

Endotoxin에 의한 혈전증에 미치는 홍화자의 효과

승금란* · 정기화
덕성여자대학교 약학대학

Effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen on Endotoxin-induced Thrombosis in Rats

Keum-Ran SEUNG* and Ki-Hwa JUNG

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

(Received August 31, 2001; accepted Decembr 19, 2001)

Abstracts – In the advanced age, cardiovascular disease is more serious than any other disease. Especially, the thrombus causes the serious disease like apoplexia, cerebri and myocardial infarction. Thrombosis is caused by the injury of endothelium and the alterations in normal blood flow. To investigate activities of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction for blood coagulation system, endotoxin (4000EU/kg) was injected (i.v) to rats at 1hr after administration of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction (500 mg/kg, p.o.). *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction was found to have antiplatelet activity *in vitro*. *In vivo* it showed a delay of blood clotting time, and prothrombin time, and reduction of fibrinogen and FDP. It also increased SOD activity, and decreased MDA content. These results suggest that the antithrombosis effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction results from suppressive activity for a blood coagulation system and antioxidative activity.

Key words □ *Carthamus tinctorius* L. Semen, endotoxin, blood coagulation, antithrombosis, antioxidative activity

혈전은 혈액응고기능의 이상, 혈류의 울체 및 혈관벽의 이상 등을 가져와 혈관내에서 혈액이 굳어진 상태를 말한다. 혈전은 혈류를 따라 흐르다 미세혈관을 막아 심근경색, 허혈 등의 혈행장애를 유발하게 된다(Hawiger, 1989). 그러므로 이와 같은 혈전의 생성을 막는 것은 혈관 질환의 예방과 치료에 매우 중요하다.

혈전의 예방 및 치료제로는 항응고제인 heparin, wafarin 및 dicumarol과 혈전용해제인 streptokinase, urokinase 및 aminocaproic acid, 그리고 항혈소판제인 aspirin, dipyridamole 및 ticlopidine 등이 대표적으로 사용되고 있다(Hardman 등, 1996).

Endotoxin은 gram음성세균에서 생성되는 내독소로서 세균의 사멸에 의해 유리되고 주성분은 protein-lipopolysaccharide의 복합체이다. Endotoxin은 혈액응고계에 직접 영향을 미쳐 platelet activating factor를 활성화시켜 혈액을 응고시킨다는 보고(Andries 등, 1990)와 ADP와 collagen을 활성화시켜 protein kinase C를 자극함으로써 혈액응고를 촉진시킨다는 보고(Salat 등, 1999)가 있다.

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)는 심장과 간에 작용하여

관상동맥 확장 및 혈압을 낮추는 작용이 있으며 고콜레스테롤혈증을 개선시키고 혈전을 치료하는 효과가 있다고 보고되었다. 그러나, 홍화의 씨인 홍화자(*Carthamus tinctorius* L. Semen)의 혈전과 생리활성에 관련된 보고는 없었다.

홍화자의 성분은 flavonoids, L-matairesinol-mono-β-D-glucoside, 2-hydroxyarctiin(Palter 등, 1970; Sakamura 등, 1980), linoleic acid 및 oleic acid 등의 불포화지방산이 대부분이다.

Flavonoid는 Cu²⁺ 나 Zn²⁺ 같은 2가의 중금속 이온과 강한 결합력을 갖는데 hydroxyl 치환기의 위치와 환의 전기적 특성이 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 flavonoid와 중금속 이온과의 강한 결합력과 γ-pyrone 환이 산화에 의해 쉽게 깨짐으로서 전자전달성향을 나타내는 특성은 flavonoids가 자유유리기를 포획함으로써 자유유리기로 인한 조직손상에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 flavonoids는 cyclooxygenase와 lipoxidase를 저해, PG의 생합성을 억제한다고 보고되어 있는데(Lee 등, 1982; Baumann 등, 1979), 특히 Lonchamp 등은 flavonoids가 산소유리기에 대해 강력한 포획작용을 발휘하며 lipoxygenase enzyme을 저해함으로써 arachidonic acid

*To whom correspondence should be addressed.

대사체의 생산을 저해하고 leukotriene의 농도를 저하시킨다고 보고하였다(Lonchamp 등, 1989).

