

경동맥 혈전 유발 동물모델을 이용한 한약재 추출물의 효능 검색

박인실^{1#}, 이기모¹, 이인선¹, 한재일², 전원경^{1*}

1 : 한국한의학연구원 한의신약개발그룹, 2 : 현대아산병원

Screening of Anti-thrombotic Activity of Herbal Extracts in Ferric Chloride-induced Thrombosis Model

In Sil Park^{1#}, Ki Mo Lee¹, In Sun Lee¹, Jae Il Han², Won Kyung Jeon^{1*}

1 : KM-Based Herbal Drug Development Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

2 : Laboratory Medicine Team, ASAN Medical Center, Seoul 138-736, Korea

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to examine anti-thrombotic effect of traditional herbal extracts in a rat model of ferric chloride (FeCl₃)-induced carotid arterial thrombosis.

Methods : Thirty minutes prior to a 35% FeCl₃ application, Sprague Dawley(SD) rats were injected with the 10 types of traditional herbal extracts (100mg/kg, intraperitoneal injection), respectively. The effect of these herbal extracts was examined for time to occlusion(TTO) using the Laser doppler flow meter and measured for thrombus weight (TW) in FeCl₃-induced thrombosis model.

Results : In the TTO, *Salvia miltiorrhiza* (Sm, 2.30±0.28 min, *p*<0.001) and *Santalum album* (Sa, 2.19±0.19 min, *p*<0.001) showed significantly delayed TTO more than twice compared with Saline-treated group. *Cnidium officinale* (Co), *Psoralea corylifolia* (Pc), *Scutellaria baicalensis* (Sba), *Panax notoginseng* (Pn), *Angelica tenuissima* (At), *Scrophularia buergeriana* (Sbu), *Rhus verniciflua* (Rv) and *Picrasma quassioides* (Pq), except for *Rhus verniciflua* (Rv) also meaningfully impeded TTO more than one fold. In addition, *Salvia miltiorrhiza*, *Santalum album*, *Cnidium officinale*, *Psoralea corylifolia* and *Scutellaria baicalensis* significantly reduced TW more than 10% compared with Saline-treated group. Especially, *Salvia miltiorrhiza* and *Santalum album* showed the most excellent anti-thrombotic effect among the 10 herbal extracts tested on the restoration of altered TTO and TW.

Conclusions : These results suggest that Sm and Sa extracts have outstanding anti-thrombotic effect in FeCl₃-induced thrombosis model and is potentially useful as herbal medicines for the treatment and prevention of thrombosis.

Key words : Herbal medicine, Ferric chloride, Carotid artery thrombosis model, Thrombosis

서론

혈전(thrombus)이란 생체내의 혈관 또는 심장 내에서 불용성의 혈액 응고괴를 말하는 것으로 비만, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 외상 등으로 인한 혈관내벽의 손상, 혈액조성 및 혈전 용해 인자의 변화, 유전적 요인 등이 복합적으로 관여하여

생성 된다¹⁾. 혈전증(thrombosis)은 외인성 또는 내인성 요인에 의한 혈전의 과다 생성으로 비정상적인 혈액순환 상태를 말하며, 혈전이 혈관벽에 점착 되면서 혈류를 방해하고 심근의 산소 수요에 불균형이 일어나 심근경색이나 뇌경색같은 치명적인 질병을 유발하게 된다²⁾.

한의학에서 혈전의 개념을 瘀血의 범주에 포함시켰으며,

*교신저자 : 전원경, 대전광역시 유성구 유성대로 1672, 한국한의학연구원 한의신약개발그룹
· Tel : 042-868-9505 · E-mail : wkjeon@kiom.re.kr
#제1저자 : 박인실, 대전광역시 유성구 유성대로 1672, 한국한의학연구원 한의신약개발그룹
· Tel : 042-868-9605 · E-mail : ispark@kiom.re.kr
· 접수 : 2013년 8월 22일 · 수정 : 2013년 9월 17일 · 채택 : 2013년 9월 22일

血脈이 소통이 되지 않아 瘀滯가 생성되어 체내 혈액이 일정한 부위에서 정체되어 있는 것을 말한다. 예로부터 瘀血을 치료하는 약을 活血祛瘀藥이라고 하여 血行을 좋게 하고 혈액의 오염과 혈류의 정체를 개선하여 혈액순환기계 병증을 예방하고 치료하는 목적으로 사용되어 왔다³⁾.

