

사상자 물추출물의 혈액 응고 작용

김환수 · 박병욱 · 김기협 · 박광식*
선경인더스트리 생명과학연구소,
440-745 경기도 수원시 장안구 정자 1동 600

(Received November 25, 1994)

Hemostatic Action of *Torilis fructus*

Hwan-su Kim, Pyeong-uk Park, Key H. Kim, and Kwang Sik Park*

Life Science Research Center, Sunkyong Industries,
#600 Jungja-1-Dong, Changan-Ku, Suwon-Si, Kyungki-Do, 440-745, Korea.

Abstract—The acetone precipitates of the hot water extract of *Torilis fructus* showed strong hemostatic activity which was not inhibited by aspirin. This activity was not through platelet activation but possibly through activating some coagulation factors in plasma. The hemostatic action of the precipitates was not active by oral administration and no behavioral toxicity was appeared in treated mice. However, mice treated with the acetone precipitates through tail vein showed serious tremor and then were killed probably by the thrombus produced in the body. The hemostatic activity was still remained after treatment with β -glucosidase, β -galactosidase, α -amylase, subtilisin BPN', or trypsin but completely lost by acid hydrolysis. The active components seemed to be a complex of unidentified macromolecules to which some phenolic compounds were strongly bound.

Keywords □ *Torilis fructus*, blood, platelet, coagulation.

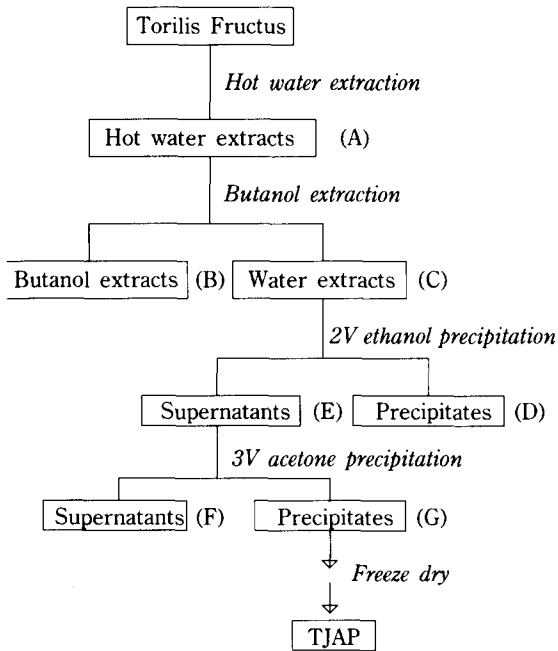
사상자 (*Torilis fructus*)는 미나리과 (Umbelliferae)에 속하는 월년생 사상 (*Torilis japonica*)의 성숙 과실을 건조한 것으로서 민간에서는 풍습비통, 음위, 습진 및 피부 소양증 등에 이용되어 왔다. 뿐만 아니라 사상자 추출물은 남성 호르몬과 같은 작용이 있어 흰쥐의 전립선, 정낭 등의 중량을 증가시키고 발정기를 연장시키며, 관상 동맥질환에 의한 협심통을 완화시키는 작용이 알려져 있다.^{1,2,3)} 저자들은 소염 진통 작용을 갖는 수종 생약의 활성 성분들에 대해 연구하던 중 사상자 추출물의 강력한 소염 진통작용에 대해 이미 확인한 바 있다. 한편 대부분의 NSAID (Non-steroidal antiinflammatory drugs)는 arachidonic acid의 대사경로에 관여함으로써 항염증 작용을 발현하며 항염증 작용을 갖는 대부분의 NSAID는 collagen 등으로 유도된 혈소판 응집을 억제하는 것이 알려져 있다.^{4,5)} 그러나 사상자 추출물은 항염증 작용을 가짐에도 불구하고 오히려 Platelet Rich Plasma

(이하 PRP라 한다)를 강하게 응집시킬 뿐만 아니라 흰쥐의 전혈에 대해서도 강한 응고 작용을 발현하였기에 혈액 응고 과정에 미치는 사상자 특정 성분들에 관한 지견을 얻고자 본 실험을 수행하였다.

