

銀甲方加減이 血栓病態有關係因子와 酸化的損傷에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과교실
이수정, 김송백

ABSTRACT

The Effect of *Eungapbang-gagam* on Thrombus Disease Related Factors and Oxidative Stress

Soo-Jeong Lee, Song-Baeg Kim

Dept. of Oriental Obstetrics and Gynecology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose: In this study, we investigated the anti-thrombotic efficacy of "*Eungapbang-gagam*(*EGB*)" currently used in clinical treatment of PID

Methods: We studied inhibitory effect of platelet cohesion, suppressive effect of GPIIb/IIIa activity, inhibitory effect of TXB₂ and PGE₂ biosynthesis, and oxidative damage suppression effects of "*EGB*" *in vitro*. Also, suppression of pulmonary embolism and changes of related factors in dextran coagulation condition model were studied *in vivo*.

Results: In this study, *EGB* extract showed dose-dependent inhibitory effect on platelet coagulation induced by ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid. Also it showed dose-dependent inhibition effect on GPIIb/IIIa activities compared to the control group. *EGB* extract significantly suppressed the decrease of speed of bloodstream caused by blood coagulation in dextran coagulation condition model and increased the number of platelets and amount of fibrinogen, and decreased the APTT in dextran coagulation condition model compared to the control group. *EGB* extract showed dose-dependent decrease of oxidative damages caused by DPPH and superoxide anion radicals, whereas dose-dependent increase of superoxide dismutase like activity was observed compared to the control group.

Conclusion: We confirmed the anti-thrombosis and anti-oxidative efficacy of "*Eungapbang-gagam*". Various clinical applications of "*Eungapbang-gagam*" as well as use of data for the construction of EBM is anticipated.

Key Words: *Eungapbang-gagam*(*EGB*), platelet aggregation, anti-thrombosis, anti-oxidative, Herbal medicine.

“이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.”
“This reserch was supported by Wonkwang University in 2007”

I. 緒 論

瘀血이란 비생리적인 혈액 개념인 血毒과 순환 장애의 병리적 상태까지 포함하는 병리적 산물이다¹⁻³⁾. 瘀血이 혈액학적 분석 지표로 활용되기 시작하면서 혈액 순환 장애, 혈액 성분 변화, 결체 조직의 증식 및 변성 등으로 해석되고 있으며, 血栓과 가장 유사한 개념으로 인식되고 있다^{1-3,6-8)}.

특히 韓醫學에서 瘀血로 인한 脈絡 손상과 출혈은 현대의학에서 혈액 정상·성분의 변화와 혈류 역학적 특성 변화로 인한 혈관 손상, 염증 및 혈액 응고 기전 장애로 이해된다^{1-3,5-8)}. 《靈樞·癰疽篇》⁹⁾의 “營衛稽留于經脈之中 則血泣而不行 不行則衛氣從之而不通 壅遏而不得行 故熱 大熱不止 熱勝則肉腐 肉腐則爲膿…”은 바로 이러한 瘀血과 염증과의 상관관계를 명확하게 기술하고 있다.

韓醫學에서는 염증이라는 병명은 없어도 이로 인한 병증 및 치법은 다양하게 언급되고 있으며, 급성 염증성 증후에 대한 치법으로는 주로 清熱解毒, 祛風利濕, 涼血活血 등의 治法을, 만성 염증성 증후는 補益法을 중심으로 清熱利濕, 解毒, 活血化瘀 등의 治法이 병용된다¹⁰⁾. 특히 濕熱은 급성 염증성 증후를 유발하는 기본 인자가 되는데, 濕熱의 積盛으로 인하여 氣機가 阻滯되면 인체의 혈액 혹은 진액이 粘滯凝聚되면서 瘀血과 痰濁을 유발시키게 된다^{3,10)}. 이로 인하여 조직의 변성과 괴사가 이루어지면 腫脹, 疼痛, 化膿性潰爛, 黃水, 膿血 및 惡臭 등의 염증성 소견이 나타난다. 膀胱炎, 肝炎, 陰炎 및 骨盤腔炎 등 주로 하복부에 나타나는 염증의 主 病機가 濕熱下注와

瘀血이라는 점^{3,10-14)}은 이를 잘 반영하고 있다

銀甲方加減은 《實用中醫婦科學》¹⁵⁾에 收載된 銀甲方에서 紫花地丁과 琥珀을 제외한 임상처방으로, 清熱利濕, 祛瘀散結 효능을 지니고 있어 濕熱壅阻와 瘀血로 인한 慢性骨盤炎에 활용되고 있다. 항혈전 및 항염증에 대한 실험적 연구로 제 등⁶⁻¹⁸⁾이 稜莪消積湯, 複方紅藤敗醬散, 加味生化湯 등으로 수행한 연구가 있으나 현재 임상에서 骨盤炎에 활용되는 銀甲方加減에 대한 실험적 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이제 저자는 銀甲方加減의 항혈전 및 항염증의 효능을 규명하기 위해 먼저 *in vitro*에서는 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제 효과, GPIIb/IIIa 활성화 억제 효과, TXB₂와 PGE₂ 생성 저해능에 대한 실험을 수행하였고, *in vivo*에서는 肺塞栓 유발 억제 효과 및 dextran 瘀血 병태 모형에서의 유관 인자 변화에 대한 실험을 수행하였으며, 마지막으로 염증과 혈전의 공통 병리적 인자인 산화적 손상에 대한 항산화 효능에 대한 실험을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동 물

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 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 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 銀甲方加減(*Eungapbang-gagam*, 이하 *EGB*로 표기)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 한 첩 용량은 다음과 같다.

Table 1. The Prescription of *Eungapbang-gagam*(EGB)

韓藥名	生藥名	用量(g)
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	4
鱉甲	<i>Carapax Amydae</i>	4
蒲黃	<i>Typhae Pollen</i>	4
紅藤	<i>Mucunae Caulis</i>	4
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	4
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	4
蒲公英	<i>Taraxaci Herba</i>	4
椿根皮	<i>Ailanthi Cortex</i>	4
大青葉	<i>Isatidis Folium</i>	4
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	4
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4
Total		44

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약으로 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, heparin는 Sigma(USA) 제품을 사용하였으며, normal saline은 중외제약(Korea)제품을, ADP reagent, epinephrine reagent, collagen reagent, arachidonic acid reagent, thrombin reagent 은 Chrono-Log(USA) 제품을 사용하였으며, IL Test™ PT-Fibrinogen HS와 IL Test™ AP TT Lyophilized silica는 Instrumentation Laboratory(USA) 제품을, aspirin은 바이엘(USA) 제품을 CD62P-PE는 BD Pharmingen(USA) 제품을, PAC-1-FITC는 Becton dickinson(USA) 제품을, prostaglandin E₂ EIA kit와 thromboxane B₂ EIA kit는 Cayman chemical(USA) 제품을 사용하였다.

기기는 centrifuge(Beckman Co., USA), 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. USA), high speed centrifuge(Hanil. Korea), FACS Calibur (Becton Dickinson USA), ELISA reader(MD. USA) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 약물 추출

EGB 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℃

deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1첩당 13 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) *In vitro*

(1) Mouse lung fibroblast cells(mLFCs) 배양

정상 Balb/c 생쥐의 폐조직(1g)을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 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(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15mg/ml, Sigma), antibiotics(penicillinm 10^4 U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B $25\mu\text{g}/\text{ml}$)}를 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 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 EGB(1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 배양하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한 후, 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50 μl 를 가하고, 1 시간 동안 4°C에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB(0.4%/1% acetic

acid) 용액을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 이를 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 용해시켰다. 이 well plate를 plate shaker에서 3.5speed로 5분간 shaking하고, ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 혈소판 응집(Platelet aggregation) 측정^{19,20)}

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 상등액으로부터 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 항혈소판 응집 효과는 platelet aggregation profiler model PAP-4를 사용하였으며, 최종 농도는 arachidonic acid 5mM, collagen 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ADP 10 μM 과 epinephrine 10 μM 이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation시킨 PRP 320 μl 와 EGB 40 μl 를 넣고 다시 incubation한 후 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid를 각각 40 μl 를 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 맞추

기 위해 생리식염수 40 μ l를 가한 뒤 최대 응집률(%)을 측정하여 채혈 후 시간 경과로 인한 혈소판 변질로 나타날 수 있는 실험 오차를 방지하였으며, PRP를 얻은 후 2시간 안에 모든 실험을 진행시켰다. 실험 조작 동안 온도는 37 $^{\circ}$ 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 = EGB 실험군의 maximum aggregation %

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

(4) GPIIb/IIIa binding assay

GPIIb/IIIa binding assay는 Peter의 실험 방법²¹⁾을 변형하여 실시하였다. Platelet rich plasma(PRP)는 대전혈액 원으로부터 공급받아 사용하였다. PRP는 tyroid buffer(129mM NaCl, 2.8mM KCl, 8.9mM NaHCO₃, 0.8mM mgCl₂, 0.8mM KH₂PO₄, 1mM CaCl₂, 5.6mM glucose, 10mM Hepes, 0.35% BSA, pH 7.4)를 이용하여 농도가 3 x 10⁸ platelets/ml 이 되도록 조정하였다. 이를 2 x 10⁸ platelets/ml 로 희석한 후 collagen(5 μ g/ml) 과 각 농도(1,000, 500, 250 μ g/ml)의 EGB를 더하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 수세하였다. 수세 후 PAC-1 (20 μ g/ml)과 CD62P (10 μ g/ml)를 더하여 4 $^{\circ}$ C에서 30

분간 반응 후 flow cytometry를 이용하여 측정하였다.

(5) Thromboxane B₂(TXB₂), Prostaglandin E₂(PGE₂) 측정

Platelets(3 x 10⁸ platelets/ml)에 collagen (50 μ g/ml)과 EGB를 각각의 농도 (1,000, 500, 250 μ g/ml)로 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응 시킨 후 2mM EDTA 과 200uM indomethacin을 가하여 반응을 정지시켰다. 2분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 TXB₂와 PGE₂를 prostaglandin E₂ EIA kit와 thromboxane B₂ EIA kit로 측정하였다.

