

동해안 심층수의 혈행 및 혈중지질 개선효과

박미화 · 배송자 · 김미향*

신라대학교 자연과학대학 식품영양학과

Effect of the Deep Sea Water of East Coast on Blood Flow and Serum Lipids. Mi-Hwa Park, Song-Ja Bae and Mihyang Kim*. *Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea.*

Abstract The more the population grow, the severer the shortage of a basic human needs such as clean water, food, energy resources and so on. Recently, we aware that deep sea water can be utilized to solve comprehensively food, energy and water problems. In this study, inhibitory effect of the deep sea water of east coast (DSW) on platelet aggregation were investigated using washed platelet and beneficial effect of the change of lipid concentration on serum at various time intervals for three weeks. In this study six groups of 6-month-old Sprague-Dawley rats were examined. An intact group served as controls (C-1D : breeding for one day, C-1W : breeding for one week, C-3W : breeding for three week). The fourth group (1D-DSW) supplemented with DSW for one day. The fifth group (1W-DSW) supplemented with DSW for a week. The sixth group (3W-DSW) supplemented with DSW for three weeks. The total cholesterol and triglyceride concentration on serum of supplemented groups with the DSW for one or three weeks were significantly decreased. The serum HDL-cholesterol level in the DSW groups were significantly higher than the level in the control group. The supplementation of DSW for one day did not appear to have such a beneficial effect on lipid level. The ability of platelet aggregation of supplemented groups with DSW was less than control group. These results suggest that supplementation with DSW is positively influence on lipid concentration and platelet aggregation.

Key words : Deep sea water, platelet aggregation, blood flow

서 론

경제 수준과 의료 기술의 향상으로 인해 평균수명이 약 80세 정도로 빠른 속도로 고령화 사회로 되고 있으며, 생활양식의 변화와 식생활의 서구화로 인해 전체 국민 중에 고혈압, 동맥경화, 혈전증과 같은 심혈관계 질환으로 인한 사망률이 점점 증가 하는 추세이다. 이와 같은 혈행 장애에 있어 혈소판은 매우 중요한 역할을 담당하고 있는 인자이다[16,22]. 혈소판은 혈관 벽에 상처가 생겨 혈소판은 혈관이 손상 되면 응집함으로써 혈액유실을 방지하지만, 어떤 병적인 증상에 의해 과도하게 활성화 될 경우 응집함

으로써 혈전을 생성하여 혈류를 따라 흐르다 미세혈관을 막아 심근경색, 허혈 등의 혈행 장애를 유발하게 된다[18,20]. 생체 내에서 혈액응고 반응은 혈액응고계의 어느 한 효소에 의해 억제 또는 방해작용을 가지는 외래성 항응고제에 의해서 효과적으로 저해될 수 있으므로 심장질환, 성인병의 예방 및 치료에 관한 항 혈액응고활성에 대한 연구가 진행되고 있다[5,15]. 하지만 현재 많이 사용되고 있는 heparin, coumarin 등의 항응고제제들은 비타민 K결핍이나, 장기간 사용 시 혈소판의 감소와 출혈, 골다공증 등의 부작용과 사용용량의 오류 등이 빈번히 일어나서 문제되어지고 있는데[3,6], 이러한 문제점을 해결하

* Corresponding author

Phone: +82-51-999-5620, Fax: +82-51-999-5176

E-mail: mihkim@silla.ac.kr

기 위해 최근에는 천연물 또는 전통 약물소재로 부터 항혈액응고 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[26]. 이와 관련하여 본 연구에서는 천연물의 항혈액응고 작용을 검색하기 위하여 심층수를 사용하였다.

해양 심층수는 수심 200m 이상에 부존하며 저온성, 안전성, 부영양성, 청정성, 숙성성 등의 자원적 특성을 가진 유용한 해양 자원이며, 태양광을 에너지원으로 하는 물질 순환계 중에서 생성되어 해수로서 재생 및 순환되는 막대한 청정 자원이다[17]. 또한 최근 인구 증가에 따른 자원 소모량의 급증으로 자원의 감소, 고갈 등이 심화되어, 인류 문제를 완화시키기 위한 연구 개발이 여러 방면으로 전개 되고 있는데, 해양 심층수는 이러한 문제를 해결하기 위해 가치가 높은 해양 자원으로써 연구되고 있다. 우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸여 있지만, 우리나라 주변에 수심 200m 이상의 해역으로 심층수를 얻을 수 있는 곳은 동해에 국한되고 있다 [4,10,11,13, 19,24,25].