실험방법

혈액 응고 작용 성분의 분리—본 실험에 사용된 사상자는 서울시 동대문구 소재 한약시장에서 구입하였다. 시료 100 g을 1 l 열수로 3회 반복 추출하고 추출액을 합하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 암갈색의 사상자 열수 추출물 11 g을 얻었다. 열수 추출물 10 g을 1 l의 물에 녹인 후 동일량의 수포화 부탄올로 3회 반복 추출하였다. 부탄올 분획 후 남은 수층에 대해서 2배량의 차가운 에탄올을 가하여 침전물을 생성시키고 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 감압 농축하여 잔류 에탄올을 제거한 후 3배량의 아세톤을 가하여 생성된 침전분획을 동결 건

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로



Scheme 1—Solvent fractionation of *Torilis fructus*

조하고 황갈색 엑스를 얻어 TJAP라 명명하였다 (Scheme 1). 평균 수율은 약 2.0% 였다.

전혈 응고 작용 시험—3.8% sodium citrate 용액 일정량이 함유된 주사기를 사용하여 Sprague-Dawley 계 흰쥐의 복대동맥으로부터 10 배량의 혈액을 채취하고 응고가 일어나지 않도록 가볍게 흔들어 준 후 동일 량의 생리 식염수를 가해 응고 측정 시험에 사용하였다. 혈액 응고 시험은 ChronoLog™ 사의 whole blood aggregometer를 사용하였으며 측정용 혈액 1 ml를 37°C 에서 5 분간 preincubation한 후 일정량의 사상자 성분을 가하고 10분 동안에 일어나는 impedance의 변화로 응고 정도를 판단하였다. 응고가 진행되는 동안 반응액의 교반은 1,000 rpm으로 하였다.^{6,7)}

혈소판 응집 작용 시험—흰쥐의 복대동맥으로부터 sodium citrate (최종농도 0.38%)를 미리 채워둔 주사기를 이용하여 채혈하고 200 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액 PRP를 취하여 시험에 사용하였다. 일부 PRP를 2,000 g에서 10분간 재 원심분리하여 침전을 제외한 상등액 Platelet Poor Plasma (이하 PPP라 한다)를 얻고 이때 얻은 PPP로 혈소판 응집 시험에 사용할 PRP를 회석하였다. Washed Platelet

Solution (이하 WPS라 한다)은 상등액 PPP를 제외한 침전물을 EDTA 함유 Tris buffer로 원심분리하여 잘 세척하고 bovine serum albumin이 함유된 modified Tyrode's buffer에 재현탁시켜 제조하였다. 혈소판 응집 시험에 사용한 PRP 및 WPS 중의 혈소판 농도는 cell counter를 사용하여 측정하였고 약 2×10^8 cell/ml가 되도록 희석하여 시험에 사용하였다. 혈소판 응집능 시험은 Platelet aggregometer를 사용하여 turbidometric method에 따라 수행하였다.^{8,9)} PRP 또는 WPS를 0.5 ml를 37°C 에서 3 분간 preincubation시킨 후 사상자 추출 성분 일정량을 가하여 light transmittance의 증가에 따른 혈소판 응집 정도를 10 분간 측정하였다. 응집이 측정되는 동안 반응액의 교반은 1,000 rpm으로 유지하였다.

in vivo 혈전 생성 시험—실험적 혈전의 유도는 Dimino 등의 실험 방법에 준하여 실시하였다.¹⁰⁾ 사상자 추출 성분 TJAP를 20 g 전후의 ICR계 생쥐에 경구 및 꼬리정맥 주사하였을 때 발생하는 생쥐 뒷다리의 마비나 전신 경련 후 사망이 일어나는 경우를 관찰함으로써 혈전 생성유무를 판단하였다.

결과 및 고찰

전혈 응고 작용 분획—37°C로 3 분간 preincubation한 응고 측정용 혈액에 사상자 열수 추출물 (Scheme 1의 A, 1 mg/ml)을 가하였을 때 약 5 분 후 혈액 응고 작용이 나타나기 시작하였으며 약 3 분 동안에 걸쳐 시험에 사용된 1 ml 혈액 전량이 완전히 응고되었다. 사상자 추출물에 의한 혈액 응고는 응고 반응이 시작된 후 매우 급격히 진행되는 특징을 보였으며 이는 동일 시간대에 collagen 등이 사용 농도에서 미세한 혈액 응고물을 생성시킴으로써 aggregometer에 의한 측정 impedance를 증가시키는 것과는 달리 측정 혈액 전체가 완전히 응고되는 현상을 보여 주었다. 열수 추출물을 수포화 부탄올로 추출한 분획물 (Scheme 1의 B)은 혈액 응고 작용을 나타내지 않았으며 이로써 혈액 응고 작용에 관여하는 활성 물질은 친수성이 매우 강한 물질로 추정되었다. 부탄올 추출 후 남은 수층에 대해 에탄올과 아세톤 처리 과정을 거쳐 얻어진 침전물 (TJAP)은 사상자 열수 추출물 및 다른 어떤 분획보다도 강한 혈액 응고 작용을 나타내었다 (Fig. 1). 따라서 acetone 침전 분획