한약재의 항혈전 효능 연구로는 혈전증에 유효한 약물을 대상으로 혈소판 활성화 억제 작용⁴⁾과 혈전 용해능⁵⁾ 등을 통해 혈전 생성을 억제하는 한약제제를 개발하기 위한 연구가 이루어지고 있다.

현재 심혈관계 질환의 예방과 치료에 사용되고 있는 약물 요법으로 항혈소판제인 Aspirin, clopidogrel, 혈전용해제인 streptokinase, urokinase, tPA(tissue-type plasminogen activator), 항응고제인 warfarin, coumarin 등이 있다⁶⁾. 그러나 이들은 고가, 낮은 활성 그리고 urokinase를 제외한 나머지 약물들의 경구투여 불가능 등의 문제점이 있고, 위장장애, 불임, 지혈과다억제와 같은 부작용이 제기되어 왔다⁷⁾. 따라서 부작용을 최소화 하고 항혈전 효능을 가진 새로운 항혈전제 개발의 필요성이 증대되고 있으며, 아울러 혈전에 의한 질환의 근원적 예방차원에서 치료제 개발이 요구되고 있는 실정이다.

본 연구팀은 선행연구를 통해 *in vitro* 수준에서 361개의 한약재 중 혈소판 응집 억제 활성이 우수한 한약재 10종을 선별하였고, 선별한 10종에 대해 *in vivo* 수준에서 항혈전 효능을 확인하기 위해 경동맥 혈전 유발 동물모델을 이용한 실험을 통해 효능이 우수한 한약재를 도출하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

흡입마취제 isofluran(포란 액, 중의제약, 한국)은 산소(신홍 산소, 한국)와 질소(신홍산소, 한국)를 혼용하여 사용하였다. 기기는 흡입마취기(VMC Anesthesia Machine, Midmark International, Versailles, Ohio, USA)와 탐침(Powerlab/8sp, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW, Australia)을 설치한 혈류측정기 Laser doppler flowmetry(LDF; BFL21, Transonic Instrument, USA)를 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육환경

본 연구는 한국한의학연구원의 실험동물윤리위원회의 승인을 받은 후(승인번호 12-024, 12-033) 실험동물에 대한 지침을 준수하여 가이드라인에 따라 수행하였다. 수컷 Sprague Dawley(SD) rat (220-250 g, 오리엔트바이오, 한국)을 1주일의 순화기간을 거쳐 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시하여 정상 군, 대조군, 약물 투여군으로 나누어 사용하였다. 피 실험동물은 순화 및 실험기간 동안 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수는 시간당 12-16회, 밤낮주기(12시간 light/12시간 dark), 조도는 150-300 Lx 로 조절되는 일정한 환경에서 사육하였다.

3) 시료의 조제

실험대상으로 선정된 한약재 10종은 옴니허브(대구, 한국)와 광명당(울산, 한국)에서 한약재의 외부형태를 비교 검사한 후 규격 포장한 전형 또는 절단생약으로 구입하였고, 한약재 보관소에 보관하고 실험에 필요할 때 마다 정량하여 사용하였다. 실험에 사용한 한약재 10종의 명칭, 추출에 사용한 부위, 기원 및 수율을 Table 1에 나타내었다. 각 한약재는 100 g 을 정량하고 증류수 1000 mL를 등근 플라스크에 넣어 70~90℃에서 2시간 동안 가열하면서 환류 추출한 다음 여과지로 여과하였다. 상기 여과액을 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하고, 35~40℃의 수용액 상에서 회전 진공농축기를 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조시켜 획득한 동결건조물은 실험에 사용할 때까지 냉암소(冷暗所)에 보관하였다.

Table 1. List of 10 medicinal herbs used in this study

No.	Scientific name	Korean Name	Used part	Origin	Yield (%)
1	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	丹蔘	Stem	China	33.2
2	<i>Santalum album</i>	白檀香	Stem	China	1.42
3	<i>Cnidium officinale</i>	川芎	Stem, Root	China	29
4	<i>Psoralea corylifolia</i>	補骨脂	Fruit	China	13
5	<i>Scutellaria baicalensis</i>	黃金	Root	Korea, China	51.6
6	<i>Panax notoginseng</i>	三七	Root	Korea, China	5.23
7	<i>Angelica tenuissima</i>	藁本	Root, Stem	Korea, China	9.22
8	<i>Scrophularia buergeriana</i>	玄蔘	Root	Korea, China	5.2
9	<i>Picrasma quassioides</i>	苦木	Stem, Bark	Korea	3.4
10	<i>Rhus verniciflua</i>	漆皮	Stem, Bark	Korea, China	5.8

2. 실험방법

1) 경동맥 혈전 유발 동물모델에 약물 투여

SD rat에 한약재 10종의 열수 추출물 100 mg/kg을 혈전 유발 30분 전에 복강투여 하였고, 대조군은 동량의 완충액(Saline)을 복강 투여 하였다.

