

## 慢盆方이 血栓 病態 有關 因子에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

정우석, 조한백, 김송백, 최창민, 최철원

### ABSTRACT

#### The Effect of *Manbunbang* on Thrombus Disease Related Factors

Woo-Suk Jung, Han-Baek Cho, Song-Baeg Kim, Chang-Min Choe, Chul-Won Choi  
Department of Oriental Obstetric and Gynecology, college of Oriental  
Medicine, Wonkwang University

**Purpose:** In this study, we evaluated anti-inflammatory activity and anti-thrombosis effect of *Manbunbang*(*MBB*) prescribed to chronic PID patients.

**Methods:** We studied inhibitory effect of platelet aggregation, suppression effect of GPIIb/IIIa activity and inhibitory effect of TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> biosynthesis which were caused by ADP, epinephrine, collagen and arachidonic acid in vitro. And suppression of pulmonary embolism, changes of related factors in dextran coagulation condition model and anti-oxidative effect of oxidative damage were studied in vivo.

**Results:** *MBB* extract showed LD50 of 200  $\mu$ g/ml or higher in mouse lung fibroblast cells, and significantly decreased the GPT and GPT level in dextran coagulation condition model compared to the control. *MBB* extract showed dose-dependent inhibition effect on platelet coagulation induced by ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid. *MBB* extract showed dose-dependent inhibition effect on GPIIb/IIIa activities compared to the control. *MBB* extract significantly suppressed TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> biosynthesis compared to the control. *MBB* extract suppressed pulmonary embolism triggered by collagen and epinephrine by 37.5% compared to the control. *MBB* extract significantly suppressed the decrease of speed of bloodstream caused by blood coagulation in dextran coagulation condition model compared to the control.

**Conclusion:** The results strongly suggest the anti-inflammatory activity of *Manbunbang* through anti-thrombus. Various applications using *Manbunbang* on inflammatory diseases are anticipated. Anti-oxidative efficacy comparison data between the *Manbunbang* prescription and the drug compositions may be used as important clinical information, and further investigation of anti-oxidative activities of *Chrysanthemum indicum* and *Rhemaniae Radix* should be followed.

**Key Words:** *Manbunbang*(*MBB*), Aggregation, anti-thrombosis, anti-inflammatory

“이 논문은 2007년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구됨.”

“This research was supported by Wonkwang Univ. Research Fund. 2007”

## I. 緒 論

慢益方は《實用中醫婦科學》<sup>1)</sup>에 收載된 처방으로, 少腹墮痛, 經病疼痛, 午後潮熱, 月經量少, 閉經 등이 동반되는 慢性 骨盤 炎症性 疾患에 활용된다. 구성 약물 대부분이 養陰清熱, 活血軟堅 效능이 있어 陰虛發熱과 이로 인한 瘀血 증상에 응용되고 있다. 骨盤 炎症性 疾患 (Pelvic Inflammatory Disease, PID)은 박테리아 혹은 드물게 바이러스 감염에 의해 膻炎, 頸部炎이 방치되어 子宮을 통하여 卵管이나 골반내까지 염증이 진행된 상태를 말한다<sup>2,3)</sup>. 해부학적 위치에 따라 염증성 변화는 혈관, 임파선을 통하여 子宮內膜에서 시작하여 卵管, 卵巢, 腹膜 및 인접 장기로 전파됨으로써 子宮內膜炎, 卵管炎 및 腹膜炎 등을 유발한다<sup>2-4)</sup>.

韓醫學에서 骨盤 炎症性 疾患은 발현 증상으로 보아 月經不調, 痛經, 帶下, 熱入血室, 產後發熱, 癥瘕, 不妊 등의 범주에 속하며<sup>4-8)</sup>, 이에 대한 辨證은 타 염증성 질환과 유사하게 急性은 濕熱型, 熱毒型, 濕濁型 및 血滯型으로, 慢性은 沖任虛損型, 臟腑氣血失調型 및 血滯型으로 辨證하여 다양한 치료법이 활용된다<sup>4-8,11)</sup>. 骨盤 炎症性 疾患은 병리 기전에 따라 發熱期에는 清熱解毒과 活血化瘀法이, 癥瘕期에는 破瘀理氣, 清化濕熱法이 主治法이 되고, 血의 병리가 기본이 되는 여성 질환 특징으로 인하여 瘀血과 그에 따른 活血化瘀 治法이 중요하다고 언급하고 있다<sup>11)</sup>.

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 응결되어 형성된 병리적 산물이자, 속발성 발병 인자이다<sup>12-15)</sup>. 《金匱要略·

驚悸吐衄下血胸滿瘀血病脈證治》<sup>16)</sup>에서 최초로 '瘀血'이란 명칭이 언급되었으며, 현대에 이르러서는 병리 및 증상 면에서 血栓과 가장 유사한 개념으로 인식<sup>12-15,18)</sup>되고 있어, 抗瘀血劑의 효능 평가에 주로 血栓 有關 인자이자 결과물인 血液粘度, 血漿粘度, 赤白血球와 血小板의 附着性과 凝集性, fibrin, prothrombin 數值, 赤血球의 變形 能力 등이 측정 指標로 사용되고 있다. 또한 炎症에서 나타나는 조직의 變性和 壞死가 瘀血로 인한 증상과 유사하여 항염증 작용에 대한 活血化瘀의 효능을 지닌 한약 및 처방에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다<sup>19-25)</sup>. 이러한 血栓, 炎症과 活血化瘀加味方의 상호 관계에 대한 실험적 연구는 단순히 한의학적 이론의 배경에 준한 것이 아니라, 血栓 형성 반응에 있어서 monocyte/macrophage가 분비하는 다양한 염증성 사이토카인이 TF(tissue factor)의 발현을 증가시켜 血栓을 유도한다는 연구 결과<sup>26)</sup>에 기인한 것이며 이는 결과적으로 血栓과 炎症의 병리적 단계에서 생화학적으로 동일한 기전이 작용한다는 보고이다<sup>26-28)</sup>. 이에 저자는 현재 慢性 骨盤 炎症性 疾患에 활용되는 慢益方의 抗血栓 效능에 대한 실험적 연구를 통하여 抗炎 작용을 객관적으로 규명하고자 血小板 凝集 억제 효과를 비롯한 다양한 血栓 有關 인자들의 변화를 관찰한바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재 료

1) 동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180 ~ 250g의 Sprague-Dawley계(대한실험동물센터, 충청북도 음성) 웅성 백서와 18 ~ 20g의 ICR(International Cancer Research-대한실험동물센터, 충청북도 음성)계 생쥐로, 실험 당일까지 고형 사료(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 배합사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시

간 12시간(07:00-19:00), 조도 150 ~ 300Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용한 慢盆方(*Manbunbang*, 이하 *MBB*로 표기)의 처방구성은 《實用中醫婦科學》<sup>1)</sup>에 準하였으며 약물은 원광대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 한 첩 용량은 다음과 같다.

Table 1. The Prescription of *Manbunbang*(*MBB*)

韓藥名	生藥名	用量(g)
熟地黃	<i>Rhemaniae Radix</i>	5
龜板	<i>Reevesi Geoclemys (Carapax Testucinis)</i>	5
鱉甲	<i>Carapax Amydae</i>	5
牡丹皮	<i>Moutan Cortex Radix</i>	5
菁蒿	<i>Artemisiae Annuae herba</i>	5
丹蔘	<i>Salviae Radix</i>	5
百部根	<i>Stemonaе Radix</i>	5
玄蔘	<i>Scrophulariae Radix</i>	5
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	5
地骨皮	<i>Licii Radicis Cortex</i>	5
野菊花	<i>Chrysanthemum indicum</i>	5
Total		55

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 platelet rich plasma (PRP)는 대전혈액원(Korea)에서 공급 받았고, Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, collagen, epinephrine, dextran, 3.8% sodium citrate, acid citrate dextrous, heparin은 Sigma(U.S.A) 제품을 사용하였고, normal saline은 중외제약(Korea) 제품을, arachidonic acid reagent, epinephrine reagent, ADP reagent, collagen reagent, thrombin reagent

는 Chrono-Log(U.S.A) 제품을, IL Test<sup>TM</sup> PT-Fibrinogen HS와 IL Test<sup>TM</sup> AP TT Lyophilized silica는 Instrumentation Laboratory(U.S.A) 제품을, aspirin은 바이엘(U.S.A) 제품을, CD62P-PE는 BD Pharmigen(U.S.A) 제품을, PAC-1-FITC는 Becton dickinson(U.S.A) 제품을, prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit와 thromboxane B<sub>2</sub> EIA kit는 Cayman chemical(U.S.A) 제품을 사용하였다. 기기는 centrifuge (Beckman Co., U.S.A.), rotary vacuum

evaporator(Büchi 461, Swiss), deep freezer (Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave(Hirayama, Japan), roller Mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), vortex(Vision Co., Korea), platelet aggregation profiler model PAP-4(BIO/DATA Co. U.S.A), High speed centrifuge(Hanil, Korea), FACS Calibur(Becton Dickinson U.S.A), ELISA reader(Molecular devis. U.S.A) 등을 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 약물 추출

MBB 2첩을 약탕기(대용 1800)에 넣고 증류수 1,500ml를 가한 후, 3시간 가열 추출하여, 침전물을 3회 여과(3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1첩당 14.5g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

### 2) *In vitro*

#### (1) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양

정상 Balb/c 생쥐의 폐 조직(1g)을 잘게 분쇄하여 RBC lysis buffer로 적혈구를 제거한 후 cool D-PBS로 3회 세척하여 conical tube(15ml)에 넣고 1,400rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM(containing collagenase A(5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I(0.15mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin  $10^4$ U/ml, streptomycin

10mg/ml, amphotericin B  $25\mu\text{g/ml}$ )를 넣고 37°C CO<sub>2</sub>배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin -0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 1,500rpm에서 5분간 2회 원심 분리하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

#### (2) 세포독성 측정

mLFCs에 MBB extract( $1\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $50\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $200\mu\text{g/ml}$ )를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한 후, 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를  $50\mu\text{l}$ 를 가하고, 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을  $100\mu\text{l/well}$ 로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로  $100\mu\text{l/well}$ 로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군의 상대치로 세포독성을 평가하였다.

#### (3) 血小板凝集(Platelet aggregation) 측정<sup>29)</sup>

12시간 이상 공복을 유지한 지원자의 상박 정맥으로부터 채혈한 혈액을 3.8% 구연산나트륨이 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣었다. 이를 원심분리(900rpm 10분)하여 상등액으로

부터 platelet rich plasma (PRP)를 얻고 잔액을 다시 원심분리(3,000rpm 10분)하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻었다. PRP는 채취 즉시 변화를 막고 얼음이 들어 있는 용기에 방치하였다.

약물의 抗血小板 응집 효과 측정은 platelet aggregation profiler model PAP-4를 사용하였으며, 최종 농도는 ADP 10µM, epinephrine 10µM, collagen 5µg/ml과 arachidonic acid 5mM이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation시킨 PRP 320µl와 MBB 40µl를 넣고 다시 incubation한 후 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid를 각각 40µl를 가하여 5분간 반응시켰다.