3) In vivo

(1) 폐색전(Pulmonary thrombosis) 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura의 실험 방법²²⁾에 준하여 실시하였다. 실험 동물은 몸무게 약 18-20g 정도의 수컷 ICR 계 mouse를 사용하였고, EGB extract 투여군은 20g ICR 생쥐를 기준으로 검액 8.6mg 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집 시약(11.3 μ g의 collagen과 1.3 μ g의 epinephrine)을 HBSS 200 μ l에 함유되도록 조제하였고, ICR계 mouse의 몸무게 20g당 200 μ l의 용량으로 미정맥에 주사하였다. 실험 동물을 실험 전 24시간 절식시킨 후 혈소판 응집 유발 시약의 정맥 주사 2시간 전에 상기한 농도의 EGB extract를 ICR계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 0.1mg/g을 경구 투여하였다. 항 혈전 효과는 혈소판 응집 시약의 투여로 인하여 발생하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분

율로 계산하였으며, 여기서 마비는 20분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

(2) 혈류 속도 측정

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

(3) Dextran 어혈 병태에 대한 실험²³⁾

① 어혈 병태 유발 및 약물 투여

백서 8마리를 1군으로 하여 정상군, 대조군 및 EGB extract 투여군으로 각각 나누었다. 정상군은 생리식염수를 공급하고, 대조군은 생리식염수를 투여한 지 1시간 후에 dextran 어혈 병태를 유발하였다. EGB extract 투여군은 성인 60kg을 기준으로 하루 2침을 복용했을 때 rat 무게 200g 당 86.6mg으로 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/200g 씩 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 간기능 검사

실험 종료 후 ether로 마취한 백서에서 심장채혈을 통해 혈액을 취하였다. 혈액을 6500rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 검사기관인 Biotoxthech(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

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

$$\text{DPPH 소거능 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{EGB 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 측정

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

$$\text{SOD 유사활성}(\%) = 100 - \left\{ \left(\frac{\text{EGB 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100 \right\}$$

(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) 2.5 ml과 2mM xanthine 0.2ml과 1mM NBT 0.1ml이 혼합된 반응액에 *EGB*를 1,000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 섞은 후 xanthine oxidase 0.2 unit/ml을 가하여 15분 동안 반응하였다. 반응 후 550nm에서 측정하였다. 대조군은 증류수를 첨가하여 사용하였다.

$$\text{Superoxide anion radical 소거능}(\%) = \left(\frac{\text{대조군} - \text{EGB 투여군}}{\text{대조군}} \right) \times 100$$

5) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계 처리하였으며 $P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$, $P < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 成 績

1. 세포독성에 미치는 영향

mLFCs에 대한 세포독성을 관찰한 결과, 대조군의 세포생존율이 $100 \pm 2.4\%$ 인데 비하여, *EGB* 투여군 1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 각각 97.4 ± 6.5 , 94.1 ± 5.8 , 91.3 ± 4.8 , 86.3 ± 4.5 , $76.4 \pm 4.7\%$ 로 나타났다(Fig. 1).

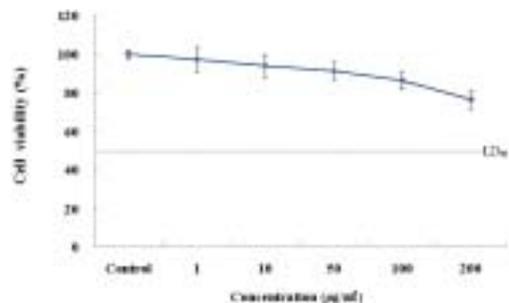


Fig. 1. Cytotoxicity of *EGB* on mouse lung fibroblast Cells(mLFCs). Mouse lung fibroblast Cells(mLFCs) were treated with various concentration of the *EGB* extract.

2. 혈소판 응집(Platelet aggregation)에 미치는 영향

1) ADP에 의한 혈소판 응집 억제 효과
ADP($10\mu\text{M}$)에 의한 혈소판 응집 억제 효과를 검색한 결과, *EGB* extract 20 mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 $92.9 \pm 2.9\%$, $80.8 \pm 1.5\%$, $36.6 \pm 16.4\%$, $18.2 \pm 4.7\%$, $10.5 \pm 4.2\%$, $21.1 \pm 3.2\%$ 의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

2) Epinephrine에 의한 혈소판 응집 억제 효과

Epinephrine($10\mu\text{M}$)에 의한 혈소판 응집 억제 효과를 검색한 결과, *EGB* extract 20mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml,

0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 95.3±3.5%, 86.6±2.0%, 47.1±1.1%, 27.1±3.2%, 21.3±2.4%, 21.6±2.1%의 응집 억제율을 나타내었다 (Fig. 3).

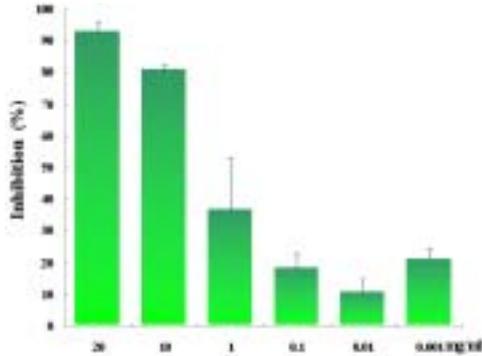


Fig. 2. Effects of *EGB* extract on human platelet aggregation with 10 μM of ADP.

Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of *EGB* at 37°C before stimulation with 10μM of ADP. The results are the mean ± SD of four independent experiments.

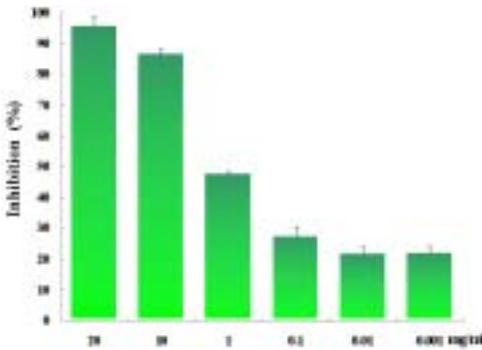


Fig. 3. Effects of *EGB* extract on human platelet aggregation with 10μM of epinephrine.

Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of *EGB* at 37°C before stimulation with 10μM of epinephrine. The results are the mean ± SD of four independent experiments.

3) Collagen에 의한 혈소판 응집 억제 효과

Collagen(5μg/ml)에 의한 혈소판 응집 억제 효과를 검색한 결과, *EGB* extract 20mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 91.6±4.2%, 59.2±7.8%, 22.1±3.1%, 12.9±3.2%, 8.9±0.7%, 7.9±3.7%의 응집 억제율을 나타내었다 (Fig. 4).

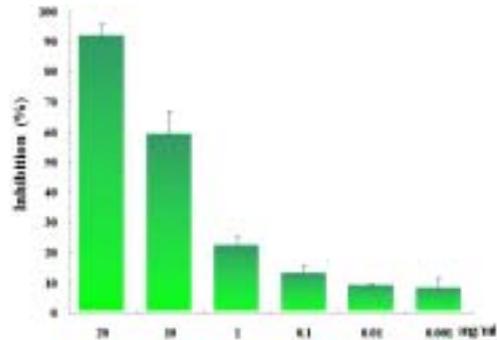


Fig. 4. Effects of *EGB* extract on human platelet aggregation with 5μg/ml of collagen.

Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of *EGB* at 37°C before stimulation with 10μM of collagen. The results are the mean ± SD of four independent experiments.

4) Arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제 효과

Arachidonic acid(5mM)에 의한 혈소판 응집 억제 효과를 검색한 결과, *EGB* extract 20mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도에서 각각 92.4±3.0%, 85.5±4.2%, 73.4±9.8%, 67.6±3.6%, 21.6±7.8%, 44.2±17.2%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 5).

5) E_{max}와 EC₅₀값

응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 E_{max}는 154.3%, EC₅₀은 9.5mg/ml로 나타났다으며, epinephrine는 E_{max}가 134.2%, EC₅₀은 5.8mg/ml, collagen의 경우는 E_{max}

가 191.4%, EC₅₀은 19.2mg/ml, arachidonic acid는 E_{max}가 140.0%, EC₅₀은 6.6mg/ml로 나타났다(Table 2).

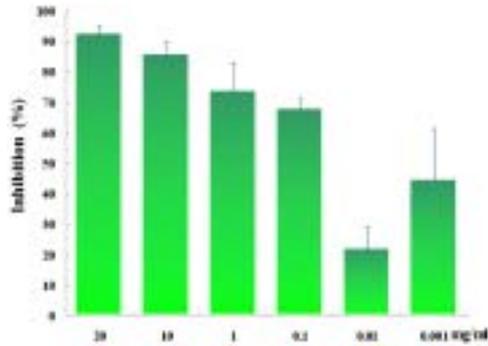


Fig. 5. Effects of *EGB* extract on human platelet aggregation with 5mM of arachidonic acid.

Platelets were pre-incubation for 5mins with various concentrations of *EGB* at 37°C before stimulation with 10µM of arachidonic acid. The results are the mean ± SD of four independent experiments.

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by E_{max} Model in Win Nolin Program

Inducer	parameter	
	E _{max} (%)	EC ₅₀ (mg/ml)
ADP	154.3 ± 80.8	9.5 ± 1.2
Epinephrine	134.2 ± 52.5	5.8 ± 7.2
Collagen	191.4 ± 13.2	19.2 ± 2.4
Arachidonic acid	140.0 ± 48.9	6.6 ± 0.7

3. 혈소판에서의 GPIIb/IIIa 발현에 미치는 영향

형광유세포 분석을 통해 collagen에 의해 유발된 혈소판 응집에서 GPIIb/IIIa 발현율을 측정된 결과, 정상군의 3.4%에 비하여 대조군은 91.0%로 나타나 응집 정도가 현저하게 많았으며, *EGB* 250µg/ml 농도에서는 81.0%, *EGB* 500µg/ml 농도에서는 75.4%, *EGB* 1000µg/ml 농도에서는 59.5%로 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

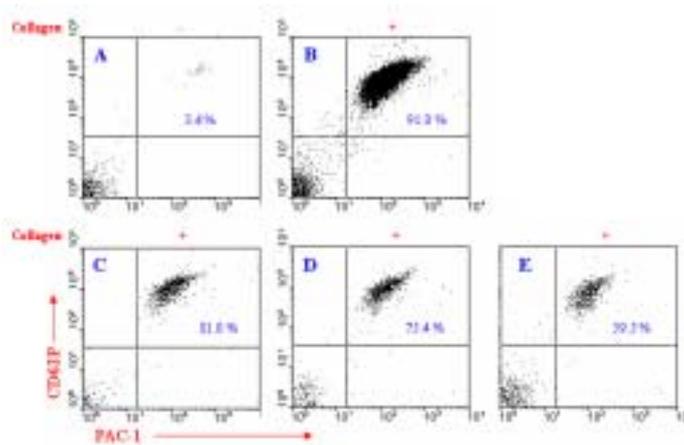


Fig. 6. Effects of *EGB* on binding of fibrinogen to platelet GPIIb/IIIa.

