

## Endotoxin에 의한 혈전증에 미치는 Propolis의 효과

정춘식\* · 정주희 · 정기화  
덕성여자대학교 약학대학

### The effect of Propolis on Endotoxin-induced thrombosis

Choon Sik JEONG\*, Joo Hee JUNG and Ki Hwa JUNG

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received July 1, 2000; accepted August 30, 2000)

**Abstract** – Propolis, a natural resinous compound collected from honey bees, contains many biochemical constituents and has been used for traditional medicines as early as 300 B.C. Recently, it has been reported to possess many biological activities such as antibacterial, antiviral, fungicidal, local anaesthetic, immunostimulating, antiinflammatory and free radical scavenging properties. To investigate activities of chrysin, one of propolis effective compounds for blood coagulation system was injected endotoxin (4000 EU/kg, i.v.) in rats at 1hr after administered chrysin (20 mg/kg, p.o.). This study was resulted that chrysin has antiplatelet aggregation activity *in vitro*, delay of blood clotting time and prothrombin time, and reduction of fibrinogen and FDP *in vivo*. Chrysin has increased SOD activity, GSH content and GST activity, and decreased MDA content in liver. The result suggests that the antithrombosis effect of chrysin is suppressive activity for a blood coagulation system and antioxidative activity.

**Keywords** □ Propolis, chrysin, endotoxin, thrombosis, antioxidant activity

혈전과 관련한 질환은 심근경색, 말초혈관 질환, 쇼크 및 동맥경화증 등으로 최근 산업화되고, 고령화된 개발도상국이나 선진국에서 신체상의 이상이나 죽음을 초래하는 흔한 질환 중에 하나가 되었다. 혈전의 예방 및 치료를 위해서는 항응고제로 heparin, wafarin 및 dicumarol 등이 있고, 혈전용해제로 streptokinase, urokinase 및 aminocaproic acid 등이 있으며, 항혈소판제로 aspirin, dipyridamole 및 ticlopidine 등이 대표적으로 사용되고 있다(Joel G. Hardman 등, 1996). Heparin은 합병증으로 출혈이 나타나 용량의 조절과 환자 선정이 국한되어 있으며, urokinase 등은 소아 혹은 치유 도중인 상처, 외상이나 악성 종양을 가진 환자에게 사용 금기로 이용에 어려움이 있으며 주사제로 인한 불편함을 해소하기 위하여 경구용 제제의 개발에 중점을 두고 있다.

Propolis는 벌집으로부터 채취한 수지상의 물질로 독특한 방향성과 점착성을 가졌으며, 성상은 체취장소와 시간에 따라 다르다. 국내에서는 1990년대 초 건강식품으로 소개되어 염증성 질환이나 심장질환 및 당뇨병을 비롯하여 암에 이르기까지 치료효과가 소개되고 있다(Han S.K. 과 Park H.K., 1996). Propolis 성분 중의 하나인 chrysin은

항위염 및 항위궤양 작용(Jeong C.S 등, 1999; Jung K.H. 등, 1999), low-density lipoprotein에 대한 항산화 효과(Myara I. 등, 1993) 및 hypoglycemic effect(Shin J.S.과 Kim K.S., 1999)가 있다. 또한 liver microsome에서 생체활성(Nielsen S. E. 등, 1998)의 연구와 항암효과(Siess M.H.과 Leclerc J. C., 1995)에 대해서도 연구되고 있다.

본 실험에서는 propolis의 성분인 chrysin의 적혈구막 안정화 작용 및 혈소판 응집 억제 작용을 *in vitro*에서 확인하고, gram음성세균에서 생성되는 내독소이며, protein-lipopolysaccharide의 복합체인 endotoxin에 대한 blood clotting time, prothrombin time, fibrinogen 량 및 FDP 량으로 항혈전작용을 검색하였다. 또한 항산화 작용의 측정을 통해 혈액 응고 기전과 관련이 깊은 간세포에 있어서 SOD 활성도, GSH 량, GST 활성도 및 지질과산화물 량을 측정하였다.