심층수와 같은 천연자원으로 심혈관계질환 치료의 경우는 약물과는 달리 부작용이 적고, 장기간의 복용이 가능하므로 치료나 예방을 위한 천연자원에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 이 논문에서는 천연자원인 동해안 심층수를 사용하여, 혈소판 응집 및 혈청 중의 지질 농도에 효과가 있는지 검토해보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중이 평균 160g (6주)되는 Sprague-dawley 계 수컷 흰쥐를 (주)샘타코로부터 구입하여 본 실험실에서 고형사료로 사육하였고, 실험 시작

1주일 동안 대조군 식이로 적응시킨 후 6군으로 나누었다. 실험동물은 심층수 1일 투여군(DSW-1D)과 대조군(CON-1D), 심층수 1주 투여군(DSW-1W)과 대조군(CON-1W), 심층수 3주 투여군(DSW-3W)과 대조군(CON-3W)으로 나누어 실험하였다(Table 1).

체중은 실험 사육 기간 중에 격일로 일정 시간에 측정하였고, 식이 섭취량은 매일 식이 잔량을 측정하여 산출하였다. 동물 실험실의 사육 조건은 온도 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 55~60%을 유지 시키며 물과 식이는 자유 공급하였고, 실험 시료는 매일 1mL씩 경구 투여 하였고, 대조군은 동일 용량의 증류수를 투여하였다.

혈액 채취

혈액은 실험 동물을 해부 전 24시간 절식 시킨 후 ether 마취 하에서 개복한 후 대동맥에서 채취하였고, 혈소판 응집 실험을 위해 3.8% sodium citrate용액과 1:9의 비율로 혼합한 뒤 실험에 사용하였고, 혈류 실험을 위해 heparin처리가 된 tube를 사용하였으며, 혈청 중의 효소 활성 및 지질 농도는 실온에서 한 시간 방치 후 3,000 rpm, 4°C 에서 10분간 원심 분리하여 분석하였다.

혈소판 응집 실험

채취 한 혈액을 3.8% sodium citrate용액과 1:9의 비율로 혼합한 뒤 1,100rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층의 PRP (platelet rich plasma)를 얻었다. PRP를 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층의 혈장을 제거한 후 EDT를 포함하는 washing buffer (138mM NaCl, 2.7mM KCl, 12mM NaHCO_3 , 0.36mM NaH_2PO_4 , 5.5mM glucose, 1mM EDTA, pH6.5)를 5mL를 가하고 혈소판을 재 현탁시켰다. 이 혈소판을 다시 3,000

Table 1. Experimental design of animals

Group (No.)	Treatment
CON-1D (6)	intact group, breeding for one day
DSW-1D (6)	rats supplemented deep sea water of East coast at 1mL/day for one day
CON-1W (6)	intact group, breeding for one week
DSW-1W (6)	rats supplemented deep sea water of East coast at 1mL/day for one week
CON-3W (6)	intact group, breeding for three week
DSW-3W (6)	rats supplemented deep sea water of East coast at 1mL/day for three weeks

rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 세척액을 버리고, 잔사의 혈소판을 위의 방법으로 더 세척하였다. 세척 후 혈소판을 suspending buffer (138mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12mM NaHCO₃, 0.36mM NaH₂PO₄, 5.5mM glucose, 0.49mM MgCl₂, 0.25% Gelatin, pH7.4)에 재현탁 시킨 후 3,000rpm에서 10분간 더 원심 분리하여, 상층액은 버리고 다시 suspending buffer로 재현탁시켜 조제하였다. Washed platelet중의 혈소판 수를 suspending buffer로 희석하여 혈소판 수가 5×10⁸/ml가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 혈소판 응집실험은 Aggregometer (Chrono-log, USA)를 사용하여 37°C에서 optical방법에 의하여 행하였다. Suspending buffer, washed platelet, 10M CaCl₂를 미리 가온한 cuvet에 넣고, collagen[16]를 가해 혈소판 응집을 유도했다. 심층수 농도별 응집저해 실험은 응집제 처리 전에 생리 식염수로 농도별로 희석한 심층수를 미리 처리 후 실험하였다.

