액으로 유출되기 때문에 심장세포 손상의 지표로 사용된다(Ghormade 등, 2014). 심장형 크레아틴키나제(CK-MB)는 대부분 심근 특이도가 높아 심장근육에서 발견되며, 심장근육세포에 손상이 있을 때 수치가 증가하게 된다(Amani 등, 2013). 따라서 심장 손상이 일어났을 경우 혈액 내 CK-MB와 LDH가 증가했으며, Campbell early 잎 추출물이 개선시키는 것으로 확인됐다.

심장-신장 상호작용이 가능한 메커니즘에는 혈액학적 변화, 내피 기능 장애, 염증, 레닌-안지오텐신 알도스테론 시스템 및 교감 시스템의 활성화가 포함되며, 이들 중 어느 것이

든 다른 요인의 연쇄 반응을 일으킬 수 있다(Bongartz 등, 2005). 본 연구에 사용된 ISO는 교감 시스템의 활성화로 인해 심장 기능을 상실하게 되고, 이에 따라 신장에 구조적 및 기능적 손상(장애)을 초래하게 된다고 알려져 있다(Ronco 등, 2008). 신장 기능이 떨어질 경우 신장에서 소변의 단백질을 거르는 능력을 잃게 되어 알부민이 소변을 통해 배설되게 되고, 분자가 작은 알부민은 신장 손상 시 최초로 소변에서 검출되게 된다(Bongartz 등, 2010; Szymanski 등, 2012). 실험 결과 ISO에 의한 심근병증모델에서 노 알부민 농도가 유의하게 증가하였으며, Campbell early 잎 추출물이 회복시키는 것으로 확인됐다. 혈액과 소변 속의 물과 용질의 균형을 평가하고 신장의 소변 농축 능력을 확인하기 위해 삼투질 농도를 측정했다. 일반적으로 혈청 삼투압이 증가하는 것은 혈중수분이 감소했거나 용질이 증가했기 때문이며, 혈청 삼투압이 감소했다면 그것은 체액량이 증가했기 때문에 신장 손상이 일어났을 경우 혈청 삼투압은 증가하게 된다(Oyaert 등, 2019). 실험 결과 ISO에 의한 심근병증모델서 신장의 무게 차이는 나지 않았지만 신장 내 기능 손상으로 인해 삼투질 농도가 유의하게 증가하였으며, Campbell early 잎 추출물이 회복시키는 것으로 확인됐다. BUN은 체내에서 단백질의 이화작용으로 생긴 대사산물로써 90% 이상이 신장으로 배설되기 때문에 신장 배설 기능을 알아볼 수 있는 지표이다(Huang 등, 2005). 실험 결과 ISO에 의한 심근병증모델서 BUN 수치가 유의하게 증가하였으며, Campbell early 잎 추출물이 BUN 수치를 회복시키는 것으로 확인됐다. 아울러 신장의 조직학적 변화를 확인하기 위해 신장을 PAS staining 하여 확인한 결과, ISO군과 비교했을 때 cortex에서 사구체 팽창과 outer medulla와 inner medulla에서 세뇨관 팽창이 Campbell early 잎 추출물에 의해서 회복됨을 확인했다.

요 약

결론적으로, ISO 주입으로 심근병증을 유발하여 심장파 신장의 구조 변화 및 기능 손상(심신증후군)을 일으켰으며, Campbell early 잎이 이를 개선시키는 것으로 확인됐다. 비록 용량 의존적인 효과를 보진 않았지만 대체로 고농도의 Campbell early 잎 추출물이 더욱 심장 및 신장의 기능 이상을 개선하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 추후 심장-신장 상호 기전에 대한 후속 연구에 유용한 결과로 사용될 수 있을 것으로 보이며, 포도는 열매뿐만 아니라 잎 또한 심혈관계 질환 개선 소재로 활용이 가능할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 논문은 한국연구재단(NRF-2019R1I1A3A01062432) 및 농림식품기술기획평가원(IPET-118041-3)의 지원을 받

았습니다.

