

紅花 추출물 투여에 의한 뇌출혈 흰쥐 뇌조직의 유전자 발현 조절

임세현^{1) #} · 손영수²⁾ · 백진웅³⁾ · 조수인³⁾ · 김영균^{2) *}

¹⁾고려대학교 간호대학, ²⁾동의대학교 한의과대학,

³⁾부산대학교 한의학전문대학원

Carthami Flos Extract Treatment Restored Changes of Gene Expression on ICH Model in Rats

Lim Se-Hyun,^{1) #} Son Young-Soo,²⁾ Back Jin-Ung,³⁾

Cho Su-In³⁾ & Kim Young-Kyun^{2) *}

¹⁾College of Nursing, Korea University

²⁾College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

³⁾School of Korean Medicine, Pusan National University

Abstract

Objectives : The pathophysiology of ICH is not fully understood, therefore, the fundamental therapeutic strategies for ICH also not well inspected either. The genetic profile for the effect of Carthami Flos extract on cerebral hemorrhage in rat brain tissue was measured using microarray technique. Genes displaying expressional change on brain damage were selected and the functional analysis on these genes was conducted.

Methods : Rats were placed in a stereotaxic frame after intraperitoneal injection of chloralhydrate, and ICH was induced by injection of collagenase type IV and Carthami Flos extract was administered orally. The molecular profile of cerebral hemorrhage in rat brain tissue was measured using microarray technique to identify up- or down- regulated genes in brain tissue.

· 접수 : 2008년 11월 8일 · 논문심사 : 2008년 11월 25일 · 채택 : 2008년 12월 5일

제1저자 : 임세현, 서울시 성북구 안암동 5가 고려대학교 간호대학

Tel : 017-549-0351, E-mail : shlim1119@hanmail.net

* 교신저자 : 김영균, 부산시 부산진구 양정동 동의대학교 한의과대학

Tel : 051-867-5105, E-mail : lab3402@hanmail.net

Results : Upon treatment with Carthami Flos extract on the rat having brain damage, many genes show expressional change. The pattern of gene expressional change can be classified into 8 classes in which two types of classes were composed of recovered genes from up or down-regulation by brain damage, respectively.

Conclusions : Further analysis using protein interaction database identified some key molecules that can be used for elucidation of therapeutical mechanism of Carthami Flos extract in future.

Key words : Carthami Flos extract, Gene Expression, ICH

I. 서론

紅花는 국화과에 속한 1년생 초본인 잇꽃 (Carthamus tinctorius L.)의 花瓣으로서, 성질은 따뜻하고 독성은 없으며, 辛味를 가져 活血通經 등의 효능으로 인해 經閉·痛經·惡露不行·腹痛 등의 병증에 적용하고, 기타 각종 瘀血阻滯로 인한 瘀血疼痛·跌撲損傷 등의 병증을 다스리는데 사용되어져 왔으며, 이러한 이유로 인해 紅花는 임상에서 뇌혈관 질환 등에 많이 이용되는 약재 중 하나이다.¹⁻³⁾

한의학에서는 뇌혈관 질환, 특히 혈전증을 瘀血의 범주에 포함시켰고, 또한 血의 운행이 장애를 받아 정상적인 경로를 벗어났거나 혹은 운행이 순조롭지 못하여 經脈이나 臟腑에 阻滯된 상태를 서양의학적인 혈전과 유사하다 하여 活血化瘀하는 약재 또는 처방을 이용한 연구가 주로 되고 있다.⁴⁻⁷⁾ 본 연구에서는 병태모델로 뇌출혈을 사용하였는데, 서양의학에서의 뇌출혈 치료 원칙으로 혈압을 정상으로 유지시키면서 두개내 압력을 저하시키는 약물 투여와 함께 수술로 혈종을 제거하는 방법이 주로 고려되므로 瘀血阻滯 및 기타 血의 운행 장애로 인해 經脈이나 臟腑에 血이 阻滯되었을 때 주로 응용되는 紅花의 치료 효과와 의미가 통하는 것으로 생각되어 뇌출혈로 유발로

인한 유전자의 변화에 紅花 추출물의 투여가 어떠한 양상으로 작용하는지 확인하기 위하여 본 연구를 수행하게 되었다.

