

瑞金散의 抗血栓作用에 對한 實驗的 研究

대전대학교 한의과대학 부인과학교실
이보라, 김의일, 이정은, 유동열

ABSTRACT

The Experimental Study on Antithrombotic activities of Saegeumsan(瑞金散)

Lee Bo-ra, Kim Eui-il, Lee Jung-eun, Yoo Dong-Youl

Dept. of Ob & Gyn, College of Oriental Medicine, Dae-jeon univ.

This study was performed to evaluate antithrombotic activities of *Saegeumsan* (瑞金散, SGS) which has effects of activating blood, removing thrombus.

This study is designed to measure the effect which was given to blood flow rate through the regular volume of glass tube after the blood was diluted five times with ACD solution. Antithrombotic effect was calculated as a percentage of the experimental animal figure protected from the paralysis of hind legs or death of the mouse that is caused from the administration of platelet aggregation reagent.

We standardized the time when the experimental animals were incapable of functioning the hind legs more than 20 minutes or maintained trembling.

Being classified one group of eight mice, each of them was divided into Normal, Control, and SGS. The normal group supplied a saline solution and the control group brought the dextran extravasated blood after an hour of administering the saline solution. Also, SGS was dissolved in 2ml saline solution and then we dosed it to the experimental mice with Oral Zonde one day before the experiment. After that, the mice were abstained from food. And then we gave a measured amount of it before an hour. Finally, it gave rise to dextran extravasated blood in the same way as the Control group.

The results were obtained as follows, SGS significantly inhibited platelet aggregation induced

by ADP and epinephrine when analyzed by the Sigmoid E_{max} model in WinNonlin. EC_{50} values of SGS were 4.61 mg/ml and 12.41 mg/ml for ADP and epinephrine respectively.

SGS showed fibrinolytic activity insignificantly as compared with the control group. SGS increased blood flow rate significantly as compared with the control group in vitro. SGS inhibited pulmonary embolism induced by collagen and epinephrine (inhibitive rate is 37.5 %). SGS increased number of platelet and fibrinogen amount significantly, and shortened PT and APTT as compared with the control group in thrombus model induced by dextran.

According to, SGS is effective antithrombotic activity from experimental result.

Key words : SGS 서금산, antithrombus 항혈전, paralysis 마비, tremble 떨림, extravasated blood 어혈 pulmonary embolism 폐색전.

I. 緒 論

瑞金散은 清代 武¹⁾의 《濟陰綱目》에 最初로 수록된 處方으로 “治婦人血行氣 撮痛 月經不行”이라 하여 氣滯血瘀로 인한 婦女經閉를 治療할 목적으로 立方되었다.

婦人科 領域에서 瘀血이란 정상적인 생리 기능을 상실한 血液이 응취되어 형성된 일종의 病理的 產物이며 단순히 血毒으로서의 비생리적인 혈액만을 의미한 것이 아니라 血滯라는 순환장애의 병리적 상태를 기반으로 나타나는 특수한 증후군까지도 포함한다²⁾. 따라서 瘀血은 현대병리, 병태학적 개념에서 血栓의 범주에서 다루어 진다고 볼 수 있다.

血栓에 의한 症狀은 매우 다양하여 그 症狀이 전혀 나타나지 않는 경우에서부터 鬱血, 浮腫, 梗塞, 혹은 壞疽, 心臟機能의 機械的 障礙, 敗血症 등이 나타날 수 있다³⁾. 이러한 症狀은 韓醫學에서 瘀血로 인한 血行凝結不行으로 야기되는 病症과 유사한 점이 많으며⁴⁾, 최근에 康⁶⁾ 등은 血栓症을 瘀血의 범주에 포함시키기도 하였다. 血栓에 대한 실험적 연구로 趙⁸⁾는 歸朮破癥湯이, 崔⁹⁾는 加味桂枝茯苓丸이, 高¹⁰⁾는 麻黃附子細辛湯이 血栓症에 유의성이 있다고 보고하였으나, 瑞金散의 抗血栓 作用에 관한 實驗은 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 涼血祛瘀, 活血行氣하는 瑞金散의 抗血全 效능을 규명하고자 血小板凝集 抑制 作用, fibrinolytic activity 그리고 血栓誘發에 따른 혈류속도를 측정하였고, 肺塞栓 誘發 및 dextran에 의한 血栓症 유발 후 혈소판수, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT), 그리고 fibrinogen 양을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動物

本 實驗에 사용된 쥐는 체중 180~250 g 의 SD(Sprague-Dawley 개 대한실험동물센터, 충청북도음성) 雄性白鼠 와, 18~20 g 의 ICR (International Cancer Research- 대한실험동물센터, 충청북도 음성)계 생쥐로, 實驗 당일까지 固形 飼料(조단백질 22.1 % 이상, 조지방 8.0 % 이하, 조섬유 5.0 % 이하, 조회분 8.0 % 이하, 칼슘 0.6 % 이상, 인 0.4 % 이상 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2 °C, 상대 습도 50±10 %, 조명 시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 實驗室 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 動物만을 選別하여 實驗에 사용하였다.

2) 藥 物

本 實驗에 使用한 瑞金散은 濟陰綱目¹⁾에 準하였으며 사용한 약제는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 후, 精選하여 사용하였고, 1점의 內容과 分量은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Saegeumsan (SGS)

韓藥名	生 藥 名	用量 (g)
薑 黃	CURCUMAE LONGAE RHIZOMA	8
當 歸	ANGELICAGE GIGANTIS	4
赤芍藥	PAEONIAE RADIX RUBRA	4
川 芎	CNIDII RHIZOMA	4
牧丹皮	MOUTAN CORTEX	4
蓬 朮	ZEDOARIAE RHIZOMA	4
玄胡索	CORYDALIDIS TUBER	4
官 桂	CINNAMOMI CORTEX SPISSUS	4
紅 花	CARHTAMI FLOS	4
Total amount		40g

3) 試藥 및 機器

實驗에 使用한 試藥은 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A; Sigma Co., USA), normal saline(중외제약, Korea), Hank's balanced salt solution (HBSS: Sigma Co., USA), collagen(Sigma Co., USA) epinephrine (Sigma Co., USA), dextran(Sigma Co., USA), 3.8 % sodium citrate(Sigma Co., USA), ADP reagent (Chrono-Log Corp., USA), collagen reagent(Chrono-Log Corp., USA), thrombin-reagent(Chrono-Log Corp., USA), IL Test™ PT-Fibrinogen HS(Instrumentation Laboratory, USA), IL Test™ APTT Lyophilized silica (Instrumentation Laboratory, USA), fibrinogen (Sigma Co., USA), acid citrate dextrous(ACD: Sigma Co., USA), heparin(Sigma Co., USA), urokinase(Sigma Co., USA), aspirin을 使用하였다.

