

## 清熱調血湯加味方の 抗血栓作用에 대한 實驗的 研究

대전대학교 한의과대학 부인과교실

이귀희, 임현정, 신선미, 유동열

### ABSTRACT

#### The Experimental Study on Anti-thrombotic Effect of *Cheongyeoljohyeoltangkamibang* (CYJHT)

Gui-Hee Lee, Hyun-Jung Lim, Sun-Mi Shin, Dong-Youl Yoo  
Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

**Purpose:** This study was performed to evaluate anti-thrombotic effect of *Cheongyeoljohyeoltangkamibang* extract (CYJHT).

**Methods:** Blood flow rate through the regular volume of glass tube after the blood was diluted five times with ACD solution. Antithrombotic effect was calculated as a percentage of the experimental animal figure protected from the paralysis of hind legs or death of the mouse that is caused from the administration of platelet aggregation reagent.

**Results:**

1. CYJHT inhibited the platelet aggregation induced by ADP, epinephrine, collagen and arachidonic acid as compared with the control group.
2. CYJHT inhibited pulmonary embolism induced by collagen and epinephrine (inhibitory rate is 50%).
3. CYJHT increased platelet number and fibrinogen amount significantly and also CYJHT shortened PT and APTT significantly as compared with the control group in thrombus model induced by dextran.
4. CYJHT increased blood flow rate insignificantly as compared with the control group *in vivo*.

**Conclusion:** These results suggest that CYJHT can be useful in treating various female diseases caused by thrombosis, such as menstrual pain, menstrual disorder and so on.

**Key Words:** *Cheongyeoljohyeoltangkamibang* (CYJHT), anti-thrombotic effect, embolism, thrombosis.

## I. 서 론

清熱調血湯은 明代 (A.D 1500년경) 龔信<sup>1)</sup>이 氣滯血瘀로 인하여 발생하는 痛經을 치료할 목적으로 立方하였다. 痛經은 ‘月水來腹痛’ 또는 ‘經行腹痛’이라고도 하며, 생리기간이나 생리기간 전후에 아랫배나 腰骶에 통증이 있는 증상을 말한다<sup>2,3)</sup>.

瘀血은 정상적인 생리기능을 상실한 혈액이 凝聚하여 形成된 일종의 병리산물을 가리키는 것으로, 역대 학자들의 瘀血에 관한 인식을 살펴보면 瘀積不行한 停滯된 血, 惡穢不潔한 더러운 血毒, 離經脈하여 체내에 停留된 血, 久病으로 脈絡에 영향을 주어 나타나는 병변 등을 의미하는 것으로 이해할 수 있다<sup>4)</sup>. 瘀血을 서양의학적 관점에서 보면 혈전, 혈액순환장애, 국부적 혈류장애, 충격에 의한 조직장애, 염증, 임파액 순환장애 등으로 볼 수 있다<sup>2-6)</sup>.

혈전증은 활동중인 심혈관계 안에서 혈액이 응괴를 형성하는 것을 말하며, 혈액응괴를 혈전이라고 한다. 혈전은 혈류를 감소시키거나 차단함으로써 조직이나 장기에 각종 질환을 유발하고, 혈전의 일부가 떨어져나가 색전을 만들게 된다. 결국, 혈전은 한의학의 병리개념상 瘀血과 유사한 양태를 보이고 있으며<sup>6)</sup>, 최근에는 牧丹散<sup>7)</sup>, 玄胡索散<sup>8)</sup>, 清熱消毒飲<sup>9)</sup> 牛膝散<sup>10)</sup>, 紅花當歸散<sup>11)</sup>, 行經紅花湯<sup>12)</sup> 등 活血祛瘀하는 처방의 항혈전 효과에 대한 연구결과들이 보고되고 있다.

본 연구에 사용된 清熱調血湯加味方は 清熱調血湯<sup>1)</sup>에 清熱涼血, 祛瘀止痛, 健脾滲濕의 효능이 있는<sup>13)</sup> 敗將草, 薏苡仁, 鷄血藤을 가미한 처방으로, 祛瘀止痛의

효능이 있어 항혈전 작용이 있을 것으로 사료되어 본 실험에 착수하였다.

저자는 清熱調血湯加味方の 항혈전 효과를 알아보기 위하여 adenosine diphosphate(ADP)와 epineprine, collagen, arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제력, 폐색전 유발에 대한 억제효과 및 dextran 어혈병태 model을 이용하여 혈소판 수, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen 양에 미치는 효과, 어혈유발에 따른 혈류속도를 측정된 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### 1) 동 물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~200 g의 Sprague-Dawley계 (대한 실험동물센터, 충청북도 음성) 웅성 백서와, 18~20 g의 ICR (international cancer research-대한실험동물센터, 충청북도 음성)계 생쥐로, 실험 당일까지 고형 사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상 삼양사 배합사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22 ± 2°C, 상대 습도 50 ± 10%, 조명 시간 12 시간 (07:00-19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 약 물

본 실험에 사용한 清熱調血湯加味方

(이하 CYJHT으로 지칭)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방의 내용과 1첩 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Cheongyeoljohyeoltangkamibang* (CYJHT)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
牡丹皮	<i>MOUTAN RADICIS CORTEX</i>	5
黃連	<i>COPTIDIS RHIZOMA</i>	5
生地黃	<i>REHMANNIAE RADIX</i>	7.5
當歸	<i>ANGELICAE GIGANTIS RADIX</i>	5
白芍藥	<i>PAEONIAE RADIX ALBA</i>	6
川芎	<i>CNIDII RHIZOMA</i>	3
紅花	<i>CARTHAMI FLOS</i>	3
桃仁	<i>PERSICAE SEMEN</i>	5
莪朮	<i>ZEDOARIAE RHIZOMA</i>	5
香附子	<i>CYPERI RHIZOMA</i>	5
玄胡索	<i>CORYDALIDIS TUBER</i>	5
敗醬草	<i>PATRINIAE RADIX</i>	7.5
薏苡仁	<i>COICIS SEMEN</i>	7.5
鷄血藤	<i>SPATHOLOBI CAULIS</i>	6
TOTAL		75.5

