

# 표고버섯 추출물의 항혈소판 응집 및 항혈전 효과

김계엽 · 정현우<sup>1</sup> · 정동조 · 송형봉 · 이홍균\*

동신대학교 물리치료학과, 1: 동신대학교 한의학과

## Effects of Shiitake Mushroom on Anti-platelet Aggregation and Anti-thrombotic

Gye Yeop Kim, Hyun Woo Jeong<sup>1</sup>, Dong Jo Jeong, Hyung Bong Song, Hong Gyun Lee\*

Department Physical Therapy, Dongshin University, 1: Department of Korean Medicine, Dongshin University

In in vitro study, the anti-platelet aggregation effect of Shiitake mushroom extract was examined by measuring the collagen induced platelet aggregation and the DPPH radical scavenging. In in vitro study, anti-thrombotic effect of Shiitake mushroom extract was examined using the carotid artery thrombosis rat model. Carotid artery thrombosis rat model was made by 35% FeCl<sub>3</sub> treatment. After that, we investigate thrombus weight and blood flow. In platelet aggregation test, the extract significantly inhibited platelet aggregation in a concentration dependent manner(p<.001). Also, extract increased DPPH radical scavenging activity in a concentration dependent manner. Extract significantly inhibited thrombus weight to compare with control group. And blood passage time were shorter in the Shiitake mushroom extract supplemented groups than in control group. These results provide experimental evidence that Shiitake mushroom can be used to prevent platelet aggregation and thrombosis, then could apply the clinical diseases such as cardiovascular disease, and so on.

Key words : Shiitake mushroom, Anti-platelet aggregation, Anti-thrombotic

### 서 론

심혈관 질환의 대표적인 원인은 혈전이다<sup>1)</sup>. 이러한 혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장 등 순환기계 어느 곳에서도 발생할 수 있으며, 대표적인 심혈관계 질환인 동맥경화증은 심근경색이나 뇌경색을 일으키는 매우 위험한 질환이다<sup>2)</sup>. 혈전질환의 예방과 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 형성된 혈전을 치료하기 위한 혈전용해제 등이 사용되고 있다. 그러나 대표적인 항혈소판제제인 아스피린은 효과가 뛰어나지만 위장관 출혈과 소화성궤양 등의 부작용을 일으키며<sup>3)</sup>, 그 외의 항응고제나 고지혈증 치료제로 쓰이는 약물들은 가격이 너무 비싸다는 문제점이 있다.

특히 동맥경화, 뇌졸중 등 혈행 장애로 발생하는 심혈관계 질환은 미국, 유럽, 아시아 등 전 세계적으로 주요한 사망 원인이 되고 있으며, 우리나라에서도 2011년 사망원인 조사 결과 1위가 암, 2위가 뇌혈관질환, 3위가 심장질환으로 보고되어 혈관계질환

으로 사망하는 건수가 1위인 암과 동일한 것으로 나타났다<sup>4)</sup>. 이는 최근 급속한 경제성장과 가족형태의 변화 등으로 현대인들의 식생활이 빠르게 서구화됨에 따라 지방 및 가공식품의 섭취량 등이 증가하게 됨으로써 혈관계질환의 위험인자로 알려진 고콜레스테롤증, 고혈압, 당뇨병, 대사증후군의 유병율이 높아지고 결국 혈행 장애로 인한 혈관계질환으로 이어지게 되는 것이다<sup>5)</sup>. 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있어 정상적인 상태에서는 출혈이나 혈전 등에 의해 흐름이 방해받지 않는다. 그러나 여러 가지 요인으로 이러한 평형상태가 깨지면 혈관의 흐름이 원활하지 못하여 심혈관계 질환이 발생된다<sup>6)</sup>. 혈관 내벽의 collagen이 노출되면 혈액중의 혈소판이 점착, 활성화, 응집되고 혈액 응고계를 활성화하여 급속하게 혈전을 형성하게 된다<sup>7)</sup>.

혈전의 초기단계는 상처부위의 과도한 지혈작용과 혈관 내피세포의 손상 등의 원인에 의해 혈소판이 점착, 활성화, 응집되면서 시작되며, 혈액응고계를 활성화시키면서 급속히 촉진된다<sup>8)</sup>.

합성 항산화제인 Butylated hydroxyanisole (BHA)와 Butylated hydroxy toluene (BHT) 등은 안전성에 대하여 논란이

\* 교신저자 : 이홍균, 나주시 건제로 185 동신대학교 물리치료학과

· E-mail : leehonggyun@hanmail.net, · Tel : 061-330-3392

· 접수 : 2013/02/01 · 수정 : 2013/02/21 · 채택 : 2013/03/27

제기되어 현재에는 허용대상 식품이나 사용량이 법적으로 엄격히 규제되어 있다<sup>9)</sup>. 따라서 천연소재인 표고버섯의 사용이 요구되고 있다.

