

仙茅 熱水 抽出物の 抗血栓 효능 연구

노성수*

대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Effects of Curculiginis Rhizoma on anti-thrombotic activity

Seong-Soo, Roh*

Department of Herbology, College of Oriental medicine, DaeguHaany University

ABSTRACT

Objectives : An aim of study is to investigate effects of curculiginis rhizoma in vitro (factor Xa (FXa) inhibitor assay, prothrombinase assay, prothrombin time (PT) assay, activated partial thromboplastin time (aPTT) assay) and in vivo experiment (blood clotting time, thromboxane B2 content assay in serum and weight of thrombus by AV-shunt rat model).

Methods : We gained a human serum and used serum in vitro study such as factor X activity (FXa) inhibition, prothrombinase inhibition, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time. Fifteen SD rats were divided into three groups (intact control group and two experimental group treated with extract of Curculiginis Rhizoma(ECR)). Rats were orally administrated DW (intact control group), 600 mg/kg concentration of ECR and 200 mg/kg concentration of ECR. After one hour, we anesthetized rats and made arteriovenous (AV) shunt rat models to study weights of thrombus, took a hole blood to study content of thromboxane B2 and blood clotting time.

Results : *In vitro*, ECR increased a inhibitory activity of FXa, prothrombinase and aPTT compared than intact control group. Especially ECR made significant increase of FXa and prothrombinase inhibitory activity ($p < 0.05$, $p < 0.01$). And PT were increased in ECR control group compared with intact control group. In vivo, a blood clotting time of experiment group treated with ECR 600 mg/kg were significantly increased compared with that of intact control group ($p < 0.05$) and content of thromboxane B2 was significantly decreased in group treated with ECR 600 mg/kg in seum. The weight of thrombus were significantly reduced in group treated with ECR 600 mg/kg compared with intact control group ($p < 0.05$). But in vivo experiment study, those of group treated with ECR 200 mg/kg were reduced compared with those of intact control group without statistical significance.

Conclusions : ECR has a antithrombotic activity in internal course with inhibitory activity of FXa and prothrombinase *in vitro*, it required to research more study for effective compounds.

Key words : Curculiginis Rhizoma, antithrombotic activity, factor Xa assay, prothrombinase assay, prothrombin time assay, blood clotting time, thromboxane B2, arteriovenous shunt modle

서 론

仙茅는 수선화과(Amaryllidaceae)에 속하는 다년생 宿根草 본인 仙茅 *Curculigo orchioides* Gaertn의 根莖으로 가을과 겨울에 채취하여 根頭와 鬚根을 제거하고 洗淨하여 건조한 것이다¹⁾.

性味는 溫하고 辛하며 小毒하여 肝腎脾經에 歸經하고, 補腎陽, 強筋骨, 祛寒濕의 效能으로 陽痿精冷, 筋骨痿軟, 腰膝冷痺, 陽虛冷瀉의 證狀을 治療한다¹⁾.

화학성분으로 탄닌이 4%, 지방 1% 및 수지와 전분이 있으며, 밝혀진 성분에는 Curculigenin, curculigosaponin, curculigol, Orcinolglucoside, curculigine D 등이 있다¹⁻³⁾.

*교신저자 : 노성수, 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실.
· Tel : 053-819-1459, · Fax : 053-819-1752, · E-mail : ddede@dhu.ac.kr,
· 접수 : 2011년 11월 7일 · 수정 : 2011년 11월 29일 · 채택 : 2011년 12월 16일

약리작용으로 면역증강효과^{4,5)}, 골조직 신생 및 골 치유효과⁶⁾, 항B형 간염 바이러스효과⁷⁾가 보고되었으며 仙茅의 성분 중 하나인 curculigosaponin Gdlm 면역자극과도 알려져 있다⁸⁾. 仙茅는 초대 배양한 난포의 과립막 세포에서 estradiol (E2)의 농도를 효과적으로 증가시키고⁹⁾, 사람에서 채취한 정자의 운동성을 개선시킨다고 증명되었다¹⁰⁾.

그러나, 아직까지 仙茅에 대한 항혈전 연구가 수행되지 않았으며, 補腎助陽의 효능을 가진 仙茅가 혈액의 병리적 산물인 '瘀血' 과 유사한 혈전에 미치는 영향을 알아보기 위해, *in vitro* 에서 FXa assay, thrombin assay, prothrombin time assay, activated partial thromboplastin time assay를 수행하였고, *in vivo* 실험으로 전혈응고 실험, 혈장 내 Thromboxane B2 함량, arteriovenous shunt 모델을 이용한 thrombus 무게 측정을 통해 항혈전 작용에 대한 선모의 효능을 연구하였다. 이에 연구자는 실험분석을 통해 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험을 위하여 사용된 8주령 (300g) 숫컷 SD 흰쥐는 중앙실험동물(주)에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고형사료 (조단백질 22%이상, 조지방 80%이하, 조섬유 50%이하, 조회분 80%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사 Co Korea)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용한다.

