

정향 추출물의 항응고 활성양식 및 *In vivo* Test

이종임 · 이현순* · 전주진 · 유광원 · 신동훈[†] · 홍범식 · 조홍연 · 양한철

고려대학교 생명공학원
*고려대학교 생명공학연구소

Anticoagulation Activity Pattern and *In vivo* Test of Extract from *Eugenia caryophyllata*

Jong-Im Lee, Hyun-Sun Lee*, Woo-Jin Jun, Kwang-Won Yu, Dong-Hoon Shin[†],
Bum-Shik Hong, Hong-Yun Cho and Han-Chul Yang

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

The EC-2B and EC-2C fractions were isolated from the alkali extract of *Eugenia caryophyllata* by ethanol precipitation, cetavlon treatment and ultrafiltration. EC-2B fraction only prolonged the clotting time at activated partial thromboplastin time (APTT), but EC-2C fraction prolonged the clotting time at both APTT and thrombin time (TT). Antiplatelet activity was observed in both fractions. The EC-2B and EC-2C were not toxic upon oral administration. The EC-2B fraction showed no toxicity up to 1,000 mg/kg (mouse, intravenous), while the EC-2C fraction was 322 mg/kg of LD₅₀. The *in vivo* anticoagulant activities of two fractions were compared at the dose adjusted to 60% survival rate *in vitro*. The *in vivo* activities were 131 mg/kg for EC-2B and 58 mg/kg for EC-2C, magnifying the difference in activity between two fractions compared to *in vitro* activities. After sulfating these two fraction, an increase in the anticoagulant activity was observed in both EC-2B and EC-2C; especially, the activity of EC-2B fraction was dramatically increased.

Key words: *Eugenia caryophyllata*, anticoagulant, *in vivo*, sulfation

서 론

천연물중에서 혈전의 생성을 억제하는 항응고 활성물질에 관한 연구는 그간 다수 진행되어 왔는데 대표적으로, 소나 돼지의 장 점막에서 분리한 mucopolysaccharide인 heparin(1), 해조류 등에서 분리한 함황성 다당류인 fucoidan(2), 거머리 등에서 분리한 단백질 성분인 hirudin(3), 미생물 대사에서 분리된 수종의 peptide 성분(4) 및 새우, 게 등의 갑각류의 껍질 등의 절족동물의 외골격이나 연체동물의 기관, 곰팡이, 효모, 버섯 등 진균류의 세포벽 등에 함유되어 있는 동물성 mucopolysaccharide인 키틴과 키토산(5) 등의 항응고 활성이 보고되어 왔으며 이러한 항응고성 물질은 heparinoid의 제조(6), sulfation(7), 산 또는 효소를 이용한 저분자화(8) 등의 방법으로 활성의 향상을 도모하는 방향으로도 연구가 활발히 진행 중에 있다.

가장 광범위하게 사용되고 있는 항응고제인 heparin의

연구 경향은 효소나 산에 의해 가수분해되어 생성된 low molecular weight heparin(LMW heparin)으로 표준 heparin에 비해 antithrombin활성은 감소하지만 factor Xa에 대한 항응고 활성이 증가되며, 혈소판 응집 억제능과 체내 반감기의 증가 및 장기 투여시 출혈에 대한 안전성 등의 이유로 최근 활발히 연구되고 있다(9). 또한 heparin은 antithrombin III(AT III)과 결합함으로써 AT III의 항응고 활성을 증폭시켜 항응고 활성을 나타내는데 이 두 물질 사이의 결합 부위는 명확히 밝혀지지 않았으나 heparin의 negative charge 즉 황산기와 AT III 사이에서의 정전기적 상호결합(electrostatic interaction)이라고 보고되고 있다(9). 따라서 heparin 계통의 항응고성 물질에 있어서 황산기는 필수적인 부분이며 그 함량에 따라 활성이 좌우된다(7).

기능성 식품이란 말은 1984년 일본의 특정 연구과제에 서부터 사용되었으며 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법을 이용, 해당식품의 기능을 특정 목적에 적용, 발

[†]To whom all correspondence should be addressed

현하도록 부가가치를 부여한 식품군으로 분류하고 있다(10). 본 연구자들은 국내에서 상용되는 허브, 양념채소 및 건강채소 등을 대상으로 항응고 활성을 검색하여 정향(*Eugenia caryophyllata*, clove)의 항응고 활성을 확인할 수 있었다(11).