본 실험에서는 *in vitro*에서 홍화자 butanol 분획물의 혈소판 응집 억제 작용을 확인한 후 endotoxin으로 혈전증을 유발시킨 흰쥐에 있어서 홍화자 butanol 분획물 전투여가 blood clotting time, prothrombin time, fibrinogen 량, FDP 량 및 적혈구막 안정화 작용 등을 통해 응고 기전에 미치는 영향을 분석하였다. 그리고 혈관의 손상 및 혈액 응고 기전과 관련이 깊은 SOD 활성도 및 지질과산화물 량을 측정하여 endotoxin에 의해 혈전증이 유발된 흰쥐에 작용하는 홍화자 butanol 분획물의 항혈전효과와 그 작용기전을 알아보려고 한다.

실험재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 홍화자는 경동 시장 내 한약전재상으로부터 구입하였다.

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

홍화자의 추출 및 분획

잘 건조된 홍화자를 methanol로 수욕상에서 4시간씩 5회 추출한 후 온시여과하고, 여액을 감압 농축하였다. Methanol 추출물은 hexane, chloroform, butanol 및 물로 계통적으로 분획하고 그 중 효과가 확인된 butanol 분획물을 검체로 사용하였다.

실험동물

체중 170~210 g의 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐를 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 충분한 물과 고형사료(삼양사료)를 공급하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다.

혈전증 유발 및 홍화자 butanol 분획물 투여

Schoendorf 등(Schoendorf 등, 1971)의 방법에 준하였다. 즉, 홍화자 butanol 분획물 500 mg/kg을 경구투여하고 1시간 후 endotoxin (Escherichia Coli 055:B5, SIGMA사) 4000EU를 흰쥐 꼬리정맥에 주사하였다. 4시간이 경과 후 심장에서 채혈하였다.

혈소판 응집 억제 작용

Ether로 마취시킨 흰쥐의 심장으로부터 2.5% sodium citrate를 넣은 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 citrate (0.25%) 함유 혈액을 $200 \times g$ 로 10분간 상온에서 원심분

리하여 혈소판 농축 혈장(Platelet rich plasma, PRP)을 얻었으며, Modified smear method(Yun-Choi 등, 1985)로 검색하였다.

Blood clotting time 측정

Ether로 마취한 흰쥐에서 2.5% sodium citrate를 넣은 주사기를 사용하여 심장으로부터 취한 혈액(0.25% sodium citrate가 포함) 1mL를 유리시험관에 넣고 1.7% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200 μL 를 가한 후 stop watch를 작동하고 정확히 1분 뒤부터 30초 간격으로 시험관을 45°경사로 조심스럽게 기울여 응고가 완료될 때까지의 시간(sec.)을 측정하였다(Cho, 1994).

Prothrombin time 측정

Prothrombin time 측정은 Quick의 one-stage법(Quick, 1935)을 사용하여 측정하였다. 혈장 0.1 mL를 37°C 에서 3분간 가온한 후 PT 시약(thromboplastin 0.50 mL/mL, 유산 Ca^{2+} 3.0 mg/mL를 포함) 0.2 mL를 가하여 응고하는 데 걸리는 시간을 측정하였다.

Fibrinogen 측정

혈장내의 fibrinogen 측정은 임상병리검사법 중 fibrinogen 측정법(Lee and Chung, 1994)을 사용하여 측정하였다. 완충액으로 10배 희석한 혈장 검체를 0.2 mL 취하여 37°C 에서 3분간 가온한 후 thrombin 시약 0.1 mL를 가하여 응고하는 데 걸리는 시간을 측정하였다. 표준검량선을 작성하여 fibrinogen의 양을 계산하였다.

FDP 측정

FDP 측정은 thrombo-wellco test(Ellman 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(1968)의 방법에 준하여 가열에 의한 적혈구의 용혈에 대한 검액의 억제작용을 측정하였다. 흰쥐에서 채혈하여 1,500rpm, 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°C 의 수욕중에서 가열하였다. 20분 후에 빙수 중에서 급냉하여 3,000rpm, 15분간 원심분리한 다음 상층을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SOD 측정

Superoxide dismutase는 xanthine-xanthine oxidase assay에 의해 활성도를 측정하였다. 2.9 mL의 혼합용액(5 μ mol xanthine, 2 μ mol cytochrome c, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl buffer, pH7.8)을 cuvette에 넣은 후 50 μ L을 첨가하여 반응을 시작함과 동시에 550 nm에서 흡광도 증가 속도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 이때의 cytochrome C의 분자흡광계수는 21 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다(Fridovich 등, 1985).