본 연구에 사용된 DNA 칩 기술은 대규모 유전자발현 연구에 유용한 기술로 유전자 발현을 분석하는데 있어 표준화된 분자생물학적 기법으로 인정받고 있다.^{8,9)} 현재 약물 기전을 밝히기 위해서는 대용량 분석을 통해 얻어진 모든 종류의 데이터를 시스템 생물학을 이용하여 분석하는 접근법이 최근 일반적으로 사용되고 있으며, 게다가 유전체학이나 단백질체학과 같은 대용량 분석기법을 통해 얻어진 데이터가 매우 필요해질 것이므로^{10,11)} 본 연구에서 이러한 분석법이 한약재의 효능을 효과적으로 입증할 수 있는지 확인하고자 하는 시도의 일환으로 연구 방법으로 사용하게 되었다.

본 연구의 수행을 통해 뇌손상에 의해 유도되는 유전자의 발현 패턴이 확인되었으며, 뇌혈관 질환에 다용되고 있는 紅花 추출물의 투여에 의해 정상 수준으로 회복되는 유전자의 변화를 확인하였으며 향후 이러한 분석법의 적용이 한약재 연구에 효과적으로 응용될 수 있을 것으로 생각되어 그 결과를 발표하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 생후 8주령 된 체중 200 ± 20 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 전문업체(대한실험동물, 한국)에서 공급받아 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재 및 추출

본 실험에 사용된 紅花는 시중(전남생약, 한국)에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 실험에 사용하기 위해 紅花 75g을 증류수 1,200ml과 함께 전기 약탕기(DWP-1800T, 대웅, 한국)로 100°C에서 2시간 전탕한 후 추출액을 냉장 원심분리기(VS6000CFN, Vision과학, 한국)로 1,300×g에서 50분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, 일본)에서 감압농축하고 이를 -84°C deep freezer(DF8514, 일신, 한국)에서 1시간 동안 방치하고, freeze dryer(SFDSM06, 삼원, 한국)로 동결건조하여 16.4g의 건조 추출물을 얻었다. 이를 냉동실에 신선하게 보관하였다가 실험 직전에 필요한 농도로 1차 증류수에 녹여 검액으로 사용하였다.

2. 방법

1) 뇌출혈 유발과 紅花 추출물의 투여

흰쥐를 일정한 온도(22 ± 1 °C)와 12시간의 light/dark 주기의 환경에서 사육하였고, 마취를 위

해서는 chloral hydrate(400mg/kg, Fluka, 독일)를 복강 내에 주입하였으며, 뇌출혈 유발을 위해 27 gauge의 스테인리스 주사침을 흰쥐의 우측 striatum(정중선의 3mm 측방 및 시상봉합의 0.2mm 전방 부위)에 삽입하여 5 μ l 생리식염수에 1 unit의 collagenase type IV(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 희석되어진 용액을 마이크로 펌프를 이용하여 0.4 μ l/min의 속도로 주입하였다. ICH를 유발하지 않은 정상대조군에는 striatum에 생리식염수만을 주입하였다. Striatum 부위에 용액이 주입된 후에는 피부를 봉합하고 항생제를 투여한 후 cage에서 자유로이 사료와 물을 섭취하도록 하였다.

2) RNA 분리

흰쥐를 경추탈구로 희생시켜 우측 뇌질을 분리한 즉시 바로 동결시킨 후 초저온 냉동고에 보관하였다. 이후 전RNA를 동결조직에서 분리하였는데, 이것은 Qiagen에서 제시한 방법에 따라 이루어졌다. 전RNA를 아가로스 겔 상에서 전기영동한 후 28S/18S RNA의 비율을 측정하여 정도 관리하였다.

