

항혈소판 작용 검색

표미경

(주)이에스바이오텍, 이에스생명과학연구소

I. 서 언

혈소판(platelet)은 거핵구(megakaryocyte)의 세포질에서 떨어진 조각으로 순환 혈액 중에 존재하며 혈관 손상시 부착하여 저장된 혈소판 물질을 방출하고 혈소판 응집괴를 형성하여 손상된 혈관벽을 막는 지혈 과정에 꼭 필요한 혈액 세포이다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 혈소판은 α -granule, Dense granule(δ -granule), λ -granule에 혈소판 활성화에 기여하는 다양한 물질을 저장하고 있으며, 혈소판 세포막은 부착이나 응집과정에 필수적인 콜라겐(collagen), 트롬빈(thrombin), ADP, 에피네프린(epinephrine), 트롬복산 $A_2(TXA_2)$, 세로토닌(serotonin), 혈소판 활성화인자(PAF) 등에 대한 수용체(receptor)와 조직이나 기관 구성에 필요한 세포와 세포를 부착하게 하는 인테그린(integrin)을 포함하고 있다.

그러나 각종 과민 반응에 의하여 활성화된 혈소판은 혈전성 질환인 동맥경화, 심근경색, 뇌졸중 등의 발현에 기여할 뿐만 아니라, 혈소판 활성화시 순환 혈액내 방출되는 혈소판저장물질과 각종 인테그린은 염증 반응을 증대하는 데도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 혈전 관련 질환은 우리나라 뿐만 아니라 세계적으로 주요한 사망원인이 되고 있어 이를 예방하고 치료하는 데에 관한 관심은 아주 지대하다.

혈소판 혈장 혼탁도 측정법은 aggregometer(Chrono-Log Corp. U.S.A.)라는 장치만 있으면 비교적 실험 조작이 간단하고 비용이 적게 들며 정량화가 가능하고 실험 결과가 생체내 실험에 의한 결과와 일치도가 높아서 항혈소판 작용 검색을 위해 가장 널리 이용되는 방법이다. 혈소판 세포막에 존재하는 여러 가지 인자(thrombin, collagen, ADP, epinephrine, PAF 등)에 대한 수용체는 혈소판이 이들 인자에 의해 자극 받아 활성화되어 일련의 과정을 거쳐 응집을 일으키게 한다. 혈소판 혈장 혼탁도 측정법은 이들 인자에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하는 물질을 찾고자 고안된 방법으로 혈소판 풍부혈장이 갖는 탁도(turbidity)에 의한 빛의 투과도(T%)를 측정함으로써 결과가 얻어진다. 진한 색깔을 띠거나 물에 대한 용해도가 현저하게 떨어지는 물질의 검색에는 다소 어려운 점이 있다.

생체내 항혈전 측정법은 혈소판을 포함한 혈구세포, 혈액응고 인자, 혈관벽, shear stress 등 다양한 인자들이 관여한다. 생체내에서 혈전생성을 유도하는 방법은 혈관에 상해를 주는 방법, 혈관내에서 이물질과 접촉시키는 방법, 혈전 유발 물질을 주사하는 방법 등 다양한 방법

판이 활성화 되어 응집되면 혼탁도가 감소되어 맑아진다. 이러한 성질을 이용하여 PRP에 응집유도 물질을 가하고 혼탁의 감소정도를 550 nm에서 측정함으로써 혈소판의 응집도를 측정하는 것이다.

2) 시약 및 기구

(1) 시료 : 작물로부터 유효성분을 추적하기 위한 시료의 추출 및 추출물의 분획, 분리 과정은 추정되는 작용 성분이 어떤 종류인지에 따라 적절한 방법을 찾아야 한다. 시료는 생리 식염수에 녹이는 것이 가장 좋으나 물에 잘 녹지 않는 시료는 10% 에탄올 함유 생리식염수, 또는 10% DMSO 함유 생리식염수에 녹여 사용한다. 시료를 혈소판 결핍 혈장(platelet poor plasma, PPP)에 녹여 사용하는 경우는 당일 조제하여 사용함을 원칙으로 한다.