2) FeCl₃를 이용한 경동맥 혈전 유발 동물모델 제작

실험동물의 경동맥 혈전 유발 방법은 경동맥에 FeCl₃를 적신 filter paper를 접촉시켜 혈관 내에 혈전을 유발시키는 방법을 이용하였다. 본 연구팀은 선행연구⁸⁾에서 35%의 FeCl₃로 유도된 동물모델에서 약물 효능 평가시 가장 안정적인 결과를 도출하였기에 본 연구에서도 35%의 FeCl₃를 최적 농도로 채택하였다.

모든 실험동물은 2% isoflurane과 7:3의 질소산소 혼합기체로 흡입마취를 유도하였고, 수술을 진행하는 동안 일정한 체온을 유지하기 위하여 수술 pad의 온도를 37℃로 유지하였다. 실험동물의 정중경부를 절개하고 미주신경과 주변 혈관이 손상되지 않도록 주의하여 우측 경동맥을 노출 시킨 후 FeCl₃를 적신 정사각형 filter paper (2×2 mm)를 3분간 접촉시켰다. 그 후 filter paper를 제거하고 생리식염수로 닦아낸 다음 혈류측정기를 사용하여 최대 30분 동안 혈류 측정 을 시행하였다.

혈전 생성 시간의 분석은 chart4(ADI, Australia) 프로그램

램을 사용하였으며, 측정값의 기본 단위는 tissue perfusion unit(TPU) 이다. 혈전 생성 시간은 TPU값이 0까지 완전히 떨어진 시점을 기준으로 하였다.

3) 경동맥 혈관 적출 및 무게측정

모든 실험동물은 경동맥 혈전 유발을 실시한 다음 혈전 생성 시간을 측정 후 혈전이 생성된 혈관 부위를 절개하여 무게를 측정하였다. 손상된 경동맥 적출 시 출혈을 최소화하기 위해 혈관 양쪽을 봉합사로 단단히 묶고 3~4 mm 적출하였다. 적출한 손상된 경동맥을 생리식염수에 세척한 다음 혈관 무게를 측정하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 평균 ± 표준편차로 표시하였고 그룹 간 평균비교는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)으로 분석한 후 tukey로 사후검증 하였다. 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 채택하였다. 모든 통계처리는 SPSS 12.0 패키지(SPSS, USA) 와 R package version 2. 12.0을 이용하였다.

결 과

1. 혈전 생성 시간 측정

Saline과 한약재 10종의 열수 추출물을 각각 투여하고 FeCl₃로 경동맥 혈전 유발 동물모델 제작 후 혈전 생성 시간을 측정 한 결과는 Table 2, Fig. 1과 같다. Saline 투여군의 혈전 생성 시간은 8.00 ± 0.76 min으로 측정되었고, 본 연구팀의 선행연구⁸⁾에서 FeCl₃를 처리하지 않은 정상군에서 30분의 관찰 시간 내에 혈전이 생성되지 않은 것과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 생성 시간이 감소되어 경동맥 혈전 유발 모델이 확립된 것을 확인하였다.

한약재 10종의 열수 추출물 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 생성 시간이 지연된 약재는 丹蔘(Salvia miltiorrhiza, Sm), 白檀香(Santalum album, Sa), 川芎(Cnidium officinale, Co), 補骨脂(Psoralea corylifolia, Pc), 黃金(Scutellaria baicalensis, Sba), 三七(Panax notoginseng, Pn), 藜本(Angelica tenuissima, At), 玄蔘(Scrophularia buergeriana, Sbu), 苦木(Picrasma quassioides, Pq) (18.17 ± 0.75, 17.50 ± 1.52, 14.17 ± 1.47, 13.83 ± 0.98, 12.83 ± 0.75, 12.00 ± 1.10, 10.50 ± 1.05, 10.33 ± 1.03, 10.17 ± 1.72 min) 순이었다. 특히 丹蔘과 白檀香 투여군에서 대조군과 비교하여 혈전 생성 시간이 각각 2.30 ± 0.28 배, 2.19 ± 0.19 배 지연된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 漆皮(Rhus verniciflua, Rv) (9.00 ± 0.89 min) 투여군에서는 혈전 생성 시간이 증가되지 않았다.