혈청 중의 지질농도 분석

혈 중 triglyceride, total-cholesterol 및 HDL-cholesterol 함량은 자동 측정용 slide(FU-JI FILM, Japan)를 이용하여 Dry chemistry analyzer 3500i (Fuji, Japan)으로 측정하였다.

혈류측정

혈류는 Micro Channel Array Flow Analyzer KH-6 (MC Lab, Japan)을 이용하여 채취 한 혈액 100 µL를 주입하여 측정하였다.

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험의 결과는 mean±SD치로 나타내었고, 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 상호비교 하였다.

결과 및 고찰

*In vitro*에서의 심층수 농도별 혈소판 응집 억제 효과

포유동물의 순환혈액을 이루는 구성성분 중 가장 작은 세포인 혈소판은 지혈작용 및 혈전형성에 중요한 역할을 하는 cell fragment 로서, 동맥경화, 심장질환, 혈전의 생성 및 뇌혈관 질환과 같은 성인병의 발병과도 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[3,9].

본 실험에서는 *in vivo* 실험을 위한 전 단계로서 *in vitro*에서의 혈소판 응집능에 미치는 심층수의 영향을 검토하였다. 그 결과 심층수 첨가 농도의 증가와 더불어 혈소판 응집 억제 활성이 나타났다. Table 2는 심층수 농도를 각각 0, 25, 50, 75, 100%로 증류수로 하여 첨가하였을 때 혈소판 응집 억제에 대한 효과를 나타낸 것이다. 혈소판 응집을 (Amplitude)은 심층수의 농도가 진해질수록 점차 억제되었고, 그 반응시간 (Lag time) 또한 같은 결과를 나타내었다. 응집율과 반응시간과의 상관관계를 나타내는 Slop 또한 수치가 감소함으로써 응집이 억제됨을 나타내었는데 심층수의 농도가 진해질수록 비례적으로 수치가 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 *in vitro* 상에서 심층수 처리로 인해 혈소판 응집이 저해되었음을 알 수 있었다.

혈청 중 지질 조성의 변화

고지혈증 또는 혈중 콜레스테롤 농도의 상승은 심혈관질환의 발병과 상관성이 높은 인자이다[6]. 본 연구에서는 동해안 심층수를 투여한 후 혈청 중의 총 콜레스테롤, 중성 지질 및 고 밀도 지 단백질의 농도 변화를 검토하였다. 혈청 중의 총콜레스테롤 함량은 대조군(CON-1D : 110.75±14.43 mg/dL, CON-1W : 98.17±16.80 mg/dL, CON-3W : 82.86±8.05 mg/dL)에

Table 2. Effect of the deep sea water of East coast on collagen-induced aggregation of rat platelets *in vitro*

Con(%)	Amplitude(%)	Slop(Ω/min)	Lag time(sec)	Area under
0	102.00±16.97	110.50±44.54	66.50±28.91	275.25±49.69
25	97.00±2.82	85.50±9.19	56.00±14.14	300.75±53.95
50	88.00±5.65	57.00±15.55	58.50±6.36	247.85±29.48
75	72.00±21.21	44.00±0.00	66.50±13.43	192.80±75.94
100	45.50±19.09	32.00±16.97	73.00±1.41	108.40±55.72

비해 심층수를 투여한 군에서 각각 110.25 ± 11.53 mg/dL (DSW-1W), 91.86 ± 11.53 mg/dL (DSW-1W), 73.25 ± 24.22 mg/dL (DSW-1W)으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1).

중성지방의 함량은 심층수를 3주일 동안 투여한 그룹(DSW-3W)에서 42.33 ± 13.94 mg/dL로 대조군(OVX-CON)의 67.71 ± 28.92 mg/dL보다 유의적으로 감소하는 결과를 보였다. 1일 투여군(DSW-1D : 50.25 ± 11.53 mg/dL) 과 1주일 투여군(DSW-1W : 35.57 ± 14.74 mg/dL) 또한 유의적이지는 않지만 대조군(CON-1D : 50.75 ± 7.23 mg/dL, CON-1W : 38.17 ± 16.68 mg/dL)에 비해 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

혈청 중 고밀도 지 단백질의 함량은 1주일 투여 군(DSW-1W)이 그에 따른 대조군(32.50 ± 14.82 mg/dL)에 비해 41.67 ± 16.17 mg/dL으로 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3).