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약 중 Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, collagen, ephineprine, dextran, 3.8% sodium citrate, fibrinogen, acid citrate dextrous, heparin는 Sigma (USA) 제품을 사용하였고, normal saline은 중외제약 (Korea) 제품을, arachidonic acid reagent, epinephrine reagent, ADP reagent, collagen reagent은 Chrono-Log (USA) 제품을 사용 하였으며, IL Test™

PT-fibrinogen HS와 IL Test™ AP TT lyophilized silica는 Instrumentation Laboratory (USA) 제품을, aspirin은 바이엘 (USA) 제품을 사용하였다.

기기는 serum separator (녹십자, Korea), minos-ST (Cobas Co., France), centrifuge (Beckman Co., USA), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), deep freezer (Sanyo Co., Japan), freeze dryer (Eyela Co., Japan), autoclave (Hirayama, Japan), ultrasonic cleaner (Branson Ultrasonics Corp., USA.), roller Mixer (Gowon scientific technology Co., Korea), vortex (Vision Co., Korea), ACL-100 (Instrumentation Laboratory, USA.), silicon-treated cuvette, platelet aggregation profiler model PAP-4 (BIO/DATA Co. USA), simplastin kit (General, Diagnostics, USA)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

CYJHT 2 첩을 3,000 ml round flask 에 넣고 증류수 2,000 ml를 가한 후, 3 시간 가열 추출하여, 침전물을 3 회 여과 (3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 4 시간 동안 방치하고, 24 시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 15.0 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 혈소판 응집 (Platelet aggregation) 측정

12 시간 이상 공복을 유지한 지원자의

상박 정맥으로부터 채혈한 혈액을 3.8% 구연산나트륨이 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣고 원심분리(900 rpm 10 분)하여 상등액으로 부터 platelet rich plasma (PRP)를 얻고 잔액을 다시 원심분리(3,000 rpm 10 분)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 ADP 10  $\mu$ m, epinephrine 10  $\mu$ m, collagen 5  $\mu$ g/ml과 arachidonic acid 5 mM이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation시킨 PRP 320  $\mu$ l와 실험군을 40  $\mu$ l를 넣고 다시 incubation한 후 ADP 40  $\mu$ l를 가하여 5 분간 반응시켰다.

실험군은 CYJHT extract를 생리식염수에 용해시키고 희석하여 사용하였으며, 최종 농도가 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml가 되도록 PRP에 가하고 응집 유도제를 넣기 전까지 37°C에서 3 분간 incubation 하였다. 실험의 처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 생리식염수 40  $\mu$ l를 가한 뒤 최대응집률(%)을 측정하여 채혈 후 시간 경과로 인한 혈소판 변질로 나타날 수 있는 실험 오차를 방지하였으며, PRP를 얻은 후 2 시간 안에 모든 실험을 진행시켰다. 실험 조작 동안 온도는 37°C로 유지하고 교반 속도는 500~1,500 rpm으로 하며 528 nm에서 응집도를 측정하였다.

약물에 의해 aggregation이 억제되는 정도를 다음 식에 의거하여 transmission

maxium reduction percent를 산출하였다.

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

A = 대조군의 maxium aggregation %

B = 실험군의 maxium aggregation %

각각의 농도에서의 aggregation (%)은 mean  $\pm$  S.E.로 나타내었다.

### 3) 폐색전 (Pulmonary thrombosis) 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura 등<sup>14)</sup>의 실험 방법에 준하여 실시하였다. 실험동물은 몸무게 약 18~20 g 정도의 수컷 ICR계 생쥐를 사용하였고, CYJHT 투여군은 20 g ICR계 생쥐를 기준으로 검액 5.0 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집 시약 (11.3  $\mu$ g의 collagen과 1.32  $\mu$ g의 epinephrine)을 HBSS 200  $\mu$ l에 함유되도록 조제하였고, ICR계 생쥐의 몸무게 20 g당 200  $\mu$ l의 용량으로 미정맥에 주사하였다(대조군).

실험동물을 실험 전 24 시간 절식시킨 후, 혈소판 응집 유발 시약의 정맥 주사 2 시간 전에 상기한 농도의 CYJHT를 ICR계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 2.0 mg/20 g을 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수를 투여하여 실험군과 동일한 시각에 각종 지표를 검사하였다.

항혈전 효과는 혈소판 응집 시약의 투여로 인하여 발생하는 생쥐 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였으며, 여기서 마비는 20 분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

4) Dextran 어혈 병태 유발 실험

(1) Dextran 어혈병태 유발 및 약물 투여

SD계 웅성백서 8 마리를 1 군으로 하여 정상군, 대조군 및 CYJHT 투여군으로 각각 나누었다. 정상군은 생리식염수를 공급하고, 대조군은 생리식염수를 투여한 지 1 시간 후에 dextran 어혈 병태를 유발하였으며, CYJHT 투여군은 체중 200 g당 50.0 mg을 생리식염수 2 ml에 용해하여 oral zonde로 실험 하루 전에 1 회 경구 투여한 후 절식시키고, 실험 1 시간 전에 다시 1 회 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 1.1 ml/200 g씩 백서의 미정맥에 3 분 이내에 전량 주사하고, 4 시간 경과 후 심장 천자로 채혈하여 각종 검사를 실시하였다. 정상군 및 대조군은 실험 약물 대신 생리식염수를 투여하여 실험군과 동일한 시각에 각종 지표를 검사하였다.

(2) 혈소판 수 측정

혈소판수 측정은 자동혈구계산기, Minos-ST를 사용하여 측정하였다.