The inhibitory effect of *EGB* on binding of fibrinogen to platelet GPIIb/IIIa in collagen stimulated platelets was examined by flow cytometric analysis. Platelets were prepared and adjusted to 2 x 10⁸platelets/ml with modified tyroid buffer(pH 7.4). The fluorescence signal was measured 10mins after collagen(5µg/ml), PAC-1 (20µg/ml) and CD62P(10µg/ml) were added. The point show the fluorescence signal of collagen-activated platelets in the presence of various concentration of *EGB*. A ; Normal : Platelet. B ; Control : Platelet and collagen. C : Platelet and collagen and *EGB* 250µg/ml, D : Platelet and collagen and *EGB* 500µg/ml, E : Platelet and collagen and *EGB* 1000µg/ml.

4. Thromboxane B₂(TXB₂) 생성에 미치는 영향

*EGB*에 의한 TXB₂의 생성 저해능을 측정된 결과, 대조군에서는 0.347±0.002 (OD)으로 나타나 정상군의 0.177±0.003 (OD)에 비하여 유의성 있게 (+++ : P <0.001) 증가하였으며, *EGB* 250µg/ml 농도에서는 0.177 ± 0.012 (OD), *EGB* 500 µg/ml 농도에서는 0.177 ± 0.001 (OD), *EGB* 1000µg/ml 농도에서는 0.176 ± 0.005 (OD)로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 (*** : P <0.001) 감소하였다. 실선은 *EGB* 투여군의 TXB₂의 생성 저해율을 나타낸 것이다 (Fig. 7).

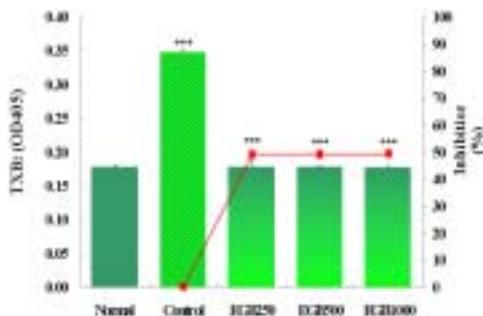


Fig. 7. Effects of *EGB* on thromboxane B₂ formation in collagen stimulated platelets.

Various concentrations of *EGB* were pre-incubated with platelets (3 × 10⁸platelets/ml) at 37°C for 3mins, followed by addition of collagen (50µg/ml). After 6mins the thromboxane B₂ formation was determined by 2mM EDTA and 200uM indomethacin. Normal : Platelet. Control : Platelet and collagen. *EGB* 250 : Platelet and collagen and *EGB* 250µg/ml, *EGB* 500 : Platelet and collagen and *EGB* 500µg/ml, *EGB* 1000 : Platelet and collagen and *EGB* 1000µg/ml. The results are the mean ± SD. +++ : P <0.001 compared with normal group. *** : P <0.001 compared with control group.

5. Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성에 미치는 영향

*EGB*에 의한 PGE₂의 생성 저해능을 측정된 결과, 대조군에서는 0.363±0.012 (OD)으로 나타나 정상군의 0.173±0.001 (OD)에 비하여 유의성 있게 (+++ : P <0.001) 증가하였으며, *EGB* 250µg/ml 농도에서는 0.267±0.004 (OD), *EGB* 500µg/ml 농도에서는 0.212± 0.007 (OD), *EGB* 1000µg/ml 농도에서는 0.201±0.008 (OD)로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있는 (* : P <0.05 ** : P <0.01, *** : P <0.001) 감소를 나타내었다(Fig. 8).

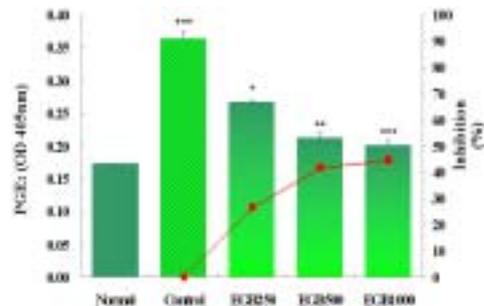


Fig. 8. Effects of *EGB* on prostaglandin E₂ formation in collagen stimulated platelets.

Various concentrations of *EGB* were pre-incubated with platelets(3 × 10⁸ platelets/ml) at 37°C for 3 mins, followed by addition of collagen(50µg/ml). After 6mins the prostaglandin E₂ formation was determined by 2mM EDTA and 200uM indomethacin. Normal : Platelet. Control : Platelet and collagen. *EGB* 250 : Platelet and collagen and *EGB* 250µg/ml, *EGB* 500 : Platelet and collagen and *EGB* 500µg/ml, *EGB* 1000 : Platelet and collagen and *EGB* 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 대

한 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8마리 중 8마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 지속되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되었다. 이에 반하여 EGB extract 투여군은 8마리 중 4마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 50%의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effects of EGB on Pulmonary Embolism Mice

Dose (mg/20g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	Protection rate (%)
Control HBSS *	8/8	0
Aspirin 2	2/8	75.0
EGB 8.6	4/8	50.0

* HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution
 Control : Collagen(11.3 μ g) and epinephrine (1.3 μ g/200 μ l/20g) treated group.
 Aspirin : Collagen(11.3 μ g) and epinephrine (1.3 μ g/200 μ l/20g) treated group after oral administration of aspirin(0.1mg/g).
 EGB : Collagen(11.3 μ g) and epinephrine (1.3 μ g/200 μ l/20g) treated group after oral administration of EGB extract(8.6mg/20 g).
 Data are means \pm SD.

7. 어혈 유발에 따른 혈류 속도에 미치는 효과

어혈을 유발시킨 SD계 백서에서 혈액을 채취하여 혈류 속도를 측정된 결과, 정상군은 20.1 \pm 1.5sec, 대조군은 27.2 \pm 1.9sec, EGB extract 투여군은 20.5 \pm 1.3sec로 나타나 대조군에 비하여 혈류 속도가 유의성 있게(P<0.05) 증가하였다(Table 4, Fig. 9).

Table 4. Effect of EGB on Enhancement of Blood Flow Rate by Administration *in Vivo*

Sample	Flow Rate(sec)
Normal	20.1 \pm 1.5
Control	27.2 \pm 1.9 ⁺
EGB	20.5 \pm 1.3*

Normal : Oral administration of normal saline.

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

EGB : Dextran (i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of EGB extract (86.6mg/200g). Data are means \pm SD.

+ : P <0.05 compared with normal group.

* : P <0.05 compared with control group.

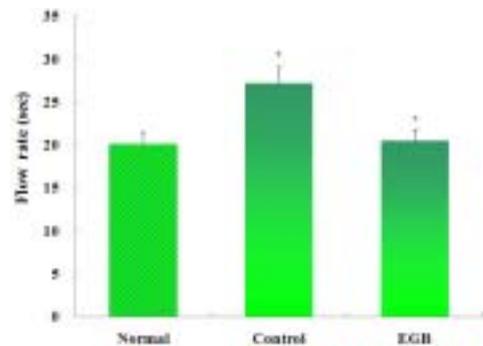


Fig. 9. Enhancement of blood flow rate by administration *in vivo*.

Normal : Oral administration of normal saline. Control : Dextran(i.v. 1ml/200 g) injected group after oral administration of normal saline. EGB : Dextran (i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of EGB extract (86.6mg/200g). Values represent the means \pm 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 \pm 37.3IU/L, 정상군이 153.0 \pm 31.6 IU/L 으로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (+ : p <0.05) 증

가를 나타내었다. 이에 비하여 *EGB* 투여군에서는 173.1±5.5I.U/L로 대조군에 비하여 유의성 있게 (* : p <0.05) 감소하였다. GPT는 대조군이 90.1±5.1I.U/L, 정상군이 50.2±0.7I.U/L로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (+ : p <0.01) 증가를 나타낸 반면, *EGB* 투여군에서는 49.4±2.7I.U/L로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (* : p <0.05) 감소하였다(Fig. 10).

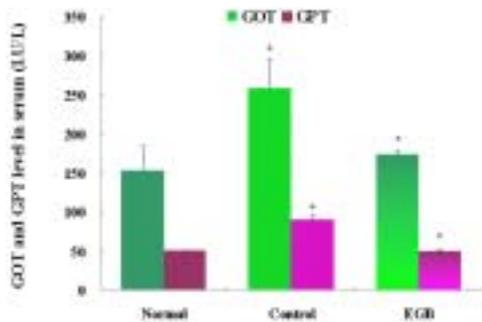


Fig. 10. Effect of *EGB* extract on the GOT and GPT in dextran treated rat. Normal : Oral administration of normal saline. Control : Dextran (i.v. 1ml/200 g) injected group after oral administration of normal saline. *EGB* : Dextran (i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of *EGB* extract (86.6mg/200g). Values represent the means ± SD. + : P <0.05 compared with normal group. * : P <0.05 compared with control group.

2) 혈소판 수에 미치는 영향

혈소판 수 변화에서는 정상군이 889.0±18.8 (×10³/mm³)인데 비하여, 대조군은 686.0±5.7 (×10³/mm³)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있게 (+++ : P<0.001) 감소 하였으나, *EGB* extract 투여군은 867.0±11.0(×10³/mm³)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (***) : P<0.001) 증가하였다(Table 5).

Table 5. Effect of *EGB* on Platelet in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Platelet (×10 ³ /mm ³)
Normal	8	889.0±18.8
Control	8	686.0±5.7 ⁺⁺⁺
<i>EGB</i>	8	867.0±11.0 ^{***}

Normal : Oral administration of normal saline.