Table 2. Anti-thrombosis effects of 10 medicinal herbs after FeCl₃ induced carotid arterial thrombosis in SD

Sample	n	TTO (min)	TTO extension (ratio)	TW (mg/mm)	TW inhibition (%)
Saline	23	7.96 ± 0.64 ^f	-	0.78 ± 0.02 ^{d,e}	-
Salvia miltiorrhiza	6	18.17 ± 0.75 ^g	2.30 ± 0.28	0.62 ± 0.01 ^b	21.52 ± 2.82

<i>Santalum album</i>	6	17.50 ± 1.52 ^g	2.19 ± 0.19	0.57 ± 0.03 ^a	26.58 ± 4.78
<i>Cnidium officinale</i>	6	14.17 ± 1.47 ^g	1.64 ± 0.16	0.68 ± 0.04 ^c	10.83 ± 4.76
<i>Psoralea corylifolia</i>	6	13.83 ± 0.98 ^{b,c}	1.89 ± 0.17	0.70 ± 0.02 ^c	10.65 ± 3.58
<i>Scutellaria baicalensis</i>	6	12.83 ± 0.75 ^{b,c}	1.62 ± 0.20	0.69 ± 0.02 ^c	12.27 ± 2.53
<i>Panax notoginseng</i>	6	12.00 ± 1.10 ^d	1.65 ± 0.22	0.75 ± 0.01 ^d	2.74 ± 2.39
<i>Angelica tenuissima</i>	6	10.50 ± 1.05 ^{d,e}	1.26 ± 0.12	0.78 ± 0.02 ^{d,e}	1.56 ± 2.78
<i>Scrophularia buergeriana</i>	6	10.33 ± 1.03 ^{d,e}	1.29 ± 0.13	0.77 ± 0.02 ^{d,e}	0.81 ± 2.19
<i>Picrasma quassioides</i>	6	10.17 ± 1.72 ^{d,e}	1.27 ± 0.22	0.77 ± 0.04 ^{d,e}	-1.32 ± 5.77
<i>Rhus verniciflua</i>	6	9.00 ± 0.89 ^{e,f}	1.16 ± 0.19	0.80 ± 0.02 ^e	-1.02 ± 3.14

Results are mean ± S.D. (n = 6–23). Means of letters recorded as a,b,c,d,e,f and g within a column indicate the same level of anti-thrombotic effects within the values determined by one-way ANOVA. Tukey's post-hoc test. *** $p < 0.001$ indicate significant differences between each group and Saline treated group. TTO; time to occlusion, TW; thrombus weight.

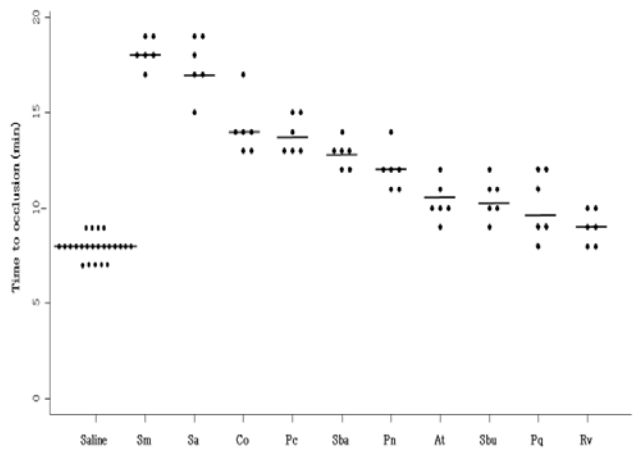


Fig. 1. The effect of 10 types of traditional herbal extracts on time to occlusion in FeCl₃-induced carotid arterial thrombosis model. Thirty minutes prior to FeCl₃ application, the SD rats were injected with saline and 10 types of herbal extracts (100 mg/kg, intraperitoneal injection). The left carotid arteries were exposed, and a filter paper saturated with 35% FeCl₃ was placed on top of the exposed vessel for 3 min. The data are presented as the mean ± S.D. (n=6–23). *Salvia miltiorrhiza*, Sm; *Santalum album*, Sa; *Cnidium officinale*, Co; *Psoralea corylifolia*, Pc; *Scutellaria baicalensis*, Sba; *Panax notoginseng*, Pn; *Angelica tenuissima*, At; *Scrophularia buergeriana*, Sbu; *Picrasma quassioides*, Pq; and *Rhus verniciflua*, Rv.