(3) Prothrombin time (PT) 측정

PT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

(4) Activated partial thromboplastin time (APTT) 측정

APTT는 simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

(5) Fibrinogen 량 측정

Fibrinogen 량은 Simplastin Kit를 사

용하여 ACL-100으로 측정하였다.

(6) 혈류 속도 측정

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

5) 통계 처리

실험 결과는 Student's *t*-test를 사용하여 통계 처리하였으며  $P < 0.05$  이하 수준에서 유의성을 검증하였다.

### III. 결 과

#### 1. 혈소판 응집 억제 효과

1) ADP에 의한 혈소판 응집 억제 효과

CYJHT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml 농도로 투여한 후 ADP (10  $\mu$ m)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 99%의 응집율을 보인 반면, CYJHT extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 94.7%, 10 mg/ml 농도에서 90.6%, 1 mg/ml 농도에서 18.1%, 0.1 mg/ml 농도에서는 9.0%, 0.01 mg/ml 농도에서는 8.0%, 0.001 mg/ml 농도에서는 -4.0%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 1).

2) Epinephrine에 의한 혈소판 응집 억제 효과

CYJHT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml

농도로 투여 한 후 epinephrine (10  $\mu$ m)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 95%의 응집율을 나타낸 반면, CYJHT extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 96.3%, 10

mg/ml 농도에서 97.5%, 1 mg/ml 농도에서 22.1%, 0.1 mg/ml 농도에서 21.0%, 0.01 mg/ml 농도에서 17.8%, 0.001 mg/ml 농도에서는 9.4%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

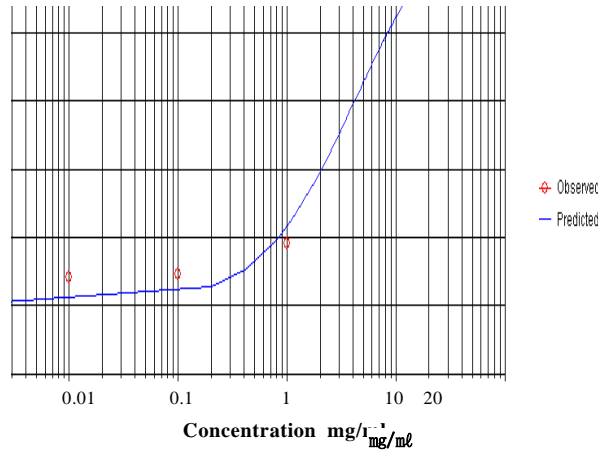


Fig. 1. Effect of CYJHT extract on human platelet aggregation with 10  $\mu$ m of ADP.

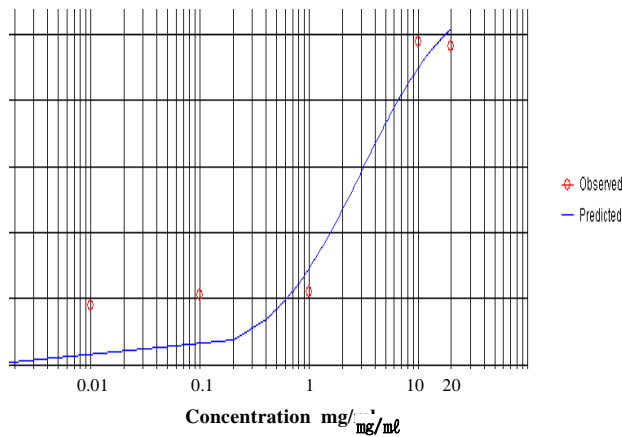


Fig. 2. Effect of CYJHT extract on human platelet aggregation with 10  $\mu$ m of epinephrine.

### 3) Collagen에 의한 혈소판 응집 억제 효과

CYJHT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml 농도로 투여한 후 collagen (5  $\mu$ g/ml)에

의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 93%의 응집율을 나타낸 반면, CYJHT extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 95.1%, 10 mg/ml 농도에서 75.6%, 1 mg/ml 농도에서 -3.2%,

0.1 mg/ml 농도에서는 0%, 0.01 mg/ml 농도에서는 3.2%, 0.001 mg/ml 농도에서 -4.3%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

4) Arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제 효과

CYJHT extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml 농도로 투여한 후 arachidonic acid (5 mM)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관

한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 88%의 응집율을 나타낸 반면, CYJHT extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 96.5%, 10 mg/ml 농도에서 76.1%, 1 mg/ml 농도에서 100%, 0.1 mg/ml 농도에서 -2.2%, 0.01 mg/ml 농도에서 100%, 0.001 mg/ml 농도에서 0%의 응집 억제율을 나타냈다(Fig. 4).

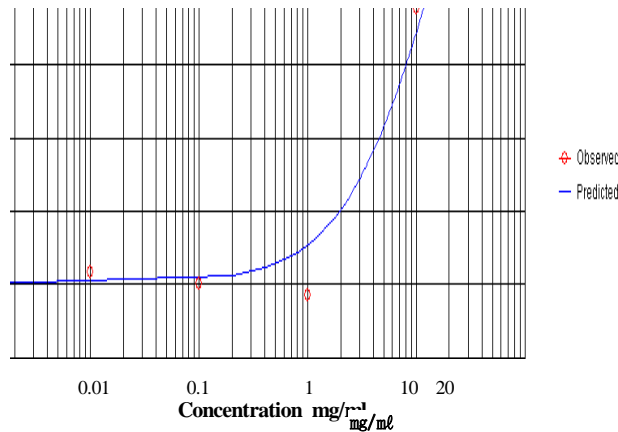


Fig. 3. Effect of CYJHT extract on human platelet aggregation with 5 µg/ml of collagen.