機器는 serum separator(녹십자, Korea), minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., USA), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Switzerland), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave (Hirayama, Japan), ultrasonic cleaner (Branson Ultrasonics Corp., USA), roller Mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), vortex(Vision Co., Korea), camera (Nikon, Japan), ACL-100(Instrumentation Laboratory, USA), platelet aggregation profiler (Model PAP-4, BIO/DATA Co., USA), silicon-treated cuvette(BIO/DATA Co., USA)등을 使用하였다.

2. 方 法

1) 檢液의 製造

瑞金散(SGS) 2g을 3,000 ml round flask 에 넣고 증류수 2,000 ml을 넣은 후, 3시간 加熱 抽出하고, 沈澱物을 3회 濾過(3M filter pa-

per)하고, 이 濾過液을 rotary vaccum evaporator에서 減壓 濃縮하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70 °C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1침당 4.14 g의 분말을 얻어서 實驗에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 血小板 凝集(Platelet aggregation) 測定¹¹⁻¹⁴⁾

12時間 以上 空腹을 유지한 성인남자의 上 膊 靜脈으로부터 채혈한 혈액을 3.8 % 구연산 나트륨이 들어있는 일회용 시험관에 血液과 1:9의 비율로 넣고 원심분리 (900 rpm 10분)하여 상등액으로부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻고 잔액을 다시 원심분리(3000 rpm 10분)하여 platelet poor plasma(PRP)를 얻었다. PRP는 채취 즉시 變化를 막고 얼음이 들어있는 용기에 방치하였다.

藥物의 항혈소판 응집 효과는 platelet aggregation profiler (Model PAP-4, BIO/DATA Co., USA)를 사용하였으며, 최종 농도는 adenosine-disphate(ADP) 6 μM 와 epinephrine 5 μM 이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37 °C에서 incubation시킨 PRP 320 μl와 실험군을 40 μl를 넣고 다시 incubation한 후 ADP 40 μl를 가하여 5분간 반응시켰다. 실험군은 증류수에 용해시키고 희석하여 사용하였으며 최종 농도가 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 mg/ml이 되도록 PRP에 가하고 응집 유도제를 넣기 전까지 37 °C에서 3분간 incubation하였다. 실험의 처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 생리식염수 40 μl을 가한 뒤 최대 응집 %를 측정하여 채혈 후 시간 경과로 인한 혈소판 변질로 나타날 수 있는 실험 오차를 방지하였으며, PRP를 얻은 후 2시간 안에 모든 실험을 進行시켰다. 실험 조작 동안 溫度는 37 °C로

유지하고 교반 속도는 500 ~ 1,500 rpm으로 하며 528 nm에서 응집도를 측정하였다. 藥物에 의해 aggregation이 억제되는 정도를 다음 식에 의거하여 transmission maximum reduction percent를 산출하였다.

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

A = 대조군의 maximum aggregation %

B = 실험군의 maximum aggregation %

각각의 농도에서의 aggregation(%)은 mean± S.D.으로 나타내었고 試驗藥物의 통계적인 유의성은 Student t-test를 통해 검정하였다.

3) Fibrinolytic activity 測定¹⁵⁾

最終 0.7 %가 되도록 fibrinogen(plasminogen-containing)을 0.05 M babital buffer, pH 7.8에 녹인 뒤 5 ml의 용액을 0.1 ml의 thrombin(100 NIH/ml)에 넣어 수 초 내에 petri dish(85x15 mm)에서 혼합하였다. 이것을 37 °C에서 30분간 放置하여 fibrin plate가 형성됨을 확인하고 형성된 fibrin plate 상에 disk를 이용하여 陽性 對照群 urokinase 0.1 ml (100 iu/ml)를 點滴하고 시료를 濃度別로 點滴한 다음 37 °C incubation기기에 24시간 동안 放置하여 溶解되는 whole well의 크기를 測定하여 對照群과 實驗群을 比較하였다.

4) 血流速度 測定

In vitro에서는 heparin(1000 units/ml) 처리한 syringe를 이용하여 일반 정상쥐의 心臟 전자를 통해 採血하였다. 血液을 ACD용액으로 5배 稀釋한 다음 일정한 크기의 유리관을 통과하게 하여 血流 速度에 미치는 影響을 測定하였다. 血液에 dextran만을 넣은 대조군과 藥物을 처리한 實驗群으로 나누어 實驗하였고, 使用한 稀釋 血液은 37 °C가 維持되도록

하였으며, 시료를 넣고 5분간 pre-incubation 시킨 후 上記 方法으로 血流 速度를 測定하였다.

In vivo에서는 시료를 10일간 SD에 經口 投與하고 dextran으로 瘀血病態를 誘發을 한 다음 heparin(1000 units/ml)을 처리한 syringe를 이용하여 採血하였다. 採血한 血液을 ACD용액으로 5배 稀釋한 다음 일정한 크기의 유리관을 통과하게 하여 血流 速度를 測定하였다.