지질과산화물 측정

Microsome 0.5 mL에 1% H_3PO_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 등, 1978).

통계처리

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

결과 및 고찰

혈소판 응집 억제 작용

*In vitro*에서 홍화자 butanol 분획물의 혈소판 응집 억제 작용을 Table I에 나타내었다. PRP 자체를 관찰하였을 때는 응집이 일어나지 않은 상태(-)를, 응집유도 물질로 collagen과 endotoxin을 첨가한 PRP에서는 혈소판들이 응집(+++)을 일으키는 것을 관찰할 수 있었다. 홍화자 butanol 분획물을 첨가한 PRP의 응집 정도는 대조군을 collagen으로 한 경우에는 응집도가 +로, 대조군을 endotoxin으로 한 경우에는 응집도가 \pm 로 감소함을 보였다. 혈소판 응집유도 물질

Table I. Effects of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction against collagen^{a)} and endotoxin^{b)} induced platelet aggregation

| Group | Degree ^{c)} |
|---|----------------------|
| Control | |
| PRP ^{d)} (without aggregation agent) | - |
| PRP (with collagen) | +++ |
| PRP (with endotoxin) | +++ |
| CTS ^{e)} (with collagen) | + |
| CTS (with endotoxin) | \pm |

^{a)}collagen 1.2×10^{-5} g/mL

^{b)}endotoxin 4000EU

^{c)}degree of platelet aggregation: - no aggregation; slight aggregation; \pm less aggregation; ++ less aggregation than control PRP with aggregation agent; +++ as much aggregation with PRP plus aggregation agent alone.

^{d)}PRP platelet rich plasma

^{e)}CTS *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction

에 대하여 홍화자 butanol 분획물 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 혈소판과 혈액응고계를 관찰할 수 있는 것으로 측정 결과를 Table II에 나타내었다. 정상군이 113.82 sec 인데 비하여 대조군은 160.67 sec로 blood clotting time이 연장되었다. 홍화자 butanol 분획물 투여군은 86.68 sec로 대조군에 비하여 유의성 있는 시간의 단축을 보였다. Blood clotting time은 혈소판 결핍과 기능이상 및 혈액응고인자의 결핍 등에 의해 일어날 수 있는 질환들을 판정하는 데 응용되는 방법으로 홍화자 butanol 분획물 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보임으로써 혈소판과 혈액응고계의 이상이 있는 대조군에 대하여 항혈전 작용이 있다고 생각된다.

Prothrombin time

Table II. Effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction 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 \pm 18.6 | 13.19 \pm 3.7 |
| Control | 6 | | 160.67 \pm 24.0 | 29.28 \pm 6.8 |
| CTS | 6 | 500 | 86.68 \pm 8.5 ^{***} | 11.36 \pm 0.9 [*] |

The values are mean \pm 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)

CTS, *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction

Prothrombin time은 thromboplastin과 Ca^{2+} 을 가하여 thromboplastin이 VII 인자를 활성화시켜 VII·thromboplastin 복합체를 형성하고 X, V, II 및 I 인자들을 활성화하여 fibrin을 형성하는 시간을 측정하는 것이다. Prothrombin time은 Table II에 나타난 바와 같이 정상군이 13.19 sec 인데 비하여 대조군은 29.28 sec로 prothrombin time이 연장되었으며, 홍화자 butanol 분획물 투여군은 11.36 sec로 대조군에 비하여 유의성 있는 시간의 단축을 보였다. Prothrombin time 측정 결과 홍화자 butanol 분획물 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보인 것은 홍화자 butanol 분획물 투여군이 endotoxin 투여로 유발된 혈액 응고계의 손상에 대하여 억제작용이 있어 항혈전 효과가 공통인자 경로에서도 나타났음을 확인할 수 있었다.