2) 시료

본 실험에 사용한 仙茅 (*Curculigo orchioides* Gaertn ; Curculiginis Rhizoma)은 음니허브 (영천, 경북, 한국) 제약 회사에서 500 g을 구매하여, 약전 규격에 부합되는 것만을 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선하여 시료로 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Human purified FXa, thrombin, and plasmin (Kordia (Leiden, The Netherlands), Factor XIa (FVIIa ; Calbiochem(Schwabach, Germany), trypsin, urokinase from Sigma (Taufkirchen, Germany), activated protein C (APC) from Haemochrom Diagnostica (Essen, Germany), Factor VIIa (FVIIa), Factor IXab (FIXab), FX, prothrombin (Swansea, UK), tissue factor (American Diagnostica Inc, Stanford, USA), Chromogenic substrates (chromozym TH, X, U, trypsin, and plasmin ; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), S 2366 (Chromogenix Instrumentation Laboratory ; Bubendorf, Switzerland), Pefachrome FXa (Pentapharm ; Basel, Switzerland), Fluorogenic substrates (I-1100 and H-D-Phe-Pro-Arg-6-amino

-1-naphthalene-benzylsulfonamide·H₂O ; Bachem, Bubendorf, Switzerland), Russell' s viper venom (RVV ; Pentapharm, NeoplastinPlus), thromboplastin, PTT-Reagent (Roche Diagnostics), hirudin (Refludan, Aventis, Strasbourg, France), Xylazine (Rompun ; Bayer HealthCare), ketamine (Ketavet ; Pharmacia & Upjohn, Karlsruhe, Germany), pentobarbital Na (Nembutal ; Richter Pharma, Wels, Austria)을 사용하였으며, 일반시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 방법

1) *In vitro* 실험

(1) 仙茅 추출물 제조

仙茅 500 g에 각각 증류수 3,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치로 농축하였다. 농축한 것을 다시 모아서 동결 건조기를 이용하여 완전 건조 (DCR-110916 ; 69.65g)하여 仙茅 추출물 (extract of curculiginis rhizoma ; ECR)을 제조하였다. 仙茅의 추출물 수율은 13.93%였으며, 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실에서 냉동 (-84℃) 보관하였으며, 사용시 적당한 농도로 희석하여 사용하였으며 나머지는 냉동 보관 하였다.

(2) Plasma 준비

인간 혈액은 최근 10일 동안 약물을 투약하지 않은 건강인 신체를 가진 사람의 정맥혈을 채취하였다. 혈액은 38% 트리소듐 시트레이트가 있는 플라스틱 튜브에 보관하였고, 이를 4℃에서 10분간 2,500g로 원심분리한 다음, -20℃에서 보관하면서 실험시 사용하였다.

(3) FXa activity in plasma

인간혈장 (45 μ l)에 5 μ l hirudin (10 μ g/ml)을 섞고, 5 μ l ECR (100 mg/ml)와 50 μ l RVV (human, 07mU/ml)를 37℃에서 CaCl₂ 50 uM에 녹인다. Chromozym X (50 μ l ; 600 uM)를 15분 후에 첨가하였다. 증가된 optical density를 37℃에서 spectra rainbow thermo reader (Tecan, Crailsheim, Germany)로 각각 20분간 측정하였다.

FXa에 대한 억제효과는 Cheng-Prusoff 공식 ($K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_m)$)에 따라 계산하였으며, [S]는 기질의 농도이며, K_m 은 Michaelis-Menten 상수이다. K_m 은 Lineweaver-Burk plot에 의해 결정된다. IC_{50} 은 50%에 의한 대조군의 처음 속도를 결정하는데 필요한 inhibitor의 총량이다.

(4) Prothrombonase assay

트롬빈 발생을 통해 측정하였으며, 간략하게 인간 FXa (0.025 nM)을 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 2 mM CaCl₂)에서 배양한다 10분 동안 37℃에서 인간 혈소판들을 세척한다. 반응은 프로트롬빈 (1 uM)과 ECR를 추가하면서 시작된다 20분 후, 20 μ l aliquots를 160 μ l buffer에 희석하고, 트롬빈 활성을 20 μ l chromozym TH (500uM)을 사용하여 측정되었다.

(5) Coagulation assay

Activated partial thromboplastin time (aPPT) 분석과 prothrombin time (PT) 분석은 기성판매품 kits를 이용하였다. ECR 3 μ l를 100 μ l platelet-poor plasma (PPP)에 넣고, 37°C에서 10분간 배양하였다 응혈 시간은 coagulometer (Biometric 4000; Sarstedt, Numbrecht, Germany)를 이용하여 측정하였는데, 최종 농도가 3.03 μ l가 되도록 하는 매뉴얼의 지침을 따랐다 항응혈 효능은 혈장 응혈 시간을 2배로 늘리는데 필요한 농도를 기준으로 정하였다.

2) *In vivo* 실험

(1) 전혈 응고시간

SD 생쥐는 intact 그룹 (약물을 구강투여하지 않은 대조군), 2개의 약물투여군 (600 mg/kg과 200 mg/kg 농도)으로 각각 그룹별로 5수씩 분류하였다. 실험 전날 절식을 시켰으며 음료는 제공하였다. 실험일에 증류수를 intact 그룹에 구강투여하였고, 약물투여군에도 농도별로 구강투여 하였다.

전혈 응고시간은 ECR을 구강투여한 2시간 후에 랫트를 줄레틸로 마취시켜 개복한 다음 주사기를 이용하여 복강 대정맥에서 혈액을 채취하고 채취된 혈액 중 1 ml를 유리시험관에 넣고 즉시 17% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 200 μ l를 가한 후 가만히 섞어 준 뒤, 혈액에 CaCl_2 를 가한 시간부터 응고가 생길 때까지의 시간으로 측정하였다.

