

## 모과 추출물의 항응혈 활성

유지현, 한신희, 길기정\*

중부대학교 한약자원학과

### Active Effect of Anticoagulant Effects in *Chaenomeles* Fructus Water Extract

Ji-Hyun Yoo, Sin-Hee Han, Gi-Jung Kil\*

Dept. of Oriental Medicine Resources, Joongbu University

#### ABSTRACT

**Objectives** : This research was investigated anticoagulant effect of the *Chaenomeles* Fructus extract.

**Methods** : To examine an active effect of anticoagulation in *Chaenomeles* Fructus extract, the study measured Prothrombin time(PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) of human plasma *in vitro* and measured bleeding time and arterio-venous shunt model in rats *in vivo*.

**Results** : Bleeding time of *Chaenomeles* Fructus extract *in vivo* had a significant increase as about 1.6 times and thrombus weight of *Chaenomeles* Fructus extract had a significant reduction of thrombus weight as 50%. *Chaenomeles* Fructus extract represented an effect of anticoagulation by operating on extrinsic pathway factor II, V, VII, X and intrinsic pathway factor VIII, IX, X, XI, XII in the coagulation system.

**Conclusions** : Considering the above mentioned results, it is judged that a *Chaenomeles* Fructus extract has a control effect of thrombus creation.

**Key words** : *Chaenomeles* Fructus, Anticoagulant, Prothrombin time, Bleeding time

## 서론

최근 선진국의 조사보고에 따르면 현대인의 사망 원인 중 첫 번째는 악성종양(약 23%)이며 두 번째는 뇌혈관질환(약 21%)이고 세 번째는 심장질환(약 18%)이라고 한다. 그런데 두 번째 및 세 번째 질환은 모두 혈관 내 장애에 의해 일어나며 그 사망률 합계는 39%로써 악성종양을 훨씬 상회하는 추세다<sup>1)</sup>.

뇌혈관 및 심장질환은 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색 등으로 대표되는 혈관계 질환으로 현재 의학적으로 많은 관심과 함께 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 혈관계 질환들은 순환기계에서 혈소판의 비정상적 활성화로 인한 혈전의 생성과 직접적인 연관이 있다.

혈전성 질환 치료제에는 혈전용해제, 혈소판소제 및 항응혈제로 크게 분류된다. 먼저 혈전의 주요 구성 성분인 fibrin을 분해하여 이미 형성된 혈전을 용해시키는 혈

전용해제에는 streptokinase, urokinase 및 tPA(tissue type plasminogen activator) 등 많은 의약품이 개발되어 있다. 그러나 대부분은 가격이 비싸고 비 특이적 작용 등으로 인한 전신출혈 등의 부작용이 나타나고 있어<sup>2)</sup>, 지렁이(Lumbricus lubellus)에 함유된 6가지의 혈전용해 효소를 이용하여<sup>3)</sup>, 경구투여가 가능하고 부작용이 적은 치료제가 개발되어 있고 또한 발효식품인 natto와 shiokara에 함유되어 있는 nattokinase와 katsuwoxinase를 경구투여 시 혈전용해가 높은 것으로 보고되었다<sup>4)</sup>.

우리나라에서도 일본의 natto와 유사한 대두 발효식품인 청국장에서 혈전용해 효소를 가지는 Bacillus 균주가 분리된 바 있으며, 된장과 젓갈 등의 발효식품에서도 혈전용해 효소를 가진 균주들이 보고되었다<sup>5)</sup>.