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

EGB : Dextran (i.v. 1 ml/200g) injected group after oral administration of of *EGB* extract (86.6 mg/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±0.7sec, 대조군은 13.8±0.6sec로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 (++) : P <0.01) 증가한 반면, *EGB* extract 투여군은 13.7±0.8 sec로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성 은 나타나지 않았다(Table 6).

Table 6. Effect of *EGB* 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 ⁺⁺
<i>EGB</i>	8	13.7±0.8

Normal : Oral administration of normal saline.

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

EGB : Dextran (i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of of *EGB* extract(86.6 mg/200g). Data are means ± SD.

++ : P <0.01 compared with normal group.

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

APTT는 정상군이 30.7±1.3 sec, 대조군은 34.2±1.1 sec로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 (+ : P <0.05) 증가한 반면, EGB extract 투여군은 29.2±1.3 sec로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(* : P<0.05) 감소하였다 (Table 7).

Table 7. Effect of EGB 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 ⁺
EGB	8	29.2 ± 1.3*

Normal : Oral administration of normal saline.
Control : Dextran (i.v. 1ml/200 g) injected group after oral administration of normal saline.
EGB : Dextran (i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of of EGB extract (86.6 mg/200g). Data are means ± SD.
+ : P <0.05 compared with normal group.
* : P <0.05 compared with control group.

5) Fibrinogen 양에 미치는 영향

Fibrinogen 양은 정상군이 290.0±18.7mg/ml, 대조군은 224.0±16.2mg/ml로 나타난 반면 EGB extract 투여군은 286.0±8.6mg/ml으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** : P<0.01) 증가하였다(Table 8).

9. 항산화 활성에 미치는 영향

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

(1) EGB 투여군

DPPH의 소거 활성은 EGB 1000, 500, 250, 125, 62.5µg/ml 농도에서 각각 77.4±0.8,

75.5±1.1, 52.2±0.6, 28.9±1.5, 16.4±1.3%의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 11).

Table 8. Effect of EGB on Fibrinogen Level in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Fibrinogen (mg/ml)
Normal	8	290.0± 18.7
Control	8	224.0 ± 16.2 ⁺
EGB	8	286.0 ± 8.6**

Normal : Oral administration of normal saline.
Control : Dextran (i.v. 1ml/200 g) injected group after oral administration of normal saline.
EGB : Dextran (i.v. 1ml/200g) injected group after oral administration of of EGB extract (86.6 mg/200g). Data are means ± SD.
+ : P <0.05 compared with normal group.
** : P <0.01 compared with control group.

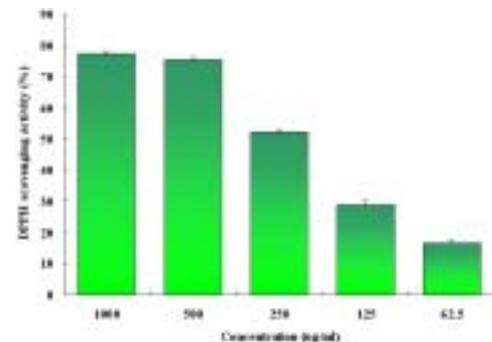


Fig. 11. Scavenging activity of EGB on DPPH free radical.

EGB were reacted with DPPH for 30 mins at 37°C, and the absorbance at 518nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean ± SD.

(2) 구성 약물 투여군

EGB 구성 약물의 DPPH 소거 활성에서는 金銀化, 連翹, 紅藤, 蒲公英, 蒲黃, 大靑葉, 茵陳 투여군에서 상대적으로 높은 소거 활성을 나타내었다(Table 9, Fig. 12).

Table 9. Scavenging Activity of Compositions of *EGB* on DPPH Free Radical

약물	농도	
	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
金銀化	76.0 \pm 1.0	75.7 \pm 0.8
鱉甲	0	0
升麻	49.8 \pm 1.2	63.9 \pm 1.4
連翹	72.0 \pm 0.5	76.4 \pm 0.6
紅藤	76.3 \pm 0.5	80.0 \pm 0.5
蒲公英	69.2 \pm 0.7	72.7 \pm 3.5
蒲黃	75.8 \pm 0.2	54.3 \pm 11.7
椿根皮	41.7 \pm 2.8	9.7 \pm 2.4
大青葉	62.1 \pm 0.7	24.2 \pm 5.4
茵陳	71.5 \pm 2.2	74.9 \pm 1.2
桔梗	11.9 \pm 6.0	0

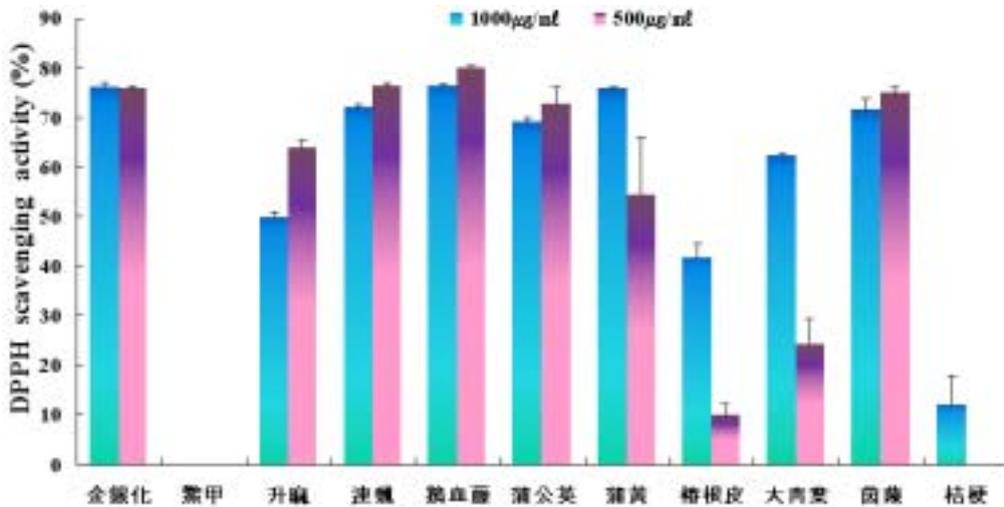


Fig. 12. Scavenging activity of compositions of *EGB* on DPPH free radical. *EGB* were reacted with DPPH for 30mins at 37 $^{\circ}\text{C}$, and the absorbance at 518nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean \pm SD of three independent experiments.

2) SOD 유사 활성에 미치는 영향

(1) *EGB* 투여군

*EGB*의 SOD 유사 활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 63.0 \pm 2.9, 43.3 \pm 4.8, 22.7 \pm 3.7, 10.3 \pm 3.2, 6.9 \pm 3.3%의 유사활성을 나타내었다(Fig. 13).

(2) 구성 약물 투여군

EGB 구성 약물의 SOD 유사 활성은 金銀化, 升麻, 蒲公英, 茵陳 투여군에서 상대적으로 높은 유사 활성을 나타내었다(Table 10, Fig. 14).

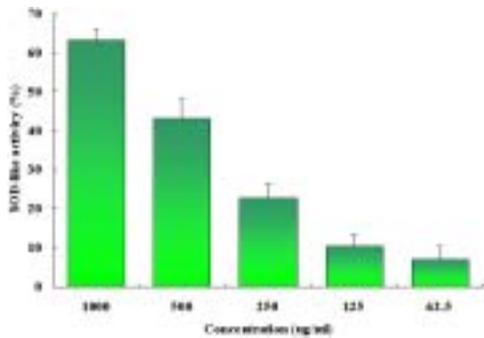


Fig. 13. Effects of *EGB* on superoxide dismutase like activity. *EGB* were reacted with tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6ml and 7.2mM pyrogallol 0.2ml for 10mins at 25°C, and determined at 420nm after stopping the reaction by adding 0.1ml of 1N HCl. The results are the mean ± SD of three independent experiments.

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

약물	농도	
	1000μg/ml	500μg/ml
金銀化	62.4±2.0	48.2±1.7
鱉甲	3.2±4.8	4.8±0.3
升麻	50.1±0.6	29.6±0.4
連翹	66.7±1.8	52.7±0.6
紅藤	41.3±3.8	31.4±1.1
蒲公英	53.4±0.8	37.4±1.1
蒲黃	24.0±1.2	12.9±2.2
椿根皮	6.4±0.1	5.1±1.7
大青葉	41.6±0.1	28.3±1.4
茵陳	83.5±0.1	72.9±0.7
桔梗	8.6±4.8	0.4±3

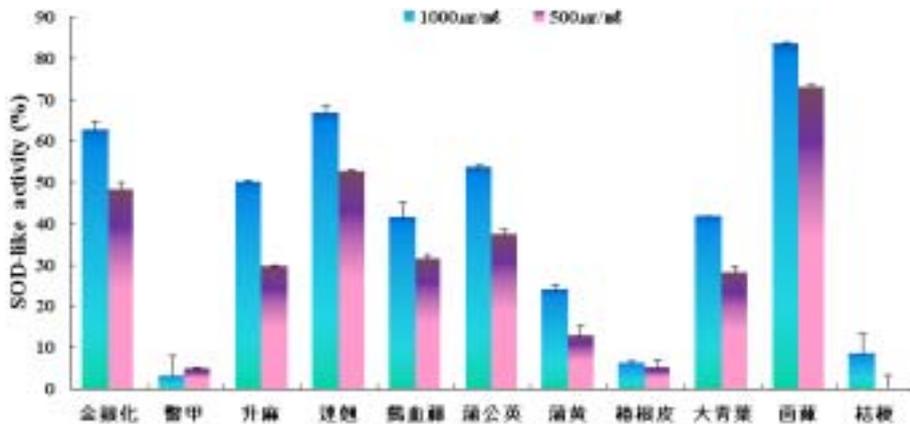


Fig. 14. Effects of compositions of *EGB* on superoxide dismutase like activity. *EGB* were reacted with tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6ml and 7.2mM pyrogallol 0.2ml for 10mins at 25°C, and determined at 420nm after stopping the reaction by adding 0.1ml of 1N HCl. The results are the mean ± SD of three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

3) Superoxide anion radical 소거능에 미치는 영향

(1) *EGB* 투여군

EGB 투여군의 superoxide anion 소거 활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5μg/ml 농도에서 각각 69.3±3.1, 44.7±2.7, 37.8±4.9, 27.9±2.8, 4.0±5.2%의 소거 활성 효과를

나타내었다(Fig. 15).

