

柿蒂의 *in vitro*와 *in vivo* 항혈전 효능 연구

백경민¹, 노성수^{2*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 심계내과학교실

2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Effects of Aqueous Extract of Diospyros Kaki Calyx on Anti-thrombotic Activity *in vitro* and *in vivo*

Kyung-Min, Baek¹, Seong-Soo, Roh^{2*}

1 : Department of Cardiovascular and Neurologic Diseases(Stroke Center), College of Oriental medicine,
DaeguHaany University¹

2 : Department of Herbology, College of Oriental medicine, DaeguHaany University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study is to research an anti-thrombus effect by Diospyros Kaki Calyx.

Methods : The healthy human plasma were gained and used *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 (orally administrated with distilled water 5ml/kg) and two experimental group treated with extract of diospyros kaki calyx (EKC). Experimental rats were orally 600 mg/kg concentration of EKC and 200 mg/kg concentration of EKC. After an hour from administration, we anesthetized rats and made arteriovenous (AV) shunt rat models to study weight of thrombus, took whole blood to study content of thromboxane B2 and blood clotting time.

Results : *In vitro*, EKC significantly increased inhibitory activity of FXa, prothrombinase compared with intact control group (*P<0.05). PT and aPTT were increased in EKC treated (600 mg/kg) group compared with intact control group (*P<0.05). *In vivo*, blood clotting time of experiment group treated with EKC 600 mg/kg were significantly increased compare with that of intact control group (p<0.05) and content of thromboxane B2 was significantly decreased in group treated with EKC 600 mg/kg in serum. The weight of thrombus were significantly reduced in group treated with EKC 600 mg/kg compared with intact control group (p<0.05). But *in vivo* experiment study, those parameters of group treated with EKC 200 mg/kg were relatively decreased compared with those of intact control group without statistical significance.

Conclusions : EKC has an antithrombic activity because of inhibition internal course such as FXa and prothrombin. And EKC inhibited a hole blood clotting *in vivo* experiment by low content of thromboxane B2.

Key words : Diospyros Kaki Calyx, antithromboic activity, factor Xa assay, prothrombin time assay, thromboxane B2, arteriovenous shunt modle

서론

柿蒂는 감나무과에 속한 낙엽교목인 감나무 *Diospyros kaki* Thunb.의 열매 꽃받침으로, 가을에 성숙한 감의 꼭지를 채취하여 晒乾한다. 그 性味는 平하고 苦澁하며 肺胃經에 歸經

하여 降逆下氣, 止咳의 效能으로 痰濕咳嗽와, 呃逆, 噎氣, 反胃 등의 증상에 응용되고 있고, 胃寒氣逆의 呃逆에 多用하는 데 대개 清熱鎮降의 약을 配合하여 응용한다¹⁾.

柿蒂의 임상응용은 丁香, 生薑 등을 配合하여 胃寒呃逆을 治療하며 (丁香柿蒂湯), 丁香을 配合하여 胸滿咳逆不止에 有效

*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

하고 (柿蒂湯), 蘆根, 竹茹, 代赭石등을 配合하여 胃熱로 인한 呃逆을 치료한다²⁾.

감은 예로부터 애용되던 식품으로 최근 약리효능으로 항산화 및 항염증 작용³⁾, 알콜대사촉진 작용⁴⁾, 항미생물 작용⁵⁾, 항돌연변이 작용⁶⁾, 지질대사 개선 작용⁷⁾, 림프백혈병세포 성장억제 작용⁸⁾, 체온저하 작용⁹⁾ 등의 연구 결과가 발표되었으며, 산업적으로 건강식품인 와인, 푸레, 동결연시, 식초, 주스, 잼, 조청, 천연염료 등으로 개발되어 있다.

감꼭지에 대한 최근 연구 중 사 등¹⁰⁾은 사람의 plasma에서 thrombin time(TT)를 사용한 혈액응고 저해 분석을 통해 柿蒂에서 혈액응고 저해물질을 연구보고 하였는데, 결과적으로 분자량이 130,000~180,000인 대분자이고 구성은 C,H,O로 구성되어 있으며, periodate oxidation시 거의 활성이 소멸되고 열에 안정하며 주로 글루코스와 갈락토스로 구성된 다당류로 추정된다고 보고하였으나, AV shunt 동물을 이용한 항혈전 실험은 수행되지 않았다.

한의학에서 血과 氣의 관계는 ‘氣者 血之帥’¹¹⁾라 하여 血行이 不暢한 경우 活血시키는 약물을 기본으로 사용하되 行氣理氣시키는 약물을 同用함으로써 血滯, 瘀血을 치료하는데 더욱 좋은 효과를 발휘한다. 또한 氣가 行하면 血이 行하고, 氣虛하면 血 역시 虛하며, 氣滯하면 血 또한 滯하게 된다. 《本草綱目》¹²⁾에서 ‘血爲氣之配 氣升則升, 氣降則降; 氣熱則行, 氣寒則滯’라 하여 氣와 血은 밀접히 관련되어 있고, 원활한 혈액순환을 위해서는 治氣가 우선됨을 알 수 있다.

