

혈소판 응집 억제 작용 생약의 검색 (II)

윤 혜 숙 · 김 제 훈 · 이 중 난

서울대학교 생약연구소

Screening of Potential Inhibitors of Platelet Aggregation from Plant Sources(II)

Hye Sook Yun-Choi, Jae Hoon Kim and Jong Ran Lee

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110, Korea

Abstract—As a continuation of the previous work, a second group of sixty solvent fractions prepared from twenty plant species were screened for their inhibitory effects on adenosine 5'-diphosphate (ADP)-, arachidonic acid (AA)- or collagen-induced rat platelet aggregation. The results suggested that five plant species including *Angelica koreana*, *Cassia obtusifolia*, *Gastrodia elata*, *Paemonia lactiflora* and *Salvia miltiorrhiza* are potential sources of inhibitors of platelet aggregation.

Keywords—Inhibition of platelet aggregation · adenosine 5'-diphosphate (ADP) · arachidonic acid · collagen

혈소판은 복잡한 내부구조를 갖는 미세한 혈 중 세포로서 정상적인 혈관 내피에는 부착하지 않으나 내피의 손상등 여러가지 자극에 의하여 손상된 내피에 부착 또는 혈소판 자체끼리의 응집을 일으킨다. 또한 이때 혈소판 내부로부터 adenosine 5'-diphosphate (ADP), thromboxane A₂ 등의 혈소판 응집유도 물질을 분비함으로써 더욱 응집을 촉진시킨다. 이와같은 성질에 의하여 혈소판은 혈관벽에 상처가 생겼을 때 platelet plug를 형성하여 또한 혈액응고 과정의 활성화로 출혈을 막는 중요한 역할을 한다. 그러나 비정상적인 혈소판의 활성화는 혈소판 응괴 및 혈전형성을 초래하여 폐쇄성 혈관 질환의 임상적 발현에 관여하게 된다.^{1,2)} 특히 심근경색증 및 뇌혈전증에서는 혈소판 응괴가 직접적인 원인이 되어 조직의 허혈을 초래하게 된다. 또한 혈소판에서 유리된 물질들은 혈관수축, 염증, 동맥경화성 혈관 질환의 임상적 발현에도 관련되고 있음이 밝혀지고 있다.³⁾

따라서 혈소판의 활성화를 억제시켜 혈소판 응집을 억제하는 약물들은 혈소판 응집으로 인한 혈전증 또는 혈소판 활성화에 의하여 발현하

는 다른 병적과정의 예방 및 치료에 유용하며 또한 혈소판 활성화의 작용기전 연구에도 기여할 것으로 기대된다.

저자들은 식물의 에기스 또는 이들의 용매분획들이 혈소판 응집에 미치는 영향을 검색하기에 적합한 검색방법인 modified smear method를 개발 하였으며 이 방법을 이용하여 18종의 식물로부터 조제한 54개의 용매분획들의 혈소판 응집억제 작용을 검색하여 이미 보고한바 있다.⁴⁾

이의 계속으로서 본 논문에서는 한방 또는 민간에서 고혈압 또는 중풍등 관계 질환에 사용되어온 20종의 식물생약을 선택하여 이들 생약으로부터 조제한 60종의 용매 분획들이 ADP, arachidonic acid (AA) 또는 collagen에 의하여 유도되는 혈소판 응집에 미치는 영향을 검색하였으며 이를 종합하여 보고하고자 한다.

