

加味調經湯의 煎湯 방법에 따른 항혈전 및 염증에 관한 연구

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

안규환, 최창민, 김송백, 조한백

ABSTRACT

The Study on Antithrombosis and Inflammation according to The Broth Preparation Method of *Gamijoukyungtang*

Kyu-Hwan Ahn, Chang-Min Choe, Song-Baeg Kim, Han-Baek Cho
Department of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose: In this study, we investigated the anti-thrombotic and anti-inflammatory efficacy of "*Gamijoukyungtang*(GJKT)".

Methods: We studied inhibitory effects of platelet aggregation, FXa activation, TXB₂ and PGE₂ biosynthesis and suppressive effects of GPIIb/IIIa activity and oxidative damage, pro-inflammatory cytokine reduction effects of 'GJKT(by press extractor)/GJKT-1(by pressless extractor)' *in vitro*. Also, we studied suppression of pulmonary embolism, AV shunt model in rats and shortening of Rat tail bleeding time *in vivo*.

Results: GJKT/GJKT-1 extract showed inhibitory effects on GPIIb/IIIa activities and platelet aggregation induced by ADP, epinephrine, collagen and arachidonic acid. They suppressed biosynthesis of PGE₂ but GJKT-1 only suppressed biosynthesis of TXB₂. In FXa assay, they inhibited activation of FXa. they suppressed pulmonary embolism triggered by collagen and epinephrine. In AV shunt model, they decreased the weights of AV shunt thrombus. they inhibited pro-inflammatory cytokines and decreased oxidative damages caused by DPPH.

Conclusion: We confirmed the anti-thrombosis, and ant-inflammatory efficacy of 'GJKT(by press extractor)/GJKT-1(by pressless extractor)'.

Key Words: *Gamijoukyungtang*(GJKT/GJKT-1), broth preparation method, antithrombosis, inflammation, antioxidative

“이 논문은 2008년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.”
“This research was supported by Wonkwang University in 2008”

I. 서 론

調經湯은 《葉天士女科·調經》¹⁾에서 “經閉不行 致有敗血 血停積五臟 流入四肢 作浮腫者 不可誤認水氣 宜調其經 經調則腫消矣.” 라 하여 瘀血로 인한 經閉와 浮腫에 활용하는 처방이다. 加味調經湯은 《葉天士女科》¹⁾에 수재된 調經湯에 補血行血化瘀하는 鷄血藤과 活血祛瘀하는 蘇木²⁾을 가미한 임상처방이다.

인체의 정상적인 생리활동 유지를 위해 血의 작용이 중요한데, 여성이 생리적으로 月經, 妊娠, 分娩, 授乳 등을 수행하는 데 있어 血이 정상적인 생리 기능을 하지 못하면 瘀血로 인한 부인 질환이 발생한다³⁾. 瘀血은 정상적인 생리 기능을 상실한 혈액이 응취되어 형성된 일종의 병리적 산물이며 단순히 血毒으로서의 비생리적인 혈액만을 의미한 것이 아니라 血滯라는 순환장애의 병리적 상태를 기반으로 나타나는 특수한 증후군까지도 포함하는 것으로, 최근 임상 및 실험적 연구를 통하여 瘀血은 서양의학에 있어서의 혈액순환장애, 혈액성분의 변화 및 결체조직의 증식변성으로 귀납되어진다고 보고된 바 있다^{4,5)}.

염증은 손상조직에 대한 살아있는 조직의 반응으로, 염증반응은 국소순환계의 순환장애와 혈액성분의 혈관 외로 삼출 및 조직 증식이 동반되는 일련의 과정으로 나타나며, 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실이 대표적인 증상이라고 할 수 있다^{6,7)}. 이러한 염증의 일련의 과정은 疼痛, 出血, 寒熱, 腫塊 등을 주요증상으로 하는 瘀血의 병태와 유사하다고 할 수 있다⁸⁾.

이에 대한 연구로 이 등⁹⁻¹⁷⁾이 銀甲方

加減, 慢盆方 및 稜莪消積湯 등으로 실험을 수행하여 항혈전 및 항염증 작용이 있음을 보고한 바 있으나 加味調經湯의 항혈전 및 항염증 작용에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

또한, 현재 한방의료기관에서 기계를 활용하여 이용되고 있는 전탕 방식은 압력식, 무압력식으로 크게 구분되며, 최근에는 15분 전탕용 기계도 등장하고 있다¹⁸⁾. 그러나 기존의 항혈전 및 항염증에 관한 活血化瘀加味方 실험들은 대개 무압력식 전탕법에 의해 확보된 시료를 바탕으로 실험되었다.

이에 저자는 加味調經湯을 고압 전탕법과 재래식 전탕법으로 시료를 확보한 후 전탕방법에 따른 항혈전과 항염증 효능을 비교 검증하였다. 항혈전 작용을 규명하기 위해 *in vitro*에서는 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제 효과, GPIIb/IIIa 활성화 억제 효과, TXB₂와 PGE₂ 생성 저해능에 대한 실험 및 factor Xa assay를 수행하였고, *in vivo*에서는 폐색전 유발 억제 효과 및 AV shunt 모델을 통해 혈전 감소 효과, rat tail bleeding time 연장 효과를 실험 하였다. 아울러 항염증 작용을 규명하기 위해 염증 관련 사이토카인 변화에 미치는 영향을 분석하였고, 염증과 혈전에서의 공통 유관 인자인 산화적 손상에 대한 항산화 효능 관련 실험을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 동 물

본 실험에서는 18~20 g의 ICR(International Cancer Research:대한실험동물센터, 충청북도 음성)계 생쥐와 12주령 350 g의 수컷 SD(Sprague-Dawley:코아텍(주))계 흰쥐를 사용하여 실험하였다.

2) 약 재

본 실험에 사용한 加味調經湯 (Gamijoukyungtang, GJKT)의 처방구성은 《葉天士女科》¹⁾의 調經湯에 鷄血藤, 蘇木을 加味하였으며, 약물은 원광대학교 부속한방병원에서 구입했다.

Table 1. The Prescription of Gamijoukyungtang (GJKT)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
향부자	Cyperi Rhizoma	3.2
계혈등	Mucunae Caulis	8
생지황	Rehmannia glutinosa	4
익모초	Leonuri Herba	4
백복령	Poria cocos Wolf	3.2
목단피	Moutan Cortex Radicis	3.2
당귀	Angelicae Sinensis Radix	4
백작약	Paeoniae Radix alba	3.2
천궁	Ligustici Rhizoma	3.2
감초	Glycyrrhizae Radix	1.2
소목	Caesalpiniae Lignum	4
Total		41.2

3) 시약 및 기기

platelet rich plasma (PRP)는 대전혈액원(Korea)에서 공급 받았고, Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, collagen, epinephrine, heparin, chloral hydrate, tris-HCl, NaCl, CaCl₂, polyethylene glycol은 Sigma(U.S.A) 제품을 사용하였고, normal saline은 중외제약(Korea) 제품을, arachidonic acid reagent, epinephrine reagent, ADP reagent,

collagen reagents는 Chrono-Log(U.S.A) 제품을, IL TestTM PT-Fibrinogen HS와 IL TestTM APTT Lyophilized Silica는 Instrumentation Laboratory(U.S.A) 제품을, aspirin은 바이엘(U.S.A) 제품을, CD62P-PE는 BD Pharmingen (U.S.A) 제품을, PAC-1-FITC는 Becton Dickinson (U.S.A) 제품을, prostaglandin E₂ EIA kit와 thromboxane B₂ EIA kit는 Cayman Chemical(U.S.A) 제품을, Prionex(Centerchem, Stamford, CT), FXa chromogenic substrate S-2765(N- α -benzyloxy-carbonyl-D-arginyl-L-glycyl-L-arginine-p-nitroaniline-dihydrochloride, 330 μ M; DiaPharma, West Chester, U.S.A) 제품을, silicon tube, cotton thread, polyethylene catheters (PE50; Becton Dickinson, MD, U.S.A), Rivaroxaban(Lego Chembio Science, Korea) 제품을 사용하였다.

기기는 centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), rotary vacuum evaporator(Büchi 461, Switzerland), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave(Sanyo, 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 devices, U.S.A), iEMS kinetic microplate reader (Labsystems, Waltham, PA) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 약물 추출

GJKT 10첩을 압력식 약탕기(경서 기

계 산업: GJKT)에 넣고 증류수 2500 ml를 가한 후, 3시간 가열 추출하였고, 또 다른 황토 약탕기(세라믹 약탕기 (주): GJKT-1)에도 같은 방법으로 약 물을 추출하였다. 침전물을 3회 여과 (3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 4시간 동안 방치 하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하였다. 압력식 약탕기에서는 GJKT 24.4 g, 황토 약탕기에서는 GJKT-1 11.7 g의 분말을 얻었고, 실험에 필요한 농도 로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) *In vitro*

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 hFCs로 SRB assay¹⁹⁾를 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 × 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 GJKT, GJKT-1 extract(최종 농도 500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/ml)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid) 50 µl를 가하여 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액 (1% acetic acid 용액의 0.4% 용액) 100 µl를 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base(100 µl)로 용해시켰

다. 이 plate를 plate shaker 에서 3.5 speed로 5분간 흔들어 준 후 ELISA Reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 혈소판 응집 측정^{20,21)}

12시간 이상 공복을 유지한 지원자의 상박 정맥으로부터 채혈한 혈액을 3.8% 구연산나트륨이 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣었다. 이를 원심분리(900 rpm, 10 mins)하여 상등액으로 부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻고 잔액을 다시 원심분리(3,000 rpm, 10 mins)하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻었다. PRP는 채취 즉시 변화를 막고 얼음이 들어 있는 용기에 방치하였다.