3) DNA 칩 실험

45K oligo-chip을 이용하여 실험을 수행하였으며, 탐침 준비와 혼성화 반응은 3DNA array detection system을 이용해서 수행하였다(Genisphere, PA). 형광 표지된 cDNA 제작시 20 μ g 전RNA를 사용하였으며, 어레이를 씻어낸 후 ScanArray scanner(Perkin-Elmer, Boston, MA)로 스캔하였다. 정상 RNA를 레퍼런스로 사용하여 DNA 칩상의 대다수 cDNA spots(85% 이상)이 검출됨을 확인하였다.

4) 데이터분석

이미지파일에서 IMAGEGENE 4.0(Bio-discovery, Marina del Rey, CA)를 사용하여 1차 데이터를 얻은 후 lowess method를 사용하여 표준화하였고, 모든 칩 상의 spot에서, 각 채널의 형광 강도가 배경의 형광 강도보다 1.4배 더 큰 경우에 한해 제대로 측정된 것으로 판단하여 선별하였다. 시료에서 제대로 측정되지 않은 것은 제외시켰다. 발현 비율은 CLUSTER를 이용하여 순차적 클러스터링한 후 TREEVIEW (M.B. Eisen, <http://rabam.lbl.gov>)를 이용하여 시각화하였으며, 유전자 기능분석은 FatiGo algorithms(<Http://.babelomics.bioinfo.cipf.es>)를 이용하여 수행하였다. 클래스간 비교분석을 통해 얻어진 결과는 False Discovery Rate(FDR) 값이 0.05 이하일 때 의미있는 것으로 판단하였으며, 단백질 결합은 BOND 데이터베이스 (<http://bond.unleashedinformatics.com>)에서 얻어진 흰쥐 단백질 데이터베이스로 cytoscape program(ver. 2.4)을 이용하여 분석하였다.

III. 결 과

1. DNA 칩 이미지, 표준화 및 스팟 강도의 분포

DNA 칩 이미지는 Fig. 1에 표시하였는데, Agilent rat 45K 올리고칩을 사용하여 흰쥐의 전체 유전체 변이를 분석하였다. Cy3와 cy5로 구성된 two colors system을 사용하였기 때문에, 적색과 녹색 스팟으로 표현되어졌다. 대부분의 유전자는 의미있는 변화를 보이지 않았기 때문에 대부분의 스팟이 노란색으로 나타났다.

본 연구에 나타내지는 않았지만, 원천 이미지에서 얻어진 1차 데이터를 lowess 기법을 사용해 표준화하였으며, 각 DNA 칩의 표준화 뿐만 아니라, 대조군과 실험군의 마이크로어레이간의 표준화 또한 수행하였다. 표준화 후, 스팟 강도의 분포를 측정하였다. 대조군(Fig. 2a)

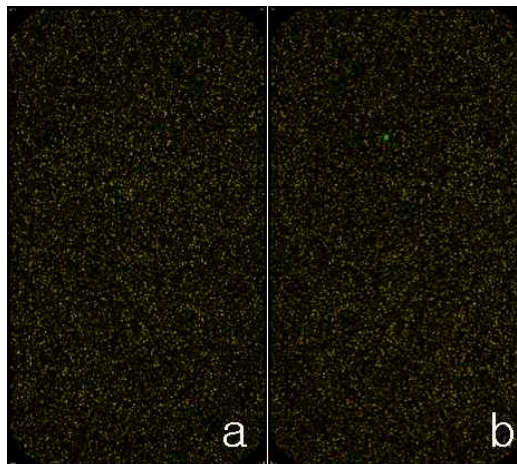


Fig. 1. A total sequence set of ~45,000 oligo-nucleotides were printed onto glass microscope slides. The probe preparation and hybridization were performed using 3DNA array detection system with 20 μ g of total RNA from damaged brain tissue (a) and treated tissues (b).