실험군은 증류수에 용해시키고 희석하여 사용하였으며, 최종 농도가 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml가 되도록 PRP에 가하고 응집 유도제를 넣기 전까지 37°C에서 3분간 incubation 하였다. 실험의 처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 생리식염수 40µl를 가한 뒤 최대 응집율(%)을 측정하여 채혈 후 시간 경과로 인한 血小板 변질로 나타날 수 있는 실험 오차를 방지하였으며, PRP를 얻은 후 2시간 안에 모든 실험을 진행시켰다. 실험 조작 동안 온도는 37°C로 유지하고 교반 속도는 500-1,500rpm으로 하며 528nm에서 응집도를 측정하였다. Aggregation이 억제되는 정도를 다음 식에 의거하여 transmission maximum reduction percent를 산출하였다.

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

A = 대조군의 maximum aggregation %

B = MBB 투여군의 maximum aggregation %

각각의 농도에서의 aggregation(%)은 mean ± SD로 나타내었고, 시험 약물의 통계적인 유의성은 Student t-test를 통해 검정하였다.

#### (4) GP II b/III a binding assay

GP II b/III a binding assay는 Peter의 실험 방법<sup>30)</sup>을 변형하여 실시하였다. Platelet rich plasma (PRP)는 대전혈액 원으로부터 공급받아 사용하였다. PRP는 tyroid buffer(129mM NaCl, 2.8mM KCl, 8.9mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.8mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 5.6mM glucose, 10mM HEPES, 0.35% BSA, pH 7.4)를 이용하여 농도가 3 x 10<sup>8</sup>platelets/ml 이 되도록 조정하였다. 이를 2 x 10<sup>8</sup>platelets/ml로 희석한 후 collagen(5µg/ml)과 각 농도(1,000, 500, 250µg/ml)의 MBB extract를 더하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 수세하였다. 수세 후 PAC-1(20µg/ml)과 CD62P(10µg/ml)를 더하여 4°C에서 30분간 반응 후 flow cytometry를 이용하여 측정하였다.

#### (5) Thromboxane B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>), Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 측정

혈소판(3 x 10<sup>8</sup>platelets/ml)에 collagen (50µg/ml)과 MBB extract를 각각의 농도(1,000, 500, 250µg/ml)로 혼합하여 37°C에서 3분간 반응 시킨 후 2mM EDTA와 200uM indomethacin을 가하여 반응을 정지시켰다. 2분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>를 thromboxane B<sub>2</sub> EIA kit와 prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit로 측정하였다.

#### 3) In vivo

##### (1) 폐색전(Pulmonary Embolism) 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura의 실험

방법<sup>31)</sup>에 준하여 실시하였다. 실험 동물은 몸무게 약 18-20g 정도의 수컷 ICR계 mouse를 사용하였고, MBB extract 투여군은 20g ICR계 mouse를 기준으로 검액 9.6mg을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 혈전의 유발은 血小板 응집 시약(11.3 $\mu$ g의 collagen과 1.3 $\mu$ g의 epinephrine)을 HBSS 200 $\mu$ l에 함유되도록 조제하였고, ICR계 mouse의 몸무게 20g당 200 $\mu$ l의 용량으로 미정맥에 주사하였다. 실험동물을 실험 전 24시간 절식시킨 후 血小板 凝集 유발 시약의 정맥 주사 2시간 전에 상기한 농도의 MBB extract를 ICR계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 0.1mg/g을 경구 투여하였다. 항혈전 효과는 血小板 凝集 시약의 투여로 인하여 발생하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였으며, 여기서 마비는 20분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

(2) 혈류 속도 측정

10일간 MBB extract를 백서에 경구 투여하고, dextran으로 어혈 병태를 유발한 다음 heparin(1,000units/ml)을 처리한 syringe를 이용하여 채혈하였다. 채혈한 혈액을 acid citrate dextrous(ACD) 용액으로 5배 희석한 다음 직경 2mm 크기의 유리관을 통과하는데 걸리는 시간을 기준으로 혈류 속도를 측정하였다.

(3) Dextran 어혈 병태에 대한 실험<sup>32)</sup>

① 어혈 병태 유발 및 약물 투여

백서 8마리를 1군으로 하여 정상군, 대조군 및 MBB extract 투여군으로 각각 나누었다. 정상군은 생리식염수를 공

급하고, 대조군은 생리식염수를 투여한 지 1시간 후에 dextran 어혈 병태를 유발하였다. MBB extract 투여군은 성인 60kg을 기준으로 하루 2첩을 복용했을 때 백서 무게 200g당 96.6mg으로 산정하였다.

이를 생리식염수 2ml에 용해하여 oral zonde로 실험 하루 전에 1회 경구 투여한 후 절식시키고, 실험하기 1시간 전에 다시 1회 경구 투여한 다음 대조군과 동일한 방법으로 dextran 어혈 병태를 유발하였다.

Dextran 어혈 병태 유발 : Dextran (분자량 21만)을 생리식염수에 넣고 가열하면서 완전히 용해시켜 10%농도의 용액을 만들어 1ml/200g씩 백서의 미정맥에 3분 이내에 전량 주사하고, 4시간 경과 후 심장 천자로 채혈하여 각종 검사를 실시하였다. 정상군 및 대조군은 실험 약물 대신 생리식염수를 투여하여 실험군과 동일한 시각에 각종 지표를 검사하였다.

② 간 기능 검사

실험 종료 후 ether로 마취한 백서에서 심장채혈을 통해 혈액을 취하였다. 혈액을 6500rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 검사기관인 biotoxtech(주) (청원, 충북)에 의뢰하여 측정하였다.

③ 혈소판 수 측정

혈소판 수 측정은 자동혈구계산기(Minos-ST)를 사용하여 측정하였다.

④ Prothrombin time

Prothrombin time은 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

⑤ Activated partial thromboplastin time(APTT)

APTT는 Simplastin Kit를 사용하여

ACL-100으로 측정하였다.

⑥ Fibrinogen 양 측정

Fibrinogen 양은 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

4) 항산화 활성 측정

(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 소거능 측정

150mM DPPH/EtOH 150 $\mu$ l에 MBB extract를 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu$ g/ml 농도로 희석하여 100 $\mu$ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{MBB extract 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

(2) Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 측정

MBB extract 0.2ml에 tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6ml과 7.2mM pyrogallol 0.2ml를 가하여 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 1N HCl 0.1ml로 반응을 정지시켰다. 반응액을 420nm에서 흡광도를 측정하고, buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 활성도를 측정하였다.

$$\text{SOD 유사활성(\%)} = 100 - \frac{\text{MBB extract 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \times 100$$

(3) Superoxide anion radical 소거 활성

Superoxide anion radical 소거능 측정은 xanthine, xanthine oxidase를 이용하여 NBT(nitro blue tetrazolium)를 이용하여 측정하였다. 0.1mM EDTA가 함유된 50mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.5ml과 2mM xanthine 0.2ml과 1mM NBT 0.1 ml이 혼합된 반응액에 MBB extract

를 1,000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu$ g/ml의 농도로 섞은 후 xanthine oxidase 0.2unit/ml을 가하여 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 550nm에서 측정하였으며, 대조군은 증류수를 첨가하여 사용하였다.

$$\text{Superoxide anion radical 소거능(\%)} = \frac{\text{대조군} - \text{MBB extract 투여군}}{\text{대조군}} \times 100$$

5) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계 처리하였으며 정상군과 비교는 + P<0.05 또는 ++ P<0.01, +++ P<0.001 수준으로, 대조군과 비교는 \* P<0.05 또는 \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 수준에서 유의성을 검정하여 나타내었다.

### III. 成 績

1. 세포독성에 미치는 영향

mLFCs에 대한 세포독성을 관찰한 결과, 대조군의 세포생존율이 100 $\pm$ 2.4%인데 비하여, MBB extract 투여군 1, 10, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml의 농도에서는 각각 97.0 $\pm$ 2.8%, 97.1 $\pm$ 8.9%, 93.4 $\pm$ 1.8%, 91.1 $\pm$ 9.1%, 86.2 $\pm$ 9.7%로 나타났다(Fig. 1).

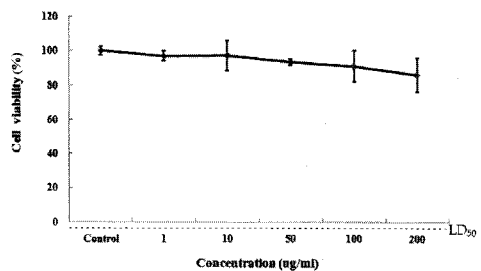


Fig. 1. Cytotoxicity of MBB extract on mouse lung fibroblast Cells(mLFCs) Mouse lung fibroblast Cells(mLFCs) were treated with various concentration of the MBB extract.

2. 血小板 凝集(Platelet Aggregation)에 미치는 영향

1) ADP에 의한 血小板 凝集에 미치는 영향

ADP(10 $\mu$ M)에 의한 血小板 凝集 억제 효과를 관찰한 결과, *MBB* extract 20 mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 91.6 $\pm$ 1.7%, 71.8 $\pm$ 10.1%, 28.4 $\pm$ 11.7%, 17.9 $\pm$ 10.5%, 3.9 $\pm$ 2.9%, 4.2 $\pm$ 6.4%의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

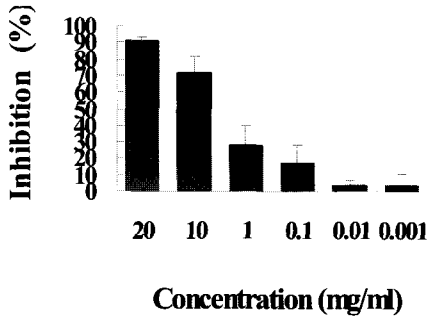


Fig. 2. Effects of *MBB* extract on human platelet aggregation with 10 $\mu$ M of ADP

Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of *MBB* extract at 37 $^{\circ}$ C before stimulation with 10 $\mu$ M of ADP. The results are the mean  $\pm$  SD of four independent experiments.

2) Epinephrine에 의한 血小板 凝集에 미치는 영향

Epinephrine(10 $\mu$ M)에 의한 血小板 凝集 억제 효과를 관찰한 결과, *MBB* extract 20mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 94.7 $\pm$ 3.0%, 78.2 $\pm$ 3.6%, 45.5 $\pm$ 2.7%, 23.2 $\pm$ 2.7%, 15.5 $\pm$ 5.3%, 7.1 $\pm$ 4.9%의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

3) Collagen에 의한 血小板 凝集에 미치는 영향

Collagen(5 $\mu$ g/ml)에 의한 血小板 凝集 반응 억제 효과를 관찰한 결과, *MBB* extract 20mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 90.8 $\pm$ 2.3%, 56.6 $\pm$ 12.9%, 23.2 $\pm$ 7.1%, 14.5 $\pm$ 4.5%, 12.1 $\pm$ 8.0%, 3.7 $\pm$ 3.5%의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 4).

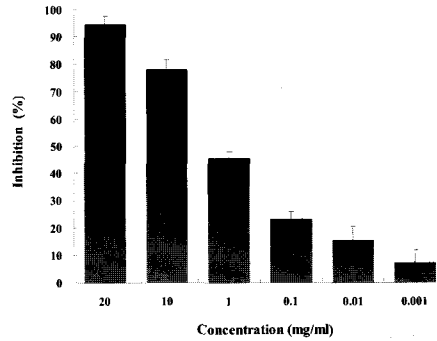


Fig. 3. Effects of *MBB* extract on human platelet aggregation with 10 $\mu$ M of epinephrine

Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of *MBB* extract at 37 $^{\circ}$ C before stimulation with 10 $\mu$ M of epinephrine. The results are the mean  $\pm$  SD of four independent experiments.