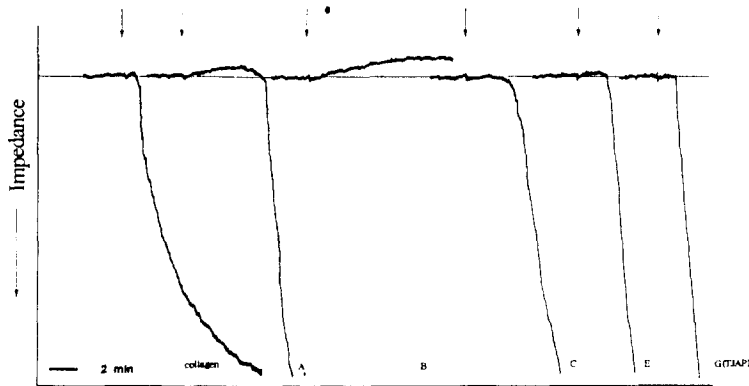


Fig. 1—Effects of several fractions of *Torilis fructus* on whole blood coagulation. Rat whole blood treated with sodium citrate as anticoagulant was diluted with same volume of physiological saline for the test. Blood clotting was determined by the impedance method using aggregometer. Arrows indicate the addition of each fraction A, B, C, E, G (test conc : 1 mg/ml) described in Scheme 1 and collagen (10 µg/ml).

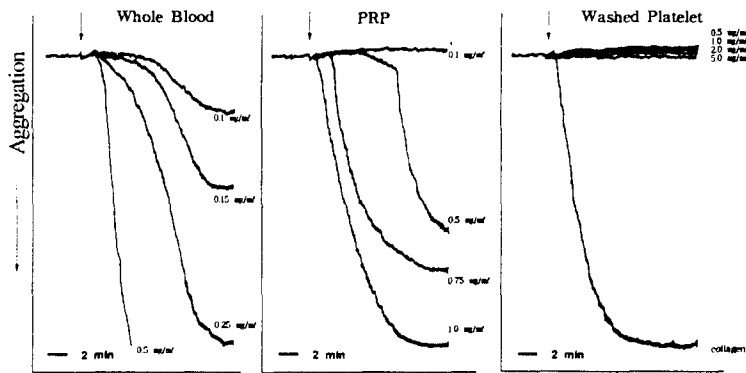


Fig. 2—Effects of TJAP on whole blood coagulation and platelet aggregation. Arrows indicate the point of TJAP addition. Collagen (10 µg/ml) was used as a positive control.

물인 TJAP를 혈액 응고 작용을 발현하는 사상자의 활성 분획으로 추정하고 사상자 성분이 갖는 혈액 응고 작용에 관한 차후 실험을 진행하였다.

TJAP의 혈액 응고 작용—TJAP는 0.5 mg/ml의 농도에서 혈액과 반응하여 약 2분후 응고 작용을 나타내기 시작하였으며 측정에 사용한 1 ml의 혈액 전체를 완전히 응고시켰다. TJAP는 PRP에 대해서도 강한 응고 작용을 나타내었으나 혈청 성분이 존재하지 않는 WPS에 대해서는 응고 작용을 발현하지 않았다 (Fig. 2). 한편 혈소판이 존재하지 않는 PPP도 겔상의 응고 물질을 생성시키는 것으로 보아 이는 TJAP가 혈청중에 존재하는 혈액 응고 인자를 활성화시키거나 fibrin polymerization을 유발시킴으로써 혈청 성분을

고형화 시키는 것이 아닐까 추정되었다. TJAP의 혈액 응고 작용은 PRP에서보다는 whole blood에서 보다 효율적으로 일어났으며 TJAP의 농도-활성 상관 관계를 갖는 농도 범위는 매우 좁아 0.1 mg/ml의 농도에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. TJAP가 탄닌등과 마찬가지로 비특이적으로 단백질을 응고시키는 작용이 있는지에 관한 실험으로서 일정 농도의 bovine serum albumin-용액에 TJAP를 첨가시켜 보았으나 어떠한 침전도 생성되지 않았다. 이는 TJAP의 작용이 혈장 성분에 대해 강한 특이성을 갖는다는 것을 암시한다 하겠다.

