

## 은행, 은행잎 및 들깨잎에서 추출한 지용성 성분이 쥐의 혈소판 응집에 미치는 영향

박동기 · 박화진

건국대학교 자연과학대학 생화학과

### Studies on the Effects of Rat Platelet Aggregation by Ginkgo and Perilla Oil Dietary

Dong-Ki Park and Hwa-Jin Park

Dept. of Biochemistry, Kon-Kuk University, Seoul, 380-701, Korea

#### Abstract

This research was performed to observe the effect on aggregation of rat platelet treated with ginkgo and perilla oil which contain much linolenic acid. The numbers of platelet treated with ginkgo and perilla oil were  $2.7 \times 10^8/\text{ml}$  and  $4.7 \times 10^8/\text{ml}$ , respectively. These numbers were much less than control group (this group was  $7.5 \times 10^8/\text{ml}$ ). The ability of platelet aggregation treated with perilla oil and ginkgo oil was 1.4 folds less than control group. Concentrations of total cholesterol and free fatty acid in serum of rat treated with ginkgo and perilla oil group were almost equal to those of control group.

#### 서 론

식생활 향상과 식품 패턴의 변화와 더불어 식품에서의 유지 섭취량이 증가하고 있는 오늘날, 고지방 식품의 섭취는 동맥경화증, 심장병, 혈전증 등의 혈관 관련성 질환에 심각한 문제를 야기시키고 있다. 이들의 질환과 고지방질 식품간의 관계를 구명하기 위한 연구가 활발하게 행해지고 있다<sup>1)</sup>. Eicosapentaenoic acid(EPA)가 많이 함유된 어류를 다량 섭취한 경우, 지방산이 혈소판의 응집을 저하시킴으로써 심장 혈관 질환의 일종인 심혈전을 예방한다<sup>2-4)</sup>. 섭취한 식품 속에 포함된 유지의 지방산은 세포막 인지질의 구성단위 성분(building-block components)으로서의 기능을 가진다. 혈소판을 응집시키는 thromboxane  $A_2$ (TXA<sub>2</sub>)의 전구 물질은 arachidonic acid로서 외부 자극에 응답하여 혈소판 막의 인

지질로부터 유리된다<sup>5)</sup>. 따라서, 세포막의 기능을 조절한다는 관점으로 부터 EPA를 많이 함유하고 있는 정어리유(sardine oil)를 rat(Sprague-Dawley)에 투여하여 *in vivo*에서 혈소판 막의 인지질 구성 지방산중 혈소판을 응집시키는 TXA<sub>2</sub>의 전구 물질 즉, arachidonic acid를 혈소판의 응집을 억제시키는 thromboxane  $A_3$ (TXA<sub>3</sub>)의 전구 물질인 EPA로 전환시킴으로써 혈소판의 응집력을 조절할 수 있다고 본다<sup>6-8)</sup>. 이와 같은 결과는 섭취한 식품 속에 포함되어 있거나 식용 유지로 사용하는 유지의 양 및 구성 지방산의 종류에 따라 혈소판의 응집능에 차이가 있음을 시사하고 있다. 한편, linolenic acid 및 EPA 등의 고도 불포화 지방산은 동맥경화증 및 심장 질환의 주요 원인이 되는 혈청의 저 지단백(low density lipoprotein : LDL)의 함량을 저하시키는 작용이 있다<sup>9-12)</sup>. LDL은 유리형의 cholesterol과 유리형의 지방산을

많이 함유하고 있기 때문에 linolenic acid와 EPA등이 LDL의 양을 저하시켜, 동맥경화증 및 심장질환에 효과를 나타내는 것은 이들의 고도 불포화 지방산이 혈청의 유리형 cholesterol과 유리형 지방산의 함량에 변화를 일으키는데 기인 되는 것으로 생각할 수 있다. 실제로 고도 불포화 지방산은 혈청의 LDL 함량을 저하시킨다<sup>9)</sup>. 이와 같이 혈소판의 응집과 혈청의 유리형 cholesterol 및 유리형 지방산의 함량은 혈관 관련성 질환에 깊은 관계가 있다.