5) 肺塞栓(Pulmonary thrombosis) 誘發 實驗

實驗的 血栓의 誘導는 Kimura의 實驗 方法¹⁶⁾에 준하여 실시하였다. 實驗 動物은 몸무게 약 18 g-20 g 정도의 수컷 ICR계 mouse를 사용하였고, SGS는 20 g ICR 생쥐를 기준으로 檢液 2.73 mg/20 g/day을 생리식염수 0.2 ml에 溶解시켜 oral zonde를 이용하여 2회 經口 投與하였다. 血栓의 誘發은 血小板 凝集 試藥(11.3 µg의 collagen과 1.32 µg의 epinephrine)을 HBSS 200 µl에 함유되도록 調製하였고, ICR계 mouse의 몸무게 20 g당 200 µl의 용량으로 微靜脈에 注射하였다.

實驗 動物을 實驗 前 24시간 絶食시킨 후, 血小板 凝集 誘發 試藥의 靜脈 注射 2時間 前에 上記한 濃度의 SGS를 ICR계 mouse에 經口 投與하였으며, 陽性對照群으로는 aspirin 100 mg/kg을 經口 投與하였다.

抗血栓 效果는 血小板 凝集 試藥의 投與로 인하여 發生하는 mouse 뒷다리의 痲痺나 죽음으로부터 보호된 實驗 動物 숫자의 百分率로 計算하였으며, 여기서 痲痺는 20分 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 持續될 때를 基準으로 하였다.

6) Dextran 瘀血病態 誘發 實驗¹⁷⁾

(1) Dextran 瘀血病態 誘發 및 藥物 投與 白鼠 8마리를 1群으로 하여 正常群(Nor-

mal), 對照群(Control) 및 實驗群(SGS)으로 각각 나누었다. 正常群은 생리식염수를 공급하고, 對照群은 생리식염수를 투여한 지 1시간 후에 dextran 瘀血 病態를 誘發하였으며, SGS 投與群은 27.3 mg/200 g/day을 생리식염수 2 ml에 溶解하여 oral zonde로 實驗 하루 前에 1회 經口 投與하고, 이 후 絶食시킨 후 實驗하기 1시간 전에 다시 1회 經口 投與한 후 對照群과 동일한 方法으로 dextran 瘀血 病態를 誘發하였다.

Dextran 瘀血 病態 誘發 : Dextran(분자량 21만)을 생리식염수에 넣고 加熱하면서 완전히 溶解시켜 10 % 濃度の 溶液을 만들어 1.1 ml /200 g(rat) 씩 白鼠의 微靜脈에 3분 이내에 全量 주사하고, 4시간 경과 후 心臟穿刺로 採血하여 각종 檢사를 실시하였다. 正常群 및 對照群은 實驗 藥物 대신 생리식염수를 投與하여 實驗群과 동일한 시각에 각종 지표를 檢査하였다.

(2) 血小板數 測定

血小板數 測定은 自動血球計算機, minos-st를 使用하여 測定하였다.

(3) Prothrombin time 測定¹⁸⁾

Prothrombin time은 simplastin kit(General Diagnostics., USA)를 使用하여 ACL-100으로 測定하였다.

(4) Activated partial thromboplastin time 測定

APTT은 simplastin kit를 使用하여 ACL-100으로 測定하였다.

(5) Fibrinogen 量 測定

Fibrinogen 量은 simplastin kit를 使用하여 ACL-100으로 測定하였다.

7) 統計處理

實驗 結果는 unpaired student's T-test를 使用하여 統計 處理하였으며 P<0.05, P<0.01 또는 p<0.001 수준에서 有意性을 檢定하였다.

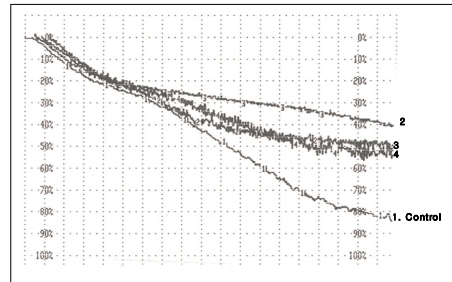
III. 實驗成績

1. 血小板 凝集 抑制 效果¹⁹⁾

1) ADP에 의한 血小板 凝集 抑制 效果

最終 濃度 ADP(6 μM)에 의해서 誘導된 血小板 凝集에 대한 억제 效果를 測定하기 위하여 濃度에 대한 最大 凝集率(%)과 抑制率(inhibition %)을 산출하였다

對照群의 最大 凝集率은 84 %로 나타난 반면, SGS 10 mg/ml 濃度 投與群에서는 最大 凝集率 이 38 %, 抑制率은 54.76 %로 나타났고, 5 mg/ml 濃度 投與群에서는 最大 凝集率 이 48 %, 抑制率은 42.85 %로 나타났으며, 2.5 mg/ml 濃度 投與群에서는 最大 凝集率 이 55 %, 抑制率은 34.52 %로 나타났다(Fig. 1).

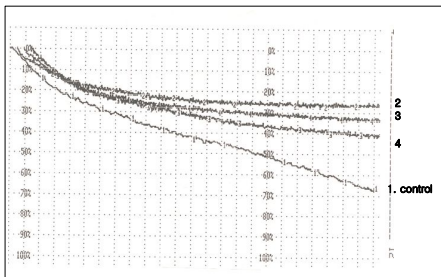


1: Control, 2: 10 mg/ml, 3: 5 mg/ml, 4: 2.5 mg/ml

Fig. 1. Effect of SGS on human platelet aggregation induced by ADP. Each line represent the platelet aggregation curve recorded on a chart at a speed of 2.5 cm/min, where the relative optical transmission of PPP and PRP were designed as 0 and 100, respectively.

2) Epinephrine에 대한 血小板 凝集 抑制 效果

Epinephrine에 의해서 誘導된 血小板 凝集에 대한 억제 효과에서는 對照群의 最大凝集率이 68 %로 나타난 반면 SGS 10 mg/ml 濃度 投與群은 最大凝集率 25 %, 抑制率은 63.23 %로 나타났고, 5 mg/ml 濃度 投與群에서는 最大凝集率 35 %, 抑制率은 48.52 %로 나타났으며, 2.5 mg/ml 濃度 投與群에서는 最大凝集率 42 %, 抑制率은 38.23 %로 나타났다(Fig. 2).