2. 혈전 무게 측정

실험 종료 후 FeCl₃에 의해 혈전이 생성된 경동맥 혈관을 적출하여 혈전 무게를 측정 한 결과는 Table 2와 같다. Saline 투여군의 혈전 무게는 0.78 ± 0.03 mg/mm로 측정되었고, 본 연구팀의 선행연구⁸⁾에서 FeCl₃를 처리하지 않은 정상군의 혈전 무게 0.47 ± 0.08 mg/mm와 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 무게가 증가하여 경동맥 혈전 유발 모델이 확립된 것을 확인하였다.

한약재 10종의 열수 추출물 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 무게가 감소된 추출물은 白檀香, 丹蔘, 黃金, 川芎, 補骨脂 (0.57 ± 0.03, 0.62 ± 0.01, 0.68 ± 0.02, 0.68 ± 0.04, 0.70 ± 0.02 mg/mm) 순으로 측정되었다. 특히 白檀香, 丹蔘 투여군에서 대조군과 비교하여 혈전 무게가 각각 26.58 ± 4.78%, 21.52 ± 2.82% 감소된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 玄蔘, 苦木, 漆皮 (0.77 ±

0.02, 0.77 ± 0.04 , 0.80 ± 0.02 mg/mm) 투여군 에서는 혈전 무게가 오히려 증가되었다.

고찰

혈전이 발생하는 원인은 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨, 비만, endotoxin shock 등으로 인한 혈관내피세포의 손상, plasminogen, plasmin, urokinase와 같은 체내에 존재하는 혈전분해효소의 변화, protein C, protein S, antithrombin III의 결핍과 같은 유전적 요인들이 복합적으로 관여하여 발생한다⁹⁾.

혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관과 같은 전신의 혈관 및 심장 등 순환기계에서 발생할 수 있으며, 혈전이 생성되는 부위에 따라 그 질환의 성질이 다르게 나타난다. 정맥혈전은 fibrin clot, 적혈구의 분포가 상대적으로 높고¹⁰⁾, 동맥혈전은 응집된 혈소판이 주요 조성으로 동맥에서 혈전이 발생하면 혈액순환의 이상이 생기고 더 나아가 폐색된 부위 주위로 산소나 영양물질의 공급을 받지 못하는 허혈을 유발한다고 알려져 있다¹¹⁾.

韓醫學에서 혈전은 瘀血의 범주에 속하고 체내의 일정부위에 혈액이 응체되거나 오예불결한 혈액을 말하는 것으로서 七情傷, 飲食傷, 飲酒, 吸煙, 藥物, 外傷, 外感邪氣 등에 의해 야기되는 병리적 산물이다¹²⁾. 瘀血에 의한 증상은 부종과 같은 비교적 경미한 증상에서부터 관상동맥협착증, 경색, 울혈과 같은 생명을 위협하는 심각한 질병에 이르기까지 다양한 형태로 나타나게 되며¹³⁾, 그에 따른 치료는 活血祛瘀의 효능을 가진 본초가 사용되고 있다¹⁴⁾.

본 연구팀은 FeCl₃를 이용한 경동맥 혈전유발 동물모델 시스템을 구축하여 천연약물의 항혈전 효능평가를 진행하여 왔다¹⁵⁻¹⁷⁾. FeCl₃를 적신 filter paper를 혈관에 도포하여 일정 시간이 지나면 혈관벽을 통해 확산되는 FeCl₃에 의해 혈관내막이 손상을 입게 되고 혈관 내피세포의 콜라겐과 tissue factor들이 혈액에 노출된다¹⁸⁾. 이들이 혈소판 표면의 GPIIb/IX 수용체에 결합하여 혈소판을 활성화시키고, 활성화된 혈소판 응집과를 중심으로 트롬빈은 가용성 피브리노겐의 불용성 피브린으로 전환되는 반응을 매개한다. 이 응집에 적혈구, 백혈구 등 혈액 내 고형성분이 부착되어 조밀하고 견고한 혈전이 생성된다¹⁹⁾.