Fibrinogen 함량

Fibrinogen은 혈액응고기전에서 중요한 역할을 갖는 제1인자로 알려진 분자량 약 334,000의 혈장 단백질이다. Fibrinogen은 thrombin에 의해 fibrin으로 되고 fibrin 안정화인자(제 XIII인자)에 의해 중합체를 형성하여 응고를 완료한다. 혈액 응고의 이상 유무를 알 수 있는 fibrinogen량은 Table III에 나타난 바와 같이 정상군의 fibrinogen량은 74.73 mg/mL인데 비해 대조군은 36.01 mg/mL로 감소하였다. 홍화자 butanol 분획물 투여군은 fibrinogen량이 66.84 mg/mL로 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다. 홍화자 butanol 분획물 투여군에서 fibrinogen의 양이 대조군에 비해 증가한 것은 endotoxin에 의해 항진되는 혈액 응고 작용이 억제된 것으로 보여진다.

FDP 함량

Fibrinogen 및 fibrin에 plasmin이 작용하여 얻어지는 산물이 FDP이다. FDP는 항 fibrin항체에 대해 정량적으로 응집 반응하는 것을 이용하여 측정하는 방법으로 혈전의 형성 경향과 용해상태를 검사할 수 있다. 홍화자 butanol 분획물 투여군의 FDP량은 4.2 μ g/mL로 대조군 6.50 μ g/mL에 비해 감소하였다(Table III). 즉, FDP가 생성되지 않은 정상군에 비하여 FDP량이 증가된 대조군은 혈전의 형성에 의한 것으로 생각할 수 있었고, 홍화자 butanol 분획물은 혈전

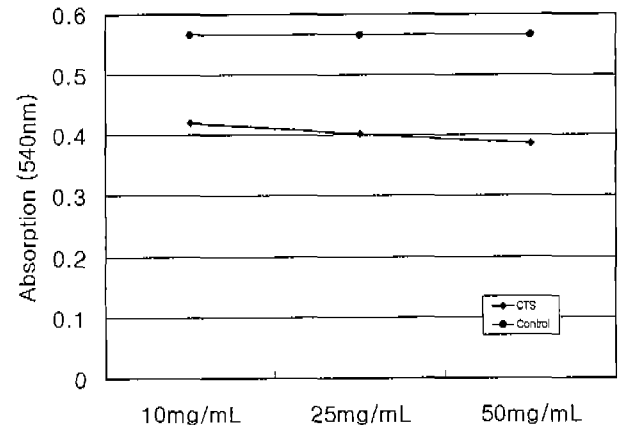


Fig. 1. Stabilizing effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction on heat-induced hemolysis. CTS *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction

형성을 억제함으로써 FDP량이 감소되었다고 보여진다.

적혈구막 안정화 작용

가열에 의한 적혈구의 용혈에 대한 억제 작용을 확인하기 위한 적혈구막 안정화 작용은 Fig. 1에 나타내었다. 적혈구막 안정화 작용은 540 nm에서 대조군의 흡광도가 0.5661인데 비해 홍화자 butanol 분획물 투여량에 따라 10 mg에서 0.4208, 25 mg에서 0.4018, 50 mg에서 0.3868로 흡광도가 감소하였다. 홍화자 butanol 분획물 투여군은 가열에 의한 적혈구막 손상을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었고 홍화자 butanol 분획물 투여군의 적혈구막 보호 작용은 혈액 응고 촉진을 억제하는 것을 확인하였다.

SOD 활성도

Superoxide anion radicals에 의한 산화적 손상에 대한 세포 방어에 관여하는 SOD의 활성도를 각 실험군의 간에서 분리한 cytosol을 사용하여 측정된 결과를 Table IV에 나타내었다. 대조군은 1.38 unit/mg protein 인데 비하여 홍화자 butanol 분획물 투여군은 2.17 unit/mg protein으로 SOD 활성도가 유의성있게 증가하였다. 홍화자 butanol 분획물 투여군이 대조군에 비해 SOD 활성도가 증가한 것

Table III. Effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction 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 (μ g/dL) |
|---------|----------------|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Normal | 6 | | 74.73 \pm 9.5 | 0.00 \pm 0.0 |
| Control | 6 | | 36.01 \pm 7.5 | 6.50 \pm 2.2 |
| CTS | 6 | 500 | 66.84 \pm 9.9** | 4.2 \pm 1.0 |

The values are mean \pm S.D

**, Significantly different from the endotoxin treated rats (Student's t-test, $P < 0.01$) CTS *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction

Table IV. Effect of *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction 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) | MDA (nmol/g liver) |
|---------|----------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| Control | 6 | | 1.38 ± 0.3 | 69.48 ± 7.8 |
| CTS | 6 | 500 | 2.17 ± 0.0* | 59.52 ± 3.2 |

The values are mean ± S.D

*Significantly different from the endotoxin treated rats (Student's t-test, P<0.001)

CTS *Carthamus tinctorius* L. Semen butanol fraction

으로 보아 홍화자 butanol 분획물 투여군은 super-oxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 손상에 대한 보호 효과가 있음을 확인하였다.

