

약용 및 야생식물로부터 트롬빈 저해물질의 탐색

손호용* · 권윤숙 · 김영숙 · 권하영 · 권기석¹ · 김경재² · 권정숙 · 손건호

안동대학교 식품영양학과, ¹안동대학교 생명자원과학부, ²(주) 대평 천연물신소재 개발연구소

Screening of Thrombin Inhibitors from Medicinal and Wild Plants

Ho-Yong Sohn*, Yun-Sook Kwon, Young Sook Kim, Ha-Young Kwon, Gi-Seok Kwon¹,

Kyung-Jae Kim², Chong-Suk Kwon and Kun Ho Son

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

¹The School of Bioresource sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²Research Center for Natural & New materials, Daepyeong Co., Sangju 742-802, Korea

Abstract – Inhibitory activities of 264 methanol extracts, which were prepared from different parts of 210 kinds of wild and medicinal plants, against human thrombin were evaluated. Based on the anti-coagulation activity determined by thrombin time and activated partial thromboplastin time, the 14 extracts were screened. The fibrinolytic activity, heat stability and inhibition of other proteolytic digestive enzymes, such as pepsin, papain, trypsin and chymotrypsin, of the 14 extracts were further determined, and *Ginko biloba* (herba), *Ephedra sinica* (radix), *Reynoutria elliptica* (herba), *Amomum tsao-ko* Crevost (fructus), and *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils (bark) were finally selected as possible plant sources for anti-thrombosis agent. These results suggested that medicinal and wild plants could be the potential source of thrombin inhibitor.

Key words – Thrombosis, thrombin time (TT), activated Partial Thromboplastin Time (aPTT), medicinal and wild plants

생체 구성성분으로 혈액은 산소, 영양분, 노폐물의 운반 기능과 원충작용, 체온유지, 삼투압 조절 및 이온 평형유지, 수분 일정유지, 액성 조절작용, 혈압의 유지 및 조절, 생체 방어 등 다양한 중요 기능을 가지고 있다. 따라서 혈액의 기능적 이상은 다양한 질병을 유발하게 되며, 특히, 손상된 혈관 내에서 혈액 손실을 최소화하기 위한 지혈(hemostasis) 기능의 이상으로 유래되는 뇌혈관 질환이나 심장질환은 생명에 치명적이며 후유증 또한 심각하다. 현재, 심혈관계 질환의 경우, 사회의 발달과 인구의 고령화에 따라 급속히 증가되고 있으며, 그 사망률의 합계는 악성종양의 경우를 상회하고 있어 치료제 개발이 매우 시급한 실정이다.^{1,2)} 한편 정상적인 혈액 순환은 체내에서의 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호보완적으로 조절되면서 혈액 순환을 용이하게 하며, 이들 중 혈액 응고 반응계의 기작은 혈관벽에 혈소판이 점착, 응집하여 혈소판 혈전을 형성한 후, 혈액 응고계가 활성화되어 혈소판 응집괴를 중심으로 피브리린(fibrin) 혈전이 형성되는 것으로 보고되어 있다.²⁻⁴⁾ 피브리린

혈전의 생성은 수많은 인자들의 여러 단계반응을 거쳐 피브리린 응고에 직접 관여하는 트롬빈(thrombin)이 활성화 되어, 최종적으로 피브리노겐(fibrinogen)으로부터 피브리린 단량체를 생성하게 하며, 피브리린 단량체들은 칼슘에 의해 중합되어, 혈소판과 내피세포에 결합하게 되며 Factor XIII에 의해 교차 결합된 피브리린 폴리머(cross-linked fibrin polymer)를 형성하면서 영구적인 혈전을 생성하게 된다. 또한, 트롬빈은 혈소판, V 인자, VII 인자들을 활성화시켜 혈액 응고 반응을 촉진시키는 등 혈전 생성에 중추적 역할을 하게 된다.^{4,7)} 따라서, 트롬빈의 활성 저해물질은 과다한 혈액응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환에 매우 유용한 예방 및 치료제로 사용될 수 있다. 현재까지 혈전성 질환의 예방과 치료에 헤파린, 쿠마린, 아스피린, 유로키네이즈 등의 다양한 항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제 등이 사용^{4,5,8)}되고 있으나, 이들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장애 및 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있는 실정이다.^{5,8-12)}

이에 본 연구에서는 혈전 관련 질환 예방 및 혈류개선 기능성 식품의 개발을 목표로, 먼저 안전성이 확보된 210여종의 약용 및 야생식물의 다양한 부위로부터 264종의 메탄

*교신저자(E-mail) : hysohn@andong.ac.kr
(FAX) : 054-820-5491

을 추출물을 조제하여 트롬빈 저해활성을 검색하였으며, 그 결과 기린초, 노회, 마황, 비파엽, 오매, 오수유, 은행, 전공피, 조협, 초과, 큰애기수영, 호장근, 황금, 후박 등 14종의 메탄올 추출물에서 300% 이상의 트롬빈 저해활성을 확인하였다. 또한 선별된 14종의 식물 추출물의 혈전생성 저해활성과 혈전 분해능을 각각 아스피린과 plasmin을 사용하여 비교 검토하였으며, 실제적 경구 복용을 위해 다양한 소화효소에 대한 비특이적 저해양상과 열 안정성을 조사하여 은행(잎), 호장근(잎), 초과(열매), 후박(근피), 마황(뿌리) 추출물이 식물생약 및 건강기능 식품 소재로 이용 가능함을 확인하였다. 이러한 결과는, 약용 및 야생 식물자원으로부터 혈전생성 저해 및 심혈관 혈류개선을 위한 식물 생약개발이 가능함을 제시하며, 새로운 심혈관 혈류개선제 개발에 필요한 기초 자료로 활용될 것이다.