#### 실험재료 및 방법

##### 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 chrysin은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

Fibrinogen kit 및 prothrombin time kit (국제시약주식회사,

\*To whom correspondence should be addressed.

Japan), FDPL test set(제국장기, Japan), collagen (Chrono-Log Corp.), endotoxin(Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA) 및 기타시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

### 실험 동물

체중 170~210 g의 Sprague-Dawley계 수컷 rat를 22±2°C에서 충분한 물과 고형사료(삼양사료)를 공급하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다.

### 실험적 혈전증 유발 및 chrysin 투여

Schoedorf 등(Schoedorf 등, 1971)의 방법에 준하였다. 즉, chrysin 20 mg/kg을 경구투여하고 1시간 후 endotoxin (*Escherichia Coli* 055:B5, SIGMA사) 4000EU를 흰쥐 꼬리정맥에 주사하였다. 그 후, 4시간이 경과되면 심장에서 채혈하였다. Chrysin의 용량은 예비실험에서 효과를 나타낸 20 mg/kg을 사용하였다.

### 혈소판 응집 억제 작용

Ether로 마취시킨 흰쥐의 심장으로부터 2.5% sodium citrate를 넣은 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 citrate(0.25%) 함유 혈액을 200×g로 10분간 상온에서 원심분리하여 혈소판 농축 혈장(Platelet rich plasma, PRP)을 얻었으며, Modified smear method(Yun-Choi 등, 1985)에 의하여 검색하였다.

### Blood clotting time 측정

Ether로 마취한 흰쥐에서 2.5% sodium citrate를 넣은 주사기를 사용하여 심장으로부터 취한 혈액(0.25% sodium citrate가 포함) 1 mL를 유리시험관에 넣고 1.7% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 200 μL를 가한 후 stop watch를 작동하고 정확히 1분 뒤부터 30초 간격으로 시험관을 45°경사로 조심스럽게 기울여 응고가 완료될 때까지의 시간(sec.)을 측정(Cho H. K., 1994)하였다.

### Prothrombin time 측정

Prothrombin time 측정은 Quick(Quick, 1935)의 one-stage법을 이용한 kit를 사용하여 측정하였다. 혈장 0.1 mL를 37°C에서 3분간 가온한 후 PT 시약(thromboplastin 0.50 mL/mL, 유산 Ca<sup>++</sup> 3.0 mg/mL를 포함) 0.2 mL를 가하여 응고하는데 걸리는 시간을 측정하였다.

### Fibrinogen 측정

혈장내의 fibrinogen 측정은 임상병리검사법 중 fibrinogen 측정법(Lee S.Y. and Chung Y.S., 1994)을 사용하여 측정하였다. 완충액으로 10배 희석한 혈장 검체를 0.2 mL 취하여 37°C에서 3분간 가온한 후 thrombin 시약 0.1 mL를 가하

여 응고하는 데 걸리는 시간을 측정하였다. 표준검량선을 작성하여 fibrinogen의 양을 계산하였다.

### FDP 측정

FDP 측정은 thrombo-wellco test(Ellman L. 등, 1973)를 사용하여 측정하였다.

혈액응고촉진제를 가한 채혈관에 혈액 1 mL를 취하여 상온에서 30분간 방치 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이를 희석하여 검체 0.07 mL를 취하고 latex 시약을 1적 가한 후 교반하여 2분 뒤에 응집 여부를 관찰하였다.

### 적혈구막 안정화 작용

Glenn 등(Glenn 등, 1968)의 방법에 준하여 가열에 의한 적혈구의 용혈에 대한 검액의 억제작용을 측정하였다. 흰쥐에서 채혈하여 1,500 rpm, 15분간 원심분리하고 침사로 적혈구를 얻었다.