실 험 방 법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 식물생약은 시중에서 구입하여 사용하였다. ADP(adenosine 5'-diphosphate

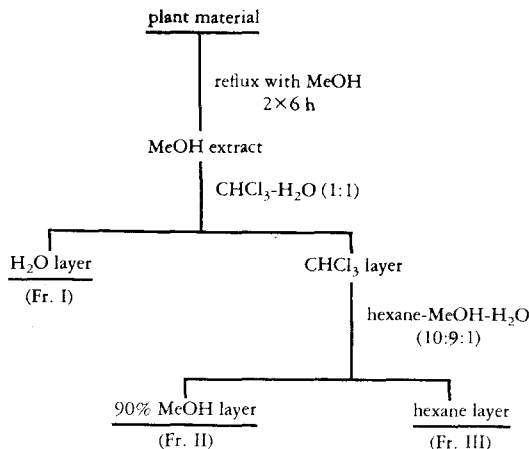
dicyclohexylammonium salt), AA(arachidonic acid sodium salt) 및 collagen (acid soluble, from calf skin)은 미국의 Sigma Chemical Company로부터 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물

서울대학교 실험동물 사육장으로 부터 구입한 응성의 Sprague-Dawley계 흰쥐 (220 ± 30 g)를 사용하였다.

3. 식물생약으로 부터 시료(용매분획)의 조제

Scheme 1의 방법에 의하여 각각의 생약으로부터 메타놀 에기스를 조제하고 이를 다시 용매로 분획하였다. 즉 메타놀 에기스를 CHCl_3 와 H_2O 로 분획하였으며 CHCl_3 층으로 부터 용매를 제거한 후 다시 hexane : MeOH : H_2O (10 : 9 : 1)로 분획한후 용매를 제거하여 H_2O 층 (Fr. I), 90% MeOH층 (Fr. II) 및 hexane 층 (Fr. III)을 조제하였으며 이들을 시료로서 사용하였다.



Scheme 1. Extraction and solvent fractionation of plant materials.

4. 혈소판 응집 억제 작용의 검색

a) Platelet rich plasma의 조제

CHCl_3 로 마취시킨 흰쥐의 심장으로부터 2.2% trisodium citrate를 넣은 plastic주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. Citrate (0.22%) 함유혈액을 $200 \times g$ 로 10분간 상온에서 원심분리 하여 상층액 platelet rich plasma (PRP)를 얻었다.

b) 혈소판 응집 억제 작용의 검색

각각의 시료는 생리식염수에 필요 농도를 용해시켜 사용하였으며 용해도가 낮은 시료의 경우

는 먼저 EtOH에 녹이고 homogenize하면서 생리식염수를 가해 최종 EtOH농도가 1%가 되도록 하여 사용하였다. 응집 유도 물질 용액들은 최종 농도가 ADP : 1×10^{-6} g/ml, AA : 6.5×10^{-5} g/ml, collagen : 6×10^{-6} g/ml가 되도록 생리식염수에 녹여 사용하였다. Plastic micro-pipette를 사용하여 PRP 0.16 ml를 프라스틱시험관에 옮기고 시료용액 (control의 경우에는 생리식염수 또는 EtOH-생리식염수) 0.02 ml를 가하여 혼합하고 응집유도 물질로서 AA나 collagen을 사용할 경우에는 37° 에서 2분 배양시키고 ADP를 사용할 경우에는 실온에서 2분 방치한 후에 응집유도 물질용액 0.02 ml를 넣고 10초동안 시험관을 흔들어 혼합한다. 응집유도 물질이 AA인 경우에는 37° 에서 4분간, collagen인 경우에는 6분간 배양시키고, ADP인 경우에는 실온에서 4분 방치한 후 glass slide에 smear하여 공기중에서 빨리 건조 시켰다. Smear 건조까지는 PRP 제조후 적어도 3시간 이내에 수행 하였으며 건조된 glass smear는 Wright-Giemsa 염색을 한후 물로 씻고 오븐에서 말려 oil-immersion objective lens를 써서 광학 현미경 (1,000 \times)하에서 slide를 상하 좌우로 움직이면서 관찰하여 다음의 기준에 의하여 각각의 slide에 있어서의 혈소판 응집 정도를 판정하였다. 즉 (-), PRP에 생리식염수만을 넣었을 때와 같이 혈소판 응집이 일어나지 않은 상태; (\pm), 약간의 혈소판 응집이 일어난 상태; (+), 혈소판 응집이 상당히 일어났으나 PRP에 혈소판 응집 유도 물질을 첨가했을 때 보다는 못 미치는 상태; (H), PRP에 혈소판 응집 유도 물질을 넣었을 때와 같은 정도의 응집이 일어난 상태; (H#), PRP에 혈소판 응집유도 물질만을 넣었을 때보다 혈소판 응집이 좀더 유도된 상태. 위의 판정 기준에 따라 PRP에 검체 시료와 혈소판 응집 유도물질을 같이 넣었을 때의 혈소판 응집도를 검색하였다.