따라서, 본 연구는 구미 선진국 뿐만 아니라 우리 나라에서도 사망 원인의 제1순위가 되는 혈관 관련성 질환, 즉 혈전증에 혈소판 응집이 깊어 관련하고 있기 때문에 EPA의 전구 물질인 linolenic acid(n-3형)가 다량 함유되어 있는 은행유 및 들깨유를 rat에 투여하여 혈소판 응집능에 미치는 영향을 중점적으로 검토하고, 아울러 혈청의 cholesterol 및 유리 지방산 함량에 미치는 영향을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재 료

Arachidonic acid(<sup>14</sup>C<sub>20:4</sub>), acetonitrile, methanol, tetrahydrofuran 등은 Chem. Bio. Co.의 HPLC grade, chloroform, ether 등은 G.R.급을 사용하였으며, total cholesterol과 free fatty acid의 정량은 일수 제약(일본)의 kit시약을 사용하였다. 혈소판 응집능을 검토하기 위하여 fibrinogen을 사용하였다. 항 응고제인 ACD용액은 0.8% 무수 citric acid, 2.2% sodium citrate, 2.45% 무수 glucose를 혼합하여 제조하였다. Rat에 투여할 유지원으로서는, 은행(ginkgo) 및 은행잎은 1988년 9월 충북 충주시 충렬사 부근에서 채취하였으며, 은행은 음건시켜 껍질을 제거한 알맹이를, 은행잎은 신선한 것을 사용하였다. 들깨(perilla)는 충북 진천에서 1988년 9월에 수확 정선한 것이다.

### 은행 및 들깨로부터 지질의 추출

Morrison등<sup>13)</sup>의 방법에 의해 7kg의 은행 알맹이, 1kg의 은행잎 및 300g의 들깨를 3배의 chloro-

form : methanol(2 : 1, v/v) 혼합 용액으로 1시간 동안 균질화시켜 3회 추출한 다음, 다시 chloroform : methanol : H<sub>2</sub>O(8 : 4 : 3, v/v/v)로 분리한 다음, chloroform층을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 은행으로 부터 105g의 지방질을, 은행잎으로 부터 10g의 지방질을, 들깨로부터 194g의 지방질을 얻었다. 이들은 분석시까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

### 실험 동물

인삼연초연구소에서 분양받은 체중 150~180g의 male Sprague-Dawley rat를 기본 사료(제일 사료계, 실험 동물용 pellet)로 일주일 동안 적응시킨 다음 10마리씩을 1군으로 하여 대조군(C), 은행유 투여군(G), 은행잎유 투여군(T), 들깨유 투여군(P)으로 나누고, 이들에 corn oil, ginkgo oil, 은행잎 oil, perilla oil을 각각 하루에 2.5mg/kg씩 2주간 경구 투여한 다음 혈소판 제조 및 혈청 분리에서 사용하였다.

### 혈소판의 제조<sup>14)</sup>

Rat를 개복하여 복대동맥에서 10ml를 채혈한 후 항응고제인 ACD용액을 9 : 1(v/v)의 비율로 넣은 다음 1,100rpm에서 10분간 원심분리시켰다. 상정액을 취하고 침전물을 다시 1,100rpm에서 10분 동안 원심분리시킨 다음 상정액을 원래의 상정액에 합하여 다시 700rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 상정액만 취한 다음 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 침전물인 혈소판을 분리하였다. 분리한 혈소판을 tyrode buffer(138mM NaCl, 27mM KCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5mM glucose, 1mM EDTA, pH 6.4)로 씻은 다음 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 침전물인 혈소판을 5ml의 washing buffer(138mM NaCl, 27mM KCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5mM glucose, 2.6mg/ml gelatin, pH 7.4)로 3번 세척하여 EDTA를 제거시킨 다음 washing buffer 5ml로 혈소판 suspension 용액을 제조하였다.