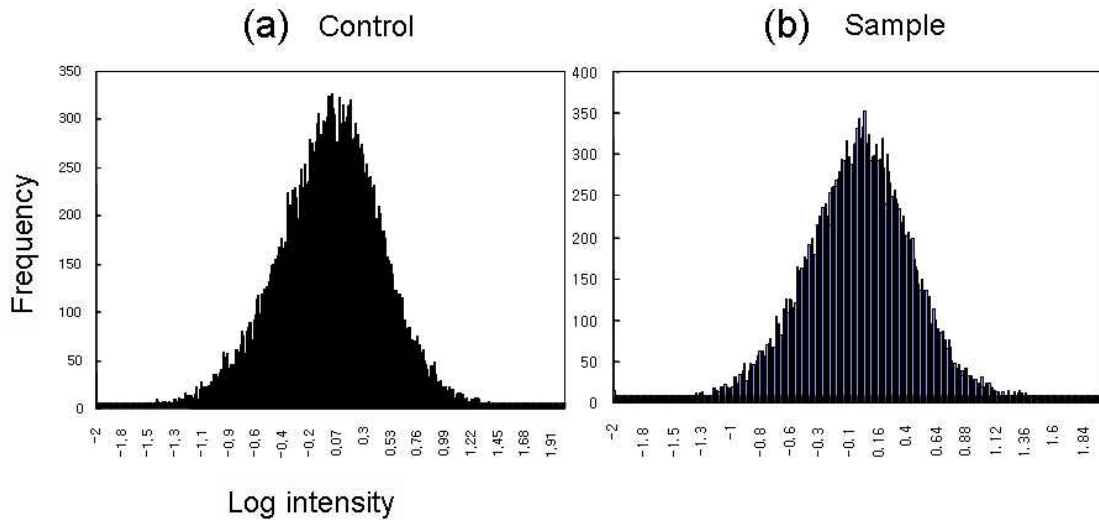


Fig. 2. After normalization, the distributions of spot intensities were measured. Control (a) and experimental samples (b) show normal distribution with average of zero, which were already adjusted through normalization processes.

과 실험군(Fig. 2b) 시료는 평균 0의 정상분포를 보이는데, 이것은 표준화 과정을 통해 이미 조정되었다.

2. DNA 칩 발현 프로파일

Fig. 3은 시료의 유전자 발현 프로파일로써, 발현 변화를 보이는 유전자를 선택하여 비교하여 보았다. 실험군은 뇌 손상만이 유발된 대조군에서와 유사한 유전자 발현 패턴을 보였다. 뇌 손상 시료에서 발현이 증가되었거나 감소된 대부분의 유전자는 실험군에서도 증가 또는 감소되었다.

그러나 일부의 유전자는 대조군과 실험군에서 서로 다른 발현 패턴을 보였는데, 이 부분이 본 연구에서의 중요한 관찰점이라 여겨진다. 따라서 이러한 유전자 발현 패턴을 8가지의 군으로 분류하여 보았는데, 즉, (A) 대조군에서 증가하였으나 실험군에서 변하지 않은 것, (B) 대조군에서 감소하고, 실험군에서는 변

하지 않은 것, (C) 대조군에서 증가하고 실험군에서 증가한 것, (D)대조군에서 감소하고 실험군에서 감소한 것, (E) 대조군에서 증가하고 실험군에서 감소한 것, (F) 대조군에서 감소하고 실험군에서 증가한 것, (G) 대조군에서 변화 없고, 실험군에서 증가한 것, 그리고 마지막으로 (H) 대조군에서 변화 없고 실험군에서 감소한 것이다.

E 및 F 분류군의 경우 변화 유전자의 수가 적어 Fig. 3에 나타나지 않았으며, 전체 유전자 발현 프로파일에서 각 패턴의 위치는 Fig. 3의 우측에 표시되어 있다.