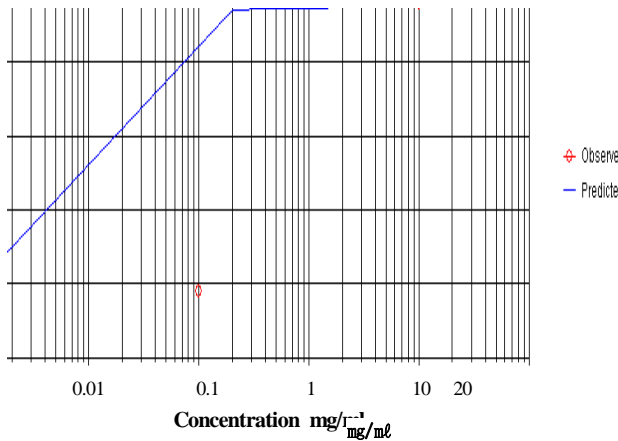


Fig. 4. Effect of CYJHT extract on human platelet aggregation with 5 mM/ml of arachidonic acid.

5) E<sub>max</sub>와 EC<sub>50</sub>값

응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 E<sub>max</sub>는 119.0%. EC<sub>50</sub>은 4.0 mg/ml로 나타났으며, epinephrine는 E<sub>max</sub>가 117.0%, EC<sub>50</sub>은 3.0 mg/ml, collagen은 E<sub>max</sub>가 170.6%, EC<sub>50</sub>은 14.7 mg/ml, arachidonic acid는 E<sub>max</sub>가 74.9%, EC<sub>50</sub>은 0.02 mg/ml로 나타났다(Table 2).

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by E<sub>max</sub> and EC<sub>50</sub> Model in Win Nollin Program

parameter	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (mg/ml)
ADP	119.0	4.0
Epinephrine	117.0	3.0
Collagen	170.6	14.7
Arachidonic acid	74.9	0.02

2. 폐색전에 대한 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속이 되었다. 이에 비해 양성대조군인 aspirin 투여군은 8 마리 중 2 마리만이 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 75%의 억제율을 나타내었고, CYJHT extract 투여군은 8 마리 중 4 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 50%의 억제 효과를 나타내었다 (Table 3).

3. Dextran 어혈 병태에 미치는 효과

1) 혈소판 수에 미치는 효과

혈소판 수 변화에서는 정상군이 889.0 ± 18.8 (×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)인데 비하여, 대조군은 686.0 ± 5.67 (×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)로 정상군에 비하여 유의성 (P<0.01) 있는 감소 효과를 보였으며, CYJHT extract 투여군은 963.3

± 13.3 (×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)로 대조군에 비하여 유의성 (P<0.001) 있는 증가 효과를 보였다(Table 4, Fig. 5).

Table 3. Effect of CYJHT extract on Pulmonary Embolism Mice

Dose (mg/20 g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control HBSS	8/8	0
Aspirin 2	2/8	75
CYJHT 5.0	4/8	50

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution  
Control : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group.  
Aspirin : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group after oral administration of 2.0 mg/20 g of aspirin.  
CYJHT : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group after oral administration of 5.0 mg/20 g of CYJHT extract.

Table 4. Effect of CYJHT extract on Platelet in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	Platelet (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
Normal	8	889.0 ± 18.8
Control	8	686.0 ± 5.67 <sup>++</sup>
CYJHT	8	963.3 ± 13.3 <sup>***</sup>

a) : Mean ± Standard Error  
Normal : Oral administration of normal saline.  
Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.  
CYJHT : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 50.0 mg /200g of CYJHT extract.  
+ : Statistically significant value compared with normal group(++ : P<0.01 )  
\* : Statistically significant value compared with control group(\*\*\* : P<0.001 )



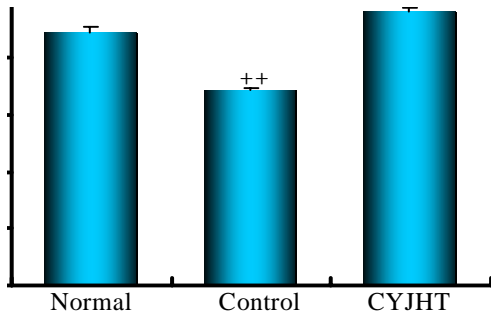


Fig. 5. Effect of CYJHT extract on platelet in dextran treated rats.

+: Statistically significant value compared with normal group(++ : P<0.01)

\* : Statistically significant value compared with control group(\*\*\* : P<0.01)

2) PT에 미치는 효과

PT에 대한 효과에서는 정상군이 10.95 ± 0.67 (sec)인데 비하여, 대조군은 13.8 ± 0.56 (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 (P<0.01) 있는 증가 효과를 보였으며, CYJHT extract 투여군은 12.6 ± 0.47 (sec)로 나타내었다(Table 5, Fig. 6).

Table 5. Effect of CYJHT extract on PT in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	Prothrombin time (sec)
Normal	8	10.95 ± 0.67
Control	8	13.8 ± 0.56 <sup>++</sup>
CYJHT	8	12.6 ± 0.47

a) : Mean ± Standard Error

Normal : Oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

CYJHT : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 50.0 mg /200 g of CYJHT extract.

+ : Statistically significant value compared with normal group(++: P<0.01)

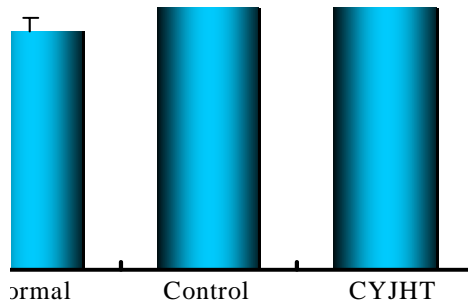


Fig. 6. Effect of CYJHT extract on PT in dextran treated rats.

