

오배자의 항혈전 효과

송규용 · 박병준¹ · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원, ¹대전대학교 한의과대학

Antithrombotic Effect of *Galla Rhois*

Gyu Yong Song, Byung Jun Park¹ and Sung Hoon Kim*

Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Yongin 449-701, Korea.

¹College of Oriental Medicine, Taejon University, Taejon 300-716, Korea

Abstract – The possibility of *Galla Rhois*(GR) water extract as an antithrombotic agent was investigated. The effect of GR on platelet aggregation in human platelet-rich plasma(PRP) induced by collagen and ADP *in vitro* and coagulation parameters in a pathological model induced by endotoxin and hydrocortisone acetate(HA) *in vivo* were examined. In platelet aggregation assay, GR extract significantly inhibited platelet aggregation induced by collagen and ADP in a dose-dependent manner. GR extract significantly increased the number of platelet and shortened prothrombin time(PT) and activated thromboplastin time(APTT) as compared with the control in pathological model induced by endotoxin and HA. Also, GR extract significantly increased fibrinogen level as compared with the control in a pathological model induced HA. These results suggest that GR may be a promising antithrombotic agent.

Key words – *Galla Rhois*(GR) water extract, antithrombotic agent, platelet aggregation, PT, APTT

혈전증이란 심장과 혈관내에서 혈액이 굳어 혈관을 막고 있는 상태를 말하며, 이 혈액 덩어리를 혈전이라고 하는데,¹⁻³ 이러한 성상으로 인하여 혈액순환장애, 혈액류변성(혈행속도감소), 혈액점도이상, 이로 인한 조직 기관의 병리 변화 상태 등의 많은 문제점을 야기한다.⁴ 따라서 혈전증을 치료하기 위하여 streptokinase, urokinase 및 tPA(tissue-type plasminogen activator) 등 많은 의약품^{3,5}이 개발되어 있지만, 고비용에다 비특이적 작용 등으로 인한 전신 출혈 등의 부작용^{6,8}이 나타나고 있어, 최근에는 새로운 활성 인자의 개발과 천연물질에서의 혈전용해제 개발을 위하여 많은 노력과 비용을 투자하고 있다. 특히 최근에는 수질, 오공, 전갈, 제조 및 지류 등과 같은 동물성 약제의 항혈전 작용에 대한 유의성있는 결과가 보고된 바 있다.⁹⁻¹² 오배자는 붉나무 *Rhus chinensis* MILL.의 잎날개에 오배자 진드기 *Melaphis chinensi*(BELL)가 기생하여 만들어진 충영으로 염폐, 삼장, 해독작용과 더불어 지혈작용이 있어 각종 출혈 등에 응용되고 있으며,¹³ 현재까지는 항균작용에 대한 실험 보고만 있을 뿐 항혈전작용에 대한 연구는 보고된 바 없다.¹⁴

이에 저자는 오배자가 각종 출혈증에 응용된다는 점에 착안하여, 이를 시료로 *in vitro*에서 collagen과 ADP를 이용하여 혈소판 응집 억제효과를 탐색하고, *in vivo*에서 endotoxin과 hydrocortisone acetate(HA)으로 유도된 병태 모델을 이용하여 혈소판수와 coagulation parameter인 prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT) 및 fibrinogen 양의 측정을 통하여 항혈전작용을 탐색하였던 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 오배자(*Galla Rhois*)는 대전대학교 부속 한방병원과 대전시내의 건재도매상 두 곳에서 외부형태를 비교 검사 확인한 후 실험에 사용하였다.

생약의 추출 – 오배자 80 g을 증류수 2리터로 2시간 동안 가열 추출한 뒤 여과한 여액을 감압농축하였다. 잔사를 동결건조기로 건조하여 17.2 g의 시료(GR)를 얻어 실험에 필요한 농도로 증류수에 용해시켜 사용하였다.

실험동물 – 본 실험에 사용된 rat는 체중 180-220 g의 Sprague-Dawley계로서 한국화학연구소에서 체중 180-200 g

*교신저자(E-mail) : sungkim7@khu.ac.kr

의 수컷을 분양받아 사용하였다. (주)삼양사의 실험동물용 고형사료로 사용하였으며, 물은 충분히 공급하고 실온 22±2°C를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

시약 및 기기 - Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), endotoxin, 3.8% sodium citrate는 Sigma 제품을, ADP, collagen, thrombin reagent는 Chrono-Log 제품을, IL Test™ PT-fibrinogen HS, IL Test™ APTT Lyophilized silica는 Instrumentation Laboratory 제품을 각각 사용하였다. 실험기기로써 Whole Blood Lumi-Ionized Calcium aggregometer(Chrono-Log Co., Ltd), centrifuge(Beckman Co.), freeze dryer(Eyela Co.) 등을 사용하였다.