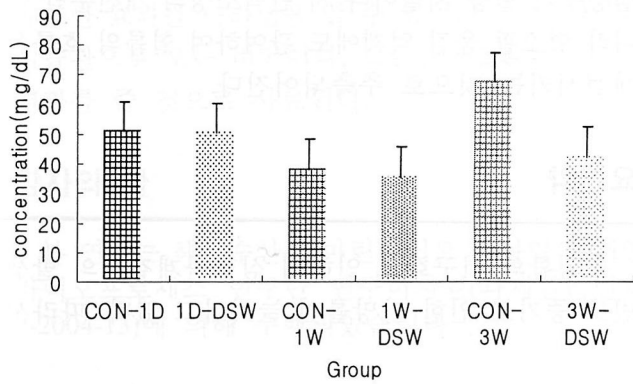


Fig. 1. Effect of deep sea water of East coast on serum total-cholesterol concentration in rats.

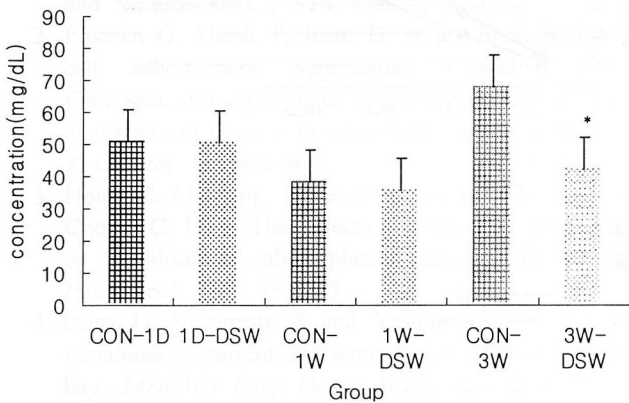


Fig. 2. Effect of deep sea water of East coast on serum triglyceride concentration in rats. Significantly different from intact group : * $p < 0.05$

심층수 투여 기간에 따른 혈소판 응집 억제효과

In vivo 에서 심층수 효과를 검토하기 위하여 Table 2와같이 군을 나누어 실험하였다. 그 결과 모든 심층수 투여군(DSW-1D, DSW-1W, DSW-3W)이 심층수 비 투여군(CON-1D, CON-1W, CON-3W)에 비하여 혈소판 응집이 억제되는 효과가 나타났다. 혈소판 응집율은 심층수 투여군이 각각 $101.00 \pm 2.35\%$ (DSW-1D), $78.44 \pm 4.59\%$ (DSW-1W), $84.10 \pm 8.31\%$ (DSW-3W)로 이는 심층수 비 투여군인 CON-1D ($104 \pm 6.16\%$), CON-1W ($86.32 \pm 5.27\%$), CON-3W ($90.00 \pm 6.81\%$)보다 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 4).

혈소판 응집시간과 응집율의 상관관계를 나타내는 Slop은 그 수치가 감소하면, 혈소판응집이 지연되는 것을 나타내는데, 본 실험에서 응집제인 collagen을 넣어 혈소판응집을 유도하였는데, 심층수 비 투여군 CON-1D (126.80 ± 10.03 Ω/min), CON-1W (77.05 ± 11.92 Ω/min), CON-3W (85.92 ± 10.33 Ω/min)에 비해 심층수 투여군은 각각 120.20 ± 6.53 Ω/min

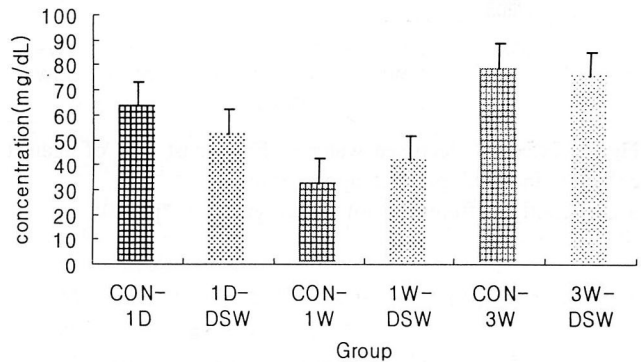


Fig. 3. Effect of deep sea water of East coast on serum HDL-cholesterol concentration in rats.