3. A 분류군과 B 분류군에서의 유전자 발현 세부 형태

A 군과 B 군의 유전자 발현 세부 형태는 Fig. 4에 나타나 있다. 대조군에서 증가하고 실험군에서 변화가 없는 유전자를 A군으로 분류했고(Fig. 4a), 대조군에서 감소하고 실험군

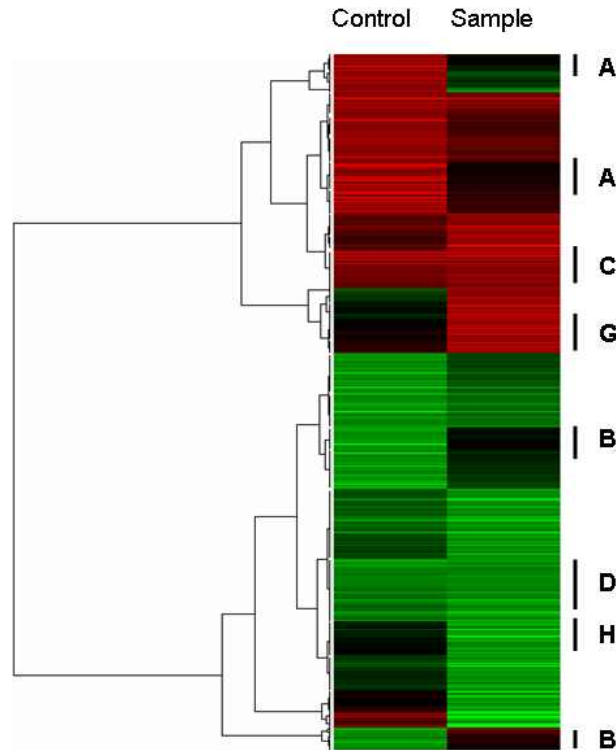


Fig. 3. Genes showing expressional variations were selected for comparison. Interestingly experimental sample shows similar gene expression pattern with brain injury sample. Most genes that were up regulated or down regulated in brain injury sample were also up or down regulated in experimental sample. This pattern of gene expression can be classified into 8 classes.

에서 변화가 없는 유전자를 B군으로 분류했다 (Fig. 4b). 그림에서 보듯이 각 군에 속한 유전자들의 경우 명확한 발현 변화가 있었다.

4. 紅花 추출물 투여에 의해 정상발현으로 회복된 유전자들의 상호작용 네트워크

앞에서 약물 처리에 의해 유전자들의 발현 변화가 있다는 것을 확인하였다. 따라서 더 나아가 이들 유전자들간의 상호작용에 대해 알기 위하여 단백질 상호작용을 이용한 네트워크 분석을 수행하여 보았다. Fig. 5는 칩에 존재하는 유전자에 해당하는 단백질의 상호작용

을 보여주는 그림이다. 노란색으로 표시된 도형은 약물 처리에 의해 발현이 정상으로 복귀한 단백질을 나타내는데, 각각의 단백질들을 직접 확인할 수 있다. Ngf, Dlgap1, Ctnnb1, Slc6a9, Stm3 등의 단백질이 다른 여러 단백질과 상호작용한다는 것을 확인할 수 있으며, 따라서 이들 단백질이 약물의 세포내 작용에 매우 중요한 역할을 수행할 것으로 예측된다.

IV. 고찰

최근 생활 수준의 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 급속히 높아져 가고 있는 추세이며,