재료 및 방법

실험재료

경북 안동지역 한약방에서 구입한 100 여종의 시료와, 경북 안동, 의성, 봉화지역 및 강원도 일대에서 1996년 3월에서 2000년 6월 사이에 채집한 110 여종의 약용 및 야생식물을 대한식물도감에서 검증¹³⁾하여 그늘에서 건조 후 잘게 썰어 추출에 사용하였다. 추출은 건조 재료 약 100 g을 메탄올을 사용하여 추출하였으며, 추출액은 감압 농축하여 분말로 제조하여, 사용 전까지 저온 밀봉 보관하였으며, DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여 트롬빈 저해 활성, 혈전 용해활성, 소화효소 저해활성 등을 측정하였다. 사용한 식물 재료 및 추출 부위는 Table 1에 나타내었다. 혈장은 지원자의 전혈로부터 조제하였으며, 채혈 후 즉시 4°C에서 5000 g로 5분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 냉동한 상태로 보관하였으며(신선동결혈장), 필요 시 상온에서 해동하여 사용하였다.

항혈전 활성 측정

TT (Thrombin Time); 37°C에서 0.5 U 트롬빈(Sigma Co., USA) 50 μ l와 20 mM CaCl₂ 50 μ l, 다양한 농도의 시료 추출액 10 μ l를 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 μ l를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다.⁷⁾ 대조로는 아스피린(Sigma Co., USA)과 헤파린(heparin; Sigma Co., USA)을 사용하였으며, 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 32.1초의 응고시간을 나타내었다. 열 안정성 측정의 경우에는 다양한 농도의 시료용액을 100°C에서 30분간 열처리하고, 실온에서 1시간 방냉한

후, 잔존활성을 측정하였다. 트롬빈 저해 효과는 3회 이상 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다.¹⁴⁾

aPTT (activated Partial Thromboplastin Time); 혈장 100 μ l와 다양한 농도의 시료 추출액 10 μ l를 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온한 후, 50 μ l의 aPTT reagent(Sigma, ALEXINTM)를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 배양하였다. 이후 50 μ l CaCl₂(35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다.⁸⁾ 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하였으며, 이 경우 55.1초의 응고시간을 나타내었다. aPTT의 결과는 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다.

혈전 용해 활성 측정

혈전 용해활성은 Astrup 등의 방법¹⁵⁾을 일부 수정하여 측정하였다. 먼저 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)에 피부리노겐을 0.3% 첨가하여 완전히 용해한 후 평판에 붓고, 45°C로 유지한 1% 살균 agarose 용액을 동량 첨가하여 충분히 혼합한 후, 트롬빈 100 U를 첨가하고, 상온에서 1시간 방치하여 고화된 피브린 평판을 준비하였다. 이 후, 평판에 적정수의 미세구멍을 만들고, 각각의 미세구멍에 다양한 식물 추출액 10 μ l(25 mg/ml)을 분주하여 37°C에서 18시간 배양하였다. 양성 대조군으로는 plasmin(0.1 U)을, 음성 대조구는 시료용매인 DMSO를 10 μ l 사용하였으며, 37°C에서 18시간동안 반응시킨 후, 형성되는 투명한 크기로 혈전 용해활성을 평가하였다.²⁾

기타 단백질 분해효소에 대한 저해 활성 측정

선별된 식물 추출물의 트롬빈 이외의 α -chymotrypsin, trypsin, pepsin, papain에 대한 저해활성은 Anson방법을 변형하여 사용하였다.¹⁶⁾ 즉, 1/15 M McIlvaine buffer (pH 7.6) 100 μ l, 각각의 효소용액 50 μ l와 다양한 식물 추출액 10 μ l (최종 반응농도 1 mg/ml)를 함유한 반응액을 37°C에서 10분간 전처리한 후 0.5% Hammarsten milk casein 50 μ l을 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 0.44 M trichloroacetic acid(Sigma Co.)를 200 μ l 가하여 반응을 정지시키고, 보정된 다음 37°C에서 10분간 방치하고 여과한 다음 여액 50 μ l를 취해 0.55 M Na₂CO₃ 125 μ l, Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Co., USA) 25 μ l를 혼합하여 30분간 발색한 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다(Asys Expert 96, Asys Co., Japan). 효소액의 조제는 pepsin(Sigma Co., USA)의 경

Table I. Inhibitory activity of methanol extract of medicinal and wild plants against human thrombin