이에 저자는 柿蒂가 혈액순환이 不순하여 발생하는 혈전에 미치는 영향을 알아보기 위해 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 수행하였으며 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험을 위하여 사용된 8주령 (300g) 숫컷 SD 흰쥐는 중앙실험동물(주)에서 분양받아 2주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험당일까지 고형사료 (조단백질 221%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 柿蒂 (*Diospyros kaki* Thunb. ; *Diospyros Kaki Calyx*)는 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) 시료추출

柿蒂 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 柿蒂抽出物 (extract of *diospyros kaki calyx* ; EKC)을 제조하였다. 柿蒂의 추출물 수율은 13.93%였으며, 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실에서 냉동 (-84℃) 보관하였으며, 사용시 적당한 농도로 희석하여 사용하였으며 나머지는 냉동 보관 하였다.

(2) 혈장 준비

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

(3) 혈장에서의 FXa 활성

인간혈장 (45 μ l)에 5 μ l hirudin (10 μ g/ml)을 섞고, 5 μ l EKC (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_m은 Michaelis-Menten 상수이다. K_m은

Lineweaver-Burk plot에 의해 결정된다. IC50은 50%에 의한 대조군의 처음 속도를 결정하는데 필요한 inhibitor의 총량이다.

(4) Prothrombinase 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°C에서 인간 혈소판들을 세척한다. 반응은 프로트롬빈 (1 uM)과 EKC를 추가하면서 시작되며, 20분 후, 20 μl aliquots를 160 μl buffer에 희석하고, 트롬빈 활성을 20 μl chromozym TH (500uM)을 사용하여 측정되었다.

(5) Coagulation assay

Activated partial thromboplastin time (aPPT) 분석과 prothrombin time (PT) 분석은 기성판매품 kit를 이용하였다. EKC 3 μl를 100 μl 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 μl가 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 구강투여 하였고, 약물투여군에도 농도별로 구강투여 하였다.

전혈 응고시간은 약물 투여후 2시간 후 실험동물을 ethyl ether로 마취시켜 회복한 다음 주사기를 이용하여 복강 대정맥에서 혈액을 채취하고 채취된 혈액 중 1 ml를 유리시험관에 넣고 즉시 17% CaCl₂·H₂O 200 μl를 가한 후 가만히 섞어 준 뒤, 혈액에 CaCl₂를 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 phamacia 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 비색정량하였다.

(3) Arteriovenous Shunt model using Rat

EKC 600 mg/kg과 EKC 200 mg/kg 농도로 아침에 0.3 ml씩 1회 구강투여 하였으며, EKC 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 다

음 5 cm silicon tube에 cotton thread를 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.

3) 통계처리

모든 수치는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 다중비교 검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산 동질성을 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 test를 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

EKC를 0, 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리한 후, FXa 활성을 측정한 결과, EKC의 약물 농도에 따라 0 mg/ml에서 2.22±0.23 %였으며, 1 mg/ml에서 11.6±0.88%로 대조군에 비해 유의성 있게 FXa 활성이 억제되었다. 5, 10, 20 mg/ml 농도로 처리된 실험군에서 약물을 처리하지 않는 대조군에 비해 유의성 있게 활성이 억제되었음을 알 수 있었다. 또한 1 mg/ml 농도로 처리된 실험군에 비해 EKC를 10, 20 mg/ml 농도로 처리된 실험군에서 FXa 활성이 농도 의존적으로 유의성 있게 억제되었다(Fig. 1).

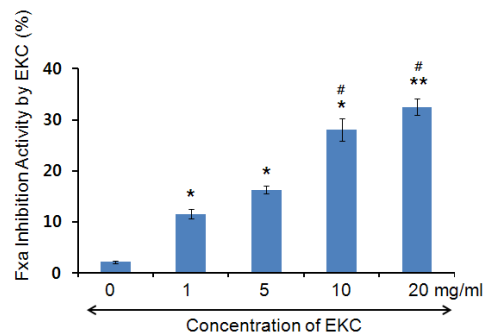


Fig. 1. Effects of EKC on purified human free Factor Xa (FXa) using a chromogenic substrate of FXa on platelet surfaces using prothrombin as substrate (measuring generated thrombin). The plasma was collected in healthy human and centrifuged at 2500 g for 10 min, stored -20°C. Mean ± Standard Error of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

2) Prothrombinase assay

혈장에 대한 Prothrombinase assay 분석 결과, EKC를 1 mg/ml로 처리한 실험군은 억제율이 $0.275 \pm 0.05\%$ 였고, 5 mg/ml로 처리한 실험군은 $0.8 \pm 0.08\%$ 이었으며, 10 mg/ml로 처리한 실험군은 $4.85 \pm 0.5\%$, 20 mg/ml로 처리한 실험군은 $6.45 \pm 0.57\%$ 로 유의성 있게 억제되었다. 또한 10 mg/ml와 20 mg/ml로 처리한 실험군은 1 mg/ml 농도로 처리한 실험군에 비해 억제율이 농도 의존적으로 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2).