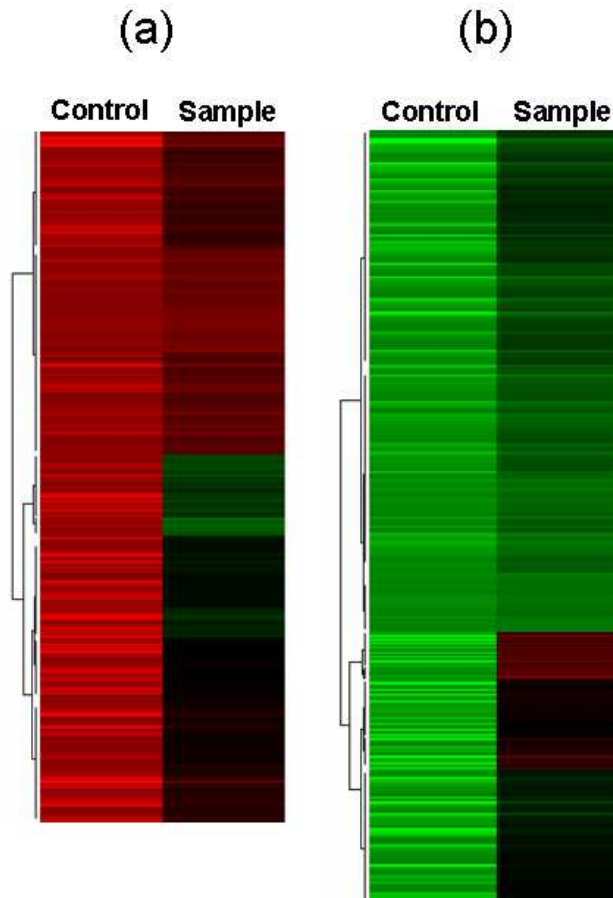


Fig. 4. More detailed view of gene expression in class A and class B were shown. Although we classified genes increased in control and not-changed in experiment as A class (a) and genes decreased in control and not-changed in experiment as B class (b), there were evident variations of expressions in each class.

특히 현대 도시 생활자들은 40대 중반부터 찾아오는 성인병, 특히 뇌혈관 질환의 예방 및 치료에 대한 관심이 대단히 높다. 뇌혈관 질환과 밀접한 연관이 있으면서 혈액 내를 순환하고 있는 혈소판은 정상 상태에서는 혈관 내피에 부착하거나 혈소판들끼리는 응집하지 않지만, 여러 종류의 자극들이 존재하거나 또는 혈관 내피가 파괴되어 collagen이 노출되었을 경우 혈소판 응집이 초래되고 결과적으로 혈소판 파립 내에 있는 여러 물질들을 분비하게

되며, 이들은 적혈구 및 백혈구로 이루어진 혈전의 형성을 촉진시키게 된다.¹²⁻¹⁴⁾

한의학에서 이와 원인으로 일컬어지는 瘀血에 관한 記錄은 『內經』에서부터 찾아볼 수 있는데 『素問·舉痛論篇第三十九』에 “經脈流行不止，環周不休。……泣而不行，客於脈外，則血少，客於脈中，則氣不通，故卒然而痛”이라 기록하여 혈액은 인체 내에서 끊이지 않고 흐르는데 만약 흐름이 멈추게 되면 瘀血이 발생하여 질병이 유발된다고 보았으며,¹⁵⁾ 外因과 內因의

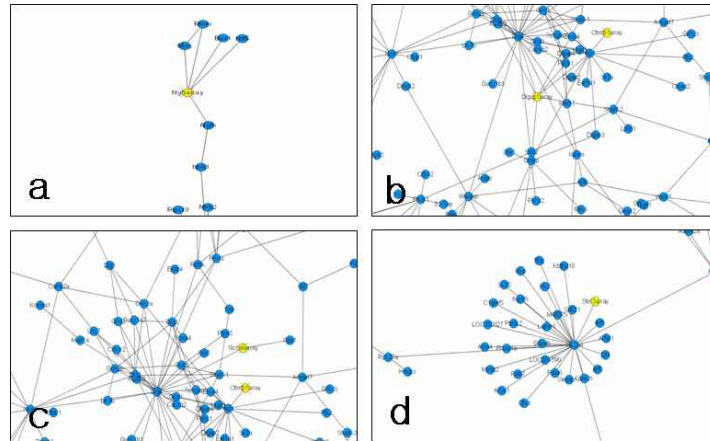


Fig. 5. Protein interaction network of genes recovered by treatment with Carthami Flos extract, and yellow circles marked in figure were shown in more detailed view. Each circle have name of the protein. Ngf, Dlgap1, Ctnnb1, Slc6a9, and Strn3 were placed on core positions with intensive interactions with other proteins.