약물의 항혈소판 응집 효과 측정은 platelet aggregation profiler model PAP-4를 사용하였으며, 최종 농도는 ADP 10 µM, epinephrine 10 µM, collagen 5 µg/ml과 arachidonic acid 5 mM이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation시킨 PRP 320 µl와 GJKT, GJKT-1 extract 40 µl 넣고 다시 incubation한 후 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid를 각각 40 µl씩 가하여 5분간 반응시켰다.

실험군은 증류수에 용해시키고 희석하여 사용하였으며, 최종 농도가 20, 10, 1, 0.1, 0.01 mg/ml가 되도록 PRP에 가하고 응집 유도제를 넣기 전까지 37°C에서 5분간 incubation하였다. 실험의 처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 생리식염수 40 µl를 가한 뒤 최대 응집율(%)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°C로 유지하고 교반 속도는 500~1,500 rpm으로 하며 528 nm에서 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 = GJKT, GJKT-1 extract 투여군의 maximum aggregation %

(3) GPIIb/IIIa binding assay

GPIIb/IIIa binding assay는 Peter 등²²⁾의 실험 방법을 변형하여 실시하였다. Platelet rich plasma(PRP)는 대전혈액 원으로부터 공급받아 사용하였다. PRP는 Tyrode buffer(129 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 8.9 mM NaHCO₃, 0.8 mM MgCl₂, 0.8 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 10 mM Hepes, 0.35% BSA, pH 7.4)를 이용하여 농도가 3 × 10⁸ platelets/ml가 되도록 조정하였다. 이를 2 × 10⁸ platelets/ml로 희석한 후 collagen(5 μg/ml)과 각 농도(1,000, 500, 250 μg/ml)의 GJKT, GJKT-1 extract를 더하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 수세하였다. 수세 후 PAC-1(20 μg/ml)과 CD62P(10 μg/ml)를 더하여 4°C에서 30분간 반응 후 flow cytometry를 이용하여 측정하였다.

(4) TXB₂, PGE₂ 측정

혈소판(3 × 10⁸ platelets/ml)에 collagen (50 μg/ml)과 GJKT, GJKT-1 extract를 각각의 농도(1,000, 500, 250 μg/ml)로 혼합하여 37°C에서 3분간 반응 시킨 후 2

mM EDTA와 200 μM indomethacin을 가하여 반응을 정지시켰다. 2분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 TXB₂와 PGE₂를 thromboxane B₂ EIA kit와 prostaglandin E₂ EIA kit로 측정하였다.

(5) FXa assay

FXa 활성에 대한 GJKT, GJKT-1 extract의 효능 측정은 96 well plate에 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.01% polyethylene glycol, 0.5% Prionex 등을 GJKT, GJKT-1 extract(1, 5, 10 mg/ml)과 함께 혼합한 후 25°C(pH 7.4)에서 배양하였다. 즉, 25 μl의 human FXa(5 nM)와 GJKT, GJKT-1 extract 25 ml를 혼합하여 실온에서 1시간 배양한 후, 100 μl의 FXa chromogenic substrate S-2765를 넣고 혼합한 후 iEMS kinetic microplate reader로 405 nm에서 p-nitroaniline의 생성을 관찰하였다. FXa의 활성은 시간에 따른 405 nm에서 S-2765의 가수분해 비율로 결정된다.

3) In vivo

(1) 폐색전 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura 등²³⁾의 실험 방법에 준하여 실시하였다. 실험동물은 몸무게 약 18~20 g 정도의 수컷 ICR계 mouse를 사용하였고, GJKT extract 투여군은 25 g ICR계 mouse를 기준으로 검액 5.1 mg, GJKT-1 extract 투여군은 25 g ICR계 mouse를 기준으로 검액 2.4 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집 시약(11.3 μg의 collagen과 1.3 μg의 epinephrine)을 HBSS 200 μl에 함유되도록 조제하였고, ICR계 mouse

의 몸무게 25 g 당 200 μ l의 용량으로 미정맥에 주사하였다. 실험동물을 실험 전 24시간 절식시킨 후 혈소판 응집 유발 시약의 정맥 주사 2시간 전에 상기한 농도의 GJKT, GJKT-1 extract를 ICR 계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 0.1 mg/g을 경구 투여하였다. 항혈전 효과는 혈소판 응집 시약의 투여로 인하여 발생하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였으며, 여기서 마비는 15분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

(2) AV shunt model

AV shunt 실험 1시간 전에 350 g의 SD계 흰쥐에 GJKT, GJKT-1 extract, Rivaroxaban 5 mpk를 경구 투여하였다. 1시간 후 흰쥐의 복강에 1 ml씩 10% chloral hydrate를 주사하여 마취한 후, 마취가 끝나면 Left carotid artery와 Right jugular vein에 polyethylene catheters로 cannulation하였다. 그런 다음 5 cm silicon tube에 cotton thread을 넣고 saline을 채운 후 artery와 vein에 연결된 tube로 혈액을 흐르게 하여 shear-stress를 유도하여 15분간 thrombus를 생성시켰다. 생성된 thrombus를 건조한 후 무게를 측정하여 antiplatelet efficacy를 평가하였다.

(3) Rat tail bleeding model

Tail bleeding 실험 1시간 전에 GJKT extract 142.3 mg/350 g, GJKT-1 extract 68.2 mg/350 g, Rivaroxaban 5 mpk를 경구 투여하였다. 1시간 후 SD계 rat의 복강에 1 ml씩 10% chloral hydrate를 주사하여 마취한 후, 마취가 끝나면 쥐의

꼬리 끝으로부터 2 mm를 가로로 절개한 후 37°C 생리식염수 bath에 담갔다. 20분 동안 관찰 시간을 가지고, 30초 이상 연속적으로 피가 흐르는 것을 관찰하여 시간을 측정하였다.

4) 항산화 활성 측정

(1) DPPH 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 150 μ l에 GJKT, GJKT-1 extract를 1000, 500, 250, 125, 62.5 μ g/ml 농도로 희석하여 100 μ l씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{GJKT, GJKT-1 extract 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

(2) SOD 유사 활성 측정

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

$$\text{SOD 유사활성(\%)} = 100 - \left\{ \left(\frac{\text{GJKT, GJKT-1 extract 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100 \right\}$$

5) 염증관련 사이토카인 분석

THP-1 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포수로 분주하였다. 여기에 GJKT, GJKT-1 extract(100, 50 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS 2 μ g/ml를 각각의 well에 첨가하고 3시간 배양하였다. 배양 후, 세포배양 상층액 만을 취하여 IL-1

β , IL-6, TNF- α , MCP-1의 분비량을 ELISA kit를 이용하여 흡광도 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 통계처리

실험 결과는 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. 결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 100±5.8(%)로 나타난 반면, GJKT extract의 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μ g/ml 농도 투여군에서는 각각 104.5±3.7, 105.6±1.8, 97.6±3.8, 95.8±3.5, 90.8±4.2(%)로 나타내었고, GJKT-1 extract의 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μ g/ml 농도 투여군에서는 각각 104.2±2.6, 97.5±3.2, 95.6±2.1, 93.0±2.6, 86.7±3.5(%)로 나타내었다(Fig. 1).

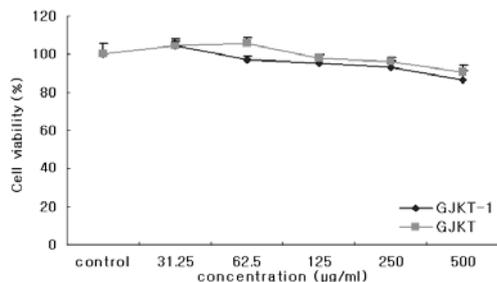


Fig. 1. Cytotoxicity of GJKT, GJKT-1 extract on human fibroblast cells (hFCs).

2. 혈소판 응집에 미치는 영향

1) ADP에 의한 혈소판 응집에 미치

는 영향

ADP(10 μ M)에 의한 혈소판응집 억제효과를 검색한 결과, GJKT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 95.3±0.2%, 81.9±0.2%, 30.6±3.5%, 7.7±3.5%, 2.5±0.5%의 응집 억제율을 나타내었고, GJKT-1 extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 96.7±1.8%, 74.6±6.9%, 18.6±9.4%, 12.1±6.0%, 4.5±1.5%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

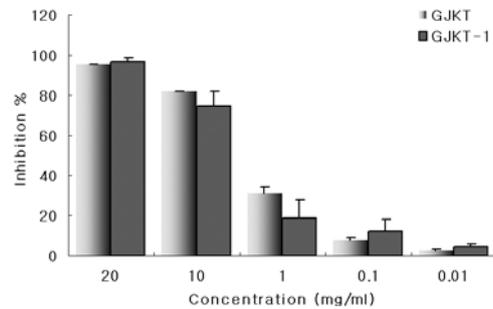


Fig. 2. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on human platelet aggregation with 10 μ M of ADP.

2) Epinephrine에 의한 혈소판 응집에 미치는 영향

Epinephrine(10 μ M)에 의한 혈소판 응집 억제 효과를 검색한 결과, GJKT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 97.8±0.2%, 58.8±8.2%, 43.7±2.2%, 6.5±6.5%, 2.0±2.0%의 응집 억제율을 나타내었고, GJKT-1 extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 95.7±0.4%, 69.4±2.4%, 47.2±1.9%, 22.5±3.5%, 19.7±2.7%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

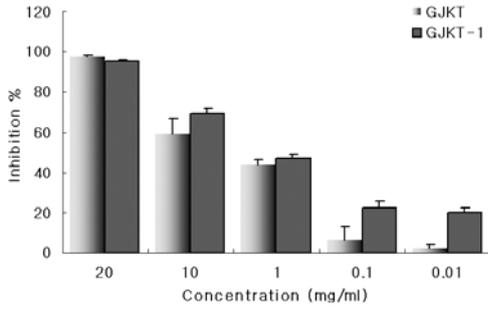


Fig. 3. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on human platelet aggregation with 10 μM of epinephrine.