본 연구는 정향의 기능성 식품화에 있어 정향 추출물의 항응고 활성 양식 검토, *in vivo*에서의 독성 검사와 활성 확인 및 최근 연구 추세에 맞추어 정향 추출물의 sulfation에 의한 구조 변화시 활성의 변화를 확인하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 정향은 항원 스파이스사(Seoul, Korea)에서 홀랜드산을 구입하여 사용하였으며 항응고 활성 측정용 시약인 Dade[®] Actin[®] Activated Cephaloplastin reagent와 thrombin(bovine)는 Dade사(New York, USA) 제품을 사용하였다.

정향 추출물의 제조

정향 1,600 g을 1.0 N NaOH로 70°C에서 추출한 추출물(EC-0)을 3배의 에탄올 침전을 실시하여 고분자 획분인 crude extract(EC-1)로 분획하였다. 조획분 EC-1을 이온강도에 따라 분획하기 위하여 8% cetavlon(cetyltrimethyl ammonium bromide)을 처리하여 그 침전물인 EC-2 획분을 얻었으며, EC-2 획분은 Prep/Scale-TFF Cartridges(Millipore, Bedford, USA) 및 10 KDa와 100 KDa regenerated cellulose cartridge(Millipore, Bedford, USA)를 이용하여 한외여과를 실시하여 분자량별로 분자량 10 KDa이하인 획분 EC-2A와 10~100 KDa인 EC-2B 및 100 KDa 이상인 EC-2C 획분으로 분획한 후 항응고 활성이 유지되는 EC-2B와 EC-2C 획분을 동결건조하여 시료로 사용하였다.

항응고 활성 양식의 측정

정향추출물 EC-2B와 EC-2C 획분의 항응고 활성 측정은 10인 이상의 성인으로부터 채혈한 혈장과 blood coagulation analyzer(Clots 1A, Hospitex Diagnostics, Italy)를 이용하여 activated partial thromboplastin time(APTT)과 thrombin time(TT)을 3회 반복 측정하여 평균 응고시간을 측정하였다(12).

혈소판 응집 억제능 검사(platelet aggregation test)

혈소판 응집능 측정은 human platelet rich plasma (PRP)와 human platelet poor plasma(PPP)를 이용하여 adenosine diphosphate(ADP), collagen, epinephrin 및

ristocetin(Sigma Chem. Co., ST. Louis. Mo., USA)에 대한 응집 억제능을 platelet aggregator(PAP-4C, BIO/DATA Co., USA)를 이용하여 측정하였다(13).

독성검사

실험동물

국립보건원에서 4주령 ICR계 mouse(웅성)를 분양받아 1일 11시간씩(오전 9시~오후 8시) 점등하에서 22±1°C, 습도 55±15%의 환경에서 물(정제수)과 extruder pallet형의 사료(실험동물 I, 삼양사료)를 자유로이 급식시키면서 1주 적응시킨 후 사용하였다.

경구투여에 의한 독성검사

순화기간 중 건강하다고 판단된 동물에 대하여 체중을 측정하고 체중이 25±1 g에 개체를 선택하여 무작위로 이용, 군 분리를 실시하였다. 투여군은 모두 10마리씩으로 구성하였다. 급성독성은 시료를 1,000 mg/kg로 제조하여 1회 투여후 일주일 동안 관찰하였으며 만성 독성은 시료는 50 mg/kg의 농도로 제조하여 30일간 오전 11~12사이에 시료를 투여하였다. 각 시료는 식염수에 용해하여 여과, 멸균, 밀봉하여 냉장보관하면서 사용하였으며 투여량은 개체당 10 mL/kg으로 실시하였다.

꼬리정맥 투여에 의한 독성 실험

군분리는 상기와 동일하게 실시하였으며 시료는 멸균된 식염수에 용해시킨 후 농도를 달리하여 10마리를 1군으로 하여 농도별로 0.1 mL을 꼬리정맥에 주입한 후 1시간 간격으로 관찰하였으며 48시간까지 관찰 후 생존한 마리수를 측정하였다.