따라서 FeCl₃를 이용한 경동맥 혈전 유발 동물모델은 한약재 추출물 투여군의 혈전 생성 시간과 혈전 무게를 측정하여 실제 한약재 추출물의 흡수에 따른 혈전 생성 억제 효과를 판단하는 기준으로 삼을 수 있어 본 실험에서 항혈전 효능검색 방법으로 채택되었다. Saline을 투여하고 FeCl₃로 경동맥 혈전 유발 동물모델 제작 후 혈전 생성 시간과 혈전 무게를 측정한 결과 FeCl₃를 처리하지 않은 정상군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 생성 시간이 감소되고 혈전 무게가 증가되어 경동맥 혈전 유발 모델이 확립된 것을 확인하였다.

저자는 선행연구에서 선별된 혈소판 응집 억제 활성이 우수한 한약재 10점의 항혈전 효능을 규명하기 위하여 *in vivo* 수준에서 혈전 생성 시간과 혈전 무게를 측정하였다. 그 결과 丹蔘, 白檀香, 川芎, 補骨脂, 黃金, 三七, 藜本, 玄蔘 그리고 苦木 추출물 투여군에서 혈전 생성 시간이 대조군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 지연되었고, 白檀香, 丹蔘, 黃金, 川

芎, 補骨脂 추출물 투여군의 혈전 무게가 대조군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 감소하는 것으로 나타났다. 특히 丹蔘, 白檀香 추출물 투여군에서 대조군과 비교하여 혈전 생성 시간이 각각 2.30 ± 0.28 배, 2.19 ± 0.19 배 지연되었고, 혈전 무게가 각각 $21.52 \pm 2.82\%$, $26.58 \pm 4.78\%$ 감소되어 실험에 사용된 한약재 10종의 열수추출물 중에서 항혈전 활성이 가장 우수한 소재로 丹蔘과 白檀香이 도출되었다.

丹蔘에 대한 실험적 연구로는 *in vitro* 수준에서 혈소판 응집 억제 효과²⁰⁻²¹⁾, 항산화 효과²²⁾에 의한 항혈전 효능을 등이 연구되었고, *in vivo* 수준에서 A-V shunt 동물모델²³⁾, 심근 허혈 재관류 모델²⁴⁾, 중뇌동맥 폐색 모델²⁵⁾에서 항혈전 효능이 밝혀진 바 있으며, 白檀香은 *in vitro* 수준에서 혈소판 응집억제 및 혈전 용해 활성²⁶⁾이 보고되어 본 실험에서 항혈전 효능이 예측되었다. 그러나 본 연구에서와 같이 FeCl₃를 이용한 경동맥 혈전유발 동물모델에서 丹蔘과 白檀香의 항혈전 효능에 관한 연구는 없었다.

천연약물에 포함된 항산화 효과를 나타내는 생리활성 성분이 항혈전 활성에 영향을 미칠 가능성이 크다고 알려져 있다²⁷⁾. 본 실험에 사용된 한약재 중에서 川芎, 補骨脂, 黃金, 三七, 藜本, 玄蔘, 苦木의 항산화 효과에 대한 연구²⁸⁻³⁴⁾를 바탕으로 본 실험에서 항혈전 효능이 예측되었지만 대조군과 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 생성 시간이 지연되고 혈전 무게가 감소한 한약재는 川芎, 補骨脂, 黃金이었다. 漆皮는 *in vitro* 수준에서 항혈소판 작용³⁵⁾이 보고되었지만 본 연구의 *in vivo* 수준에서는 항혈전 효능이 낮게 측정되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 丹蔘과 白檀香 추출물이 경동맥 혈전 유발 동물모델을 이용한 *in vivo* 실험에서 우수한 항혈전 효능을 나타내었다. 또한 adenosine diphosphate 유리에 의한 혈소판 응집, arachidonic acid의 대사물질인 Thromboxane A₂에 의한 혈소판 응집, immunoglobulin E에 감작된 호염구가 항원을 감작할 때 분비하는 platelet activating factor에 의한 혈소판 응집³⁶⁾과 같은 혈전형성기전으로부터 丹蔘과 白檀香의 항혈전 기전을 예측해 볼 수 있으며, 추후 연구를 통해 정확한 약동학적 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