3) Collagen에 의한 혈소판 응집에 미치는 영향

Collagen(5 μg/ml)에 의한 혈소판 응집 반응 억제 효과를 검색한 결과, GJKT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 97.6±0.6%, 86.4±8.2%, 70.4±0.2%, 31.0±1.5%, 16.3±2.1%의 응집 억제율을 나타내었고, GJKT-1 extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 94.7±1.7%, 86.2±4.1%, 63.7±8.3%, 38.6±6.6%, 13.9±4.1%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 4).

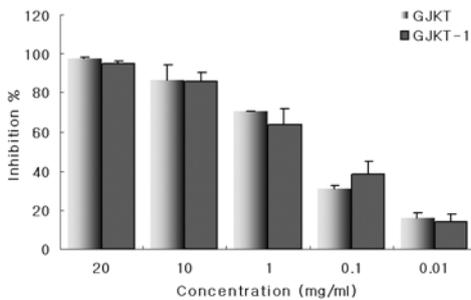


Fig. 4. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on human platelet aggregation with 5 μg/ml of collagen.

4) Arachidonic acid에 의한 혈소판 응집에 미치는 영향

Arachidonic acid(5 mM)에 의한 혈소판 응집 억제 효과를 검색한 결과, GJKT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01mg/ml 농도에서 각각 94.7 ± 2.7%, 69.7±1.3%, 38.6±6.4%, 5.0±2.5%, 3.0±1.5%의 응집 억제율을 나타내었고, GJKT-1 extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 95.2±2.2%, 63.8±11.8%, 14.5±1.5%, 11.0±3.0%, 6.0±2.0%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 5).

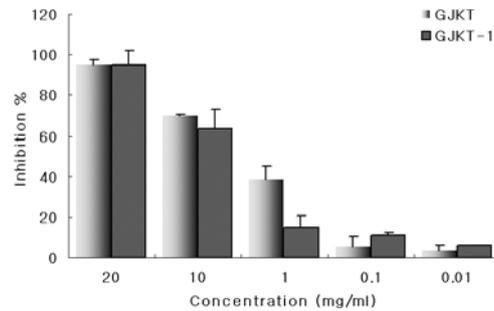


Fig. 5. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on human platelet aggregation with 5 mM of arachidonic acid.

5) E_{max}와 EC₅₀값

응집 유도체를 사용한 경우, GJKT extract 투여군에서 ADP는 E_{max}가 106.2 ± 2.2%, EC₅₀은 3.8 ± 2.5 mg/ml로 나타났으며, epinephrine은 E_{max}가 118.7 ± 2.8%, EC₅₀은 5.1 ± 3.02 mg/ml, collagen의 경우는 E_{max}가 98.3 ± 1.2%, EC₅₀은 0.6 ± 4.9 mg/ml, arachidonic acid는 E_{max}가 98.2 ± 0.9%, EC₅₀은 2.9 ± 0.2 mg/ml로 나타내었다. 또한 GJKT-1 extract 투여군에서 ADP는 E_{max}가 126.3 ± 2.4%, EC₅₀은 7.2 ± 2.8 mg/ml로 나타났으며, epinephrine는 E_{max}가 119.0 ± 14.6%, EC₅₀은 5.3 ± 1.6 mg/ml, collagen의 경우는 E_{max}가 101.8 ± 20.3%, EC₅₀은

0.6±5.9 mg/ml, arachidonic acid는 E_{max}가 136.8±16.1%, EC₅₀은 9.6±2.1 mg/ml로 나타내었다(Table 2).

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

Parameter Inducer	E _{max} (%)		EC ₅₀ (mg/ml)	
	GJKT	GJKT-1	GJKT	GJKT-1
ADP	106.2	126.3	3.8	7.2
	±2.2	±2.4	±2.5	±2.8
Epinephrine	118.7	119.0	5.1	5.3
	±2.8	±14.6	±3.02	±1.6
Collagen	98.3	101.8	0.6	0.6
	±1.2	±20.3	±4.9	±5.9
Arachidonic acid	98.2	136.8	2.9	9.6
	±0.9	±16.1	±0.2	±2.1

3. 혈소판에서의 GPIIb/IIIa 발현에 미치는 영향

형광 유세포 분석을 통해 collagen에 의해 유발된 혈소판 응집에서 GPIIb/IIIa 발현율을 측정된 결과, 정상군은 11.4%로 나타난 반면, 대조군에서는 99.3% 나타나 응집 정도가 현저하게 증가하였으며, GJKT extract의 농도 250 µg/ml에서는 88.4%, 500 µg/ml 농도에서는 49.8%, 1000 µg/ml 농도에서는 16.3%로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 발현이 감소하였고, GJKT-1 extract 역시 농도 250 µg/ml에서는 92.02%, 500 µg/ml 농도에서는 72.1%, 1000 µg/ml 농도에서는 15.0%로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 발현이 감소하였다(Fig. 6).

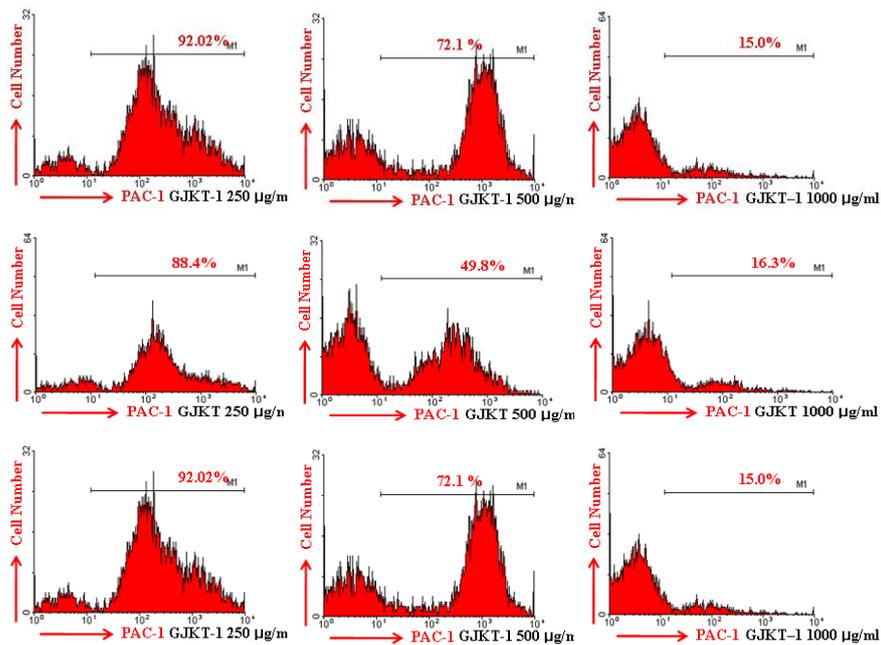


Fig. 6. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on binding of fibrinogen to platelet GPIIb/IIIa.

The inhibitory effect of GJKT, GJKT-1 extract on binding of fibrinogen to platelet GPIIb/IIIa in collagen stimulated platelets was examined by flow cytometric analysis. The point show the fluorescence signal of collagen activated platelets in the presence of various concentration of GJKT, GJKT-1 extract.

4. TXB₂ 생성에 미치는 영향

GJKT extract에 의한 TXB₂의 생성 저해능을 측정된 결과, 정상군에서는 0.29±0.01(OD), 대조군에서는 0.33±0.02(OD)로 나타났으며, GJKT extract 250, 500, 1000 µg/ml 농도에서 각각 0.33±0.03(OD), 0.32±0.05(OD), 0.24±0.07(OD)로 나타났고, GJKT-1 extract 250, 500, 1000 µg/ml 농도에서는 각각 0.30±0.00(OD), 0.27±0.02(OD), 0.20±0.03(OD)로 나타나 대조군에 비하여 GJKT-1 extract 투여군에서 유의성 있는(*p<0.05, **p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 7).

GJKT extract에 의한 PGE₂의 생성 저해능을 측정된 결과, 정상군에서는 0.20±0.01(OD), 대조군에서는 0.38±0.02(OD)로 나타났으며, GJKT extract 250, 500, 1000 µg/ml 농도에서 각각 0.31±0.05(OD), 0.31±0.01(OD), 0.24±0.01(OD)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01, ***p<0.001) 감소를 나타내었다. GJKT-1 extract 250, 500, 1000 µg/ml 농도에서는 0.38±0.02(OD), 0.33±0.03(OD), 0.31±0.02(OD)로 나타나 대조군에 비하여 GJKT-1 extract 투여군 1000 µg/ml 농도에서 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 8).

5. PGE₂ 생성에 미치는 영향

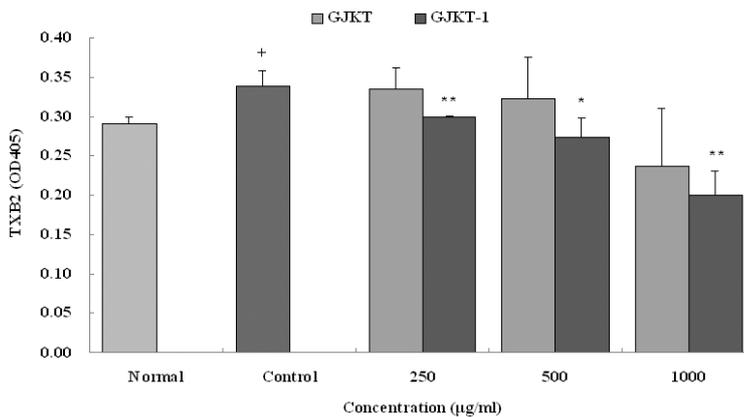


Fig. 7. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on thromboxane B₂ formation in collagen stimulated platelets.

Normal : Platelet. Control : Platelet and collagen.

GJKT, GJKT-1 250 : Platelet, collagen add GJKT, GJKT-1 extract 250 µg/ml.