모과는 장미과(Rosaceae)에 속한 모과나무(*Chaenomeles sinensis* (Thovin) Koehne) 및 동속식물의 성숙과실을 건조한 것으로 중국 의학서인 《명의별록(名醫別錄)》에

\* 교신저자 : 길기정, 충남 금산군 추부면 대학로 101 중부대학교 한약자원학과  
· Tel : 041-750-6225 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr  
· 접수 : 2009년 2월 23일 · 수정 : 2009년 3월 26일 · 채택 : 2009년 6월 22일

처음 기재된 이래 서근활락(舒筋活絡), 화위화습(和胃化濕), 강근골(強筋骨)하는 효능 및 치습비구련(治濕痺拘攣), 요슬관절산동통(腰膝關節酸疼痛), 토사전근(吐瀉轉筋), 각기수종(脚氣水腫)의 효과로 임상에서 널리 쓰이고 있다<sup>6)</sup>.

모과 중의 malic acid는 위장평활근의 경련과 수축의 강제성 경련에 진정작용이 있으며 흰쥐의 퇴행성관절염에 소염작용이 보고되었고<sup>7)</sup> 화학 성분으로는 정유 성분, flavonid, proanthocyanidin, tannin, 산성 terterpene 등이 알려져 있다<sup>8,9)</sup>.

모과에 관한 실험적 연구로는 항균작용<sup>10)</sup>, 모과의 정미성분인 polyphenol, 아미노산, 유기산 및 당의 함량 측정<sup>11)</sup>, 모과의 휘발성과 비휘발성 향기성분 분석<sup>12)</sup>, 모과 주류의 생리기능성<sup>13)</sup> 등 모과의 가공에 관한 연구가 있을 뿐 아직까지 혈전과 관련한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 항응혈 활성 물질 탐색과정에서 모과의 항응혈 활성 효능을 탐색하였으며 향후 심혈관 질환 예방의 가능성과 안전하고 우수한 항응혈제 식품 및 의약품 개발을 위한 모과 추출물의 우수성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

모과(*Chaenomeles Fructus*; CMF)는 중국 하북지방에서 모과나무의 성숙한 과실을 건조한 것으로 구입하여 중부대학교 본초학교실에서 감정한 후 정선하여 4°C에서 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

#### 2) 시약

PT reagent (Diagnostica Stago, France), APTT reagent (Diagnostica Stago, France), Calcium chloride (Sigma, USA), Ginkgo biloba extract (Schwab extracta KG, Germany), Saline (중외제약, 한국), 혈장 (적십자, 한국)을 사용하였으며 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

혈장은 충남적십자혈액원에서 약물투여를 받지 않은 지원자의 전혈을 사용하였고 분리된 혈장을 냉동한 상태로 보관하였으며 사용 시 37°C에서 해동하여 사용하였다.

#### 3) 실험동물 및 사육환경

본 연구에서 사용된 실험동물은 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐 12주령 체중 350±10 g로 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험당일까지 고형사료(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, Korea)와 물을 충분히 공급하였다. 사육환경은 실온 22±2°C, 상대습도 50±10%, 조명시

간 12시간(07:00~19:00), 조명도 150~300Lux로 하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

모과 50 g에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 450 ml 추출액을 여과지(Whatman NO. 1)로 1회 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여, -80°C deep freezer에 4시간 동안 정치하고 freeze dryer로 12시간 동안 동결 건조하여 모과 추출물에서 3 g(수거율 : 6%)의 분말을 얻어 냉장(4°C)보관하면서 본 실험에 필요한 농도 10 mg/ml (CMF 1), 30 mg/ml (CMF 2), 50 mg/ml (CMF 3)로 희석하여 사용하였다.

### 2) 항응혈 활성 측정

#### (1) 프로트롬빈 시간(Prothrombin time : PT)

Quick's one stage법<sup>14)</sup>을 사용하여 모과 추출물을 농도별로 5 µl를 취하고, 대조구로 증류수 5µl를 취하여 사용하였다. 각각 혈장 45 µl를 취하여 37°C에서 5분간 가온한 후 PT 시약 100 µl를 가하여 혈장이 응고되는 시간을 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (2) 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(Activated partial thromboplastin time : APTT)