1: Control, 2: 10 mg/ml, 3: 5 mg/ml, 4: 2.5 mg/ml

Fig. 2. Effect of SGS on human platelet aggregation induced by epinephrine. Each line represent the platelet aggregation curve recorded on a chart at a speed of 2.5 cm/min, where the relative optical transmission of PPP and PRP were designed as 0 and 100, respectively

2. ADP와 epinephrine에 대한 E_{max} , EC_{50} 및 γ 값

Fitted된 그래프로부터 산출된 E_{max} , EC_{50} 및 γ 의 pharmaco-dynamic parameter는 (Table 2)에 정리하였는데, 응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 E_{max} 는 93.06 %로 나타났고, EC_{50} 은 4.61 μ g/ml로 나타났다. Epinephrine의 경우는 E_{max} 가 151.53 %, EC_{50} 은 12.41 g/ml으로 나타났다.

Sigmoid E_{max} model에서 곡선의 sigmoid-icity를 나타내는 γ 은 ADP와 epinephrine 이 각

각 1.23과 0.8로 ADP의 sigmoidicity가 크게 나타났다(Table 2, Fig. 3).

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by Sigmoid E_{max} Model in WinNolin Program

parameter	E_{max} (%)	EC_{50} (mg/ml)	γ
Inducer			
ADP	93.06	4.61	1.23
Epinephrine	151.53	12.41	0.8

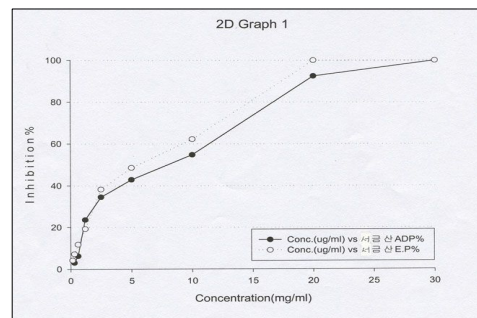


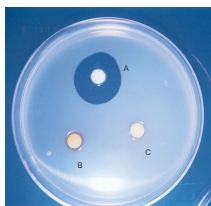
Fig 3. In vitro pharmacodynamic response (inhibition %) versus concentration of SGS using the Sigmoid E_{max} model in WinNonlin. The solid and open circles are observed values of ADP and epinephrine-induced aggregation, respectively. The solid lines and dashed line are the model predicted values of ADP and epinephrine.

3. Fibrinolytic activity에 미치는 影響

Fibrin plate 상에 disk를 이용하여 陽性 對照群인 urokinase를 0.1 ml(100 iu/ml)를 點滴하고, 시료를 濃度別로 點滴한 다음 37 °C incubater 기기에 24 시간 동안 방치하여 溶解되는 whole well의 크기를 測定한 결과 SGS 投與群에서 溶解되는 whole well이 보이기는 하나 유의적인 결과를 나타내지 않았다(Table 3, Fig. 4).

Table 3. Effect of SGS on The Fibrinolytic Activity by Fibrin Plate

Group	Concentration	Fibrinolysis size per dilutions(cm)
Sample A	10 iu/disk	3.5
Sample B	10 mg/disk	0.2
Sample C	2.5 mg/disk	-



Sample A ; Urokinase: 10 iu/disk treated group.
 Sample B ; 10 mg/disk SGS treated group.
 Sample C ; 5 mg/disk SGS treated group.

Fig. 4. Effect of SGS on the fibrinolytic activity by fibrin plate.

4. 血流速度에 미치는 影響

1) In vitro

血流速度를 測定한 結果 正常群은 20.07 ±1.47 sec, 對照群은 27.5 ±2.05 sec, SGS 投與群은 21.43 ±2.23 sec 로 나타나 對照群에 비해 有意性(P<0.01) 있는 血流 減少 效果를 나타내었다(Table 4, Fig. 5).

Table 4. Effect of SGS on Blood Flow Rate in Vitro

Sample	Flow Rate(sec)
Normal	20.07 ±1.47
Control	27.5 ±2.05 **
SGS	21.43 ±2.23 **

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Normal blood.
 Control : Normal blood treated with 10 % dextran.
 S G S : Normal blood treated with 10% dextran and 10 mg/10 ml of SGS extracts.
 + : Statistically significant value compared with normal data
 (+: P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001)
 * : Statistically significant value compared with control data
 (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

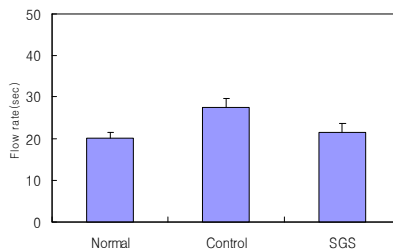


Fig. 5. Enhancement of blood flow rate by administration in vitro.

2) In vivo

正常群은 21.07 ±2.48 sec, 對照群은 26.26 ±2.81 sec, SGS 投與群은 23.95 ±2.91 sec로 나타나 對照群에 비하여 血流 速度의 減少는 보였으나 有意性 있는 結果는 나타나지 않았다 (Table 5, Fig. 6).

Table 5. Enhancement of Blood Flow Rate by Administration in Vivo

Sample	Flow Rate(sec)
Normal	21.07 ±2.48
Control	26.26 ±2.81
SGS	23.95 ±2.91

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 S G S : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 27.3 mg/200 g of SGS extracts.

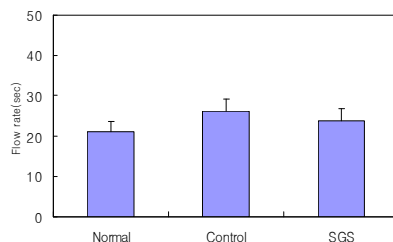


Fig. 6. Enhancement of blood flow rate by administration in vivo.

5. 肺塞栓(Pulmonary embolism)에 대한 效果²⁾

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 肺塞栓 實驗에서 對照群은 8마리 중 8마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 陽性 對照군인 aspirin 投與群은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되었다. 이에 반하여 SGS 投與群은 8마리 중 5마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 37.5%의 抑制 效果를 나타내었다(Table 6, Fig. 7).