### 유지의 지방산 조성의 분석

Rat에 투여할 은행유 및 옥수수유, 들깨유의

Table 1. GLC conditions for fatty acid analysis

Item	Conditions
Mobile phase	acetonitrile : methanol : tetrahydrofuran(45 : 45 : 25 v/v/v)
Column	NH <sub>2</sub> column
Flow rate	0.7ml/min
Detector	U.V.(254nm)
Chart speed	0.5mm/min

지방산 조성중 linolenic acid만의 조성을 분석하기 위해 HPLC(Gilson 702)를 이용하였으며, 그 분석 조건은 Table 1과 같다.

#### <sup>14</sup>C<sub>20:4</sub> labeling<sup>14)</sup>

혈소판 suspension용액(pH 7.4)에 <sup>14</sup>C<sub>20:4</sub>를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 incubation시킨 다음, 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 유리 상태의 <sup>14</sup>C<sub>20:4</sub>를 제거시키고, washing buffer(pH 7.4)로 세번 세척하였다. 이 세척한 혈소판은 washing buffer로 suspension시켜 혈소판의 수 및 혈소판의 응집능 측정에 이용하였다.

#### 혈소판의 응집력 측정<sup>14)</sup>

대조군, 들깨유 투여군을 저온에서 2분간 preincubation시킨 다음 은행유 투여군 및 은행잎 투여군의 rat로 부터 제조한 세척 혈소판(10<sup>8</sup>/ml) suspension을 37°C에서 2분간 preincubation시킨 다음 20, 40, 60 및 80μl의 혈장속 혈액응고 인자인 fibrinogen을 첨가하여 혈소판응집을 측정하였다. UV visible spectrophotometer(Shimadzu 160, Tokyo)의 cell속에서 37°C, 1분 동안 반응시켜 560nm에서 그 흡광도의 변화로 혈소판 응집능을 측정하였다.

#### Total cholesterol의 정량

Fujino<sup>15)</sup>의 방법에 의하여 total cholesterol을 측정하였다. 각 시험관에 rat혈청 0.02ml, 표준용액 0.02ml, 증류수 0.02ml를 각각 넣고 측정용액 3.0ml를 각 시험관의 기벽을 따라 넣고 혼합하여 37°C water bath에서 10분간 가온후, 시약 blank를 대조로 하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Free fatty acid의 정량

Fujino<sup>15)</sup>의 방법에 의하여 non-esterified fatty acid을 정량하였다. 각 시험관에 혈청 0.05ml, 표준용액 0.05ml, 증류수 0.05ml를 넣고 측정용액 1.0ml를 각각 가하여 37°C water bath에서 5분간 가온한 다음, 시약 blank를 대조로 하여 555nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

Rat에 2주일간 경구투여할 유지의 지방산중, 혈소판의 응집을 억제시키는 EPA의 전구물질인 linolenic acid(18:3)만을 HPLC로 분석한 결과, corn oil에서는 10%, perilla oil에서는 66%, ginkgo oil에서는 15%가 함유되어 있었다(Table 2). 즉 perilla oil에는 corn oil과 ginkgo oil에 비해 상당한 양의 linolenic acid가 함유되어 있기 때문에 이들의 유지를 rat에 투여했을 경우에 thrombosis(혈전증)이나 고혈압에 상당한 효과가 있을 것으로 예상된다. 따라서 대조군에는 corn oil만을, 은행유투여군에는 은행유만을, 들깨유 투여군에는 들깨유만을 rat의 체중 kg당 매일 2.5 mg씩 2주간 경구투여했다. 그 결과 corn oil투여

Table 2. Composition of linolenic acid in the feeding oils

	Corn oil	Perilla oil	Ginkgo oil
Linolenic acid(%)	10	66	15

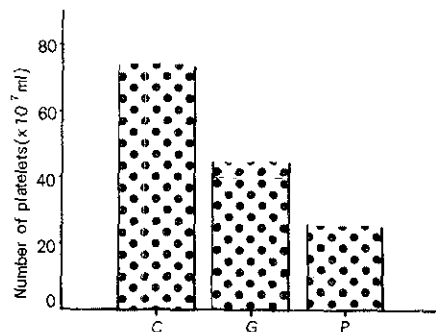


Fig. 1. Number of platelets from rat fed different oil.