마우스 모델계에서의 항응고 효과

Thrombosis에 대한 항치사성 효과는 10마리를 한 군으로 하여 시료를 농도를 달리하여 마우스(25±1 g) 꼬리정맥에 0.1 mL 주입한 15분 후 thrombin을 주입한 다음 30분 동안의 사망, 전신마비 및 회복되는 마리수를 측정하였다(14). Thrombin의 투여량은 30마리를 1군으로 하여 10%의 생존율을 갖는 투여량으로, 100 units/mL의 농도로 0.12 mL 투여하였다.

화학적 수식 변화에 따른 항응고 활성의 변화

EC-2B와 EC-2C 획분 50 mg을 각각 10 mL의 distilled pyridine으로 3회 탈수하여 100 mL의 pyridine에 분산시킨 후, chlorosulfonic acid-pyridine(100 mL의 distilled pyridine에 15 mL의 ClSO₃H)을 가해 교반하면서 90분 동안 가열 환류 후 원심분리하여 얻은 잔사를 냉각수에 분산하고 0.1 N NaOH를 이용, pH 9로 조정후 3배의 ethanol을 첨가하여 침전시켰다(15). 침전물을 증류수에 투석, 동결건조하여 sulfation된 시료로 사용하였

다. 화학적 수식변화에 따른 항응고 활성의 변화는 각각의 시료(EC-2B, EC-2C, sulfated EC-2B 및 sulfated EC-2C)를 멸균된 식염수에 용해시킨 후 농도를 달리하여 마우스(25±1 g) 꼬리정맥에 0.1 mL씩 투여하고 30분 경과 후 심장채혈법으로 0.9 mL의 혈액을 취한 후 3.8% sodium citrate 용액 0.1 mL과 혼합하여 PPP를 취하여 APTT와 TT를 측정하였다.

결과 및 고찰

혈액응고계에서의 활성 양식 검색

정향으로부터 추출 분리한 항응고 활성획분 EC-2B와 EC-2C의 APTT와 TT를 측정한 결과 10만 이상의 분자량으로 추정되는 EC-2C 획분은 APTT와 TT에서 모두 응고시간이 증가되었으나 10만 이하의 분자량으로 추정되는 EC-2B 획분은 APTT만을 증가시킬 뿐 TT는 증가하지 않았다(Fig. 1). 따라서 EC-2B 획분은 내인성 경로의 factor Xa만을 EC-2C는 내인성경로와 공통경로

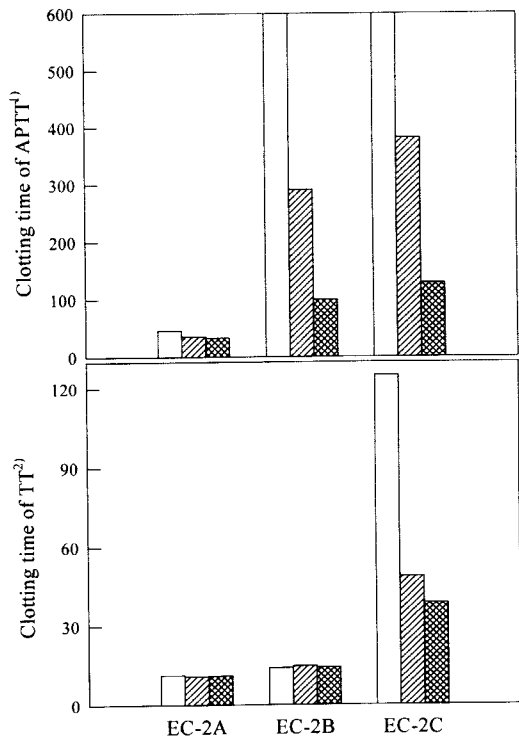


Fig. 1. Anticoagulant activities of subfractions by prep-scale ultrafiltration.

EC-2A is 8% cetavlon fraction of *Eugenia caryophyllata* with below 10 kDa, EC-2B is with 10~100 kDa, and EC-2C is with above 100 kDa.

¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time and its control time was 30 sec.