FeCl₃를 이용한 경동맥 혈전 유발 동물모델에서 한약재 10종의 열수 추출물의 항혈전 효능 검색을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Saline을 투여하고 FeCl₃로 경동맥 혈전 유발 동물모델 제작 후 혈전 생성 시간과 혈전 무게를 측정한 결과 FeCl₃를 처리하지 않은 정상군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 생성 시간이 감소되고 혈전 무게가 증가되어 경동맥 혈전 유발 모델이 확립된 것을 확인하였다.
2. 효능 검색에 사용된 한약재 10종의 열수 추출물 중에서 대조군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 생성 시간이 지연된 한약재는 丹蔘, 白檀香, 川芎, 補骨脂, 黃金, 三七, 藜本, 玄蔘, 苦木 순이었으며, 특히 丹蔘과 白檀香 추출물

투여군에서 혈전 생성 시간이 2배 이상 지연되었다.

3. 효능 검색에 사용된 한약재 10종의 열수 추출물 중에서 대조군과 비교하여 유의성 있게 ($p < 0.001$) 혈전 무게가 감소된 한약재는 白檀香, 丹蔘, 黃金, 川芎, 補骨脂 순이었으며, 특히 白檀香과 丹蔘 추출물 투여군에서 혈전 무게가 20% 이상 감소되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 한약재 10종의 열수 추출물 중에서 丹蔘과 白檀香 추출물이 혈전 생성을 예방하고 혈전증의 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 丹蔘과 白檀香의 항혈전 활성의 정확한 약동학적 기전과 개별성분 또는 추출분획별 항혈전 효능 비교에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 기초기술연구회의 내부기관협동연구사업 (kiom-2010-2) 과 한국한의학연구원의 연구비 지원 (K12220, K13220)에 의해 수행되었음.

References

1. Xiang YZ, Kang LY, Gao XM, Shang HC, Zhang JH, Zhang BL. Strategies for antiplatelet targets and agents. *Thrombo Res*. 2008 ; 123 : 35-49.
2. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl Med*. 1999 ; 340 : 115-26.
3. Huh Jun, Dongyibogam. Seoul : Namsangdang. 1980 : 134-5.
4. Lee JO, Kim CY, Lee SW, Oak MH. Antiplatelet and antithrombotic activities of *Lindera obtusiloba* extract in vitro and in vivo. *J Appl Pharmacology*. 2010 ; 18(2) : 205-10.
5. Nutescu EA, Shapiro NL, Ibrahim S, West P. Warfarin and its interactions with foods, herbs and other dietary supplements. *Expert Opin Drug Saf*. 2006 ; 5(3) : 433-51.
6. Miwa K, Kambara H, Kawai C. Effect of aspirin in large doses on attacks of variant angina. *Am Heart J*. 1983 ; 105 : 351-5.
7. Verstraeta M, Lijnen HR, Collen D. Thrombolytic agents in development. *Drugs*. 1995 ; 50 : 29-42.
8. Lee IS, Choi SG, Jeon WK. Optimization of ferric chloride induced carotid artery thrombosis model in a rat : Effect of *Ginkgo biloba* extracts. *Kor J Clinical Laboratory Sciences*. 2011 ; 43(4) : 179-87.
9. Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Ferris DM, Myers DD, Im M, Wakefield TW, Mackman N, Fay WP. Microvascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood*. 2005 ; 105 : 192-8.
10. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AW, Prins MH, Girolami A. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2003 ; 348 : 1435-41.
11. van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HF, Connolly TM, de Groot PG, Sixma JJ. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest*. 1994 ; 93 : 615-32.
12. Bang YJ. *Practical Chinese Internal Medicine*. Shanghai : Shanghai Science Technology . 1988 : 439-49.
13. Boos CJ, Lip GY. Blood clotting, inflammation, and thrombosis in cardiovascular events : perspectives. *Frontiers in Bioscience*. 2006 ; 11 : 328-36.
14. Guemsungsa. *Pathology of Eastern Medicine*. DaeJeon : Hanlimone. 1994 : 348-56.
15. Kim SK, Jeon WK. Effects of modified Je-Ho-Tang on ferric chloride-induced thrombosis in a rat model and of peripheral circulatory disturbance in a mouse model. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2010 ; 53 : 842-6.
16. Jeon WK, Yoo BK, Kim YE, Park SO, Park SM, Ko BS. Effect of extracts for herbal medicines on the inhibition of whole blood aggregation. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2007 ; 50(4) : 352-7.
17. Heo EJ, Lee IS, Kang HW, Jeon WK. Effectos of Sokmyong-tang on ferric chloride-induced carotid injury and thrombosis in a rat model. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2012 ; 26(5) : 732-7.
18. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, Mangin PH, Gachet C. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thrombo Haemost*. 2011 ; 9 : 779-89.
19. Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol*. 2001 ; 38(4 Suppl 12) : 2-5.
20. Yu WG, Xu LN. Effect of acetylsalvianolic acid A on platelet function. *Yao Xue Xue Bao*. 1994 ; 29(6) : 412-6.
21. Zou ZW, Xu LN, Tian JY. Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from *radix Salviae miltiorrhizae* (danshen). *Yao Xue Xue Bao*. 1993 ; 28(4) : 241-5.
22. Yang SA, Im NK, Lee IS. Effect of methanolic extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on in vitro antithrombotic and antioxidative activities. *Korean J Food Sci Technol*. 2007 ; 39(1) : 83-7.
23. Fan HY, Fu FH, Yang MY, Xu H, Zhang AH, Liu K. Antiplatelet and antithrombotic activities of