(2) 구성 약물 투여군

구성 약물의 superoxide anion 소거 활성은 1000μg/ml 농도에서 50% 이상 억제하는 약물은 없었으나 金銀化, 升麻, 連翹, 蒲公英 투여군에서 상대적으로 높은 소거 활성을 나타내었다(Table 11, Fig. 16).

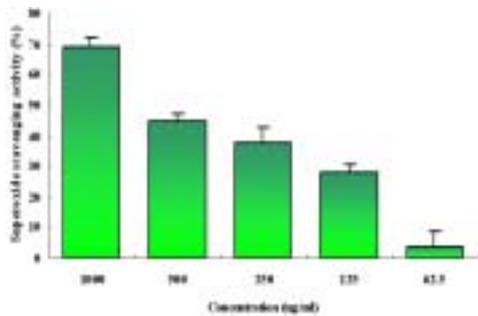


Fig. 15. Scavenging activity of *EGB* on superoxide anion radical.

EGB 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 15 mins with xanthine oxidase 0.2unit/ml, and determined at 550nm. The results are the mean \pm SD of three independent experiments.

Table 11. Scavenging Activity of Compositions of *EGB* on Superoxide Anion Radical

약물	농도	
	1000 μ g/ml	500 μ g/ml
金銀化	42.2 \pm 4.2	36.1 \pm 3.9
鱉甲	16.9 \pm 1.6	3.0 \pm 0.3
升麻	45.5 \pm 0.2	32.9 \pm 1.6
連翹	45.8 \pm 0.9	18.4 \pm 3.1
紅藤	34.7 \pm 2.0	42.1 \pm 0.4
蒲公英	41.9 \pm 1.8	11.5 \pm 0.9
蒲黃	30.2 \pm 5.9	19.8 \pm 3.2
椿根皮	28.7 \pm 7.4	46.7 \pm 2.1
大青葉	31.7 \pm 1.3	34.5 \pm 1.7
茵陳	10.8 \pm 3.9	47.4 \pm 0.4
桔梗	30.1 \pm 2.4	39.2 \pm 1.8

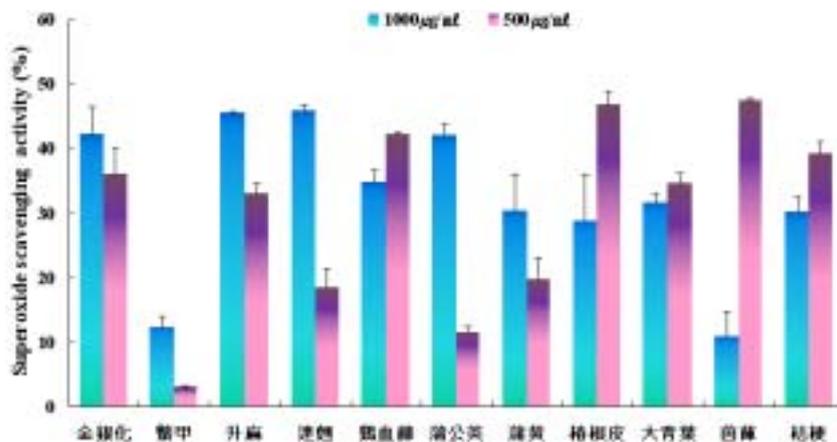


Fig. 16. Scavenging activity of compositions of *EGB* on Superoxide anion radical. *EGB* were reacted with 50mM phosphate buffer(pH 7.8, 0.1mM EDTA) 2.5ml and 2mM xanthine 0.2ml and 1mM NBT(nitro blue tetrazolium) 0.1ml for 15mins with xanthine oxidase 0.2unit/ml, and the absorbance at 550nm. The results are the mean \pm SD of three independent experiments.

IV. 考 察

瘀血이란 六淫을 비롯한 七情, 飮食, 打撲 등의 선행 원인에 의해 혈액 순환 과정이 교란되면서 혈액이 凝集되어 형성된 병리 산물이자 이차적 병변을 일으

키는 속발성 병인이다^{1-3,5,7,8,24}. 內經²⁵의 ‘惡血’, ‘留血’, ‘血凝’, ‘血凝泣’, ‘脈不通’, ‘血泣’, ‘血不流’ 등의 용어와 개념을 정리하여 張⁴이 《金匱要略·驚悸吐衄下血胸滿瘀血病脈證治》篇에서 최초로 ‘瘀血’이란 명칭을 사용하였다.

최근에는 원인과 존재 양상에 따라 크게 네 가지로 나누어 정의하고 있는데, 첫째 臟腑 經絡과 조직 간의 혈류 정체로 인한 이물질 덩어리, 둘째 혈액 자체의 성분 또는 속도, 止血, 清血 등의 생리 기전에 이상이 생긴 혈액, 셋째 대소혈관 병변으로 인하여 정상 혈류가 파괴되고 혈류가 불창된 혈액, 넷째는 혈관을 이탈한 혈액이 체외로 배출되지 못하거나 다시 흡수되지 못하여 피하에 쌓여 있는 혈액 등을 포함한다^{2,3,5,7}. 아울러 상기한 네 가지 존재 양상은 현대의학에서 혈관내피세포의 상해, 혈소판의 활성화, fibrin 형성, 혈류 변화 등으로 형성되는 血栓과 가장 유사한 개념으로 인식되고 있다^{1,2,5,7,8,26}.

이는 주로 氣虛, 氣滯, 血虛, 痰阻, 偏寒, 偏熱 등의 병리 상태에 의해 형성되며^{1-3,5,7}, 부인과 영역에서는 出血, 疼痛, 積聚, 癥瘕, 癰腫 및 痺證을 비롯하여 經·帶·胎·產 등에서 나타날 수 있는 여러 병증들의 주된 원인 중의 하나로 인식되고 있다¹¹⁻¹⁴.

즉 月經, 妊娠, 出產, 經閉, 遺產, 避妊手術, 子宮手術, 子宮筋腫 및 骨盤腔炎 등의 여자의 모든 생·병리적 과정에서 상기한 瘀血 기인성 증상이 다양하게 나타남으로써^{11-14,27,28}, 상대적으로 부인과 영역에서 活血化瘀 약물의 활용 빈도는 높은 편이다.

또한 급성 염증성 질환의 주 병인으로 인식되고 있는 濕熱은 급격한 혈액순환 장애와 체액 불균형을 초래함으로써 속발성 병인인 瘀血과 痰濁을 유발한다. 특히 급성 질환에서의 瘀血 병증은 대부분 濕熱痰濁과 더불어 발생한다.

최근 活血化瘀의 효능으로 활용되는

처방과 약물에 대한 연구는 주로 혈액 응고 기전에 관련된 인자와 endotoxin, collagen, hydrocortisone, dextran 등을 이용한 혈전 동물 병태 모델²⁹⁻³⁶이 활용되고 있으며, 특히 혈전 동물 병태 모델은 심혈관계, 혹은 婦人科 經·帶·胎·產 등에 活血化瘀의 목적으로 사용되는 약물의 효능 검색에 다용된다. 아울러 瘀血로 인한 組織의 變性, 壞死, 增殖, 惡性 變化 등은 염증성 질환을 유발한다는 점에서 염증과 혈전의 상관관계를 통한 효능에 대한 실험적 연구³⁷⁻³⁹ 역시 활발하게 이루어지고 있다.

銀甲方加減은 《實用中醫婦科學》¹⁵에 收載된 처방으로 濕熱壅阻와 瘀血로 인한 骨盤炎에 활용되는 처방으로 임상상 실제 사용하지 않는 중국산 紫花地丁과 琥珀을 제외한 처방이다. 慢性骨盤炎이란 자궁, 수란관, 난소 등의 여성생식기와 자궁근치의 조직, 골반복막 등에 발생하는 만성 염증을 지칭하는데, 한의학적으로는 “痛經”, “帶下”, “癥瘕”, “不妊” 등의 범주에 속한다¹⁵. 銀甲方은 慢性骨盤炎 중에서도 實證에 사용되는 處方으로서 清熱解毒, 消腫散結, 利濕 작용⁴⁰이 있는 金銀花, 連翹, 蒲公英, 椿根皮, 大青葉, 升麻, 茵陳, 行血祛瘀, 散瘀止血 작용⁴⁰이 있는 蒲黃, 鷄血藤, 滋陰潛陽 軟堅散結 작용⁴⁰이 있는 鱉甲, 祛痰排膿 작용⁴⁰이 있는 桔梗 등으로 구성되었다.

구성약물 각각의 性味와 效能을 자세히 살펴보면, 金銀花의 性은 寒 無毒하고, 味는 甘하며 효능은 清熱解毒, 治癰腫疔瘡 涼散風熱한다⁴⁰. 連翹의 性은 微寒 無毒하고 味는 苦하며 효능은 清熱解毒 消腫散結 治癰疽, 瘰癧, 乳癰한다⁴⁰. 蒲公英의 性은 寒 無毒하고 味는 苦甘하

며 효능은 淸熱解毒 消腫散結 利尿通淋 治疔瘡腫毒乳癰瘰癧한다⁴⁰⁾. 椿根皮의 性은 寒 無毒하고 味는 苦澁하며 효능은 淸熱燥濕 收澁止帶 止瀉 止血한다⁴⁰⁾. 大靑葉의 性은 寒 無毒하고 味는 苦하며 효능은 淸熱解毒 涼血消癥 治溫邪入營發癍發疹한다⁴⁰⁾. 升麻의 性은 微寒 無毒하고 味는 辛微甘하며 귀경하고 효능은 發表透疹 淸熱解毒 升舉陽氣한다⁴⁰⁾. 茵陳의 性은 微寒 無毒하고 味는 苦하며 효능은 淸利濕熱한다⁴⁰⁾. 蒲黃의 性은 平 無毒하고 味는 甘하며 효능은 收澁止血 行血祛瘀한다⁴⁰⁾. 鷄血藤의 性은 溫 無毒하고 味는 苦微甘하며 효능은 行血補血 舒筋活絡한다⁴⁰⁾. 鱉甲의 性은 微寒 無毒하고 味는 鹹하며 효능은 滋陰潛陽 軟堅散結한다⁴⁰⁾. 桔梗의 性은 平 無毒하고 味는 苦辛하며 효능은 宣肺利咽 祛痰排膿한다⁴⁰⁾.