(2) 혈장의 Thromboxane B2 함량

분석방법은 unlabelled TXB2와 일정량의 peroxidase로 labelled된 TXB2 간의 한정된 수의 specific antibody의 결합 위치에 대한 competition을 근거로 한 enzyme immunoassay (ELIA) kit (amersham pharmacia biotech, UK)를 사용하였다. 반응을 1 M 황산 용액을 넣어 종결시킨 후 생성된 반응물질은 450 nm에서 microtitre plate photometer (SPECTRA MAX 340, USA)로 읽어 비색정량 하였다.

(3) Arteriovenous Shunt model using Rat

안정시킨 랫트는 실험전날 절식을 시행하였고(음료는 자유 제공), 실험당일 랫트 체중을 측정하였다. 무게의 유의적 차이가 없게 Intact 대조군, ECR 600 mg/kg과 ECR 200 mg/kg농도로 구강투여할 실험군으로 6수씩 분리하였다. 약물 투여군은 ECR을 각각 600 mg/kg과 200 mg/kg농도로 아침에 0.3 ml씩 1회 구강투여하였으며, ECR 구강투여 1시간 뒤, SD rat의 복강에 2 ml 씩 10% chloral hydrate를 주사하여 마취한 후, 마취가 끝나면 Left carotid artery와 Right jugular vein에 PE50 tube로 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 생성시킨다. 생성된 thrombus를 건조시켜 무게를 측정하여 antiplatelet efficacy를 평가한다.

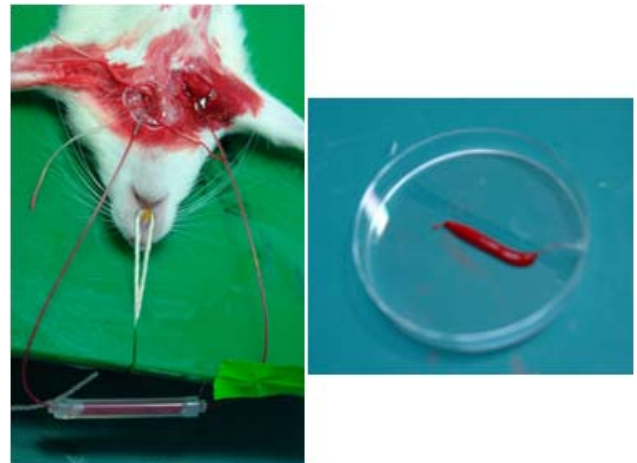


Figure 1. Induction of thrombus by AV shunt rat model
Fifteen rats were divided into three groups (each group rat was five). After one hour from oral administration of ECR 600 mg/kg and 200 mg/kg, rat was established AV shunt operation. And after fifteen minute AV shunt, a thrombus was weighted by electronic balance.

3) 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 다중비교 검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 실험군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U test 를 실시하여 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. *In vitro* 실험

(1) FXa inhibition assay

ECR를 0, 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리한 후, FXa 활성을 측정된 결과, 농도 의존적으로 FXa 활성이 억제되었다. ECR을 처리하지 않은 대조군의 FXa 억제율은 $2.24 \pm 0.27\%$ 인 반면에 ECR을 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리된 실험군에서 약물을 처리하지 않는 대조군에 비해 유의성 있게 활성이 억제되었음을 알 수 있었다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 또한 1 mg/ml 농도로 처리된 실험군에 비해 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리된 실험군이 FXa 활성이 유의성 있게 억제되었다(# $P < 0.05$, Figure 2).

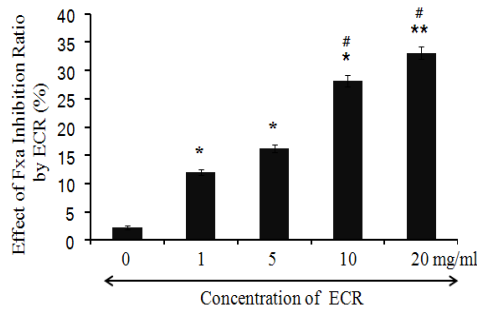


Figure 2. Effects of ECR on purified human free Factor Xa (FXa) using a chromogenic substrate of FXa on platelet surfaces. The plasma was collected in healthy human and centrifuged at 2500 g for 10 min, stored -20°C. Mean ± Standard Error of 5 times. Statistically significant compared with control group (*P<0.05, **P<0.01); Statistically significant compared with exrerimental group treated by 1 mg/ml of ECR (#P<0.05, ##P<0.01)

(2) Prothrombinase assay

ECR를 0, 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리한 후, Prothrombonase 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 Prothrombonase 활성이 억제되었다. ECR을 처리하지 않은 대조군의 Prothrombonase 억제율은 거의 없었으며, 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리된 실험군에서 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해 유의성 있게 활성이 억제되었음을 알 수 있었다(*p<0.05, **P<0.01). 또한 1 mg/ml 농도로 처리된 실험군에 비해 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리된 실험군이 FXa 활성이 유의성 있게 억제되었다(#P<0.05, ##p<0.01, Figure 3).

