

## Ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 혈소판 응집 억제 효과 및 그 작용기전에 관한 연구

이소라 · 박정일 · 최강주<sup>1</sup> · 김낙두  
서울대학교 약학대학, 한국인삼연초연구원  
(1997년 7월 24일 접수)

### Inhibitory Effects of Ginsenoside Rg<sub>3</sub> on Platelet Aggregation and its Mechanism of Action

So Ra Lee, Jung Hill Park, Kang-Ju Choi<sup>1</sup> and Nak Doo Kim  
*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 157-242, Korea,*  
*<sup>1</sup>Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon, 305-763, Korea*  
(Received July 24, 1997)

**Abstract :** The effects of ginsenosides purified from red ginseng on platelet aggregation were investigated. Preincubation of washed platelets from rats with either ginsenoside Rg<sub>3</sub>, ginsenosides non-polar fraction(G-NPF), ginsenoside Rg<sub>1</sub>(Rg<sub>1</sub>) or ginsenosides polar fraction(G-PF) reduced the platelet aggregation induced by collagen in a dose-dependent manner, whereas ginsenoside Rg<sub>2</sub> failed to inhibit the aggregation. Their IC<sub>50</sub> values of Rg<sub>3</sub>, G-NPF, Rg<sub>1</sub>, and G-PF were 8.7±1.0, 150.3±0.1, 369.9±1.0, 606.2±1.3 µg/ml, respectively. Aggregation induced by thrombin was also inhibited by Rg<sub>3</sub> and G-NPF with IC<sub>50</sub> being 5.2±1.1 and 66.5±0.8 µg/ml, respectively. The alterations of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in platelets were monitored using fura-2 as a fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator. Both Ca<sup>2+</sup> release from internal stores and Ca<sup>2+</sup> influx into cytosol were suppressed by Rg<sub>3</sub>. Rg<sub>3</sub> also inhibited granular release of ATP and TXA<sub>2</sub> formation induced by thrombin in a dose-dependent manner in the washed platelets. Aggregation and ATP release from human platelets induced by collagen were also inhibited by Rg<sub>3</sub> to a similar extent as were observed in rat platelets. In conclusion, Rg<sub>3</sub> is a potent anti-aggregating component in ginsenosides and may exert its anti-aggregating activity by decreasing TXA<sub>2</sub> formation and granular secretion in platelets, most likely by inhibiting Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores. Thus ginseng may contribute to the prevention and treatment of thrombosis.

**Key words :** platelet, aggregation, TXA<sub>2</sub>, calcium, ATP release, ginsenoside Rg<sub>3</sub>.

## 서 론

혈소판은 응집작용을 통해 혈액의 응고 및 지혈에 관여한다.<sup>1)</sup> 그러나 혈소판 응집이 과도할 경우, 혈전증의 원인이 되는 것은 물론 동맥경화증, 심근경색, 협심증, 당뇨병, 고혈압 등의 혈관 질환의 악화 요인이 되기도 한다. 그러므로 혈소판 응집을 억제시킬 수 있는 약물은 혈 전증을 비롯한 혈관질환의 치료

및 예방을 목적으로 개발되고 있다.<sup>2)</sup>

Ginsenosides는 혈소판 응집 억제 작용이 있다고 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> Ginsenosides는 극성에 따라 ginsenosides polar fraction(G-PF)과 ginsenosides non-polar fraction(G-NPF)으로 나뉘어진다. G-PF에는 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd 등의 protopanaxadiol계 성분이 주로 포함되어 있으며 G-NPF에는 ginsenoside Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub> 등의 protopanaxatriol계

성분과 ginsenoside Rg<sub>3</sub>(Rg<sub>3</sub>)가 포함되어 있다.<sup>5)</sup> Rg<sub>3</sub>는 구조상으로는 protopanaxadiol계 성분이지만 극성 때문에 G-NPF에 함유되어 분리된다.

여러 ginsenosides가 혈소판 응집 억제 작용이 있다고 보고된 바 있으나 연구자에 따라 각 성분들의 효과 유무 및 효력은 상이하게 보고되었다. 랫드 platelet rich plasma(PRP) 응집반응에서 Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rb<sub>1</sub>이 억제효과가 있다고 보고한 Matsuda 등과는 달리 Kubo 등은 억제 효과를 관찰하지 못했다.<sup>6,7)</sup> 또한 사람의 PRP에서 Rg<sub>2</sub>의 응집 억제 효과가 가장 강력하다고 보고한 Kubo 등의 보고와는 달리 Kimura 등, Yamamoto 등은 사람의 PRP 및 washed platelets에서 Rg<sub>1</sub>의 응집억제 효과가 가장 강력하다고 보고했다.<sup>4,7,8)</sup> 이와같이 각각의 실험조건에 따라 상이한 결과가 보고되어 있지만 그중 응집억제 효과가 다른 ginsenosides에 비하여 강하다고 보고된 것은 Rg<sub>1</sub>과 Rg<sub>2</sub>이다.<sup>4,7,8)</sup> Rg<sub>3</sub>의 응집억제 기전은 세포내 Ca<sup>2+</sup> mobilization 억제에 기인한다고 보고되었다.<sup>4)</sup>

Rg<sub>3</sub>는 랫드 PRP에서 collagen 및 ADP 유도 응집 반응의 억제, thrombin으로 유도한 fibrinogen으로부터 fibrin으로의 전환 억제 효과가 보고된 바 있다.<sup>9)</sup> Tamura 등은 Rg<sub>1</sub>과 Rg<sub>3</sub>가 홍삼중 혈소판 응집 억제 주성분이며 그 억제 기전은 동일한 것으로 언급한 바 있으나<sup>10)</sup> Rg<sub>3</sub>에 대한 data 뿐으로서 Rg<sub>3</sub>에 대한 실험 결과가 보고된 논문은 찾을 수 없었다.