Herbal drugs (Korean name)	Scientific name (Family)	Part	Inhibition (%)
가느기린초	<i>Sedum aizoon</i> (Crassulaceae)	whole	145.9
각갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i> (Leguminosae)	radix	81.5
		flower	83.5
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i> (Compositae)	aerial	135.4
감수	<i>Euphorbia sieboldiana</i> (Euphorbiaceae)	whole	101.0
감초	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (Leguminosae)	whole	101.8
강활	<i>Ostericum koreanum</i> (Umbelliferae)	whole	137.6
갯기름나물	<i>Peucedanum japonicum</i> (Umbelliferae)	herba	95.3
겨자무	<i>Armoracia lapathifolia</i> (Cruciferae)	herba	122.9
		aerial	137.2
		whole	114.2
고련피	<i>Melia azedarach</i> (Meliaceae)	whole	114.2
고본	<i>Angelica tenuissima</i> (Umbelliferae)	whole	156.4
고비	<i>Osmunda japonica</i> (Osmundaceae)	aerial	111.8
고삼	<i>Sophora flavescens</i> (Leguminosae)	whole	126.9
골담초	<i>Caragana sinica</i> (Leguminosae)	whole	108.3
골잎원추리	<i>Hemerocallis lilioasphodelus</i> (Liliaceae)	whole	112.8
		rhizoma	154.1
곰취	<i>Ligularia fischeri</i> (Compositae)		
공사인	<i>Amomum villosum</i> (Zingiberaceae)	whole	101.5
구기자	<i>Lycium chinense</i> (Solanaceae)	whole	83.8
		herba	99.6
		fructus	83.3
		aerial	106.2
구릿대	<i>Angelica dahurica</i> (Umbelliferae)	whole	128.9
구맥	<i>Dianthus superbus</i> (Caryophyllaceae)	whole	98.8
구절초	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>latilobum</i> (Compositae)	whole	122.9
기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i> (Crassulaceae)	aerial	93.8
		whole	302.8
		seed	95.3
긴강남차	<i>Cassia tora</i> (Leguminosae)	whole	106.0
까마중	<i>Salvia miltiorrhiza</i> (Labiatae)	fructus	94.7
		whole	101.5
까치수염	<i>Lysimachia barystachys</i> (Primulaceae)	aerial	101.6
꼬리풀	<i>Veronica linariaefolia</i> (Scrophulariaceae)	whole	118.8
꽃향유	<i>Elsholtzia splendens</i> (Labiatae)	whole	115.6
파리	<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>francheti</i> (Solanaceae)	whole	121.1
		herba	110.6
노랑붓꽃	<i>Iris koreana</i> (Iridaceae)	whole	104.1
노회	<i>Aloe vera</i> (Liliaceae)	whole	300.0
누로	<i>Rhaponticum uniflorum</i> (Compositae)	whole	92.5
능소화	<i>Campsis grandiflora</i> (Bignoniaceae)	herba	117.0
		herba	158.7
닭의장풀	<i>Commelina communis</i> (Commelinaceae)	flower	88.4
닥풀	<i>Hibiscus manihot</i> (Malvaceae)	whole	117.4
		herba	92.7
		fructus	91.8
		bud	105.6
		aerial	94.2

Table I. Continued

Herbal drugs (Korean name)	Scientific name (Family)	Part	Inhibition (%)
당귀	<i>Ligusticum acutilobum</i> (Umbelliferae)	whole	128.0
		herba	138.1
		fructus	110.6
대극	<i>Euphorbia pekinensis</i> (Euphorbiaceae)	stem	182.6
대황	<i>Eisenia bicyclis</i> (Alariaceae)	whole	87.3
		herba	112.0
더위지기	<i>Artemisia iwayomogi</i> (Compositae)	aerial	102.9
도꼬마리	<i>Xanthium strumarium</i> (Compositae)	whole	111.6
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Campanulaceae)	whole	122.4
독활	<i>Aralia continentalis</i> (Araliaceae)	whole	87.0
		seed	105.3
		herba	162.4
		fructus	103.6
돌나물	<i>Sedum sarmentosum</i> (Crassulaceae)	whole	129.8
돌의	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Cucurbitaceae)	herba	126.6
동규자	<i>Malva verticillata</i> (Malvaceae)	whole	120.5
두베부추	<i>Allium senescens</i> (Liliaceae)	aerial	104.0
뚝갈	<i>Patrinia villosa</i> (Valerianaceae)	whole	119.3
마	<i>Dioscorea batatas</i> (Dioscoreaceae)	herba	126.1
		whole	79.6
마두령	<i>Aristolochia debilis</i> Sieb. et Zucc. (Aristolochiaceae)	whole	81.0
마삭줄	<i>Trachospermum asiaticum</i> var. <i>intermedium</i> (Apocynaceae)	whole	118.3
마황	<i>Ephedra sinica</i> (Ephedra)	radix	2,051.0
만년청	<i>Rohdea japonica</i> (Liliaceae)	herba	106.4
만삼	<i>Codonopsis pilosula</i> (Campanulaceae)	aerial	108.0
만현자	<i>Vitex rotundifolia</i> (Verbenaceae)	whole	96.5
맑은대쑥	<i>Artemisia keiskeana</i> (Compositae)	whole	104.9
맥문동	<i>Liriope platyphylla</i> (Liliaceae)	whole	124.8
		herba	121.6
		fructus	108.2
머루	<i>Vitis coignetiae</i> (Vitaceae)	herba	101.3
머위	<i>Petasites japonicus</i> (Compositae)	whole	102.4
명석팔기	<i>Rubus parvifolius</i> (Rosaceae)	whole	107.9
매발톱꽃	<i>Aquilegia buergeriana</i> var. <i>pallidiflora</i> (Ranunculaceae)	whole	88.9
멧대추	<i>Zizyphus jujuba</i> (Rhamnaceae)	fructus	122.5
모란	<i>Paeonia suffruticosa</i> (Ranunculaceae)	flower	209.2
		whole	108.5
목통	<i>Aristolochia manshuriensis</i> (Aristolochiaceae)	whole	93.5
목향	<i>Inula helenium</i> (Compositae)	whole	120.2
목화	<i>Gossypium herbaceum</i> (Malvaceae)	herba	152.3
무릇	<i>Scilla scilloides</i> (Liliaceae)	seed	130.3
		aerial	116.1
미국자리궁	<i>Phytolacca americana</i> (Phytolaccaceae)	aerial	90.9
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i> (Compositae)	aerial	90.6
박주가리	<i>Metaplexis japonica</i> (Asclepiadaceae)	aerial	94.7
박하	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i> (Labiatae)	whole	137.2
배초향	<i>Agastache rugosa</i> (Labiatae)	aerial	107.3