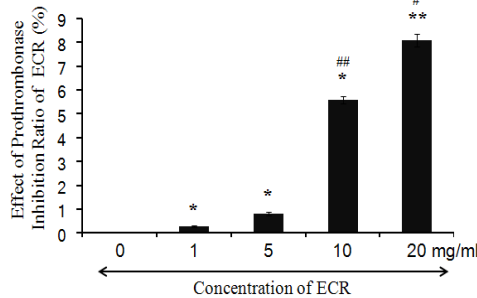


Figure 3. Effects of ECR on prothrombinase activity on platelet surfaces using prothrombin as substrate (measuring generated thrombin). Mean ± Standard Error of 5 times. Statistically significant compared with control group (*P<0.05, **P<0.01); Statistically significant compared with exrerimental group treated by 1 mg/ml of ECR (#P<0.05, ##P<0.01)

(3) Prothrombin time assay

ECR를 0, 0033, 033, 33 mg/ml 농도로 처리한 후, prothrombin time (PT) 측정한 결과, 농도 의존적으로 ECR을 처리하지 않은 대조군에 비해 ECR을 처리한 실험군에서 PT가 증가되었다. 그러나 0.33, 3.3 mg/ml 농도로 처리된 실험군은 각각 13.0 ± 0.4 sec, 14 ± 0.9 sec로 유의성 있게 PT가 증가되었다(*p<0.05, **P<0.01). 또한 0.0033 mg/ml 농도로 처리된 실험군에 비해 0.33, 3.3 mg/ml 농도로 처리된 실험군의 PT가 유의성 있게 증가되었다(#P<0.05, ##p<0.01, Figure 4).

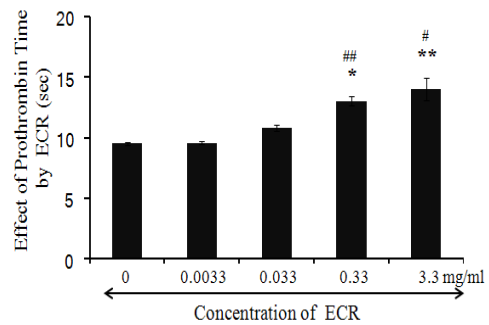


Figure 4. Effects of ECR on prothrombin time (PT) in vitro. Mean ± Standard Error of 5 times. Statistically significant compared with control group (*P<0.05, **P<0.01); Statistically significant compared with exrerimental group treated by 1 mg/ml of ECR (#P<0.05, ##P<0.01)

(4) Activated partial thromboplastin time assay

ECR를 0, 0.033, 0.33, 3.3 mg/ml 농도로 처리한 후, activated partial thromboplastin time (aPPT) 측정한 결과, 농도 의존적으로 ECR을 처리하지 않은 대조군 (46.8 ± 0.8%)에 비해 ECR을 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 증가되었고, 3.3 mg/ml로 처리한 실험군은 유의성 있게 증가되었다(*P<0.05). ECR을 0.0033 mg/ml로 처리한 실험군에 비해 ECR을 3.3 mg/ml 농도로 처리된 실험군의 aPPT가 유의성 있게 증가되었다(#P<0.05, Figure 5).

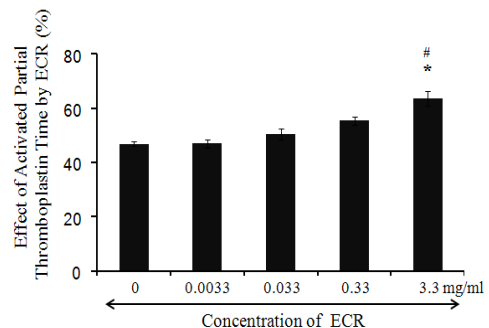


Figure 5. Effects of ECR on the activated partial thromboplastin time (aPTT) in vitro. Mean ± Standard Error of 5 times. Statistically significant compared with control group (*P<0.05); Statistically significant compared with exrerimental group treated by 0.0033 mg/ml of ECR (#P<0.05)

2. In vivo 실험

(1) 전혈 응고시간

전혈 응고 시간 분석 결과, ECR을 처리하지 않은 대조군의 전혈응고 시간은 45.6 ± 6.0 sec이었고, ECR을 600 mg/kg 농도로 구강 투여한 실험군은 전혈응고 시간이 54.2 ± 6.7 sec이었으며, ECR을 200 mg/kg 농도로 구강 투여한 실험군의 전혈응고 시간은 48.1 ± 6.9 sec로 ECR을 600 mg/kg으로 구강 투여한 실험군의 전혈응고시간이 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었고(*P<0.05), ECR을 300 mg/kg으로 구강 투여한 실험군의 전혈응고시간은 대조군에 비해 증가되었으나 유의성은 보이지 않았다(Figure 6).

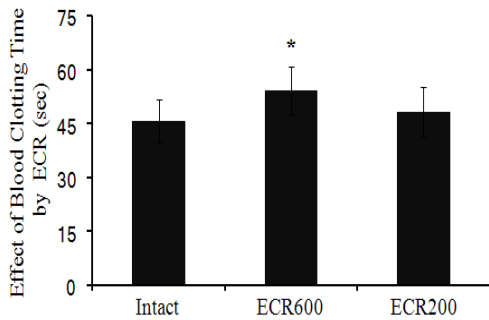


Figure 6. Effects of blood clotting time by ECR treatment
Intact : Normal rats had a distilled water oral administration ;
ECR600 : Rats had a oral administration of extract of curculiginis rhizoma (ECR) with 600 mg/kg concentration ;
ECR200 : Rats had a oral administration of extract of curculiginis rhizoma (ECR) with 200 mg/kg concentration. Mean \pm Standard Errors. Statistically significant compared with intact control group (*P<0.05).