(2) 3.8% trisodium citrate: 비이커에 증류수 100 ml을 넣고 trisodium citrate 3.8 g을 넣은 후 stirring bar를 넣고 교반한다.

(3) 멸균생리식염수

(4) 혈소판 응집의 유도제 : 혈소판 응집 유도제는 다양하다. 혈소판 세포막에는 다양한 응집 유도제에 대한 수용체가 있어서 어떤 유도제에 얼마만큼의 억제활성을 갖는지를 비교검토함으로써 시료가 가지는 억제활성 경로를 예측할 수 있다. 많이 이용되는 몇가지 유도제의 조제법은 아래와 같다.

- ① 콜라겐(collagen, Chrono-Log Corp. USA) : collagen 1 mg/ml 농도의 stock solution으로 시판되며, 실험 당일 2배 희석하여 500 µg/ml이 되게 생리 식염수로 희석하여 ice에 보관하여 사용한다. 최종 농도 1-5 µg/ml에서 최대 응집이 일어난다. Stock solution은 냉장보존한다.
- ② ADP(adenosine 5'-diphosphate, Chrono-Log Corp. USA) : 시판되는 ADP 시약에 5 ml의 생리식염수를 넣어 1 mM의 stock solution이 되게 한 다음 100 µl씩 분주하여 냉동고에 보관하고, 필요할 때마다 꺼내 사용한다. 최종농도 5-10 µM에서 최대 응집이 일어난다.
- ③ Arachidonic acid(Chrono-Log Corp. USA) : 시판사에서 지시하는 대로 알부민용액으로 arachidonic acid를 희석하여 50 mM의 농도가 되게 조제한 것을 stock solution으로 사용하고 100 µl씩 분주하여 냉동보관하여 사용한다. 최종 농도 0.5-1.0 mM에서 최대 응집이 일어난다.
- ④ Thrombin(Chrono-Log Corp. USA) : 시판되는 트롬빈 시약에 생리식염수 1 ml을 가하여 10 units/ml이 되도록 stock solution을 조제한 후 100 µl씩 분주하여 냉동보관하여 사용한다. 최종 농도 1 unit/ml 에서 최대 응집이 일어난다.
- ⑤ Epinephrine(Chrono-Log Corp. USA) : 시판되는 에피네프린 시약에 5.0 ml의 증류수를 넣어 10 mM의 농도가 되도록 stock solution을 조제한다. 사용할 때는 이 stock solution을 생리식염수로 10배 희석하여 사용한다. 최종 농도 1-5 µM의 농도에서 최대 응집이 일어난다.

(5) Platelet aggregometer(Chrono-Log Corp. USA)

(6) Blood cell counter 또는 platelet counter

- (7) 원심분리기
- (8) Aggregometer용 cuvettes 및 stirring bar
- (9) Micropipette
- (10) 플라스틱 원심분리관
- (11) 혈청분리관
- (12) 수술 가위 및 핀셋
- (13) 10 ml 플라스틱 주사기

3) 혈액 채취

(1) 사람 혈액

혈액은 사람의 혈액을 실험하기 바로 전에 채혈하여 실험에 사용하는 것이 가장 이상적이며, 채혈하기 2주 전부터 혈소판 응집작용에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용하지 않은 사람의 것이라야 한다. 혈소판은 압력이나 자극에 의해 깨지기 쉬운 특성을 가지고 있어 플라스틱 주사기를 이용하여 천천히 채혈하여 3.8% trisod. citrate(혈액:3.8% trisod. citrate = 9:1)를 미리 넣어둔 플라스틱(polystyrene 또는 polypropylrene 등) 원심분리관에 기벽을 따라 조용히 넣어준 다음 뚜껑을 닫아 천천히 전도혼합 한다.

(2) 랫트 혈액

우리나라는 사람의 혈액을 직접 채혈하거나 공급 받기에 제한점이 많아 동물로부터 혈액을 채취하여 사용하는 경우가 많다. 각종 실험동물의 혈소판은 동물의 종류에 따라 크기, 수, 수명 등에 차이점이 있을 뿐만 아니라 혈소판 응집 유도제에 대한 반응도 상당한 차이가 있다. 때문에 경우에 따라서는 실험하고자 하는 목적에 선택된 동물의 혈소판이 적합한지를 고려할 필요가 있다.