+: Statistically significant value compared with normal group(++ : P<0.01)

3) APTT에 미치는 효과

APTT에 대한 효과에서는 정상군이 30.7 ± 1.3 (sec)인데 비하여, 대조군은 34.17 ± 1.1 (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 증가 효과를 나타내었으며, CYJHT extract 투여군은 31.3 ± 0.6 (sec)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 6, Fig. 7).

Table 6. Effect of CYJHT extract on APTT in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	APTT (sec)
Normal	8	30.7 ± 1.3
Control	8	34.17 ± 1.1 <sup>+</sup>
CYJHT	8	31.3 ± 0.6 <sup>*</sup>

a) : Mean ± Standard Error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

CYJHT : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 50.0mg /200 g of CYJHT extract.

+: Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)

\* : Statistically significant value compared with control group(\* : P<0.05)

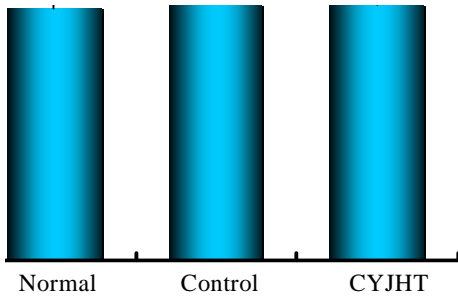


Fig. 7. Effect of CYJHT extract on APTT in dextran treated rats.

+ : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)

\* : Statistically significant value compared with control group(\* : P<0.05)

4) Fibrinogen 량에 미치는 영향

Fibrinogen 량에 대한 효과에서는 정상군에서  $290 \pm 18.74$  (mg/dl)인데 반하여, 대조군은  $224 \pm 16.17$  (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었으며, CYJHT extract 투여군은  $282.7 \pm 16.7$  (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 7, Fig. 8).

Table 7. Effect of CYJHT extract on Fibrinogen in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	Fibrinogen (mg/dl)
Normal	8	$290 \pm 18.74$
Control	8	$224 \pm 16.17^+$
CYJHT	8	$282.7 \pm 16.7^*$

a) : Mean  $\pm$  Standard Error

Normal : oral administration of normal saline.  
Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.  
CYJHT : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 50.0mg/200 g of CYJHT extract.

+ : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)

\* : Statistically significant value compared with control group(\* : P<0.05)

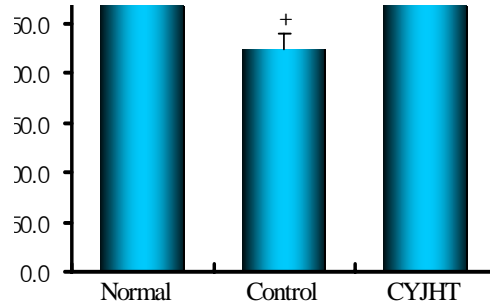


Fig. 8. Effect of CYJHT extract on fibrinogen in dextran treated rats.

+ : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)

\* : Statistically significant value compared with control group(\* : P<0.05)

4. 어혈 유발에 따른 혈류 속도에 미치는 효과

어혈을 유발시킨 SD계 웅성백서에서 혈액을 채취하여 혈류 속도를 측정된 실험 결과, 정상군은  $20.1 \pm 1.48$  (sec), 대조군은  $27.2 \pm 1.85$  (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 증가 효과를 나타내었으며, CYJHT 투여군은  $25.4 \pm 0.31$  (sec)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 8, Fig. 9).

Table 8. Enhancement of Blood Flow Rate by Administration *in Vivo*

Sample	Flow Rate (sec)
Normal	$20.1 \pm 1.48$
Control	$27.2 \pm 1.85^+$
CYJHT	$25.4 \pm 0.31$

a) : Mean  $\pm$  Standard Error

Normal : Oral administration of normal saline.  
Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

CYJHT : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 50.0 mg/200 g of CYJHT extract.

+ : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)

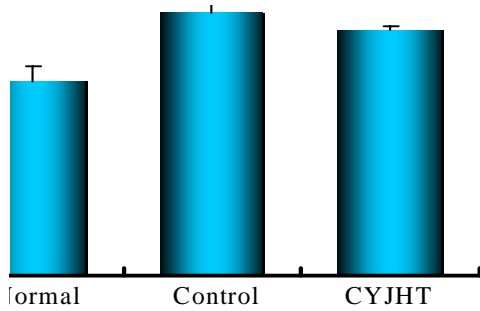


Fig. 9. Enhancement of blood flow rate by administration *in vivo*.

+: Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)

#### IV. 고찰

淸熱調血湯은 明代 (A.D 1500년경) 龔信<sup>1)</sup>이 立方한 것으로, 그 이후 《萬病回春》<sup>15)</sup> 《東醫寶鑑》<sup>16)</sup> 등에 轉載되어 있으며 “治經後將來 腹中陣陣作痛 乍作乍止 氣血俱實” 이라 하여, 氣滯血瘀로 인하여 발생하는 不通則痛의 기전에 의한 痛經에 응용되고 있다.

痛經은 ‘月水來腹痛’ 또는 ‘經行腹痛’ 이라고도 하며 생리기간이나 생리기간 전 후에 아랫배에 참을 수 없는 통증이 발하는 것을 말하며<sup>2)</sup>, 통증뿐만 아니라 생리기능상의 변화로 인하여 頭痛, 眩暈, 食慾不振, 惡心, 乳房痛, 便秘, 泄瀉, 小便頻數, 浮腫, 易怒, 驚悸, 上熱感, 憂鬱症 등의 증상을 동반하기도 한다.

서양의학에서는 월경통을 월경곤란증이라고 하며 월경을 하는 여성들의 50%가 경험하는 흔한 부인과적 장애이다. 월경 곤란증은 원발성과 속발성으로 구분하는데, 원발성 월경곤란증을 골반에 기질적인 병변이 없이 유발되는 반면, 속발성 월경곤란증은 골반내 근원적 병적 상태가 존재한다<sup>2,3)</sup>.