모과 추출물을 농도별로 5 µl를 취하고 대조구는 증류수 5 µl를 취하여 사용하였다. 각각 혈장 45 µl를 취하여 37 °C에서 2분간 가온한 후 APTT 시약을 50 µl를 취하고 37°C에서 5분간 가온한 후 25mM calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>)를 100 µl를 취하여 혈장이 응고되는 시간을 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (3) 출혈시간(Bleeding time : BT)

모과 추출물을 400 mg/kg 농도로 6일 동안 경구투여한 다음 7일째 되는 날 약물 투여 60분 후에 1.25 g/kg 농도의 에테르를 복강 주사하여 마취시킨 다음 Han 등의 방법<sup>15)</sup>에 의하여 마취된 실험동물의 꼬리를 끝에서부터 0.3 cm 자른 후 즉시 37.5°C 생리식염수에 꼬리를 5 cm 담가 지혈될 때까지의 시간을 측정하였다.

#### (4) 혈전중량(Thrombus weight)

모과 추출물을 400 mg/kg 농도로 6일 동안 경구투여한 다음 7일째 되는 날 약물 투여 60분 후에 1.25 g/kg 농도의 에테르를 복강 주사하여 마취시킨 다음 왼쪽 경동맥과 오른쪽 정맥에 폴리에틸렌 도뇨관으로 주입하였다. 그런 다음 5 cm 실리콘 튜브에 면실을 넣고 생리식염수로 채운 후 동맥과 정맥에 연결된 튜브로 혈액을 흐르게 하여 shear-stress를 유도하여 15분간 혈전을 생성시켰다. 생성된 혈전을 건조시켜 무게를 측정하여 항응혈 활성을 평가하였다.

### 3) 통계처리

실험군별 상호비교를 위한 평균치는 평균  $\pm$  표준편차 (Mean $\pm$ S.D.)로 산출하였다. 실험군간의 유의성 검증은 student's t-test 분석방법을 이용하여  $p \leq 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. PT에 미치는 영향

모과 추출물을 농도별로 처리하여 PT에 대한 영향을 조사한 결과, 대조군은 13.66 $\pm$ 0.29초였고, 30 mg/ml 처리군에서는 17.43 $\pm$ 2.60초, 50 mg/ml 처리군에서는 45.23 $\pm$  4.90초로 나타나 농도 의존적으로 PT가 길어지는 것으로 나타났으며 대조군과 비교할 때 50 mg/ml 에서 약 3.3배 정도 혈액응고 시간을 증가시키는 것으로 항응혈 활성과 관련하여 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다(Table 1).

Table 1. Effect of *Chaenomelis* Fructus Extract on Prothrombin Time

Group	Concentration (mg/ml)	PT(sec)
Control	0	13.66 $\pm$ 0.29
CMF 1	10	18.13 $\pm$ 4.35
CMF 2	30	17.43 $\pm$ 2.60
CMF 3	50	45.23 $\pm$ 4.90**

Control : Untreated. CMF 1, 2, 3 : 10 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml aqueous extract of *Chaenomelis* Fructus.

\* : Statistically significant value compared to control by Student's t-test (\*\* :  $p \leq 0.01$ ).

요소 II, V, VII, X의 관여 하에 프로트롬빈이 트롬빈으로 되고 트롬빈이 혈장 내에 들어있는 피브리노겐을 피브린으로 전환시켜 항응혈을 형성하는데 PT가 길어진다는 것은 프로트롬빈을 트롬빈으로 바꾸는데 관여하는 외인성 경로인자들의 활성을 억제함으로써 트롬빈을 생성을 지연시킨 결과 이러한 PT의 증가는 혈액응고 기전에서 외인성 경로인자에 대해 조절 작용을 가지는 것으로 볼 수 있다.