Table I. Continued

Herbal drugs (Korean name)	Scientific name (Family)	Part	Inhibition (%)
백개자	<i>Sinapis alba</i> L. (Cruciferae)	whole	80.5
백모	<i>Imperata cylindrica</i> var. <i>koenigii</i> (Gramineae)	radix	94.9
백부령	<i>Poria cocos</i> (Polyporaceae)	whole	80.0
백선	<i>Dictamnus dasycarpus</i> (Rutaceae)	whole	110.6
백출	<i>Atractylodes japonica</i> (Compositae)	whole	118.0
뽕딸기	<i>Duchesnea chrysantha</i> (Rosaceae)	aerial	122.0
뽕무	<i>Geum japonicum</i> (Rosaceae)	aerial	117.1
별개미취	<i>Aster koraiensis</i> (Compositae)	whole	122.5
별노랑이	<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i> (Leguminosae)	whole	111.0
범부채	<i>Belamcanda chinensis</i> (Iridaceae)	fructus	152.3
복분자	<i>Rubus coreanus</i> (Rosaceae)	whole	151.5
부용	<i>Hibiscus mutabilis</i> (Malvaceae)	whole	131.4
부채마	<i>Dioscorea nipponica</i> (Dioscoreaceae)	aerial	126.7
부처손	<i>Selaginella tamariscina</i> (Selaginaceae)	whole	175.7
부추	<i>Allium tuberosum</i> (Liliaceae)	whole	111.9
부평초	<i>Spirodela polyrhiza</i> (Lemnaceae)	whole	99.2
붓꽃	<i>Iris nertschinskia</i> (Iridaceae)	whole	118.3
비파	<i>Eriobotrya japonica</i> (Rosaceae)	herba	403.8
사철쑥	<i>Artemisia capillaris</i> (Compositae)	whole	112.4
산국	<i>Chrysanthemum boreale</i> (Compositae)	whole	112.2
산꼬리풀	<i>Veronica rotunda</i> var. <i>subintegra</i> (Scrophulariaceae)	whole	164.8
산딸기	<i>Rubus crataegifolius</i> (Rosaceae)	whole	144.0
산마늘	<i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> (Liliaceae)	radix	131.4
산부추	<i>Allium thunbergii</i> (Liliaceae)	whole	120.2
산뽕나무	<i>Morus bombycis</i> (Moraceae)	herba	106.7
산사	<i>Crataegus pinnatifida</i> (Rosaceae)	whole	93.5
산옥잠화	<i>Hosta lancifolia</i> (Liliaceae)	whole herba	87.6 111.9
산초	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> (Rutaceae)	whole herba	154.1 129.8
삼지구엽초	<i>Epimedium koreanum</i> (Berberidaceae)	aerial whole	93.5 107.3
삼칠근	<i>Panax notoginseng</i> (Araliaceae)	whole	86.2
상기생	<i>Loranthus ramulus</i> (Loranthaceae)	whole	78.5
새모래덩굴	<i>Menispermum dauricum</i> (Menispermaceae)	whole	123.6
석결명	<i>Cassia occidentalis</i> (Leguminosae)	whole	139.9
석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i> (Orchidaceae)	whole	143.6
선모	<i>Curculigo orchoides</i> Gaertn (Amarylidaceae)	radix	105.8
선복화	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i> (Compositae)	whole	99.2
소리쟁이	<i>Rumex crispus</i> (Polygonaceae)	whole	125.2
소회향	<i>Foeniculum vulgare</i> (Umbelliferae)	whole aerial	88.5 127.1
속단	<i>Phlomis umbrosa</i> (Labiatae)	whole	105.0
속새	<i>Equisetum hyemale</i> (Equisetaceae)	whole	88.2
숨양지	<i>Potentilla discolor</i> (Rosaceae)	flower	145.0