瘀血은 체내에 있는 혈액이 정체된 병리산물로서, 혈관에서 이탈하여 체내에 쌓여있거나 혹은 혈액의 운행이 不暢하여 經脈이나 臟腑에 阻滯된 혈액, 오염된 혈액을 포함한다. 어혈은 형성된 후에는 기혈의 운행에 영향을 미쳐 장부의 기능을 실조케 하여 다양한 질병을 야기하므로, 병리적 산물인 동시에 중요병인의 하나로 인식되고 있다<sup>17,18)</sup>.

특히 부인과 영역에서는 어혈을 月經痛, 月經失調, 無月經, 崩漏, 子宮外妊娠, 癥瘕, 產後腹痛, 惡露不絕 등의 주된 원인 중의 하나로 인식하고 있어<sup>3)</sup>, 부인과 영역에서의 活血化瘀 처방 사용빈도는 높다고 할 수 있다.

혈전증이란 생체의 파열되지 않은 혈관 내에서 내피세포의 손상, 정상혈류의 변화 및 혈액의 과응고성 등으로 인해 혈액이 응괴를 형성하는 것을 말하며, 그 응괴를 혈전이라고 한다. 혈전은 심혈관계의 어느 곳이나 생길 수 있으며, 시간이 지남에 따라 계속 성장하여 혈관을 폐쇄하거나, 혈전의 일부가 떨어져서 색전을 만들거나, 섬유성 용해효소에 의하여 용해되어 없어질 수도 있고, 혈전에 염증이 일어나 기질화되어 신생혈관이 만들어져 재 관통 될 수도 있다<sup>6,17,19)</sup>. 혈전은 한의학의 병리개념 상 瘀血과 유사한 양태를 보이고 있으며, 蓄血, 惡血, 瀉血, 敗血 등의 용어로 나타난 질병개념과 유사하다<sup>4)</sup>.

淸熱調血湯은 淸熱涼血藥인 生地黃, 牡丹皮, 淸熱燥濕藥인 黃連, 補血藥인 當歸, 白芍藥, 理氣藥인 香附子, 活血祛瘀藥인 川芎, 玄胡索, 莪朮, 紅花, 桃仁으로 구성되어있어 淸熱涼血, 祛瘀止痛하는 처방<sup>13,20,21)</sup>임을 알 수 있다. 淸熱調血湯

加味方は 清熱調血湯<sup>1)</sup>에 清熱解毒 祛瘀止痛하는 敗醬草, 健脾滲濕 除痺止瀉 清熱排膿하는 薏苡仁, 行血補血 舒筋活絡하는 鷄血藤을 加味하여<sup>13,22)</sup> 清熱涼血, 祛瘀止痛, 健脾滲濕의 效능을 높인 처방이다.

최근의 임상연구에서 活血祛瘀하는 처방의 항혈전 효과에 대한 연구<sup>7-12)</sup>가 활발히 進行되고 있는데, 실험적 연구에서는 주로 혈전증 병태모형을 이용해서 行하고 있다<sup>4)</sup>. 따라서 저자는 혈전증 병태모형을 이용하여 清熱調血湯加味方の 항혈전 효과에 대한 실험적 연구에 착수하였다.

ADP와 epineprine, collagen, arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제력, 폐색전 유발에 대한 억제효과와 dextran 어혈병태 model을 이용하여 혈소판 수, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen 양에 미치는 효과 및, 어혈유발에 따른 혈류속도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

먼저 혈소판 응집억제에 관한 실험에서 ADP (10  $\mu$ m)대조군은 99%의 응집율을 보였으나 CYJHT extract 투여군은 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml 농도에서 각각 94.7%, 90.6%, 18.1%, 9.0%, 8.0%, -4.0%의 응집 억제율을 나타내었다 (Fig. 1). Epineprine (10  $\mu$ m)대조군은 95%의 응집율을 나타낸 반면, CYJHT extract 투여군은 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml 농도에서 각각 96.3%, 97.5%, 22.1%, 21.0%, 17.8%, 9.4%의 응집 억제율을 나타내었다 (Fig. 2). 또, collagen (5  $\mu$ g/ml) 대조군은 93%의 응집율을 보인 반면, CYJHT extract 투여군은 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml 농

도에서 각각 95.1%, 75.6%, -3.2%, 0%, 3.2%, -4.3%의 응집 억제율을 나타내었다 (Fig. 3). Arachidonic acid (5 mM) 대조군은 88%의 응집율을 나타낸 반면, CYJHT extract 투여군은 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml 농도에서 각각 96.5%, 76.1%, 100%, -2.2%, 100%, 0%의 응집 억제율을 나타냈다 (Fig. 4). 응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 E<sub>max</sub>는 119.0%, EC<sub>50</sub>은 4.0 mg/ml로 나타났으며, epineprine은 E<sub>max</sub>가 117.0%, EC<sub>50</sub>은 3.0 mg/ml, collagen은 E<sub>max</sub>가 170.6%, EC<sub>50</sub>은 14.7 mg/ml, arachidonic acid는 E<sub>max</sub>가 74.9%, EC<sub>50</sub>은 0.02 mg/ml로 나타났다 (Table 2). 여기서 E<sub>max</sub>는 최대 응집 억제율을 나타내고, EC<sub>50</sub>은 50%의 억제율을 보이는 농도를 나타낸다<sup>23)</sup>.

Collagen은 교원질로서 인체 내에서 가장 흔한 단백질이며 體조직의 세포외 기질에서 발견되는 주된 섬유이다. 이는 기질분비세포의 endoplasmic reticulum에서 합성되는 tropocollagen에서 만들어지며 tropocollagen이 세포외 기질로 분비될 때 교원질로 변형된다. 교원질은 섬유조직, 기저막, 골, 연골 및 각막이나 심장판막과 같은 조직의 주된 구성 요소이다<sup>24,25)</sup>.