### 2. APTT에 미치는 영향

모과 추출물을 처리하여 APTT를 조사한 결과, 대조군에서는 46.03 $\pm$ 3.39초였으나, 30 mg/ml 처리군에서는 80.65 $\pm$  3.94초, 50 mg/ml 처리군에서는 102.37 $\pm$ 6.05초로 나타나 농도 의존적으로 APTT가 길어지는 것으로 나타났으며 대조군과 비교할 때 30 mg/ml, 50 mg/ml에서 약 2배 정도 혈액응고 시간을 증가시켜 유의성 있는 결과로 나타났다 (Table 2).

이러한 APTT의 증가는 요소 XIII, XI, IX, X, II, I을 비롯한 내인성 경로인자에 관여된 여러 요소들을 활성화

시킴으로써 최종적으로 피브린 형성에 의한 항응혈 활성이 있는 것으로 볼 수 있으며, 이러한 결과로 혈액응고 기전에서 내인성 경로인자에 대해 조절 작용을 가지는 것으로 볼 수 있다.

Table 2. Effect of *Chaenomelis* Fructus Extract on Activated Partial Thromboplastin Time

Group	Concentration (mg/ml)	APTT(sec.)
Control	0	46.03 $\pm$ 3.39
CMF 1	10	44.70 $\pm$ 1.60
CMF 2	30	80.65 $\pm$ 3.94***
CMF 3	50	102.37 $\pm$ 6.05***

Control : Untreated. CMF 1, 2, 3 : 10 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml aqueous extract of *Chaenomelis* Fructus.

\* : Statistically significant value compared to control by Student's t-test (\*\* :  $p \leq 0.01$ ).

### 3. 출혈시간에 대한 영향

혈액응고 시스템에서 표피에 아주 미세한 상처를 유도하여 상처부위에서 혈소판 응고상태를 살펴보기 위하여 모과 추출물을 투여한 실험군과 Ginkgo biloba extract (GBE)를 투여한 대조군의 응고반응 시간에 미치는 영향을 비교 실험한 결과, 무처리군의 응고반응 시간은 464.33 $\pm$  40.07초였으며 GBE 투여군은 495.67 $\pm$ 16.24초로 나타나 무처리군과 비교하여 증가하였지만 유의적인 차이가 없었다.

모과 추출물을 투여한 실험군은 755.67 $\pm$ 15.04초로 나타나 무처리군에 비해 약 1.6배, GBE 투여군에 비해 1.5배 정도 응고반응 시간이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

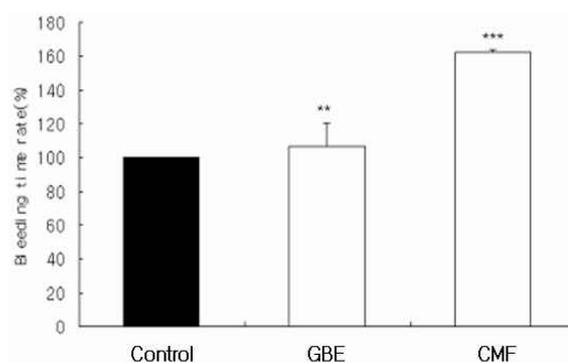


Fig. 1. Effect of *Chaenomelis* Fructus extract on the bleeding time. Rats was treated with oral administration of 400 mg/kg of GBE and CMF, representatively.

Control : Untreated. GBE : Ginkgo biloba extract, CMF : *Chaenomelis* Fructus extract.

\* : Statistically significant value compared to control by Student's t-test (\*\* :  $p \leq 0.01$ ).

### 4. 혈전중량에 대한 영향

혈전중량의 변화를 살펴보기 위하여 모과 추출물을 투

여한 실험군과 Ginkgo biloba extract (GBE)를 투여한 대조군의 혈전중량에 미치는 영향을 비교 실험한 결과, 무처리한 대조군은  $286.67 \pm 32.15$  mg이었으며 GBE 투여군은  $253.30 \pm 15.28$  mg으로 나타나 무처리 대조군과 비교하여 조금의 감소는 있었지만 유의적인 차이가 없었다.