그러므로 본 연구에서는 랫드의 washed platelets를 이용하여 Rg<sub>3</sub>의 혈소판 응집 억제 효과를 다른 ginsenosides와 비교하고, Rg<sub>3</sub>의 응집 억제 기전을 규명하고자 하였다. 이를 위해 Rg<sub>3</sub>의 응집 억제 효과를 Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, G-NPF, G-PF와 비교하고 Rg<sub>3</sub>가 ATP release, 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도, TXA<sub>2</sub> 생성에 미치는 효과를 관찰하고자 하였다. 또한 Rg<sub>3</sub>가 사람의 혈소판에서도 응집 억제 효과가 있는지 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### (1) 홍삼시료

Ginsenoside Rg<sub>1</sub>(Rg<sub>1</sub>), ginsenoside Rg<sub>2</sub>(Rg<sub>2</sub>), ginsenoside Rg<sub>3</sub>(Rg<sub>3</sub>), ginsenosides polar fraction(G-

PF), ginsenosides nonpolar fraction (G-NPF)을 실험에 사용하였다. 모든 ginsenoside는 DMSO에 녹였으며 G-NPF는 물을 용매로 사용하였다. Ginsenoside를 DMSO에 용해하였을 경우는 혈소판에 대한 DMSO의 영향을 배제하기 위해 최종농도를 0.5%가 되도록 하였다.

#### (2) 실험대상

오성 Sprague-Dawley 랫드를 서울대학교 실험동물 사용장에서 분양받아 사용시킨후 체중 250±20g의 랫드를 사용하였다. 사람 혈액 채취를 위하여 2주 이상 약물 복용 경험이 없는 26±2세의 건강한 남성지원자를 12시간 이상 금주, 금연, 금식하게 한 후 채혈하였다.

#### 2. Washed platelets(WP)의 조제

랫트를 ether로 흡입마취시킨후 개복하여 복대동맥에서 채혈하였다. 항응고제로는 acid-citrate-dextrose (85 mM trisodium citrate, 71 mM citric acid, 111 mM dextrose)를 15%로 사용하였다. 채혈액을 150g에서 15분간 원심분리하여 얻은 platelet rich plasma(PRP)를 500g에서 10분간 원심분리하여 platelet pellet을 얻었다. 이를 washing buffer (138 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5.6 mM dextrose, 2 mM EDTA, 0.35% BSA, pH=7.4)에 현탁시켰다. 이 현탁액을 500g에서 10분간 원심분리시켜 platelet pellet을 얻은 후 suspension buffer(138 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5.6 mM dextrose)에 2×10<sup>6</sup>platelets/ml로 재현탁시켜 washed platelets(WP)를 얻었다. 이에 CaCl<sub>2</sub> 1 mM을 첨가시킨후 10분후에 실험에 사용하였다.

사람의 WP를 조제하기 위하여 건강한 지원자의 상박정맥에서 채혈하였으며 랫드 혈액과 같은 과정으로 조제하였다. 단 채혈액은 120g에서 15분간 원심분리하였으며, PRP 및 washing buffer에 현탁된 혈소판은 400g에서 10분간 원심분리하였다.

#### 3. 혈소판 응집 및 ATP 유리 측정

Born의 turbidometric method에 의하여 측정하였다.<sup>11)</sup> WP를 lumi-aggregometer(Chrono-log Corp.)에서 37°C, 1200 rpm으로 교반하였다. 1분후에 여러 농도의 ginsenosides(또는 용매)를 첨가하여 2분 더 반응시켰다. Thrombin(0.06~0.1 U/ml) 또는 col-

lagen(4~12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 투여하여 응집을 유도하였고 이를 5분동안 관찰하였다. 혈소판 응집 실험결과는 control에 대한 응집퍼센트로 나타내었다.

$\text{IC}_{50}$ 는 혈소판 응집을 50% 억제하는 약물의 농도로서, 각 농도별로 억제율을 산출한 후 이를 linear regression에 대입하여 회귀직선을 구하여 이 직선으로부터 계산하였다.

ATP 유리는 응집유도물질 첨가후 5분후에 luciferin-luciferase를 투여하여 발생하는 luminescence로 측정하였다. 측정결과는 control에 대한 ATP 유리 퍼센트로 나타내었다. 사람 혈소판의 경우는  $2 \times 10^8$  platelets/ml 조건에서는 유리된 ATP 양이 측정한계를 능가하였으므로 혈소판 수를  $10^8/\text{ml}$ 로 하여 측정하였다.

#### 4. 혈소판내 calcium 농도 측정

##### (1) Fura-2가 loading된 WP의 조제

Fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator인 fura-2를 세포안으로 loading하기 위하여 랫드 혈소판을 washing buffer에 현탁시킨후 fura-2 acetoxymethylester 10  $\mu\text{M}$ , pluronic F-127 0.025% 농도가 되도록 첨가하였다. 이를 3°C에서 90 rpm으로 45분간 incubation시켰다. 이 현탁액을 500 g에서 10분간 원심분리시켜 platelet pellet을 얻은후 이를 suspension buffer에 재현탁시켰다. 혈소판 수를  $2 \times 10^8$  platelets/ml로 만든 후  $\text{CaCl}_2$  1 mM 함유 또는 비함유 WP를 조제하였다.

##### (2) 혈소판내 calcium 농도 측정

Fluorometer cuvette에  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM이 함유된 WP를 넣고 37°C에서 교반시키면서 1분간 preincubation한 후  $\text{Rg}_3$  또는 용매(DMSO)를 첨가하여 2분간 반응시켰다. 이에 thrombin 0.1U/ml을 첨가하여 증가되는 fluorescence intensity를 측정하여  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 로 환산하였다.