TJAP의 혈전 생성 작용—기성 한약서에 의하면 사상자는 인체에 무독한 약으로 기술되어 있다. 그

Table I—TJAP의 *in vivo* 혈전생성능 시험

투여용량	I.V		P.O	
	혈전생성수	사망수	혈전생성수	사망수
50 mg/kg	0/6	0/6	0/6	0/6
100 mg/kg	1/6	0/6	0/6	0/6
200 mg/kg	4/6	0/6	0/6	0/6
300 mg/kg	5/6	0/6	0/6	0/6
400 mg/kg	6/6	1/6	0/6	0/6
500 mg/kg	6/6	6/6	0/6	0/6

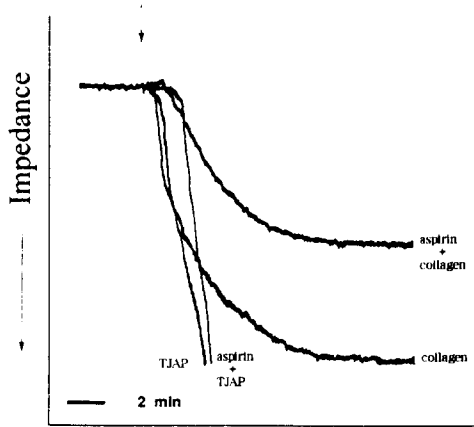


Fig. 3—Effect of aspirin on the coagulation activity of TJAP. Whole blood was preincubated with aspirin (5 mM) at 37°C for 30 minutes and then stimulated with TJAP (500 µg/ml) or collagen (10 µg/ml).

그러나 본 실험에서 밝혀진 사상자의 혈액 응고 작용을 고려할 때 사상자 성분이 체내에서 혈전을 생성시킬 가능성을 전혀 배제할 수 없기에 사상자의 생체내 혈전 생성 유무를 실험하였다. TJAP를 생쥐 꼬리 정맥에 주사한 결과 100 mg/kg 용량에서 부터 뒷다리의 마비 현상이나 전신 경련이 관찰되었으며 500 mg/kg 용량에서는 사용한 6마리 생쥐 전체가 혈전 생성으로 인한 경련 발작을 지속하다 사망하는 것이 관찰되었다. 그러나 동일 용량을 경구로 투여하였을 경우, 혈전 생성의 증후는 전혀 나타나지 않았다 (Table I). 이러한 결과로 보아 TJAP는 경구 투여시 흡수되지 않는 물질이거나 위장관에서 분해되어 그 효력이 상실되는 물질로 추정되었다.

TJAP의 혈액 응고 작용에 미치는 aspirin과 heparin의 영향—대표적 비스테로이드 항염증제인 aspirin은 cyclooxygenase를 acetylation 시킴으로써 염

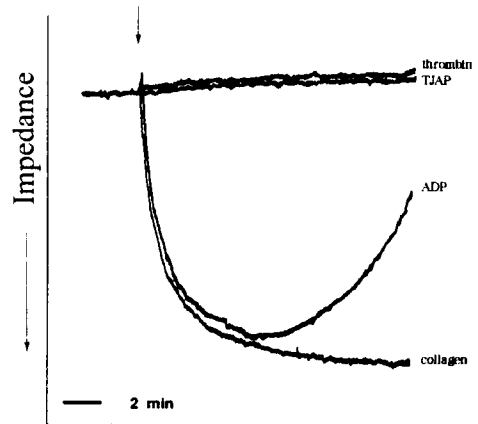


Fig. 4—Effect of heparin on the hemostatic activity of TJAP. Heparin (10 U/ml) was used as anticoagulant instead of sodium citrate. Thrombin 100 µg/ml, ADP (20 M), collagen (10 µg/ml), TJAP (500 µg/ml).