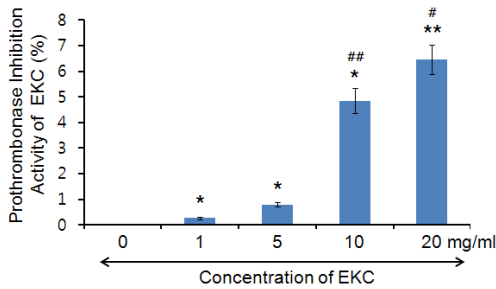


Fig. 2. Effects of EKC on prothrombinase activity on platelet surfaces using prothrombin as substrate (measuring generated thrombin).

The plasma was collected in healthy human and centrifuged at 2500 g for 10 min, stored -20°C . Mean \pm Standard Error of 5 times. Statistically significant compared with control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); Statistically significant compared with experimental group treated by 1 mg/ml of EKC (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

3) Prothrombin time assay

프로트롬빈 시간 실험 결과, EKC를 처리하지 않은 대조군의 PT는 9.5 ± 1.12 였으며, 처리한 약물의 농도가 증가될수록 PT가 증가되었다. 그러나 유의성은 EKC를 0.33 mg/ml과 3.3 mg/ml 농도로 처리한 실험군에서 유의성 있게 PT가 각각 12.22 ± 1.3 , 13.8 ± 0.9 로 증가되었다(Fig. 3).

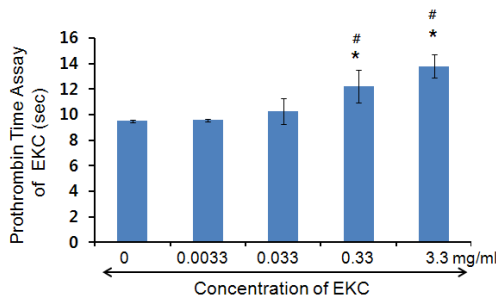


Fig. 3. Effects of EKC on prothrombin time (PT) in vitro. Mean \pm Standard Error of 5 times. Statistically significant compared with control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); Statistically significant compared with experimental group treated by 1 mg/ml of EKC (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

4) Activated partial thromboplastin time assay

EKC를 각각 0, 0.033, 0.33, 3.3 mg/ml 농도로 처리한 후, activated partial thromboplastin time (aPTT) 측정 한 결과, EKC를 처리하지 않은 대조군은 $46.8 \pm 0.8\%$ 였으며, 0.0033 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 $47.5 \pm 1.5\%$, 0.033 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 $51.2 \pm 2\%$ 로 억제율이 증가

되었으나 유의성은 없었다. EKC를 0.33과 3.3 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 4).

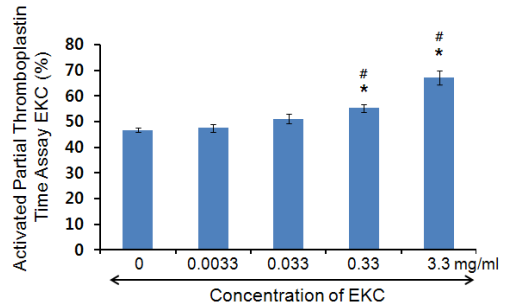


Fig. 4. Effects of EKC on the activated partial thromboplastin time (aPTT) in vitro

Mean \pm Standard Error of 5 times. Statistically significant compared with control group (* $P < 0.05$); Statistically significant compared with experimental group treated by 0.0033 mg/ml of EKC (# $P < 0.05$)

2. In vivo 실험

1) 전혈 응고시간

마취 후 전혈을 채취하여 응고시간을 측정한 결과, 대조군 (48.5 ± 4.1 sec)에 비해 EKC를 600 mg/kg 농도로 구강 투여한 실험군 (54.6 ± 3 sec)에서 유의성 있게 전혈 응고시간이 증가되었다. 그러나, EKC를 200 mg/kg 농도로 구강 투여한 실험군 (44.7 ± 4.2 sec)은 대조군에 비해 전혈 응고시간이 증가되었으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 5).

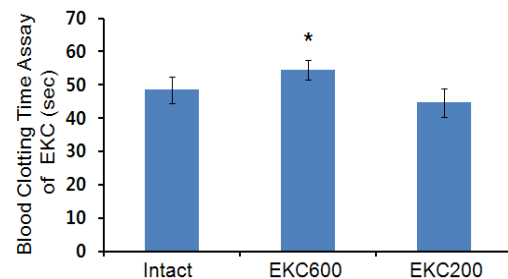


Fig. 5. Effects of EKC on whole blood clotting time Intact: Normal rats had DW (5 ml/kg) administration; EKC600: Rats had oral administration of extract of diospyros kaki calyx (EKC) in 600 mg/kg concentration; EKC200: Rats had oral administration of extract of diospyros kaki calyx (EKC) in 200 mg/kg concentration. Values were expressed mean \pm SD (five rats). Statistically significant compared with intact control group (* $P < 0.05$).

2) 혈장의 Thromboxane B2 함량

ELISA assay를 통해 혈장 내 thromboxane B2 함량을 분석한 결과, intact 대조군의 혈장 내 thromboxane B2 함량은 19.1 ± 1.41 ng/ml이었고, EKC를 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군은 14.44 ± 1.54 ng/ml로 유의성 있게 감소되었다. 또한 EKC를 200 mg/kg으로 구강 투여한 실험군은 18.72 ± 1.29 ng/ml으로 혈장 내 thromboxane B2 함량이 대조군에 비해 감소되었다(Fig. 6).