세포내 저장소로부터의  $\text{Ca}^{2+}$  유리와 외부  $\text{Ca}^{2+}$  유입의 측정을 위해 Magocsi 등의 방법<sup>12)</sup>을 응용하여 수행하였다.  $\text{Ca}^{2+}$ 이 함유되지 않은 WP를 37°C에서 30초간 교반시킨후 EGTA 0.5 mM을 첨가하였다. 30초후에  $\text{Rg}_3$  또는 용매를 첨가하여 2분간 반응시킨 후 thrombin(0.1 U/ml)을 투여하였다. 이때 증가된 fluorescence intensity를 세포내 저장소에서 유리된  $\text{Ca}^{2+}$  농도로 환산하였다. 2분후  $\text{CaCl}_2$  1 mM을 첨가하여 증가한 fluorescence intensity를 외부에서 유입

된  $\text{Ca}^{2+}$  농도로 환산하였다. 세포내 calcium 농도는 Grynkiewicz 등의 식에 따라 계산하였다.<sup>13)</sup>

#### 5. $\text{TXB}_2$ radioimmunoassay

$\text{TXA}_2$ 는 반감기가 매우 짧은 불안정한 물질로서 생성후  $\text{TXB}_2$ 로 대사된다.  $\text{TXA}_2$  생성의 지표로서  $\text{TXB}_2$ 를 radioimmunoassay법으로 측정하였다.<sup>14)</sup> 랫드 WP를 aggregometer에서 37°C, 1200 rpm으로 교반시키면서 1분간 preincubation시켰다. 여기에  $\text{Rg}_3$  또는 용매를 첨가하여 2분간 incubation한 후 thrombin 0.5 U/ml을 투여하였다. 5분후에 ice-cold EGTA (5 mM)-indomethacin(50  $\mu\text{M}$ )을 첨가하여  $\text{TXA}_2$  생성을 중지시킨 후 10000 g에서 2분간 원심분리하여 얻은 상등액중의  $\text{TXB}_2$ 를  $\text{TXB}_2$  radioimmunoassay kit(Dupont, USA)를 사용하여 정량하였다.

#### 6. 통계 분석

실험결과는 mean  $\pm$  S.E.M.으로 표시하였으며 각 군간의 평균치는 Student's t-test로 비교하였다. 통계학적 유의성 판정은  $P < 0.05$  값으로 하였다.

## 결 과

### 1. 랫드 혈소판에 대한 응집 억제 효과

Collagen(4~12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 유도한 응집반응에서  $\text{Rg}_3$ 는 6~14  $\mu\text{g}/\text{ml}$  범위에서 용량의존적인 억제 효과를 보였다.  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Rg}_3$ , G-NPF 및 G-PF의 응집억제 효과를 비교하면  $\text{Rg}_3$ 의 응집 억제 효과가 가장 강력하였다. G-NPF의 응집 억제 효과가 G-PF,  $\text{Rg}_1$ 에 비하여 강하였고 G-PF는 비교적 넓은 농도범위에서 완만한 응집억제 효과를 나타냈다(Table 1). 그러나  $\text{Rg}_3$ 의 응집 억제 효과는 1 mg/ml까지 관찰되지 않았다(데이터 미제출).

$\text{Rg}_3$ 의  $\text{IC}_{50}$ 는  $8.7 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며, G-NPF,  $\text{Rg}_1$ , G-PF의  $\text{IC}_{50}$ 는 각각  $150.3 \pm 1.0$ ,  $369.9 \pm 1.0$ ,  $606.0 \pm 1.3$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다(Table 2).

Thrombin(0.06~0.1 U/ml)으로 유도한 혈소판 응집을  $\text{Rg}_3$ 는 2~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  범위에서, G-NPF는 50~200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  범위에서 용량의존적으로 억제하였다(Table 3).  $\text{Rg}_3$ , G-NPF의  $\text{IC}_{50}$ 는 각각  $5.2 \pm 1.1$ ,  $66.5 \pm 0.8$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로서  $\text{Rg}_3$ 가 G-NPF에 비하여 약 13배 강력하였다(Table 4).  $\text{Rg}_3$ 와 G-NPF 모두 collagen 유도 응집반응보다 thrombin 유도 응집반응에 대한 억제효과가 높게 나타났다.

**Table 1.** Effects of ginsenosides on collagen-induced rat platelet aggregation

Drug	% of aggregation
Collagen	100
Ginsenoside Rg <sub>3</sub>	
6.0×10 <sup>-6</sup>	98.9±6.3
7.9×10 <sup>-6</sup>	65.6±5.3
1.0×10 <sup>-5</sup>	23.5±1.3
1.2×10 <sup>-5</sup>	11.4±2.8
1.4×10 <sup>-5</sup>	8.4±5.3
Ginsenoside-nonpolar fraction	
5.0×10 <sup>-5</sup>	96.2±1.3
1.0×10 <sup>-4</sup>	77.1±3.7
1.5×10 <sup>-4</sup>	53.4±5.1
2.0×10 <sup>-4</sup>	28.2±2.9
2.5×10 <sup>-4</sup>	5.2±3.0
Ginsenoside-polar fraction	
5.0×10 <sup>-5</sup>	91.6±2.1
1.0×10 <sup>-4</sup>	75.1±5.2
2.5×10 <sup>-4</sup>	72.5±5.9
5.0×10 <sup>-4</sup>	51.4±3.7
1.0×10 <sup>-3</sup>	39.8±3.8
Ginsenoside Rg <sub>1</sub>	
3.0×10 <sup>-4</sup>	97.2±6.7
4.0×10 <sup>-4</sup>	70.3±8.6
5.0×10 <sup>-4</sup>	44.2±13.4
1.0×10 <sup>-3</sup>	15.4±5.9

Results are expressed as % of aggregation induced by collagen. Each value presents the mean±SEM of 3~4 experiments.