Table I. Continued

Herbal drugs (Korean name)	Scientific name (Family)	Part	Inhibition (%)
췌양	<i>Cynomorium songaricum</i> Rupr. (Gramineae)	aerial	89.2
쇠무릎	<i>Achyranthes japonica</i> (Amaranthaceae)	aerial	102.9
눈개승마	<i>Aruncus dioicus</i> var. <i>kamtschaticus</i> (Rosaceae)	whole	123.8
술괘랭이꽃	<i>Dianthus superbus</i> var. <i>longicalycinus</i> (Caryophyllaceae)	aerial	100.0
식방풍	<i>Ledebouriella seseloides</i> (Umbelliferae)	whole	111.0
씀바귀	<i>Ixeris dentata</i> (Compositae)	whole	159.6
애기똥풀	<i>Chelidonium majus</i> var. <i>asiaticum</i> (Papaveraceae)	whole	102.7
야콘	<i>Polymnia sonchifolia</i> (Compositae)	herba	142.5
약메밀	<i>Fagopyrum esculentum</i> (Polygonaceae)	aerial	153.7
양하	<i>Zingiber mioga</i> (Zingiberaceae)	whole	124.8
영경귀	<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>ussuriense</i> (Compositae)	whole	152.3
여정자	<i>Ligustrum lucidum</i> Ait. (Oleaceae)	fructus	91.2
영신초	<i>Polygala japonica</i> Houtt (Polygalaceae)	whole	98.1
영지	<i>Ganoderma lucidum</i> (Polyporaceae)	whole	99.0
영춘화	<i>Jasminum nudiflorum</i> (Oleaceae)	aerial	149.1
오갈피	<i>Acanthopanax seoulense</i> (Araliaceae)	herba	111.4
		fructus	108.5
오매	<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc. (Rosaceae)	whole	703.5
오미자	<i>Schizandra chinensis</i> (Magnoliaceae)	whole	103.0
		herba	121.6
오수유	<i>Evodia officinalis</i> (Rutaceae)	fructus	559.3
오이풀	<i>Sanguisorba officinalis</i> (Rosaceae)	seed	119.6
와송	<i>Sedum sarmentosum</i> Bge. (Crassulaceae)	whole	99.5
왕불유행	<i>Vaccaria segetalis</i> (Neck.) Gareke (Caryophyllaceae)	whole	84.6
왕원추리	<i>Hemerocallis fulva</i> var. <i>kwanso</i> (Liliaceae)	whole	107.3
용안육	<i>Euphoria longan</i> (Lour.) Steud. (Sapindaceae)	whole	85.8
우영	<i>Arctium lappa</i> (Compositae)	aerial	123.0
원추리	<i>Hemerocallis fulva</i> (Liliaceae)	whole	103.2
		rhizoma	94.9
유럽감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Leguminosae)	whole	120.6
		seed	133.5
육종용	<i>Boschniakia rossica</i> (Orobanchaceae)	whole	91.0
윤관나물	<i>Disporum sessile</i> (Liliaceae)	whole	105.5
율무	<i>Coix lachrymajobi</i> var. <i>mayuen</i> (Gramineae)	aerial	112.7
으름	<i>Akebia quinata</i> (Lardizabalaceae)	herba	72.9
은방울꽃	<i>Convallaria keiskei</i> (Liliaceae)	rhizoma	111.4
		flower	98.0
은행	<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)	herba	580.5
개나리	<i>Forsythia koreana</i> (Oleaceae)	whole	115.1
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i> (Labiatae)	whole	127.1
		aerial	114.6
익지인	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miq. (Zingiberaceae)	whole	88.1
안동	<i>Lonicera japonica</i> (Caprifoliaceae)	fructus	135.8
		aerial	163.3
		whole	129.6
인진	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb. (Compositae)	whole	90.0
		herba	106.0

Table I. Continued

Herbal drugs (Korean name)	Scientific name (Family)	Part	Inhibition (%)
일당귀	<i>Angelica japonica</i> (Umbelliferae)	aerial	120.5
일천궁	<i>Cnidium officinale</i> (Umbelliferae)	aerial	113.3
		whole	147.7
작두콩	<i>Canavalia gladiata</i> (Leguminosae)	fructus	101.3
		aerial	100.2
작약	<i>Paeonia lactiflora</i> var. <i>hortensis</i> (Ranunculaceae)	whole	96.2
저실자	<i>Broussonetia papyrifera</i> (L) Vent (Moraceae)	whole	90.5
적하수오	<i>Pleuropterus multiflorus</i> (Polygonaceae)	whole	139.0
		herba	112.0
전공피	<i>Sorbus amurensis</i> (Malaceae)	aerial	475.8
전충	<i>Artemisia argyi</i> (Compositae)	whole	113.0
절굿대	<i>Echinops setifer</i> (Compositae)	whole	117.9
접시꽃	<i>Althaea rosea</i> (Malvaceae)	whole	112.8
정향	<i>Eugenia aromaticum</i> (Myrtaceae)	whole	96.5
제비꽃	<i>Viola mandshurica</i> (Violaceae)	whole	107.3
		aerial	111.8
제충국	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> (Compositae)	whole	144.0
조각자	<i>Gleditsia sinensis</i> (Leguminosae)	whole	96.5
조개나물	<i>Ajuga multiflora</i> (Labiatae)	whole	128.9
조구등	<i>Uncaria rhynchophylla</i> (Rubiaceae)	whole	86.2
조협	<i>Gleditsia japonica</i> var. <i>koraiensis</i> (Nakai) (Leguminosae)	fructus	1,534.5
죽력	<i>Phyllostachys nigra</i> var. <i>henonis</i> Stapf (Gramineae)	whole	96.7
죽자초	<i>Macleaya cordata</i> (Papaveraceae)	whole	132.6
중나리	<i>Lilium leichtlinii</i> var. <i>tigrinum</i> (Liliaceae)	whole	119.2
쥐손이풀	<i>Geranium sibiricum</i> (Geraniaceae)	aerial	127.9
지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge (Liliaceae)	whole	137.6
지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Scrophulariaceae)	herba	131.7
		whole	94.2
진달래	<i>Rhododendron mucronulatum</i> (Ericaceae)	whole	130.3
진오가피	<i>Acanthopanax koreanum</i> Nakai (Araliaceae)	whole	97.7
질경이	<i>Plantago asiatica</i> (Plantaginaceae)	whole	102.3
		seed	145.0
		aerial	114.3
짚신나물	<i>Agrimonia pilosa</i> (Rosaceae)	whole	107.8
참나리	<i>Lilium tigrinum</i> (Liliaceae)	whole	113.8
참쑥	<i>Artemisia lavandulaefolia</i> (Compositae)	aerial	158.7
참죽나물	<i>Cedrela sinensis</i> (Meliaceae)	herba	127.1
창포	<i>Acorus calamus</i> var. <i>angustatus</i> (Araceae)	herba	96.3
천남성	<i>Arisaema amurense</i> var. <i>serratum</i> (Araceae)	fructus	133.0
		whole	88.0
천마	<i>Gastrodia elata</i> (Orchidaceae)	whole	109.5
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Liliaceae)	whole	110.6
천속단	<i>Dipsacus asper</i> Wall. (Dipsacaceae)	whole	95.0
천오	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx. (Ranunculaceae)	whole	100.5
천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i> (Cucurbitaceae)	whole	91.5
청피	<i>Citrus reticulata</i> Blanco. (Rutaceae)	whole	107.9