이 적혈구를 0.15M 인산완충액(pH 7.4)으로 희석하여 5% 적혈구현탁액으로 하였다. 적혈구현탁액 3.8 mL에서 0.2 mL의 검액 및 대조액을 가하고 53°C의 수욕중에서 가열하였다. 20분 후에 빙수 중에서 급냉하여 3,000 rpm, 15분간 원심분리한 다음 상층을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### SOD 측정

Superoxide dismutase는 xanthine-xanthine oxidase assay에 의해 활성도를 측정하였다. 2.9 mL의 혼합용액(5 μmol xanthine, 2 μmol cytochrome c, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl buffer, pH7.8)을 cuvette에 넣은 후 50 μL를 첨가하여 반응을 시작함과 동시에 550 nm에서 흡광도 증가 속도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 이때의 cytochrome c의 분자흡광계수는 21 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 환산하여 계산하였다(Fridovich, I. 등, 1985).

### GSH 측정

간 균질액에서의 GSH 함량은 Ellman 법(Ellman, 1959)에 따라 시행하였다. 완충용액 2.5 mL(100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5)에 homogenate 25 μL와 6 mM DTNB 100 μL를 넣고 3분 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### GST 측정

Cytosol에 존재하는 GST 활성도는 Habig 등(Habig 등, 1974)의 방법에 따라 시행하였으며 CDNB가 GST에 의해 GSH와 포함되었을 때의 고유의 황색이 탈색되는 속도를 측정함으로써 효소의 활성도를 산출하였다.

0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)와 cytosol 단백질 25  $\mu\text{g}$ 을 넣고 25°C에서 2분간 방치 후 기질로써 1.0 mM의 CDNB와 1.0 mM의 GSH를 가하여 총량을 1.0 mL로 한 후 즉시 340 nm에서 10초 간격으로 100 초 동안 흡광도를 측정하였다.

Blank로는 가열하여 불활성화된 cytosol 단백질을 사용하였으며 분자흡광계수 9.6  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다.

### 지질과산화물 측정

Microsome 0.5 mL에 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 와 0.67% thiobarbituric acid 시약을 가한 후 95°C에서 45분간 진탕한 후 실온까지 냉각하고 butanol 4.0 mL를 가해서 진탕 추출한 후 원심 분리하여 butanol 층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxy propane을 사용하여 검체에서의 malondialdehyde 생성량을 계산하고 이를 nmol/g liver로 나타내었다(Uchiyama, M.과 Mihara M., 1978).

### 통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준편차를 계산하였고, 각 군간의 차이는 student's t-test를 사용하여 p값이 5%미만 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈소판 응집 억제 작용

PRP 자체를 관찰하였을 때는 응집이 일어나지 않은 상태(-)이나 응집유도 물질로 collagen과 endotoxin을 첨가한 PRP에서는 혈소판들이 응집(+++)을 일으킴을 관찰할 수 있었다. Propolis의 성분인 chrysin을 첨가한 PRP의

**Table I.** Effects of chrysin against collagen<sup>a)</sup> and endotoxin<sup>b)</sup> induced platelet

| Group   | Degree <sup>c)</sup> |
|---|----------------------|
| Control                                       |                      |
| PRP <sup>d)</sup> (without aggregation agent) | -                    |
| PRP (with collagen)                           | +++                  |
| PRP (with endotoxin)                          | +++                  |
| Chrysin (with collagen)                       | +                    |
| Chrysin (with endotoxin)                      | ±                    |

<sup>a)</sup> collagen  $1.2 \times 10^{-5}$  g/mL

<sup>b)</sup> endotoxin 4000EU

<sup>c)</sup> degree of platelet aggregation: - no aggregation; ± slight aggregation; + less aggregation; ++ less aggregation than control PRP with aggregation agent; +++ as much aggregation with PRP plus aggregation agent alone.

<sup>d)</sup> PRP platelet rich plasma

응집 정도는 대조군을 collagen으로 한 경우에는 응집도를 +로, 대조군을 endotoxin으로 한 경우에는 응집도를 ±로 감소함을 보였다(Table I).