**Table 2.** Inhibitory concentration of 5%(IC<sub>50</sub>) of various ginsenosides required to inhibit rat platelet aggregation induced by collagen or thrombin

agonist	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
	collagen	thrombin
Rg <sub>3</sub>	8.7±1.0	5.2±1.1
G-NPF	150.3±1.0	66.5±0.8
Rg <sub>1</sub>	369.9±1.0	n.d.
G-PF	606.2±1.3	n.d.

Inhibitory effects of Rg<sub>2</sub> on collagen-induced aggregation was not detected. n.d.=not determined

**2. 랫드 혈소판에 대한 ATP 유리 억제 효과**

Thrombin 투여에 의해 유리된 ATP 양을 100%로 보았을 때 Rg<sub>3</sub> 2.5, 5 및 10 μg/ml 전처리에 의해 ATP 유리는 각각 83.6±3.9, 28.1±3.7 및 14.2±

**Table 3.** Effects of Rg<sub>3</sub> and G-NPF on thrombin-induced rat platelet aggregation

Drug (g/ml)	% of aggregation
Thrombin	100
Ginsenoside Re <sub>3</sub>	
2.0×10 <sup>-6</sup>	94.3±5.6
4.0×10 <sup>-6</sup>	72.3±6.9
6.0×10 <sup>-6</sup>	32.2±2.6
8.0×10 <sup>-6</sup>	22.7±1.7
1.0×10 <sup>-5</sup>	5.0±2.8
Ginsenoside-nonpolar fraction	
2.5×10 <sup>-5</sup>	95.5±2.3
5.0×10 <sup>-5</sup>	71.2±9.9
7.5×10 <sup>-5</sup>	38.8±8.4
1.0×10 <sup>-4</sup>	23.1±3.5
1.5×10 <sup>-4</sup>	7.5±1.1
2.0×10 <sup>-4</sup>	1.2±1.2

Results are expressed as % of aggregation induced by thrombin. Each value presents the mean±SEM of 3~4 experiments.

**Table 4.** Effect of Rg<sub>3</sub> on thrombin-induced Ca<sup>2+</sup> increase in fura-2 loaded rat platelets

Rg <sub>3</sub> (μg/ml)	[Ca <sup>2+</sup> ]	
	Resting (nM)	thrombin (nM) (% of increase)
0	99.8±4	497.8±62 (100%)
5	100.8±4.3	451.2±44.5 (77.3±7.8%**)
10	100.1±3	279.9±18.8** (49.2±5.3%**)
20	98.0±4.7	275.0±23.8** (47.2±5.3%**)

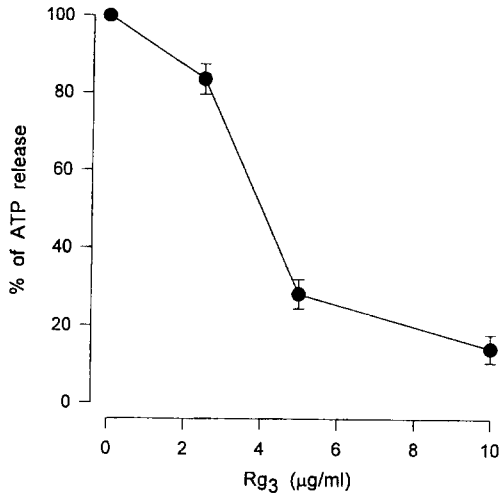
Values are mean±S.E.M n=5-8 Statistical difference is shown as \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. thrombin alone.

3.7%로 감소되었다(Fig. 1).

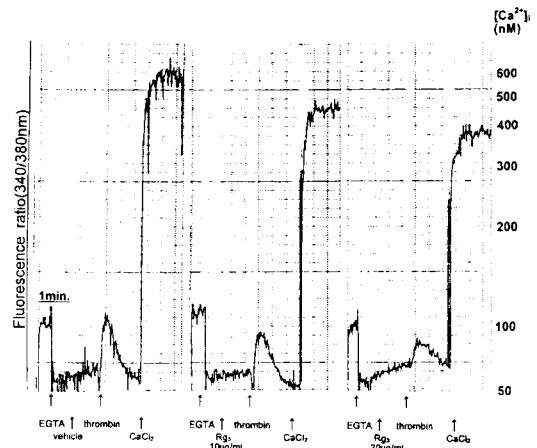
**3. 랫드 혈소판내 Ca<sup>2+</sup> 농도 증가에 미치는 효과**

(a) 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 증가에 미치는 효과 Resting [Ca<sup>2+</sup>]는 약 100 nM이었고 thrombin에 의하여 497.8±62.0 nM까지 증가되었다. Rg<sub>3</sub> 5, 10 및 20 μg/ml의 전처리에 의하여 각각 451.2±44.5, 279.9±18.8, 275.0±23.9 nM까지 감소되었다(Fig. 2, Table. 4). 또한 thrombin에 의한 Ca<sup>2+</sup> 증가량을 100%로 보았을 때 Rg<sub>3</sub> 5, 10, 20 μg/ml에 의하여 각각 77.3±7.8, 49.2±5.3, 47.2±5.3%까지 감소되었다(Table 4).

