

천마(*Gastrodia elata* Blume)의 항혈소판, 항혈전활성

백영숙 · 송재경 · 윤춘희* · 정교순* · 윤혜숙*
경희대학교 화학과, 서울대학교 천연물과학연구소*

Anti-platelet and Anti-thrombotic Effects of *Gastrodia elata*

Young-Sook Paik, Jae-Kyoung Song, Chun Hee Yoon, Kyo Soon Chung and
Hye Sook Yun-Choi

Department of Chemistry, Kyung Hee University, Suwon 449-701 and
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—MeOH extract of *Gastrodia elata* was fractionated to five solvent fractions, hexane fr (fr I), 90% MeOH fr (fr II), EtOAc fr (fr III), BuOH fr (fr IV) and H₂O fr (fr V). Among the five fractions, fr II, III and IV showed platelet anti-aggregating effects against ADP or collagen induced rat platelet aggregation *in vitro*. Fr II, III and IV were also tested *in vivo*, in the mouse and rat models of thrombosis. Oral administration of fr II, III or IV enhanced the recovery from the thrombotic shock in the mouse model of thrombosis to 32-40% from 17% of recovery with the control group of mice. Treatment with fr II, III or IV also attenuated the sudden reduction in the blood platelet count following intravenous collagen injection to rat. The above results were indicative of the presence of anti-platelet and anti-thrombotic components in this plant.

Keywords—*Gastrodia elata* Blume · Orchidaceae · anti-platelet · anti-thrombotic

혈전성 질환의 예방과 치료 약물들은 혈전용해제, 항응고제 및 항혈소판제로서 크게 분류된다. 혈액응고계를 차단하여 혈전 형성을 억제하는 헤파린, 쿠마린등의 항응고제들이나 혈전의 주요 구성성분인 피브리노를 분해하여 이미 형성된 혈전을 용해시키는 혈전용해제들은 혈전성 질환의 응급처치 목적으로 사용되고 있으나 혈관손상 부위에서의 출혈 또는 전신성 출혈 등의 부작용으로 인하여 장기치료 목적에는 적합하지 못하다.

혈소판은 직경 2-4 μ m의 원판형 혈구세포로서 혈관 파손시에 상해된 혈관 부위에 지혈, 혈전막개를 만들고 혈액 응고인자들에 의한 응고과정을 촉진시킴으로서 혈관 파손 부위로 부터의 급격한 혈액의 손실을 방지하는 생체 방어기전을 갖는다. 그러나 폐쇄 혈관내에서의 혈소판 활성화에

의한 혈소판의 점착, 응집, 방출반응은 혈전형성을 초래하게 되고 각종 혈전성 질환을 유발하게 된다. 또한 혈소판의 비정상적인 활성화에 의하여 생성되는 미세혈전들은 각종 혈전성 질환뿐 아니라 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병 등의 성인병 발현에도 관여하고 있음이 밝혀지고 있으며, 혈소판 방출반응에 의하여 유리된 thromboxane, serotonin 등에 의하여 부종이나 염증이 뒤따르기도 한다. 따라서 혈소판응집 억제작용을 갖는 항혈소판 물질들은 심근경색증, 뇌졸중 등의 심각한 혈전증상의 재발방지 및 다양한 혈전관련 질환의 치료 및 예방에 그 응용 가치가 있다 하겠다. 그러나 aspirin, ticlopidine 등의 기존의 항혈소판작용 약물들 또한 장기간 사용할 때 위나 장에서의 출혈 등의 부작용으로 인하여 새로

은 항혈소판제의 개발이 요구되고 있다.

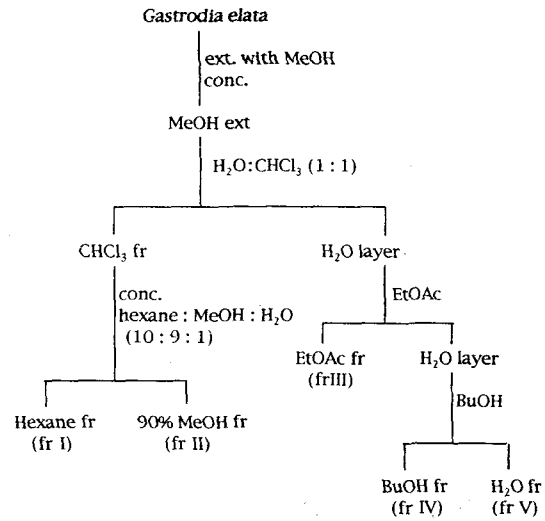
동양의 전통의학에서는 위에 언급한 혈전 관련 질환의 각종 증상들의 개선 또는 치료목적으로 다양한 종류의 천연약물들이 사용되어 온 것으로 파악된다. 본연구자들은 “어혈(瘀血)”, “풍증(風症)” 등 각종 혈전관련 증상에 사용되어 온 식물 생약 약 40종에 대하여 항혈소판 작용을 갖는가를 검색하여 오가피, 천마, 작약 등이 강력한 혈소판 응집억제 작용을 가짐을 보고한바 있다.^{1,2)} 또한 오가피 및 작약으로부터 protocatechuic acid 및 이의 ethyl ester, gallic acid methyl ester 등을 항혈소판 작용 물질로서 확인하였으며, 현재 이들의 유도체들에 대하여 항혈소판, 항혈전 작용에 관한 연구를 진행중에 있다.³⁻⁶⁾