버섯류는 분류학적으로 포자를 만들기 위해 자실체를 형성하는 고등균류로 담자균 또는 자낭균에 속한다. 버섯은 독특한 풍미와 질감뿐만 아니라 탄수화물, 단백질, 무기질 및 비타민 등의 영양소를 함유하고 있어 예로부터 식용 및 약용으로 이용되어 왔다<sup>10)</sup>. 표고버섯 (Shiitake mushroom; SM, *Lentinus edodes*)은 담자균강 주름버섯목 느타리과 갯버섯속에 속하는 식용버섯이다. 표고버섯은 특유의 향과 맛을 띠어 기호성이 높은 천연소재이며 건강 기능성 측면으로 볼 때 항산화 활성 및 혈액응고 저해 효능을 보이고 있다<sup>11)</sup>. 표고버섯은 버섯 중 비타민 C의 함량이 가장 많으며 맛과 향기 성분으로 각각 guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP)와 lenthionine을 함유하고 있고 각종 아미노산과 ergosterol 또한 많이 함유하고 있으며, 표고버섯의 주요성분중 lenthionine은 항혈소판 작용 및 항산화 효과를 가지고 있다고 한다<sup>12)</sup>.

하지만 혈소판의 활성억제에 의한 항혈전의 효능 및 기전에 관한 체계적인 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 표고버섯 (Shiitake mushroom; SM, *Lentinus edodes*) 추출물의 항혈소판 응집 및 항혈전에 미치는 영향을 알아보기 위해 in vitro 실험에서 Aggregometer 실험을 진행하고, DPPH solution을 이용한 항산화능을 관찰하였다. 또한 in vivo 실험을 통해 경동맥 혈전 동물모델을 이용하여 혈전무게를 측정하고 혈류의 흐름을 탐색함으로써 산화 관련 질환 및 혈소판 응집, 혈전 관련 질환 또는 혈행 개선의 응용 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 조제

본 연구에서는 전남 장흥산 표고버섯을 재료로 하여 사용하였다. 표고버섯 1 kg을 80% 에탄올 (에탄올:물=4:1) 5,000 ml에 넣고 환류 냉각기를 장치한 후 95~100°C 수욕조에서 12시간 동안 온탕 하였다. 이 추출액을 약 50°C 정도로 냉각 시키고 여러 겹의 거즈로 여과하여 상등액을 취하였다. 이와 같은 추출 및 여과 조작을 3회 반복하여 상등액을 합하고 회전증발장치 (Rotary evaporator, Buchi, R-200, USA)를 이용하여 감압하에서 에탄올을 완전히 증발시켜 농축하였다. 이를 소량의 증류수에 용해하여 최종적으로 얻은 추출 용액을 -80°C에서 동결건조하여 분말 시료 155.8 g (수득율 15.58%)을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2. 실험동물

본 연구에서는 체중이 약 250 ± 50 g의 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐 (8주령, 웅성, 다물사이언스)를 사용하였으며 1주일 정도 적응시킨 후 사용하였다. 사육실의 온도는 25 ± 1°C로 하였으며, 습도는 55 ± 10%를 유지하였다. 조명은 12시간 명암주기로 조정하여 시험 전 기간 동안 동물 실험실의 일정한 환경 조건을 유지하였다. 물과 고형 사료 (삼양주식회사, 한국)는 자유롭게

게 섭취할 수 있도록 하였다. 본 실험에 사용된 모든 실험동물의 사육 및 처치는 동물실험윤리 위원회의 윤리요강에 준하여 실험하였다.

항혈소판 응집 효과 검색을 위해 각 농도별로 4마리를 사용하였다. 또한 항혈전 효과 검색을 위해 아무런 처치를 실시하지 않은 대조군, 표고버섯 추출물 50, 100, 250 mg/kg 투여군으로 총 네 개의 군으로 구분하였다. 각 군마다 12마리씩 나누고, 표고버섯 추출물을 1일 1회 주 5회, 3주간 매일 1 ml씩 동일한 시간에 경구투여 하였다.

### 3. 표고버섯 추출물의 항혈소판 응집 효과 검사(in vitro)

#### 1) 혈액 준비

실험 동물실에서 적응된 흰쥐를 마취 챔버 (Royal medical, 한국)에 넣고, 70% N<sub>2</sub>O와 28.5% O<sub>2</sub> 가스에 2.0% 엔플루란 (enflurane, 중의제약, 한국)을 혼합시킨 마취가스를 사용하여 흡입마취 후 수술대에 고정하고, 흡입전신마취를 계속하여 유지하였다. 항응고제를 혈액과 1:9 (v/v)의 비율이 되도록 항응고 처리 (3.8% sodium citrate)한 plastic syringes를 사용하여 심장천자를 통해 채취하였다. 채취한 혈액은 1,100 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 분취하여 혈소판농축혈장 (platelet-rich plasma, PRP)을 얻는다. PRP의 혈소판 수를 Coulter Counter (Coulter electronics, USA)를 이용하여 측정하고 3 × 10<sup>5</sup>/μl로 조정하여 사용하였다. 남은 물질층은 계속하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 그 상등액을 분취하여 저혈소판혈장 (platelet poor plasma, PPP)을 얻어 실험에 사용하였다.