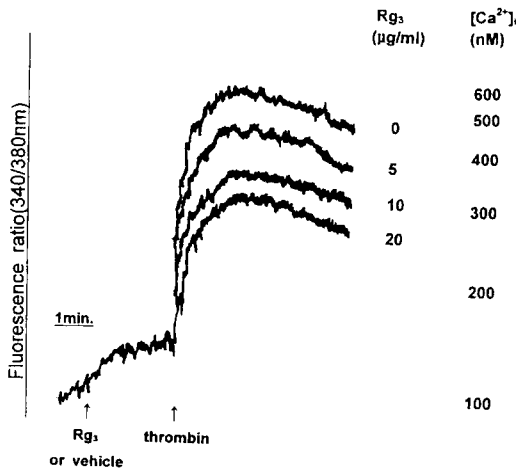
(b) 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리와 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입에 미치는 효과 세포외 Ca<sup>2+</sup>이 존재하지 않을 때



**Fig. 1.** Effects of increasing concentrations of Rg<sub>3</sub> on thrombin-induced ATP release from washed rat platelets. Various concentrations of Rg<sub>3</sub> were pre-incubated for 2 min. and thrombin (0.06–0.1 U/ml) was added to induce ATP release. Results are expressed as % of vehicle control. Each value represents the mean ± S.E.M. of 3 experiments.



**Fig. 3.** Effect of Rg<sub>3</sub> on thrombin-induced Ca<sup>2+</sup> release from internal stores and Ca<sup>2+</sup> influx in rat platelets. The cells were stimulated by thrombin in the absence of extracellular calcium. External calcium was repleted after 2 min. of thrombin stimulation. Traces of changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> are representative of 5 experiments. Addition: EGTA = 0.5 mM, thrombin = 0.1 U/ml, CaCl<sub>2</sub> = 1 mM.



**Fig. 2.** Effects of increasing concentrations of Rg<sub>3</sub> on thrombin-induced Ca<sup>2+</sup> increase in fura-2 loaded rat platelets. Various concentrations of Rg<sub>3</sub> were pre-incubated for 2 min. and thrombin (0.1 U/ml) was added to induce Ca<sup>2+</sup> increase in platelets. Traces of changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> are representative of 5–8 experiments.

ml)에 의하여 각각 88.2 ± 9.7, 80.9 ± 8.8 nM 까지 감소되었으며 각 실험마다 용량의존성이 관찰되었다(Fig. 3). 즉 Rg<sub>3</sub> 10 및 20 µg/ml에 의하여 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 증가율이 각각 74.4 ± 7.7, 54.7 ± 7.5%까지 감소되었다(Table 5). 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입에 의하여서는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 580 ± 90 nM까지 증가되었으며 Rg<sub>3</sub> 10 및 20 µg/ml에 의하여 각각 407.8 ± 55.7, 350.2 ± 40.2 nM까지 감소되었다. 이를 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 증가율로 환산하면 각각 69.5 ± 2.2 및 57.4 ± 3.1%이다(Fig. 3, Table 5).

**4. 랫드 혈소판에 대한 TXA<sub>2</sub> 생성 억제 효과**

TXA<sub>2</sub> 생성의 지표로서 TXB<sub>2</sub>를 정량하였다. Resting 상태(control)에서의 TXB<sub>2</sub>는 0.9 ± 0.16 ng/10<sup>6</sup>platelets 이었다. Thrombin 0.5 U/ml 투여후 5분 후에 상등액중의 TXB<sub>2</sub>를 정량한 결과 43.0 ± 6.5 ng/10<sup>6</sup>platelets까지 증가하였다. Rg<sub>3</sub> 5, 10 및 15 µg/ml에 의하여 각각 20.6 ± 4.3, 2.8 ± 0.8 및 1.8 ± 0.4 ng/10<sup>6</sup>platelets까지 억제되었다. 특히 Rg<sub>3</sub> 15 µg/ml 처리시 TXA<sub>2</sub> 생성은 control과 유사한 수준까지 억제되는 것을 관찰하였다(Fig. 4).

**5. 사람 혈소판에 대한 응집 및 ATP 유리 억제 효과**

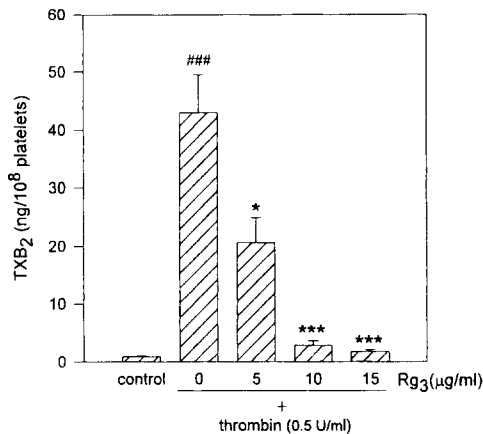
Collagen(4–10 µg/ml)으로 유도한 응집반응에서

의 Resting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>는 약 60 nM 이었으며 thrombin을 투여하였을 때 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리에 의하여 약 100 nM까지 증가되었다. Rg<sub>3</sub> 10 및 20 µg/

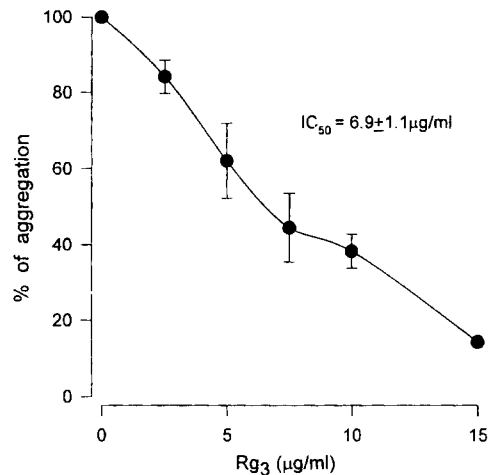
**Table 5.** Effect of Rg<sub>3</sub> on thrombin-induced Ca<sup>2+</sup> release from internal stores and Ca<sup>2+</sup> influx

Rg <sub>3</sub> (μg/ml)	Resting Ca <sup>2+</sup> (nM)	Ca <sup>2+</sup> release		Ca <sup>2+</sup> influx	
		from (nM)	internal stores (% of increase)	(nM)	(% of increase)
0	61.0±5.2	99.9±11.8	(100%)	580.0±90.8	(100%)
10	58.9±5.1	88.2±9.7	(74.4±7.6% <sup>**</sup> )	407.8±55.7	(69.5±2.2% <sup>***</sup> )
20	58.9±5.0	80.9±8.8	(54.7±7.5% <sup>***</sup> )	350.2±40.2 <sup>*</sup>	(57.4±3.1% <sup>***</sup> )

Values are mean±SEM. n=5 Statistic difference is shown as <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.01 vs. thrombin alone.