천마(*Gastrodia elata* Blume, Orchidaceae)는 한국, 중국, 일본 등지에서 혈전관련 질환으로 사료되는 반신불수등의 “풍증”의 치료 또는 “어혈” 증상의 개선등의 목적으로 널리 쓰여온 생약이다. 그러나 천마는 식물의 채집이 어려워, 근래에 재배방법이 개발되기까지 매우 고가의 생약이었기 때문에, 천마의 약리작용이나 화학성분에 관하여 발표된 논문은 매우 적은 숫자에 불과하며 화학성분으로서 gastrodin 등 수종의 phenol 성 성분들이 보고되어 있을 뿐이다.⁷⁻¹⁰⁾ 따라서 저자들은 항혈소판 작용 생약의 검색과정에서 강력한 작용을 가짐이 확인된 생약의 하나인 천마로부터 항혈소판 작용성분을 추적하기 위한 시도로서 천마 추출액의 용매분획들의 항혈소판 및 항혈전 작용을 검색하여 보고하는 바이다.

실험방법

실험재료 - 본실험에 사용한 천마는 시판품(썬서 말린것)을 경동시장에서 구입하여 서울대학교 천연물과학연구소 지형준교수의 감정을 받아 사용하였다.

실험기기 및 시약 - Centrifuge는 Sorvall RT-6000를 Whole blood platelet analyzer는 Texas International Lab. PLT-4를 사용하였으며, ADP (adenosine 5'-diphosphate dicyclohexylammonium salt)는 미국 Sigma Chem. Co.로부터, collagen은 미국 Chrono-Log Corp.로부터 구입하였



Scheme 1. Extraction and fractionation of *Gastrodia elata*

으며 epinephrine은 대한약품의 주사용 제제를 사용하였다.

추출 및 분획 - 천마는 MeOH로 가열, 추출, 여과한 후 여액으로부터 용매를 감압, 증류 제거하여 MeOH엑스를 얻었으며 Scheme 1과 같이 용매로 분획하여 hexane fr (fr I), 90% MeOH fr (fr II), EtOAc fr (fr III), BuOH fr (fr IV) 및 H₂O fr (fr V)을 조제하여 실험하였다.

혈소판응집 억제작용 검색 - Modified smear method에^{1,2)} 의하여 각용매 분획(fr I-fr V)들이 래트 혈소판응집에 대하여 억제작용을 갖는가를 검색하였다. 즉 래트(Sprague-Dawley, 200 ± 20 g) 혈액(0.1 volume citrate 함유)을 200 x g로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 혈소판혈장(platelet rich plasma, PRP) 0.16 ml에 시료용액 0.2 ml를 가하고 혈소판응집 유도물질로서 ADP 또는 collagen용액 0.2 ml를 가한 후 37°C에서 4분간 배양하였다. 배양액으로부터 thin smear를 만들어 염색한 후 현미경하에서 관찰하여 혈소판의 응집도를 관찰하였으며 다음과 같이 판단하였다. “++” PRP에 응집유도 물질을 넣어 혈소판응집이 일어난 상태, “+” 혈소판응집이 상당히 일어났으나 응집유도 물질을 넣었을 때보다는 못 미치는 상태, “±” 약간의 혈소판 응집이 일어난 상태, “-” PRP에 응집유도 물질을 가하지 않아

혈소판응집이 일어나지 않은 상태.

마우스 혈전모델에서의 항혈전작용 검색 - Dimino and Silver의 방법에^{11,12)} 의하여 검색하였다. 즉 미리 1시간 절식시킨 마우스(ICR계, 20 ± 2 g)에 시료용액을 경구투여하고 1시간 후 collagen과 epinephrine혼합용액(650 ug collagen + 65 ug epinephrine/10 ml saline/Kg)을 꼬리정맥에 주사한 후 15분간 폐동맥 경색에 의한 마비의 지속, 사망 또는 마비로 부터의 회복여부를 관찰하여 시료의 항혈전 효과를 판정하였다.