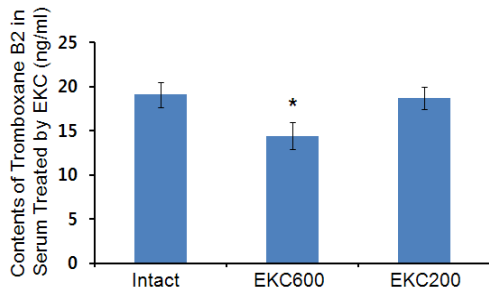


Fig. 6. Effects of EKC on thromboxane B2 in serum
Intact : Normal rats had DW (5 ml/kg) administration ; EKC600 : Rats had oral administration of extract of diospyros kaki calyx (EKC) in 600 mg/kg concentration ; EKC200 : Rats had oral administration of extract of diospyros kaki calyx (EKC) in 200 mg/kg concentration, Values were expressed mean \pm SD (five rat). Statistically significant compared with intact control group (*P<0.05).

3) AV shunt 모델의 혈전 무게 변화

혈전 무게 변화 실험은 Arteriovenous shunt model (A-V shunt)을 적용한 SD rat을 이용하였다. 수술 1시간 전 intact 대조군은 증류수를 구강투여 하였고, 약물 투여군은 EKC를 600 mg/kg과 200 mg/kg의 농도로 각각 구강투여 하였다. 혈전 무게 측정 결과, 대조군의 혈전무게는 235.8 ± 10.57 mg이었으며, EKC 600 mg/kg 농도로 구강 투여한 실험군의 혈전무게는 204.8 ± 7.9 mg로 유의성 있게 감소되었다(p<0.05). EKC를 200 mg/kg 농도로 구강 투여한 실험군의 혈전무게는 221.6 ± 9.23 mg로 무게가 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

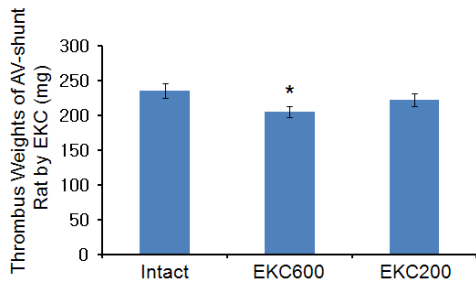


Figure 7. Effect of EKC on thrombus weight in arteriovenous (AV)-shunt model rats
After a-v shunt model experiment, weight of thrombus were analyzed in rats treated with EKC (600 and 200 mg/kg). Intact : Normal rats had DW (5 ml/kg) administration ; EKC600 : Rats had oral administration of extract of diospyros kaki calyx (EKC) in 600 mg/kg concentration ; EKC200 : Rats had oral administration of extract of diospyros kaki calyx (EKC) in 200 mg/kg concentration, Values were expressed mean \pm SD (five rats). Statistically significant compared with intact control group (*P<0.05).

고 찰

심뇌혈관질환은 지난 10년간 꾸준한 발생률을 기록하고 있으며, 식습관의 서구화 및 인구의 고령화로 인해 갈수록 증가할 것으로 예상된다. 심뇌혈관질환은 발병 이전에 그 위험요소를 관리함으로써 예방이 가능하므로¹³⁾ 치료 및 보건학적 측면에서 매우 중요한 의미를 갖는다.

이러한 심뇌혈관질환의 1차 및 2차 예방에 있어서 가장 중추적인 역할을 하고 있는 항혈소판제가 아스피린¹⁴⁾이고, 최근 CAPRIE연구를 포함한 여러 연구에서 심혈관계 질환의 발생을 아스피린보다 효과적으로 낮추는 것으로 입증된 플라비스(clopidogrel)¹⁵⁾ 외 cilostazol(pletal)¹⁶⁾, pentoxifyllin(trental)¹⁷⁾ 등이 있다. 그러나 이와 같은 항혈전 약물은 효과는 뛰어나지만 위장관 출혈과 소화성궤양, 뇌출혈 등의 부작용을 일으켜¹⁸⁾ 혈관질환의 예방과 치료를 위한 장기복용에 제한점이 있다. 따라서 혈전형성 예방을 위한 혈소판의 활성화 및 응고의 억제, 혈전의 용해활성을 가지면서 부작용은 최소화할 수 있는 천연물 성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

천연물을 이용한 항혈전 효과에 대한 기존연구로는 맹종죽엽¹⁹⁾, 목이버섯²⁰⁾, 상황버섯²¹⁾, 초피나무²²⁾, 메밀종자²³⁾ 등이 있으며, 大黃²⁴⁾, 山査子²⁵⁾, 五倍子²⁶⁾, 知母²⁷⁾, 天麻²⁸⁾, 九蒸黃精²⁹⁾, 黑蓼³⁰⁾, 丹蔘³¹⁾ 등의 한약재를 이용한 항혈전 효과에 대한 연구, 四物湯³²⁾, 棱莪消積湯³³⁾, 通經四物湯³⁴⁾ 등의 한약의 항혈전 효과 연구와 감귤과 유자³⁵⁾, 포도 또는 흑마늘 주스³⁶⁾ 등의 건강기능 소재에 이르기까지 항혈전에 대한 탐색 및 기전연구들이 지속되고 있다.