REFERENCES

- Amani M, Jeddi S, Ahmadiasl N, Usefzade N, Zaman J. Effect of HEMADO on level of CK-MB and LDH enzymes after ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *BiolImpacts*. 2013. 3:101-104.
- Bongartz LG, Braam B, Verhaar MC, Cramer MJ, Goldschmeding R, Gaillard CA, et al. Transient nitric oxide reduction induces permanent cardiac systolic dysfunction and worsens kidney damage in rats with chronic kidney disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010. 298:R815-R823.
- Bongartz LG, Cramer MJ, Doevendans PA, Joles JA, Braam B. The severe cardiorenal syndrome: 'Guyton revisited'. *Eur Heart J*. 2005. 26:11-17.
- Chang BY, Kim DS, Kim SY. *Vitis labrusca* extract (HP01) improves blood circulation and lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020. Article ID 6180310. <https://doi.org/10.1155/2020/6180310>
- Chiva-Blanch G, Arranz S, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol Alcohol*. 2013. 48:270-277.
- Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res*. 2011. 89:265-272.
- Dani C, Oliboni LS, Agostini F, Funchal C, Serafini L, Henriques JA, et al. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicol In Vitro*. 2010. 24:148-153.
- Dani C, Oliboni LS, Vanderlinde R, Bonatto D, Salvador M, Henriques JAP. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food Chem Toxicol*. 2007. 45:2574-2580.
- de Moura RS, Viana FSC, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EPB, et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*. 2002. 54:1515-1520.
- Ghormade PS, Kumar NB, Tingne CV, Keoliya AN. Distribution & diagnostic efficacy of cardiac markers CK-MB & LDH in pericardial fluid for postmortem diagnosis of ischemic heart disease. *J Forensic Leg Med*. 2014. 28:42-46.
- Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, Wright EC, Dalton RN, Zakowski JJ, et al. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and jaffe method principles. *Clin Chem*. 2012. 58:391-401.
- Gudsoorkar PS, Thakar CV. Acute kidney injury, heart failure, and health outcomes. *Cardiol Clin*. 2019. 37:297-305.
- Haseeb S, Alexander B, Santi RL, Liprandi AS, Baranchuk A. What's in wine? A clinician's perspective. *Trends Cardiovasc Med*. 2019. 29:97-106.
- Huang JW, Chen KY, Tsai HB, Wu VC, Yang YF, Wu MS, et al. Acute renal failure in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Formos Med Assoc*. 2005. 104:891-896.
- Jo SK. Cardiorenal syndrome. *Korean J Med*. 2016. 90:378-383.
- Johnson DM, Antoons G. Arrhythmogenic mechanisms in heart failure: linking β -adrenergic stimulation, stretch, and calcium. *Front Physiol*. 2018. 9:1453. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01453>
- Katholi RE, Couri DM. Left ventricular hypertrophy: major risk factor in patients with hypertension: update and practical clin-