조건하에서 인체의 심장·혈관 및 생물물리학적 변화 등으로 말미암아 혈액의 흐름이 완만 혹은 정체되거나, 혈액이 혈관을 벗어나 瘀積을 이루는 瘀血이 형성된다는 견해⁷⁾도 있다.

瘀血에 의한 여러 병증들을 치료하기 사용하는 약재들 중 紅花는 그 대표 약재 중 하나라 할 수 있는데, 申³⁾은 “肝氣를 疏通하고 血海를 助하여 … 留血을 破하고 活血한다. … 行血藥이므로 血量을 解除하고, 留滯가 行하면 곧 中止해야 한다.”라 하였으며, 이외의 서적들에서도 유사한 기록들을 보이고 있으므로 본 연구에서 이의 추출물을 재료로 사용하게 되었다.

최근 현대 생물학을 이용한 한의학의 연구가 활발하게 진행되고 있지만, 분자수준의 연구결과는 아직까지 많이 발표되고 있지 않고 있으므로, 본 연구에서는 흰쥐의 뇌손상에 대한 紅花 추출물의 효과를 분자수준에서 파악하기 위하여 DNA 칩을 이용하여 유전자들의 발현정도를 측정하였다.

그 결과, 대다수의 유전자들이 뇌손상을 유발시켰을 경우 발현이 크게 변화하지 않고 있

다는 것을 확인할 수 있었는데, 본 연구에 나타내지는 않았지만, 뇌손상에 의해 발현이 증가된 유전자는 393종, 발현이 감소한 유전자는 760종으로 총 1153종의 유전자들의 발현이 변화되었으며 이는 DNA 칩에 존재하는 유전자를 기준으로 약 2.5% 정도밖에 되지 않는 숫자이다. 따라서 뇌손상에 의해 발현이 감소하는 유전자가 증가하는 유전자보다 다수 존재함을 알 수 있는데, 뇌손상시 정상적인 유전자의 기능이 상대적으로 많이 저하된다는 것을 확인해 주는 결과이다.

뇌손상을 줄여주는 약물의 기작을 연구하기 위해서는 일반적으로 생화학적 지표들을 측정해 왔으며 유전자 수준에서의 변화까지는 아직 많은 연구가 되어 있지 않다. Fig. 3에서 보였듯이 紅花 추출물 처리에 의한 전체 유전자의 발현 변화는 전반적으로 큰 변화가 없다는 것을 알 수 있다. 하지만 세밀하게 보면 대조군과 紅花 추출물 처리군 간에 발현 차이를 보이는 몇 개의 유전자군을 선별할 수 있다.

대표적인 변화군으로 다음의 8개 군을 선택하였다. (A) 대조군에서 증가되었으나 실험군

에서 변화가 없는 유전자군, (B) 대조군에서 감소되었으나 실험군에서 변화가 없는 유전자군, (C) 대조군과 실험군 모두에서 증가된 유전자군, (D) 대조군과 실험군 모두에서 감소된 유전자군, (E) 대조군에서 증가되었으나 실험군에서는 감소된 유전자군, (F) 대조군에서 감소되었으나 실험군에서 증가된 유전자군, (G) 대조군에서 변화 없으나 실험군에서 증가된 유전자군, (H) 대조군에서 변화 없으나 실험군에서 감소한 유전자군. 이상의 8가지 유전자군의 위치가 Fig. 3에 표시되어 있다.

약물치리에 의한 유전자의 변화를 더 자세히 살펴보기 위해 A 군과 B 군에 속한 유전자들을 조사한 결과, 나타내지는 않았지만 A 군에는 357개의 유전자가 B 군에는 585개의 유전자가 존재함을 알 수 있었으며, A 군과 B 군에 속한 유전자들의 발현패턴을 보면 발현도가 매우 다양하게 분포되어 있음을 알 수 있다(Fig. 4). 이 중에서 발현도의 변화차이가 큰 유전자들이 실제 중요한 생물학적 의미를 가지고 있을 것으로 판단된다.