본 실험과 관련된 구성 약물의 실험적 연구로 전 등^{19,21-24,41)}은 金銀花, 連翹, 鷄血藤, 蒲公英, 蒲黃 등으로 항혈전에 대한 효능을 보고한 바가 있고, 또한 제 등¹⁶⁻¹⁸⁾은 실험을 통하여 다양한 처방의 항혈전작용에 대한 연구결과를 보고한 바 있다.

따라서 본 실험에서는 현재 임상에서 骨盤炎에 활용되는 銀甲方加減의 항혈전 효능을 규명하고자 다양한 혈전 인자의 변화를 검색하였다.

혈전이란 혈관내피세포의 상해, 혈소판의 활성화, fibrin의 형성, 혈류의 변화 및 세포내피계의 관여 등으로 인해, 폐쇄 혈관 또는 심장 내에서 혈액이 부분적으로 응고된 응집괴를 말하며^{8,16-18,29-31,35,37,42-44)}, 心筋梗塞症, 腦卒症, 肺動脈梗塞症 등의 심각한 혈전성 질환의

원인이 된다. 또한 혈소판의 비정상적인 활성화에 의하여 생성되는 微細血栓들은 각종 혈전성 질환 뿐 아니라 動脈硬化症, 高血壓, 糖尿病 등의 발현에도 관여함이 밝혀지고 있다. 현재 혈전성 질환의 예방과 치료 약물들은 血栓溶解劑, 抗凝固劑 및 抗혈소판劑로서 크게 세 가지로 분류할 수 있으나^{45,46)}, 아직까지 이들 제제의 부작용과 한계성⁴⁷⁾으로 인하여 natural compounds를 중심으로 한 연구가 심도 있게 이루어지고 있다.

혈소판은 직경 2-4 μ m의 원판형의 혈구 세포로서, 세포막은 교원질, 혈관벽의 von Willebrand factor 및 섬유소원에 대한 수용체를 가지고 있다⁴⁸⁻⁵⁰⁾. 세포질은 두 종류의 과립을 함유하고 있는데, 이중 고밀도과립(dense granule)은 비단백 물질들을 함유하고 있으며, serotonin과 ADP 그리고 기타 adenine nucleotide에 의해 혈소판이 활성화되면 분비된다. 또 다른 과립은 lysosome에 있는 가수분해 효소를 제외한 대부분의 분비 단백질을 함유하고 있으며, 응고 인자와 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)등이 여기에 속한다⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

지혈 과정에서 혈소판은 자신의 표면에 존재하는 수용체에 의해 glycopeptide group을 가지는 콜라겐과 내피하 미세원섬유(subendothelial microfibrils)에 부착하여, 혈관의 endothelial gap에 작은 plug를 생기게 함으로써 vascular integrity를 유지하게 된다^{42,48,51,52)}. 콜라겐이나 외부 물질의 표면에 부착한 지 수초내에 모양이 변화하면서 ADP, ATP, thrombin, serotonin 등을 분비한다^{42,48,51-56)}. 분비된 ADP는 이차적 혈소판 응집을 유도하는데, 이는 세로토닌에 의한 혈관수축 작

용과 함께 가장 중요한 지혈 과정을 담당한다⁵⁵). 또한 혈소판은 막 인지질(membrane phospholipid)로부터 생긴 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 여러 종류의 프로스타글란딘(prostaglandin)을 만든다⁵¹⁻⁵⁸). 다음으로 혈액 응고계가 활성화되면서 섬유소의 형성이 뒤따르며 이차 지혈(secondary hemostasis)이 이루어져 지혈 과정이 완성된다. 그러나 이러한 정상적인 지혈 기전의 과민 반응 또는 혈관벽의 이상 등의 원인에 의하여 혈소판들이 활성화되면, 혈관 파손시와 유사하게 혈소판의 점착 및 방출 반응이 일어나고 응집이 일어나게 됨으로써 혈소판의 변화는 응혈 및 혈전 형성 여부의 대표적 지표가 된다.

따라서 본 실험에서는 먼저 *in vitro*에서 혈전 형성의 중요한 인자로 작용하고 있는 혈소판에 대하여 *EGB extract*의 항혈소판(antiplatelet) 효능을 검색하고자 유도인자인 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid를 PRP에 처리한 후 응집 억제능을 평가하였다.

응집 유도체인 ADP는 serotonin, Ca^{2+} , K와 함께 혈소판 응고 요소가 되는데, 혈액 응고 과정에 있어서 ADP는 다른 혈소판을 잡아끌어 혈소판 덩어리를 구축하여 지혈 마개를 형성하는 역할을 한다⁵⁵).

생리적으로 epinephrine은 부신수질 hormone으로, 여러 표적 장기에 작용하는 순환 hormone이나 혈소판 응집 단계에서는 혈소판에 있는 α 와 β -epinephrine type의 receptor에 작용하여 혈소판 응집을 일으킨다⁵⁹).

Collagen은 교원질로서 결체 조직의 세포외 기질에서 발견되는 주된 섬유이

다. 이는 kinase Syk과 phospholipase C_v 2를 포함하는 신호 전달 경로로 tyrosine kinase-based를 통하여 platelet 활성화를 유도한다⁵⁶). Collagen 등으로 활성화된 혈소판은 알파과립을 혈소판 막 외부로 노출시켜 정상 혈소판에서는 발현되지 않는 Pselectin (CD62P)을 발현한다⁶⁰). 또한 혈소판 응집에 관여하는 GPIIb-IIIa의 형태학적 변화가 일어나 PAC-1 항체와 반응하는 fibrinogen-binding site의 새로운 항원을 제공한다⁶¹).

Arachidonic acid는 다양한 요인에 의해 화학적, 물리적 stress에 의해 과잉 생성된 free radical 이나 축적된 지질 과산화물 등의 자극에 의해 유리되어 대사 반응이 시작된다⁶²). 혈액 응고 기전에 있어서는 혈관벽의 내피세포가 어떤 자극에 의하여 손상을 입으면 collagen이 노출되고 혈소판이 노출된 collagen에 의해 활성화되면서 혈소판 막지질에 결합되어 있던 arachidonic acid는 Phospholipase A_2 (PLA₂)에 의해 분해되어 방출됨으로써 혈소판 응집 작용 등의 생·병리 활성을 나타낸다고 알려져 있다^{57,58}).

혈소판 응집의 주요한 인자로 알려진 이들에 대하여 *EGB extract*는 농도 의존적으로 혈소판 응집을 억제하였고(Fig. 2-5), EC₅₀ 값으로 ADP는 9.5mg/ml로 나타났으며, epinephrine은 5.8mg/ml, collagen은 EC₅₀은 19.2mg/ml, arachidonic acid는 6.6mg/ml로 나타났다(Table 2). 현재 한약 같은 복합 천연물 혹은 본 시료와 같은 한방 처방에서의 유의성 있는 EC₅₀ 농도에 대한 기준이 없어 비교 평가는 어렵지만 전반적으로 농도 의존적이라는 점에서는 의미 있는 결과로 보인다.

다음으로 혈소판 기능을 측정하는 방법 중 혈소판 활성화의 민감한 표지자로 알려진 백혈구-혈소판 응집까지 측정 가능한 유세포분석기^{63,64}를 이용하여 CD 62P와 PAC-1 항체의 활성화⁶⁵⁻⁶⁹를 측정하였다. GPIIb/IIIa 활성을 collagen에 의한 혈소판의 응집 정도를 통하여 평가한 결과 농도 의존적으로 CD62p과 PAC-1 발현이 억제되었다(Fig. 6). Arachidonic acid는 상기한 바와 같이 PLA₂에 의해

세포막의 인지질로부터 합성되며, 대표적으로 cyclooxygenase와 lipoxygenase pathway를 거친다⁵⁷. 특히 cyclooxygenase (COX) 생성물은 thromboxane B₂(TXB₂)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 만드는데 (Fig. 17), 최근 연구에서 collagen에 의하여 활성화된 혈소판은 arachidonic acid(AA)의 기전에 의하여 COX와 Thromboxanes(TXS)에서 TXB₂와 PGE₂와 같은 대사산물이 증가한다는 보고^{57,58,62}가 있다.

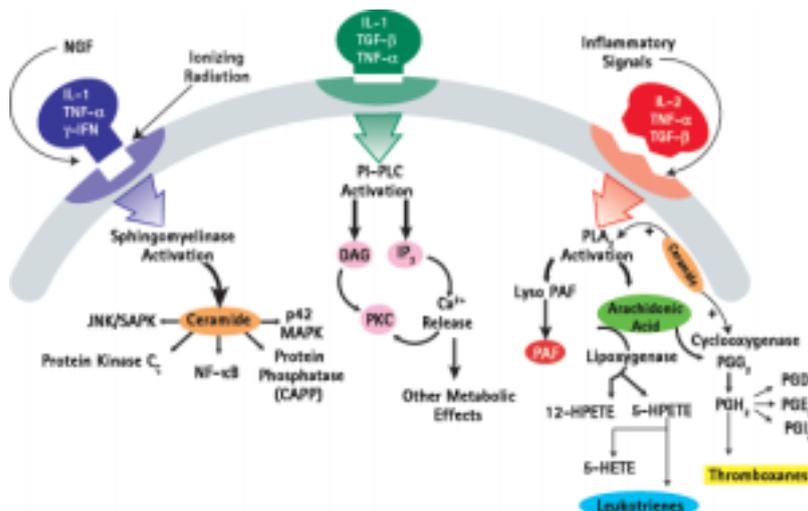


Fig. 17. Arachidonic acid pathway : TXB₂ and PGE₂

따라서 본 실험에서는 혈소판에서 arachidonic acid(AA)의 연속 반응의 대사산물인 TXB₂와 PGE₂에 대한 억제능을 관찰하였는데, TXB₂와 PGE₂의 대사물 유리에 대하여 농도 의존적으로 억제하여(Fig. 7, 8) PRP인 사람 혈소판의 응집을 감소하는 결과를 얻었다. 이 결과 역시 아직 한의학계에서 이에 대한 실험 보고가 없어 처방간 비교 평가를 실시할 수 없으나 상기 혈소판 응집 억제 효과와 부합된 결과가 도출됨으로써 EGB

extract 항혈소판 효능이 인정되었다. 단 본 시료가 COX와 TXS의 활성을 억제하는지에 대하여서는 보다 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

다음으로 *in vivo*에서는 두 가지 동물 병태 모델을 이용하여 항혈전 작용을 검토하였다. 먼저 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 肺塞栓 실험에서는 양성대조군인 aspirine 투여군에 비하여 상대적으로 낮지만 50%의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Dextran은 蔗糖으로부터 만들어진 포도당으로 구성된 수용성다당류이다. 이를 미정맥 주사하면 미세한 혈전을 형성함으로써 혈전증과 어혈 병태 모델로 응용되고 있다⁷⁰⁾. 기존의 실험 방법에 준하여 본 실험에서도 dextran 血栓·瘀血 병태를 유발한 후 혈류 속도, 혈소판수, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT), fibrinogen 양을 측정하였다.