#### 2) 혈소판 응집 억제 활성의 측정

혈소판 응집에 대한 표고버섯의 억제 효과를 알아보기 위하여 Aggregometer (Chrono Log, Havertown, PA, USA)를 이용하여 전혈의 혈소판 응집을 측정하는 impedance 방법으로, 혈소판의 응집에 따라 형성되는 두 전극사이에 형성된 전기적 저항 (ohm)의 변화로 나타내었다. Plastic cuvettes에 혈액 450 μl를 분주하여 37°C에서 약 10분간 반응시키고, 다양한 농도의 시료 20 μl를 가하여 stir bars를 넣고 1200 rpm에서 교반하면서 반응시켰다. 이에 2분 정도 baseline을 확인 후, collagen 7 μl (1 mg/ml)을 넣어 혈소판 응집을 유도하고 최대 10분간 측정하였다. 표고버섯의 최종 농도는 5, 10, 25 mg/ml가 되도록 10% (v/v) DMSO (dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 제조하였고, 대조군은 시료가 함유되지 않은 용매 DMSO를 사용하였다. 혈소판 응집억제 활성은 collagen으로 유도된 aggregation (%)을 대조군(A)으로, 표고버섯 추출물을 처리한 후 유도된 aggregation (%)을 실험군(B)으로 하여 다음 계산식에 따라 저해율 (%)로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: control aggregation (%)  
B: experimental aggregation (%)

#### 3) DPPH solution을 이용한 항산화능 측정

표고버섯의 항산화능을 알아보기 위하여 Blois<sup>13)</sup>에 의한 방

법에 따라 항산화 활성 중의 하나인 자유라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH 16 mg을 100 ml의 에탄올에 녹인 후 100 ml의 증류수를 혼합하여 여과지로 여과한 후 여액 2.5 ml에 표고버섯 추출물을 각각 5, 10, 25 mg/ml가 되도록 생리식염수에 녹인 후 0.5 ml을 혼합하고 실온에서 10분간 반응시켰다.

남아있는 DPPH의 양을 측정하기 위해서 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 528 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 양성 대조물로는 ascorbic acid 성분을 사용하였다.

4. 표고버섯 추출물의 항혈전 효과 검사(in vivo)

1) FeCl<sub>3</sub>를 이용한 경동맥혈전 유발 동물 모델(FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis)

경동맥혈전 유발 동물모델을 제작하기 위해 FeCl<sub>3</sub>를 이용하여 경동맥혈전을 유발하였다<sup>14)</sup>. 동물 실험실에서 적응된 흰쥐를 마취 챔버 (Royal medical, 한국)에 넣고, 70% N<sub>2</sub>O와 28.5% O<sub>2</sub> 가스에 2.0% 엔플루란 (enflurane, 중외제약, 한국)을 혼합시킨 마취가스를 사용하여 흡입마취 후 수술대에 고정하고, 흡입전신 마취를 계속하여 유지하였다. 목의 정중부를 절개를 하고 미주 신경이 손상되지 않도록 주의하여 우측 총경동맥 (common carotid, CCA)을 찾아 확인한 후 노출시켰다. 그리고 doppler flow probe를 경동맥에 위치시켜 모니터를 통하여 혈행을 관찰하였다. 혈관에 filter paper(2 mm square)를 대어 3분 간 35% FeCl<sub>3</sub>를 가하였다. 3분이 지나면 filter paper를 제거하고 경동맥을 세척하고 30분 간 관찰하였다. 어느 정도의 시간이 지나면 혈전이 형성이 되며 30분 후 혈전이 생긴 부위의 혈전을 조심스럽게 박리한 후 무게를 측정하였다.

2) 혈류 측정

각 군의 혈액을 100 μl 채취하여 헤파린을 이용하여 항응고 처리 후, 일정한 압력에 의해 혈액이 모세관을 통과하는 시간을 Micro Channel Array Flow Analyzer KH-6(MC Lab, Japan)으로 측정하였다.

5. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 SPSS 18.0 ver. for windows<sup>®</sup>을 사용하였다. 농도에 따른 실험군 간의 통계적 유의성 검정을 위하여 일요인 분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후 검정으로 Tukey's multiple range test를 실시하였다. 분석 시 유의수준은 α=0.05로 설정하여 검정하였다.

결 과

1. 표고버섯 추출물의 항혈소판 응집 효과(in vitro)

1) 혈소판 응집 억제 활성

표고버섯 추출물의 혈소판 응집반응에 대한 억제 효과를 보기 위하여 collagen으로 응고를 유도하여 검사를 시행하였다. 표고버섯 추출물을 5, 10, 25 mg/ml의 농도로 처리하여 응집률을 측정한 결과 66.53±3.33%, 47.97±1.55%, 37.23±1.41%로 나타났다.

각 군간의 유의성을 알아보기 위하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시한 결과 통계학적 유의한 차이를 나타냈고 (p<.001), 사후검정에서는 대조군과 비교하여 모든 농도에서 유의한 차이를 나타냈다(p<.001)(Fig. 1). 각각의 농도별로 최대 응집율(%)을 측정하여 control의 최대 응집율(%)에 대한 응집 억제율을 구한 결과 5, 10, 25 mg/ml 농도에서 11.02±5.4%, 35.85±2.86%, 50.24±1.24%로 농도가 증가함에 따라 응집 억제율이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2).