혈소판 응집억제 반응에 가장 빈번하게 이용되는 혈액은 랫트와 토끼 혈소판인데 본 장에서는 랫트로부터 혈액을 채취하는 방법만을 기술한다. 혈소판 응집억제 실험에 이용되는 랫트는 몸무게가 250 ± 30 g이 되는 숫놈이 적당하다. 너무 작으면 채취할 수 있는 혈액의 양이 적고, 너무 크면 혈액은 많이 채취할 수 있으나 본인의 경험으로는 혈소판 응집반응이 둔해지는 경향이 있었다.

랫트를 에테르로 포화시킨 챔버에 넣어 마취시킨다. 마취가 너무 세면 랫트가 사망할 수 있고, 마취가 너무 약하면 흉부 절개시 마취가 깨어날 수 있으므로 마취 적정점을 찾아야 한다. 마취가 되었으면 랫트를 깨내어 에테르에 적신 솜을 넣은 컵을 쥐의 코에 씌우고 70% 알코올을 흉복부의 왼쪽 부분에 뿌린 다음 가위로 재빨리 절개하여 랫트의 우심실에서 우심방 쪽으로 미리 1 ml의 3.8% trisod. citrate를 넣어둔 플라스틱 주사기를 삽입하여 혈액이 10 ml (혈액 : 3.8% trisod. citrate=9 : 1)이 되도록 천천히 채취한다. 채혈된 주사기로부터 주사바늘을 분리하고 피스톤을 약간 뺀 다음 주사기 끝부분을 막고 항응고제가 섞이도록 천천히 위아래로 전도 혼합한 후 플라스틱 원심분리관에 기벽을 따라 서서히 분주 한다.

(3) 혈소판 풍부 혈장(PRP) 및 혈소판 결핍 혈장(PPP)의 제조

채혈한 원심분리관은 저울을 이용하여 평형을 맞춘 후, 200×g에서 10분간 원심분리한 후 혈청분리관을 이용하여 상층액을 분리하여 PRP를 얻고, 남은 층은 다시 700×g에서 15분간

Table 1. Platelet anti-aggregating activities of aporphine alkaloids isolated from leaves of *M.obovata*.

Compounds	IC ₅₀ (μM)			
	ADP ^a	Collagen ^{b,c}	Epinephrine ^{c,e}	AA ^{d,e}
ASA ^f	>1000	420	53	66
1	450	32	0.39	0.25
2	440	8.0	0.28	0.37
3	930	6.9	0.24	0.27
4	>1000	>1000	67	44
5	>1000	>500	>100	>100

^aADP; 2-5 μM, ^bcollagen 2-5 μg/ml, ^cepinephrine 1-4 μM, ^dsodium arachidonate 10-40 μM, ^ewith the threshold concentration of collagen (collagen 0.8-1.0 μg/ml), ^fASA; acetylsalicylic acid.

원심분리하여 PPP를 얻는다. PRP는 blood cell counter 또는 platelet counter를 이용하여 혈소판의 수를 사람의 경우 300~350×10⁶/ml 되게, 랫트의 경우 400~450×10⁶/ml이 되게 PPP 또는 생리식염수로 희석하여 조정한다.

4) 측정법

- (1) 혈소판 응집 측정기(platelet aggregometer)를 37°C 1,000 rpm으로 유지한다.
- (2) PRP 500 μl와 PPP 500 μl를 cuvette에 각각 넣는다. 이때 cuvette의 외면을 닦아 지문이 묻지 않도록 주의한다.
- (3) PRP(이때 PRP cuvette에는 stirring bar를 넣어 준다)와 PPP cuvette을 각자의 자리에 꽂고 5분간 incubation하여 검체의 온도를 37°C로 유지한다.
- (4) PRP에서 T=0%로, PPP에서 T=100%로 조정해 둔다.
- (5) PRP에 vehicle 또는 시료 용액을 5~10 μl를 가한다.
- (6) 1분후 혈소판 응집유도제를 마이크로 피펫을 이용하여 첨가하여 혈소판 응집을 유도한다.
- (7) 이를 5~10분 동안 관찰하여 혈소판 응집곡선을 예시(Fig. 2)와 같이 얻는다. 응집 억제율을 나타내는 시료는 vehicle만 가했을 때보다 T%의 상승이 억제된다.