랫트 혈전모델에서의 항혈전작용 검색 - 미리 2시간 절식시킨 랫트에 시료를 경구투여하고, 1시간 후 ketamine(250 mg/Kg, *i.m.*)을 주사하여 마취시키고 복부를 절개하여 실험하였다. Collagen 60 ug/Kg을 정맥주사하였으며 정맥주사전과, 정맥주사 3분 후 대동맥으로부터 각각 혈액을 채취하여 혈소판수를 측정하여 collagen 투여에 의한 혈액내 혈소판수의 감소도를 관찰하였다.¹³⁾ 혈액의 채취에는 0.1 volume의 2.2% sodium citrate(0.7 mg/ml indomethacin함유) 용액이 든 플라스틱 주사기를 사용하였다.

결과 및 고찰

천마는 Scheme 1에서와 같이 MeOH로 추출한 후 fr I-fr V의 다섯 개의 분획으로 분리하여 각분획들의 작용을 관찰하였다. 먼저 이들 용매분획들이 랫트 혈소판 응집에 미치는 영향을 modified smear method로서 검색하였다. Table 1에 정리한 바와 같이 혈소판혈장(PRP) 자체는 혈소판이 응집을 일으키지 않은 상태(-)를, PRP에 응집유도 물질로서 ADP 또는 collagen을 가하였을 때 혈소판들이 응집을 일으킴(++)을 관찰하였다. 대조물질로서 혈소판 응집억제 작용을 갖는 aspirin은 각각 1.0 또는 0.3 mg/ml에서 응집도“-”를, 0.5 또는 0.15 mg/ml에서 응집도“±”를 보여 ADP 및 collagen에 의하여 유도되는 혈소판응집을 억제함을 확인하였다. Fr I 및 fr V는 2.5 mg/ml에서 응집도“++”로서 응집억제 작용이 없었다. Fr II, III 및 IV는 ADP에 의한 혈소판응집에 대하여는 2.5 및 1 mg/ml에서 응집도“-”, 0.5 mg/ml에서 응집도“±~+” 또는“++”를

Table 1. Effects of solvent fractions against ADP and collagen induced platelet aggregation

sample	conc. (mg/ml)	aggregating agents	
		ADP*	collagen**
control			
PRP (without agg. agents)		-	-
PRP (with agg. agents)		++	++
fr I	2.5	++	++
fr II	2.5	-	-
	1.0	-	~±
	0.5	±~+	+
fr III	2.5	-	-
	1.0	-	-
	0.5	++	+
fr IV	2.5	-	-
	1.0	-	-
	0.5	++	±~++
fr V	2.5	++	++
aspirin	1.0	-	-
	0.5	±	-
	0.3	-	-
	0.15	-	±

- ; no aggregation, ± ; slight aggregation, + ; intermediate aggregation, ++ ; full aggregation; *ADP, 1 x 10⁻⁷ g/ml; **collagen, 5 x 10⁻⁶ g/ml

보였으며, collagen에 의한 혈소판응집에 대하여는 2.5 mg/ml에서 응집도“-”, 1 mg/ml에서“~±” 또는“-”, 0.5 mg/ml에서 응집도“+” 또는“±~++”를 보여 세분획 모두 ADP 또는 collagen에 의한 혈소판응집에 억제작용을 가짐을 관찰하였다. *In vitro*에서 혈소판응집 억제작용을 보인 fr II, III 및 IV는 *in vivo*에서도 항혈소판 작용을 갖는가를 마우스 및 랫트 혈전증 모델에서 실험하였다. 즉 마우스에 collagen과 epinephrine의 혼합용액을 정맥주사하면 혈전 형성에 의하여 급성 폐경색이 발생하며 전신 마비를 거쳐 대부분이 2-3분에 사망하거나 15분 이상 마비가 지속됨을 관찰하게된다. Table 2에서 보는 바와 같이 대조군에서는 총 48마리 중 8마리만이 15분 이내에 회복되어 회복률 17%로서 83%가 15분 이내에 사망하거나 15분 이상 마비가 지속되었으며, aspirin 50 mg/Kg 투여군에서는 46%가 회복되어 혈전 증상의 경감이 뚜렷하였다. Fr II, III

Table 2. Effects of solvent fractions in mouse thrombosis model

sample	total no. of mice	no. of mice recovered*	% recovery
control	48	8	17
fr II	47	19	40
fr III	25	11	44
fr IV	28	9	32
aspirin	52	24	46

*no. of mice recovered from thrombotic paralysis within 15 min.