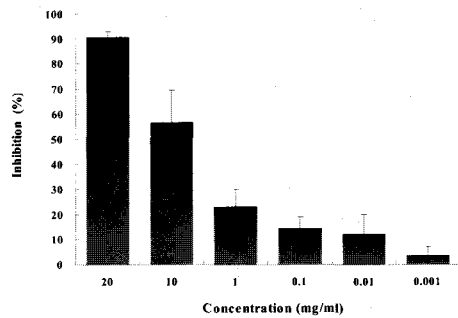


Fig. 4. Effects of *MBB* extract on human platelet aggregation with 5 $\mu$ g/ml of collagen

Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of *MBB* extract at 37 $^{\circ}$ C before stimulation with 10 $\mu$ M of collagen. The results are the mean  $\pm$  SD of four independent experiments.



4) Arachidonic acid에 의한 血小板凝集에 미치는 영향

Arachidonic acid(5mM)에 의한 血小板凝集 억제 효과를 관찰한 결과, MBB extract 20mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 93.7±2.6%, 86.8±5.0%, 86.1±3.2%, 70.3±4.6%, 45.3±9.5%, 32.9±10.3%의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 5).

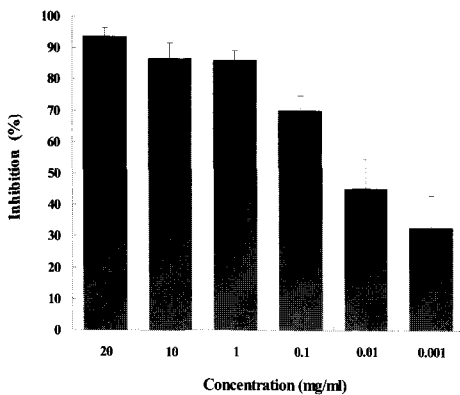


Fig. 5. Effects of MBB extract on human platelet aggregation with 5mM of arachidonic acid  
Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of MBB extract at 37°C before stimulation with 10µM of arachidonic acid. The results are the mean ± SD of four independent experiments.

5) E<sub>max</sub>와 EC<sub>50</sub>값

凝集 유도체로 ADP를 사용한 경우

E<sub>max</sub>는 121.7%, EC<sub>50</sub>은 4.70mg/ml로 나타났으며, epinephrine는 E<sub>max</sub>가 99.3%, EC<sub>50</sub>은 0.72mg/ml, collagen의 경우는 E<sub>max</sub>가 493.4%, EC<sub>50</sub>은 9.90mg/ml, arachidonic acid는 E<sub>max</sub>가 101.8%, EC<sub>50</sub>은 0.02mg/ml로 나타났다(Table 2).

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by E<sub>max</sub> Model in Win Nolin Program

Inducer	Parameter	
	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (mg/ml)
ADP	121.7	4.70
Epinephrine	99.3	0.72
Collagen	493.4	9.90
Arachidonic acid	101.8	0.02

3. 血小板에서의 GP II b/III a 발현에 미치는 영향

형광 유세포 분석을 통해 collagen에 의해 유발된 혈소판 응집에서 GP II b/III a 발현을 측정된 결과, 정상군은 3.4%로 나타난 반면, 대조군에서는 91.0% 나타나 凝集 정도가 현저하게 증가하였으며, MBB extract의 농도가 250µg/ml에서는 72.7%, 500µg/ml 농도에서는 63.1%, 1000µg/ml 농도에서는 45.3%로 나타나 농도 의존적으로 발현이 감소하였다(Fig. 6).

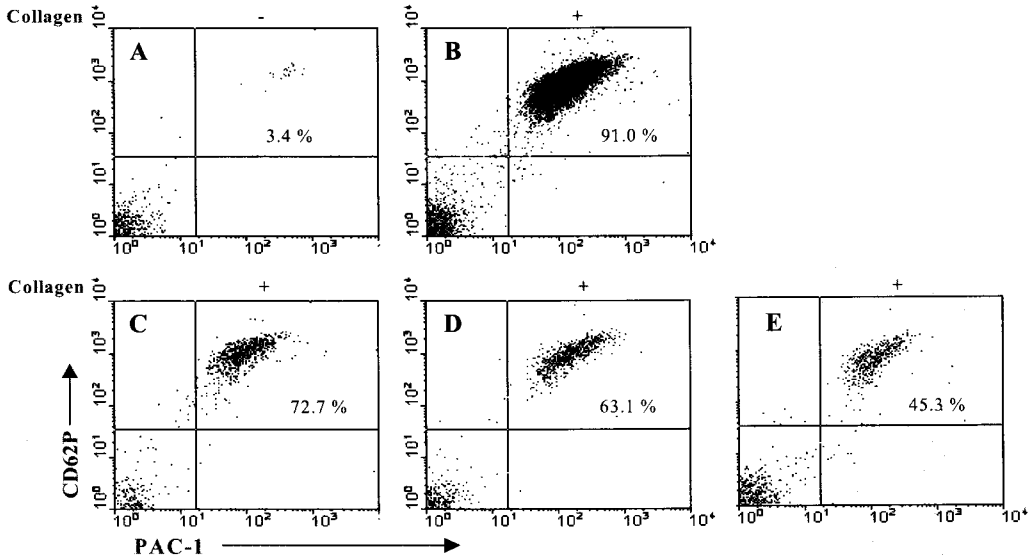


Fig. 6. Effects of *MBB* extract on binding of fibrinogen to platelet GP II b/III a  
 The inhibitory effect of *MBB* extract on binding of fibrinogen to platelet GP II b/III a in collagen stimulated platelets was examined by flow cytometric analysis. Platelets were prepared and adjusted to  $2 \times 10^8$  platelets/ml with modified tyroid buffer (pH 7.4). The fluorescence signal was measured 10min after collagen ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), PAC-1 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) and CD62P ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) were added. The point show the fluorescence signal of collagen -activated platelets in the presence of various concentration of *MBB* extract.

- A : Normal : Platelet
- B : Control : Platelet and collagen.
- C : Platelet and collagen and *MBB* extract  $250 \mu\text{g/ml}$
- D : Platelet and collagen and *MBB* extract  $500 \mu\text{g/ml}$
- E : Platelet and collagen and *MBB* extract  $1000 \mu\text{g/ml}$

4. Thromboxane B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>) 생성 저해능에 미치는 영향

*MBB* extract에 의한 TXB<sub>2</sub>의 생성 저해능을 측정 한 결과, 대조군에서는  $0.347 \pm 0.002$ (OD)으로 나타나 정상군의  $0.177 \pm 0.003$ (OD)에 비하여 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ) 증가하였으며, *MBB* extract  $250 \mu\text{g/ml}$  농도에서는  $0.176 \pm 0.005$ (OD), *MBB* extract  $500 \mu\text{g/ml}$  농도에서는  $0.174 \pm 0.001$ (OD), *MBB* extract  $1000 \mu\text{g/ml}$  농도에서는  $0.169 \pm 0.001$ (OD)로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 7).

5. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성 저해능에 미치는 영향

*MBB* extract에 의한 PGE<sub>2</sub>의 생성 저해능을 측정 한 결과, 대조군에서는  $0.363 \pm 0.012$ (OD)으로 나타나 정상군의  $0.173 \pm 0.001$ (OD)에 비하여 현저하게 증가하였으며, *MBB* extract  $250 \mu\text{g/ml}$  농도에서는  $0.285 \pm 0.008$ (OD), *MBB* extract  $500 \mu\text{g/ml}$  농도에서는  $0.283 \pm 0.003$ (OD), *MBB* extract  $1000 \mu\text{g/ml}$  농도에서는  $0.236 \pm 0.003$ (OD)로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있는 ( $P < 0.01, P < 0.01, P < 0.001$ ) 감소를 나타내었다(Fig. 8).

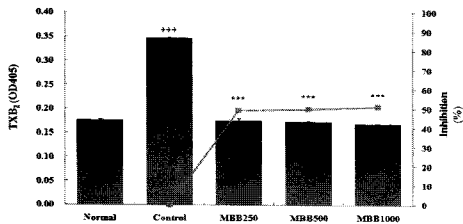


Fig. 7. Effects of *MBB* extract on thromboxane B<sub>2</sub> formation in collagen stimulated platelets

Various concentrations of *MBB* extract were pre-incubated with platelets(3 x 10<sup>8</sup>platelets/ml) at 37°C for 3mins, followed by addition of collagen(50µg/ml). After 6mins the thromboxane B<sub>2</sub> formation was determined by 2mM EDTA and 200uM indomethacin.

Normal : Platelet

Control : Platelet and collagen

*MBB* 250 : Platelet and collagen and *MBB* extract 250µg/ml

*MBB* 500 : Platelet and collagen and *MBB* extract 500µg/ml

*MBB* 1000 : Platelet and collagen and *MBB* extract 1000µg/ml

The results are the mean ± SD.

+++ : P <0.001 compared with normal group

\*\*\* : P <0.001 compared with control group

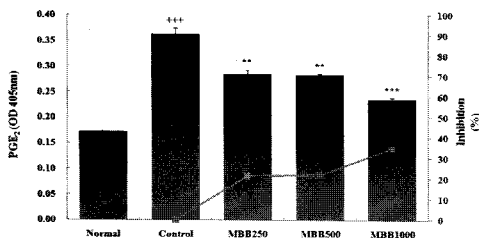


Fig. 8. Effects of *MBB* extract on prostaglandin E<sub>2</sub> formation in collagen stimulated platelets

Various concentrations of *MBB* extract were pre-incubated with platelets(3 x 10<sup>8</sup>platelets/ml) at 37°C for 3mins, followed by addition of collagen(50µg/ml). After 6mins the prostaglandin E<sub>2</sub> formation was determined by 2mM EDTA and 200uM indomethacin.

Normal : Platelet

Control : Platelet and collagen

*MBB* 250 : Platelet and collagen and *MBB* extract 250µg/ml

*MBB* 500 : Platelet and collagen and *MBB* extract 500µg/ml

*MBB* 1000 : Platelet and collagen and *MBB* extract 1000µg/ml

The results are the mean ± SD.

+++ : P <0.001 compared with normal group.

\*\* : P <0.01.

\*\*\* : P <0.001 compared with control group.

## 6. 폐색전(Pulmonary Embolism)에 대한 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8마리 중 8마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되었다. 이에 반하여 *MBB* extract 투여군은 8마리 중 5마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 37.5%의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of *MBB* on Pulmonary Embolism Mice

	Dose (mg/mouse)	No. of killed or paralyzed / No. tested	Protection ratio (%)
Control	HBSS*	8/8	0
Aspirin	2	2/8	75.0
<i>MBB</i>	9.6	5/8	37.5

\* HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

Control : Collagen(11.3µg) and epinephrine (1.3µg/200µl/20g) treated group

Aspirin : Collagen(11.3µg) and epinephrine (1.3µg/200µl/20g) treated group after oral administration of aspirin(0.1mg/g)

*MBB* : Collagen(11.3µg) and epinephrine (1.3µg/200µl/20g) treated group after oral administration of *MBB* extract(9.6mg/20g)

Data are means ± SD.

## 7. 어혈 유발에 따른 혈류 속도에 미치는 효과

어혈을 유발시킨 백서에서 혈액을 채취하여 혈류 속도를 측정된 결과, 정상군은 20.1±1.5sec, 대조군은 27.2±1.9sec.

MBB extract 투여군은 22.7±1.2sec로 나타나 대조군에 비하여 시간이 단축되어 혈류 속도가 유의성 있게(P<0.05) 증가하였다(Table 4, Fig. 9).