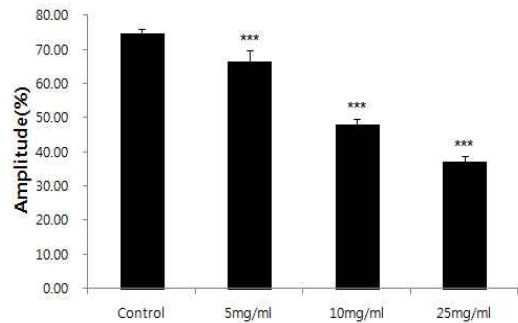


Fig. 1. Effect of extract of Shiitake mushroom on platelet aggregation. All values showed mean±SD. Tested by one way ANOVA and Tukey's multiple range test. Statistically significant compared with control group(\*\*\*: p<.001)

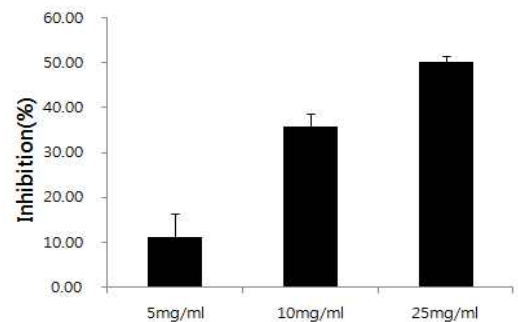


Fig. 2. Inhibitory effect of extract of Shiitake mushroom on platelet aggregation. All values showed mean±SD.

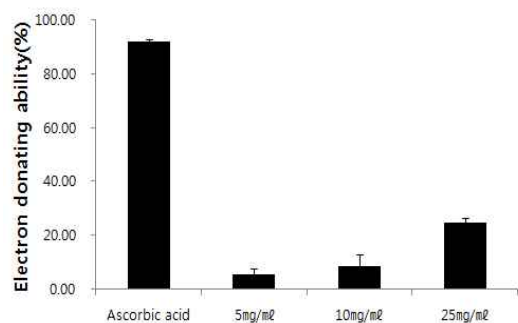


Fig. 3. Electron donating ability of the extract from Shiitake mushroom. All values showed mean±SD.

2) DPPH solution을 이용한 항산화능 측정

표고버섯 추출물의 항산화능을 측정하기 위하여 DPPH radical에 대한 전자공여능을 측정하였다. 표고버섯 추출물의 농

도에 따른 DPPH radical에 대한 전자공여능 측정 결과는 다음과 같다(Fig. 3). 표고버섯 추출물의 각각의 농도에서 Ascorbic acid에 비하여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거효과를 나타냈다. 대조군에 비하여 가장 높은 소거효과를 보인 농도는 최고농도인 25 mg/ml로 약 24%의 공여능을 보였다.

2. 표고버섯 추출물의 항혈전 효과(in vivo)

1) 경동맥혈전증 동물모델에서의 혈전무게 측정

표고버섯 추출물의 항혈전 효과를 보기 위하여 FeCl<sub>3</sub>를 이용하여 경동맥혈전증 유발 동물모델을 제작하여 혈전무게를 측정하였다. 표고버섯 추출물을 5, 10, 25 mg/ml의 농도로 처리하여 혈전무게를 측정된 결과 0.63±0.17 mg/mm, 0.55±0.19 mg/mm, 0.47±0.12 mg/mm로 나타났다. 각 군간의 유의성을 알아보기 위하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시한 결과 통계학적 유의한 차이를 나타냈고(p<.01), 사후검정에서는 대조군과 비교하여 5 mg/ml 투여군은 수치상의 감소는 있었으나, 유의성은 나타나지 않았고, 10 mg/ml 투여군(p<.05), 25 mg/ml 투여군(p<.01)에서 유의한 차이를 나타냈다(Fig. 4).

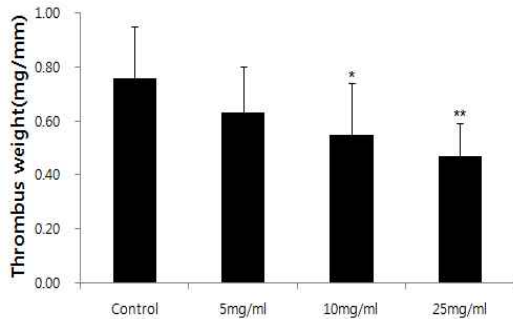


Fig. 4. The effects of shiitake mushroom on thrombus weight. Thrombus weight were determined 30 min after FeCl<sub>3</sub> induced injury. All values showed mean±SD. Tested by one way ANOVA) and Tukey's multiple range test. Statistically significant compared with control group(\*: p<.05, \*\*: p<.01)

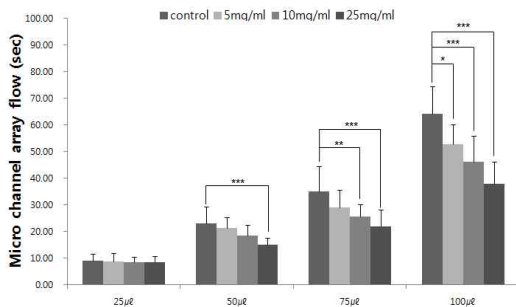


Fig. 5. Effect of Shiitake Mushroom on micro channel array flow in rats. All values showed mean±SD. Tested by one way ANOVA) and Tukey's multiple range test. Statistically significant compared with control group(\*: p<.05, \*\*: p<.01, \*\*\*: p<.001)