5) 계산법

% inhibition 농도를 아래의 계산식과 같이 계산한다. 50% 억제 효과 농도(IC50)를 구할 경우에는 각각 IC50 수치가 약 25%, 50%, 75%의 범위가 되는 농도를 3회 이상 측정하여 통계치를 내야 한다. 통계법은 regression 분석을 한다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A : vehicle과 응집유도 물질을 가했을 때의 혈소판 응집도

B : 시료와 응집유도 물질을 가하였을 때의 혈소판 응집도

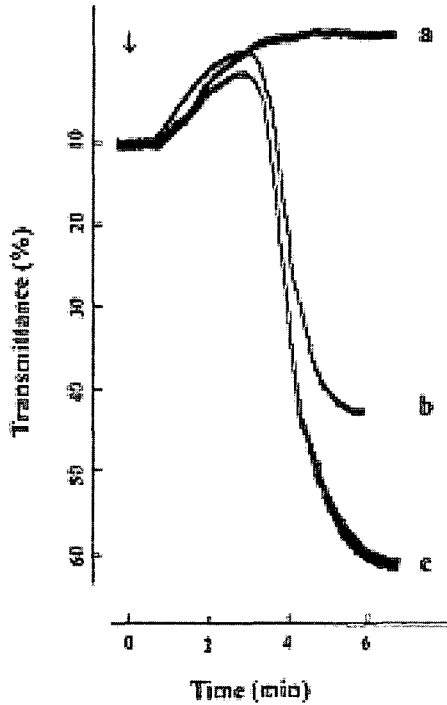


Fig. 2. Representative tracing of concentration-dependent increase in rat platelet aggregation induced by collagen. Collagen was added as indicated by the arrow. The concentration of collagen : a, 1.5 µg/ml; b, 2.0 µg/ml; c, 3.0 µg/ml. (from: Throm. Res. 2000; 100 : 511-518).

6) 결과

다음은 후박(*Magnolia obovata*) 잎으로부터 분리된 5가지의 aporphine alkaloids인 N-acetylanonaine (1), N-acetylxylopine (2), N-formylanonaine (3), liriodenine (4), lanuginosine (5) 에 대한 랫트 항혈소판 응집 검색 결과를 예시하였다(from: Plant Med. 2003; 69 : 267-269).

7) 주의점

혈소판은 동물의 종에 따라 이들 유도제에 반응하는 양상이나 그 정도가 다르고, 같은 종이라도 유도제의 종류에 따라 반응 양상이 다르다. 또한 응집제는 제조사에 따라 또는 같은 제조사라 하더라도 제조 단위에 따라 그 역가가 달라질 수 있으므로, 측정 전에 반드시 최대의 혈소판 응집을 얻는데 필요한 응집제의 최소한의 농도를 검토해야 하며, 가능하면 동일한 조건에서 매번 측정하도록 하는 것이 좋다.

2. 마우스 항혈전 검색법 (mouse anti-thrombotic assay)

1) 원리

마우스 꼬리 정맥에 혈소판 응집유도제를 주사하면 짧은 시간 내에 폐동맥에 대량의 혈전

형성이 유도되어 동물이 사망하게 되는데 시료가 이것을 얼마나 회복할 수 있는지를 관찰함으로써 혈전생성 억제 정도를 측정한다.

2) 시약 및 기구

- (1) 실험동물: 체중 20±2 g 정도의 ICR 계 숫놈 마우스가 적당하다.
- (2) 시료 및 혈소판 응집 유도제의 종류는 혈소판 혈장 혼탁도 측정법과 동일하다. 단, 마우스 항혈전 검색에는 효율적이고 경제적인 실험을 위하여 한가지의 혈소판 응집유도제를 사용하는 것보다는 두가지를 조합하여 사용하는 것을 권장한다. 통상 혈소판 응집 유도제는 한 종류만 사용했을 때보다 두 종류를 병용했을 때 혈소판 응집 능력이 상승한다.
- (3) 26G 주사바늘 달린 주사기
- (4) 마우스 경구투여용 needle
- (5) 마우스를 고정시키고 꼬리정맥에 주사 놓을 수 있는 장치