Table 6. Effect of SGS on Pulmonary Embolism Mice

	Dose (mg/20 g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control	HBSS	8/8	0
Aspirin	2	2/8	75
SGS	2.73	5/8	37.5

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

Control : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrin/200 μl/20 g treated group.

Aspirin : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrin/200 μl/20 g treated group after oral administration of 50 mg/kg of aspirin.

SGS : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrin/200 μl/20 g treated group after oral administration of 2.73 mg/20 g of SGS extracts.

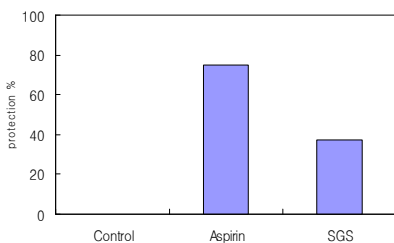


Fig. 7. Effect of SGS on pulmonary embolism mice.

6. Dextran 瘵血 病態에 미치는 效果

1) 血小板數에 미치는 效果

血小板數 變化에서는 正常群이 889±18.8 (×10³/mm³) 인데 비하여, 對照群은 686±5.67 (×10³/mm³), SGS 投與群은 789±7.24(×10³/mm³)로 對照群에 비하여 有意性(P<0.001) 있는 增加 效果를 보였다 (Table 7, Fig. 8).

Table 7. Effect of SGS on Platelet in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Platelet(×10 ³ /mm ³)
Normal	8	889±18.8
Control	8	686±5.67
SGS	8	789±7.24***

a) : Mean ± Standard Error

Normal : Oral administration of normal saline.
Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

S G S : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 27.3 mg/200 g of SGS extracts.

* : Statistically significant value compared with control data

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

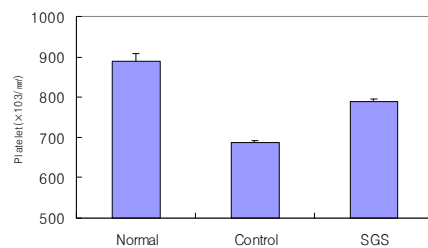


Fig. 8. Effect of SGS on platelet in dextran treated rat.

2) Prothrombin time에 미치는 效果

Prothrombin time에 대한 效果에서는 正常群이 17.26±0.43 sec인데 비하여, 對照群은 30.55±8.14 sec, SGS 投與群은 15.95±0.26 sec로 對照群에 비하여 유의성(P<0.05) 있는 단축

효과를 보였다(Table 8, Fig. 9).

Table 8. Effect of SGS on Prothrombin Time in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Prothrombin time (sec)
Normal	8	17.26±0.43
Control	8	30.55±8.14 ⁺
SGS	8	15.95±0.26 [*]

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 S G S : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 27.3 mg/200 g of SGS extracts.
 + : Statistically significant value compared with normal data
 (+: P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001)
 * : Statistically significant value compared with control data
 (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

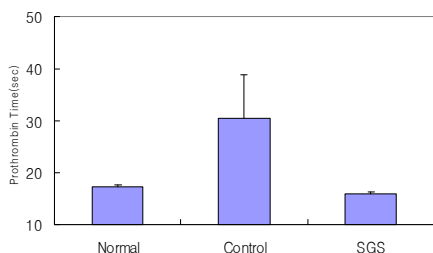


Fig. 9. Effect of SGS on prothrombin time in dextran treated rat

3) Activated partial thromboplastin time (APTT)에 미치는 효과

APTT에 대한 효과에서는 정상군이 44.0±1.35 sec인데 비하여 對照群은 67.8±2.02 sec, SGS 投與群은 39.65±0.62 sec로 나타나 對照群에 비하여 유의성(P<0.001) 있는 減少 효과를 나타내었다(Table 9, Fig. 10).

Table 9. Effect of SGS on Activated Partial Thromboplastin Time in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	APTT (sec)
Normal	8	44.0±1.35
Control	8	67.8±2.02 ⁺⁺⁺
SGS	8	39.65±0.62 ^{***}

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 S G S : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 27.3 mg/200 g of SGS extracts.
 + : Statistically significant value compared with normal data
 (+: P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001)
 * : Statistically significant value compared with control data
 (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

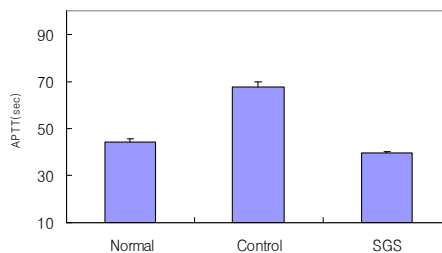


Fig. 10. Effect of SGS on activated partial thromboplastin time in dextran treated rat.

4) Fibrinogen 量에 미치는 影響

Fibrinogen 量에 대한 效果에서는 正常群에서 263.3±10.58 mg/dl인데 비하여, 對照群은 181.5±11.5 mg/dl, SGS 投與群은 244.75±18.00 mg/dl 으로 對照群에 비하여 유의성(P<0.001)있는 增加 效果를 나타내었다(Table 10, Fig. 11).

Table 10. Effect of SGS on Fibrinogen in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Fibrinogen(mg/dl)
Normal	8	263.3±10.58
Control	8	181.5±11.5 ***
SGS	8	244.75±18.00 ***

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 S G S : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 27.3 mg/200 g of SGS extracts.
 + : Statistically significant value compared with normal data
 (+: P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001)
 * : Statistically significant value compared with control data
 (*: P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

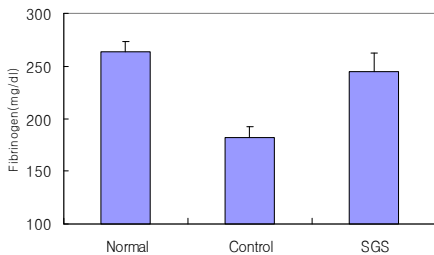


Fig. 11. Effect of SGS on fibrinogen in dextran treated rat.