Table 4. Effect of MBB extract on Enhancement of Blood Flow Rate by Administration in Vivo

Sample	Flow Rate(sec)
Normal	20.1 ± 1.5
Control	27.2 ± 1.9 <sup>+</sup>
MBB	22.7 ± 1.2 <sup>*</sup>

Normal : Oral administration of normal saline

Control : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of normal saline

MBB : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of MBB extract (96.6mg/200g)

Values represent the means ± SD.

+ : P<0.05 compared with normal group

\* : P<0.05 compared with control group

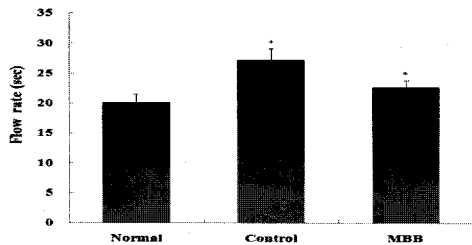


Fig. 9. Effect of MBB extract on Enhancement of Blood Flow Rate by Administration in Vivo

Normal : Oral administration of normal saline

Control : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of normal saline

MBB : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of MBB extract (96.6mg/200g).

Values represent the means ± SD.

+ : P<0.05 compared with normal group

\* : P<0.05 compared with control group

## 8. Dextran 어혈 병태에 미치는 영향

### 1) 간 기능에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표인 GOT는 대조군이 258.2±37.3I.U/L, 정상군이 153.0±31.6 I.U/L으로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는(P<0.05) 증가를 나타냈다. 또한 MBB extract 투여군에서는 167.4±28.9I.U/L로 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 감소를 나타내었다. GPT는 대조군이 90.1±5.1I.U/L, 정상군이 50.2±0.7I.U/L로 나타나 정상군에 대조군에서 유의성 있는(P<0.05) 증가를 나타내었으며 MBB extract 투여군에서는 59.8±6.3I.U/L로 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 감소를 나타내었다(Fig 10, 11).

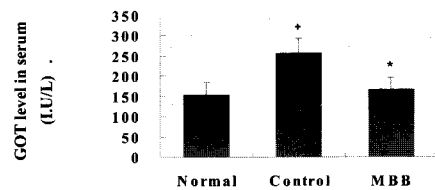


Fig. 10. Effect of MBB extract on the GOT in dextran treated rat

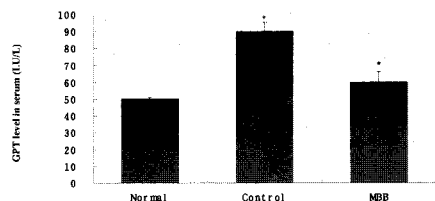


Fig. 11. Effect of MBB extract on the GPT in dextran treated rat

Normal : Oral administration of normal saline  
Control : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of normal saline

MBB : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of MBB extract (96.6mg/200g)

Values represent the means ± SD.

+ : P<0.05 compared with normal group

\* : P<0.05 compared with control group

2) 血小板數에 미치는 영향

血小板數 변화에서는 정상군이 889.0±18.8 (×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)인데 비하여, 대조군은 686 ±5.7(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)으로 정상군에 비하여 유의성 있게(P<0.001) 감소하였고, MBB extract 투여군은 844.6±12.5(×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.001) 증가하였다(Table 5).

Table 5. Effect of MBB extract on Platelet in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Platelet (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
Normal	8	889.0 ± 18.8
Control	8	686.0 ± 5.7 <sup>+++</sup>
MBB	8	844.6 ± 12.5 <sup>***</sup>

Normal : Oral administration of normal saline

Control : Dextran (i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of normal saline

MBB : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of MBB extract (96.6mg/200g )

Data are means ± SD.

+++ : P <0.001 compared with normal group

\*\*\* : P <0.001 compared with control group

3) Prothrombin time(PT)에 미치는 영향

Prothrombin time은 정상군이 10.9±0.7sec에 비하여 대조군은 13.8±0.6sec로 나타나 유의성 있게(P<0.01) 증가하였다. 반면 MBB extract 투여군은 11.6±0.9sec로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.05) 감소하였다(Table 6).

4) Activated partial thromboplastin time(APTT)에 미치는 영향

APTT는 정상군이 30.7±1.3sec로 나타난 반면 대조군은 34.2±1.1sec로 나타난 유의성 있게(P<0.05) 증가하였으며, MBB extract 투여군은 31.3±0.9sec로 나타나

대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 7).

Table 6. Effect of MBB extract on Prothrombin Time in Dextran treated Rat

Group	NO. of animals	Prothrombin time(sec)
Normal	8	10.9 ± 0.7
Control	8	13.8 ± 0.6 <sup>++</sup>
MBB	8	11.6 ± 0.9 <sup>*</sup>

Normal : Oral administration of normal saline

Control : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of normal saline

MBB : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of MBB extract (96.6mg/200g)

Data are means ± SD.

++ : P <0.01 compared with normal group

\* : P <0.05 compared with control group

Table 7. Effect of MBB extract on Activated Partial Thromboplastin Time in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	APTT(sec)
Normal	8	30.7 ± 1.3
Control	8	34.2 ± 1.1 <sup>+</sup>
MBB	8	31.3 ± 0.9

Normal : Oral administration of normal saline

Control : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of normal saline

MBB : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of MBB extract (96.6mg/200g)

Data are means ± SD.

+ : P <0.05 compared with normal group

5) Fibrinogen 양에 미치는 영향

Fibrinogen 양은 정상군이 290.0±18.7mg/ml, 대조군은 224.0±16.2mg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(P<0.05)

감소를 나타낸 반면, *MBB* extract 투여군은  $274.8 \pm 14.3 \text{ mg/ml}$ 으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 ( $P < 0.05$ ) 증가하였다(Table 8).

Table 8. Effect of *MBB* extract on Fibrinogen in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Fibrinogen(mg/ml)
Normal	8	$290.0 \pm 18.7$
Control	8	$224.0 \pm 16.2^+$
<i>MBB</i>	8	$274.8 \pm 14.3^*$

Normal : Oral administration of normal saline

Control : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of normal saline

*MBB* : Dextran(i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of *MBB* extract (96.6mg/200g)

Data are means  $\pm$  SD.

+ :  $P < 0.05$  compared with normal group

\* :  $P < 0.05$  compared with control group

### 9. 항산화 활성에 미치는 영향

#### 1) DPPH 소거능에 미치는 영향

##### (1) *MBB* extract 투여군

DPPH의 소거 활성은 *MBB* extract 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $82.4 \pm 2.4\%$ ,  $80.8 \pm 0.9\%$ ,  $66.7 \pm 9.1\%$ ,  $46.1 \pm 6.0\%$ ,  $23.0 \pm 0.7\%$ 의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 12).

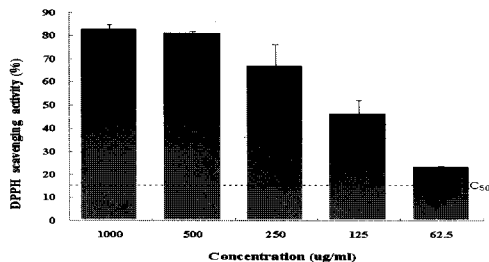


Fig. 12 Scavenging activities of *MBB* extract on DPPH free radical  
*MBB* extract were reacted with DPPH for

30mins at  $37^\circ\text{C}$ , and the absorbance at 517nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean  $\pm$  SD.

#### (2) 구성 약물 투여군

*MBB* 구성 약물의 DPPH 소거 활성에서는 熟地黄, 牡丹皮, 白芍藥, 野菊花 투여군에서 상대적으로 높은 소거 활성을 나타내었다(Table 9, Fig. 13).

#### 2) SOD 유사 활성에 미치는 영향

##### (1) *MBB* extract 투여군

*MBB* extract의 SOD 유사 활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $42.0 \pm 3.5\%$ ,  $25.8 \pm 2.0\%$ ,  $13.7 \pm 4.8\%$ ,  $7.9 \pm 3.7\%$ ,  $0.97 \pm 1.2\%$ 의 유사 활성을 나타내었다(Fig. 14).

Table 9. Scavenging Activities of Compositions of *MBB* on DPPH Free Radical

약물	농도	
	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
熟地黄	$66.4 \pm 1.7$	$68.9 \pm 5.8$
龜板	$30.2 \pm 5.9$	$14.2 \pm 1.7$
鱉甲	0	0
牡丹皮	$75.7 \pm 0.5$	$82.7 \pm 0.5$
菁蒿	$70.1 \pm 4.4$	$39.5 \pm 12.8$
丹蔘	$62.3 \pm 1.5$	$16.8 \pm 4.6$
百部根	$68.1 \pm 3.1$	$13.9 \pm 2.4$
玄蔘	$51.6 \pm 5.5$	$18.1 \pm 6.2$
白芍藥	$75.0 \pm 0.7$	$79.0 \pm 1.1$
地骨皮	$71.5 \pm 7.9$	$45.9 \pm 6.6$
野菊花	$77.3 \pm 4.2$	$72.9 \pm 6.4$

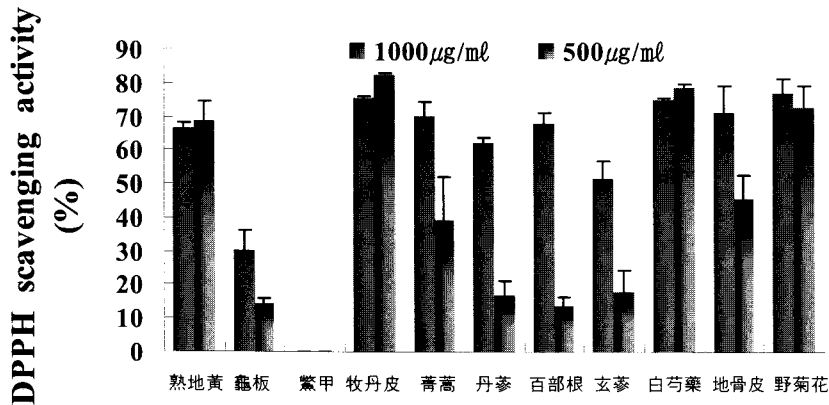


Fig. 13. Scavenging activities of compositions of *MBB* on DPPH free radical. Compositions of *MBB* were reacted with DPPH for 30mins at 37°C, and the absorbance at 517nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean ± SD.

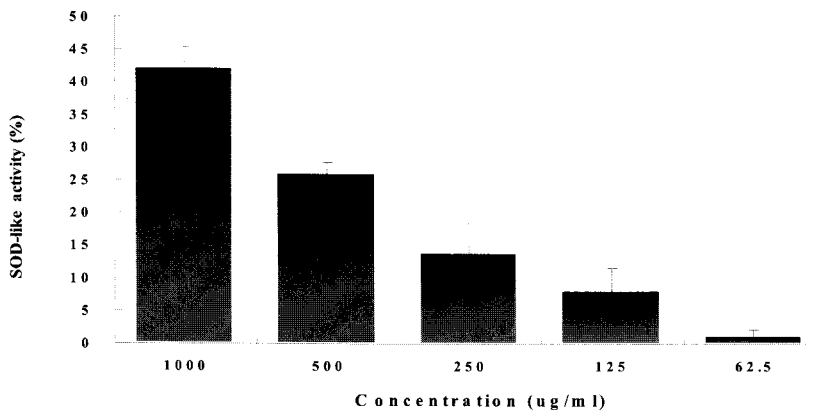


Fig. 14. Effects of *MBB* extract on superoxide dismutase like activity. *MBB* extract were reacted with tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6ml and 7.2mM pyrogallol 0.2ml for 10mins at 25°C, and determined at 420nm after stopping the reaction by adding 0.1ml of 1N HCl. The results are the mean ± SD of three independent experiments.