GJKT, GJKT-1 500 : Platelet, collagen add GJKT, GJKT-1 extract 500 µg/ml.

GJKT, GJKT-1 1000 : Platelet, collagen add GJKT, GJKT-1 extract 1000 µg/ml.

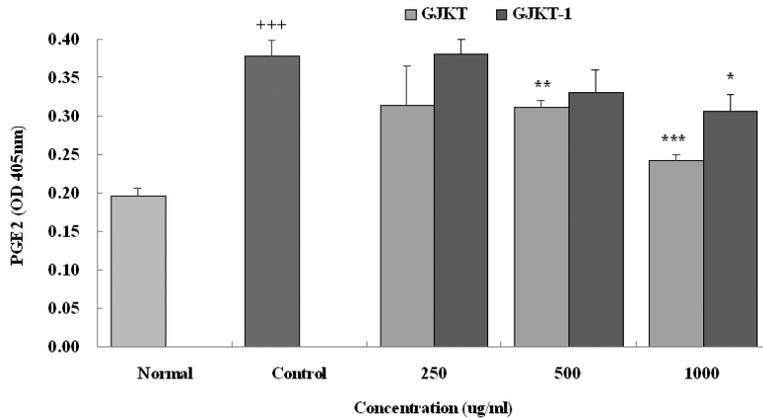


Fig. 8. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on prostaglandin E₂ formation in collagen stimulated platelets.

6. FXa assay

GJKT extract에 의한 factor Xa의 inhibition %를 농도별로 측정된 결과, 대조군에서는 3.25±0.2%로 나타났으며 1, 5, 10µg/ml에서는 각각 24.3±1.3%, 31.6±2.5%, 37.1±2.6%로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는(***p<0.001) 결과를 나타냈고, GJKT-1 extract에서는 대조군에서는 2.7±0.4%로 나타났으며 1, 5, 10 µg/ml에서는 각각 18.4±3.9%, 24.4±3.0%, 31.3±1.9%로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는(**p<0.01, ***p<0.001) 결과를 나타내었다(Table 3).

7. 폐색전에 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 지속 되었다. 이에 반하여

GJKT extract 투여군은 8마리 중 4마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 50%의 억제 효과를 나타내었고, GJKT-1 extract 투여군은 8마리 중 4마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 50%의 억제 효과를 나타내었다(Table 4).

Table 3. Inhibition of Factor Xa Activity(%)

Concentration (µg/ml)	Inhibition %	
	GJKT	GJKT-1
0	3.25 ± 0.2	2.7 ± 0.4
1	24.3 ± 1.3***	18.4 ± 3.9**
5	31.6 ± 2.5***	24.4 ± 3.0***
10	37.1 ± 2.6***	31.3 ± 1.9***

Control : Human FXa(5 nM) and FXa chromogenic substrate S-2765(100 µl) treated group.

GJKT : Human FXa(5 nM), FXa chromogenic substrate S-2765(100 µl) add GJKT extract treated group.

GJKT-1 : Human FXa(5 nM), FXa chromogenic substrate S-2765(100 µl) add GJKT-1 extract treated group.

Table 4. Effect of GJKT, GJKT-1 on Pulmonary Embolism Mice

	Dose (mg/mouse)	No. of killed or paralyzed / No. tested	Protection ratio (%)
Control	HBSS*	8/8	0
Aspirin	2.5	2/8	75.0
GJKT	5.1	4/8	50.0
GJKT-1	2.4	4/8	50.0

* HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

Control : Collagen(11.3 μ g) and epinephrine(1.3 μ g/200 μ l/25 g) treated group.

Aspirin : Collagen(11.3 μ g) and epinephrine(1.3 μ g/200 μ l/25 g) treated group after oral administration of aspirin(0.1 mg/g).

GJKT : Collagen(11.3 μ g) and epinephrine(1.3 μ g/200 μ l/25 g) treated group after oral administration of GJKT extract(5.1 mg/25 g).

GJKT-1 : Collagen(11.3 μ g) and epinephrine(1.3 μ g/200 μ l/25 g) treated group after oral administration of GJKT-1 extract(2.4 mg/25 g).

8. AV shunt model에 대한 효과

GJKT extract에 의한 Arteriovenous shunt의 thrombus의 weight(mg)와 inhibition (%)을 측정 한 결과, 대조군에서는 190.0 \pm 10.0 mg으로 나타내었고, Rivaroxaban 에서는 45.0 \pm 1.5 mg으로, 76.3%, GJKT 에서는 160.0 \pm 10.0 mg으로, 15.8%, GJKT-1 에서는 145.0 \pm 5.0 mg으로, 23.7%를 나타 내어 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Arteriovenous Shunt (AV shunt) of Thrombus Weight and Inhibition

Drugs	weight(mg)	inhibition (%)
Control	190.0 \pm 10.0	
Rivaroxaban	45.0 \pm 1.5***	76.3
GJKT	160.0 \pm 10.0**	15.8
GJKT-1	145.0 \pm 5.0**	23.7

Control : no treated group. Rivaroxaban : 5 mpk oral treated group.

GJKT : GJKT extract oral treated group.

GJKT-1 : GJKT-1 extract oral treated group.

9. Rat tail bleeding assay

GJKT extract에 의한 rat tail bleeding 의 time을 측정한 결과, 대조군에서는 332.2 \pm 26.3 sec, Rivaroxaban에서는 1200.0 \pm 0.00 sec, GJKT extract 투여군에서는 351.4 \pm 17.0 sec, GJKT-1 extract 투여군 에서는 334.3 \pm 27.0 sec로 나타내었다 (Table 6).

Table 6. Effects of GJKT, GJKT-1 and Rivaroxaban on the Tail Bleeding Time in Rats

drugs	Concentration	Bleeding Time(sec)
Control	0	332.2 \pm 26.3
Rivaroxaban	5 mpk	1200.0 \pm 0.00
GJKT	142.3 mg/350 g	351.4 \pm 17.0
GJKT-1	68.2 mg/350 g	334.3 \pm 27.0

10. 항산화 활성에 미치는 영향

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

DPPH의 소거능은, GJKT extract 1000, 500, 250, 125, 62.5 μ g/ml 농도에서 각각 82.6 \pm 1.4%, 76.4 \pm 7.0%, 63.2 \pm 5.8%, 38.4 \pm 3.5%, 32.0 \pm 1.1%의 소거 효과를 나타내었고, GJKT-1 extract 1000, 500,

250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 76.1 \pm 5.7%, 69.1 \pm 1.0%, 56.6 \pm 1.4%, 51.0 \pm 4.0%, 37.2 \pm 1.8%의 소거 효과를 나타내었다 (Fig. 9).

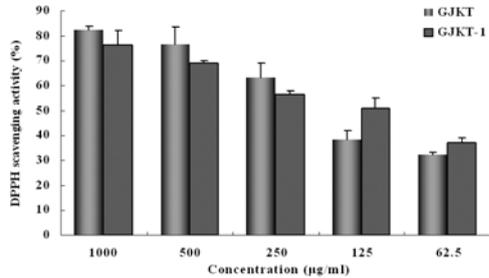


Fig. 9. Scavenging activities of GJKT, GJKT-1 extract on DPPH free radical. GJKT, GJKT-1 extract were reacted with DPPH for 30 mins at 37°C, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean \pm S.D.

2) SOD 유사 활성에 미치는 영향

SOD 유사 활성은 GJKT extract 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 61.2 \pm 5.1%, 48.9 \pm 3.0%, 43.5 \pm 3.3%, 35.3 \pm 5.6%, 6.0 \pm 4.2%의 유사 활성 효과를 나타내었고, GJKT-1 extract 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 52.8 \pm 8.7%, 42.8 \pm 1.4%, 26.3 \pm 8.6%, 27.9 \pm 12.9%, 16.3 \pm 4.6%의 유사 활성을 나타내었다(Fig. 10).

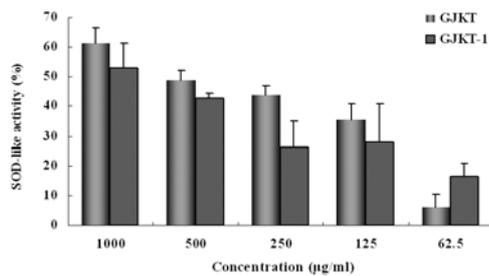


Fig. 10. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on superoxide dismutase like activity.

GJKT, GJKT-1 extract were reacted with tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 ml and 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml for 10 mins at 25°C, and determined at 420 nm after stopping the reaction by adding 0.1 ml of 1 N HCl. The results are the mean \pm S.D.

11. THP-1 세포주에서 염증 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 β 생성량

THP-1 세포주에서의 IL-1 β 생성량을 보면 정상군은 42.4 \pm 8.3 pg/ml, 대조군은 418.5 \pm 7.4 pg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, GJKT extract는 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 268.4 \pm 10.1 pg/ml와 369.7 \pm 0.9 pg/ml로, GJKT-1 extract는 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 239.8 \pm 4.6 pg/ml와 293.7 \pm 8.3 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있는(**p<0.001, **p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 11).

2) IL-6 생성량

THP-1 세포주에서의 IL-6 생성량을 보면 정상군은 24.6 \pm 0.6 pg/ml, 대조군은 160.2 \pm 5.1 pg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, GJKT extract는 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 88.3 \pm 0.8 pg/ml로, GJKT-1 extract는 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 82.4 \pm 6.8 pg/ml와 123.2 \pm 3.1 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 12).