Table I. Continued

Herbal drugs (Korean name)	Scientific name (Family)	Part	Inhibition (%)
초과	<i>Amomum tsao-ko</i> Crevost. (Zingiberaceae)	fructus	975.8
측백	<i>Thuja orientalis</i> (Cupressaceae)	whole	70.5
층층둥글레	<i>Polygonatum stenophyllum</i> (Liliaceae)	radix	118.3
치커리	<i>Cichorium intybus</i> (Compositae)	whole	144.5
킴프리	<i>Symphytum officinale</i> (Boraginaceae)	whole radix	123.4 105.8
큰평의비름	<i>Sedum spectabile</i> (Crassulaceae)	whole	105.8
큰애기수영	<i>Rumex acetosella</i> (Polygonaceae)	whole	297.2
타래붓꽃	<i>Iris pallasii</i> var. <i>chinensis</i> (Iridaceae)	herba	113.3
택사	<i>Alisma canaliculatum</i> (Alismataceae)	whole	83.5
뜸풀	<i>Achillea sibirica</i> (Compositae)	whole	131.7
파극	<i>Morinda officinalis</i> (Rubiaceae)	whole	93.6
패랭이	<i>Dianthus sinensis</i> (Caryophyllaceae)	flower	124.3
할미꽃	<i>Pulsatilla koreana</i> (Ranunculaceae)	whole	103.7
합환피	<i>Albizia julibrissin</i> (Leguminosae)	whole	100.5
향부자	<i>Cyperus rotundus</i> (Cyperaceae)	whole seed	110.7 131.4
향유	<i>Elsholtzia ciliata</i> (Labiatae)	whole	105.0
현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i> (Scrophulariaceae)	whole	71.2
현호색	<i>Corydalis turtschaninovii</i> (Fumariaceae)	whole	76.2
호장근	<i>Reynoutria elliptica</i> (Polygonaceae)	whole radix herba	313.0 192.4 833.0
호황련	<i>Picrorrhiza kurroa</i> Benth (Scrophulariaceae)	whole	95.0
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i> (Labiatae)	whole aerial	545.5 96.7
황기	<i>Astragalus membranaceus</i> (Leguminosae)	whole	95.0
황정	<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> (Liliaceae)	whole radix	107.3 90.6
후박	<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wils. (Magnoliaceae)	bark	1,295.4

우 1/15 M KCl-HCl buffer(pH 2.0)에 최종 농도 10 unit 되도록 조정하였으며, α -chymotrypsin, trypsin, papain의 경우에는 1/15 M McIlvaine buffer(pH 7.6)에 녹여 최종농도가 각각 5 unit, 70 unit, 0.5 unit 되도록 조정하여 사용하였다. 각각의 효소 저해율은 다음 식에 의해 계산하였다(C1: 식물 추출물 무첨가구의 흡광도, C2: 효소 무첨가구의 흡광도 S: 식물 추출물 및 효소 첨가구의 흡광도).