(2) 구성 약물 투여군

*MBB* 구성 약물의 SOD 유사 활성은 熟地黄, 野菊花 투여군에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다(Table 10, Fig. 15).

3) Superoxide anion 소거능에 미치는 영향

(1) *MBB* extract 투여군

*MBB* extract 투여군의 superoxide anion 소거 활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5µg/ml

농도에서 각각 54.3±6.3%, 46.9±3.9%, 37.5±4.3%, 27.4±0.6%, 13.2±2.9%의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 16).

(2) 구성 약물 투여군

구성 약물의 superoxide anion 소거 활성은 熟地黄, 牡丹皮, 地骨皮, 野菊花 투여군에서 상대적으로 높은 소거 활성을 나타내었다(Table 11, Fig. 17).

Table 10. Effects of Compositions of *MBB* on Superoxide Dismutase like Activity

약물	농도	
	1000 $\mu$ g/ml	500 $\mu$ g/ml
熟地黄	56.4 $\pm$ 0.9	42.9 $\pm$ 1.0
龜板	21.7 $\pm$ 2.2	13.1 $\pm$ 4.1
鱉甲	3.2 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.3
牡丹皮	19.7 $\pm$ 3.3	14.2 $\pm$ 2.5
菁蒿	24.2 $\pm$ 3.3	14.8 $\pm$ 2.3
丹蔘	5.5 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 1.3
百部根	18.7 $\pm$ 3.1	13.5 $\pm$ 1.7
玄蔘	27.9 $\pm$ 1.8	12.9 $\pm$ 1.2
白芍藥	19.9 $\pm$ 1.0	12.6 $\pm$ 3.1
地骨皮	11.0 $\pm$ 0.2	12.4 $\pm$ 0.4
野菊花	50.0 $\pm$ 1.2	32.2 $\pm$ 0.3

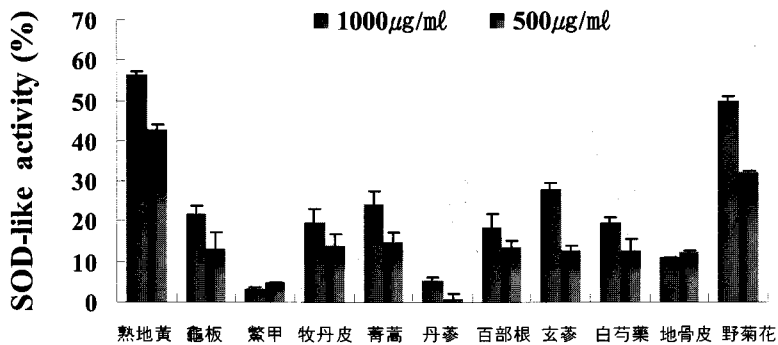


Fig. 15. Effects of compositions of *MBB* on superoxide dismutase like activity. Compositions of *MBB* were reacted with tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6ml and 7.2mM pyrogallol 0.2ml for 10mins at 25°C, and determined at 420nm after stopping the reaction by adding 0.1ml of 1N HCl. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

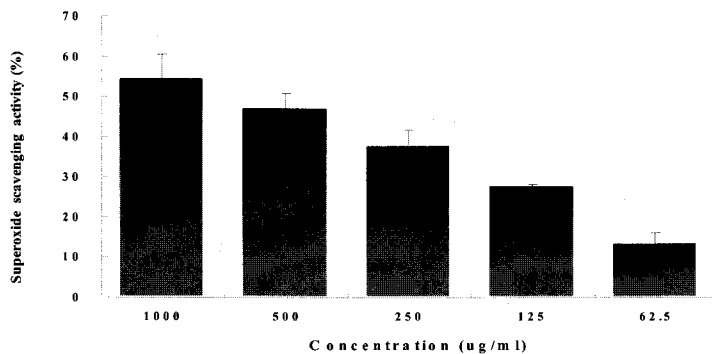


Fig. 16. Scavenging activities of *MBB* on superoxide anion radical. *MBB* extract were reacted with 50mM phosphate buffer(pH 7.8, 0.1mM EDTA) 2.5ml and 2mM xanthine 0.2ml and 1mM NBT(nitro blue tetrazolium) 0.1ml for 15mins with xanthine oxidase 0.2unit/ml, and determined at 550nm. The results are the mean  $\pm$  SD.



Table 11. Scavenging Activities of Compositions of *MBB* on Superoxide Anion Radical

약물	농도	
	1000 $\mu$ g/ml	500 $\mu$ g/ml
熟地黄	46.7 $\pm$ 2.6	27.3 $\pm$ 3.4
龜板	10.6 $\pm$ 2.5	17.9 $\pm$ 4.3
鱉甲	11.9 $\pm$ 4.1	4.4 $\pm$ 3.0
牡丹皮	60.6 $\pm$ 5.7	31.5 $\pm$ 0.7
菁蒿	44.8 $\pm$ 1.6	25.9 $\pm$ 3.5
丹蔘	38.1 $\pm$ 3.2	41.9 $\pm$ 0.3
百部根	26.8 $\pm$ 5.1	45.8 $\pm$ 2.1
玄蔘	18.7 $\pm$ 0.5	27.0 $\pm$ 7.0
白芍藥	28.2 $\pm$ 5.2	9.4 $\pm$ 1.4
地骨皮	40.9 $\pm$ 4.6	26.9 $\pm$ 4.7
野菊花	43.2 $\pm$ 5.8	29.7 $\pm$ 5.9

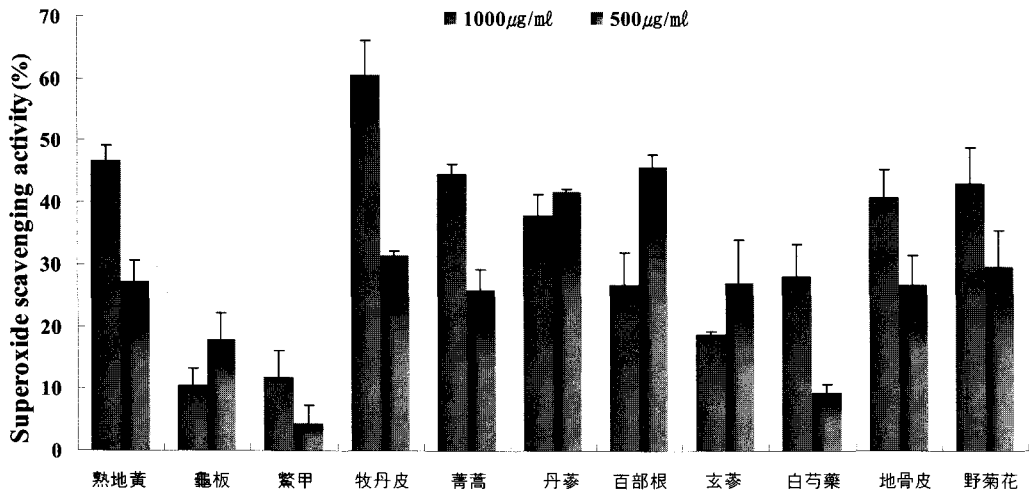


Fig. 17. Scavenging activities of compositions of *MBB* on superoxide anion radical. Compositions of *MBB* were reacted with 50mM phosphate buffer(pH 7.8, 0.1mM EDTA) 2.5ml and 2mM xanthine 0.2ml and 1mM NBT(nitro blue tetrazolium) 0.1ml for 15mins with xanthine oxidase 0.2unit/ml, and determined at 550nm. The results are the mean  $\pm$  SD.

#### IV. 考 察

骨盤 炎症性 疾患(PID)은 대부분 膾 炎이나 頸部炎, 性病의 後유증으로 발생 하며 子宮을 통하여 卵管이나 骨盤內에 까지 炎症이 進行된 상태를 말한다<sup>33)</sup>.

최근에는 性생활의 문란, 子宮內 장치의 사용 등으로 인하여 相當수가 이로 인하여 고통을 받고 있으며, 약 25%에서 卵管이 막혀서 임신이 안 되는 난관 폐색 성 不妊이 초래되고 있다. 또한 適期에 治療가 이루어지지 않는 경우 月經痛,

卵巢 卵管 膿瘍, 子宮外 妊娠, 慢性 骨盤痛, 膀胱炎, 早期閉經 등의 다양한 후유증이 발생한다<sup>34)</sup>.

이에 대한 치료법으로는 항생제 주사나 먹는 항생제 등이 사용되나, 심한 경우 子宮 摘出術이 시행되며 또한 최근 항생제 남용으로 인하여 不應性 혹은 再發性 慢性 骨盤 炎症性 질환이 점차 증가 추세에 있어 의학계의 관심이 되고 있다.

韓醫學에서 骨盤 炎症性 疾患이란 명칭은 없지만 이와 관련하여 《女科經綸》<sup>9)</sup>에서는 “月水行房, 精血相射, 入于任脈, 留于脈中, 以治小腹結病”은 骨盤 炎症性 疾患과 性關係, 任脈 및 瘀血과 有關성을 말하였고, 《婦人良方大全》<sup>10)</sup>에서는 “婦人月經痞塞不通, 或產後餘穢未盡…血得冷則成瘀血也. 血瘀在內 則時時體熱面黃, 瘀久不消, 則爲積聚癥瘕矣”라 하여 月經과 有關된 병리로 瘀血과 炎症의 上관성을 언급하였다.

慢益方은 《實用中醫婦科學》<sup>1)</sup>에 수재된 慢性 盆腔炎 處方으로, 滋陰補血, 清虛熱 효능의 熟地黃, 菁蒿, 涼血除蒸 瀉火 효능의 地骨皮, 滋陰潛陽 軟堅散結 補腎 효능의 龜板, 鱉甲, 清熱涼血 活血散瘀 消癰 효능의 牡丹皮, 丹蔘, 潤肺下氣止咳 효능의 百部根, 涼血平肝 斂陰 효능의 白芍藥, 滋陰清熱 解毒 효능의 玄蔘, 野菊花로 구성되어 慢性 骨盤 炎症性 疾患에 활용된다.

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 응결되어 형성된 병리적 산물이자 속발성 발병 인자로, 陳<sup>13)</sup>은 ‘瘀滯內結之血’, ‘離經之血’, ‘污穢之血’ 등의 병리적 실체로 정리한 바가 있다. 현대에 이르러서는 병리 및 증상면에서 血栓과 가장

유사한 개념으로 인식<sup>12-15,18)</sup>되고 있어, 抗瘀血劑의 효능 평가에 있어 일반적인 실험 모델로 血栓症의 有關 인자 및 동물 모델이 응용되고 있다. 즉 血栓에서의 혈액 성분의 변화, 結締 조직의 增殖과 變性으로 인한 혈액 순환 장애 등의 병리적 변화 등이 瘀血과 동일 혹은 유사 개념으로 해석되고 있음을 시사한다. 그러나 전반적으로 充血에 의한 혈관 외부에서의 혈액 응고인 血腫(hematoma) 등과 구분된다는 점에서 瘀血이 보다 포괄적인 개념을 가지고 있다.