C : corn oil, G : ginkgo oil, P : perilla oil

군의 혈소판수가 혈액 1ml당  $7.5 \times 10^8$ 개이고, 은행유 투여군과 들깨유 투여군은 혈액 1ml당 각각  $4.7 \times 10^8$ 개 및  $2.7 \times 10^8$ 개의 혈소판을 함유하고 있다(Fig. 1). 또한, 은행잎유 투여군의 혈소판의 수는 은행유 투여군의 그것과 큰 차이가 없었다(실험결과는 생략함). 혈소판의 수의 계산에 있어서 다소 오차가 있을 수 있고, 복대동맥으로부터 혈액을 채취할 때 다소의 응고상태에서 비롯되는 혈소판의 손실 또는 rat의 건강 상태에 따라 혈소판의 수가 증가 또는 감소될 수 있다고 생각한다. 그러나 혈소판의 수가 경구투여한 oil의 종류에 따라 다른 사실은 혈전성 이상에 영향을 미친다고 본다. 왜냐하면, 혈전성 이상은 항상 혈소판의 수와 그 기능에 따라 분류하기 때문이다<sup>16)</sup>.

유지의 종류에 따라 식이시킨 rat로 부터 얻은 세척 혈소판을 fibrinogen의 농도를 변화시키면서 응집반응시킨 결과, 유의차를 볼 수 있는 것은 fibrinogen  $80 \mu\ell$ 로 반응시켰을 때이다. Linolenic acid가 10% 함유된 corn oil을 투여시킨 대조군에서의 응집반응보다 linolenic acid가 각각 66%, 15% 함유된 들깨유 및 은행유를 투여했을 때 응집반응이 낮다(Fig. 2). 이것은 투여한 유지의 linolenic acid의 함량에 비례된 것이다. 식용으로 섭취한 유지중의 지방산은 체내에서 사슬연장(chain elongation)과 불포화화(desaturation)의 과정을 거쳐, 여러종류의 지방산으로 대사되는

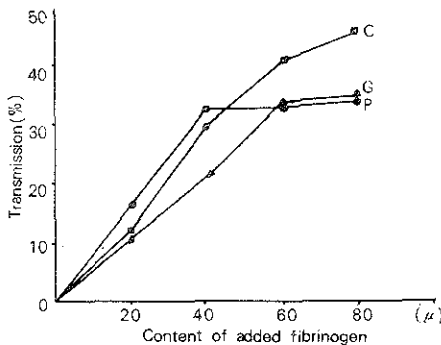


Fig. 2. Aggregation of rat washing platelets by stimulation of fibrinogen.  
 ■ : (C) Corn oil, ▲ : (G) Ginkgo oil, ● : (P) Perilla oil