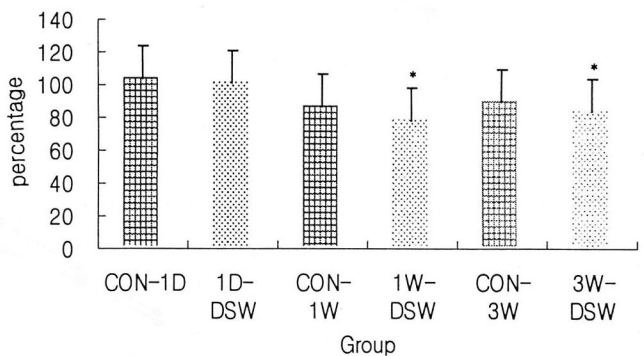


Fig. 4. Effect of deep sea water of East coast amplitude of against collagen induced platelet aggregation. Significantly different from intact group : * $p < 0.05$

(DSW-1D), 53.44±7.63 Ω/min (DSW-1W), 51.40±9.59 Ω/min (DSW-3W)로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5).

심층수 비 투여군에 비해 심층수군에서 응집율의 감소, 응집율과 반응시간과의 기울기가 감소하여 동해안 심층수가 혈소판 응집을 억제하는 효과가 나타나, 심혈관계 질환 및 혈전 생성 등을 예방하는 차원에서 그 효과를 기대할 수 있는 것으로 사료되어진다.

심층수가 혈행에 미치는 효과

혈류의 속도는 적혈구의 변형과 응집, 백혈구의 점성과 혈소판 응집을 반영하여 나타나며, 실제로

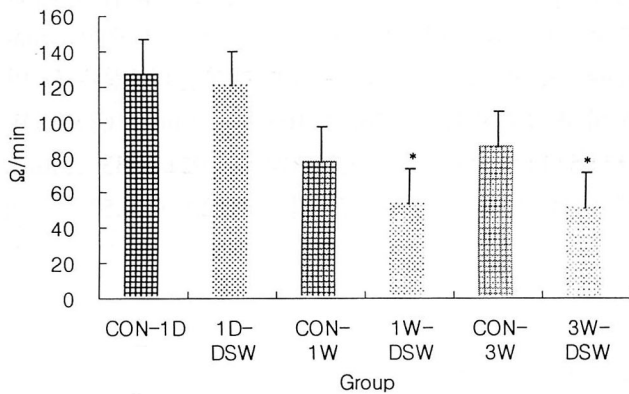


Fig. 5. Effect of deep sea water of East coast slop of against collagen induced platelet aggregation. Significantly different from intact group : *p<0.05

Kikuchi et al.[7,8]은 original microchannel method (micro channel array flow analyzer, MC-FAN)를 통해 혈류흐름을 현미경을 통해 관찰하였다[23]. 또한 혈류는 혈청 지질과 지 단백질 함량과도 관련 있음이 보고되었다[2,21]. 혈류의 흐름과 관련하여 동해안 심층수의 영향을 검토해보기 위해 각 군의 혈액을 채취하여 항 응고제인 헤파린 처리 후, 일정한 압력으로 인해 혈액이 모세관을 25, 50, 75, 100μL 통과하는 시간을 측정하였다(Fig. 6).

1일 심층수 투여군의 경우 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았고 유량을 높였을 경우 오히려 혈류 흐름 속도가 저하하였다(Fig. 6, A). 그러나 심층수를 1주일 동안 투여하였을 때 대조군에 비하여 혈류 속도가 현저히 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 6, B). 심층수를 3주간 투여한 군도 1주간 투여의 경우와 마찬가지로 혈액 주입 시 심층수 비 투여군 보다 더 빠른 혈류 속도를 나타내었는데, 이는 동해안 심층수가 혈중 지질이나 지 단백질조성의 개선뿐만 아니라 혈소판 응집 억제에도 관여하여 혈류의 흐름을 개선시키는 것으로 추측되어진다.