2) 혈류개선 효과

표고버섯 추출물의 혈류의 흐름에 미치는 영향을 실험하기 위해 각 군의 혈액을 채취하여 혈액이 모세관을 25, 50, 75, 100

µl 통과하는 시간을 Micro channel array를 이용하여 측정하였다. 각 군간의 유의성을 알아보기 위하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시한 결과 통계학적 유의한 차이를 나타냈고 (p<.01), 사후검정을 통한 각 혈액량에 따른 군간 차이 검정은 50 µl에서 대조군과 비교하여 25 mg/ml 투여군(p<.001)에서 유의한 차이를 나타냈다. 75µl에서 대조군과 비교하여 10 mg/ml 투여군 (p<.01), 25mg/ml 투여군(p<.001)에서 유의한 차이를 나타냈고, 100 µl에는 5 mg/ml 투여군(p<.05), 10 mg/ml 투여군(p<.001), 25 mg/ml 투여군(p<.001)에서 유의한 차이를 나타냈다(Fig. 5).

고찰

혈전질환은 혈소판과 혈장의 응고, 섬유소 분해, 응고억제 과정의 조절과 균형이 여러 가지 요인으로 인하여 혈액의 흐름이 방해받아 혈전이 혈관을 막아 생기는 질환으로, 동맥경화를 비롯한 뇌경색 등의 심혈관 질환이 발생한다<sup>15)</sup>. 혈전은 상처 부위의 혈관 내피세포 손상에 의해 혈소판이 점착, 활성화, 응집되면서 시작되며 혈액 응고계를 활성화시키면서 그 반응이 촉진된다<sup>16)</sup>. 그 후 혈소판의 ADP와 thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 등이 분비되어 혈소판이 활성화되고, 혈소판막의 GP IIb/IIIa 수용체와 fibrinogen이 결합하여 혈소판 응고가 촉진된다<sup>17)</sup>. 한의학에서는 혈전을 어혈과 그 의미가 유사하다고 보는데, 어혈이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 凝聚하여 형성된 일종의 병리적 산물로 혈류속도감소와 혈액순환장애의 병리상태를 포괄하여 의미한다<sup>18)</sup>. 동의보감에서는 어혈을 血滯라는 순환기능의 장애라는 개념으로 보고, 또한 黃帝內經에는 어혈과 유사한 개념으로 惡血, 留血, 着血, 衄, 蓄血 등이 쓰여졌고, 漢代 張<sup>19)</sup>이 처음 어혈이라는 명칭을 사용하면서 어혈의 병인, 병기, 증상 및 치료에 대한 체계적인 이론이 확립되었다. 최근의 연구에서는 어혈의 범주에 혈전증을 포함시켜 점도가 높은 혈액을 어혈로 인정하며 어혈치료를 혈전질환의 치료에 이용하고 있다<sup>20)</sup>. 현재 혈관계 질환을 유발하는 혈전의 예방과 치료방법으로 식이조절, 운동요법, 약물요법 등이 있으며, 약물요법에는 크게 심혈관계 약물인 고지혈증 치료제와 혈액 관련 약물인 항혈전-혈소판 응집 억제제, 항응고제 등이 사용되고 있다. 하지만 이러한 치료제들은 가격이 매우 높을 뿐만 아니라 urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하며<sup>21)</sup>, 모두 정제된 화학물질로 인체에 투여하였을 때 지혈과다억제, 불임, 소화기장애 등의 여러 부작용을 야기한다<sup>22)</sup>. 따라서 최근에는 천연 자연물로부터 보다 경제적이고 인체에 무해하며 혈전을 선택적으로 용해시키고 혈관 내에서 혈소판의 응집을 저해하여 혈전예방의 효과를 나타낼 수 있는 물질의 탐색이 필요한 실정이다<sup>23,24)</sup>.

표고버섯 (Shiitake mushroom; SM, *Lentinus edodes*)은 담자균강 주름버섯목 느타리과 잣버섯속에 속하는 식용버섯으로 건강기능성 측면에서 항암, 폐질환 및 위장질환 예방, 바이러스에 대한 면역증강, 항체생성 촉진, 혈압 강하, 동맥경화예방, 혈중 지질 농도 조절기능, 당뇨억제 효과 등이 알려져 있다<sup>25-30)</sup>. 표고버섯은 버섯 중 비타민 C의 함량이 가장 많으며, 각종 아미노산

과 ergosterol 또한 다량 함유하고 있다<sup>12)</sup>. 또한 혈액 중의 콜레스테롤을 감소시키는 물질인 lentinacin (eritadenine)이 있으며, 특히 자실체로부터 분리된  $\beta$ -1,3-glucan인 lentinan은 암세포의 증식을 억제시키는 활성이 보고되었다<sup>32)</sup>. 표고버섯의 특징은 맛과 향기에 있으며 각각 GMP (guanosine 5'-monophosphate)와 lenthionine이라는 물질로 밝혀지고 있다<sup>33,34)</sup>.

본 연구에서는 표고버섯 (Shiitake mushroom ; SM, *Lentinus edodes*) 추출물의 항혈소판 응집 및 항혈전에 미치는 영향을 알아보기 위해, in vitro 실험에서 Aggregometer 실험을 진행하고, DPPH solution을 이용한 항산화능을 관찰하였다. 또한 in vivo 실험을 통해 경동맥혈전 동물모델을 이용하여 혈전무게를 측정하고 혈류의 흐름을 탐색함으로써 산화 관련 질환 및 혈소판 응집, 혈전 관련 질환 또는 혈행 개선의 응용 가능성을 검토하였다.