혈소판 응집유도 물질에 대하여 chrysin 투여군은 혈소판 활성화의 억제로 혈소판 응집을 저해하여 혈전증 또는 혈소판 활성화에 의하여 발현되는 다른 병적 과정의 예방과 치료 효과가 기대되어진다.

### Blood clotting time

Blood clotting time은 혈소판 결핍과 기능이상 및 혈액 응고인자의 결핍 등에 의해 일어날 수 있는 질환들을 판정하는 데 응용되는 방법으로 정상군이 113.83 sec 인데 비하여 대조군은 160.68 sec로 현저히 증가하였다(Table II). Chrysin 투여군은 113.95 sec로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보임으로써 혈소판과 혈액응고계의 이상이 있는 대조군에 대하여 항혈전 작용이 있다고 생각된다.

### Prothrombin time

정상군이 16.20 sec 인데 비하여 대조군은 20.25 sec로 prothrombin time이 연장되었으며, chrysin 투여군은 16.53 sec로 대조군에 비하여 유의성 있는 시간의 단축을 보였다(Table II).

이는 chrysin 투여군이 endotoxin을 투여하여 일어나는 혈액응고계의 손상에 대하여 억제를 보인 것으로 항혈전 작용이 공통인자 경로에서도 나타났음을 확인할 수 있었다.

### Fibrinogen 함량

심근경색, 간질환, 괴저성 병변 및 출혈증과 같은 질환의 예측 및 치료에 유용하게 응용되고 있는 혈장내의 fibrinogen 양은 chrysin 투여군에서 59.38 mg/mL로 대조군 35.69 mg/mL에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table III). Endotoxin은 혈액의 응고 작용이 항진되어 혈전을 형성하므로 fibrinogen의 소비량이 많아져 정상군에 비해 대조군에서 fibrinogen의 양이 감소된 것으로 보여진

**Table II.** Effect of chrysin on blood clotting time and prothrombin time in rats with experimental thrombosis induced by endotoxin

| Group   | No. of animals | Dose (mg/kg, p.o.) | Blood Clotting time(Sec.) | Prothrombin time(Sec.) |
|---------|----------------|--------------------|---------------------------|------------------------|
| Normal  | 6              |                    | 113.82 ± 18.6             | 16.20 ± 1.4            |
| Control | 6              |                    | 160.67 ± 24.0             | 20.45 ± 1.5            |
| Chrysin | 6              | 20                 | 113.95 ± 23.5**           | 16.53 ± 0.7*           |

The values are mean ± S.D

\*Significantly different from the endotoxin treated rats (Student's t-test, P<0.05)

\*\*Significantly different from the endotoxin treated rats (Student's t-test, P<0.01)

**Table III.** Effect of chrysin on fibrinogen and FDP in rats with experimental thrombosis induced by endotoxin

| Group   | No. of animals | Dose (mg/kg, p.o.) | Concentration of fibrinogen (mg/dL) | Concentration of FDP (µg/dL) |
|---------|----------------|--------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Normal  | 6              |                    | 74.30 ± 9.5                         | 0.00 ± 0.0                   |
| Control | 6              |                    | 35.69 ± 7.5                         | 6.50 ± 2.2                   |
| Chrysin | 6              | 20                 | 59.38 ± 4.6**                       | 3.60 ± 1.0                   |

The values are mean ± S.D

\*\*Significantly different from the endotoxin treated rats (Student's t-test, P<0.01)

다. Chrysin 투여군에서 fibrinogen의 양이 대조군에 비해 증가한 것은 endotoxin에 의해 항진되는 혈액 응고 작용이 억제된 것으로 보여진다.

**FDP 함량**

FDP는 항 fibrin항체에 대해 정량적으로 응집 반응하는 것을 이용하여 측정하는 방법이다.

Chrysin 투여군의 FDP량은 3.6 µg/mL로 대조군 6.5 µg/mL에 비해 감소하였다(Table III).