- ical applications. *Int J Hypertens*. 2011. Article ID 495349. <https://doi.org/10.4061/2011/495349>
- Kim HY, Hong MH, Yoon JJ, Kim DS, Na SW, Jang YJ, et al. Protective effect of *Vitis labrusca* leaves extract on cardiovascular dysfunction through HMGB1-TLR4-NFκB signaling in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*. 2020. 12:3096. doi: 10.3390/nu12103096.
- Kwon SU, Lee HY, Xin M, Ji SJ, Cho HK, Kim DS, et al. Antithrombotic activity of *Vitis labrusca* extract on rat platelet aggregation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016. 27:141-146.
- Leenen FH, White R, Yuan B. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001. 281: H2410-H2416.
- Liu Q, Li Z, Zhang Q, Lu D, Wang K, Wang S, et al. Effects of renal denervation on left atrial fibrosis in rats with isoproterenol induced chronic heart failure. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2015. 43:1040-1045.
- Llauger L, Jacob J, Miró Ò. Renal function and acute heart failure outcome. *Med Clin (Barc)*. 2018. 151:281-290.
- Messerli FH, Rimoldi SF, Bangalore S. The transition from hypertension to heart failure: contemporary update. *JACC Heart Fail*. 2017. 5:543-551.
- Oliboni LS, Dani C, Funchal C, Henriques JA, Salvador M. Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. Bordo) on wistar rat tissues. *An Acad Bras Ciênc*. 2011. 83:1403-1411.
- Oyaert M, Speckaert MM, Delanghe JR. Estimated urinary osmolality based on combined urinalysis parameters: a critical evaluation. *Clin Chem Lab Med*. 2019. 57:1169-1176.
- Pariyar R, Bastola T, Seo J. Protective effects of quercetin-3-O-glucuronide against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity. *J Life Sci*. 2019. 29:191-197.
- Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germanò G, et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis*. 2006. 188:77-83.
- Ronco C, Cruz DN, Ronco F. Cardiorenal syndromes. *Curr Opin Crit Care*. 2009. 15:384-391.
- Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2008. 52:1527-1539.
- Samouillan V, de Lejarza Samper IMM, Amaro AB, Vilades D, Dandurand J, Casas J, et al. Biophysical and lipidomic biomarkers of cardiac remodeling post-myocardial infarction in humans. *Biomolecules*. 2020. 10:1471. <https://doi.org/10.3390/biom10111471>
- Samuel CS, Bodaragama H, Chew JY, Widdop RE, Royce SG, Hewitson TD. Serelaxin is a more efficacious antifibrotic than enalapril in an experimental model of heart disease. *Hypertension*. 2014. 64:315-322.
- Scola G, Laurino CCFC, Menin E, Salvador M. Suppression of oncoprotein Her-2 and DNA damage after treatment with flavan-3-ol *Vitis labrusca* extract. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013. 13:1088-1095.
- Srinivasan AV. Propranolol: A 50-year historical perspective. *Ann Indian Acad Neurol*. 2019. 22:21-26.
- Stephan LS, Almeida ED, Markoski MM, Garavaglia J, Marchant A. Red wine, resveratrol and atrial fibrillation. *Nutrients*. 2017. 9:1190. <https://doi.org/10.3390/nu9111190>
- Szymanski MK, de Boer RA, Navis GJ, van Gilst WH, Hillege HL. Animal models of cardiorenal syndrome: a review. *Heart Fail Rev*. 2012. 17:411-420.
- Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of heart failure. *Compr Physiol*. 2015. 6:187-214.
- Tang Y, Wang M, Le X, Meng J, Huang L, Yu P, et al. Antioxidant and cardioprotective effects of Danshensu (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-propanoic acid from *Salvia miltiorrhiza*) on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy in rats. *Phytomedicine*. 2011. 18:1024-1030.
- Thavendiranathan P, Liu S, Verhaert D, Calleja A, Nitinunu A, van Houten T, et al. Feasibility, accuracy, and reproducibility of real-time full-volume 3D transthoracic echocardiography to measure LV volumes and systolic function: a fully automated endocardial contouring algorithm in sinus rhythm and atrial fibrillation. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012. 5:239-251.
- Thuning CA, Fanshaw MS, Warren J. Mechanisms of the synergistic effect of oral dimethyl sulfoxide on antineoplastic therapy. *Ann NY Acad Sci*. 1983. 411:150-160.
- Wang HJ, Wang W, Cornish KG, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension*. 2014. 64:745-755.
- Yoon CS, Kim DC, Ko WM, Kim KS, Lee DS, Kim DS, et al. Anti-neuroinflammatory effects of quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Kor J Pharmacogn*. 2014. 45:17-22.
- You J, Wu J, Zhang Q, Ye Y, Wang S, Huang J, et al. Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018. 314:H552-H562.