때, linolenic acid는 eicosapentaenoic acid(20:5)로 대사되어 prostaglandin의 전구물질이 된다. 이 지방산으로부터는 prostaglandin  $G_3$ ,  $H_3$ ,  $D_3$ ,  $E_3$ ,  $I_3$ , 및 thromboxane  $A_3$ 등 3개의 이중결합을 가진 eicosanoids가 생성되는데, 이들중 thromboxane  $A_3$ 는 혈소판의 막의 인지질에 결합되어있는 eicosapentaenoic acid가 외부의 응집자극에 의해 세포질로 유리되어 대사된다. 이것은 혈소판의 응집을 억제시키는 작용이 있다. 한편, 혈소판을 응집시키는 thromboxane  $A_2$ 는 이중결합을 두개 가지고 있는 eicosaenoic acid로서 혈소판 막의 인지질에 결합되어 있는 arachidonic acid(20:4)가 그 전구물질이 되며, 이것은 linoleic acid로부터 대사된 것이다. 따라서 들깨유, 은행유를 rat에 경구 투여했을때, 이들의 유지에 함유되어있는 많은 양의 linolenic acid(66%)가 linoleic acid의 대사를 억제시켜 arachidonic acid로의 전환을 억제함과 동시에 eicosapentaenoic acid로 전환되어 혈소판막의 인지질에 축적될 것으로 추측된다. 따라서 eicosapentaenoic acid가 fibrinogen의 자극에 의해 혈소판의 인지질로부터 유리되어 thromboxane  $A_3$ 로 전환되어 결과적으로 corn oil의 투여군보다 들깨유 및 은행유의 투여군에서의 혈소판 응집능이 억제된 것으로 생각할 수 있다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 미루어 들깨유와 은행유가 동맥경화증, 혈전증 등의 혈관 관련성 질환에 효과가 있을 것으로 기대된다. Table 3은 각종 유지를 투여한 rat로 부터 얻은 혈청에 함유되어 있는 총 cholesterol 및 유리 지방산의 조성을 화학적인 방법으로 조사한 것이다. 들깨유 투여군의 혈청에 함유되어있는 총 cholesterol의 양은 corn oil 투여군의 그것과 비슷하지만, 은행유 투여군의 그것은 corn oil의 투여군 보다 약간

Table 3. Compositions of lipids in rat serum with feeding oils

	Total cholesterol (mg/dℓ)	Free fatty acid (μ eq/ℓ)
Corn oil	39.24	523.07
Ginkgo oil	43.24	836.15
Perilla oil	40.84	543.07

높았다. Linoleic acid 및 linolenic acid가 많이 함유된 투여군에서 cholesterol의 농도가 낮아진다는 보고도 있으나, linolenic acid(18:3)의 함량에 따라서 또는 많은 양의 linoleic acid(18:2)를 섭취했을 경우 혈청 cholesterol의 양이 저하한다<sup>8)</sup>. 이와 반대로, linolenic acid(18:3)가 많이 함유된 유지 즉, 들깨유나 은행유를 투여했을 경우, linolenic acid가 적게 함유된 corn oil을 투여했을 경우 보다 혈청 cholesterol의 양이 높을 것으로 생각된다. 따라서 Table 3에 표시한 결과들은 Goodnight<sup>8)</sup> 등의 결과와 거의 일치한다고 볼 수 있다.

한편, 혈청의 유리 지방산 함량은 은행유의 투여군에 가장 많이 함유되어있고, corn oil과 들깨유 투여군에서는 그 유의차를 찾아볼 수 없다 (Table 3). 이것은 은행유 투여군 혈청중의 총 cholesterol의 양이 다른 투여군에 비해 높다는 것으로 부터 은행유 투여군 혈청의 유리 지방산은 지방조직의 지방질 분해에 의해 생기기 때문이라고 생각된다. 또한 corn oil의 투여군보다 은행유 및 들깨유 투여군에서 총 cholesterol의 양이 높다고 하여 반드시 나쁠 것이라고는 생각할 수 없다. 혈관 관련성의 질환에 악영향을 미치는 것은 유리형의 cholesterol이며, 각 투여군에서 나타난 총 cholesterol의 양으로는 혈관 관련성의 질환에 좋고 나쁨을 판단하기 어렵다. 왜냐하면 cholesterol이 생체내에서도 생합성되어 hormone 등의 전구물질이 되기 때문이다. 또한 대조군 (corn oil)과 은행유 및 들깨유 투여군에서의 총 cholesterol양이 거의 비슷하기 때문이다. 이것은 반드시 경구 투여한 유지의 종류에만 기인하는 것이 아니라는 것을 의미한다.