(2) 혈장의 Thromboxane B2 함량

ECR을 구강투여한 후 채혈한 혈장 내 thromboxane B2 함량 분석 결과, intact 대조군의 혈장 내 thromboxane B2 함량은 19.62 ± 1.63 ng/ml이었고, ECR을 600 mg/kg으로 구강투약한 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되어 10.394 ± 2.06 ng/ml으로 혈장 내 thromboxane B2 함량이 감소되었다(*P<0.05). ECR을 200 mg/kg으로 구강투약한 실험군은 17.43 ± 1.36 ng/ml으로 혈장 내 thromboxane B2 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다 (Figure 7).

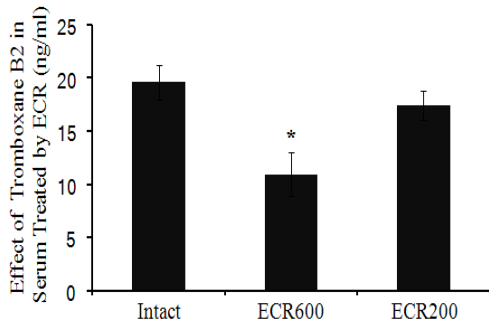


Figure 7. Effects of thromboxane B2 in serum treated with ECR
Intact : Normal rats had a distilled water oral administration ;
ECR600 : Rats had a oral administration of extract of curculiginis rhizoma (ECR) with 600 mg/kg concentration ;
ECR200 : Rats had a oral administration of extract of curculiginis rhizoma (ECR) with 200 mg/kg concentration. Mean \pm Standard Errors. Statistically significant compared with intact control group (*P<0.05).

(3) 혈전의 무게 변화

혈전 무게 변화 실험은 Arteriovenous shunt model (A-V shunt)을 적용한 SD 랫트를 이용하였다. 수술 1시간 전 대조군은 증류수를 구강투여하였고, 실험군은 ECR을 600 mg/kg과 200 mg/kg의 농도로 구강투여하였다. 15분 동안 혈행을 관류시킨 다음, 혈전의 무게를 측정하였다. 증류수를 구강투여한 대조군의 혈전무게는 239 ± 7.9 mg이었으며, ECR 600 mg/kg 농도 투여군의 혈전무게는 199 ± 10.0 mg로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(*P<0.05). 그러나 ECR 200 mg/kg 농도 투여군의 혈전무게는 224.8 ± 12.82 mg로 혈전 무게가 감소되었으나 유의성은 보이지 않았다 (Figure 8).

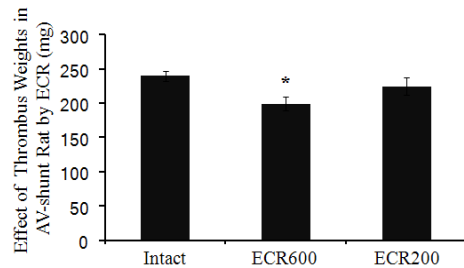


Figure 8. Effects of ECR on thrombus weight in a rat arteriovenous (AV)-shunt model
After AV shunt model experiment, weights of thrombus were analysed in rats treated with ECR (600 and 200 mg/kg). Intact : Normal rats had a distilled water oral administration ;
ECR600 : Rats had a oral administration of extract of curculiginis rhizoma (ECR) with 600 mg/kg concentration ;
ECR200 : Rats had a oral administration of extract of curculiginis rhizoma (ECR) with 200 mg/kg concentration. Mean \pm Standard Errors. Statistically significant compared with intact control group (*P<0.05).

고찰

혈전과 관련한 질환은 심근경색, 말초혈관 질환, 쇼크 및 동맥경화증 등으로 최근 산업화되고, 고령화된 개발도상국이나 선진국에서 신체상의 이상이나 죽음을 초래하는 흔한 질환 중에 하나가 되었다¹¹⁾.

혈전이란 생체의 혈관 내에서 응고된 혈액의 덩어리를 말하며, 혈관의 수축과 함께 과도한 출혈을 방지할 수 있는 중요한 신체 방어기능의 하나이다. 그러나 심장이나 혈관내의 항응고체제의 균형이 어긋난 병리적 상태에서는 혈액의 응고를 촉진시키게 된다^{12,13)}.

한의학에서 혈전은 ‘瘀血’의 병리적 상태로 여겨지고 있으며, 이에 대한 治法은 活血化瘀하는 약물을 응용하는 것이다¹⁴⁾. 이에 活血化瘀 처방과 관련되어 항혈전, 항염증 작용에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이¹⁵⁾는 은감방가감의 혈전증에 관련된 인자와 항산화에 미치는 영향을 연구하였고, 김¹⁶⁾은 지모추출물의 혈전용해능에 대한 연구를, 도¹⁷⁾는 내독소 유발 혈전에 미치는 紅花 및 紅花油의 효능을 연구하였으며, 제¹⁸⁾는 棧菝消積湯의 항혈전과 항염증 효능에 대한 연구를, 임 등¹⁹⁾은 複方紅藤敗醬散의 혈전과 염증에 미치는 영향에 대한 연구를, 강 등²⁰⁾은 壁虎의 항혈전효과에 대한 연구를, 전 등²¹⁾이 한약재의 항혈전효과에 대한 연구를, 오 등²²⁾이 通經四物湯의 내독소 유발 혈전에 미치는 효과에 대해 연구를, 이 등²³⁾이 水牛角, 牛角에 대한 항혈전 효능 연구를, 박 등²⁴⁾이 수종 한약재 추출물의 항산화와 혈전 용해능에 대한 실험을 수행하였으며 저자는 九蒸黃精과 黑參에 대한 항혈전 효능을 연구 보고한 바 있다^{25,26)}.