3) 측정법

- (1) 3시간 이상 절식시킨다.
- (2) 마우스에 1 g 당 0.01 ml이 되도록 조제한 시료 용액 또는 vehicle을 경구 투여한다.
- (3) 시료 투여 1시간 후 혈소판 응집 유도제(900 µg collagen+90 µg epinephrine/10 ml saline/kg)를 꼬리 정맥에 주사한다. 이때 혈소판 응집 유도제의 용량은 미리 실험하여 혈소판 응집 유도제 주사 후 15분내에 사망률이 약 90% 정도 되고, 양성 대조로서 아스피린 50 mg/kg을 경구 투여한 마우스에서 약 50% 회복율을 보이는 농도가 적당하다. 혈소판 응집 유도제 종류는 실험하고자 하는 목적에 따라 다르게 할 수 있다.
- (4) 주사후 15분 이내에 사망하거나 마비가 15분 이상 지속되는가를 관찰한다. 이때 마비란 마우스를 핀셋으로 다리를 건드렸을 때 움직이지 못하는 경우를 말한다.

4) 결과

다음은 부자(*Aconitum japonicum*)의 성분인 higenamine의 마우스 항혈전 검색법에 의한 결과를 예시하였다(from: Plant Med. 2001; 67 : 619-622).

Table 2. Protection of mice from thrombotic challenge with the oral administration of higenamine.

Sample	Dose (mg/kg)	Total number of mice	Mice recovered	
			(n)	(%)
Control		60	13	17
ASA ^a	50	53	32	52
Higenamine	50	30	11	37
	100	27	13	48

^aASA : acetylsalicylic acid

5) 주의점

본 검색 방법은 마우스의 종류에 따라 혈전 유도제의 용량이 달라질 수 있으며, 일정한 생육 환경을 유지하는 것 또한 중요하다. 뿐만 아니라 혈소판 응집유도제의 용량은 제조회사 및 제조 번호가 같다고 하더라도 실험 단위가 바뀔 때마다 재조정하는 것이 반드시 필요하다. 한 그룹당 실험동물의 수는 최소한 20마리 이상이라야 바람직하다.

참고문헌

1. Bang, N. U. and D. B. Wilson. 1999. Normal platelet function and antiplatelet drugs. ACC Current Journal Review. 8 : 13-16.
2. Hau, Y. and K. F. Ley. 2004. Role of platelets in the development of atherosclerosis. Trends Cardiovasc Med. 14(1) : 18-22.
3. Pyo, M. K., H. S. Yun-Choi, Y. J. Hong. 2003. Apparent heterogenous responsiveness of human platelet rich plasma to catecholamines. Platelets. 14 : 171-178.
4. Yun-Choi, H. S., K. M. Park, M. K. Pyo. 2000. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. Thromb. Res. 100 : 511-518.
5. Pyo, M. K., H. S. Yun-Choi, Y. J. Hong. 2003. Antiplatelet activities of aporphine alkaloids isolated from leaves of *Magnolia obovata*. Planta Med. 69 : 267-269.
6. Yun-Choi, H. S., M. K. Pyo, K. M. Park, K. C. Chang, D. H Lee, 2001. Anti-thrombotic effects of higenamine. Planta Med., 67 : 619-622.
7. 윤혜숙, 장일무. 전통약물로부터 신약개발 연구법. 1993년 5월. - 항혈소판제 검색법(윤혜숙). 서울대학교 천연물과학 연구소, 서울. pp 38-47.
8. 김낙두. 건강기능식품의 기능성 시험 가이드. 2004년 5월. - 혈행관련 기능성 시험(정진호). 사단법인 한국보건공정서연구회, 서울. pp 181-512.

Assay for Anti-platelet Activity of Bioactive Compounds from Plant

Mi-Kyung Pyo

*E.S. Life Science Research Institute, E.S. Biotech Co. Ltd., Cheonan 330-863, Korea
+82-41-556-9166, pmk67@hanmail.net*