이상의 결과들로 부터, linolenic acid가 많이 함유된 들깨유 투여군 또는 은행유 투여군이 linolenic acid가 적게 함유된 corn oil 투여군 보다 혈소판 응집능이 저하되고 총 cholesterol의 양에 있어서도 일반적으로 알려져있는 사실과 거의 일치하고 있어 혈소판 관련성 질환에 효과가 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

Linolenic acid를 다량으로 함유하고 있는 들깨유, 은행유를 rat에 투여하여 혈소판 응집능에 미치는 영향을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 은행유 및 들깨유를 투여한 쥐의 혈청중 혈소판의 수는 각각  $2.7 \times 10^8/\text{ml}$ ,  $4.7 \times 10^8/\text{ml}$ 였다. 이 수치는 대조군( $7.5 \times 10^8/\text{ml}$ )에 비해 현저하게 낮았다. 은행유와 들깨유를 투여한 혈청중 혈소판 응집능은 대조군 보다 1.4배 낮았다. 은행유와 들깨유를 투여한 rat의 혈청중 총 cholesterol과 유리 지방산의 함량은 대조군과 유의차를 나타내지 않았다.

위와 같은 결과로 부터 linolenic acid가 다량으로 함유된 들깨유 및 은행유는 혈소판 관련성 질환에 효과가 있을 것으로 생각된다.

## 사 사

본 논문은 1987년 문교부 학술 연구 조성비 (대학부설 연구소)의 지원에 의해 이루어졌음.

## 문 헌

1. Sevansson, L. : The effect of dietary partially hydrogenated marine oils on desaturation of fatty acids in liver microsomes. *Lipid*, 18, 171(1983)
2. Bang, H.O., Dyerberg, J. and Nielson, A.B. : Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic west-coast eskimos. *Lancet*, 1, 1143 (1971)
3. Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S. and Vane, J. R. : Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet*, II, 117(1978)
4. Bang, H.O., Dyerberg, J. and Sincclair, H.M. : The composition of the eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 2657(1980)
5. Dyerberg, J., Bang, H.O. and Hjorne, N. : Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenlandic eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 958 (1975)

6. Stubbs, C.D. and Smith, A.D. : The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochem. Biophys. Acta.*, 779, 89(1984)
7. Lokesh, B.R., Bruckner, G. and Kinsella, J.E. : Reduction in thromboxane formation by n-3 fatty acid enriched lung microsomes from rat and guinea pig following the ingestion of dietary menhaden oil. *Prostaglandins Leukotriens Med.*, 15, 337(1984)
8. Goodnight, S.H., Harris, W.S., Connor, W.E. and Illingworth, D.R. : Polyunsaturated fatty acid, hyperlipidemia and thrombosis. *Arteriosclerosis*, 2, 87(1982)
9. Taussant, M.J. Wilson, M.D. and Clarks, S.D. : Coordinate suppression of liver acetyl-Co A carboxylase and fatty acid synthetase by unsaturated fats. *J. Nutr.*, 111, 146(1981)
10. Phillipson, B.E., Rothrock, D.W., Connor, W.E., Harris, W.S. and Illingworth, D.R. : Reduction of plasma lipid, lipoproteins and apoproteins by dietary fish oil in patients with hypertriglyceridemia. *N. Engl. J. Med.*, 312, 1210(1985)
11. Nestel, P.J., Connor, W.E., Reardon, M.R., Connor, S., Wong, S. and Boston, R. : Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J. Clin. Invest.*, 74, 82(1984)
12. Harris, W.S., Connor, W.E. and McMurry, M.P. : The comparative reduction of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats : Salmon oil vs vegetable oil. *Metabolism*, 32, 179(1983)
13. Morrison, W.R., Tan, S.L. and Hargin, K.D. : Methods for the quantitative analysis of lipids in cereals and similiar tissues. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 329(1980)
14. Kito, M., Narita, I.L. and Takamura, I.L. : Phosphoinositide breakdown as an indirect link between stimulation and aggregation of rat platelets by thrombin and collagen. *J. Biochem.*, 97, 765(1985)
15. 脂質分析法 入門, 藤野安彦 著 學習出版 センタ, 日本, 東京, pp. 134(1980)
16. 山中學 植田 編 : 血小板, 日本, 東京, pp. 189 (1982)

(1990년 2월 20일 접수)