결과와 고찰

한약 또는 민간약의 형태로서 증풍 또는 고혈압 관련 질환에 사용되어온 식물생약 20종을 검색시료로서 선택 하였다. 각각의 메타놀 에기스

Table I. Effects of plant preparations against adenosine 5'-diphosphate (ADP), arachidonic acid (AA) or collagen induced platelet aggregation

Plant name(Family name)	Parts of plants used ^{a)}	Fractions ^{b)}	Aggregating agents ^{c)}		
			ADP	AA	Collagen
Controls					
PRP(without aggregating agents)			— ^{d)}	—	—
PRP(with aggregating agents)			‡	‡	‡
<i>Aconitum pseudolaeve</i> var. <i>erectum</i> Nakai (Ranunculaceae)	ra	I	‡	+	+
		II	+	‡	+
		III	‡	‡	‡
<i>Alisma orientale</i> (Samuelsson) Juzepczuk (Alismataceae)	tu	I	+	+	+
		II	‡	‡	‡
		III	‡	‡	‡
<i>Angelica koreana</i> Maximowicz (Umbelliferae)	ra	I	‡	+	+
		II	—	—	—
		III	‡	‡	‡
<i>Aralia continentalis</i> Kitagawa (Araliaceae)	ra	I	‡	+	+
		II	‡	‡	‡
		III	‡	‡	+
<i>Arisaema amurense</i> var. <i>serratum</i> Nakai (Araceae)	tu	I	±	±	±
		II	‡	‡	‡
		III	‡	‡	‡
<i>Biota orientalis</i> Linne (Cupressaceae)	sm	I	‡	+	+
		II	‡	+	+
		III	‡	‡	±
<i>Cassia obtusifolia</i> (Linne) Endlicher (Leguminosae)	sm	I	+	±	±
		II	—	—	—
		III	‡	+	‡
<i>Clematis mandshurica</i> Maximowicz (Ranunculaceae)	ap	I	‡	‡	+
		II	‡	+	+
		III	‡	+	‡
<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i> Stapf (Gramineae)	sm	I	‡	+	+
		II	‡	‡	+
		III	‡	‡	+
<i>Corydalis ternata</i> Nakai (Papaveraceae)	rh	I	+	+	+
		II	+	+	+
		III	‡	‡	‡
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver (Eucommiaceae)	ba	I	‡	‡	‡
		II	‡	‡	‡
		III	‡	‡	‡
<i>Gastrodia elata</i> Blume (Orchidaceae)	tu	I	+	+	+
		II	—	—	—
		III	+	±	±
<i>Inula helenium</i> Linne (Compositae)	ra	I	±	±	±
		II	±	±	±
		III	‡	‡	‡
<i>Leonurus sibiricus</i> Linne (Labiatae)	ap	I	‡	‡	+
		II	‡	‡	‡
		III	‡	‡	‡
<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas (Ranunculaceae)	ra	I	+	±	±
		II	—	—	—
		III	‡	‡	‡
<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow (Paeoniaceae)	rb	I	‡	‡	‡
		II	+	+	‡
		III	‡	+	+
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge (Labiatae)	ra	I	—	—	±
		II	‡	‡	+
		III	‡	‡	‡