Epineprine은 생체 내에 존재하는 중요한 catecholamine 중 하나로, 부신수질 hormone으로서 부신수질에서 혈중으로 분비되어 심박동 및 심장에서 내보내는 혈액량을 증가시키고 혈관 벽에 작용하여 혈관을 수축시킨다. 위장관에 작용하여 수축 및 운동성을 감소시키고 기관과 기관지에 대해서는 긴장을 약화시켜 확장시키는 작용을 하며<sup>26)</sup>, 산소 소비도 증가시켜 기초대사를 높이는 작용을 한

다. 또한 epinephrine은 혈전형성 기전 중 손상된 내피세포에 혈소판이 유착되어 응집하는 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>24)</sup>.

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8마리 중 8마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 된 데 비해 양성대조군인 aspirin 투여군은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 75%의 억제율을 나타내었고, CYJHT extract 투여군은 8마리 중 4마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 50%의 억제 효과를 나타내었다 (Table 3).

Dextran은 蔗糖으로부터 만들어진 포도당으로 구성된 수용성다당류로서 혈장 증량제로 사용되고, 항원항체반응을 일으킬 가능성이 많고 혈소판 응집을 방해하며 적혈구응집을 촉진시킨다<sup>27)</sup>. Dextran에 의한 瘀血병태는 고점도혈증 모델로 혈액의 점성이 증가되어 혈의 흐름이 정체되어 나타나는 血瘀 모델에 가깝다고 볼 수 있다<sup>28)</sup>. 그러므로 이를 이용해 瘀血을 유발시킨 후 HBCT extract를 투여하여 혈소판 수, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen 양을 측정하였다.

혈소판은 골수의 거대 핵 세포에서부터 형성된다. 혈소판은 손상된 내피세포 및 혈관 벽의 깊은 부분에 위치하여 손상에 의해 노출된 어떤 콜라겐에도 아주 쉽게 유착되도록 할 수 있으며, 혈액의 응고 반응에서 중요한 역할을 하는 phospholipid를 다량 함유하고 있다. 이 phospholipid를 중심으로 한 혈액의 응고작용, 세포구성 인자와 대사물질(prostaglandins, serotonin, 세포 성장인자, cyclic AMP 등)에 의한

혈관운동, 염증반응 및 동맥경화현상 등이 알려짐과 동시에 생체 내 반응에 의해서도 혈전형성의 과정에 결정적으로 관여하는 것으로 밝혀져, 혈소판 수는 응혈 및 혈전형성 여부의 대표적 지표가 되고 있다<sup>29,30)</sup>. 혈소판 수 변화에서는 정상군이  $889.0 \pm 18.8 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 인데 비하여, 대조군은  $686.0 \pm 5.67 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 정상군에 비하여 유의성 ( $P < 0.01$ ) 있는 감소 효과를 보였으며, CYJHT extract 투여군은  $963.3 \pm 13.3 (\times 10^3/\text{mm}^3)$ 로 대조군에 비하여 유의성 ( $P < 0.001$ ) 있는 증가 효과를 보였다 (Table 4, Fig. 5).

PT 측정은 혈장에 조직 thromboplastin과 calcium을 첨가하여 fibrin이 석출할 때까지의 시간을 측정하는 것으로, 이 반응은 VII, X, II 인자와 fibrinogen이 관여하므로 PT는 외인성 및 공통성의 응고 과정 이상을 검출하는 방법이다<sup>26,31)</sup>. PT에 대한 효과에서는 정상군이  $10.95 \pm 0.67$  (sec)인데 비하여, 대조군은  $13.8 \pm 0.56$  (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ( $P < 0.01$ ) 있는 증가 효과를 보였으며, CYJHT extract 투여군은  $12.6 \pm 0.47$  (sec)로 나타내었다 (Table 5, Fig. 6).

Thromboplastin은 혈액응고에 중요한 인자로 출혈 시에 혈장 속에 있는 prothrombin을 thrombin으로 바꿈으로서 지혈에 관여한다. 따라서 APTT의 검사목적은 지혈기구의 이상이 어디에 있는가를 조사하는 것으로, 이 검사에서 이상치를 보이는 것은 내인계 응고장애가 있음을 의미하는 것이다<sup>26)</sup>. APTT에 대한 효과에서는 정상군이  $30.7 \pm 1.3$  (sec)인데 비하여, 대조군은  $34.17 \pm 1.1$  (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 증가 효과를 나타내었

며, CYJHT extract 투여군은  $31.3 \pm 0.6$  (sec)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 6, Fig. 7).

Fibrinogen은 최초로 그 존재가 확인된 응고인자로 응고과정 최종단계의 인자이다. 혈장 농도가  $100 \sim 700 \text{mg/dl}$ 인 큰 분자량을 가진 단백질로, 간에서 합성되고 혈중으로 방출되는데 thrombin에 의해 분해되어 fibrin으로 전환되어서 지혈인자 또는 창상국소의 fibrin matrix의 기초재료가 된다. Fibrinogen은 급성기 반응단백의 하나이기도 하여 염증, 악성 종양, 혈전 급성기, 신장질환, 당뇨병 등에서 증가하는 경우가 많은 한편, 감소하는 경우로는 간 실질 장애로 인한 생산저하 및 파종성 혈관내응고증 (DIC, disseminated intravascular coagulation)에서처럼 소비항진을 들 수 있다. 따라서 이는 심근경색, 간질환, 괴저성 손상 및 출혈증과 같은 질병의 예측 및 치료에 유용하게 응용되고 있다<sup>26,30</sup>. Fibrinogen 양에 대한 효과에서는 정상군에서  $290 \pm 18.74$  (mg/dl)인데 반하여, 대조군은  $224 \pm 16.17$  (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 감소 효과를 나타내었으며, CYJHT extract 투여군은  $282.7 \pm 16.7$  (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 증가 효과를 나타내었다 (Table 7, Fig. 8).