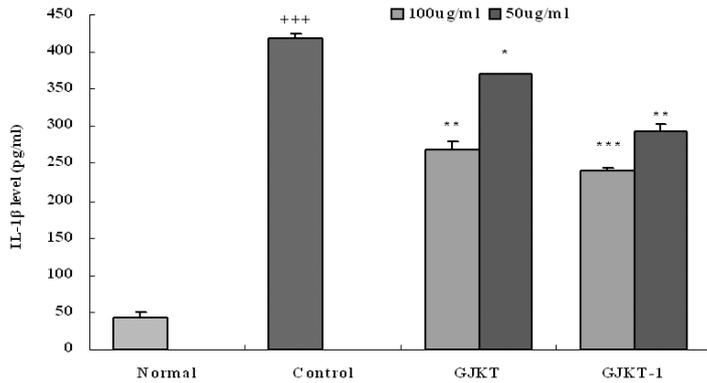


Fig. 11. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on the levels of IL-1 β in the THP-1 cell. THP-1 cells were pretreated with GJKT/GJKT-1 extract for 1 hour, and then incubated with LPS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 hours. The levels of IL-1 β were determined using a commercially available ELISA kit.

Normal : no treated group. Control : LPS stimulated group.

GJKT : LPS stimulated group after treatment of GJKT extract(50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

GJKT-1 : LPS stimulated group after treatment of GJKT-1 extract(50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

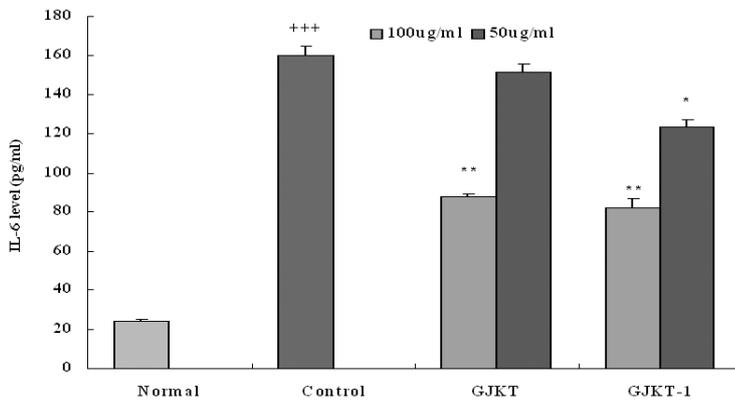


Fig. 12. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on the levels of IL-6 in the THP-1 cell. The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA kit.

3) TNF- α 생성량

THP-1 세포주에서의 TNF- α 생성량을 보면 정상군은 $54.6 \pm 0.8 \text{ pg}/\text{ml}$, 대조군은 $401.0 \pm 8.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는($+++p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, GJKT extract는 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 투여에서 $291.6 \pm 3.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 로, GJKT-1 extract는 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 투여에서 각각 $269.2 \pm 5.1 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($**p < 0.01$) 감소를 나타내었

다(Fig. 13).

4) MCP-1 생성량

THP-1 세포주에서의 MCP-1 생성량을 보면 정상군은 $136.7 \pm 13.0 \text{ pg}/\text{ml}$, 대조군은 $769.8 \pm 18.9 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는($+++p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, GJKT은 $100, 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 투여에서 각각 $418.9 \pm 5.2 \text{ pg}/\text{ml}$ 와 $475.7 \pm 54.3 \text{ pg}/\text{ml}$ 로, GJKT-1은 $100, 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 투여에서 각각 $413.6 \pm 12.7 \text{ pg}/\text{ml}$ 와 513.0

±55.1 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 소를 나타내었다(Fig. 14).
모두 유의성 있는(**p<0.01, *p<0.05) 감

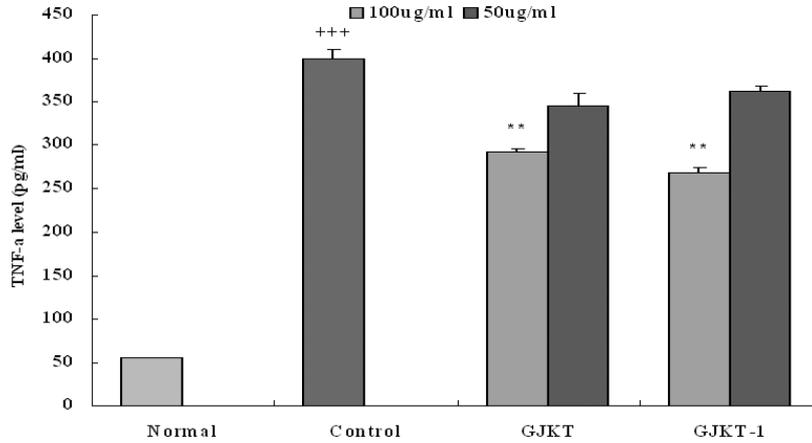


Fig. 13. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on the levels of TNF-α in the THP-1 cell. The levels of TNF-α were determined using a commercially available ELISA kit.

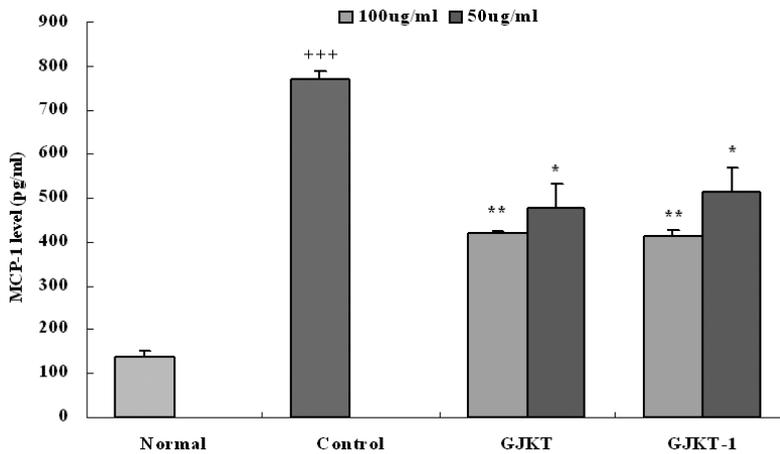


Fig. 14. Effects of GJKT, GJKT-1 extract on the levels of MCP-1 in the THP-1 cell. The levels of MCP-1 were determined using a commercially available ELISA kit.

IV. 考 察

加味調經湯은 《葉天士女科》¹⁾에 수재된 調經湯에 補血行血化瘀, 舒筋活絡하는 鷄血藤과 行血祛瘀, 止痛消腫하는 蘇木^{2,24)}을 가미한 임상처방이다. 調經湯은 《葉天士女科·調經》¹⁾에서 “治經閉浮

腫”이라 하여 瘀血로 인한 經閉와 浮腫에 활용하는 처방이다. 加味調經湯의 구성약물 효능을 살펴보면, 生地黃은 清熱涼血, 養陰生津, 當歸는 補血化血, 調經止痛, 益母草는 活血調經, 利水退腫, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛, 白芍藥은 養血柔肝, 緩中止痛, 香附子는 理氣解鬱, 止

痛調經, 白茯苓은 利水滲濕, 健脾寧心, 牡丹皮는 清熱涼血, 活血散瘀, 鷄血藤은 行血補血化瘀, 舒筋活絡, 蘇木은 行血破瘀, 消腫止痛, 甘草는 和中緩急, 潤肺解毒, 調和諸藥, 生薑은 解表散寒, 溫中止嘔, 大棗는 補脾和胃, 調榮衛하여^{2,24)}, 加味調經湯은 活血祛瘀調經 및 利水消腫止痛의 效能으로 사용되어지는 처방이다.

經閉라는 명칭은 《婦人大全良方》²⁵⁾에서 처음 사용되었는데 《內經》²⁶⁾에서는 不月, 《脈經》²⁷⁾에서는 經水不通, 《諸病源候論》²⁸⁾에서는 月水不通, 《東垣脾胃論》²⁹⁾에서는 血枯經絕, 송 등^{30,31)}의 현대문헌에서는 無月經, 閉經이라고 명명되기도 하였다. 여러 醫家는 經閉의 주요한 원인 중의 하나를 瘀血로 보고 있는데, 《校注婦人良方·婦人腹中瘀血方論》³²⁾에서는 “婦人腹中瘀血者 由月經閉積或產後餘血未盡 或風寒滯瘀 久而不消 則爲積聚矣”라 하였고, 이³³⁾는 “經病百端血滯枯”라 하여 經病의 主原因이 瘀血임을 언급하였으며, 《景岳全書·婦人規》³⁴⁾에서는 “肝主疏泄而氣抑鬱 肝氣不舒畢容易橫逆 若肝氣橫逆 氣鬱血滯而痛經者”라 하여 經閉의 주요한 원인을 瘀血이라고 언급하였다.

이처럼 婦人은 血을 위주로 하며, 월경, 임신, 출산이라는 고유한 생리적 특성을 가지고 있어서, 이로 인해 婦人病證의 大綱을 이루고 있는 월경병, 성기병, 임신병과 산후병 등에서 瘀血이 병인으로서 차지하고 있는 중요성은 매우 크다³⁰⁾. 부인과 영역에서 瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 凝聚되어 형성된 일종의 병리적 산물인 동시에 致病因子가 되는 것으로 血液運動循環障礙와 血液速度減少의 병리상태를 포괄한다. 瘀

血의 형성은 혈액의 운행이 阻滯不暢하고 經脈 內에 留滯되었거나 혈액이 經脈 外로 溢出하고 조직 간에 축적되었다가 器官 內에 瘀積되어 消散되지 못하면 瘀血이 생성된다. 瘀血이 일단 생성되면 다시 발병인자가 되어 계속해서 氣機를 阻滯하고 氣血의 運行에 영향을 미쳐 臟腑機能을 失調케 하는 循環이 계속되므로 瘀血은 일종의 중요한 발병인자에 속하는 것이다³⁵⁾. 즉 瘀血은 혈액순환장애, 혈액성분의 변화 및 결체조직의 증식, 변성으로 인식되어지고 있는데, 이는 서양의학의 혈전의 개념과 유사하다^{3,4)}.