²⁾Clotting time of thrombin time and its control time was 12 sec.

□: 500 µg/mL, ▨: 250 µg/mL, ▩: 100 µg/mL.

의 thrombin에서 동시에 항응고 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

Heparin는 thrombin과 factor Xa 모두에 항응고 활성을 가지고 있으나 가수분해된 low molecular weight heparin(LMW heparin)은 thrombin에 대한 항응고 활성이 감소하는 것으로 알려져 있다(9). Fig. 1의 결과로부터 EC-2C 획분은 heparin 계통의 항응고 물질로 EC-2B 획분은 LMW heparin 계통의 항응고 물질로 추정할 수 있다.

혈소판 응집억제능

혈소판은 복잡한 내부 구조를 갖는 미세한 혈중 세포로 여러 자극에 의해 손상된 내피에 부착(adhesiveness) 또는 혈소판 자체끼리의 응집(aggregation)을 일으키면서 platelet plug를 형성한다(16). 따라서 비정상적인 혈소판의 활성화는 혈소판 응괴 및 혈전 생성을 초래하며 특히 심근경색 및 뇌혈전증에서는 혈소판 응괴가 직접적인 원인이 되어 혈전 생성을 초래하는 것으로 보고되고 있다(17).

EC-2B와 EC-2C의 혈소판 응집능을 측정한 결과, EC-2B(Fig. 2(A))와 EC-2C(Fig. 2(B))에서 모두 혈소판 응집억제능을 관찰할 수 있었으며 특히 EC-2B가 EC-2C보다 혈소판 응집억제능이 높음을 알 수 있었다. 정상적인 혈액은 측정 30초 이내에 응집 유도물(ADP, collagen, epinephrin 및 ristocetin)에 의해 50% 이상의 응집이 일어나지만 EC-2B획분은 측정 1분이 지나도록 collagen

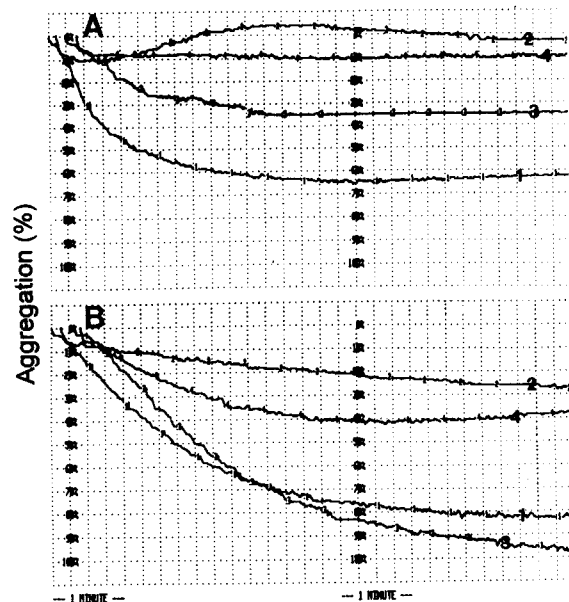


Fig. 2. The profile of blood platelet aggregation test with EC-2B (A) and EC-2C (B).

1. ADP (adenosin diphosphate, 2.0 µM)
2. Collagen (0.19 mg/mL)
3. Epinephrin (1.0 mg/mL)
4. Ristocetin (1.2 mg/mL)

과 ristocetin에 대한 응집이 10% 미만으로 높은 항혈소판 활성이 있음을 확인할 수 있었다. LMW heparin은 heparin에 비해 항응고 활성은 감소하지만 혈소판에 대한 응집억제능을 가지게 된다고 보고되고 있다(9). 이는 기존의 연구와 비교시, 두 물질의 항응고 양식과 항혈소판 활성 양식이 일치함을 알 수 있었다.