*In vivo*에서 혈류속도를 측정한 결과, 정상군은  $20.1 \pm 1.48$  (sec), 대조군은  $27.2 \pm 1.85$  (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 증가 효과를 나타내었으며, CYJHT extract 투여군은  $25.4 \pm 0.31$  (sec)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있는 감소

효과를 나타내었다 (Table 8, Fig. 9).

이상의 실험결과로 보아, 清熱調血湯加味方は ADP에 의해 유도된 혈소판 응집에 대한 억제효과를 보였으며, collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 억제하였고, dextran 어혈병태 유발실험에서 유의성 있는 결과를 나타내었으므로 항혈전 효과가 있음이 인정된다.

## V. 결 론

清熱調血湯加味方の 항혈전 효과를 실험적으로 규명하기 위해 ADP와 epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의해 유도된 혈소판 응집 억제력, 폐색전 유발에 대한 억제효과 및 dextran 瘀血病態 model을 이용하여 혈소판수, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen 량에 미치는 효과와 어혈유발에 따른 혈류속도측정을 시행하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 清熱調血湯加味方は ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해 억제효과를 나타내었다.
2. 清熱調血湯加味方は collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 50% 억제하였다.
3. 清熱調血湯加味方は dextran 어혈 병태를 유발한 백서의 혈소판 수, fibrinogen 량을 유의성 있게 증가시켰으며, PT 및 APTT를 유의성 있게 단축시켰다.
4. 清熱調血湯加味方は 어혈유발에 따른 혈류속도를 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 실험 결과로 보아 淸熱調血湯 加味方은 항혈전 효과가 있음이 인정되므로, 어혈로 인하여 발생하는 부인과 질환에 유효하게 응용될 수 있으리라고 사료된다.

## 참고문헌

1. 龔信. 古今醫鑑. 北京: 中國中醫藥出版社. 1997;330.
2. 肖淑春. 동의임상부인과학. 서울: 법인문화사. 1999;125-139.
3. 대한부인과학회 교재편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울: 정담. 2001;58-64, 177-182.
4. 田炳薰, 禹元洪, 鄭遇悅. 瘀血의 概念에 關한 東醫學的 考察. 동의병리학회지. 1989;4(1):93-102.
5. 康舜洙. 韓醫學에서의 瘀血에 대한 概念. 대한한의학회지. 1985;5(1):138-140.
6. 田炳勳, 鄭雨悅. 實驗的 血栓症에 미치는 韓藥材의 抗血栓效果에 關한 研究. 동의병리학회지. 1996;10(1):72-78.
7. 박민중 등. 牧丹散의 抗血栓 작용에 대한 실험적 연구. 부인과학회지. 2004;17(3):1-13.
8. 임민철, 김동희. 玄胡索散의 抗血栓 작용에 대한 연구. 동의병리학회지. 2003;17(4):930-938.
9. 김호민. 淸熱消毒飲이 實驗的 炎症 및 血栓症에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1995;9(2):267-293.
10. 김경수 등. 牛膝散의 抗血栓 작용에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):110-126.
11. 류동훈 등. 紅花當歸散의 抗血栓 효과에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(1):31-47.
12. 김의일 등. 行經紅花湯의 抗血栓 효과에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(2):1-17.
13. 전국한외과대학 본초학교실. 본초학. 서울: 영림사. 2000;180, 190, 193, 222, 306, 354, 409, 413, 417, 423, 424, 445, 578, 581.
14. Kimura Y, Tani T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Arzneim Forsch Drug Res. 1985;35(2):1144-1149.
15. 龔延賢. 萬病回春. 서울: 杏林書院. 1972;330.
16. 許浚. 東醫寶鑑. 경남: 동의보감출판사. 2005;297-298.
17. 대한병리학회 대구경북지부. 간추린 병리학. 서울: 정문각. 1998;87-91.
18. 채인식. 한방임상학. 서울: 대성문화사. 1987;80-81.
19. 전국한외과대학 간계내과교수. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원출판부. 2001;148-174.
20. 김철원, 유심근, 박병렬. 月經痛에 應用되는 淸熱調血湯의 效能에 대한 實驗的 研究. 원광한의학. 1992;2(1):86-101.
21. 안덕균, 신민교, 이상인. 한약임상응용. 서울: 정보사. 1983;358-359, 411-412, 564-567.
22. 신민교. 임상본초학. 서울: 남산당. 1989;221-224, 253-254, 404-405, 464-468.
23. 이정은, 유동열. 加味補陽還五湯의 抗血栓 및 抗炎症 作用에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 2006;20(4)

- :957-965.
24. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사. 1995;112-120, 125, 130, 540-542.
  25. 송계용 등. 핵심 병리학. 서울: 고려의학. 1998;62-94.
  26. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 서울: 의학문화사. 2003;587-600, 1096-1099, 1118-1121, 1147-1151, 1212-1214.
  27. 김경환. 이우주의 약리학 강의. 서울: 의학문화사. 1998;90-100, 781-782.
  28. 安圭錫, 朴種鉉, 朴耕模. 瘀血病態모형 개발에 관한 연구. 대한동의병리학회지. 1999;13(1):25-35.
  29. 서울대학교의과대학. 혈액학. 서울: 서울대학교출판부. 1990;231-233, 242-249.
  30. Authur C, Guyton, John EH. 의학생리학. 서울: 도서출판 정담. 2002;479-492.
  31. Yu Mujun et al. Screening tests of disseminated intravascular coagulation. Guidelines for rapid and specific laboratory diagnosis. Crit care Med. 2000;1777-1780.