In Vitro 혈소판응집억제 실험 - 혈소판농축액을 원심분리기에서 1,000 r.p.m으로 10분간 원심분리하여 적혈구를 침강시키고 상등액을 취해 tyrode buffer로 희석하여 3×10⁸ cells/ml의 농도로 platelet rich plasma(PRP)를 만들었고, 상등액의 일부를 다시 2,500 r.p.m으로 20분간 원심분리하여 상등액을 platelet poor plasma(PPP)로 만들어 사용하였다. 혈소판 응집에 대한 실험은 Whole Blood Lumi-Ionized Calcium aggregometer(Chrono-Log Co., Ltd)를 사용하여 Born등¹⁵⁾의 방법에 따라 탁도측정법으로 실시하였다. Cuvette에 PRP 400 µl, collagen(50 µg/ml) 50 µl 또는 ADP (20 µM/ml) 50 µl, GR 50 µl를 조심스럽게 넣고 혈소판 응집도를 관찰하였다.

In Vivo endotoxin에 의한 혈전증 유발 실험 - 백서 5마리씩을 한 군으로 하여, 정상군, 대조군, urokinase 투여군 및 GR 투여군으로 각각 나누었다. 정상군에는 멸균생리식염수를, GR 투여군은 20 mg/kg 농도로 zonde를 이용하여 경구투여하고, urokinase 투여군은 urokinase 2,500 U/kg을 정맥주사하고, 1시간 후 Westphal 법¹⁶⁾에 의하여 정제한 endotoxin 0.1 mg/kg을 백서의 꼬리정맥에 주사하여 Schoendorf 법¹⁷⁾에 준하여 혈전증을 유발시켰다. 단, 정상군은 멸균생리식염수를 미정맥에 주사하여 동일한 스트레스를 가하여 실험조건을 동일하게 하였다. 채혈은 endotoxin을 주사한 후 4시간째에 에테르로 마취하여 심장천자를 하여 6 ml의 혈액을 3.8% sodium citrate 0.6 ml가 들어있는 1회용 주사기로 채취하여 1.5 ml는 다른 시험관에 넣어 혈소판 수치 검사용 혈액으로 사용하였고, 나머지는 centrifuge tube에 넣고, 바로 원심분리기에서 3,000 r.p.m으로 15분간 원심분리시켜 상층의 혈청을 serum separator에 취하여 coagulometer 측정기인 ACL100(Germany)을 이용하여 Hara 등¹⁸⁾의 방법으로 prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT) 측정에 사용하였으며 혈소판수는 Roche hematology 기기로 측정하였다.

In Vivo hydrocortisone acetate(HA)에 의한 혈전증 유발 실험 - 백서 4마리를 1군으로 하여 정상군, 대조군, urokinase군 및 GR 투여군으로 각각 나누었다. 정상군은 생리식염수(0.15 ml/300 g)를, 대조군과 GR 투여군 및 urokinase군은 HA(5 mg/kg)를 생리식염수에 녹여 1일 1회 7일간 둔부근육 주사하였다. HA의 첫 근육주사 24시간 경과 후 7일간 정상군과 대조군은 멸균생리식염수를, GR 투여군은 20 mg/kg 농도로 zonde를 이용하여 경구투여하였으며, 양성 대조군인 urokinase군은 2,500 U/kg의 농도로 근육 주사하여 HA 유발 8일째에 채혈을 실시하였다. HA 및 약물을 최종 투여한 24시간 후 백서를 ether로 가볍게 마취시키고 심장 천자로 6 ml의 혈액을 3.8% sodium citrate 0.6 ml가 들어있는 1회용 주사기로 채취하여 1.5 ml는 다른 시험관에 넣어 platelet 수치 검사 혈액으로 사용하였고 나머지는 centrifuge tube에 넣고 바로 원심분리기에서 3,000 r.p.m으로 15분간 원심분리시켜 상층의 혈청을 serum separator에 취하여 fibrinogen양 및 PT, APTT 측정에 사용하였다.