- salvianolic acid A, *Thromb Res.* 2010 ; 126(1) : 17–22.
24. Liu J, Zhang D, Li J, Feng J, Yang X, Shi D, Liang X. Effects of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* aqueous extracts and compatibility on rat myocardial ischemic reperfusion injury. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2011 ; 36(2) : 189–94.
25. Dong JC, Xu LN. Beneficial effects of acetylsalvianolic acid A on focal cerebral ischemic rats subjected to middle cerebral artery thrombosis. *Yao Xue Xue Bao.* 1996 ; 31(1) : 6–9.
26. Sung YW, Lee JH, Koo BS, Kim GW. Preventive effects of *Santalum album* L. extracts on oxidation, platelet aggregation and thrombosis. *J Orient Neuropsychiatry.* 2012 ; 23(1) : 115–29.
27. Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res.* 1987 ; 45 : 477–84.
28. Ramalingam M, Park YK. Free radical scavenging activities of *Cnidium officinale* Makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort. methanolic extracts. *Pharmacogn Mag.* 2010 ; 6(24) : 323–30.
29. Tang SY, Gruber J, Wong KP, Halliwell B. *Psoralea corylifolia* L. inhibits mitochondrial complex I and proteasome Activities in SH–SY5Y Cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 ; 1100 : 486–96.
30. Zhang XW, Li WF, Li WW, Ren KH, Fan CM, Chen YY, Shen YL. Protective effects of the aqueous extract of *Scutellaria baicalensis* against acrolein–induced oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Pharm Biol.* 2011 ; 49(3) : 256–61.
31. Kim JG, Park SD, Park WH. Influence of *Panax notoginseng* on the atherosclerosis induced by high–cholesterol feed in Rats. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2006 ; 20(5) : 1187–95.
32. Ka MH, Choi EH, Chun HS, Lee KG. Antioxidative activity of volatile extracts isolated from *Angelica tenuissimae* roots, peppermint leaves, pine needles, and sweet flag leaves. *J Agric Food Chem.* 2005 ; 53(10) : 4124–9.
33. Jeong EJ, Ma CJ, Lee KY, Kim SH, Sung SH, Kim YC. KD–501, a standardized extract of *Scrophularia buergeriana* has both cognitive–enhancing and antioxidant activities in mice given scopolamine. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 121(1) : 98–105.
34. Jung YT, Lee IS, Whang K, Yu MH. Antioxidant effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts. *J Life Sci.* 2012 ; 22(3) : 354–9.
35. Jeon WK, Lee JH, Kim HK, Lee AY, Lee SO, Kim YS, Ryu SY, Kim SY, Lee YJ, Ko BS. Anti–platelet effects of bioactive compounds isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes. *J Ethnopharmacol.* 2006 ; 106 : 62–9.
36. Yao SK, Ober JC, McNatt J, Benedict CR, Rosolowsky M, Anderson HV, Cui K, Maffrand JP, Campbell WB, Buja LM. ADP plays an important role in mediating platelet aggregation and cyclic flow variations in vivo in stenosed and endothelium–injured canine coronary arteries. *Circ Res.* 1992 ; 70 : 39–48.