IV. 考 察

瑞金散은 清代 武¹⁾의 《濟陰綱目》에 最初로 수록된 處方으로 “治婦人血行氣撮痛 月經不行”이라 하여 氣滯血瘀로 인한 婦女 經閉를 治療할 목적으로 立方되었는데, 處方은 薑黃, 當歸, 赤芍藥, 川芎, 牡丹皮, 蓬朮, 玄胡索, 官桂, 紅花로 구성되어 있다.

瘀血은 체내에서 血液이 정체된 것을 말하며, 經脈外로 溢出하여 조직의 間에 축적됨으

로서 괴사된 血液인 惡血과 血液循環이 障礙를 받아 經脈官內나 器官內에 瘀積된 蓄血도 모두 瘀血의 범위에 속한다²¹⁾.

“瘀血”이란 名稱은 漢代 張²²⁾이 《金櫃要略·驚悸吐下血胸滿瘀血病》에서 最初로 언급하면서 變證 및 治療의 기초를 形設시켰고, 清代에 들어와 葉²³⁾, 王²⁴⁾, 唐²⁵⁾에 의해 瘀血의 病因, 病機, 症狀 및 治療에 대한 체계적인 理論이 확립되었다.

女性이 寒濕, 氣滯, 氣血虛弱 등으로 血行 障礙가 발생하면 瘀血이 형성되어 月經不調, 經少, 痛經, 經閉, 崩漏, 妊娠腹痛, 胎動不安, 胎死不下, 難產, 胎衣不下, 産後血暈, 惡露不下, 惡露不絕, 産後腹痛, 産後發熱, 癥下, 不妊症, 子宮外妊娠 등 婦人科 病症이 招來된다²⁶⁾. 그러므로 瘀血을 해소시키는 活血化瘀法은 婦人科 臨床에서 흔히 사용되는 治療법이다.

血栓은 血管이나 심장내에서 혈액성분인 固形塊가 형성되는 現狀을 말하는 것으로⁴⁾, 血栓의 크기와 발생부위에 따라 다양한 症狀을 나타내고 血栓으로 인한 血管閉鎖의 程度, 範疇 및 期間에 따라 조직의 손상정도가 결정되며²⁷⁻²⁹⁾, 혈관벽의 변화, 혈류의 변화 및 혈액성분의 변화 등과 纖維因子와 細網內皮系의 기능이 관여하여 血栓症이 유발된다^{30,31)}.

血栓에 의한 症狀은 매우 다양하여 그 症狀이 전혀 나타나지 않는 경우에서부터 鬱血, 浮腫, 梗塞, 혹은 壞疽, 心臟機能의 機械的 障礙, 敗血症 등이 나타날 수 있다⁴⁾. 이러한 症狀은 한의학에서 瘀血로 인한 血行凝結不行으로 惹起되는 病症과 유사한 점이 많으며⁵⁾, 최근에 康^{6,7)} 등은 血栓症을 瘀血의 범주에 포함시키기도 하였다.

經閉는 《婦人大全良方》³²⁾에서 유래하는데, 《內經》²⁴⁾에서는 不月, 《脈經》³³⁾에서는 經水不通, 《病源候論》³⁴⁾에서는 月水不通, 《東垣脾胃論》³⁵⁾에서는 血枯經絕, 宋

^{25,36} 등의 현대문헌에서는 無月經, 經閉, 閉經이라고命名하였다. 현대의학적으로 經閉는 원발성과 속발성으로 대별 할수 있는데, 원발성 무월경은 2차 성징의 발현없이 14세까지 초경이 없는 경우이거나, 2차 성징의 발현은 있으나 16세까지 초경이 없는 경우다. 속발성 무월경은 월경을 하던 여성이 6개월이상 월경이 없거나, 평소 월경주기의 3배이상 기간동안 월경이 없을 때를 말한다³⁷. 그러나 妊娠期間이나 授乳期, 閉經期이후의 經閉, 소녀의 경우에는 初潮 후에 한동안 月經이 중단되는 수도 있는데, 이것들은 모두 정상적인 생리 현상이다³⁸.

經閉의 原因은 《內經·陰陽別論》^{24,37}에서 “二陽之病發心脾 有不得隱曲 女子不月”이라하여 心理的 要因으로 인해 無月經이 발생할 수 있다고 설명하였으며, 《內經·評熱病論》^{24,37}에서는 “月事不來者 胞脈閉也 胞脈者屬心而絡于胞中 今期上迫肺 心氣不得下痛 故月事不來也”라고 하여 無月經의 病機를 胞絡閉로 보았다. 瑞金散은 대부분 辛散溫通한 藥物로 구성되어 있는데, 活血祛瘀藥인 薑黃, 川芎, 蓬朮, 玄胡索, 紅花는 氣滯血瘀의 모든 증상을 祛瘀行氣, 止痛活絡하고, 清熱涼血藥인 赤芍藥, 牡丹皮는 熱結로 인한 瘀滯를 涼血祛瘀하고, 溫裏藥인 官桂는 寒凝으로 인한 血瘀를 祛瘀하고, 當歸는 血病의 要藥으로 調經에 탁월한 效果가 있으므로³⁹ 胞脈不通, 經血不得下行하는 血滯經閉에 응용될 수 있으리라 思料된다.

따라서 저자는 瑞金散의 抗血全 작용을 규명하기 위하여 血小板 凝集 抑制 作用, fibrinolytic activity 그리고 血栓誘發에 따른 血流速度, 肺塞栓 誘發 및 dextran에 의한 血栓症 誘發 後 血小板數, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), 그리고 fibrinogen 量을 測定하였다.

血小板 凝集 抑制 效果에서는 最終濃度

ADP(6 μM)에 의해서 誘導된 血小板 凝集에 대한 저해

효과를 測定하기 위하여, 濃度에 대한 最大 凝集率(%)과 억제율을 산출하였다.

Fitted된 그래프로부터 산출된 E_{max} , EC_{50} 및 γ 의 pharmacodynamic parameter는 (Table 2)에 정리하였는데, 응집 유도제로 ADP를 사용한 경우 E_{max} 는 93.06 %로 나타났고, EC_{50} 은 4.61 μg/ml 로 나타났다.