저자는 실험실에서 仙茅를 가지고 항혈전 효능을 알아보기 위해, 인간 혈장을 이용한 *in vitro* 실험으로 FXa inhibition assay, prothrombinase assay, prothrombin time (PT) assay, activated partial thromboplastin time (aPPT) assay를 실시하였으며, *in vivo* 실험으로 랫트를 이용한 전혈 응고시간 실험, Thromboxane B2 함량 분석, A-V shunt model로 항혈전 효과를 연구하였다.

Factor Xa (FXa)는 효과적인 항혈전 타겟으로서 특별하게

취급되어져 왔으며, 그 이유는 FXa가 내재성 경로와 외재성 경로 모두에서 응고기전에서 주요한 역할을 수행하기 때문이다. 또한 FXa는 prothrombin이 thrombin으로 변환되는 것을 촉진시키는데, 한 개의 FXa 분자는 1,000개 이상의 thrombin 분자를 결과적으로 활성화시킬 수 있다²⁷⁾.

혈액응고는 여러 종류의 단백질 분해 효소들에 의한 연속적인 반응이며, 그 중 첫 단계가 혈액응고가 시작되어 thrombin이 형성하기 전까지의 과정이다. 이에는 내인성 및 외인성의 경로가 존재하며, 내인성 경로를 통해 최종적으로 XIa인자가 제 X인자에 작용하여 Xa를 생성하게 된다. 또한 외인성 경로는 조직상해 장소에서의 조직인자가 유리되면서부터 시작되며 조직인자, 제 VII인자, 제 X인자에 작용되어 Xa가 생성된다. 이처럼 FXa는 혈액 응고 과정에서 내인성, 외인성 경로가 합류한 공통 경로의 가장 첫 단계에 위치한 것이다²⁸⁾.

프로트롬빈 타임(Prothrombin time; PT)은 혈장에 조직 트롬보플라스틴(Thromboplastin)과 칼슘을 첨가하면 피브린으로 석출될 때까지의 시간을 말하는 것으로 이 지표의 단축은 응고성 항진을 의미하며, 연장은 응고성 억제제를 의미하여 각종 출혈성 질환의 진단 및 치료에 중요한 역할을 한다 또한 PT 분석은 Factor II, V, VII, X와 같은 외재성 factor들에 대한 보편적인 응혈 스크린 테스트이며, anti-FXa activity와 잘 부합된다¹¹⁻¹³⁾.

생체내에서 혈액응고는 외인성 경로나 내인성 경로를 통하여 형성된 Thromboplastin의 작용으로 Prothrombin이 Thrombin으로 전환하고 이 트롬빈이 Ca²⁺, Fibrin stabilizing Factor의 작용으로 피브리노젠이 피브린으로 전환하게 된다. 따라서, Prothrombin time은 각종 출혈성질환의 진단·치료에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 간장해의 종류와 정도, 황달의 감별 진단 및 Vitamin K 부족과 흡수장애의 무관정 등에 응용된다.

activated partial thromboplastin time (aPTT)과 prothrombin time (PT)의 실험적 의미는 항혈전 기전에 대한 실험으로, 특히 aPTT는 내인성 경로와 공통경로의 활성성을 평가해보는 것이다²⁹⁾.

Thromboxane B₂는 혈소판응집과 혈관수축을 유도하는 TXA₂의 좋은 지표로서 측정되었다. Arachidonic acid(AA)를 함유하고 있는 세포막인지질은 phospholipase A₂에 의해 lysophospholipid와 AA를 유출시키고 세포막으로부터 방출된 AA는 cyclooxygenase (COX)의 작용으로 PGG₂ 및 PGH₂로 전환된 후 thromboxane synthase의 작용을 받아 TXA₂를 생성하게 된다³⁰⁾. Cyclooxygenase를 경유하는 TXA₂의 이러한 생체내 합성과정은 lipid hydroperoxide (ROOH)에 의해 촉진되어 나타나므로³¹⁾, 항산화 효소활성의 불균형과 지질과산화물의 조직 내 축적의 상황에서는 혈장 TXA₂의 함량이 증가될 것으로 예측할 수 있다.

저자는 ECR에 대한 항혈전 연구가 보고된 바가 없고, 仙茅가 혈행에 미치는 영향을 알아보기 위해, *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 실시하였다.