모과 추출물을 투여한 실험군은  $130.00 \pm 40.00$  mg로 나타나 무처리 대조군에 비해 약 50%정도로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

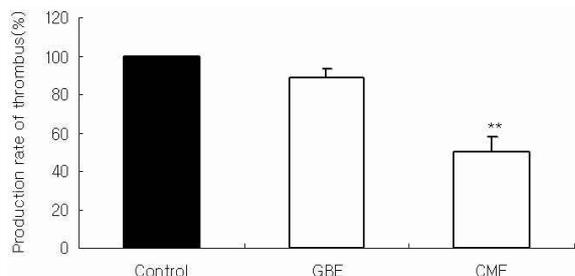


Fig. 2. Effects of *Chaenomeles* Fructus extract on the thrombus weight

Rats was treated with oral administration of 400 mg/kg of GBE and CMF, representatively.

Control : Untreated. GBE : Ginkgo biloba extract, CMF : *Chaenomeles* Fructus extract.

\* : Statistically significant value compared to control by Student's t-test (\*\* :  $p \leq 0.01$ ).

혈전의 형성은 지혈 및 혈액응고기전과 밀접한 관계를 가지는데 지혈은 혈관이 손상된 후 상처 부위의 콜라겐이 혈소판과 밀착되어 혈소판에서 혈관수축물질인 serotonin과 ADP (Adenosin diphosphate)가 유리되어 마개가 형성되는 일차적인 지혈이며, 혈액응고는 혈액응고인자들의 선택적 결합과 혈관 내에 존재하는 여러 가지 단백질 가수분해 억제인자들과 길항작용을 하는 일련의 효소반응에 의하여 피브리노겐이 피브린으로 전환됨으로써 일어나는 현상이다.

혈소판이 내피세포에 결합하게 되면 요소 XIII에 의해 교차 결합된 피브린 폴리머(cross-linked fibrin polymer)를 형성하면서 영구적인 혈전을 생성하게 된다. 또한 트롬빈은 응고 과정에 있어 여러 기능을 가지는데 가장 주요 역할은 섬유소원을 섬유소로 전환시키는 것이지만 혈소판, 요소 V, VII들을 활성화시켜 혈액 응고 반응을 촉진시키는 등 혈전 생성에 중추적 역할을 하게 된다<sup>16-19</sup>).

모과 추출물을 처리한 혈장에 트롬보 플라스틴을 인위적으로 첨가해줌으로써 factor II, V, VII, X의 관여하에 프로트롬빈이 트롬빈으로 되고 트롬빈이 혈장 내에 들어있는 피브리노겐을 피브린으로 전환시켜 항응혈을 형성하는데 PT가 길어진다는 것은 프로트롬빈을 트롬빈으로 바꾸는데 관여하는 외인성 경로 요소들의 활성을 억제함으로써 트롬빈 생성을 지연시킨 결과이다. 따라서 모과 추출물이 혈액 응고기전에 대하여 억제를 보인 것으로 항응혈 작용이 외인성 경로에 영향을 끼친 것으로 판단되었다.

또한 모과 추출물의 APTT 활성 실험 결과에서 요소

XIII, XI, IX, X, II, I을 비롯한 내인성 경로에 관여된 여러 요소들을 활성화시킴으로써 최종적으로 피브린 형성에 의한 항응혈 활성이 있고, 반대로 PT는 연장되어 있는데 APTT가 정상이면 요소 VII 결핍으로 진단할 수 있는데, 실험 결과 모과 추출물은 혈액 응고 기전에 대하여 억제를 보인 것으로 항응혈 작용이 내인성 경로에 영향을 끼친 것으로 판단되었다.