감은 오래 전부터 과일로 식용될 뿐 아니라 민간약으로도 활용되어왔는데, 종기나 염증질환, 치질에 곱감을 이겨 붙였고 부스럼이나 화상에는 불에 말린 감을 바르면 통증을 멎게 하고 새살을 돋게 하는 효능³⁷⁾이 있고 고혈압을 예방하고 동맥경화에 효과가 있는 성분이 있으며^{38,39)} 임상적으로 감잎은 중풍과 간질 치료에도 이용되어왔다⁴⁰⁾.

특히 감쪽지는 생약명으로 柿蒂라고 하며, 감나무 *Diospyros kaki* THUNB.의 열매 꽃받침을 건조한 것으로, 가을에 성숙한 감의 꼭지를 채취하여 晒乾한 것이다. 柿蒂는 理氣藥에 속하여 性味는 平 無毒하고 苦澁하여 肺胃經에 歸經하고, 降逆下氣의 효능으로 임상에서는 胃寒氣滯로 인한 呃逆을 치료하는데 사용된다¹⁾. 이것은 23가지 화학성분(stearic acid, palmitic acid, succinic acid, syringic acid, vanillic acid, gallic acid, kaempferol, quercetin, trifolin, hyperin, β -sitosterol, β -sitosteryl- β -D-glucoside, friedelin, oleanolic acid, ursolic acid, and 19 β -hydroxyursolic acid)⁴¹⁾을 가지고 있어 실제 임상적 활용 외에 더 광범위한 약리적 효능을 가지고 있는데, 조 등⁴²⁾, 김 등⁴³⁾은 감쪽지가 과육보다 3배이상 높은 폴리페놀과 플라보노이드 함유, 우수한 NO 생성 억제효과, COX-2의 발현 저해, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 감소시키는 효능이 있어 항산화 및 항염증 효과가 뛰어나다고 하였다. 그리고 사 등¹⁰⁾은 감쪽지에서 혈액응고저해물질을 정제하여 그 특성을 밝혀 혈전형성 억제 작용에 대한 연구를 수행하였으며, 장 등⁴⁴⁾은 감의 부위별 효능을 구분했는데 감쪽지가 과육, 감잎에 비해 항산화효과 및 유전독성효과가 우월하다고 하였다. 그러나 이와 같이 다양한 효능에도 불구하고 柿蒂의 항혈전 효능에 대한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. 따라서 심뇌혈관질환의 치료에 사용되는 화학 합성제의 부작용이 문제시되고 있고, 예방 및 치료에서의 기능성 물질 이용에 대한 관심이 커지고 있는 추세로 볼 때 柿蒂의 항혈전 효과 검증을 통해 이를 이용한 저비용 고효율의 새로운 심뇌혈관질환 예방 및 치료 물질로 널리 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

혈전이란 생체의 혈관 내에서 응고된 혈액의 덩어리를 말

하며, 혈관의 수축과 함께 과도한 출혈을 방지할 수 있는 중요한 신체 방어기능의 하나이다. 그러나 심장이나 혈관내의 항응고 체제의 균형이 어긋난 병리적 상태에서는 혈액의 응고를 촉진시키게 된다^{45,46}.

피의 응고는 fibrinogen이 thrombin 가수분해에 의해 일어나고 plasmin에 의해 효율적으로 제거되어진다. 정상적인 상태에서는 응고와 용해의 기작이 정교하게 조절되고 있으므로 체내의 항상성을 유지하고 있다. 그러나 노화, 질병에 의해 균형이 깨지면 혈관폐색 등에 의한 심혈관질환과 뇌혈관질환을 초래하게 된다. 현대에 이르러서는 균형이 응고 과다쪽으로 기울어지면서 다양한 성인병의 원인을 제공하고 있다. Thrombin은 혈소판활성화, fibrin 생성, 응고인자의 활성화 등에 관여하여 혈액의 응고뿐만 아니라 세포 내의 여러 가지 조절기능을 담당하고 있다. Antithrombotic agent는 응고과다로 인해 기인되는 심각한 심혈관질환과 뇌혈관질환 치료제 개발에 유망하다⁴⁷.

저자는 실험실에서 柿蒂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 (aPTT) assay를 실시하였으며, *in vivo* 실험으로 rat을 이용한 전혈 응고시간 실험, Thromboxane B2 함량 분석, A-V shunt model로 항혈전 효과를 연구하였다.

Factor Xa (FXa)는 효과적인 항혈전 타겟으로서 내재성 경로와 외재성 경로 모두에서 응고기전에서 주요한 역할을 수행한다. 또한 FXa는 prothrombin이 thrombin으로 변환되는 것을 촉진시키는데, 한 개의 FXa 분자는 1,000개 이상의 thrombin 분자를 결과적으로 활성화시킬 수 있다⁴⁸.

혈액응고는 여러 종류의 단백질 분해 효소들에 의한 연속적인 반응이며, 그 중 첫 단계가 혈액응고가 시작되어 thrombin이 형성하기 전까지의 과정이다. 이에 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 것이다⁴⁹.