독성검사

최근 안전성의 개념은 “위험하지만 그 위험이 무시될 수 있거나 또는 이득이 더 크기 때문에 받아들일 수 있는 위험(acceptable risk)”을 의미한다. 본 연구에서 높은 항응고 활성을 가지고 있는 정향 추출물 EC-2B와 EC-2C 희분의 경우, 급성 경구 독성(1,000 mg/kg, single injection)에서는 관찰기간 동안 사망의 예는 관찰되지 않았다(결과생략). 또한 만성 경구 독성검사를 위해 30일간 시료 투여 후, 체중의 변화를 측정된 결과 두 희분 모두 투여기간 중 사망한 개체는 없었으나 EC-2B는 대조군보다 높은 평균체중을 유지하였으며 EC-2C는 대조군보다 낮은 체중 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

정향 추출물들을 농도를 달리하여 꼬리정맥으로 투여한 후 독성을 측정된 결과 EC-2B 희분은 1,000 mg/kg에서도 사망한 개체가 없었으나 EC-2C 희분은 500 mg/kg 투여시 1시간 이내에 개체의 90%가 사망하는 독성을 보였다(Fig. 4). 이것의 LD₅₀(mouse, intravenous)은 322 mg/kg으로 heparin(750 mg/kg)이나 chitosan(775 mg/kg)보다 높은 독성을 가지고 있음을 시사하는 것으로(18) 향후 보다 큰 실험동물들을 이용하여 각종 장기 및 혈액학적 검사의 수행이 필요할 것으로 사료된다.

마우스 모델에서의 항응고 활성 측정

EC-2B와 EC-2C 두 희분의 *in vivo* 상에서의 항응고

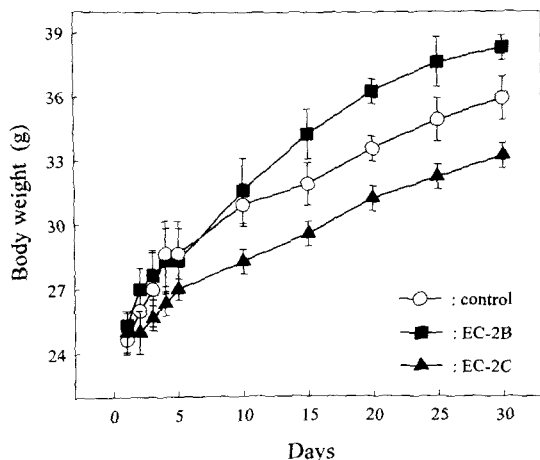


Fig. 3. Changes of body weights in mice orally administered for 30 days.

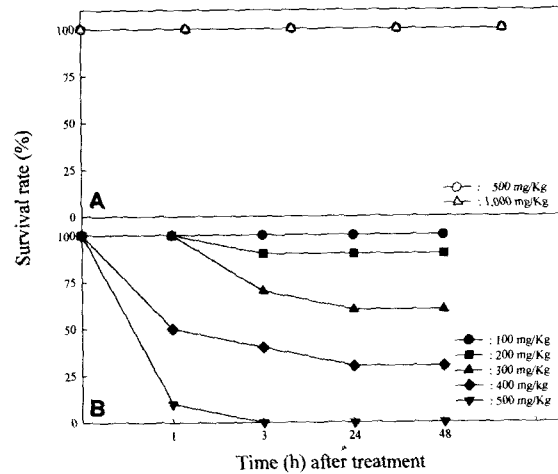


Fig. 4. *In vivo* acute toxicities of EC-2B (A) and EC-2C(B). Sample was administered intravenously into the tail veins of mice. Survival ratio (%) expressed as the percentage of No. of alive mice to No. of all tested mice.

활성을 60% 생존율을 갖는 dose로 표시한 결과 EC-2B는 131 mg/kg인데 비해 EC-2C는 58 mg/kg로 활성의 차이가 *in vitro*에서 보다 크게 나타났다. 이것은 EC-2B 희분은 내인성 경로에서만 항응고 활성을 나타내는데 비해 EC-2C 희분은 내인성과 공통경로에서 모두 항응고 활성을 나타내어 결과적으로는 더 강력한 항응고 활성을 갖는 것으로 추정된다(Fig. 5).