Epinephrine의 경우는 E_{max} 가 151.53 %, EC_{50} 은 12.41 g/ml으로 나타났다. Fibrinolytic activity에 대한 效果에서는 SGS 투여군에서 양성 대조군에 비하여 유의적인 결과가 나타나지 않았다(Table 3, Fig.4).

瘀血 誘發에 따른 血流速度 測定에 있어서 in vitro 에서 血流 速度를 測定한 結果 正常群은 20.07±1.47 sec, 對照群은 27.5 ±2.05 sec, SGS 投與群은 21.43±2.23 sec 로 나타나 對照群에 비해 有意性(P<0.01)있는 血流 減少 效果를 나타내었다(Table 4, Fig5).

In vivo에서 血流速度를 測定한 結果, 正常群은 21.07±2.48 sec, 對照群은 26.26±2.81 sec, SGS 投與群은 23.95±2.91 sec로 나타나 對照群에 비하여 血流 速度의 減少는 보였으나 有意성 있는 결과는 나타나지 않았다(Table 5, Fig. 6).

Collagen은 膠原質로 硬蛋白質의 하나이며, 骨, 軟骨, 靱帶, 眞皮 등에 존재한다. 물이나 묽은 산, 묽은 알칼리용액에 장기간 끓이면 水溶性 gelatin이 된다. epinephrine은 副腎皮質에서 분해되는 hormone의 한가지로 생리적으로는 心臟에서 作用하여 心搏數 및 心臟에서 내보내는 血液量을 增加시키고 血管壁에 作用하여 血管을 收縮시킨다. 胃와 腸에 作用하여 收縮 및 運動性を 감소시키고 氣管 氣管支에 대해서는 緊張을 強化시키고 擴張的으로 作用한다. 또한 膀胱括約筋에 대해서는 收縮作用을 한다. 酸素消費도 增加시켜

基礎代謝를 높이는作用을 한다³⁰⁾.

Collagen과 epinephrine에 의해 誘導된 肺塞栓 實驗에서 對照群은 8마리 중 8마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 陽性 對照군인 aspirin 投與群은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속이 되었다. 이에 반하여 SGS 投與群은 8마리 중 5마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 37.5 %의 抑制 效果를 나타내었다(Table 6, Fig. 7).

Dextran을 利用하여 瘀血을 誘發시킨 후 SGS을 投與하여 血小板 數 prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen量을 측정하였다.

혈소판수의 변화에서는 正常群이 $889 \pm 18.8 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 인데 비하여, 對照群은 $686 \pm 5.67 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$, SGS 投與群은 $789 \pm 7.24 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 로 對照群에 비하여 有意性 ($P < 0.001$) 있는 增加 效果를 보였다 (Table 7, Fig. 8).

prothrombin time에 대한 效果에서는 正常群이 $17.26 \pm 0.43 \text{ sec}$ 인데 비하여, 對照群은 $30.55 \pm 8.14 \text{ sec}$, SGS 投與群은 $15.95 \pm 0.26 \text{ sec}$ 로 對照群에 비하여 有意性 ($P < 0.05$) 있는 단축 效果를 보였다 (Table 8, Fig. 9).

Thromboplastin은 血液凝固에 중요한 인자로 出血時에 血漿속에 있는 prothrombin을 thrombin으로 바꿈으로서 止血에 관여하는 것으로, 활성화 부분 thrmpboplastin time(APTT)의 検査목적은 지혈기구의 이상이 어디에 있는가를 조사하는 検査로 이 検査에서 이상치를 보이는 것은 내인계 응고장애가 있음을 의미하는 것이다³⁰⁾. 이러한 APTT에 대한 效果에서는 正常群이 $44.0 \pm 1.35 \text{ sec}$ 인데 비하여 對照群은 $67.8 \pm 2.02 \text{ sec}$, SGS 投與群은 $39.65 \pm 0.62 \text{ sec}$ 로 나타나 對照群에 비하여 有意性 ($P < 0.001$) 있는 減少 效果를 나타내었다 (Table 9, Fig. 10).

Fibrinogen은 血液凝固 기전의 최종단계에 위치하는 凝固因子이며 血液이 凝固할 때 석

출되는 gel 모양의 단백질인 fibrin의 前驅體이다. 肝臟에서의 生成障礙, 全身의인 凝固에 따른 消費, 피브린의 溶解 亢進때 그 값이 떨어진다³⁰⁾.

Fibrinogen 量에 대한 效果에서는 正常群에서 $263.3 \pm 10.58 \text{ mg/dl}$ 인데 반하여, 對照群은 $181.5 \pm 11.5 \text{ mg/dl}$, SGS 投與群은 $244.75 \pm 18.00 \text{ mg/dl}$ 로 對照群에 비하여 有意性 ($P < 0.001$) 있는 增加 效果를 나타내었다 (Table 10, Fig. 11).

以上の 實驗結果로 보아 瑞金散은 血小板 凝集 抑制와 肺塞栓 抑制 및 瘀血病態 實驗에서 모두 有意性 있는 抗血栓 效果를 나타내었다.

V. 結 論

瑞金散의 효능을 실험적으로 糾明하기 위하여 in vitro에서 血小板 凝集 抑制作用, fibrinolytic activity 그리고 血栓誘發에 따른 血流速度를 測定하였고, in vivo에서 肺塞栓 誘發 및 dextran에 의한 血栓症 誘發後 血小板數, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT), 그리고 fibrinogen 量을 測定한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. ADP로 誘導된 血小板 凝集 抑制 效果에서 E_{max} 와 EC_{50} 이 각각 93.06 %와 4.61 mg/ml로 나타났고, epinephrine으로 誘導된 血小板 凝集 抑制 效果에서는 각각 151.53 %와 12.41 mg/ml로 나타났다.
2. Fibrinolytic activity에 대한 效果에서는 SGS 투여군에서 양성 대조에 비하여 有意적인 結果가 나타내지 않았다.
3. 瘀血 誘發에 따른 血流速度에 대한 效果에서는 vitro에서만 SGS 投與群이 對照群에 비해 有意性 있는 效果를 나타내

었다.