프로트롬빈 타임(Prothrombin time; PT)은 혈장에 조직 트롬보플라스틴(Thromboplastin)과 칼슘을 첨가하면 피브리노로 석출될 때까지의 시간을 말하는 것으로 이 지표의 단축은 응고성 향진을 의미하며, 연장은 응고성 억제력을 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 부합된다⁵⁰.

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

의 무관정 등에 응용된다.

Activated partial thromboplastin time(aPTT)과 prothrombin time(PT)의 실험적 의미는 항혈전 기전에 대한 실험으로, 특히 aPTT는 내인성경로와 공통경로의 활성성을 평가하기 위한 인자이다⁵¹.

혈소판응집과 혈관수축을 유도하는 TXA₂를 측정하기 위한 지표로 Thromboxane B₂가 사용되었다. Arachidonic acid(AA)를 함유하고 있는 세포막인지질은 phospholipase A₂에 의해 lysophospholipid와 AA를 유출시키고 세포막으로부터 방출된 AA는 cyclo-oxygenase (COX)의 작용으로 PGG₂ 및 PGH₂로 전환된 후 thromboxane synthase의 작용을 받아 TXA₂를 생성하게 된다⁵². Cyclooxygenase를 경유하는 TXA₂의 이러한 생체내 합성과정은 lipid hydroperoxide (ROOH)에 의해 촉진된다⁵³.

저자는 EKC가 혈액응고 과정에 미치는 영향을 알아보기 위해, *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 수행하였다.

In vitro 실험 결과, EKC의 항응혈 약리효능이 유의성 있는 것으로 나타났으며, 이는 FXa 억제효과, prothrombinase 활성 억제 효과를 통한 PT의 유의성 있는 증가가 나타났다.

In vivo 실험에서 전혈응고시간에 미치는 EKC의 효능을 알아본 결과, EKC을 600 mg/kg을 구강투여한 실험군의 전혈응고시간이 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었으며 (Figure 5), 이는 *in vitro* 실험 중 PT 연구결과와 일치하는 것이다 (Fig. 3).

혈장 내 thromboxane B₂ 함량을 분석한 결과, 대조군에 비해 EKC을 600 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군에서 유의성 있게 thromboxane B₂ 함량이 감소되었고, EKC을 200 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군은 대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 6).

Arteriovenous shunt 동물 모델은 *in vivo* 실험에서 항혈전 효능을 알아보기 위해 사용되어 왔으며^{54,55}, EKC가 혈전 형성에 미치는 영향을 알아보기 위한 A-V shunt 실험 결과, 정상군의 혈전 무게는 240±105 mg이었으나, EKC를 1회 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군의 혈전 무게는 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고, 200 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군의 혈전 무게는 221.6±9.23 mg로 혈전의 무게가 감소되었으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 7)

柿蒂는 임상에서 항응고효능 및 항혈전 효능을 통한 응용이 매우 부족하며, 이 연구를 통해 향후 柿蒂의 유효성분 최적화를 위한 추출조건, 용량결정, 양약과의 병용투여 등에 대한 지속적 연구를 통해 심뇌혈관질환의 치료 및 예방을 위한 한의약의 영역을 확대시킬 수 있을 것으로 기대한다.

결론

저자는 柿蒂의 熱水 추출물이 혈액응고에 관여하는 factor들에 대한 효과를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. *In vitro* 실험 결과, FXa inhibition assay 실험으로 EKC은 농도 의존적으로 FXa 활성이 유의성 있게 억제되었다. Prothrombinase assay 실험 결과, EKC는 농도

의존적으로 트롬빈 활성이 유의성 있게 억제되었다. Prothrombin time (PT) assay 실험 결과, EKC은 농도 의존적으로 프로트롬빈 시간을 유의성 있게 증가시켰다. Activated partial thromboplastin time (aPTT) assay 분석 결과, EKC 0.33mg/ml 와 3.3mg/ml 처리군에서 EKC를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다.

2. *In vivo* 실험 결과, 랫트의 전혈응고시간이 EKC을 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군에서 EKC를 구강투여하지 않은 대조군의 전혈응고시간에 비해 유의성 있게 증가되었다. 또한 혈장 내 thromboxane B2 실험 결과, EKC을 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군에서 thromboxane B2 함량이 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, AV shunt 랫트를 이용한 혈전무게 측정 결과, EKC 600 mg/kg으로 구강투여한 실험군의 혈전무게가 대조군의 혈전 무게에 비해 유의성 있게 감소되었다.

결론적으로柿蒂의 항응고, 항혈전 효능이 대조군에 비해 유의성 있게 나타났으며, 향후 EKC의 분획 및 화학성분에 대한 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 행하여 항혈전에 유효한 예방치료제 개발에 기초연구가 필요하다고 판단된다.