**Fig. 4.** Effects of increasing concentrations of Rg<sub>3</sub> on thrombin-induced TXB<sub>2</sub> formation in washed rat platelets. Various concentrations of Rg<sub>3</sub> were pre-incubated for 2 min. and thrombin (0.5 U/ml) was added to induce TXB<sub>2</sub> formation. Results are expressed as nanograms of TXB<sub>2</sub> released per 10<sup>8</sup> platelets. Each value represents the mean±S.E.M. of 3-5 experiments. Statistical difference is shown as <sup>###</sup>p<0.005 vs. control; <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.005 vs. thrombin alone.



**Fig. 5.** Effects of increasing concentrations of Rg<sub>3</sub> on collagen-induced human platelet aggregation. Various concentrations of ginsenosides were pre-incubated for 2 min. and collagen (4~10 μg/ml) was added to induce aggregation. Results are expressed as % of vehicle control. Each value represents the mean±S.E.M. of 3-4 experiments.

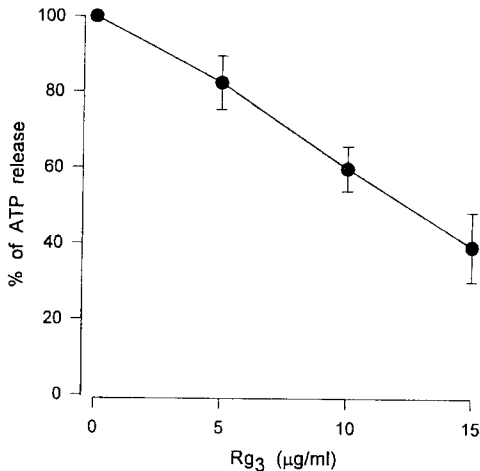
Rg<sub>3</sub>는 2.5~15 μg/ml에서 용량의존적인 응집억제 효과를 보였으며 IC<sub>50</sub>는 6.9±1.1 μg/ml이었다(Fig. 5). Rg<sub>3</sub> 5, 10 및 15 μg/ml에 의해 collagen으로 유도한 ATP 유리가 각각 82.4±7.1, 59.7±5.9 및 39.1±9.2%로 용량의존적으로 억제되었다(Fig. 6).

## 고 찰

랫드 WP를 이용하여 Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, G-NPF 및 G-PF의 응집 억제 효과를 비교한 결과, collagen으로 유도한 응집반응에서 Rg<sub>3</sub>의 억제 효과가 가장 강력하였고, G-NPF가 Rg<sub>1</sub>이나 G-PF에 비하여 강하였다. 그러나 Matsuda 등의 보고와는 달리 Rg<sub>2</sub>의 응집 억

제 효과는 관찰되지 않았다.<sup>6)</sup> IC<sub>50</sub>를 기준으로 비교하면 Rg<sub>3</sub>의 응집 억제 효과는 G-NPF, Rg<sub>1</sub>, G-PF에 비하여 각각 약 17, 43, 70배 강한 효과를 보인 것으로 보아 G-NPF의 응집 억제 효과에는 Rg<sub>3</sub>의 기여가 큰 것으로 사료된다. G-NPF의 성분 중에서 응집 억제 효과가 보고된 Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh 중 Rg<sub>3</sub>의 억제 효과가 가장 높기 때문이다.<sup>6)</sup>(Fig. 1) Thrombin으로 유도한 응집반응에서도 Rg<sub>3</sub>는 G-NPF에 비하여 약 13배 응집 억제 효과가 높았다. Rg<sub>3</sub>는 기존에 보고된 ginsenosides 중 혈소판 응집 억제 효과가 가장 강력한 성분으로 사료된다.

Matsuda 등의 보고에 의하면 collagen으로 유도한 랫드 PRP 응집반응에서 Rg<sub>3</sub> 1 mM(약 0.8 mg/



**Fig. 6.** Effects of increasing concentrations of Rg<sub>3</sub> on collagen-induced ATP release from washed human platelets. Various concentrations of Rg<sub>3</sub> were pre-incubated for 2 min. and collagen (4~10 µg/ml) was added to induce ATP release. Results are expressed as % of vehicle control. Each value represents the mean+S.E.M. of 4 experiments.

m)에 해당)은 약 27%의 억제 효과를 보였다.<sup>9)</sup> WP를 이용한 본 결과에서 Rg<sub>3</sub>의 collagen 유도 응집반응시 IC<sub>50</sub>는 8.7±1.0 µg/ml로서 억제작용이 강하였다. PRP는 혈소판이 혈장에 현탁되어 있는 상태이므로 혈장단백을 비롯한 여러 인자들이 응집반응에 관여할 수 있다. 또한 항응고제인 sodium citrate에 의해 외부 Ca<sup>2+</sup> 농도가 40 µM로서<sup>15)</sup> 생체 조건이나 WP의 세포외 Ca<sup>2+</sup> 농도가 1 mM인 것과는 차이가 있다.<sup>16)</sup> Ca<sup>2+</sup> 농도가 낮은 경우에는 TXA<sub>2</sub> 생성이 증가되며, 이로 인해 과립 분비 및 응집반응이 증폭된다.<sup>15)</sup>