4. 肺塞栓에 대한 效果에서는 SGS 投與群이 37.5 %의 抑制 效果를 나타내었다.
5. Dextran 瘀血 病態 모델에서 SGS 投與群이 혈소판수와 fibrinogen 양에 대해서는 유의성 있는 增加를, PT와 APTT에 대한 效果에서는 유의성 있는 短縮 效果를 나타내었다.

以上の 實驗結果로 보아 瑞金散은 抗血栓 效果가 있었으므로, 血滯, 氣滯血瘀 등으로 유발된 經閉에 有效하게 活用 될 수 있을 것으로 思料된다.

□ 투 고 일 : 2004년 05월 25일

□ 심 사 일 : 2004년 05월 07일

□ 심사완료일 : 2004년 05월 14일

參考文獻

1. 武之望, 濟陰綱目, 中國醫學叢書 서울 大星出版社, 1990;54.
2. 崔昇勳, 黃帝內經에서의 瘀血의 認識에 대한 理論的 研究, 大田大學校論文集 6(2):1987;313-320.
3. 鄧士賢, 活血化瘀藥의 藥理與應用, 雲南中醫雜誌, 1985;5:50-53.
4. 孫泰重, 病理學概論, 서울 高文社, 1979; 84-86.
5. 최승훈, 어혈의 병리에 관한 문헌적 고찰, 대전대학교논문집, 4(1):1985;399-406.
6. 康舜洙, 韓醫學에서의 瘀血에 대한 概念, 大韓韓醫學會誌, 5(1):1984;138 ~140.
7. 尹吉榮, 東醫學의 客觀化와 東西醫學 病名 統一을 위한 方法, 東洋醫學, 2(4): 1976;7 ~ 15.
8. 趙洪建, 歸朮破癥湯이 endotoxin으로 誘發된 白鼠의 實驗的 血栓症에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 碩士學位論文:1994.
9. 崔彰祐, 加味桂枝茯苓丸이 血栓症에 미치는 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 碩士學位論文:1991.
10. 高光錫, 麻黃附子細辛湯 및 處方構成 藥材가 endotoxin으로 誘發된 血栓症에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院:1990.
11. Lee, J.H., Lee, Y.S. and Kwon, K.I. : Protective effects of Phellinus linteun re perfusion of the isolated perfused Guinea pig hearts and anti-platelet aggregation effects of Phellinus linteus. J. Pharm. Sci. (C.N.U.), 1994;10:17-25.
12. Guerra-Fernando, J.I. et al. Effect of losartan on human platelet activation. J. Hypertension 1999;17:447-452.
13. Lewis, S.M. and Verwilghen, R.L. : Quality assurance in haematology;113-145.
14. Platelet aggregation PROFILER model P AP-4 : operating instructions and methods manual BIO/DATA corporation.
15. Jansen JW, van den Brink H, Hoogenboom PH. : Method to measure in vivo blood fibrinolytic activity with a 125i-fibrin coated aorta loop validated with agents which affect blood fibrinolytic activity, Thromb Res Nov 2001;104(3):223 ~ 32.
16. Kimura, Y., Tani, T., and Watanabe, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Arzneimittelforsch./Drug Res. 1985;35(II);1144-1149.
17. Fonio, A. On the retraction process in blood plasma coagulation. Acta Haematol. 1966;36(5):371-85.
18. Leadley RJ Jr, Morgan SR, Bentley R 외; Pharmacodynamic activity and antithrombotic efficacy of RPR120844, a novel inhibitor of coagulation factor Xa, J Cardiovasc Pharmacol, USA, 1999;34(6): 791 ~ 9.
19. Brinda, K. PH. D. : Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for scopolamine. chapter VII of Application of Pharmacokinetic model to the study of drug disposition;58-120.
20. Kumari R, Dikshit M, Srimal RC. : Free

- radical scavenging mechanisms during pulmonary thromboembolism in rats, *Thromb Res., India*, 1993;69(1):101~11.
21. 中醫研究院, 廣東中醫學院合編, 中醫名詞術語選釋, 香港:知識出版社, 1985;104.
 22. 張 機, 仲景全書, 臺北:集文書局, 1972; 172-173, 228, 236.
 23. 葉 桂, 臨證指南醫案, 서울:輪成社, 1985; 513, 596.
 24. 王清任, 醫林改錯, 서울:宿昌德書店, 1961;44, 61-62, 77.
 25. 唐宗海, 血證論, 上海:上海科學技術出版社, 1987;327-328.
 26. 楊恒茂·張文閣, 실용중의부과방제학, 陝西:협서과학기술출판사, 1988;58.
 27. 이중달, 그림으로 설명한 병리학, 서울:고려의학, 1990;127-134.
 28. 해리슨 번역 편찬위원회 역, HARRISON'S 내과학, 서울:도서출판 정담, 1997;1934, 1950-1962, 2409-2412.
 29. 의학교육연수원, 가정의학, 서울:서울대학교 출판부, 1996;343-348.
 30. 대한병리학회, 병리학, 서울:고문사, 1990; 125, 130.
 31. 保道德, 谿忠人, 漢方醫藥學, 서울:東南出版社, 1984;202, 205.
 32. 陳自明, 婦人大全良方, 北京:文光圖書有限公司印行, 1975;10-12.
 33. 沈炎南, 脈經校注, 北京:人民衛生出版社, 1991;259.
 34. 南京中醫學院編, 諸病源候論校釋, 北京:人民衛生出版社, 1983;54-56.
 35. 李 杲, 東垣脾胃論, 서울:大星文化社, 1994;308-311.
 36. 姜孝信, 東醫婦人科學, 서울:醫文社, 1966;136-142.
 37. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會, 韓醫婦人科學 上, 서울:도서출판 정담, 2002;119.
 38. 肖淑春, 東醫臨床婦人科學, 서울:法仁文化社, 1999;94.
 39. 진국한의과대학 본초학 교수 공편저, 본초학, 서울:영림사, 1992;194-195, 409-410, 413-417, 425, 578-579.