In vitro 실험 결과, ECR의 항응혈 약리효능이 유의성 있는 것으로 나타났으며, 이는 FXa 억제효과, prothrombinase 활성 억제 효과를 통한 PT의 유의성 있는 증가가 나타났다(Figure 2). 또한 이는 *in vivo*의 전혈 응고

시간 실험과 혈전 무게 측정 결과와 유사하게 나타났는데, *in vivo* 실험에서 전혈응고시간에 미치는 ECR의 효능을 알아본 결과, ECR을 600 mg/kg을 구강투여한 실험군의 전혈응고시간 (54.2±6.7 sec)이 ECR을 투여하지 않은 대조군 (45.6±6.0 sec)에 비해 유의성 있게 증가되었으며 (*P<0.05, Figure 6), 이는 *in vitro* 실험 중 PT 연구결과와 일치하는 것이다 (Figure 3).

혈장 내 thromboxane B₂ 함량을 분석한 결과, 대조군에 비해 ECR을 600 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군 (103.94±2.06 ng/ml)에서 유의성 있게 thromboxane B₂ 함량이 감소되었고 (*P<0.05, Figure 7), ECR을 200 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군 (17.43±1.36 ng/ml)은 대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었다.

Arteriovenous shunt 동물 모델은 *in vivo* 실험에서 항혈전 효능을 알아보기 위해 사용되어 왔으며^{32,33)}, ECR이 혈전 형성에 미치는 영향을 알아보기 위한 A-V shunt 실험 결과, 정상군의 혈전 무게는 240±105 mg이었으나, ECR를 1회 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군의 혈전 무게는 199±10.0 mg로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으나 (*P<0.05, Figure 8), 200 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군의 혈전 무게는 224.8±12.82 mg으로 현저히 감소되었으나 유의성은 보이지 않았다 (Figure 8). 이는 PT, 전혈 응고시간 실험 결과와 유사한 양상을 보이고 있으며, 仙茅의 熱水추출물이 혈액응고 기전에서 내인성 경로와 외인성 경로 모두에서 항혈전 효능을 가지고 있다고 사료된다.

저자는 ECR이 혈액응고에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈장을 이용한 *in vitro* 실험과 랫트를 이용한 *in vivo* 실험을 수행하였다. 연구결과 ECR은 *in vitro* 실험에서 항응고 효과를 나타내었으며, *in vivo* 실험에서 ECR 600 mg/kg 구강 투여군에서 유의성 있는 항혈전 효능을 나타내었다. 향후 仙茅의 유효성분 중 하나인 curculigoside에 대한 혈전 효능에 대한 연구를 수행하여 仙茅를 이용한 항혈전 치료제 연구를 진행할 필요가 있다고 사료된다.

결론

저자는 仙茅를 가지고, *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 통하여 혈액응고에 관여하는 factor들에 대한 억제효과를 연구하였으며, 랫트를 이용한 전혈응고 실험, thromboxane B₂ 분석, A-V shunt 모델로 항혈전 효능을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. FXa inhibition assay 분석 결과, ECR은 농도 의존적으로 FXa 활성이 유의성 있게 억제되었다.
2. Prothrombinase assay 분석 결과, ECR은 농도 의존적으로 활성이 유의성 있게 억제되었다.
3. prothrombin time (PT) assay 분석 결과, ECR은 농도 의존적으로 프로트롬빈 시간을 유의성 있게 증가되었다.
4. Activated partial thromboplastin time (aPPT) assay

분석 결과, ECR 3.3mg/ml 처리군에서만 유의성있게 증가되었다.

5. 랫트의 전혈응고시간 실험 결과, ECR을 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었으나, 200 mg/kg으로 구강투여한 실험군은 증가되었으나 유의성은 없었다.
6. 혈장 내 thromboxane B2 분석 결과, ECR을 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으나, 200 mg/kg으로 구강투여한 실험군은 감소되었으나 유의성은 없었다.
7. A-V shunt 랫트 실험 결과, ECR 600 mg/kg으로 구강 투여한 실험군은 대조군의 혈전 무게에 비해 유의성있게 감소되었고, 200 mg/kg으로 구강투여한 실험군은 감소되었으나 유의성은 없었다.

결과적으로 *in vitro* 실험결과와 *in vivo* 실험결과에서 선모의 항응고, 항혈전 효능이 유의성있게 나타났으며, 향후 ECR의 분획 및 화학성분에 대한 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 행하여 항혈전에 유효한 예방치료제 개발에 기초연구가 필요하다고 판단된다.