화학적 구조에 따른 활성의 변화

항응고 활성을 가지는 함황성 다당의 경우 황산기의 함량이 항응고 활성에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다(7). 따라서 정향으로부터 추출한 항응고 물질 또한 황산기와 활성의 상관성을 확인하기 위하여 sulfation시 환

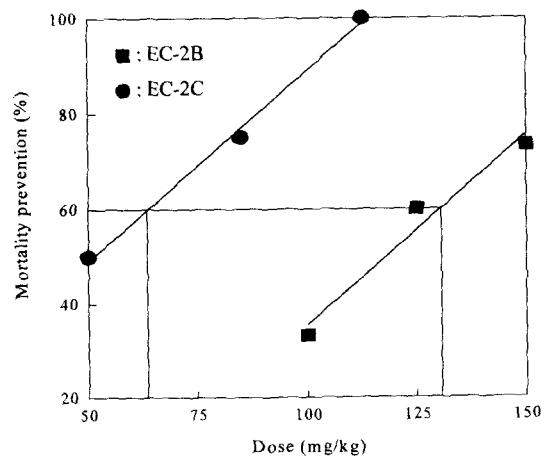


Fig. 5. Effects of clove extracts on the thrombin-induced thrombosis in mice.

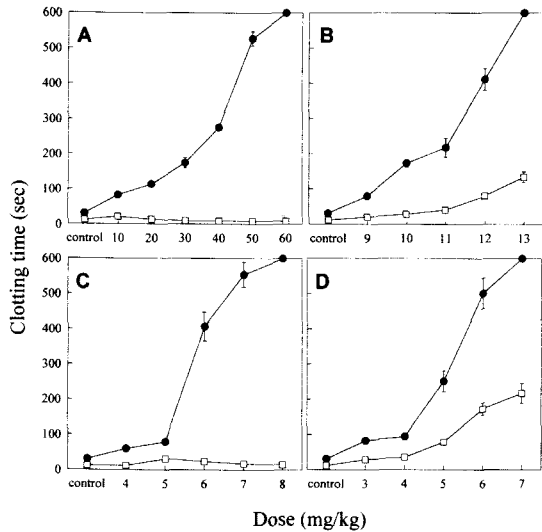


Fig. 6. *Ex vivo* anticoagulant activities in mice. A: EC-2B, B: EC-2C, C: sulfated EC-2B, D: sulfated EC-2C. ●: activated partial thromboplastin time, □: thrombin time.

성의 변화를 확인하였다.

EC-2B, EC-2C, sulfated EC-2B 및 sulfated EC-2C 획분을 각각 꼬리 정맥에 주입한 다음 심장채혈법으로 혈액을 취하여 *ex vivo* 상에서 항응고 활성을 측정된 결과 EC-2B와 EC-2C는 마우스 모델계에서의 항응고 활성 결과와 동일하게 *in vitro* 상에서보다 활성 차이가 큼을 알 수 있었다(Fig. 6(A,B)). 그러나 두 획분을 각각 sulfation 후 활성을 측정된 결과(Fig. 6(C,D)) 두 물질 모두 활성이 증가하였으며 sulfated된 EC-2B와 EC-2C 획분간의 활성 차이도 미비하였다. 따라서 이 결과정향으로부터 추출한 항응고 활성 물질인 EC-2B와 EC-2C는 AT III의 활성을 증폭시켜 항응고 활성을 발현하며 황산기 함량이 증가하면 활성이 증가함을 알 수 있었다(9). 또한 EC-2B 획분이 EC-2C 획분보다 AT III에 대한 친화성이 낮아 *ex vivo* 상에서 활성이 낮게 측정되었으나 sulfation시킨 후 친화성이 높아져 활성이 증가함을 알 수 있었다.

요 약

EC-2B와 EC-2C 획분은 정향(*Eugenia caryophyllata*)의 알칼리 추출물로부터 에탄올 침전, cetavlon 처리 및 한외여과를 거쳐 분획하였다. EC-2B 획분은 APTT에서 항응고 활성을 가지는 반면, EC-2C 획분은 APTT와 TT 모두에서 항응고 활성을 가지고 있으며 EC-2B와 EC-2C에서 모두 혈소판 응집억제능을 관찰할 수 있었다. EC-2B와 EC-2C 획분의 경구투여에서 두 획분 모두 독성이 없었으며 EC-2B 획분은 1,000 mg/kg (mouse, intrave-