FDP가 생성되지 않은 정상군에 비하여 FDP량이 증가된 대조군은 혈전의 형성에 의한 것으로 생각할 수 있었고, chrysin은 혈전 형성을 억제함으로써 FDP량이 감소되었다고 보여진다.

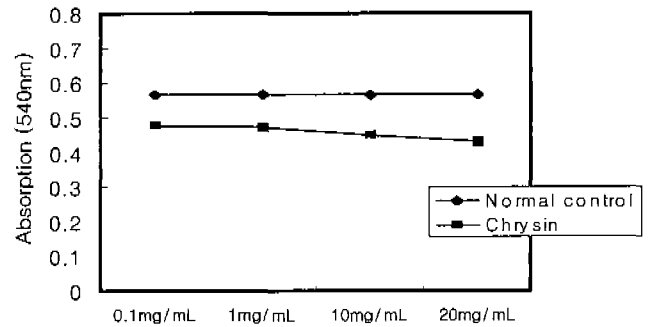
**적혈구막 안정화 작용**

가열에 의한 적혈구의 용혈에 대한 억제 작용을 확인하기 위한 적혈구막 안정화 작용은 540 nm에서 대조군의 흡광도가 0.5661인데 비해 chrysin 투여량에 따라 0.1 mg에서 0.4763, 1 mg에서 0.4718, 10 mg에서 0.4502 및 20 mg에서 0.4299로 흡광도가 감소하였다(Fig 1).

Chrysin 투여군은 가열에 의한 적혈구막 손상을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었고 chrysin 투여군의 적혈구막 보호 작용은 혈액 응고 촉진을 억제하는 작용이 있다고 생각된다.

**SOD 활성도**

Superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 손상



**Fig 1.** Stabilizing effect of chrysin on heat-induced hemolysis.

에 대한 세포의 방어에 관여하는 SOD의 활성도는 대조군이 1.16 unit/mg protein 인데 비하여 chrysin 투여군은 1.86 unit/mg protein으로 SOD 활성도가 증가하였다(Table IV). Chrysin 투여군은 superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 간세포 손상에 대해 보호 효과가 있다고 생각된다.

**GSH 함량**

과산화지질에 의한 조직 손상의 방어 인자인 GSH 함량은 대조군은 42.26 µM/g liver인데 비해 chrysin 투여군은 46.72 µM/g liver로 GSH의 함량이 투여군에 비하여 유의성 있게 증가하여 조직 손상이 억제된 것으로 생각된다(Table IV).

**GST 활성도**

GST는 GSH과 oxygen radicals 및 친전자성 xenobiotics가 포함되어 해독화 시키는데 관여하는 효소이다. GST의 활성도는 대조군이 3.31 µmol/min/mg protein 인데 비해 chrysin 투여군은 3.52 µmol/min/mg protein으로 유의성 있게 증가하였다(Table IV).

Chrysin은 항산화 작용을 통해서 GST의 활성이 증가하여 조직의 손상을 보호하는 것으로 보여진다.

**지질과산화물 함량**

MDA는 세포막의 인지질이 free radicals의 공격을 받아 분해되었을 때에 생성되는 산물로 세포막의 손상 정도를 측정할 수 있다. MDA를 측정된 결과 대조군은 69.48

**Table IV.** Effect of chrysin on SOD, GSH, GST, and MDA in rats with experimental thrombosis induced by endotoxin

| Group   | No. of animals | Dose (mg/kg, p.o.) | SOD (Unit/mg protein) | GSH (µM/g liver) | GST (µmol/min/mg protein) | MDA (nmol/g liver) |
|---------|----------------|--------------------|-----------------------|------------------|---------------------------|--------------------|
| Control | 6              |                    | 1.16 ± 0.1            | 42.26 ± 3.2      | 3.31 ± 0.1                | 69.48 ± 15.7       |
| Chrysin | 6              | 20                 | 1.86 ± 0.8            | 46.72 ± 9.4*     | 3.52 ± 0.2*               | 60.12 ± 5.5        |