결과 및 고찰

혈소판 응집 억제에 대한 효과

Collagen(50 µg/ml)에 의한 혈소판 응집반응 저해효과에서는 GR 0.1, 1, 10, 100 µg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 각각 7.04±1.66, 33.80±1.01, 57.75±0.33, 92.96±4.08(%)로 농도의존적으로 강한 저해효과를 나타내었다(Table I). ADP(20 µg/ml)에 의한 혈소판 응집반응 저해효과에서는 GR 10, 100, 1,000 µg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 각각 5.65±1.14%, 11.29±1.14%, 69.35±6.84%로 나타나 농도의존적으로 저해효과를 나타내었다(Table I). 이로 보아 오배자는 혈소판 응집 억제효과가 있는 것으로 사료된다.

Endotoxin 유발 혈전증에 대한 효과

Endotoxin은 일반적으로 혈소판 응집, 혈관내피세포 장애를 일으켜 혈전, 허혈, 출혈 증상을 나타내게 하여, 혈전증

Table I. Inhibitory effects of GR on the human platelet aggregation by collagen and ADP

Sample	Conc. (µg/ml)	Inhibition(%)	
		Collagen	ADP
GR	0.1	7.04±1.66	-
	1	33.80±1.01	-
	10	57.75±0.33	5.65±1.14
	100	92.96±4.08	11.29±1.14
	1000	-	69.35±6.84

GR : *Galla Rhois* water extract treated group, - : not determined

Table II. Effects of GR on platelet and plasma coagulation times in endotoxin treated rats

Group	No. of animals	Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PT(sec)	APTT(sec)
Normal	5	793.6 \pm 25.3 ^{a)}	15.52 \pm 0.71 ^{a)}	23.94 \pm 2.17 ^{a)}
Control	5	653.0 \pm 15.3	19.41 \pm 1.71	32.64 \pm 3.46
Urokinase	5	791.0 \pm 54.7*	17.94 \pm 1.30	27.72 \pm 1.13
GR	5	777.2 \pm 38.5*	17.68 \pm 3.60	30.24 \pm 1.86

^{a)}: Mean \pm standard error, Normal : Normal saline treated group, Control : 0.1 mg/kg endotoxin injected and normal saline treated group, Urokinase: 0.1 mg/kg endotoxin injected and 2,500 U/kg urokinase injected group, GR : 0.1 mg/kg endotoxin injected and 20 mg/kg *Galla Rhois* treated group, * : Statistically significant value compared with control data(P<0.05)

실험에 많이 사용되는 시약이다.¹⁹⁾ 혈소판수의 변화에서 정상군은 793.6 \pm 25.3($\times 10^3/\text{mm}^3$)인데 비하여 대조군은 혈전이 유도되어 혈소판 수가 653.0 \pm 15.3($\times 10^3/\text{mm}^3$)로 감소하였다. 이에 비해서 항응고제인 urokinase를 투여한 양성대조군에서는 791.0 \pm 54.7($\times 10^3/\text{mm}^3$)로 증가되었으며, GR 투여군 역시 혈소판 수가 777.2 \pm 38.5($\times 10^3/\text{mm}^3$)로 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table II, P<0.05). 한편, PT는 주로 외인계 응고 인자의 결핍 및 이상을 검출하는 검사로, 혈장에 조직 thromboplastin과 calcium을 첨가하면 fibrin으로 석출될 때까지의 시간을 말한다.¹⁹⁾ 이는 각종 출혈성 질환의 진단 및 치료에 중요한 역할을 하며, 최근 항응혈약요법의 약제 투여량의 조절에도 응용된다.²⁰⁾ 본 실험에서 정상군의 PT time은 15.52 \pm 0.71(sec)인데 비하여 대조군에서는 19.41 \pm 1.71(sec)로 연장되었으며, urokinase를 투여한 양성대조군에서는 17.94 \pm 1.30(sec)로 단축되었다. 이에 비해서 GR 투여군은 17.68 \pm 3.60(sec)로 대조군에 비하여 단축되었으나 유의성은 나타나지 않았다(Table II). APTT는 plasma coagulation factor의 결핍을 측정하는 방법¹⁹⁾으로 수술전의 환자 및 출혈성 소인의 일반검사에서 응용된다. APTT는 PT에서 나타난 결과와 동일하게 정상군이 23.94 \pm 2.17(sec)인데 비하여 대조군에서는 32.64 \pm 3.46(sec)로 증가되었으며, urokinase를 투여한 양성대조군에서는 27.72 \pm

1.13(sec)로 단축되었다. 이에 비해서 GR 투여군은 30.24 \pm 1.86(sec)로 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table II). 이로 보아 GR은 endotoxin으로 유도된 혈전생성을 억제하는 것으로 사료된다.