요 약

식생활의 서구화로 인하여 심혈관계질환의 발생 빈도 증가로 인한 사망률이 늘어나고 있다. 따라서

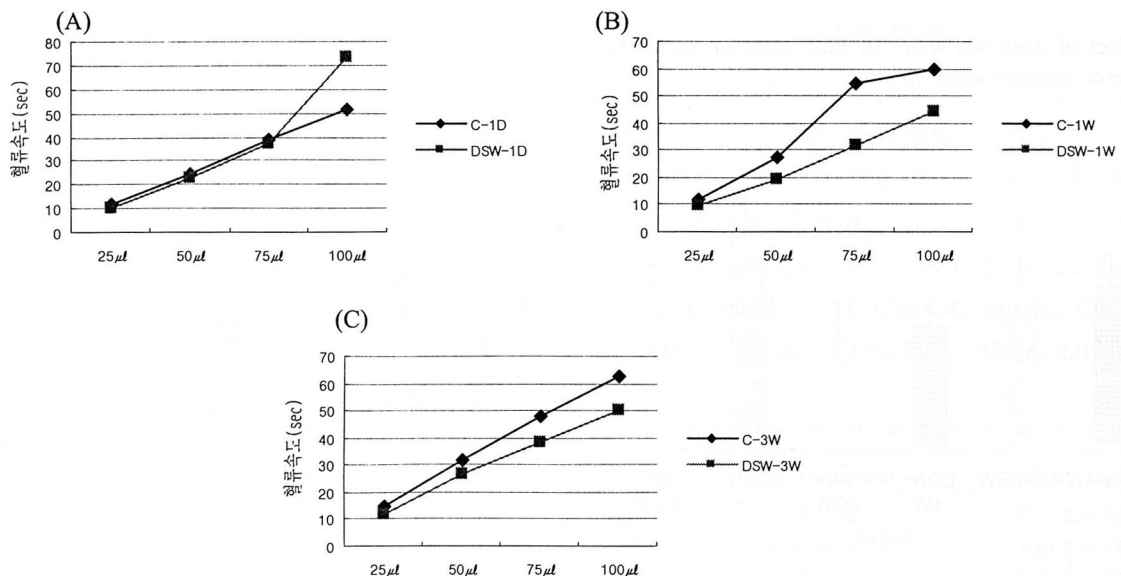


Fig. 6. Effect of deep sea water of East coast on micro channel array flow in rats. (A: breeding for one day, B: breeding for one week, C: breeding for three weeks.)