혈소판의 기능을 알아보는 실험으로 전통적인 방법으로는 bleeding time, platelet aggregometry가 있고, 새로운 실험으로는 Verify Now, Plateletworks, Thrombelastograph Platelet Mapping System, Impact cone and plate(let) analyzer 등이 있다, 이 중 Bleeding time 은 비특이적이고, 임상적 상관관계가 부족하여 더 이상 추천되지 않으며, 새로운 실험들은 아직 표준화되어있지 않은 상태에서, 현재 혈소판 기능 실험의 절대표준인 Aggregometer를 사용하였다<sup>35)</sup>. Aggregometer는 Born's principle을 사용하는 방법으로 혈소판 기능이상을 발견하거나, aspirin, thienopyridines, GP IIb/IIIa inhibitors와 같은 약물의 영향을 평가하거나, 응집 억제 물질을 연구하기 위해 사용된다<sup>36)</sup>. 본 연구에서는 Collagen을 이용하여 응집을 유도한 후 aggregometer 실험 결과 표고버섯 추출물을 5, 10, 25 mg/ml의 농도로 처리했을 때 대조군과 비교하여 모든 농도에서 유의한 차이를 나타냈으며, 농도에 의존적으로 최대응집율은 낮아지고 응집억제율은 증가하였다( $p < .001$ ).

심혈관질환의 발병에 관한 가설 중 하나는 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의한 것으로 세포 내 항산화 방어계와 활성 산소종 (reactive oxygen species; ROS) 및 활성질소종 (reactive nitrogen species; RNS) 간의 불균형이 초래될 때 생성되는 것으로<sup>37)</sup>, 생체 내 ROS 및 RNS가 단백질, 지질, DNA, 당질과 같은 거대분자를 파괴시키고, 세포 구조를 빠른 속도로 붕괴시킴으로써 결국 세포를 사멸시키고 염증반응을 유도하여 동맥경화가 유발되며 특히, 죽상동맥경화의 발병에서 산화된 저밀도 지단백 (oxidized low density lipoprotein; Ox-LDL)이 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>38)</sup>. DPPH는 항산화물질로부터 전자나 수소를 받아 안정한 분자를 형성하여 라디칼을 소거하게 되는데, 이때 고유의 청남색이 없어지는 특징을 갖고 있어 이 색차를 비색정량하여 전자공여능력을 측정 한다<sup>39)</sup>. 본 연구에서는 표고버섯 추출물의 농도에 따른 항산화능을 측정하기 위하여 DPPH radical에 대한 전자공여능을 측정한 결과, 각각의 농도에서 Ascorbic acid에 비하여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 효과를 나타냈으며, 대조군에 비하여 가장 높은 소거효과를 보인 농도는 최고농도인 25 mg/ml로 약 24%의 공여능을 보였다. 따라

서, 항산화효과가 큰 천연물은 산화적 스트레스를 감소시켜 동맥경화와 같은 심혈관 질환의 예방 및 치료에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

동맥혈전 동물모델은  $FeCl_3$ 를 이용하여 경동맥에 혈전을 유발하여 약물의 항혈전 효능을 평가하기 위한 실험방법으로<sup>40)</sup>, 허은정 등의<sup>41)</sup> 연구에서는 35%의  $FeCl_3$ 로 유도된 동물모델이 효능을 검색하는데 가장 안정적인 결과를 도출할 수 있는 것으로 입증되었다. 일반적으로 혈전은 생성되는 부위에 따라 성질이 다른데 동맥혈전은 혈소판이 주요 조성이며, 정맥혈전에는 적혈구와 fibrin clot의 분포가 상대적으로 높다. 하지만, 혈소판의 수가 감소된 상태에서는 정맥혈전의 생성이 감소하고 혈소판 응집 억제제가 정맥 혈전 생성을 억제할 수 있음이 보고됨에 따라 정맥의 혈전에도 혈소판이 중요함이 알려져 있다. 본 연구에서 상기 모델에 항혈전 효과를 보기 위해 표고버섯 추출물을 적용해본 결과 혈전무게가 대조군과 비교하여 10 mg/ml 투여군( $p < .01$ ), 25 mg/ml 투여군( $p < .001$ )에서 유의하게 감소하는 결과가 나왔다.