혈전이란 생체의 혈관 내에서 응고된 혈액의 덩어리를 말하는 것으로 혈액의 응고체제는 혈관의 수축과 함께 과도한 출혈을 방지할 수 있는 중요한 생체기능의 하나이지만 심장이나 혈관내의 항응고체제와의 균형이 어긋나는 병적인 상태가 되면 혈액의 응고를 유발할 수 있게 된다^{6,36)}. 혈전의 성립요인으로는 혈류의 정체나 와류가 있을 때 활성화된 응고인자의 회석과 청소가 안 되어 혈류 속도가 떨어지는 경우와 혈관내피의 손상에 의해 혈소판의 응고 덩어리가 핵이 되어 혈전을 형성하는 경우, 그리고 혈소판 수나 성질의 변화, 항응고인자의 결핍, 패혈증이나 암에 동반된 응고항진 상태 및 경구용 피임약을 장기 복용할 때에 나타날 수 있는 혈액조성의 변화에 기인하는 경우 등이 있다^{36,37)}. 혈전에 의한 증상은 매우 다양하여 그 증상이 전혀 나타나지 않는 경우에서부터 鬱血, 浮腫, 梗塞, 혹은 壞疽, 心臟機能의 機械的 障礙, 敗血症 등이 나타날 수 있으며 冠狀血管閉塞 또는 腹部大動脈血栓에 의하여 갑작스런 사망에 이르는 경우도 있

다³⁸⁾. 이러한 증상은 한의학에서 瘀血로 인한 血行凝結不行으로 야기되는 병증과 유사한 점이 많으며³⁹⁾, 최근에 강 등^{40,41)}은 혈전증을 瘀血의 범주에 포함시키기도 하였다.

염증반응은 조직손상 또는 세균감염으로 인하여 발생하는 것으로 어떠한 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로 생체조직이 생물학적, 물리적, 화학적, 면역학적인 원인에 의하여 손상 받았을 때, 이 손상을 국소화 시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 고도로 발달된 자기방어체계인 면역과정의 일부분이다. 이 때 손상부위에서는 손상부위의 혈관, 신경, 세포, 체액 등 모든 반응이 관여하여 복잡한 과정으로 이루어지는데, 이러한 염증반응은 살아있는 조직, 즉 혈관이 있는 조직에서만 일어날 수 있는 특징을 가지고 있다. 염증은 미세혈관계를 통하여 나타나는 생체의 방어기전으로 이해된다. 염증의 증상은 감염부위에 혈관이 확장되어 發赤과 發熱을 유발하며 모세혈관의 투과성이 증가되어 조직으로 체액과 세포들이 나와 삼출액이 축적되어 부종을 유발하게 되는데, 이는 혈류 및 혈관 크기의 변동, 혈관 투과성의 변화, 백혈구 침윤에 기인 한다^{6,42,43)}. 최근의 瘀血에 관한 다양한 연구에서는 循環障礙로 일어나는 缺血, 鬱血, 血栓形成 및 水腫 등과 같은 대사 장애로 일어나는 조직의 병리반응과 세포 분화불량과 염증으로 인한 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축 혹은 증식 등이 瘀血의 병태와 유사하다고 보고 있다⁴⁴⁾.

이처럼 어혈 및 혈전과 염증과의 연관성을 토대로 活血化瘀 處方으로 항혈전 및 항염증 작용을 규명하는 연구가 이루어

어지고 있다. 이⁸⁾는 銀甲方加減, 정⁹⁾은 慢盆方, 제¹⁰⁾는 稜莖消積湯, 임 등¹¹⁾은 複方紅藤敗醬散, 손¹²⁾은 加味生化湯, 김¹³⁾은 淸熱消毒飲, 홍¹⁴⁾은 秘方奪命散, 이¹⁵⁾는 少腹逐瘀湯, 이¹⁶⁾는 加味通經湯 등이 항혈전 및 항염증 작용이 있음을 보고한 바 있다.

현재 한방의료기관에서 기계를 활용하여 이용되고 있는 전탕방식에는 압력식, 무압력식으로 크게 구분되고 있는데¹⁷⁾, 기존의 항혈전 및 항염증에 관한 活血化瘀加味方 실험들은 대개 무압력식 전탕법에 의해 확보된 시료를 바탕으로 실험되었다.

이에 저자는 瘀血로 인한 經閉에 활용되는 加味調經湯이 항혈전 및 항염증 효과가 있을 것으로 추측되었고, 이러한 전제 하에 고압 전탕법과 재래식 전탕법으로 시료를 확보한 후 전탕방법에 따른 항혈전과 항염증 효능을 비교 검증하기 위해 실험을 수행하였다.

혈소판은 지혈을 담당하는 중요한 혈액 성분의 하나이며, 혈전 형성 성분이기도 하다. 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 된다⁴⁵⁻⁴⁸⁾. 콜라겐이나 외부 물질의 표면에 부착한지 수초 내에 모양이 변화하면서 ADP, ATP, thrombin, serotonin 등을 분비한다⁴⁵⁻⁵²⁾. 분비된 ADP는 이차적 혈소판 응집을 유도하는데, 이는 serotonin에 의한 혈관 수축 작용과 함께 가장 중요한 지혈 과정을 담당한다⁵¹⁾. 또한 혈소판은 막 인

지질(membrane phospholipid)로부터 생긴 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 여러 종류의 프로스타글란딘(prostaglandin)을 만든다⁴⁷⁻⁵⁴. 다음으로 혈액 응고계가 활성화되면서 섬유소의 형성이 뒤따르게 되며 이차 지혈(secondary hemostasis)이 이루어져 지혈 과정이 완성된다^{55,56}. 그러나 혈소판이 어떤 원인에 의해 과다하게 활성화되면 혈관 내 혈전이 형성되어 침착되는 혈전증을 유발하여 혈관계 질환의 발생에 주도적인 역할을 하게 된다⁵⁷. 따라서 혈소판의 변화는 응혈 및 혈전 형성 여부의 대표적 지표가 된다⁵⁸.

따라서 본 실험에서는 먼저 *in vitro*에서 항혈전 효능 검증에 앞서 실험 농도의 설정을 위해 hFCs에 대한 세포독성 평가를 하였는데, 고농도에서 세포독성이 없는 것으로 평가 되었다(Fig. 1). 또한 혈전 형성의 중요한 인자로 작용하는 혈소판에 대하여 GJKT/GJKT-1의 항혈소판(antiplatelet) 효능 비교를 검증하고자 유도인자인 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid를 PRP에 처리한 후 응집 억제능을 평가하였다. 혈소판 응집의 주요한 인자로 알려진 이들에 대하여 GJKT/GJKT-1는 농도 의존적으로 혈소판 응집을 억제하였고(Fig. 2-5), EC₅₀ 값으로 GJKT 투여군에서 ADP는 3.8±2.5 mg/ml, epinephrine은 5.1±3.02 mg/ml, collagen의 경우는 0.6±4.9 mg/ml, arachidonic acid는 2.9±0.2 mg/ml로 나타내었다. 또한 GJKT-1 투여군에서 EC₅₀ 값으로 ADP는 7.2±2.8 mg/ml, epinephrine는 5.3±1.6 mg/ml, collagen의 경우는 0.6±5.9 mg/ml, arachidonic acid는 9.6±2.1 mg/ml로 나타나(Table 2) 전반적으로 농도 의존적이라는 점에서 의미 있는 결과로 보인다.

혈소판 막표면 당단백인 GPIIb/IIIa는 휴지상태의 혈소판에서 약 70%가 막표면에 노출되어 있지만 fibrinogen과는 친화력이 낮아 결합하지 않는다. 그러나 혈소판이 혈관내피 손상이나 혈류 장애 등에 의해 활성화되면 표면 연결소관계(surface connected canalicular system)와 세포질 내 α-과립막에 존재하던 GPIIb/IIIa 도 모두 표면으로 이동하여 수적으로 증가되는 한편 fibrinogen과의 결합 친화력이 매우 높아진다. 혈소판은 fibrinogen과 결합하여 혈소판응집을 형성하게 되는데, 이 과정은 모든 혈소판 활성화 유발 인자에 공통적인 혈전형성의 최종단계이다⁶⁰. 따라서 GPIIb/IIIa는 혈소판 활성을 측정할 수 있으며, 이는 fibrinogen 수용체를 인식하는 항체인 PAC-1에 의해 검출할 수가 있다⁶¹. GPIIb/IIIa 활성을 collagen에 의한 혈소판의 응집 정도를 통하여 평가한 결과 GJKT/GJKT-1 모두 농도 의존적으로 발현을 억제하였다(Fig. 6). 이는 GJKT/GJKT-1이 GPIIb/IIIa 수용체와 fibrinogen의 결합을 저해함으로써 혈소판 응집이 억제됨을 실험적으로 증명한 결과라 하겠다.

TXB₂와 PGE₂는 상기한 바와 같이 세포막의 인지질로부터 합성된 Arachidonic acid가 대표적으로 cyclooxygenase와 lipoxygenase pathway를 거치는 가운데 그 중 cyclooxygenase(COX) 생성물에 의해 만들어진 대사산물이다. collagen에 의하여 활성화된 혈소판은 이러한 arachidonic acid의 기전에 의하여 COX와 Thromboxanes(TXS)에서 TXB₂와 PGE₂와 같은 대사산물을 증가시킨다⁵³. 본 실험에서는 GJKT/GJKT-1의 혈

소판에서 arachidonic acid(AA)의 연속 반응의 대사물인 TXB₂와 PGE₂에 대한 억제능을 관찰하였는데, TXB₂와 PGE₂의 대사물 유리에 대하여 GJKT/GJKT-1 모두 PGE₂ 생성을 유의성 있게 억제시켰으나, TXB₂ 생성에 대해서는 GJKT-1만이 대조군에 비해 유의성 있게 억제시켰다(Fig. 7, 8).