Rg<sub>3</sub>의 작용기전을 알아보기 위해 thrombin 유도 응집반응에 관여하는 생화학적 지표들을 측정하였다. Thrombin은 receptor를 통해 phospholipase C를 활성화시켜 PIP<sub>2</sub>로부터 IP<sub>3</sub> 및 diacyl glycerol(DAG)의 생성을 촉진한다.<sup>17)</sup> IP<sub>3</sub>는 receptor를 경유하여 세포내 저장소로부터 Ca<sup>2+</sup>을 유리시키며<sup>18)</sup>, IP<sub>3</sub>의 인산화에 의해 생성된 IP<sub>4</sub>가 세포막에 존재하는 IP<sub>4</sub> receptor를 통해 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입을 촉진한다.<sup>19)</sup> 증가된 Ca<sup>2+</sup>은 혈소판의 응집 및 과립분비에 관여하는 여러 효소들을 활성화시킨다. 이중 phospholipaseA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)는 arachidonate pathway를 활성화시켜 PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> 등

의 혈소판 응집유도물질을 생성시킨다.<sup>20)</sup> 이중 TXA<sub>2</sub>는 arachidonate 대사물질중 가장 강력한 혈소판 응집작용을 가진 물질이며 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시키는 한편 과립분비를 촉진시킨다.<sup>21)</sup> 과립에서 분비된 ADP, 5-HT 등은 혈소판을 활성화시켜 응집을 유도한다.<sup>22)</sup>

Rg<sub>3</sub>는 혈소판 응집시 과립으로부터 유리되는 ATP 양을 용량의존적으로 억제하였으며 thrombin에 의한 혈소판내 Ca<sup>2+</sup> 증가를 억제하였다. 혈소판의 Ca<sup>2+</sup>은 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리와 외부 Ca<sup>2+</sup>의 유입에 의하여 증가된다.<sup>23)</sup> Magocsi 등의 방법<sup>12)</sup>을 응용하여 Rg<sub>3</sub>가 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리와 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입에 미치는 효과를 관찰하였다. Rg<sub>3</sub>는 양쪽 경로에 모두 억제 작용을 하였으며 억제율은 유사하였다. Thrombin에 의한 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리는 약 60 nM으로부터 100 nM까지 비교적 적은 증가율을 보였는데, 이는 랫드 혈소판의 세포내 저장소는 비교적 작은 편으로, 응집과 과립 분비를 유도하기 위해서는 적어도 20 µM 이상의 외부 Ca<sup>2+</sup>이 필수적이라고 보고된 바 있다.<sup>24)</sup> 그러므로 랫드 혈소판에서 관찰한 Rg<sub>3</sub>의 응집 및 과립분비 억제 효과는 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리보다는 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입 억제의 기여도가 더 높을 것으로 생각된다. 그러나 세포내 저장소에서 유리된 Ca<sup>2+</sup><sup>19)</sup> 또는 그 결과 고갈된 세포내 저장소 자체<sup>25, 26)</sup>가 신호가 되어 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입을 촉진시킨다는 가능성을 고려하면 Rg<sub>3</sub>는 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리 억제에 의해 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입에 영향을 미칠 가능성도 배제할 수 없다.

Rg<sub>3</sub>는 thrombin으로 유도된 TXA<sub>2</sub> 생성을 억제하였으며, 특히 15 µg/ml 처리시 control과 유사한 수준까지 TXA<sub>2</sub> 생성을 억제하였다. Thrombin에 의해 증가된 세포내 Ca<sup>2+</sup>은 PLA<sub>2</sub>를 활성화시켜 arachidonate 대사체 생성을 유도한다.<sup>27)</sup> Rg<sub>3</sub>는 thrombin으로 유발된 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가를 억제하였으므로 PLA<sub>2</sub>를 통한 arachidonate 경로에 간접적인 억제 효과가 있을 것으로 생각된다. 그러나 Rg<sub>3</sub> 15 µg/ml 처리시 control과 유사한 수준까지 강력한 억제 효과를 보인 것으로 보아 arachidonate로부터 TXA<sub>2</sub>로의 생성 경로에 직접적으로 억제 작용이 있는지도 규명되어야 할 것이다.

Rg<sub>3</sub>는 랫드 혈소판 뿐만 아니라 사람 혈소판에서도 용량의존적으로 응집과 ATP 유리를 억제하였으며 그

potency는 랫드에서와 유사하였다. 특히 사람 혈소판에서 응집 억제 효과가 가장 높다고 보고된 Rg<sub>3</sub>의 연구결과<sup>4,6)</sup>와 비교해볼 때 Rg<sub>3</sub>의 응집 억제 효과는 약 50배 이상 높게 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하면 Rg<sub>3</sub>는 랫드 및 사람의 혈소판에서 강력한 혈소판 응집 억제 효과가 있으며 순수분리한 ginsenosides중 potency가 가장 강한 성분으로 사료된다. Rg<sub>3</sub>의 응집억제기전은 아마도 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리 및 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제함으로써 TXA<sub>2</sub> 생성을 억제하고 과립분비를 억제함에 기인하는 것으로 사료된다.

## 요 약

Ginsenosides의 혈소판 응집 억제 효과를 검토하였다. 랫드 및 사람 혈소판을 이용하여 ginsenoside Rg<sub>3</sub>(Rg<sub>3</sub>)의 혈소판 응집 억제 효과를 여러 ginsenosides와 비교하고, 응집 억제 기전을 규명하고자 하였다. Collagen 유도 응집반응에서 Rg<sub>3</sub>, ginsenosides nonpolar fraction(G-NPF), ginsenoside Rg<sub>3</sub>, ginsenosides polar fraction(G-PF)의 IC<sub>50</sub>는 각각 8.7±1.0, 150.3±1.0, 369.9±1.0, 606.2±1.3 µg/ml이었으며 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 응집 억제 효과는 관찰되지 않았다. Thrombin 유도 응집반응에서 Rg<sub>3</sub>, G-NPF의 IC<sub>50</sub>는 각각 5.2±1.1, 66.5±0.8 µg/ml이었다.