지질과산화물 함량

MDA는 세포막의 인지질이 free radicals의 공격을 받아 분해되었을 때에 생성되는 산물로 세포막의 손상 정도를 측정할 수 있다. 지질과산화물 측정 결과는 Table IV에 나타난 바와 같이 대조군은 69.48 nmol/g liver 인데 비해 홍화자 butanol 분획물 투여군은 59.52 nmol/g liver로 감소하였다. MDA양은 홍화자 butanol 분획물 투여군이 대조군에 비해 현저하게 감소한 것으로 보아 홍화자 butanol 분획물은 free radicals에 의한 지질과산화를 억제하여 thromboxane synthesis를 저해하여 혈액응고를 억제한 것으로 보여진다.

이상의 결과에서 볼 때 홍화자 butanol 분획물은 혈소판 응집 억제 작용, blood clotting time, prothrombin time, fibrinogen, FDP 및 적혈구막 안정화 작용의 측정에 의해서 항혈액응고 작용이 있음을 확인하였고, 간세포에서 SOD, MDA 활성을 분석함으로써 SOD radicals에 의한 항산화 효과를 확인하였다. 따라서 홍화자 butanol 분획물의 항혈전작용은 혈액응고 단계에서의 직접적인 활성억제 및 간세포에 대한 항산화 작용에 의하여 나타나는 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 2001학년도 덕성여자대학교 연구비의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Baumann J., Von Bruchhausen F., Wurn G.A. (1979). A structure-activity study on the influence of phenolic compounds and bioflavonoids on rat renal prostaglandin synthetase, *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.*, **307**, 73-78.
- Cho H. K., (1994). Effect of Kyuchoolpajintang on the intravascular coagulation induced by endotoxin in rats. *A thesis for a master's degree Taejon Univ.*
- Ellman, G. L. (1959.) Tissue sulfhydryl groups. *Rchibes of Biochemistry and Biophysics*, **82**, 70-79.
- Ellman L. Carvalho A., Colman R. W., (1973). The thrombo-wellco 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, CRC Press* Glenn, E. M., Bowman, B. J., Koslowske J. C.(1968). The systemic response to inflammation. *Biochem. Pharmacol.*, Suppl. **27-49**.
- Hawiger J. (1989). *Platelets : receptors, adhesion, secretion, Academic Press, San Diego*
- Hardaman, J. G. Alfred Goodman Gilman, Lee E. Limbird. (1996). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed.*
- Lee S. Y., Chung. Y. S. (1994). The test of clinical pathology. *The College of Medicine in Yonsei University*
- Lonchamp M., Guardiola B., Sicot N., Bertrand M., Perdrix L. and Duhault J.G. (1989). Protective effect of a purified flavonoid fraction against reactive oxygen radicals. In vivo and in vitro study, *Arzneimittel-forsch.*, **39**, 882-885.
- Palter, R., Lundin, R. E. (1970). A bitter principle of safflower : matairesinol monoglucoside, *Phytochemistry*, **9**, 2407-2409.
- Quick. J. (1935). The prothrombin in haemophilia and in obstructive jaundice. *J. Biol. Chem.*, **109**, 73.
- Salat, A. (1999). Endotoxin enhances *in vitro* platelet aggregability in whole blood. *Thrombosis research*. **93**, 145-148.
- Sakamura, S., Terayama, Y., Kawakatsu, S., Ichihara, A. and Saito, H. (1980). Conjugated serotonin and phenolic constituents in safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.), *Agric. Biol. Chem.*, **44**(12), 2951-2954.
- Schoendorf, T. H., Rosenberg, M., Beller, F.K.(1971), Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in nonpregnant rats, *Am. J. Pathol.*, **65**, 51.
- Uchiyama M., Mihara M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *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.