혈행은 혈액을 구성하는 혈장 및 혈구세포 (혈소판)가 주요 관여하여 혈류의 항상성을 유지시키며, 혈관의 손상된 부위에서 정상적인 지혈과 보호 작용을 유지함으로써 인체의 정상적인 기능을 유지한다<sup>42,43)</sup>. 본 연구에서는 표고버섯 추출물이 혈류의 흐름에 미치는 영향을 검토해보기 위해 각 군의 혈액을 채취하여 헤파린으로 항응고 처리 후, Micro channel array flow analyzer (MC-FAN)를 이용하여 일정한 압력으로 인해 혈액이 모세관을 25, 50, 75, 100  $\mu$ l 통과하는 시간을 측정하였다. 실험결과 혈액 25  $\mu$ l 이동시에는 각 군의 혈액유동성에 차이를 보이지 않았으나, 50  $\mu$ l에서 대조군과 비교하여 25 mg/ml 투여군( $p < .001$ )에서 유의한 차이를 나타냈다. 75  $\mu$ l에서 대조군과 비교하여 10 mg/ml 투여군( $p < .01$ ), 25 mg/ml 투여군( $p < .001$ )에서 유의한 차이를 나타냈고, 100  $\mu$ l에는 5 mg/ml 투여군( $p < .05$ ), 10 mg/ml 투여군( $p < .001$ ), 25 mg/ml 투여군( $p < .001$ )에서 유의한 차이를 나타냈다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 표고버섯 추출물은 collagen으로 유도된 혈소판 응집 반응을 억제시키고 DPPH solution을 이용한 항산화능에도 유의한 효과를 보였으며, 실험적으로 유도된 혈전 생성을 억제시키고 혈행 개선에 효과를 나타냈다.

## 결 론

본 연구에서는 표고버섯 (Shiitake mushroom ; SM, *Lentinus edodes*)에서 추출한 lenthionine 성분의 항혈소판 응집 및 항혈전에 미치는 영향을 알아보기 위해, in vitro 실험에서 Aggregometer 실험을 진행하고, DPPH solution을 이용한 항산화능을 관찰하였다. 또한 in vivo 실험을 통해 경동맥혈전 동물모델을 이용하여 혈전무게를 측정하고 혈류의 흐름을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Collagen으로 응고를 유도하여 혈소판 응집반응에 대한 억제 효과 평가에서 대조군과 비교하여 모든 농도에서 유의한 차이를 나타냈으며, 농도에 의존적으로 응집 억제율이 증가하는 경향을 보였다.

DPPH solution을 이용한 항산화능 평가에서 각각의 농도에서 Ascorbic acid에 비하여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 효과를 나타냈으며, 가장 높은 소거효과를 보인 농도는 최고 농도인 25 mg/ml로 약 24%의 공여능을 보였다.

경동맥혈전증 동물모델의 혈전무게를 측정된 결과 대조군과 비교하여 5 mg/ml 투여군은 수치상의 감소는 있었으나 유의성은 나타나지 않았고, 10 mg/ml 투여군, 25 mg/ml 투여군에서 유의한 차이를 나타냈다.

혈류개선 평가에서는 모든 농도에서 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 혈류의 흐름의 차이를 나타냈고, 특히 25 mg/ml 투여군에서 유의한 차이를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 보아 표고버섯 추출물은 혈소판 응집 반응을 억제시키고 항산화 효능이 나타났으며, 경동맥혈전증 동물모델의 혈전의 크기를 감소시키고 혈류를 개선시켜 항혈전의 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 2012년도 제1차 기술료사업의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Lefevre, M., Kris-Etherton, P.M., Zhao, G., Tracy, R.P. Dietary fatty acids, hemostasis, and cardiovascular disease risk. *J Am Diet Assoc.* 104(3):410-419, 2004.
- Mustard, J.F., Packham, M.A. Factors influencing platelet function: adhesion, release, and aggregation. *Pharmacol Rev.* 22(2):97-187, 1970.
- Miwa, K., Kambara, H., Kawai, C. Effect of aspirin in large doses on attacks of variant angina. *Am Heart J.* 105(2):351-355, 1983.
- Korean national statistical office. Available at [http://kosis.kr/gen\\_etl/start.jsp?orgId=101&tblId=DT\\_1B34E13&conn\\_path=I2&path](http://kosis.kr/gen_etl/start.jsp?orgId=101&tblId=DT_1B34E13&conn_path=I2&path). Assessed September 13, 2012.
- 이현진. 양파즙의 섭취가 경계고지혈증 대상자의 혈중지질에 미치는 영향연구, 창원대학교 교육대학원, 2009.
- 정창주. 유근피 추출물이 흰쥐의 황산화계 및 지질대사에 미치는 영향, 조선대학교 대학원, 2006.
- Lim, S.S., Lee, J.H. Effect *atremisa princeps* var *orientalis* and *ccircium japonicum* var *ussuiense* on serum lipid of hyperlipidemic rat. *Korean J Nutr.* 30: 12-18, 1997.
- Longenecker, G.L., Swift, I.A., Bowen, R.J., Beyers, B.J., Shah, A.K. Kinetics of ibuprofen effect on platelet and endothelial prostanoid release. *Clin Pharmacol Ther.* 37: 343-348, 1985.
- Yen, G.C., Hsieh, C.L. Antioxidant activity of extracts from *Du-Zhong* (*eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *J Agric Food Chem.* 46: 3431-3436, 1998.
- Bano, Z., Rajarathnam, S. *Pleurotus mushrooms*. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 27(2):87-158, 1988.
- Sung, J.M., Yoo, Y.B., Cha, D.R. *Mushroom science*. Kyohaksa, Seoul. Korea, 1998.
- Choi, M.Y., Jung, T.Y., Hahm, K.J. Cytotoxic effects of hot water soluble polysaccharides from mushroom, *lentinus edodes* and vitamin A & E Supplementation against P388 cells. *Korean J Nutrition.* 28(11):1091-1099, 1995.
- Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature.* 26: 1199-1200, 1958.
- Wang, X., Cheng, Q., Xu, L., Feuerstein, G.Z., Hsu, M.Y., Smith, P.L., Seiffert, D.A., Schumacher, W.A., Ogletree, M.L., Gailani, D. Effect of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost.* 3: 695-702, 2005.
- Yang, S.A., Im, N.K., Lee, I.S. Effects of methanolic extract from *salvia miltiorrhiza bunge* on in vitro antithrombotic and antioxidative activities. *Korean J Food Sci Technol.* 39(1):83-87, 2007.
- 양원경, 성윤영, 김호경. 호장근 추출물의 항혈전 효능 및 혈소판 응집 억제작용. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 41(2):168-173, 2012.
- Fan, J., Zhang, Y., Chang, X., Zhang, B., Jiang, D., Saito, M., Li, Z. Antithrombotic and fibrinolytic activities of methanolic extract of aged sorghum vinegar. *J Agric Food Chem.* 57(18):8683-8687, 2009.
- 전국한의과대학 병리학교실, 한방병리학, 일중사, pp 81-85, 2002.
- 張機. 仲景全書. 도서출판 정담, 25, 1999.
- 박종형의 9명. 補陽還五湯이 血栓生成關與因子에 미치는 影響. *대한한방내과학회지*, 21(5):829-837, 2000.
- Liu, S., Jiang, S., Wu, Z., Lv, L., Zhang, J., Zhu, Z., Wu, S. Identification of inhibitors of the HIV-1 gp41 six-helix bundle formation from extracts of chinese medicinal herbs *prunella vulgaris* and *rhizoma cibotte*. *Life Sci.* 71(15):1779-1791, 2002.
- Burggraf, D., Vosko, M.R., Schubert, M., Stassen, J.M., Hamann, G.F. Different therapy options protecting microvasculature after experimental cerebral ischaemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 103(5):891-900, 2010.
- Swenson, S., Markland, F.S. Jr. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon.* 45(8):1021-1039, 2005.
- Mine, Y., Wong, A.H.K., Jiang, B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Res Int.*