아울러 炎症에서 나타나는 조직의 變性和 壞死가 血瘀症과 유사하여 炎症과 瘀血과의 有關성 역시 끊임없이 연구되고 있어 홍 등<sup>19-21)</sup>은 活血祛瘀 약물이나 처방이 炎症과 血栓에 효과적이라는 실험적 연구를 보고한 바가 있으며, 한 등<sup>22-25)</sup>은 부인과 炎症에 사용되는 다양한 活血化瘀加味方이 抗血栓 효과가 있음을 보고한 바가 있다. 또한 현대의학에서도 血栓과 炎症의 병리적 단계에서 일정 부분에 있어 생화학적으로 동일한 기전이 작용한다는 연구가 보고<sup>26-28)</sup>된 바가 있다.

그러나 최근 한의학계에서 보고된 실험 연구 대부분은 活血化瘀, 清熱解毒 약물로 구성된 攻法 처방을 위주로 검색되었으며, 본 만분방과 같이 滋陰補血과 活血軟堅의 攻補兼法의 치료 처방에 관한 연구는 미진한 편이었다.

구성 약물 중 본 실험과 有關한 실험 보고로는 조 등<sup>35,36)</sup>은 熟地黃의, 부<sup>37)</sup>는 牡丹皮의, 정<sup>38)</sup>과 최<sup>39)</sup>는 白芍藥에 대한 抗酸化 효과를 보고한 바가 있고, 양<sup>40)</sup>과 이<sup>41)</sup>는 단삼의 항혈전 및 항산화 효과를 각각 보고한 바 있어 본 만분방도

유의한 항혈전 효과가 있을 것으로 사료되었다.

따라서 본 논문에서는 기존 연구 결과에 준하여 만성 골반 염증성疾患에 활용되는 慢益方의 抗血栓 효능에 대한 실험적 연구를 통하여 抗炎 작용을 객관적으로 규명하고자 하였다.

먼저 in vitro에서는 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의한 血小板凝集 억제 효과, GP IIb/IIIa 발현 억제 효과, TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 생성 저해능에 대한 실험을 수행하였고, in vivo에서는 肺塞栓 유발 억제 효과 및 dextran 瘀血病態 모형에서의 유관 인자 변화를 관찰하였으며, 마지막으로 酸化的 損傷에 대한 抗酸化 효능에 대한 실험을 수행하였다.

血小板은 생체 방어에 있어서 止血을 담당하는 중요한 혈액 성분의 하나이며, 虛血性 疾患의 요인이 되는 血栓 형성의 성분이기도 하다. 이는 화학물질, 단백질, 물리적 자극 등 여러 가지 자극에 대해 민감하게 반응하여 粘着, 凝集 반응을 일으키며, 血小板 자신도 활성화된 후에 스스로 많은 종류의 활성화 물질을 방출시켜 반응을 증폭시키는 것으로 알려져 있다<sup>42-44</sup>). 체내에서는 항상성 유지를 위하여 활성화 반응에 대해서 血管內皮細胞를 중심으로 억제 기구가 작용하여 病的 血栓 형성을 억제하고 있다. 따라서 血小板 활성화의 예방과 억제는 임상 의학상의 중요한 역할을 담당하고 있어, 血小板 활성화 억제 기구를 밝혀냄으로써 새로운 약물 개발을 가능하게 하고 있다<sup>45,46</sup>).

血小板은 표면에 당단백질로 덮여 있으며, 血管內皮細胞는 음성 전하를 띠

고 있어 정상적인 혈관 내에서는 血小板과 血管內皮細胞는 결합하지 않는다. 그러나 혈관벽이 손상되면 血管內皮細胞下組織의 collagen이 노출되고, 혈액중의 von willenbrand factor (vWF)와 血小板이 血小板膜蛋白質인 GPIb 수용체를 매개로 하여 血管內皮細胞下組織에 粘着하여 凝集이 일어나는데 이를 1차 血栓(血小板 혈전)이라고 한다<sup>45-48</sup>). 粘着한 血小板은 자극 전달 기구에 의해 활성화되면 원반형의 血小板이 긴 촉수를 늘어뜨리게 되며, 활성화된 血小板에서는 開放小器官係를 통해 Ca<sup>2+</sup>의 유입과 저장 Ca<sup>2+</sup>의 방출이 일어나 세포내 Ca<sup>2+</sup>가 상승한다. 그 결과 脫顆粒이 일어나 ADP, serotonin 등의 고밀도 과립이 방출되며 세포 내 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)가 활성화 되어 TXA<sub>2</sub>가 방출되게 된다<sup>45-48</sup>). 따라서 최초로 활성화된 血小板의 주변 血小板도 2차적으로 활성화되어 血小板 표면에 血小板 당단백질인 GPIIb/IIIa 수용체가 발현되며, GPIIb/IIIa 수용체는 vWF나 fibrinogen과 결합하여 血小板의 凝集을 촉진 시킨다<sup>49-51</sup>).

1차 血栓上에서 혈액 응고 인자가 활성화되면 fibrin섬유가 형성되고 fibrin纖維網이 1차 血栓을 덮어 血栓을 강화하는 2차 血栓(fibrin 血栓)을 형성한다. 혈류가 빠른 동맥 내에서는 1차 血栓이 형성되기 쉽고, 혈류 속도가 느린 정맥 내에서는 2차 血栓이 형성되기 쉽다. 결과적으로 이렇게 血小板의 凝集이 항진되면 혈액의 점도가 높아져서 혈액순환 장애를 일으킨다.

따라서 血小板 凝集의 항진에 대한 저해 활성화는 血栓症의 치료에 중요한 역할을 담당한다고 할 수 있다. 따라서 본 실

험에서는 먼저 in vitro에서 사람의 혈액에서 얻은 PRP에 혈액 응고 인자인 ADP, epinephrine, collagen 그리고 arachidonic acid를 가하여 血小板 凝集에 대한 저해 활성을 측정하였다.

MBB extract 투여군은 血栓 유도제인 네 종류에 대하여 모두 농도 의존적으로 저해 활성을 나타냈으며, EC<sub>50</sub>값은 arachidonic acid에서 0.02mg/ml, collagen에서 9.90mg/ml, ADP에서 4.70mg/ml 그리고 epinephrine에서 0.70mg/ml로 나타내었고(Table 2, Fig. 2-5), 특히 arachidonic acid에 대하여 낮은 EC<sub>50</sub>값을 나타내었다. 전체적으로 ADP, epinephrine에 대한 기존 실험 결과<sup>52-55)</sup>와 비슷하거나 상대적으로 높은 수치를 나타내었다. 이는 기존의 연구가 대부분 活血化癥 중심의 攻法 처방이라는 점에 기인한 것으로 보인다. Collagen과 arachidonic acid 유도에 의한 한방 처방의 抗凝固 작용은 보고된 바가 없어 상호 비교가 어렵지만, 농도 의존적이라는 점에서 MBB extract의 抗血小板 효능은 인정된다.

전신을 순환하고 있는 血小板은 血管 內皮 손상이나 혈류 장애 등에 의해 활성화되어 형태 변화와 세포내 과립을 방출함으로써 응집에 이르도록 한다. 血小板의 P-selectin(CD62P)과 GPIIb/IIIa 수용체에 존재하는 fibrinogen부위나 Annexin V는 정상 血小板에서는 나타나지 않으나, 血小板이 활성화되면 血小板 표면에 발현한다<sup>56)</sup>. 또한 血小板 P-selectin(CD62P)는 血小板의 a과립막상에 존재하는 당단백으로 血小板의 활성화에 의해 fibrinogen 등의 과립과 더불어 발현함으로써<sup>49-51)</sup>, 이들은 血小板의 활성화도 측정에 매우 용의한 인자로 볼 수 있다.

GPIIb/IIIa수용체는 血小板 막에 존재하는 당단백으로 血小板의 沈着이나 凝集 작용을 촉진 한다<sup>49-51)</sup>. 이 때 수용체 내측에 존재하는 fibrinogen수용체가 表出해서 그곳에 혈장 성분이나 혈액 내 fibrinogen과 결합됨으로써 血小板 凝集塊가 형성된다. 따라서 GPIIb/IIIa수용체는 fibrinogen수용체를 인식하는 항체인 PAC-1에 의해 검출할 수가 있다<sup>57)</sup>. Kawasaki 등<sup>58)</sup>은 본 실험과 동일한 collagen 자극에 의한 血小板 凝集 실험에서 토양 세균주가 생산하는 천연화합물이 GPIIb/IIIa수용체와 fibrinogen의 결합 저해 작용을 통해 血小板 凝集을 강하게 억제함을 보고한 바가 있다.

본 실험에서는 collagen에 활성화된 血小板에서 GPIIb/IIIa수용체 발현을 FACS를 통하여 GPIIb/IIIa binding assay로 검색하였는데, MBB extract 투여군에서는 농도 의존적으로 억제 활성을 나타내었다(Fig. 6). 이는 MBB extract가 GPIIb/IIIa수용체의 발현 또는 GPIIb/IIIa수용체와 fibrinogen의 결합을 저해함으로써 血小板 凝集을 억제함을 실험적으로 증명한 결과라 하겠다.

Thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)는 血小板에서 thromboxane 합성 효소에 의해 생성되어 血小板 응집, 혈관 평활근 수축 등을 통해 혈관이 손상되었을 때 지혈작용을 한다<sup>54-56)</sup>. Thromboxane 합성 효소의 활성이 높은 조직은 血小板, 마크로파지, 폐, 간 등이 있으며, 그 밖의 조직에서도 낮은 수치의 효소가 존재한다. 血小板에서는 arachidonic acid에 의해 血小板 응집 촉진 작용이 있는 TXA<sub>2</sub>를 생성한다. TXA<sub>2</sub>는 血小板 내의 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시켜 血小板을 수축시키거나 ADP

와 serotonin을 방출시켜 血小板을 凝集시킨다. 또한 血小板 내의  $Ca^{2+}$  농도가 증가하여  $PLA_2$ 가 활성화되며 arachidonic acid에 의해  $TXA_2$ 의 합성을 촉진한다. 아울러  $TXA_2$ 는 血小板에서 막의 arachidonic acid로부터  $PGH_2$ 를 경유해서 thromboxane synthetase에 의해 생성되는데<sup>59-61</sup>, 본 실험에서는  $TXA_2$ 의 반감기가 매우 짧기 때문에  $TXA_2$ 의 안정된 분해 산물인  $TXB_2$ 의 농도를 측정하여 *MBB*가  $TXB_2$ 의 생성을 농도 의존적으로 저해하여 (Fig. 7) in vitro에서 나타난 결과와 부합되었다.

Prostaglandin  $E_2$ ( $PGE_2$ )는 통상적으로 세포 내에 저장되어 있지 않고 세포의 필요에 따라 합성되고 방출되어 혈관 및 기관지 확장, 발열, 통증 및 염증 등의 다양한 증상에 작용을 하며 생체 항상성 유지에 관여하는 중요한 생리 활성 물질이다. 이는 세포가 생리적 병리적인 자극에 의해 생체막 인지질로부터 arachidonic acid를 생성하게 되며, arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX)에 의해  $PGE_2$ 의 중간체인  $PGH_2$ 로 변환된다. 그리고  $PGH_2$ 가  $PGE_2$  합성효소인 PGES에 의해  $PGE_2$ 로 변환되어 생성된다<sup>62-64</sup>.