The values are mean ± S.D

\*Significantly different from the endotoxin treated rats (Student's t-test, P<0.05)

nmol/g liver로 혈소판이 많이 응집되어 정상군보다 MDA 양이 증가되었으나, chrysin 투여군은 60.12 nmol/g liver로 free radicals에 의한 지질과산화물을 억제하여 간세포를 보호 할 뿐 아니라 thromboxane synthesis를 저해하여 혈액응고를 억제한 것으로 보여진다(Table IV).

이상의 결과, chrysin으로 혈소판 응집 억제 작용, blood clotting time, prothrombin time, fibrinogen 및 FDP의 측정으로 항혈액응고 작용을 확인하였고, 또한 적혈구막 안정화 작용, SOD의 활성도 증가, GSH의 증가, GST 활성도의 증가 및 MDA의 감소를 통해서 radicals에 의한 항산화 효과로 세포 손상 보호 효과를 관찰하였다. 따라서 propolis의 성분인 chrysin의 항혈전 작용은 직접적인 혈액응고활성억제와 간세포의 항산화작용에 의한 보호 효과임을 확인하였다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2000학년도 덕성여자대학교 연구비의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

### 참고문헌

- Cho H. K. (1994) Effect of Kyuchoolpajintang on the intravascular coagulation induced by endotoxin in rats. *A thesis for a master's degree Taejon University.*
- E. M. Glenn, B. J. Bowman and J. C. Koslowske (1968). *Biochem. Pharmacol.* 27
- Ellman L., Carvalho A. and Colman R. W. (1973) The thrombolytic test as a screening test for disseminated intravascular coagulation. *N. Eng. J. Med.* 288(12), 633-634
- Fridovich I. (1985). *Xanthine oxidase, CRC handbook of methods for oxygen radical research.* New York.
- George L. Ellman (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Biochemistry and Biophysics.* 82, 70-79.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferase; The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Bio. Chem.* 249, 7130-7139.
- Han S. K. and Park H. K. (1996). Effect of ethanol extracted propolis on fat oxidation of meat products. *Korean Journal of Animal Science* 38(1), 94-100.
- Jeong C. S., Kim E. J. and Jung K. H. (1999). Effects of propolis extract on antigastric and antiulcer. *J. Fd Hyg. Safety* 14(4), 358-364
- Joel G. Hardaman, Alfred Goodman Gilman and Lee E. Limbird (1996). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.*
- Jung K. H., Jeong C. S. and Kim E. J. (1999). Antigastric and antiulcer action of effective compounds from propolis extract. *The Journal of Applied Pharmacology* 7(4), 362-370.
- Lee S. Y. and Chung Y. S. (1994). The test of clinical pathology *The College of Medicine in Yonsei University.*
- Myara I., Pico I., Vedio B. and Moatii N. (1993). A method to screen for the antioxidant effect of compounds on low-density lipoprotein; illustration with flavonoids. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 30(2), 69-73.
- Neisslen S. E., Breinholt V., Justesen U., Cornett C. and Dragsted L. O. (1998). In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 28(4), 389-410.
- Quick J. (1935) The prothrombin in haemophilia and in obstructive jaundice. *J. Biol. Chem.* 109, 73.
- Shin J. S. and Kim K. S. (1999). Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 99(6), 869-974.
- Siess M. H. and Leclerc J. Canivenc (1995). Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130(1), 73-78.
- T. H. Schoendorf, M. Rosenberg and F. K. Beller (1971). Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in nonpregnant rats. *Am. J. Pathol.* 65, 51-58.
- Uchiyama M. and Mihara M. (1978). *Anal. Biochem.* 86, 271-278.
- Yun-Choi, H. S. Kim, J. H. and Lee. J. R. (1985). Modified smear method for screening potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources. *J. Nat. Prod.* 48, 362.