먼저 혈류 속도에서는 대조군에 비하여 상대적으로 시간이 감소되어 혈류 속도가 유의성 있게($P<0.05$) 증가하였으며 (Table 4, Fig. 9), 혈소판 수 역시 유의성 있게($P<0.05$) 증가함으로써 (Table 5), *in vitro* 결과와도 부합되었다. 또한 외인성 및 공통성의 응고 과정 이상을 검출하는 방법인 prothrombin time⁶¹⁾은 대조군에 비해 별다른 차이를 보이지 않았으나 (Table 6), prothrombin을 thrombin으로 전환하여 혈액 응고 기전에 작용하는 thromboplastin time⁶¹⁾은 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소하였다 (Table 7).

Fibrinogen은 응고 과정 최종 단계의 인자로 thrombin에 의해 분해되어 fibrin으로 전환되어서 지혈 인자 또는 창상 국소의 fibrin matrix의 기초 재료가 된다^{61,71)}. 대체로 파종성 혈관내응고증 (DIC) 등에서 감소가 이루어지는데, 본 연구에서는 혈소판수의 결과와 동일한 양상으로 감소된 대조군에 비하여 유의성 있게 증가함으로써 (Table 8) *EGB* extract가 platelet 및 fibrinogen의 소비를 억제시킴을 확인할 수 있었다. 결과적으로 *EGB* extract가 생체 안에서 내·외인성의 혈액 응고 및 미세한 혈

전, 혈소판 점착성, 적혈구 응집 등을 효과적으로 억제함으로써 dextran으로 유발된 어혈·혈전 병태에 유의성 있는 결과가 도출된 것으로 사료된다.

활성산소란 안정한 분자상태인 ground state triplet oxygen이 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인에 의하여 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen과 같은 반응성이 매우 큰 상태로 전환된 것을 말한다. 본래 활성산소는 세포의 항산화적 작용에 의해 세포 내에서 일정 농도를 유지하고 있으나, 병리적 상태에서는 생체에 치명적인 산소독성을 일으켜 강력한 산화작용으로 인한 세포 손상의 연쇄작용이 일어나게 된다⁷²⁻⁷⁸⁾.

활성산소(free radical)가 혈전의 형성을 증가시킨다는 보고들이 있지만 아직까지는 정확한 기전이 밝혀져 있지 않다. 초기에는 활성산소가 혈소판의 응고를 억제한다는 연구 결과도 있었으나 실험 조건에 따라 상반된 현상이 나타났기 때문에 이해되고 있으며, 현재는 활성산소가 혈전의 형성을 증가시키는 것으로 받아들여지고 있다⁷²⁾. 혈관 내벽, 혈소판 내부, 대식세포가 분출시키는 활성산소 등이 혈소판에 작용하는 활성산소가 생성되는 곳이다⁷³⁾. 활성산소의 종류는 다양하여 superoxide(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hypo-chlorous acid($HOCl$) 등과 같은 것이 있으나 각각의 활성산소가 혈전을 형성시키는데 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 개별적으로 잘 알려져 있지 않다. 활성산소가 혈소판의 응집을 증가시키는 것으로 현재까지 밝혀진 기작은 다음과 같다. 우선 superoxide

가 혈소판 응집이 일어나는 cascade의 초기 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 tissue factor(TF)의 발현을 혈관내피세포에서 크게 증가시키거나⁷⁴⁾, 혈소판의 thrombin, collagen, ADP, arachidonic acid 등에 대한 감수성을 증가시켜 응고를 유발시키는 직접적인 기작이 있다^{75,76)}. Nitrite(NO)는 혈전의 형성을 억제하는 기능이 있는데 이것에 superoxide가 결합하면 peroxynitrite(ONOO⁻)가 형성되면서 NO의 농도가 낮아지게 되는데, 이러한 방식으로 활성산소가 혈전을 형성을 촉진하는 역할을 한다⁷⁷⁾.

혈전 형성 반응에 있어서 monocyte/macrophage가 분비하는 endotoxin, TNF- α , IL-1과 같은 사이토카인이 TF의 발현을 증가시켜 혈전을 유도한다는 것이 알려져 있으며⁷⁸⁾, thrombin이 IL-6, IL-8과 같은 사이토카인을 발현한다는 것이 보고⁷⁹⁾된 것으로 보아 면역 염증 반응과 혈전 형성 반응은 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨진다.

상기한 바와 같이 면역 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 cyclooxygenase(COX)는 COX-1과 COX-2가 대표적으로 이들 효소는 arachidonic acid로부터 면역매개물질인 prostaglandin (PG)을 만든다⁸⁰⁾. COX에 의해 형성된 PGH₂는 leukocyte나 혈관내피세포에서 prostacyclin(PGI₂)로 변하게 되는데 이것은 혈전 형성을 억제하는 기능을 가지고 있어서 혈관 내에서 혈전이 형성되지 못하게 하는 역할을 한다⁸¹⁾. 반면 혈소판에서 PGH₂는 thromboxane synthase에 의해 thromboxane A₂(TXA₂)가 되는데 이것은 혈소판의 응집을 유발하는 기능을 가지고 있다⁸²⁾. 일반적인 상황에서

는 prostacyclin과 thromboxane이 균형을 이루나 thromboxane의 양이 증가하게 되면 혈전이 형성된다⁸³⁾.

한의학계에서 지금까지 보고된 활성산소에 대한 연구는 대부분 노화와 염증 관련에 관한 실험이 대부분으로 아직 혈전과 활성산소의 연관성을 중심으로 보고된 내용은 거의 없는 편이다. 다만 많은 논문에서 活血化痰 약물이 염증과 혈전에 유의성이 있음을 보고^{16,17,35,38,39)}한 바가 있고, 痰瘀同源이라는 이론⁸⁴⁾을 통하여 化痰清熱 효능을 지닌 처방에 瘀血藥을 가미한 처방이 염증과 혈전에 효과적이라는 점은 보고된 바가 있다. 따라서 본 연구에서는 염증, 혈전의 공통적인 병리 부분이 존재한다는 이론에 준하여 본 시료의 산화적 손상에 대한 효능을 검색하였다.

항산화작용에 대한 평가는 기본적으로 실시하는 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) 소거능, superoxide dismutase (SOD) 유사활성, superoxide anion radical 소거 활성 등을 측정하였다. 먼저 DPPH, superoxide anion radical 소거능에서는 Fig. 11, 15에서 보는 바와 같이 농도 의존적으로 소거 활성 효과를 나타내었다.

개별 구성 약물에 대한 검색에서는 상기 자유유리기에 대하여 공통적으로 金銀花, 連翹, 蒲公英 등이 상대적으로 높은 소거 활성을 나타내었다(Table 9, 10, Fig. 12, 16).

SOD 유사 활성에 미치는 영향에서도 EGB extract 투여군에서 농도 의존적으로 유사활성이 증가되었으며(Fig. 13), 구성 약물중 金銀花, 升麻, 蒲公英, 茵陳 투여군에서 상대적으로 높은 유사 활성을 나타내었다(Table 10, Fig. 14).

이 같은 결과는 본 시료가 자유 유리기에 의한 산화적 손상에 유의적인 효과가 있음을 입증해주고 있으며, 구성 약물 중 清熱解毒 약물의 항산화 효능이 상대적으로 높은 점은 기존의 동서의학 이론과 부합된 결과로 보여진다. 또한 기존에 박⁸⁵⁾은 茵蔯을, 백⁸⁶⁾은 蒲公英을, 곽⁸⁷⁾은 金銀花 ethyl acetate 分割을, 조⁸⁸⁾는 升麻를 시료로 이들의 항산화 작용을 보고한 바가 있어, 본 실험 결과가 유의성이 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 아울러 비록 단편적이지만 세포독성(Fig. 1)과 간기능 혈액 검사(Fig. 10)에서 독성이 발현되지 않아 임상 사용시 문제가 없음을 확인할 수 있었다.

V. 結 論

현재 임상에서 骨盤炎에 활용되는 銀甲方加減의 항혈전 효능을 규명하고자 *in vitro*에서 혈소판 응집 억제 효과, GP IIb/IIIa 활성화 억제 효과, TXB₂와 PGE₂ 생성 저해능, 산화적 손상 억제 효과를 검색하고, *in vivo*에서 肺塞栓 유발 억제 효과 및 dextran 瘀血 병태 모형에서의 유관 인자 변화를 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 銀甲方加減은 mLFCs에 대한 세포독성에서 LD₅₀이 200 μ g/ml 이상으로 나타났다.
2. 銀甲方加減은 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의한 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하였으며, 이들에 대한 EC₅₀ 값이 각각 9.5mg/ml, 5.8 mg/ml, 19.2mg/ml, 6.6mg/ml로 나타

났다.