혈액응고는 여러 종류의 단백질 분해 효소들에 의한 활성화의 연속적인 반응 경로를 통해 일어나는데, 그 중 첫 번째가 혈액응고가 시작되어 thrombin이 형성하기 전까지의 과정이다. 이는 내인성 및 외인성의 2가지 경로가 있는데, 내인성 경로는 제 XIII인자, 제 XI인자, prekallikrein(PK), 고분자 kininogen(HK)이 혈관 벽이 노출된 collagen에 접촉됨으로써 시작된다. 이어서 prekallikrein에서 생긴 활성화된 kininogen에 의해서 Ca²⁺ 존재 하에서 제 XIII인자가 활성화되어, XIIIa인자가 되고 XIIIa는 제 XI인자를 XIa로 활성화시키며, XIa인자가 제 X인자에 작용하여 Xa를 생성한다. 또한 외인성 경로는 조직상해 장소에서의 조직인자가 유리되면서 시작되는데, 조직인자, 제 VII인자, 제 X인자에 작용하여 Xa가 생성된다. 이처럼 FXa는 혈액 응고 과정에서 내인성, 외인성 경로가 합류한 공통 경로의 가장 첫 단계에 위치한 것으로, 이는 prothrombin을 활성화시켜 thrombin을 생성하고, thrombin에 의해서 fibrinogen이 fibrin이 되어 응혈덩어리를 형성하는 일련의 혈액응고 과정 중에 중요한 인자로서 FXa 활성을 통해 혈액 응고 활성을 평가할 수 있다^{61,62}. 이에 GJKT/GJKT-1에 의한 FXa inhibition %를 FXa 활성에 따른 S-2765의 가수분해 비

율로 결정하여 농도별로 측정된 결과 GJKT/GJKT-1 모두 FXa 활성을 농도의존적으로 억제시켰다(Table 3).

다음으로 *in vivo*에서는 세 가지 동물 병태 모델을 이용하여 항혈전 작용을 검토하였다. 먼저 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서는 양성 대조군인 aspirin 투여군에 비하여 상대적으로 낮지만 50%의 억제 효과를 나타내었다(Table 4). 그 다음으로 GJKT/GJKT-1을 투여 후 AV shunt의 thrombus weight와 inhibition을 측정된 결과 양성 대조군인 Rivaroxaban 투여군에 비하여 상대적으로 낮지만 GJKT/GJKT-1에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 5). 마지막으로 rat tail bleeding time의 측정은 혈소판과 혈장인자들 그리고 혈관 벽과 연관된 hemostatic plug를 형성하는 능력을 측정하기 위해 고안된 실험으로써 rat tail bleeding system을 이용하여 GJKT/GJKT-1의 혈행 개선 효과를 시험하였다. 실험 결과, GJKT/GJKT-1 투여군 모두 대조군에 비해 증가되었으나 유의성은 없었다(Table 6). 이러한 *in vivo* 실험을 통해 GJKT/GJKT-1이 혈액 응고 기전에 관여함을 알 수 있었다.

활성산소란 산소를 이용한 산화과정 중 발생하며 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의해 유발되는 superoxide anion radical(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂), hydroxyl radical(HO⁻), singlet oxygen(¹O₂)과 같은 반응성이 매우 큰 상태의 물질로, 생체 내에서 산화적 손상을 유발한다. 구체적으로 산화적 손상은 종양의 형성, 혈관 내 지방 축적,

진성 당뇨병과 노화 등 병리학적 질병을 유발하며, 특히 활성산소종은 일반적으로 생체 내 구성요소들과 반응하여 세포 손상에 중요한 역할을 한다. 세포 내 활성산소종의 증가는 혈관내피세포 손상을 초래하고 산화된 저밀도 지방 단백질의 활동은 활성산소종의 증가와 관련이 있다고 알려져 최근에는 활성산소종이 혈관계에 미치는 영향에 대한 연구가 지속되고 있다⁶³⁻⁶⁷.

활성산소가 혈관내피 손상 과정에서 혈소판의 응집을 증가시키는 것으로 현재까지 밝혀진 기작은 다음과 같다. 우선 활성산소가 혈소판 응집이 일어나는 cascade의 초기 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 tissue factor (TF)의 발현을 혈관내피세포에서 크게 증가시키거나⁶⁸, 혈소판의 thrombin, collagen, ADP, arachidonic acid 등에 대한 감수성을 증가시켜 응고를 유발시키는 직접적인 기작이 있다^{69,70}. Nitrite (NO)는 혈전의 형성을 억제하는 기능이 있는데 이것에 superoxide가 결합하면 peroxynitrite(ONOO⁻)가 형성되면서 NO의 농도가 낮아지게 되는데, 이러한 방식으로 활성산소가 혈전 형성을 촉진하는 역할을 한다⁷¹. 이러한 이론을 근거로 본 실험에서는 GJKT/GJKT-1의 항산화작용에 대한 평가를 위해 DPPH 소거능, superoxide dismutase(SOD) 유사활성을 측정하였다.

DPPH 소거 활성 측정은 약물에 들어 있는 여러 가지 항산화 물질에 의한 항산화 능을 측정하는 방법⁷²으로, 안정한 라디칼을 이용한 까닭에 간편하고 재현성이 뛰어나 산화적 손상의 기본 실험으로 사용된다. SOD는 superoxide를

H₂O₂와 H₂O로 분해하는 항산화 효소로, SOD 유사 활성 측정은 pyrogallol이 수용액에서 superoxide의 관여에 의해 빠르게 자동 산화되는 것을 이용한 것이다⁷³. 따라서 SOD나 SOD유사 활성 물질이 존재하는 경우 pyrogallol의 자동 산화가 억제됨으로써 항산화 물질임을 증명하는 것이다. 본 실험에서는 GJKT/GJKT-1 모두 대조군에 비해 DPPH에 의한 산화적 손상을 농도 의존적으로 감소시켰으며, SOD 유사활성은 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 9, 10). 이를 통해 GJKT/GJKT-1의 항산화 효과를 확인할 수 있었다.

마지막으로 염증은 외부 자극에 대한 생체 조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, 사이토카인, PGE₂, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 염증반응이 시작되면 염증반응의 전사인자인 NF-κB가 활성화되는데, NF-κB의 활성화는 먼저 IL-1β, IL-6, IL-8과 TNF-α를 포함하는 일부 주요 염증촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하며, 염증반응 전반에 걸쳐 중요한 역할을 한다⁷⁴. 특히 TNF-α는 혈관 염증반응 시, 혈관 내피세포를 자극하여 IL-8, MCP-1과 같은 chemokine 생성을 유도하여 초기 염증반응을 매개한다. IL-8은 혈관 내피세포 주위로 면역세포 특히 호중구의 유입 및 부착을 유도하여 급성 혈관 염증반응을 유발하며, MCP-1은 혈관 내피세포 주위로 면역세포 특히 대식세포의 유입을 유도하여 만성 혈관 염증을 유발한다⁷⁵⁻⁷⁷. 아울러 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 보고⁷⁹⁾로 보아 면역 염증 반응과 혈전 형성 반응은 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨진다. 이를 근거로 하여 GJKT/GJKT-1의 항염증 효과를 실험적으로 검증하기 위해 LPS로 자극하여 염증을 유발시킨 THP-1 세포주에 GJKT/GJKT-1을 각각 투여하여 대표적인 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 MCP-1 생성량을 측정하였다. LPS가 체내로 주입되면 혈장에서 LPS 결합단백과 함께 백혈구나 내피세포의 CD14 수용체에 부착되어⁴³⁾ 세포 손상을 초래하며, 이들 세포로 하여금 혈소판활성화인자(platelet activating factor), prostaglandins, leukotrienes 등의 cytokines를 유리시키거나 complement 등의 혈장 단백을 활성화시키는데^{43,80,81)}, 이러한 인자들은 심근의 억제, 응고계의 활성화, 혈관확장, 여러 기관의 기능부전 등을 초래하게 된다^{43,82)}. 여기에서 LPS에 의해 응고계가 광범위하게 활성화 되는 것은 LPS가 내피세포와 혈장단백구를 자극하여 tissue factor를 유리시킴으로써 외인계를 활성화시키는 것이 주된 기전으로 알려져 있다^{81,83)}.

실험 결과, GJKT/GJKT-1 투여군 모두 IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1의 생성을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 11-14). 이를 통해 GJKT/GJKT-1의 항염증 효과를 인정할 수 있다.

이상의 실험 결과 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 항혈전 및 항염증, 항산

화 효과가 인정되므로, 여성 생식비뇨기의 瘀血 및 炎症性 질환에 유효하게 이용될 수 있을 것으로 여겨지며, 압력식과 무압력식의 종류에 따른 효능이 어느 한 방식에 있어 편향적인 것이 아니므로 향후 다른 처방의 전탕방식에 따른 효능 차이에 대해서 지속적인 실험 및 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서 加味調經湯을 고압 전탕법과 재래식 전탕법으로 시료를 확보한 후 전탕방법에 따른 항혈전과 항염증 효능을 비교 검증하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. hFCs에 대한 세포독성에서 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 LD₅₀이 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 나타났다.
2. 혈소판 응집 실험에서 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 ADP, epinephrine, collagen, Arachidonic acid에 의한 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하였다.
3. 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 대조군에 비해 GPIIb/IIIa 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다.
4. 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 대조군에 비해 PGE₂ 생성을 유의성 있게 억제시켰으나, TXB₂ 생성에 대해서는 무압력식으로 추출한 加味

調經湯만이 대조군에 비해 유의성 있게 억제시켰다.

5. 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 FXa 활성을 농도 의존적으로 억제시켰다.
6. 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 대조군에 비해 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 50% 억제하였다.
7. AV shunt model에서 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 대조군에 비해 AV shunt thrombus의 중량을 유의성 있게 감소시켰다.
8. 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 rat tail bleeding time을 대조군에 비해 증가시켰으나 유의성은 없었다.
9. 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 대조군에 비해 DPPH에 의한 산화적 손상을 농도 의존적으로 감소시키는 반면, SOD 유사활성은 농도 의존적으로 증가시켰다.
10. 압력식으로 추출한 加味調經湯과 무압력식으로 추출한 加味調經湯은 모두 THP-1 세포주에서 LPS에 의한 IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1의 생성을 유의성 있게 억제하였다.