- 38(3):243-250, 2005.
25. Park, M.H., Oh, K.Y., Lee, B.W. Anti-cancer activity of lentinus edodes and pleurotus ostreatus. *Korean J Food Sci Technol.* 30(3):702-708, 1998.
  26. Lee, B.W., Park, K.M. Anti-tumor activity of protein-bound polysaccharides extracted from mycelia of lentinus edodes. *Korean J Food Sci Technol.* 30(3):665-671, 1998.
  27. Park, K.M., Lee, B.W. Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of lentinus edodes. *Korean J Food Sci Technol.* 30(5):1236-1242, 1998.
  28. Ma, S.J. Effects of the substances extracted from dried mushroom (*Lentinus edodes*) by several organic solvents on the stability of fat. *Korean J Food Sci Technol.* 15(2):150-154, 1983.
  29. Cho, Y.J., Kim, H.A., Bang, M.A., Kim, E.H. Effect of dietary mushroom on blood glucose levels, lipid concentrations and glutathione enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutri.* 35(2):183-191, 2002.
  30. Kim, Y.S., Lim, C.H. and Cho, N.S. Hemagglutinative activity of lectin Isolated from shiitake, *lentinula edodes*. *Korean J Mycol.* 30(1):31-36, 2002.
  31. Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., Fukuoka, F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*(Berk.) sing. *Nature.* 222(5194):687-688, 1969.
  32. Ito, Y., Toyoda, N., Suzuki, M., Iwaida. Gas-liquid chromatographic determination. *J of Food Sci.* 43(4):1287, 1978.
  33. Morita, K., Kobayashi, S. Isolation, structure, and synthesis of lenthionine and its analogs. *Chem. Pharm. Bull.* 15(7): 988-993, 1967.
  34. Michelson, A.D., Frelinger, A.L. 3rd., Furman, M.I. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol.* 98(10A):4N-10N, 2006.
  35. Breddin, H.K. Can platelet aggregometry be standardized?. *Platelets.* 16(3-4):151-158, 2005.
  36. Vranová, E., Inzé, D., Van Breusegem, F. Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot.* 53(372):1227-1236, 2002.
  37. Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91(3C):31S-38S, 1991.
  38. Trush, M.A., Mimnaugh, E.G., Gram, T.E. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol.* 31(21):3335-3346, 1982.
  39. Kurz, K.D., Main, B.W., Sandusky, G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res.* 60: 269-280, 1990.
  40. 허은정, 이인선, 강형원, 전원경. 경동맥 손상 및 혈전을 유발한 동물 모델에서 續命湯의 효능 검증. *Kor J Oriental Physiology & Pathology.* 26(5):732-737, 2012.
  41. Kang, J.A., Kang, J.S. Effect of garlic an onion on plasma an liver cholesterol and triglyceride and plate aggregation in rat basal or cholesterol supplemented diets. *Korean J Nutr.* 32: 132-138, 1997.
  42. Shin, K.S., Lee, J.J., Jin, Y.R., Yu, J.Y., Park, E.S., Im, J.H., You, S.H., Oh, K.W., Lee, M.K., Wee, J.J., Kim, Y.S., Yun, Y.P. Effect of korean red ginseng extract on blood circulation in healthy volunteers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Ginseng Res.* 31(2):109-116, 2007.