$$I (\%) = 100 \left[1 - \frac{S-C2}{C1-C2} \right]$$

결과 및 고찰

260 여종의 약용 및 야생식물의 메탄올 추출물의 최종농

도가 1.5 mg/ml 되게 첨가한 후, 항혈전 활성을 Thrombin Time을 측정하여 평가하였다. 그 결과, 기린초, 노회, 마황, 비파엽, 오매, 오수수유, 은행, 전공피, 조협, 초과, 큰애기수영, 호장근, 황금, 후박 등의 다양한 추출물에서 300% 이상의 우수한 트롬빈 저해활성을 확인하였다(Table I). 특히, 마황, 오매, 조협, 초과, 호장근, 후박의 추출물에서는 600%의 저해율을 나타내어 아스피린의 2배 이상의 혈전생성 저해 효과를 나타내어 새로운 혈전 생성 저해제로의 개발이 가능함을 시사하였으며, 또한 이러한 결과는 전통한방에서 혈관계 질환 및 어혈을 치료하는 호장근, 기린초, 은행의 사용과 일치하는 결과이다. 1차 선별된 14종의 추출물의 항혈전 활성을 검토하기 위해 각각의 시료를 다양한 DMSO로 희석하여 최종농도가 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg/ml 되도록

각각 첨가하여 Thrombin time을 측정 한 결과는 Table II에 나타내었다. 이 때 대조구로는 아스피린과 헤파린을 사용하였다. 헤파린의 경우 2 µg/ml의 농도에서 아스피린의 1 mg/ml 농도의 저해활성을 나타내었다. 선별된 14종의 추출물은 농도 저하에 따라 전반적으로 항혈전 활성이 감소하였으며, 오매, 오수유, 조협, 호장근, 후박의 경우 농도에 따른 저해 활성의 감소가 두드러지게 나타났다. 그러나, 마황, 비파, 은행 및 후박 추출물은 0.5 mg/ml의 낮은 농도로 300%의 저해율을 나타내어 아스피린의 항혈전 효과보다 우수함을 알 수 있었다. aPTT에 의한 혈액 항응고 활성 평가의 결과 (Table II), 노회, 마황, 비파, 은행 및 후박 추출물이 항응고 성 물질을 포함하고 있음을 확인하였다. 한편, 혈전관련 질환의 예방 및 치료를 위해서는 이미 생성된 혈전의 분해활성 또한 중요하므로 1차 선별된 14종의 시료를 대상으로 혈전분해활성을 변형된 Astrup 등의 방법¹⁵⁾으로 평가하였다. 그러나 대조구로 사용된 plasmin을 제외한 어떤 추출물 시료에서도 투명환을 확인할 수 없었다(results not shown).

선별된 추출물의 식품 소재 및 식물생약으로의 개발 가능성을 위해 트롬빈 이외의 소화효소 저해활성과 열 안전성을 검토하였다(Table II). 먼저 소화효소 저해 활성의 경우, 1 mg/ml의 농도에서 pepsin(carboxyl protease), papain(thiol protease), trypsin, chymotrypsin(serine protease)을 모두 저

해하는 추출물은 없었으며, 노회, 전공피, 큰애기수영 등 각각의 효소들을 중복적으로 저해하는 추출물이 다수 확인되었다. 따라서 조추출물의 정제를 통한 활성성분의 분획 및 보다 낮은 농도의 추출물 사용이 필요할 것으로 생각되며, 특히, 트롬빈과 동일한 세린계 단백질 분해효소(serine protease)인 trypsin 및 chymotrypsin에, 노회를 제외한 추출물들의 저해 양상이 다르게 나타나므로, 트롬빈 특이적 저해물질의 개발도 가능성을 제시하고 있다. 한편 선별 추출물을 100 °C에서 30분간 열처리한 후 잔존 활성을 측정 한 결과, 노회, 마황, 비파, 오매, 오수유, 전공피, 조협, 초과, 큰애기수영, 황금 및 후박에서 열처리에 의한 활성감소가 확인되었으며, 특히 노회, 비파, 오수유, 전공피, 조협, 황금의 경우 완전히 활성을 상실하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 기린초 추출물의 경우 활성변화가 없었으며, 은행(잎) 및 호장근(잎) 추출물의 경우 열처리에 의한 활성의 급격한 증가가 나타났다. 이러한 추출물의 열 안전성은 이후 식품 소재개발 및 가공적성의 기초적인 결과로 이용될 것이다. 현재, 심혈관계 질환의 예방 및 치료가 가능한 다양한 형태의 식품 소재 및 식물 생약원으로서 은행(잎), 호장근(잎), 초과(열매), 후박(근피), 마황(뿌리)을 2차 선정하였으며, 현재 선정 추출물을 대상으로 한 *in vivo*에서의 활성검색과 활성성분의 정제를 진행 중이다.

Table II. Inhibitory activities of fourteen plant extracts against human thrombin determined by thrombin time (TT) and activated partial thromboplastin time (aPTT)

Herbal drugs	Part used	TT (%)							aPTT (%)	
		Concentration (mg/ml)							1.0	0.5
		1.5	1.0	0.5	0.25	0.1	0.002	0		
<i>Sedum kamtschaticum</i>	whole	302	130	119	120	107	ND*	100	148	ND
<i>Aloe vera</i>	whole	300	261	227	114	103	ND	100	> 2,100	177
<i>Ephedra sinica</i>	radix	2,051	1,514	1,152	743	378	ND	100	> 2,100	> 2,100
<i>Eriobotrya japonica</i>	herba	403	323	293	245	111	ND	100	> 2,100	184
<i>Prunus mume</i>	whole	703	187	112	111	98	ND	100	136	ND
<i>Evodia officinalis</i>	fructus	559	169	132	115	90	ND	100	95	ND
<i>Ginko biloba</i>	herba	580	509	315	169	160	ND	100	491	ND
<i>Sorbus amurensis</i>	aerial	475	259	211	119	107	ND	100	141	ND
<i>Gleditsia japonica var. koraiensis</i>	fructus	1,534	338	225	118	110	ND	100	105	ND
<i>Amomum tsao-ko</i> Crevest	fructus	975	305	150	150	121	ND	100	201	ND
<i>Rumex acetosella</i>	whole	297	193	121	117	114	ND	100	130	ND
<i>Reynoutria elliptica</i>	herba	833	251	191	152	125	ND	100	102	ND
<i>Scutellaria baicalensis</i>	whole	545	195	126	109	100	ND	100	145	ND
<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wils.	bark	1,295	397	714	330	236	ND	100	> 2,100	> 2,100
aspirin	-	382	311	137	131	116	ND	100	ND	ND
heparin	-	ND	ND	ND	ND	ND	301	100	ND	ND