3. 銀甲方加減은 대조군에 비하여 GPII b/IIIa 활성을 농도 의존적으로 억제시켰다.
4. 銀甲方加減은 대조군에 비하여 TXB₂와 PGE₂ 생성을 유의성 있게 억제시켰다.
5. 銀甲方加減은 대조군에 비하여 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 50% 억제하였다.
6. 銀甲方加減은 dextran 어혈 병태 모델에서 대조군에 비하여 혈전 유발에 따른 혈류 속도를 유의성 있게 증가시켰다.
7. 銀甲方加減은 dextran 어혈 병태 모델에서 대조군에 비하여 혈소판 수, fibrinogen 양은 유의성 있게 증가시켰으며, APTT는 유의성 있게 단축시켰다.
8. 銀甲方加減은 SD계 백서의 GOT, GPT 수치를 정상 범위로 유지시켰다.
9. 銀甲方加減은 DPPH, superoxide anion radical에 의한 산화적 손상을 농도 의존적으로 감소시킨 반면, superoxide dismutase 유사 활성을 농도 의존적으로 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 銀甲方加減의 항혈전 및 항산화 효능이 인정되어 부인과 영역에서 瘀血 및 炎症으로 인한 다양한疾患에 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

- 투 고 일 : 2008년 4월 28일
- 심 사 일 : 2008년 4월 29일
- 심사완료일 : 2008년 5월 10일

參考文獻

1. 康舞洙. 한의학에서 瘀血에 대한 개념. 대한한의학회지. 1984;5(1):138-140.
2. 陳可冀 등. 實用血瘀證學. 인민위생출판사. 1999;1-3, 5-8, 15-16.
3. 한방병리학교재편찬위원회 編. 한방병리학. 한의문화사. 2007;52-57, 111-117, 389, 475.
4. 張機. 景岳全書. 集文書局. 1972;172-173, 228, 236.
5. 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.
6. 金琦顯 등. 실험적 연구의 방향 모색을 위한 고찰(I). 동의병리학회지. 1990;5(1):17-30.
7. 전병훈 등. 瘀血의 개념에 관한 동의학적 고찰. 대한동의병리학회지. 1989;4(1):93-102.
8. 永田藤太郎 등. 瘀血血栓性疾患, 瘀血研究 3. 瘀血綜合科學研究會編. 1983;43-51.
9. 홍원식. 精校黃帝內經靈樞. 東洋醫學研究院出版社. 1985;346.
10. 潘鴻鵠. 中醫葯治療炎症學. 軍事醫學科學出版社. 2000;3-15, 329, 650, 683.
11. 趙紹琴. 趙紹琴內科學. 北京科學技術出版社. 2002;267.
12. 朱小南. 女科經驗選. 人民衛生出版社. 2005;5, 95, 99, 132-134.
13. 良石. 秘方大全. 北京科學技術出版社. 2007;78-81, 183, 187, 196-203.
14. 魏陵新 등. 各中醫治療難治性女科病奇方秘法. 科學技術文獻出版社. 2006;127, 186, 205, 245, 291-294.
15. 羅元愷. 實用中醫婦科學. 上海科學技術出版社. 1994;256-259.
16. 제종민. 稜莪消積湯의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2007.
17. 임동욱 등. 複方紅藤敗醬散의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 한방부인과학회지. 2006;19(3):151-174.
18. 孫泰熏, 加味生化湯의 항혈전 및 진통 효과에 대한 연구, 대전대학교 대학원, 2001.
19. M-K Park et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of indole-3-carbinol *in vivo* and *in vitro*. *Phytother Res.* 2007.
20. Scott R, et al.. Inhibition of long-chain fatty acid metabolism does not affect platelet aggregation responses. *European Journal of Pharmacology.* Volume 356 Issues 2-3, 4 September. 1998;207-213.
21. 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* 92. 1998;3240-3249.
22. Kimura, Tani, T., Watanabe, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 1985;35(II):1144-1149.
23. Fonio, A. On the retraction process in blood plasma coagulation. *Acta Haematol.* 1966;36(5):371-385.
24. 易法銀 등. 中醫瘀血證診療大全. 北京;中國中醫藥出版社. 1999;1-11, 664.
25. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 東洋醫學

- 研究院出版社. 1985;38, 55, 78, 86-88, 104, 107, 110, 116-124, 213, 233, 247, 256.
26. 池明宇. 中西醫結合血栓病學. 人民衛生出版社. 2004;38-48.
27. 桑海中醫學院 편. 婦產科學. 商務印書館. 1983;37, 47, 77-78, 124.
28. 黃繩武. 傅青主女科評注. 湖北科學技術出版社. 1985;7, 23, 95, 113.
29. 조한백 등. 起枕散이 collagen 등으로 유발된 백서의 혈전 병태모델에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):109-126.
30. 홍지선 등. 桃紅飲이 collagen 등으로 유발된 혈전 및 혈액점도에 미치는 영향에 대한 연구. 방제학회지. 1998;6(1):199-214.
31. 이상권 등. 瓜蒌枳實湯 및 그 가미방이 endotoxin으로 유발된 혈전에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 1992.
32. 정학수 등. 흰쥐에서 endotoxin으로 유발된 파종성 혈관내 응고증에 대한 도인탕의 항혈전 효과. 대한한방부인과학회지. 2001;14(1):133-145.
33. 임강민 등. 活絡效靈丹이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 2000;14(1):122-134.
34. 김정범. 桃仁承氣湯 및 그 구성 단미제가 어혈병태에 미치는 영향. 국제어혈 심포지움 논문집. 1997;77-103.
35. 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.
36. 안규석 등. 瘀血 병태 모형 개발에 관한 연구. 대한동의병리학회지. 1999;25-34.
37. 이정은. 加味補陽還五湯의 抗血栓 및 抗炎作用에 대한 實驗的 研究. 大田大學校 大學院. 2006.
38. 홍지우 등. 秘方奪命散의 항염증효과 및 항응고작용에 대한 연구. 대한동의병리학회지. 1998;12(2).
39. 이상수 등. 少腹逐瘀湯이 항혈전 및 소염, 진통에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):81-96.
40. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 영림사. 1991;151, 198-199, 201, 204, 328, 401, 445, 460, 492, 603, 619.
41. 이진훈. 계혈등의 항염활성효과. 강원대학교대학원. 1998.
42. 문형배 등. 일반병리학. 고문사. 2001; 98-100.
43. 대한병리학회. 병리학. 고문사. 2003;47-52.
44. 김춘원. 병리학. 新光出版社. 1983;66-67.
45. Fuster V et al. Pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes 2. N Engl J Med. 1992;326:310-318.
46. Wu KK, Hoak JC. Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. Stroke. 1975;6:521-524.
47. Petruszewicz J et al. Comparative study of antithrombotic and antiaggregatory activity of acetylsalicylic acid, ticlopidine and a new noncarboxylic acid antiinflammatory pyrazine derivative HF90. Acta Pol Pharm. 1996;56:463-467.
48. 전국 의과대교수 역. 생리학. 도서출판 한우리. 1999;569-570.
49. 대한임상병리학회. 임상병리학. 고려의학. 1996;211-213.
50. 서울대학교의과대학. 혈액학. 서울대

- 학교출판부. 1990;231-233, 242-249.
51. Andrews R.K., M.C. Berndt. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):447-453.
52. Kamath S., A.D. Blann, G.Y. Lip. Platelet activation:assessment and quantification. *Eur Heart J.* 2001 ;22(17):1561-1571.
53. Packham M.A.. Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994;72(3):278-284.
54. Flores NA, Sheridan DJ. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res.* 1994;28:295-302.
55. Murugappa S., S.P. Kunapuli. The role of ADP receptors in platelet function *Front Biosci.* 2006;11:1977-1986.
56. Cowan DH. Platelet adherence to collagen:role of prostaglandin - thromboxane synthesis. *Br J Haematol.* 1981;49:425-434.
57. Horn, P.T. et al. Antagonism of prostanoid-induced vascular contraction by 13-azaprostanoic acid (13-APA). *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1984;6:609-613.
58. Rola-Pleszczynski M. et al. Evidence for the involvement of the thromboxane synthase pathway in human natural cytotoxic cell activity. *Journal of Immunology.* 1985;135:4114-4139.
59. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7: 52-62.
60. Shattil SJ et al. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985;260:11107-11114.
61. 이귀녕 등. 임상병리파일. 의학문화사. 2003;587-600, 1096-1099, 1118-1121, 1147-1151, 1212-1214.
62. Zimmermann N et al. Aspirin-induced platelet inhibition in patients undergoing cardiac surgery. *Platelets.* 2007;18(7):528-534.
63. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood.* 1996;87:4925-4936.
64. Rinder HM et al. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood.* 1991;78:1760-1769.
65. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7:52-62.
66. Shattil SJ et al. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985; 260:11107-11114.
67. Nurden AT et al. Markers of platelet activation in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest.* 1994;24:42-45.
68. Aurigemma C et al. Relationship between changes in platelet reactivity and changes in platelet receptor expression induced by physical exercise. *Thromb Res.* 2007;120(6):901-909.
69. Wang WY, Wu YC, Wu CC. Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa
-

- activation by 3,4-methylenedioxybeta-nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2006;70:1380-1389.
70. 김경환 등. 약리학 강의. 醫學文化社. 1998;781-782.
71. 김정천 등. 臨床檢査法概要. 고문사. 1993;340-341, 346, 711.
72. Pratico D et al. Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. *Haemostasis.* 1991;21:169-174.
73. Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species : Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1988-1996.
74. Golino P et al. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med.* 1996;2:35-40.
75. Krotz F et al. oxidase-dependent platelet super-oxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002;100:917-924.
76. Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest.* 1977;59:959-965.
77. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2:1057-1058.
78. Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2002;88:554-567.
79. Henn V et al. Cd40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391:591-594.
80. Gaetano G, Donati MB, Cerletti C. Prevention of thrombosis and vascular inflammation: Benefits and limitations of selective or combined cox-1, cox-2 and 5-lox inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:245-252.
81. Murata T et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature.* 1997;388:678-682.
82. Caughey GE et al. Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets, Role of thromboxane a2. *J Biol Chem.* 2001;276:37839-37845.
83. Oates JA et al. Clinical implications of prostaglandin and thromboxane a2 formation (2). *N Engl J Med.* 1988;319:761-767.
84. 李順保 등. 中醫痰病學. 學怨出版社. 2003;32.
85. 박진상 등. 인진 추출물이 마우스 대식 세포주인 RAW264.7 세포주의 iNOS 발현 및 superoxide 형성에 미치는 영향. *한국전통의학지.* 1999;9(1):200-211.
86. 백흥영 등. 포공영의 자유라디칼 소거 및 간세포 보호활성. *생약학회지.* 2003;34(4):324-326.
87. 정규찬 등. 金銀花 Ethyl Acetate 分割의 過酸化脂質生成抑制에 關한 研究. 1990;9:97-106.
88. 조향순. 촛대승마와 황새승마 뿌리의 항산화 활성 및 Nitric Oxide 생성 억제 활성. *중앙대학교 대학원.* 2007.