최근 이용가치가 인정 되어지고 있는 해양 심층수를 이용하여 심혈관계 질환의 개선효과를 알아보았다. 심층수의 혈소판 응집 억제능을 알아보기 위해, *in vitro* 실험에서 washed platelet를 분리하여 심층수를 농도별로 처리한 후, collagen으로 혈소판 응집을 유도하여 심층수의 응집억제 실험을 한 결과 그 농도별로 응집이 감소되었다. 그리고 *in vivo* 실험에서도 심층수를 투여하지 않은 군에 비해 심층수를 투여한 군에서 혈소판 응집이 감소하였으므로 이는 심층수가 혈소판 응집에 효과적인 것으로 보여진다. 또한 혈청 중의 중성지방 함량이 감소되었고, 고밀도 지단백은 증가하였다. 혈류 속도 측정에서도 심층수를 투여한 그룹이 투여하지 않은 군에 비해 더 빠른 속도로 모세혈관을 빠져나가는 것을 볼 수 있었으며, 이것으로 보아 심층수를 투여한 그룹에서 혈행에 있어 좋은 효과가 있음을 나타내었다. 본 실험의 결과 심층수가 혈소판 응집, 혈청 지질 농도, 혈류 속도에 유효한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이는 잘못된 식습관으로 오는 비만이나, 심혈관계질환에 유의한 결과를 줄 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오 21사업의 해양 바이오프로세스 연구단 연구비지원(과제관리번호 P-2004-13)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Brian L.G. and Morgan, R.D. 1986. The food and drug interaction guide. A fireside book, published by Simon and Schuster, INC., New York, p 64-65.
- Fusman G, Mardi T, Justo D, et al. 2002. Red blood cell adhesiveness/ aggregation, C-reactive protein, fibrinogen, and erythrocyte sedimentation rate in healthy adults and in those with atherosclerotic risk factors. *Am. J. Cardiol.* **90**, 561-563.
- Hong, C. M., Jang, D. D., Shin, D. H., Cho J. C. and Cho, J. C. 1995. The Effects of congeners of clofibrate on inhibition of rabbit platelet aggregation., *J. Appl. Pharmacol.* **3**(2), 132-135.
- Inaba, H., Katsumata, T. and Yasuda, K. 2001. Temporal variations of current and temperature at 300m in suruga bay. *JADOWA Deep Ocean Water Res.* **2**, 1-8.
- Jackson, C. M. and Nemerson Y. 1980. In blood coagulation. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 765-771.
- Jaques, L. B. 1979. Heparins : anionic polyelectrolyte drugs. *Pharmacol. Exp. Therap.* **31**, 99-166.
- Kikuchi, Y. 1995. Effect of leukocytes and platelets on blood flow through a parallel array of microchannels: microand macroflow relation and rheological measures of leukocyte and platelet activities. *Microvasc. Res.* **50**, 288-300.
- Kikuchi, Y., Sato K. and Mizuguchi, Y. 1994. Modified cell-flowmicrochannels in a single-crystal silicon substrate and flow behavior of blood cells. *Microvasc. Res.* **47**, 126-139.
- Kim, H. C., Chae, S. W., Lee, B. C. and Eun, J. S. 1999. Mechanism of *Vibrio vulnificus* cytolysin on rat platelet aggregation., *Yakhak Hoeji* **43**(6), 802-808.
- Kim, H. J. 2002. Feasibility study for the multipurpose development of deep ocean water resource. Korea ocean research Lab. *MOMAF Report* UCM00903~2284.
- Kim, H. J., Oh, B. D. and Hong, S. W. Characteristics and multipurpose utilization of deep ocean water resource. The Korea Society of Ocean Engineers Conference 49-52.
- Kim, J. H. 2005. The market potential analysis of the deep sea water products :mainly on the drinking deep sea water products. Ph.D. dissertation of Seoul National University.
- Kim, M. L., Jeong, J. S. and Lee, G. D. 2003. Change in Growth of alcohol Fermentation Yeash with Addition of Deep Seawater. *Kor. J. Food Preserv.* **10**(3), 417-420.
- Kim, Y. K. 1996. A Study on the water characteristics and the circulation of the intermediate and deep layer of the East Sea. Ph.D. dissertation of Seoul National University.
- Kim, Y. M., Kim, D. S. and Choi, Y. S. 2004. Anticoagulant activities of brown seaweed extracts in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**(6), 1008~1013.
- Longenecker, G.L. 1985. The platelets : physiology and pharmacology, Academic Press, Orlando, pp.1-14.
- Moon, D. S., Jung, D. H., Kim, H. J. and Shin, P. K. 2004. Comparative analysis on resources characteristics of deep ocean water and brine. *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Eng.* **7**(1),42-46.
- Mustard, J. F. and Packham, M. A. 1970. Factors influencing platelet function : adhesion, release and aggregation. *Pharmacol. Rev.* **22**,97.
- Nakagawa, K., Yokoyama, Y., Nakajima, H. and Ikegami, Y. 2000. Application of minerals in deep sea water. *JADOWA Deep Ocean Water Res.* **1**, 1-4.
- Ryu, K. H., Lee, J. Y., Cho, Y. S., Kim, M. J. and Chung, J. H. 1994. Assay for screening anti-platelet aggregating capacity of natural food. *J. Food Hyg. Safety* **9**(1), 23-30.
- Seki, K., Sumino, H. and Murakami, M. 2003. Study on blood theology measured by MC-FAN. *Rinsho Byori* **51**, 770.5 .
- Seo, D. C., Jeung, S. M., Lee, J. Y., Kim, Y. S. and Jung, J. H. 1996. Effect of oriental onion(*Allium Fistulosum*) on platelet aggregation., *J. Food Hyg. Safety* **11**(4), 273-276.
- Sumino, H., Ichikawa, S., Takahashi, T., Sakamoto, H.,

- Goto-Onozato, K., Koyae, S., Kandac, T., Nara, M., Seki, K., Murakami, M. and Kurabayashi, M. 2006. Conjugated estrogen plus medroxyprogesterone does not impair blood rheological properties in hypertensive postmenopausal women. *Eur. Menopause J.* **53**, 306-314.
24. Takahashi, M. 2001. Future resources, it learns from the sea. Academy Book. P78.
25. Takahashi, M. 2001. It knows and the deep sea water Dose publication. *Science and Technology* **23**, 35-37.
26. Yoon, G. A. 2006. Effect of garlic supplement and exercise on plasma lipid and antioxidant enzyme system in rats. *Kor. Nutri. Soc.* **39**(1), 3-10.