*ND : Not determined.

Table III. Heat stability and inhibitory activity against proteolytic digestive enzymes of fourteen plant extracts

Herbal drugs	Part used	Inhibition (%)				TT (%) after heat treatment*	
		pepsin	papain	trypsin	chymotrypsin	1.5 mg/ml	0.1 mg/ml
<i>Sedum kamtschaticum</i>	whole					290	108
<i>Aloe vera</i>	whole			89	53	103	100
<i>Ephedra sinica</i>	radix		42		20	1,750	151
<i>Eriobotrya japonica</i>	herba		69			136	100
<i>Prunus mume</i>	whole		46			423	94
<i>Evodia officinalis</i>	fructus	—				94	91
<i>Ginko biloba</i>	herba	36		54		1,750	220
<i>Sorbus amurensis</i>	aerial		100	38		105	110
<i>Gleditsia japonica</i> var. <i>koraiensis</i>	fructus					104	104
<i>Amomum tsao-ko</i> Crevost	fructus	ND**	ND	ND	ND	258	135
<i>Rumex acetosella</i>	whole	89	16			152	93
<i>Reynoutria elliptica</i>	herba		52		11	1,160	119
<i>Scutellaria baicalensis</i>	whole	6	66			96	93
<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wils.	bark			70		1,450	157

*heat treatment: The samples were treated at 100°C for 30 min and the remaining thrombin inhibitory activity was evaluated.

**ND : Not determined.

사 사

본 연구는 2003년도 경상북도 바이오산업기술 개발 사업 (G03-16)의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. Korea National Statistical Office. (2000). A study on causes of death for 1999.
2. Lee, S.-S., Kim, S.-M., Park U.-Y., Kim, H.-Y., and Shin, I.-S. (2002). Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**: 283-289.
3. Yun, Y.-P., Kang, W.-S., and Lee, M.-Y. (1996). The antithrombotic effects of green tea catechins. *J. Fd Hyg. Safety*, **11**: 77-82.
4. Yun-Choi, H. S., Chung, K. S., Kim, M. H., and Oh, J. H. (1995). Antithrombotic effects of some traditional plant medicines. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 154-158.
5. Weitz, J. I. and Crowther, M. (2002). Direct thrombin inhibitors. *Thrombosis Research*, **106**: 275-284.
6. Butenas, S. and Mann, K. G. (2002). Blood coagulation. *Biochemisrty (Moscow)*, **67**: 3-12.
7. Hsieh, K.-H. (1997). Thrombin interaction with fibrin polymerization sites. *Thrombosis Research*, **86**: 301-316.
8. Hahn, B. S., Wu, S., Kim, S.-W., and Kim, Y. S. (1999). Evaluation of anticoagulant and fibrinolytic activities from crude extracts of insects. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 409-412.
9. Cattaneo, F., Trento, F., Pescador, R., Porta, R., and Furro, L. (2002). Pharmacodynamics of the anticoagulant activity (APTT) of an algal polysaccharide. *Thrombosis Research*, **105**: 455-457.
10. Gwak, H.-S. and Chun, I. K. (2000). Performulation study of aspalatone, a new antithrombotic agent. *The J. Appl. Pharmacol.* **8**: 332-337.
11. Molina, V., Arruzazabala, M. L., and Mas, C. R. (2003). Synergistic effect of D-003 and aspirain on experimental thrombosis models. *Prostag. Leukotr. Ess.* **68**: 305-310.
12. Paik, Y.-S., Song, J.-K., Yoon, C. H., Chung, K. S., and Yun-Choi, H. S. (1995). Anti-platelet and anti-thrombotic effects of *Gastrodia elata*. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 385-389.
13. Lee, T. B. (1993). Illustrated flora of Korea, Hwang Moon Sa, Seoul.
14. Lee, H. J., Kim, J. S., Heo, G.-Y., Lee, K.-B., Rhee, I.-K., and Song, K.-S. (1999). Inhibitory activities of Basidiomycetes on prolyl endopeptidase, acetylcholine esterase and coagulation. *J. Korean Soc. Agri. Chem. Biotechnol.* **42**: 336-343.
15. Astrup, T. and Mullertz, S. (1952). The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* **40**: 346-350.
16. Yi, D.-H. and Seu, J.-H. (1982). Trypsin inhibitor from *Streptomyces* sp. (Part 1) Isolation of microorganism and purification of the inhibitor. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **10**: 275-281.

(2004년 1월 9일 접수)