ng/kg 정도의 독성을 가지고 있었다. 두 획분의 *in vivo* 상에서의 항응고 활성을 60% 생존율을 갖는 dose로 표시한 결과 EC-2B는 131 mg/kg인데 비해 EC-2C는 58 mg/kg로 활성의 차이가 *in vitro*에서 보다 크게 나타났다. 이 두획분을 sulfation시킨 후 활성의 변화를 *ex vivo* 를 통해 확인한 결과 두 획분 모두 활성이 증가하였으며 특히 EC-2B 획분의 활성이 급격히 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 1998년 농림부 농림기술개발과제에 의해 수행된 결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Hirsh, J. and Fuster, V.: Guide to anticoagulant therapy Part 1: Heparin. *Circulation*, **83**, 1449-1468 (1994)
- Nishino, T., Kiyohara, H., Yamada, H. and Nagumo, T.: An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochemistry*, **30**, 535-539 (1991)
- Lee, S.K., Sohn, J.H., Choi, E.S. and Rhee, S.K.: Screening and purification of anticoagulant proteins from Korean leeches. *Korean Biochem. J.*, **26**, 227-233 (1993)
- Kim, Y.T.: Identification of the fibrinolytic bacterial strain from chungkookjang. *Ph.D. Dissertation*, Sejong University, p.1-10 (1994)
- Scully, M.F., Ellis, V. and Kakkar, V.V.: The anticoagulant properties of mast cell product, chondroitin sulphate E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 489-491 (1986)
- Kim, Y.S., Roh, J.E., Ann, H.S. and Park, H.K.: Preparation of heparinoids from acidic plant polysaccharide. *Yakhak Hoeji*, **36**, 350-356 (1992)
- Kim, Y.S., Roh, J.E. and Ann, H.S.: Compositional analysis of polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* and its anticoagulant activity. *Kor. J. Pharmacogn.*, **24**, 124-130 (1993)
- Alban, S. and Franz, G.: Anticoagulant activities of β -1,3-glucansulfates dependence on their molecular weight. *Pure & Appl. Chem.*, **66**, 2403-2406 (1994)
- Kenneth, A.B.: *Natural anticoagulants and the prethrombotic state. Blood: Principles and practice of hematology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, p.1319-1332 (1995)
- 川辛男: 月刊フードケミカル. 3月号, p.40 (1994)
- Lee, J.I., Lee, H.S., Jun, W.J., Yu, K.W., Shin, D.H., Hong, B.S., Cho, H.Y. and Yang, H.C.: Screening of anticoagulant activities in extracts from edible herbs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 335-341 (2000)
- Fox, I., Dawson, A., Loynds, R., Eisner, J., Findlen, K., Levin, E., Hanson, D., Mant, T., Wagner, J. and Margaronre, J.: Anticoagulant activity of HirulogTM, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Thrombosis and Haemostasis*, **69**, 157-165 (1993)
- Lee, H.S., Kweon, M.H., Lim, W.J., Sung, H.J. and Yang, H.C.: Inhibitory mechanism of blood coagulation by the anticoagulant polysaccharide from *Coriolus versicolor*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 817-822 (1997)

14. Suzuki, N., Kitazoto, K., Takamatsu, J. and Saito, H. : Antithrombotic and anticoagulant activity of depolymerized fragment of the glycosaminoglycan extracted from *Stichopus japonicus* Selenka. *Thrombosis and Haemostasis*, **65**, 369-373 (1991)
15. Riccardo, A.A., Muzzarelli, F.T. and Monica, E. : Sulfated N-(carboxyl-methyl) chitosan : Novel Blood anticoagulants. *Carbohydr. Res.*, **126**, 225-231 (1984)
16. Jackson, C.M. and Nemerson, Y. : Blood coagulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 765-811 (1980)
17. Yun, H.S., Chung, C.K., Kim, M.H. and Oh, J.H. : Antithrombotic effects of some traditional plant medicines. *Kor. J. Pharmacogn.*, **26**, 154-158 (1995)
18. Horton, D. and Renst, K.J. : Preparation from chitin of (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranuronan and its 2-sulfoamino analog having blood-anticoagulant properties. *Carbohydr. Res.*, **29**, 173-179 (1973)

(2000년 4월 4일 접수)