Rg<sub>3</sub>의 응집 억제 기전을 규명하기 위하여 thrombin 유도 응집반응에 관여하는 여러 생화학적 지표들을 측정하였다. Rg<sub>3</sub>가 ATP 유리, 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 변화, thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>) 생성에 미치는 효과를 관찰하였다. Rg<sub>3</sub>는 과립으로부터의 ATP 유리를 용량의존적으로 억제하였다. Rg<sub>3</sub>는 thrombin에 의하여 유발된 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가를 억제하였으며 세포내 저장소로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리 및 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입을 모두 억제하는 것으로 관찰되었다. 또한 TXA<sub>2</sub>의 생성을 농도의존적으로 강력하게 억제하였다. 사람의 혈소판에서도 응집 및 ATP 유리를 용량의존적으로 유의성있게 억제하였으며 potency는 랫드에서와 유사하였다.

이상의 결과 Rg<sub>3</sub>는 랫드 및 사람의 혈소판에서 강력한 혈소판 응집억제 효과가 있으며 순수분리한 ginsenosides중 potency가 가장 강한 성분으로 사료된다. Rg<sub>3</sub>의 응집억제기전은 아마도 세포내 저장소로

부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리 및 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제함으로써 TXA<sub>2</sub> 생성을 억제하고 과립분비를 억제함에 기인하는 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발연구센터를 통한 한국 과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다.

## 인 용 문 헌

1. Stormorken, H. : *Platelet response and metabolism* vol. 1, Holmsen H., Ed., CRC press, 3-32 (1986).
2. Hirasawa, Y., Nishio, M., Maeda, K., Yoshida, K. and Kita, Y. : *Eur. J. Pharmacol.*, **272**, 39-43 (1995).
3. Kuo, S. C., Teng, C. M., Lee, J. C., Ko, F. N., Chen, S. C. and Wu, T. S. : *Planta medica*, **56**, 164-167 (1990).
4. Kimura, Y., Okuda, H. and Ariche, S. : *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 838-843 (1988).
5. Nakanishi, K., Kaneko, H., Murakami, A. and Kuwashima, K. : *Proc. symp. WAKAN-YAKU*, **16**, 110-113 (1983).
6. Matsuda, H., Namba K., Fukuda S., Tani, T. and Kubo, M. : *Chem. Pharm. Bull.* 34(3), 1153-57 (1986).
7. Kubo, M., Matsuda, H., Tani, T. and Arichi, S. : *Proc. Symp. Wakan-Yaku*, **15**, 36-45 (1982).
8. Yamamoto, K., Hirai, A., Tamura Y. and Yoshida, S. : *J. Med. Pharm. Soc. for WAKANYAKU*, **5**, 184-190 (1988).
9. Matsuda, H., Kubo, M., Tani, T., Arichi, S. and Kitagawa, I. : *Shoyakugaku Zasshi*, **39**(2), 123-125 (1985).
10. Tamura, Y., Hirai, A., Terano, T., Tahara, K., Saito, J., Kondo, S. and Samukawa, K. : *The ginseng review*, **16**, 55-60 (1993).
11. Born, G. V. R. : *Nature(London)*, **194**, 927-929 (1962).
12. Magocsi, M., Sarkadi, B., Kovacs, T. and Gardos, G. : *Biochim. Biophys. Acta.* **984**, 88-96 (1989).
13. Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. : *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985).
14. Fitzpatrick, F. A. : *Methods in enzymology*, **86**,



- 286-297 (1982).
15. Liu, S and Sylvester, D. M. : *Thromb. res.* **75**(1), 51-62 (1994).
  16. Campbell, A. K. : *Clinical Science*, **72**, 1-10 (1987).
  17. Rabiet, M. J., Plantier, J. L. and Dejana, E. : *British Medical Bulletin*, **50**(4), 936-945 (1994).
  18. Scharff, O. and Foder, B. : *Physiological reviews*, **73**(3), 547-82 (1993).
  19. Authi, K. S. : *Mechanism of platelet activation and control*, Authi et al., Ed. Plenum press, 83-104 (1993).
  20. Peterson, S. N. and Lapetina E. G. : *Annals NewYork academy of sciences*, 53-63 (1994).
  21. Hourani, S. M. O. and Cusack, N. J. : *Pharmacological receptors on blood platelets*, *Pharmacological reviews*, **43**(3), 243-298 (1991).
  22. Meanwell, N. A. and Seiler, S. M. : in *Drugs and the delivery of oxygen to tissues*. Fleming, J. S., Ed. CRC press, 135-214 (1990).
  23. Hashimoto, Y., Ogihara, A., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Kurokawa, K. and Nonomura, Y. : *J. Biol. Chem.*, **267**(24), 17078-17081 (1992).
  24. Heemskerk, J. W., Feijge, M. A. H., Rietman, E. and Hornstra, G. : *FEBS*, **284**(2), 223-226 (1991).
  25. Heemskerk, J. W., Feijge, M. A. H., Sage, S. O. and Walter, U. : *Eur. J. Biochem.* **223**, 543-551 (1994).
  26. Sage, S. O., Heemskerk, J. W. M. and Mahaut-Smith, M. P. : *Mechanisms of platelet activation and control*, Authi et al., Ed. Plenum press, 69-82 (1993).
  27. Scrutton, M. C. : *Mechanisms of platelet activation and control*, Authi et al., Ed. Plenum press, 1-15 (1993).