**Each fr (100 mg/Kg) or aspirin (50 mg/Kg) was administered orally one hour prior to the thrombotic challenge.

Table 3. Effects of solvent fractions in rat thrombosis model

sample	no. of mice	platelet count (x 10 ⁹ cells/L)		% ^{a)}
		before collagen	after collagen ^{b)}	
control	4	650.3 ± 97.9	551.3 ± 84.7	84.5 ± 3.8
fr II	4	710.5 ± 69.7	673.5 ± 87.8	94.6 ± 3.2
fr III	4	615.5 ± 63.2	531.0 ± 57.9	86.3 ± 3.9
fr IV	4	618.3 ± 132.0	558.5 ± 131.4	90.0 ± 7.3

^{a)}% = platelet count after collagen injection/platelet count before collagen injection. ^{b)}collagen (60 μ g/10 ml saline /Kg) was injected intravenously. ^{c)}each fr (500 mg/Kg) was administered orally one hour prior to collagen injection.

및 IV 각 100 mg/Kg 투여군들은 32-44%의 회복률을 보여 aspirin 투여군 보다는 약하나 뚜렷한 증상의 개선 효과를 보였다. Fr II, III 및 IV는 랫트 혈전모델에서 혈중 혈소판수의 감소를 억제하는가를 또한 관찰하였다. 즉 랫트에 collagen 등의 혈소판 응집유도 물질을 정맥주사하여 혈전을 형성시킬때, 혈액중 혈소판수는 급격히 저하하게 된다. Table 3의 대조군에서 보는바와 같이 collagen 주사 후 혈중 혈소판수는 collagen 주사전의 84.5%로 감소하였다. Fr II, III 또는 IV 투여군에서는 collagen 주사 후의 혈소판수는 주사전의 86-94%로서 약간의 개선효과를 보였다. 위의 결과들을 종합하여 볼때 fr I-V의 5개의 용매분획중 fr II, III 및 IV에는 혈소판응집 억제작용을 가지며 따라서 혈전 형성을 억제하는 성분들이 존재할 것으로 추정되며 이들 성분들의 규명이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀 - 본 논문은 1994년도 경희대학

교 교비연구비와 1995년도 한국과학재단 핵심전문연구과제(951-0712-049-2)의 연구비 지원에 의하여 이루어졌음을 밝히며 연구비 지원에 감사드립니다.

(1995년 11월 27일 접수)

참고문헌

1. Yun-Choi, H.S., Kim, S.O., Kim, J.H., Lee, J.R. and Cho, H.-I.: Modified smear method for screening potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources. *J. Nat. Prod.* **48**, 363 (1985).
2. 윤혜숙, 김제훈, 이종관: 혈소판 응집 억제 작용 생약의 검색(II). *생약학회지*, **17**, 19 (1986)
3. Yun-Choi, H. S., Kim, J. H. and Lee, J. R.: Potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources, III. *J. Nat. Prod.* **50**, 1059 (1987)
4. Kang, S. S., Kim, J. S., Kim, E. M. and Yun-

- Choi, H. S.: Platelet anti-aggregation of Paeony root. *생약학회지*, **22**, 215 (1991).
5. 윤혜숙, 강삼식, 김문희, 정기화: Protocatechuic acid 및 gallic acid 유도체들의 항 혈전작용. *약학회지*, **37**, 453 (1993)
 6. Yun-Choi, H.S., Kim, M.H. and Jung, K.H.: Esters of substituted benzoic acids as anti-thrombotic agents. *Arch. Pharm. Res.*, **19**, to be published (1996).
 7. Feng, X.-Z., Chen, Y.-W. and Yang, J.-S.: Studies on constituents of Tian-Ma (*Gastrodia elata* Bl). *Acta Chimica Sinica*, **37**, 176 (1979).
 8. Zhou, J., Yang, Y.-B. and Yang, T.-R.: The chemistry of *Gastrodia elata* Bl. I. The isolation and identification of chemical constituents of *Gastrodia elata* Bl. *Acta Chimica Sinica*, **37**, 183 (1979).
 9. Taguchi, H., Yosioka, I., Yamasaki, K. and Kim, I. H.: Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 55 (1981).
 10. Zhou, J., Pu, X., Yang, Y. and Tsungren, Y.: The chemistry of *Gastrodia elata* Bl. IV. The phenolic compounds of some chinese species of *Gastrodia*. *Acta Botanica Yunnanica*, **5**, 443 (1983).
 11. Dimino, G. and Silver, M.J.: Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **225**, 57 (1983).
 12. 김창민, 권용수, 윤혜숙: 백지 BuOH 가용분획의 항혈전 활성에 관한연구, *생약학회지*, **26**, 74 (1995).
 13. Arruzazabala, M.L., Carbajal, D., Mas, R., Garcia, M and Fraca, V.: Effects of policosanol on platelet aggregation in rats. *Thromb. Res.*, **69**, 321 (1993).