Plant name(Family name)	Parts of plants used ^{a)}	Fractions ^{b)}	Aggregating agents ^{c)}		
			ADP	AA	Collagen
<i>Saussurea lappa</i> Clarke (Compositae)	ra	I	##	+	+
		II	##	+	±
		III	+	±	±
<i>Scirpus maritimus</i> Linne (Cyperaceae)	tu	I	##	+	+
		II	##	+	##
		III	##	##	###
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller (Rhamnaceae)	sm	I	##	##	+
		II	##	##	±
		III	+	±	+

a) ap, aerial parts; ba, bark; fl, flower; fr, fruit; ra, radix; rb, root bark; rh, rhizome; sm, seeds; tu, tuber; sb, stem bark.

b) concentration of plant fractions; 5 mg/ml

c) ADP, 1×10^{-6} g/ml; AA, 6×10^{-5} g/ml; collagen, 6×10^{-6} g/ml

d) degrees of platelet aggregation induced: -, no aggregation; ±, slight aggregation; +, less aggregation; ##, as much aggregation with PRP plus aggregating agent alone; ###, more aggregation.

The data represent the average of minimum three testings.

를 Scheme I에서 보는바와 같이 Suffness and Douros의 방법⁵⁾에 의하여 세계의 용매분획으로 나누었으며 이들 60개의 용매분획들이 ADP, AA 또는 collagen에 의하여 유도되는 혈소판 응집도에 미치는 영향을 modified smear method⁴⁾로서 검색하여 이를 Table I에 종합하였다. 이때 PRP 자체를 smear하였을 때는 혈소판들이 응집을 일으키지 않은 상태(-)를, PRP에 응집유도 물질인 ADP, AA 또는 collagen을 가한후 smear하였을 때는 혈소판들이 응집을 일으킴을(+) 관찰할 수 있었다.

혈소판 응집 억제 작용을 갖는 물질은 이들 응집유도 물질에 의한 혈소판 응집을 감소시켜 응집도를(±) 또는 (-)로 낮추어 줄 것으로 기대되었다. 60개의 식물용매분획 시료를 각각 응집유도 물질과 함께 PRP에 가하였을 때 대부분의 시료들이 혈소판 응집에 거의 영향을 미치지 않음을(+ 또는 ##) 알 수 있었다. 그러나 *Angelica koreana*로부터 조제한 Fr. II를 비롯한 12개의 분획시료들이 두가지 이상의 응집유도 물질에 의한 혈소판 응집을 저해하여 응집도가(±) 또는 (-)를 나타내었으며 특히 이들중 *Angelica koreana*의 Fr. II, *Cassia obtusifolia*의

Fr. II, *Gastrodia elata*의 Fr. II, *Paeonia lactiflora*의 Fr. II, 및 *Salvia miltiorrhiza*의 Fr. I 들은 강력한 응집억제 작용을 나타내는 점으로 보아 이들 식물들이 혈소판 응집억제 작용 물질을 함유하고 있을 것으로 기대되어진다.

감사의 말씀—본 연구는 1985년도 문교부 학술연구 조성비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 감사드립니다.

〈1986년 2월 28일 접수 : 3월 25일 수리〉

참 고 문 헌

1. French, J.E.: *Semin Hematol.* 8, 84 (1971).
2. Stehbens, W.E.: "Pathology of the Cerebral Blood Vessels," C.V. Mosby Comp., St. Louis, p.116, 162(1972).
3. Hovig, T.: *Thromb. Diabeth. Haemorrh.* (Suppl.) 42, 137 (1970).
4. Yun-Choi, H.S., Kim, S.O., Kim, J.H., Lee, J.R. and Cho, H.I.: *J. Nat. Prod.* 48, 363 (1985).
5. Suffness, M. and Douros, J.: "Drugs of Plant Origin, Methods in Cancer Research XVI," Academic Press, Inc., New York, N.Y. p.73 (1979).