Hydrocortisone acetate(HA) 유발 혈전증에 대한 효과

HA는 부신피질 hormone으로 말초에서의 glucose 흡수와 이용을 억제하여 혈당을 증가시키고 단백질의 분해를 촉진하여 중성지방산의 가수분해촉진으로 혈중지방산을 증가시키고, 혈액의 점도, 농도, 응고성 및 적혈구 응집을 유도하는 시약으로 고점도혈증 실험 모델로 응용되고 있다.¹⁹⁾ 혈소판 수의 변화에서 정상군이 922.0 \pm 46.1($\times 10^3/\text{mm}^3$)인데 비하여 대조군은 712.2 \pm 24.9($\times 10^3/\text{mm}^3$)로 감소하였으며, urokinase를 투여한 양성대조군에서는 887.0 \pm 44.9($\times 10^3/\text{mm}^3$)로 증가되었다. 이에 비해서 GR 투여군은 842.4 \pm 47.6($\times 10^3/\text{mm}^3$)으로 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table III, P<0.05). 또한 PT의 경우 정상군은 14.30 \pm 0.27(sec)인데 비하여 대조군에서는 20.50 \pm 0.15(sec)로 연장되었으며, urokinase를 투여한 양성대조군에서는 18.22 \pm 0.73(sec)로 단축하였다. 이에 비해서 GR 투여군에서는 15.66 \pm 0.59(sec)로 대조군에 비하여 유의성있는 단축효과를 나타냈다(Table III, P<0.05). APTT는 정상군이 24.82 \pm 2.30(sec)인데 비하여 대조군에서는 31.74 \pm 1.10(sec)로 증가되었으며 urokinase를 투여한 양성대조군에서는 29.06 \pm 0.74(sec)로 감소하였다. 이에 비해서 GR 투여군은 27.1 \pm 0.89(sec)로, 대조군에 비하여 유의성있는 단축효과를 나타내었다(Table III, P<0.05). 한편, fibrinogen은 혈장에서 존재하는 응고인자로서 thrombin에 의해 분해되어 fibrin으로 전환되는데, 이는 염증, 악성종양, 신장 질환 및 당뇨병등에서 증가되고, 간질질환으로 인한 생산 저하와 소비항진이 있을때는 감소하여 심근경색, 간질환, 괴저성손상 및 출혈성 질환의 예칙 및 치료에 유용하게 응용되는데, HA 병태 모델에서 대조군에 비하여 유의성은 증가를 나타내었다(Table III, P<0.05). 이 결과는 앞서 기술한 혈소판수에 미치는 결과와

Table III. Effects of GR on platelet, plasma coagulation times and fibrinogen level in HA treated rats

Group	No. of animals	Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PT(sec)	APTT(sec)	Fibrinogen (mg/dl)
Normal	5	922.0 \pm 46.1 ^{a)}	14.30 \pm 0.27 ^{a)}	24.82 \pm 2.30 ^{a)}	275.8 \pm 3.7 ^{a)}
Control	5	712.2 \pm 24.9	20.50 \pm 0.15	31.74 \pm 1.10	246.8 \pm 13.4
Urokinase	5	887.0 \pm 44.9**	18.22 \pm 0.73*	29.06 \pm 0.74	285.8 \pm 11.6*
GR	5	842.4 \pm 47.6*	15.66 \pm 0.59*	27.10 \pm 0.89*	327.6 \pm 11.4**

^{a)}: Mean \pm standard error, PT : prothrombin time, APTT : activated partial thromboplastin time, Normal : Normal saline treated group, Control : 0.1 mg/kg HA injected and normal saline treated group, Urokinase: 0.1 mg/kg HA injected and 2,500 U/kg urokinase injected group, GR : 0.1 mg/kg HA injected and 20 mg/kg *Galla Rhois* treated group, * : Statistically significant value compared with control data (*: P<0.05, **: P<0.01)

일치되어, 본 시료가 HA로 인해 혈소판이 응고인자로 작용한 것을 방지하는 동시에 혈액 응고인자의 고갈을 방지시키는 작용을 하였다고 볼 수 있다.