또한 cyclooxygenase(COX) 생성물은 prostaglandin  $E_2$ ( $PGE_2$ )와 thromboxane  $B_2$ ( $TXB_2$ )를 만들며, 활성화된 혈소판은 arachidonic acid(AA)의 기전에 의하여 COX와 TXS에서  $PGE_2$ 와  $TXB_2$  같은 대사산물이 증가하게 된다<sup>65</sup>.

따라서 본 연구에서는  $TXB_2$  결과에 준하여 arachidonic acid(AA)의 연속 반응의 대사산물인  $PGE_2$ 에 대한 억제능을 관찰하였는데,  $PGE_2$  형성에 대해 *MBB* extract 투여군에서는 대조군에 비하여

농도 의존적인 저해 활성을 나타내어 (Fig.12),  $TXB_2$  결과와 부합되었다. 상기 두 가지 결과는 *MBB* extract가 血栓으로 인한 혈액 성분 변화뿐만 아니라 血栓으로 인한 혈관 염증에도 특이적으로 작용할 수 있음을 보여주고 있다. 肺塞栓은 장시간 같은 자세를 유지하여 하지정맥의 혈류가 정상적이지 않을 때 정맥 내에서 생성되는 혈액의 덩어리가 폐에 운반되어 肺血管을 閉塞하였을 때 일어난다<sup>66</sup>. 항혈전 효능에 대한 동물 실험에서는 이러한 폐색전을 collagen과 epinephrine으로 인위적으로 유발시킴으로써 유용 약물 선정에 자주 사용된다. 따라서 본 연구에서는 첫 번째 in vivo 동물 병태로 급성 폐색전 동물 모델을 통하여 생체내 반응을 검색하였는데, *MBB* extract 투여군에서는 생존율이 37.5%로 나타나 (Table 3), 기존의 결과<sup>52-55</sup>)와 큰 차이가 없었다. 이는 본 처방의 구성 약물이 대부분 淸虛熱, 補陰活血 약물로 구성되어 만성 염증성 질환에 활용되고 있는 까닭에 비교 우위의 효능이 나타나지 않은 것으로 평가된다.

다음으로 Dextran(분자량 21만)을 완전히 용해시켜 백서의 미정맥에 주사하여 급성 혈전증을 유발한 후 혈전 유발 인자를 중심으로 혈액학적 변화를 살펴 보았다.

Collagen, epinephrine, endotoxin과 더불어 dextran은 미세혈류의 변화와 혈류 속도의 감소 그리고 혈액 점도를 증가시켜 血小板의 점착 등을 유발시킴으로써 抗血栓 효과 검증에 응용되고 있다<sup>67</sup>.

먼저 인위적인 dextran 투여와 *MBB* extract 구강 투여로 인한 간독성을 파악하기 위하여 GOT와 GPT를 검색한 결

과, 모두 정상군에 가까운 수치를 나타내어 *MBB extract* 구강 투여로 인한 간독성은 없는 것으로 확인되었다(Fig. 10,11). *In vitro*에서의 mLFCs에 대한 세포독성 결과(Fig. 1) 역시 LD<sub>50</sub> 값이 200 µg/ml 농도를 상회하여 본 시료가 정상 세포에 대하여 독성이 없음을 재차 확인할 수 있었다. 血小板數에서는 대조군에 비하여 *MBB extract*의 투여군에서 증가하여, 血小板凝集이 대조군에 비하여 상대적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Table 5). 아울러 血小板凝集으로 인한 결과와 밀접한 관련이 있는 PT<sup>(68)</sup>는 dextran에 의해 응고된 혈액의 용해속도가 *MBB extract* 투여군이 대조군에 비하여 빠르게 나타남으로써 감소하였으나 APTT<sup>(68)</sup>는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table 6.7). Fig. 9에 나타난 혈류 속도의 유의성 있는(P<0.05) 변화는 이를 증명해주고 있다. 반면에 응고과정 최종 단계의 인자인 fibrinogen양은 대조군에서 그 양이 줄어든 반면 *MBB extract* 투여군에서는 정상군에 가깝게 증가함으로써(Table 8), *MBB extract*가 혈전에 의한 fibrinogen의 소모를 억제함과 동시에 중간 단계에서의 다양한 병리적 혈전 응고 인자에 대하여 유의성 있게 작용하였음을 추측할 수 있다.

체내에 흡입된 산소의 일부는 정상적인 호흡 과정과는 별도로 4 전자 환원과정(4-electron reduction process)을 거쳐 결국은 물이 되는데, 전자를 하나씩 받음으로 인해 각각 활성산소종이라고 하는 superoxide anion radical(O<sub>2</sub>), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(HO)이 된다(Fig. 20). 이러한 라디칼은 모두 반응성이 큰 물질로 체내의 DNA, RNA,

단백질, 지질 등과 반응하여 각종 염증, 암, 생체의 노화 등을 유발시키는 것으로 알려져 있다<sup>(69,70)</sup>.

활성산소에 의해 세포막의 지질이 산화되면 과산화지질이 발생하여 세포의 기능에 장애를 일으킨다. 혈액 중의 인지질이나 콜레스테롤 에스테르가 산화되면 산화 LDL이 증가하게 되며, 증가된 산화 LDL은 血管 內皮細胞에 작용하여 血栓의 원인이 되기도 한다. 血管 內皮細胞에서 생산되는 NO는 혈관 확장 작용뿐만 아니라 血小板凝集을 억제하는 작용을 하는데, 산화 LDL은 이러한 NO의 생산을 저하시킨다<sup>(69-72)</sup>. 이와 관련된 연구로 Renane 등<sup>(73)</sup>은 임상 연구를 통해 적포도주에 포함된 항산화 물질인 폴리페놀류가 ADP 응집과 collagen 응집 억제 작용을 통해 血小板 응집을 억제하는 효과가 있음을 보고한 바가 있다. 이러한 기존의 연구 결과를 바탕으로 본 실험에서는 항산화 효능을 평가하는 가장 기본적인 방법인 DPPH 소거능, SOD 유사 활성, superoxide anion 소거 활성 등을 측정하였다. DPPH 소거 활성 측정은 약물에 들어 있는 여러 가지 항산화 물질에 의한 항산화 능력을 측정하는 방법<sup>(74)</sup>으로, 안정한 라디칼을 이용한 까닭에 간편하고 재현성이 뛰어나 산화적 손상의 기본 실험으로 사용된다.

본 실험에서는 *MBB extract* 투여군에서 농도 의존적으로 DPPH 소거 활성을 나타내었고, 250~125 µg/ml 농도에서 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다(Fig. 12). 구성 약물 중에서는 熟地黃, 牡丹皮, 芍藥, 野菊花 투여군에서 타 약물 투여군에 비하여 상대적으로 높은 소거 활성을 나타내었다(Table 9, Fig. 13).

SOD는 superoxide를  $H_2O_2$ 와  $H_2O$ 로 분해하는 항산화 효소로, SOD 유사 활성 측정은 pyrogallol이 수용액에서 superoxide의 관여에 의해 빠르게 자동 산화되는 것을 이용한 것이다<sup>75)</sup>. 따라서 SOD나 SOD 유사 활성 물질이 존재하는 경우 pyrogallol의 자동 산화가 억제됨으로써 항산화 물질임을 증명하는 것이다.

본 실험에서는 농도 의존적으로 SOD 유사 활성이 증가되었으며(Fig. 14), 熟地黃, 野菊花 투여군에서 상대적으로 높은 활성을 나타냄으로써(Table 10, Fig. 15), DPPH 소거 활성 결과와 부합되었다.

Superoxide anion 생성 저해능은 xanthine과 xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide anion에 의한 nitroblue tetrazolium(NBT)의 감소량을 측정하는 것<sup>76)</sup>으로, MBB extract 투여군에서 superoxide anion의 생성을 농도 의존적으로 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 16). 구성 약물 역시 熟地黃, 牡丹皮, 地骨皮, 野菊花 투여군에서 상대적으로 높은 소거 활성을 나타냄으로써(Table 11, Fig. 17), DPPH 소거능, SOD 유사 활성 결과와 부합되었다.

구성 약물중 熟地黃에 대한 抗酸化 효능은 조<sup>35)</sup>와 이<sup>36)</sup> 등을 통하여 이미 규명된 바가 있고, 부<sup>37)</sup>는 牡丹皮, 정<sup>38)</sup>과 최<sup>39)</sup>는 白芍藥에 대한 抗酸化 효과를 보고한 바가 있어, 본 실험 결과는 이들의 보고와 부합되었다. 단 野菊花의 抗酸化 작용에 대한 실험적 연구는 아직 보고된 바가 없어, 향 후 분획에 대한 심도 있는 연구가 기대된다. 아울러 양 등<sup>40)</sup> 丹蔘의 메탄올층의 抗酸化 및 抗血栓 작용을 보고한 바가 있으나, 본 실험에

서는 상기 약물에 비하여 상대적으로 낮은 항산화 수치를 보였다. 이는 본 실험이 물 추출물로 효능을 평가한 까닭에 분획을 통한 유효 성분 결과와 상호 차이가 나타날 수도 있을 것으로 사료된다. 또한 기존 한의학 논문 중에서 한방 처방을 시료로 血栓과 抗酸化에 대한 유관 관계를 규명한 논문이 없어 본 시료의 抗酸化 효능에 대한 비교 고찰은 할 수 없으나, 세 가지 측정 지표 모두에서 농도 의존적인 효과를 나타냄으로써 본 시료의 抗酸化 효능이 인정되었다.

결과적으로 항산화 작용이 항염증 작용과 밀접한 관련이 있다는 기존의 연구 결과와 다양한 염증성 사이토카인이 tissue factor의 발현을 증가시켜 血栓을 유도하고<sup>26)</sup>, 血栓과 炎症의 병리적 단계에서 생화학적으로 동일한 기전이 작용한다는 보고<sup>26-28)</sup> 등을 종합하여 볼 때 산화적 손상에 대한 본 약물의 효능은 항혈전 작용에 상승적으로 작용하였을 것으로 사료된다. 아울러 본 처방과 구성 약물간의 항산화 효능 비교는 향 후 기초적 자료로 활용될 수 있을 것으로 보이며, 구성 약물 중 野菊花 및 熟地黃의 항산화 효능 검색에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

慢性 骨盤 炎症性 疾患(PID)에 활용되는 慢盆方의 抗血栓 효능의 실험적 연구를 통하여 抗炎 작용을 객관적으로 규명함과 동시에 신규 血栓 및 炎症 치료제 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고, 血栓 유관 인자 변화를 관찰한바 다

음과 같은 결과를 얻었다.

1. 慢盆方은 mLFCs에 대한 세포독성에서 LD<sub>50</sub> 값이 200 $\mu$ g/ml 이상으로 나타났으며, 혈중 GOT, GPT 검사에서도 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다.
2. 慢盆方은 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의한 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하였으며, 이들에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 각각 4.70mg/ml, 0.72mg/ml, 9.90mg/ml, 0.02mg/ml로 나타났다.
3. 慢盆方은 GP II b/III a 발현을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소시켰다.
4. 慢盆方은 TXB<sub>2</sub> 생성을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소시켰다.
5. 慢盆方은 PGE<sub>2</sub> 생성을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소시켰다.
6. 慢盆方은 대조군에 비하여 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 37.5 % 억제하였다.
7. 慢盆方은 dextran 어혈 병태 모델에서 대조군에 비하여 혈전 유발에 따른 혈류 속도를 유의성 있게 증가시켰다.
8. 慢盆方은 dextran 어혈 병태 모델에서 대조군에 비하여 혈소판수, fibrinogen 양은 유의성 있게 증가시킨 반면, PT는 유의성 있게 단축시켰다.
9. 慢盆方은 대조군에 비하여 DPPH, superoxide anion radical에 의한 산화적 손상을 농도 의존적으로 감소시킨 반면, superoxide dismutase 유사 활성은 농도 의존적으로 증가시켰다.
10. 慢盆方은 SD계 백서의 GOT, GPT 수치를 정상 범위로 유지 시켰다.