마지막으로, 뇌손상에 의해 변화되는 유전자 중에서 향후 새로운 약물의 신규 타겟이 될 수 있는 유전자를 선별하기 위하여 단백질 상호작용을 이용한 네트워크 분석을 수행한 결과, Ngf, Dlgap1, Ctnnb1, Slc6a9 및 Strn3 단백질이 중심체로 작용하여 다른 단백질과 상호 연결 되어 있음을 확인할 수 있다. 이는 이들 단백질이 뇌손상을 유발시키는 단백질의 네트워크에서 중심적인 역할을 수행할 수 있다는 것을 의미하며, 이들 단백질을 이용하여 신규 약물의 개발이 가능할 것이다.

결론적으로, 이번 연구를 통하여 뇌손상에 의해 유도되는 유전자의 발현 패턴을 확인하였으며, 유전자의 발현도를 측정하여 약물 처리에 의해 변화되는 유전자들을 8가지의 군으로 분류하였고, 이 중 紅花 추출물 처리에 의해 발현이 정상으로 회복되는 A 군과 B 군의

유전자들의 기능에 관여할 것으로 생각되는 단백질도 확인하여 보았다.

향후 이러한 결과를 바탕으로 더 진보된 분석 방법을 사용하여 본 연구의 미비점을 보완하여야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

瘀血의 병증을 개선할 수 있는 효능을 갖추고 있으면서, 뇌혈관 질환의 치료에 임상에서도 常用되는 약재 중 하나인 紅花를 재료로 하여 흰쥐의 뇌손상에 대한 분자수준에서의 작용을 확인하여 보았으며, 그 결과 전체 유전자의 발현 변화는 전반적으로 큰 변화가 없었으나 대조군과 紅花 추출물 처리군 간에 발현 차이를 보이는 몇 개의 유전자군을 선별할 수 있었다. 또한 뇌손상에 의해 변화되는 유전자 중에서 향후 새로운 약물의 신규 타겟이 될 수 있는 유전자를 선별하기 위하여 단백질 상호작용을 이용한 네트워크 분석을 수행하여 Ngf, Dlgap1, Ctnnb1, Slc6a9 및 Strn3 단백질이 다른 단백질과 상호 연결되는 중심에서 작용한다는 것도 확인하였다. 따라서 이들 단백질을 이용하여 신규 약물의 개발이 가능할 것으로 생각되며 향후 이러한 결과를 바탕으로 더 진보된 분석 방법을 사용되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(과제번호 : 2005AA108)

참고문헌

1. 辛民教 編著. 臨床本草學. 서울: 南山堂. 1997;

- 534-535.
2. 全國韓醫科大學 本草學 教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1994; 424-425.
 3. 申佶求. 申氏本草學 各論. 서울:壽文社. 1988; 554-556.
 4. 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. 1976; 2(4): 7-15.
 5. 康舜洙. 韓醫學에서의 瘀血에 대한 概念. 大韓韓醫學會誌. 1984; 5(1): 138-140.
 6. 金完熙. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1988; 59-61.
 7. 崔昇勳. 韓方病理學. 서울:一中社. 1997; 70-74.
 8. Blanchard AP, Kaiser RJ and Hood LE. High-density oligonucleotide arrays. Biosensors Bioelectron. 1996; 11: 687-690.
 9. Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. Nat Biotechnol. 2001; 19: 342-347.
 10. Hong Y, Ho KS, Eu KW and Cheah PY. A susceptibility gene set for early onset colorectal cancer that integrates diverse signaling pathways: implication for tumorigenesis. Clin Cancer Res. 2007; 13(4): 1107-14.
 11. Galbraith DW. The daunting process of MIAME. Nature. 2006; 444(7115): 31.
 12. Valgaftig BB, Chignard M and Benveniste J. Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. Biochemical Pharmacology. 1981; 30: 263-271.
 13. Thomas DP. The platelet contribution to arterial and venous thrombosis. Clin. Haematol. 1972; 1: 267-282.
 14. 金正鎭. 生理學. 서울:고문사. 1993; 61-80.
 15. 洪元植 編纂. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院出版部. 1985; 145-148.