결 론

오배자의 항혈전작용을 탐색하기 위하여 collagen과 ADP를 이용하여 혈소판 응집억제효과를 탐색하고, *in vivo*에서 endotoxin과 HA에 의해서 유도된 병태 모델을 이용하여 혈소판수, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT) 및 fibrinogen의 양을 측정하였다. 그 결과 오배자는 collagen과 ADP에 의해 유도된 혈소판응집 농도의존적으로 강한 저해효과를 나타내었다. 혈소판수의 변화에서는 endotoxin과 HA 병태 모델 모두에서 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 나타내었으며, endotoxin 병태 모델에서는 PT가 대조군에 비하여 단축되었으나 유의성은 나타나지 않았고, HA 병태 모델에서는 대조군에 비하여 유의성있는 단축을 나타내었다. APTT는 endotoxin 병태 모델에서 대조군에 비하여 단축되었으나 유의성은 나타나지 않았으며, HA 병태 모델에서는 대조군에 비하여 유의성있게 단축되었다. Fibrinogen 양은 HA 병태 모델에서 대조군에 비하여 유의성있게 증가되었다.

이상의 결과로 보아 오배자는 혈전성 응고 요인들과 콜라겐 섬유에 의한 혈전 형성 억제 기전에 효과적으로 작용함을 알 수 있으며, 특히 HA 병태 모델에서의 결과는 혈액 점도 이상으로 야기되는 다양한 혈액 질환에 응용 가능할 것으로 보여, 향후 분획을 통한 물질 분리 및 농도에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 학술진흥재단 자유공모과제(Grant 2 F0200045)와 교육부 BK21의 연구비 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

인용문헌

1. 해리슨 內科學編纂委員會(1997) 內科學, 341-347, 도서출판 정담, 서울.

2. 沈在玉(1988) 血液流變과 中風誘發에 關한 考察, 大韓韓醫學會誌, 9(1): 84-88.
3. 孫泰重(1979) 病理學概念, 84-86, 고문사, 서울.
4. 張文類(1996) 瘀血證與活血化瘀, 實用中西醫結合雜誌, 9(3): 131-132, 1996.
5. 醫學教育硏修院 編(1987) 家庭醫學, 259-262, 서울대학교출판부, 서울.
6. 이문호(1979) 내과학(下), 1450-1459, 금강출판사, 서울.
7. Hopps. H. C. (1977) Principles of pathology, 47-49, 53-55, New York Appleton Century Crofts.
8. Lee, T. K., Chen, Y. C., Lien, I. N., Liu, M. C., and Huang, Z. S. (1988) Inhibitory effect of acetylsalicylic acid on platelet function in patients with completed stroke or reversible ischemic neurologic deficit. *Stroke*. 19(5): 566-70.
9. 尹炫珉(1997) 蚯蚓水鍼이 endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 14(1): 478-493.
10. 金泳兌(1997) 水蛭 및 紅花藥鍼이 endotoxin으로 誘發된 血栓症에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 14(1): 464-477.
11. 安圭錫(1990) 蚯蚓, 水蛭, 鱗鱗, 蜈蚣이 血栓症에 미치는 影響, 大韓韓醫師協會誌, 11(2): 92.
12. 安德馨 編(1984) 活血化瘀療法臨床實踐, 1-10, 雲南人民衛生出版社, 雲南.
13. 李暎鍾(1991) 本草學, 513, 영림사, 서울.
14. 동의학연구소 편저(1997) 동물성독약, 233-237, 여강출판사, 평양.
15. Born, G. V. R., and Cross, M. T. (1963) The aggregation of blood platelets. *J. Physiol*. 168: 178-195.
16. Westphal, O. (1952) *Z. Naturforsch*. 76: 148.
17. Schoendorf, T. H. (1953) *Am. J. Clin. Pathol*. 65: 51.
18. Hara, T., Yokoyama, A., Ishihara, H., Nagahara, T. and Iwanoto, M. (1994) DX-9065a, a new synthetic, potent anticoagulant and selective inhibitor for factor Xa. *Thromb Haemost*. 71: 314-319.
19. 殷錫錫(1989) 臨床檢査法提要, 227-231, 고문사, 서울.
20. 徐德圭(1982) 血液學實技, 67-91, 고문사, 서울.

(2002년 3월 29일 접수)