참고문헌

1. The whole country a college of Oriental medicine. The joint textbook publish commission compilation. Herbalogy, seoul : Younglimsa, 2007 : 598-599.
2. Cao DP, Han T, Zheng YN, Qin LP, Zhang QY. Phenolic glycosides and lignans components in *Curculigo orchioides* Gaertn. Academic Journal of Second Military Medical University, 2009 ; 2 : 84-87.
3. Li N, Zhao YX, Jia AQ, Liu YQ, Zhou J. STUDY ON THE CHEMICAL CONSTITUENTS OF *CURCULIGO ORCHIOIDES*. Natural Product Research and Development, 2003 ; 3 : 28-31.
4. Park JH, Seo YB. Immunopharmacologic studies about Drugs for Tonifying Yang. Study of Oriental college research center in Daejeon university, 2000 ; 9(1) : 215-223.
5. Lakshmi V, Pandey K, Puri A, Saxena RP, Saxena KC. Immunostimulant principles from *Curculigo orchioides*. J. Ethnopharmacol, 2003 ; 89(2-3) : 181-184.
6. Wong RWK, Rabie B, Bendeus M, Hagg U. The effects of *Rhizoma Curculiginis* and *Rhizoma Drynariae* extracts on bones. Chinese Medicine, 2007 ; 2(13) : 87-93.
7. Mi S. A research for screening antihepatitis B virus drugs with the 2.2.15 cell line. *ZhonghuaYiXueZaZhi*, 1992 ; 72(10) : 612-615,640.
8. Attaur-Rahman. Bioactive Natural Products (PartE). Amsterdam : Elsevier, 2000 : 145-146.
9. Dong BF, Fang ZQ, Shi JR. Effect of *erxiandecoction* and its subdivisions on *granulosacells* secretory function in rats. *ZhongguoZhongXiYiJieHeZaZhi* 2006 ; 26 : 122-125.
10. Peng SJ, Lu RK, Yu LH. Effects of *semen Cuscutae*, *rhizoma Curculiginis*, *radix Morindae officinalis* on human spermatozoan's motility and membrane function in vitro. *Zhongguo Zhong XiYiJie He Za Zhi* 1997 ; 17(3) : 145-147.
11. Seung KR. Effect of *Car thamustinctorius* L. Semen on Endotox in-Induced Thrombosis in Rats. Graduate School Duksung Women's University, 2000.
12. The korean society of pathologists. Pathology II. Seoul : Gomunsa, 1995 : 112-129, 540-542.
13. Kim JJ. Physiology. Seoul : Gomunsa, 1985 : 59-63.
14. The pathological class of whole country a college of Oriental medicine. Text book of eastern medical pathology. seoul : Iljungsa, 1999 : 152-165, 272-274.
15. Lee EJ. The Effect of *Eungapgang-gagam* on Thrombus Disease Related Factors and Oxidative Stress. Graduate School of Wonkwang University, 2007.
16. Kim S. A study on the thrombolytic activities of *Anemarrhena* extracts. Graduate School of Dongshin University, 2007.
17. Do YS. Experimental studies on the effect of *carthami flos aqua-acupuncture* solution and *carthami flos* oil on the blood stasis pattern. Graduate School of Dongguk University, 1995.
18. Je JM. The Experimental Study on Anti-thrombotic and Anti-inflammatory Effect of *NeungaSoJeokTang* (NSJT). Graduate School of Daejeon University, 2007.
19. Lim DU. The Experimental Study on Anti-thrombotic and Anti-inflammatory Effect of *BokbangHongdeungPaejangSan* (BHPS). Graduate School of Daejeon University, 2006.
20. Kang YY, Kim SH, Kim DH. Study on Antithrombotic effect of *Gekko swinhoana* Gunther. Korean J. Oriental Pathology, 2000 ; 14(1) : 8-21.
21. Jeon BH, Jeong WY. Influence of Medicinal Herbal Drug on The Experimental Model of Thrombosis in Animal. Korean J. Oriental Pathology, 1996 ; 10(1) : 72-78.
22. Oh MT, Eom HS. Effect of *Tonggyungsamultang* on the Intravascular Coagulation induced by

- Endotoxin in Rats, Korean J. Oriental Pathology. 1996 ; 11(1) : 77-82.
23. Lee SI, Lee BJ. Comparative Experimental Study of Anti-Thrombosis Effect Comparing Cornu Bubali , Cornu Bos tauri , Cornu Rhinoceri. The Korea Journal of Herbology. 1988 ; 3(1) : 39-48.
 24. Park CS, Joo EY. Antioxidative and Fibrinolytic Activities of Several Medicinal Plant Extracts. The Korea Journal of Herbology. 2010 ; 25(3) : 53-60.
 25. Roh SS. The effects of Polygonati Rhizoma Preparata on anti-thrombotic activity. The Journal of Applied Oriental Medicine. 2008 ; 8(1) : 13-21.
 26. Roh SS, Park JH. The Journal of East-West Medicines. 2008 ; 33(2) : 47-61.
 27. E Perzborn, J Strassburger, A Wilmen, J Pohlmann, S Roehrig, K Hschlemmer and A Straub. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor J Thromb Haemost 2005 ; 3 : 514-521.
 28. Kyu-Hwan, Ahn. The study on antithrombosis and inflammation according to the broth preparation method of Gamijoukyungtang. Graduate School of Wonkwang University. 2009.
 29. Yi KN, Kwon OH. The Clinical Pathological Files. Seoul : UiHakMunHwaSa(醫學文化社). 2000 : 1118.
 30. Nelson DL, Cox MM. Lehninger-Principles of Biochemistry 3rd ed. New York : W.H. Freeman and Company. 2001 : 1253-1254.
 31. Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms of the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food technology* 85-89, 1993
 32. J Lorrain, L Millet, I Lechaire, S Lochot, P Ferrari, C Visconte, M Sainte-Marie, C Lunven, CN Berry, P Schaeffer, JM Herbert and SE O'Connor. Antithrombotic Properties of SSR182289A, a New, Orally Active Thrombin Inhibitor. The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics. 2002 ; 304(2) : 567-574.
 33. James R Pruitt, Donald J Pinto, Melissa J Estrella, Lori L Bostrom, Robert M Knabb, Pancras C Wong, Matthew R Wright and Ruth R Wexler Isoxazolines and Isoxazoles as Factor Xa Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2000 ; 100 : 685-689.