참고문헌

1. The Korean education committee of herbal medicine, college of oriental medicine. Seoul : Younglimsa, 2007 : 405-406.
2. Yan, Yong-He(嚴用和). JiShengFang(濟生方). QuanGuoTuShuGuanWenXianSuoWeiFuZhiZhongXin(全國圖書館文獻縮微復制中心). Beijing. 2004 : 213-214.
3. Kim HJ, Park TH, Jung MS and Son JH. Study on the Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Sarcocarp and Calyx of Persimmon (Cheongdo Bansi). J. Appl. Biol. Chem. 2011 ; 54(2) : 71-78.
4. Kim SG, Lee YC, Suh KG, and Choi HS. Acetaldehyde dehydrogenase activator from persimmon and its processed foods. J Korean Soc Food Sci Nutr 2001 ; 30 : 954-958.
5. Harada M, Sakagami R, Watanabe T, Onitsuka T, Katoh H, and Nagai. A Antibacterial and deodorizing effect of persimmon tannin. Jpn J Conserv Dent. 2005 ; 48 : 314-319.
6. Shinmoto H, Kimura T, Yamagishi K, and Suzuki M. Antimutagenicity of fruit extract on Trp-P2 induced mutagenicity of Salmonella typhimurium TA98. J Jpn Soc Food Sci Tech. 2002 ; 49 : 203-206.
7. Gorinstein S, Bartnikowsaka E, Kulasek G, Zemser M, and Trakhtenberg S. Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol. J Nutr. 1998 ; 128 :

- 2023-2027.
8. Achiwa Y, Hibasami H, Katsuzaki H, Imai K, and Komiya T. Inhibitory effects of persimmon (Diospyros kaki) extract and related polyphenol compounds on growth of human lymphoid leukemia cells. Biosci Biotech Biochem. 1997 ; 61 : 1099-1109.
9. Himbo G, Nadamoto T, Fujisawa F, and Fushiki T. Regulation of the peripheral body temperature by foods : A temperature decrease induced by the Japanese persimmon (kaki, Diospyros kaki). Biosci Biotech Biochem. 2003 ; 67 : 23-28.
10. Sa YS, Kim KA and Choi HS. Purification and Characterization of Anti- Coagulant Activity Fraction from Persimmon Stem. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2003 ; 32(8) : 1323-1327.
11. Wang Ang(汪昂). YiFangJiJie(醫方集解). Seoul : DaXingWenHuaShe(大星文化社). 1992 : 153-154.
12. Li, Shi-Zhen(李時珍). BenCaoGangMu(本草綱目). Sanghai : ShangHaiKeXueJiShuChuBanShe(上海科學技術出版社). 1993 : 571-572.
13. Blaha MJ, Bansal S, Rouf R, Golden SH, Blumenthal RS, Defilippis AP. A practical "ABCDE" approach to the metabolic syndrome. Mayo Clin. Proc. 2008 ; 83 : 932-941.
14. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy-I : prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. BMJ. 1994 ; 308 : 81-106.
15. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events(CAPRIE). Lancet. 1996 ; 348 : 1329-1339.
16. Thompson PD, Zimet R, Forbes WP, Zhang P. Meta-analysis of results from eight randomized, placebo-controlled trials on the effect of cilostazol on patients with intermittent claudication. Am. J. Cardiol. 2002 ; 90 : 1314-1319.
17. Hansen PR, Holm AM, Ki JH, Ledet T, Rasmussen LM, Andersen CB. Pentoxifylline inhibits neointimal formation and stimulates constrictive vascular remodeling after arterial injury. J. Cardiovasc Pharmacol. 1999 ; 34 : 683-689.
18. Miwa K, Kambara H, Kawai C. Effect of aspirin in large doses on attacks of variant angina. Am. Heart J. 1983 ; 105 : 351-355.(Jack Hirsh. Progress review : the relationship between dose of aspirin, side-effects and antithrombotic effectiveness. Stroke. 1985 ; 16 : 1-3.
19. Cho EA, Kim SY, Na IH, Kim DC, In MJ and