*In vivo* 실험에서 모과 추출물을 처리한 출혈 시간 반응과 혈전 중량을 측정하여 실제 모과 추출물의 흡수에 따른 반응을 판단하는 기준으로 삼을 수 있는데, 본 실험에서 나타난 상기의 결과를 볼 때 모과 추출물의 체내흡수는 혈액 응고 기전에 대하여 상호 작용하는 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 모과 추출물에서 항응혈 활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 모과 추출물은 혈액 응고 기전에서 외인성 경로 요소 II, V, VII, X과 내인성 경로 요소 VIII, IX, X, XI, XII에 대해 전부 작용하는 것으로 나타났다.
2. 모과 추출물은 *in vivo*에서 출혈 시간 반응이 약 1.6배정도 유의성 있게 증가시키는 것으로 나타났으며, 혈전 중량은 약 50%정도 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 보아 모과 추출물이 항응혈 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며, 정확한 기전에 대한 연구와 항응혈 치료에 있어서 모과 추출물의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 전광희. 천연동물 약제로부터의 혈전용해제 연구. 생물활성연구법 53. 한국생화학회지. 1991.
2. Lee DH, Kim JH, Kim NM, Choi JS and Lee JS. Physiological functionality of Chinese quince wine and liquors. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 2002 ; 17 : 266-70.
3. Ra KS, Lee BL, Lee HS and Kweon MH. An anticoagulant polysaccharide isolated from *Gandoerma lucidum*. Korean Journal of Food and Nutrition. 1997 ; 10 : 375-81.
4. Kim W and Choi K. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Chungkook-Jang*. Appl Environ Microbiol. 1996 ; 62 : 2482-8.

5. Kim YS, Lee SW, Lee KR, Kim SK, Cho SY and Lee JH. Studies on tasty constituents in various foodstuffs. Part 1. Tasty constituents of chinese quince. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 1971 ; 3 : 163-7.
6. 이상인, 안덕균, 신민교, 이영중. 한약임상응용. 서울 : 성보사. 1986 ; 182-3.
7. 이광동. 중국약리독리여임상. 천진 : 천진과학번역출판공동. 1992 ; 48.
8. Gwak HS and Chun IK. Prefomulation study of aspalatone, a new antithrombotic agent. *Journal of Applied Pharmacology*. 2000 ; 8 : 332-7.
9. Lee MH, Son YK and Han YN. Tissue factor inhibitory flavonoid from the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *Archives of Pharmacal Research*. 2002 ; 24 : 842-50.
10. 김수경. 산두근, 천오, 모과 및 그 혼합물이 족부백선균에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. 경산대학교 석사학위논문. 2000.
11. Kazufumi T, Takashi Y, Takuo T and Takuo O. Tannin production in cell suspension cultures of *Geranium thunbergii*. *phytochemistry*. 1991 ; 30 : 501-3.
12. Butenas S and Mann KG. Blood coagulation. *Moscow : Biochemistry*. 2002 ; 67 : 3-12.
13. Kurata H, Wang J, Narui T, Hashimoto T and Okuyama T. Hematological studies on naturally occurring substances. Part IV, Constituents of chinese astringent drugs on of blood coagulation and fibrinolysis systems. *Shoyakugaku Zasshi*. 1990 ; 44 : 101-4.
14. Han YN, Baik SK, Kim TH and Han BH. Antithrombotic activities of saponins from *Ilex pubescens*. *Archives of Pharmacal Research*. 1987 ; 10 : 115-22.
15. Quick J. The prothrombin in haemophilia and in obstructive jaundice. *Journal of Biological Chemistry*. 1935.
16. 김태식. 당귀수산 및 도담탕이 Endotoxin으로 유발된 혈전증에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1987.
17. 문준진, 최승훈. 동의병리학. 서울 : 고문사. 1990 ; 74-6, 282.
18. 송민주, 장경전, 송춘호, 안창범. 혈전증 유발 백서에 태충·중봉의 도인약침이 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 ; 3(16) : 238-41.
19. 송재경. *Gastrodia elata* BLUME(천마)의 항혈전 작용 검색. 경희대학교 석사학위논문. 1994.