이상의 결과에서 加味調經湯의 효능은 전탕 방법에 따른 차이는 없었고, 모두 항혈전 및 항염증, 항산화 효과가 인정되므로, 여성 생식비노기의 瘀血 및 염증성 질환에 활용될 수 있을 것으로 기

대된다.

參考文獻

1. 葉天士. 葉天士女科全書. 臺北:力行書局. 1982;30.
2. 金載益. 임상본초학강좌. 서울:대성의학사. 2001;624-625, 638-639.
3. 한의부인과학 편찬위원회. 한방부인과학(상). 서울:정담. 2002;3, 101.
4. 최승훈. 황제내경에서의 어혈의 인식에 대한 병리적 연구. 대전대학교논문집. 2006;6(2):313-320.
5. 鄧士賢. 活血化瘀藥的藥理與應用. 雲南中醫雜誌. 1985(5):50-53.
6. 대한병리학회. 병리학 II. 서울:高文社. 1995;71-104, 112-129, 540-542.
7. 송계용 등. 핵심 병리학. 서울:고려의학. 1998;62-94.
8. 전국한의학대학 병리학교실편. 동의병리학. 서울:一中社. 1999;152-165, 272-274, 424-426.
9. 이수정. 銀甲方加減이 血栓 病態 有關因子와 酸化的 損傷에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 2008.
10. 정우석. 慢益方이 血栓 病態 有關因子에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 2008.
11. 제종민. 稜莪消積湯의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2007.
12. 임동욱 등. 複方紅藤敗醬散의 抗血栓 및 抗炎作用에 대한 實驗的 研究. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):151-174.
13. 孫泰熏. 加味生化湯의 抗血栓 및 鎮痛效果에 對한 研究. 대전대학교 대

- 학원. 2001.
14. 김호민. 淸熱消毒飲이 實驗的 炎症 및 血栓症에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1995;10:267-293.
 15. 홍지우 등. 秘方奪命散의 抗炎症效果 및 抗凝固作用에 대한 研究. 대한동의병리학회지. 1998;12(2):63-72.
 16. 박병렬, 이상수. 少腹逐瘀湯이 抗血栓 및 消炎, 鎮痛에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):81-96.
 17. 이혜경. 加味通經湯의 抗血栓, 消炎 및 鎮痛作用에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2003;16(1):118-135.
 18. 徐富一 등. 壓力式과 無壓力式 煎湯方法으로 抽出한 五積散 물추출액이 關節炎에 미치는 效果. 동의·경산한의학 학술대회. 2000;4:55-64.
 19. 조영호. BCA 정색반응을 이용한 새로운 세포독성 분석법 개발과 항암제 탐색을 위한 그 이용. 건국대학교 대학원. 1992.
 20. MK Park et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of indole-3-carbinol *in vivo* and *in vitro*. *Phytother Res.* 2007.
 21. Scott R et al. Inhibition of long chain fatty acid metabolism does not affect platelet aggregation responses. *European Journal of Pharmacology.* 1998;207-213.
 22. Peter K et al. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa(αIIbβ3) inhibitors. *Blood.* 1998;92:3240-3249.
 23. Kimura et al. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim Forsch Drug Res.* 1985;35(II):1144-1149.
 24. 上海中醫學院編. 中草藥學. 商務印書館. 1983;42, 43, 120, 121, 127, 128, 226, 357, 378, 384, 387, 388, 399, 400, 524, 526, 564-566.
 25. 陳自明. 婦人大全良方. 北京:文光圖書有限公司印行. 1975;10-12.
 26. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院出版部. 1985;38.
 27. 沈炎南. 脈經校注. 北京:人民衛生出版社. 1991;259.
 28. 南京中醫學院編. 諸病源候論校釋. 北京:人民衛生出版社. 1983;54-56.
 29. 李杲. 東垣脾胃論. 서울:大星文化社. 1994;208-311.
 30. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:杏林出版社. 1978;45, 165, 182.
 31. 姜孝信. 東醫婦人科學. 서울:醫文社. 1966;136-142.
 32. 陳自明. 校注婦人良方. 台北:人民衛生出版社. 1985;215, 216.
 33. 李梴. 醫學入門. 台聯國風出版社. 1984;445, 446.
 34. 張介賓. 景岳全書(上). 上海:上海科學技術出版社. 1984;635-643.
 35. 김성훈 등. 동의병리학. 대전:한림원. 1994;348-356.
 36. 新太陽社 編輯局 百科事典部. 原色最新醫療大百科事典. 서울:新太陽社. 1996;66-68.
 37. 金正鎭. 生理學. 서울:高文社. 1985;59-63.
 38. 孫泰重. 病理學概論. 서울:高文社. 1979;84-86.
 39. 최승훈. 어혈의 병리에 관한 문헌적 고찰. 대전대학교논문집. 1985;4(1)

- :399-406.
40. 康舜洙. 韓醫學에서의 瘀血에 대한 概念. 대한한의학회지. 1984;5(1):138-140.
 41. 尹吉榮. 韓醫學의 客觀化와 東西醫學 病名 統一을 위한 方法. 동양의학. 1976;2(4):7-15.
 42. 송계용 등. 핵심 병리학. 서울:고려의학. 1998;62-94.
 43. Stanley L Robbins et al. Pathologic basis of disease(5th ed). Saunders. 1994;99-114, 117-121, 318, 319, 623-626.
 44. 張之南 等. 血瘀證與活血化瘀研究. 上海:上海科學技術出版社. 1990;429-431.
 45. 문형배 등. 일반병리학. 고문사. 2001;98-100.
 46. 전국의과대교수 역. 생리학. 한우리. 1999;569, 570.
 47. Andrews RK, MC Berndt. Platelet physiology and thrombosis. Thromb Res. 2004;114(5-6):447-453.
 48. S Kamath et al. Platelet activation: assessment and quantification. Eur Heart J. 2001;22(17):1561-1571.
 49. Packham MA. Role of platelets in thrombosis and hemostasis. Can J Physiol Pharmacol. 1994;72(3):278-284.
 50. Flores NA, Sheridan DJ. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia. Cardiovasc Res. 1994;28:295-302.
 51. Murugappa S, SP Kunapuli. The role of ADP receptors in platelet function. Front Biosci. 2006;11:1977-1986.
 52. Cowan DH. Platelet adherence to collagen: role of prostaglandin-thromboxane synthesis. Br J Haematol. 1981;49:425-434.
 53. Horn PT et al. Antagonism of prostanoid-induced vascular contraction by 13-azaprostanoic acid(13-APA). Journal of Cardiovascular Pharmacology. 1984;6:609-613.
 54. 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.
 55. Wang WY et al. Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa activation by 3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. Mol Pharmacol. 2006;70(4):1380-1389.
 56. Liu J et al. Botrocetin/VWF-induced signaling through GPIIb-IX-V produces TXA₂ in an alpha IIb beta 3- and aggregation-independent manner. Blood. 2005;106(8):2750-2756.
 57. Guyton AC. Hemostasis and blood coagulation. In: Textbook of Medical Physiology. Saunders. 1996;280-319.
 58. 이삼열, 정충섭. 임상병리검사법. 서울:연세대학교출판부. 1982;120-130.
 59. 임태현. 혈전성질환에서 혈소판막표면 당단백의 표현양상에 관한 연구. 서울대학교 대학원. 2001.
 60. 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;70(5):600-604.
 61. 한국생물과학협회 편. 생물학 사전. 서울:아카데미. 1998;163-169.

62. Hye-seon Choi, Yu-seon Sa. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*. 2003 ;92(3):545-552.
63. Mitsumoto A et al. Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(6):625-635.
64. Ward PA. Mechanisms of endothelial cell injury. *J Lab Clin Med*. 1991 ;118(5):421-426.
65. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997 ;272(33):20313-20316.
66. Yen CH et al. 17 Beta-estradiol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced generation of reactive oxygen species in endothelial cells. *Life Sci*. 2001;70(4):403-413.
67. Pober JS, Cortan RS. Cytokine and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 1990;70(2):427-451.
68. Golino P et al. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med*. 1996;2:35-40.
69. Krotz F et al. oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood*. 2002;100:917-924.
70. Handin RI et al. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest*. 1977;59:959-965.
71. Radomski MW et al. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987;2:1057-1058.
72. Blois ML. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-1224.
73. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47 :469-474.
74. Chung HY et al. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev*. 1999;111(2-3) :97-106.
75. Lukacs NW et al. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions. *Blood*. 1994;83(5):1174-1178.
76. Paleolog EM et al. Contrasting effects of interferon gamma and interleukin 4 on responses of human vascular endothelial cells to tumor necrosis factor alpha. *Cytokine*. 1992;4(6):470-478.
77. Bertini R et al. Inhibitory effect of recombinant intracellular interleukin 1 receptor antagonist on endothelial cell activation. *Cytokine*. 1992;4(1) :44-47.
78. Young JL et al. 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. Parrillo Joseph E. Pathogenetic mechanism of septic shock. *N Eng J Med*. 1993;328(20):1471-1478.
81. Levi Marcel, Ten Cate Hugo. Current conceptions; disseminated intravascular coagulation. *N Eng J Med*. 1999;341(8):586-592.
82. Hermida Jose et al. Endotoxin -induced disseminated intravascular coagulation in rabbits; effect of recombinant hirudin on hemostatic parameters, fibrin deposits, and mortality. *J Lab Clin Med*. 1998 ;131(1):77-83.
83. Levi Marcel et al. Novel approaches to the management of disseminated intravascular coagulation. *Critcare Med*. 2000;28(9):S20-S24.