- Chae HJ. Antioxidant and anticoagulant activities of water and ethanl extracts of *Phyllostachys pubescence* leaf produced in Geoje. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2010 ; 53(3) : 170-173.
20. Park YS, Choi HJ. Production of antithrombotic material extracted from *auricularia auricular-judae* and the verification of its antithrombotic activity via animal test. *Journal of Korean Society of Food Engineering*. 2010 ; 14(4) : 359-366.
 21. Seo HC. Optimization of anticoagulant production from *Phellinus Linteus Mycelia*. *Korean Journal of mycology*. 2011 ; 39(2) : 117-121.
 22. Jang MJ, Rhee SJ, Cho SH, Woo MH and Choi JH. A study on the antioxidative, anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract. *J. Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006 ; 35(1) : 21-27.
 23. Sohn HY, Kwon JS, Son KH, Kwon GS, Ryu HY and Kum EJ. Antithrombin and thrombosis prevention activity of Buckwheat Seed, *Fagopyrum esculentum moench*. *J Korean Food Sci Nutr*. 2006 ; 35(2) : 132-138.
 24. Yang WK, Kim HK, Sung YY, Cheon MS and Yoon TS. Comparative study of extracts from *Rhubarb* on anti-thrombotic and anti-platelet activity. *Journal of Korean ASsociation of Herbology*. 2010 ; 25(4) : 1-6.
 25. Ryu HY, Kim YK, Kwon US, Kwon CS, Jin IN and Sohn HY. Thrombin inhibition activity of fructus extract of *Catagagus pinnatifida bunge*. *J Korean Society of Life Science*. 2007 ; 17(4) : 535-539.
 26. Song GY, Park BJ and Kim SH. Antithrombotic effect of *Galla Rhois*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2002 ; 33(2) : 120-123.
 27. Kim S. A study on the thrombolytic activities of *Anemarrhena* extracts. Graduate School of Dongshin University. 2007.
 28. Park YS, Song JK, Yoon CH, Chung KS and Choi HS. Anti-platelet and anti-thrombotic effects of *Gastrodia Elata*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 1995 ; 26(4) : 385-389.
 29. Roh SS. The effects of *Polygonati Rhizoma Preparata* on anti-thrombotic activity. *The Journal of Applied Oriental Medicine*. 2008 ; 8(1) : 13-21.
 30. Roh SS, Park JH. The effects of *Ginseng Radix Preparata* extract on anti-thrombotic activity. *the Journal of East-West Medicine*. 2008 ; 33(2) : 47-61.
 31. Yang SA, Im NK, Lee IS. Effects of methanolic extract from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* on in vitro antithrombotic and antioxidative activities. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2007 ; 39(1) : 83-87.
 32. Lee KS, Song BK, Cho BW. Effects of A Constituent Herbs of *Samul-tang* on Antithrombosis and Antistress. *Korean J. Oriental Obstetrics & Gynecology*. 1999 ; 12(2) : 41-74.
 33. Je JM. The Experimental Study on Anti-thrombotic and Anti-inflammatory Effect of *NeungaSoJeokTang (NSJT)*. Graduate School of Daejeon University. 2007.
 34. 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.
 35. Kim SJ, Kim J, Kim HJ et al. Effect of *Naringin* on lipie metabolism and antithrombotic capacity in rat. *J. Fd Hyg. Safety*. 2008 ; 23(4) : 297-303.
 36. Lee MH, Kim MS, Shin HY, Sohn HY. Evaluation of antimicrobial, antioxidant, and antithrombin activity of domestic fruit and vegetable juice. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. 2011 ; 39 : 146-152.
 37. Heo Jun. *Donggeui Bogam*. Seoul : BubIn Publishing. 2007 : 1924.
 38. Uchida S, Ozaki M, Akashi T, Yamashita K, Niwa M and Taniyama K. Effects of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate(green tea tannin) on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1995 ; 22 : 302-323.
 39. Kameda K, Takaku T, Okuda H, Kimura Y, Okuda T, Haitian T, Agata I and Arichi S. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Natl. Prod*. 1987 ; 50 : 680-683.
 40. Bei WJ, Peng WL, MA Y and XU AL. Flavonoids from the leaves of *Diospyros kaki* reduce hydrogen peroxide-induced injury in NG108-15 cells. *Neurosci. Lett*. 2004 ; 363(3) : 262-265.
 41. Zhong S, Feng S. Naphthoquinones and a triterpene from stem of *Diospyros kaki var sylvestris*. *Zhongguo. Yaoke. Xerbao*. 1987 ; 18(4) : 279-280.
 42. Jo YH, Park JW, Lee JM, Ahn GH, Park HR and Lee SC. Antioxidant and anticancer activities of methanol extracts prepared from different parts of *Janseng Daebong persimmon(Diospyros kaki cv. Hachiya)*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2010 ; 39 : 500-505.
 43. Kim HJ, Park TS, Jung MS and Son JH. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of *sarcocarp* and *calyx* of

- persimmon(Cheondo Bansi). J Appl. Biol. Chem. 2011 ; 54(2) : 71-78.
44. Jang IC, Jo EK, Bae MS, Lee HJ, Jeon GI, Park EJ, Yuk HG, Ahn GH and Lee SC. Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon(Diospyros kaki cv. Fuyu) fruit. Journal of Medicinal Plants Research. 2010 ; 4(2) : 155-160.
 45. Korean society for Pathology. Pathology II. Seoul : Gomun Publishing. 1995 : 112-129, 540-542.
 46. Kim JJ. Physiology. Seoul : Gomun Publishing. 1985 : 59-63.
 47. Fisher M. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. J. Thromb. Thrombolysis. 1999 ; 7 : 165-169.
 48. E. Perzborn, J. Strassburger A. Wilmen, J. Pohlmann, S. Roehrig, K-H. Schlemmer. 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.
 49. Ahn KH. The study on antithrombosis and inflammation according to the broth preparation method of Gamijoukyungtang. Graduate School of Wonkwang University. 2009.
 50. Seung KR. Effect of Carthamus tinctorius L. Semen on Endotoxin-Induced Thrombosis in Rats. Graduate School Duksung Women's University. 2000.
 51. Lee GN, Kwon OH. Clinical Pathological File. Medical Publishing. 2000 ; 1118.
 52. Nelson DL, Cox MM. Lehninger-Principles of Biochemistry 3rd ed. New York : W.H. Freeman and Company. 2001 : 1253-1254.
 53. Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms of the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food technology 1993 ; 85-89.
 54. 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.
 55. 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 Inhibitory. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2000 ; 100 : 685-689.