11. 구성 약물 중 熟地黃, 牡丹皮, 地骨皮, 野菊花 투여군이 타 약물 투여군에 비하여 상대적으로 높은 항산화 효능을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 慢盆方의 抗血栓을 통한 抗炎症 작용이 인정되어 慢性 骨盤炎뿐만 아니라 瘀血과 有關한 다양한 病症에 광범위하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

- 투 고 일 : 2008년 1월 23일
- 심 사 일 : 2008년 1월 28일
- 심사완료일 : 2008년 2월 1일

## 참고문헌

1. 羅元愷. 實用中醫婦科學. 上海科學技術出版社. 1994:255-259.
2. 韓國產婦人科學會 教科書編纂委員會. 婦人科學. 도서출판 칼빈서적. 1997: 256-283.
3. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학(상). 정담출판사. 2002:271-280.
4. 李秀芝. 骨盤炎 1. 2號方 治療 骨盤炎 70例. 山東中醫雜誌. 1993:12(1):21.
5. 朱小南 등. 女科經驗選. 人民衛生出版社. 2006:132-134.
6. 魏睦新 등. 各中醫治療難治性女科病. 2006:291-303.
7. 夏桂成. 中醫臨床婦科學. 人民衛生出版社. 1994:285-293.
8. 牛建昭. 現代中西婦科學. 中國科學技術出版社. 1996:230-260.
9. 齊墳. 女科經綸. 江蘇科學技術出版社. 1986:40.



10. 陳自明. 婦人良方大全. 文光圖書有限公司. 1982;7:34.
11. 上海中醫學院. 婦產科學. 商務印書館. 1976;121-125.
12. 康舞洙. 한의학에서 瘀血에 대한 개념. 대한한의학회지. 1984;5(1):138-140.
13. 陳可冀 등. 實用血瘀證學. 인민위생 출판사. 1999;1-3, 5-8, 15-16.
14. 한방병리학교재편찬위원회 編. 한방 병리학. 한의문화사. 2007;111-117.
15. 易法銀 등. 中醫瘀血證診療大全. 中國中醫藥出版社. 1999;1-11, 664.
16. 張機. 仲景全書. 集文書局. 1972;172-173, 228, 236.
17. 張之南 등. 血瘀證與活血化瘀研究. 上海科學技術出版社. 1990;429-431.
18. 安圭錫 등. 瘀血 病態 모형 개발에 관한 연구. 대한동의병리학회지. 1999; 13(1):25-34.
19. 홍지선. 桃紅飲이 collagen 등으로 유발된 혈전 및 혈액점도에 미치는 영향에 대한 연구. 방제학회지. 1998; 6(1):199-214.
20. 전병훈 등. 실험적 혈전증에 미치는 한약재의 항혈전 효과에 관한 연구. 대한동의병리학회지. 1996;10(1):72-78.
21. 韓忠熙 등. RAW 264.7 세포주와 염증 생쥐모델에서 抗炎症 作用에 대한 清熱活血湯加鷄血藤의 效果. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):92-109.
22. 이혜경. 加味通經湯의 抗血栓. 消炎 및 鎮痛作用에 對한 研究. 大田大學 校 大學院. 2002.
23. 제종민. 稜莪消積湯의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 大田大學 校 大學院. 2007.
24. 임동욱 등. 複方紅藤敗醬散의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):151-174.
25. 이상수 등. 少腹逐瘀湯이 항혈전 및 소염. 진통에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):81-96.
26. Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. Thromb Haemost 2002;88:554-567.
27. Wakefield TW, Henke PK., The role of inflammation in early and late venous thrombosis: Are there clinical implications? Semin Vasc Surg. 2005 ;18(3):118-129.
28. Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. Thromb Haemost. 2005;94(2):362-365.
29. M-K Park et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of indole-3-carbinol *in vivo* and *in vitro*. Phytother Res. 2007.
30. Peter K et al. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein PIIb-IIIa (alphaIIb beta3) inhibitors. Blood 1998;92:3240-3249.
31. Kimura, Y., Tani, T., and Watanabe, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Arzneim. Forsch. Drug Res. 1985; 35(II):1144-149.
32. Fonio, A. On the retraction process in blood plasma coagulation. Acta Haematol. 1966;36(5):371-385.

33. Jeffrey F et al. Clinical predictors of endometritis in women with symptoms and signs of pelvic inflammatory disease. American Journal of Obstetrics and Gynecology. April 2001;184(5):856-864.
34. 황동훈 등. 여성 골반 염증성 질환의 치료에 있어 Cefbuperazone의 임상 효과 1994;37(5):937-945.
35. 조수인. 흰쥐 신장 조직 손상에 대한 熟地黃의 항산화 효과. 大韓本草學會誌 2003;18(4):119-126.
36. 이용범 등. 식이성 고지혈증에 미치는 숙지황의 영향 및 항산화 활성에 관한 연구. 環境研報. 2001;11(1):41-57.
37. 부용출 등. 녹차와 목단피의 항산화 성분. 韓國農化學會誌. 1993;36(5):326-331.
38. 정일윤 등. 백작약 열수 추출물의 산화적 스트레스 억제효과 및 유효 성분 동정 한국식품영양과학회지. 2003;32(5):739-744.
39. 최수임 등. 생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성 검색. 한국생물공학회지. 2003;18(4):282-288.
40. 양선아. 단삼 메탄올 추출물의 항혈전 및 항산화 효과. 한국식품과학회지. 2007;39(1):83-87.
41. 이종화. 단삼이 활성산소로 손상된 배양 심근세포에 미치는 영향. 2003;18(3):21-25.
42. 日本勞動厚生省. 重篤副作用疾患別對應 マニユール - 血栓症 (血栓塞栓症、塞栓症、梗塞) 2006 資料 :2-7.
43. Hechler B, Cattaneo M, Gachet C. The P2 receptors in platelet function. Semin Thromb Hemost. 2005 Apr;31(2):150-161.
44. Packham MA, Mustard JF. Platelet aggregation and adenosine diphosphate /adenosine triphosphate receptors: a historical perspective. Semin Thromb Hemost. 2005 Apr;31(2):129-138.
45. Brown SL et al. Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. J Immunol. 2006 Sep 1;177(5):3242-3249.
46. Doi K et al. Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. Am J Pathol. 2006 May;168(5):1413-1424.
47. Hiroyuki M. Osamu K. Novel physiological roles of low molecular weight HSPs. Folia Pharmacol. Jpn. Nippon Yakurigaku Zasshi 2003;121:21-25.
48. Gouin-Thibault I, Samana M. Laboratory diagnosis of the thrombophilic state in cancer patients. Seminars in thrombosis and hemostasis 1999;25:167-172.
49. Wang WY, Wu YC, Wu CC. Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa activation by 3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. Mol Pharmacol. 2006 Oct;70(4):1380-1389.
50. Liu J et al. Botrocetin/ VWF- induced signaling through GPIIb-IX-V produces TxA2 in an alphaIIb beta3- and

- aggregation-independent manner. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2750-2756.
51. Silk ST, Clejan S, Witkom K. Evidence of GTP-binding protein regulation of phospholipase A2 activity in isolated human platelet membranes. *J Biol Chem*. 1989 Dec 25;264(36):21466-21469.
  52. 이정은. 蒲黃의 항혈전, 진통 및 항균 작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2005.
  53. 이보라. 瑞金散의 항혈전 효과에 관한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2004.
  54. 김의일. 行經紅花湯의 항혈전 효과에 관한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2005.
  55. 김경수. 牛膝散의 항혈전작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2005.
  56. Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Relocation of annexin V to platelet membranes is a phosphorylation-dependent process. *Biochem J*. 1997 Dec 1;328(Pt 2):447-452.
  57. Kasuya N et al. P-selectin expression, but not GPIIb/IIIa activation, is enhanced in the inflammatory stage of Takayasu's arteritis. *Circ J*. 2006 May;70(5):600-604.
  58. Kawasaki T et al. Pharmacological properties of YM-254890, a specific G(alpha)q/11 inhibitor, on thrombosis and neointima formation in mice. *Thromb Haemost*. 2005 Jul;94(1):184-192.
  59. Gruber Ret. The stable analog carbocyclic TXA<sub>2</sub> but not platelet-released TXA<sub>2</sub> induces osteoclast-like cell formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Apr;68(4):267-272.
  60. Zheng YN et al. Effects of compounds in leaves of *Salix matsudana* on arachidonic acid metabolism. *Yakugaku Zasshi*. 2005 Dec;125(12):1005-1008.
  61. Takahashi K et al. Predominant functional roles for thromboxane A<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> during late nephrotoxic serum glomerulonephritis in the rat. *J Clin Invest*. 1990 Jun;85(6):1974-1982.
  62. 中谷良人, 工藤一朗. 프로스타그란딘 합성酵素 日藥理誌 2002;(120):373-378.
  63. Tanioka T et al. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biol Chem* 2000;(275):32775-32782.
  64. Jakobsson PJ et al. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;(96):7220-7225.
  65. Tanikawa N et al. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;(291):884-849.
  66. 김효수. 급성 심근 경색증의 치료의

- 최신 지견. 대한내과학회지 vol.70 no.6  
통권 제550호. 2006;(6):608-616.
67. 김경환 등. 약리학 강의. 醫學文化社.  
1998:781-782.
68. Brangenberg R, Bodensohn M, Bürger  
U. Antithrombin-III substitution in  
preterm infants-effect on intracranial  
hemorrhage and coagulation parameters.  
Biol Neonate. 1997;72(2):76-83.
69. Takizawa S. Free radical production  
in ischemic cerebrovascular dease.  
Nitiroisi 2003;(40):319-321.
70. Vulin AI, Stanley FM. Oxidative  
stress activates the plasminogen  
activator inhibitor type 1 (PAI  
-)promoter through an AP -  
response element and cooperates  
with insulin for additive effects on  
PAI - transcription. J Biol Chem  
2004;279:25172 - 25178.
71. Arnold CS et al. The antithrombotic  
and anti-inflammatory effects of  
BCX-3607, a small molecule tissue  
factor/factor VIIa inhibitor. 2006;  
117(3):343-349.
72. Lytvyn OI et al. Interaction between  
inflammation and thrombosis in  
acute coronary syndrome. 2004 Aug;  
61(8):110-116.
73. Renaud SC et al. Alcohol and platelet  
aggregation : the Caerphilly Pro-  
spective Heart Disease Study. Am J  
Clin Nutr 1992;55:1012 - 1017.
74. Blois ML. Antioxidant determination  
by the use of a stable free radical.  
Nature. 1958;181:1199-1224.
75. Marklund S, Marklund G. Involvement  
of the superoxide anion radical in  
the autodation of pyrogallol and  
convenient assay for superoxide  
dismutase. Eur. J. Biochem. 1974;  
47:469-474.
76. Roe EA, Jones RJ. The NBT test  
in burned patients. Br J Exp  
Pathol. 1979 Apr;60(2):167-170.