증 반응에 주요한 역할을 하는 arachidonic acid의 대사를 억제하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 측정용 혈액을 3 mM aspirin으로 37°C, 30분간 전처리하였을 때 collagen에 의한 혈액 응고 작용은 현저히 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 3). 반면 TJAP의 혈액 응고 작용은 aspirin 전처리에 의해서 어떠한 영향도 받지 않음을 알 수 있었다. 이는 TJAP의 혈액 응고 작용이 arachidonic acid대사를 통한 혈소판의 활성화에 있지 않음을 간접 시사한다고 하겠다. 한편 heparin은 수종의 혈액 응고 인자 또는 thrombin의 작용을 억제함으로써 혈액 응고를 저해하는 항응고제로 알려져 있다. 시료 혈액 제조시 항응고제로서 sodium citrate 대신 heparin을 사용할 경우 TJAP에 의한 혈액 응고 작용은 나타나지 않았다 (Fig.4). 이는 TJAP가 혈액 응고 인자 중 heparin에 의해 억제되는 응고 인자들을 활성화시키거나 fibrin의 생성 및 polymerization을 촉진시키기 때문이라 추정된다.

TJAP의 응고작용에 미치는 당 및 단백질 분해효소의 영향—TJAP는 에탄올 및 아세톤의 침전 과정을 거쳐 얻어진 다당류 또는 당단백으로 구성된 친수성 고분자 물질로 추정되었다. TJAP의 활성 본체를 규명하기 위하여 적정 농도의 당 또는 단백질 분해 효소 등과 반응시킨 후 혈액 응고 작용의 변화여부를 관찰하였다.¹¹⁾ TJAP를 Protease인 subtilisin BPN' 또는 trypsin으로 처리하였을 경우 TJAP의 활성 변화는

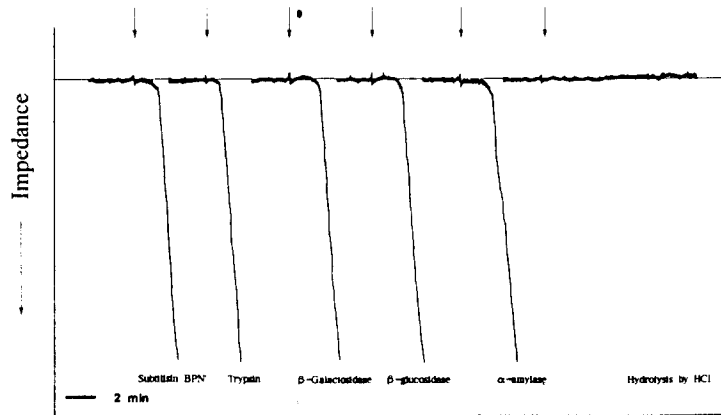


Fig. 5—Effects of several enzymes on the hemostatic activity of TJAP. Subtilisin BPN', Trypsin and β -galactosidase treatment of TJAP were performed in Tris-HCl buffer, while in β -glucosidase and α -amylase treatment, acetate buffer was used. Treatment was continued for 24 hr at 25°C, then the cuvettes were heated to stop the reaction. Blood coagulation was measured by the addition of the reaction mixtures of TJAP.

관찰되지 않았으며 당 분해 효소인 α -amylase, β -galactosidase, β -glucosidase 등에 의해서도 활성 변화가 나타나지 않았다(Fig. 5). Lowry법에 의한 단백질 정량 및 Anthrone test에 의한 다당류 정량결과 이들은 전체 성분의 10% 미만으로서 TJAP의 주요 구성 성분은 아닌 것으로 추정되었다. 또한 열수 추출과정을 거친 TJAP의 단백질 부분은 이미 변성되었을 것으로 추정되며 변성된 단백질이 이와 같은 활성을 나타내지는 않을 것으로 생각되었다. 한편 TJAP는 FeCl_3 와의 반응에 의해 페놀성 화합물의 특징적 발색을 보였으며 염산 가수 분해시 혈액 응고 작용이 완전히 소실되었다. 또한 Sephadex G200을 이용한 column chromatography 결과 TJAP는 분자량 10만 이상의 서로 다른 혼합 물질로 구성된 것으로 추정되었다.

결 론

사상자 열수 추출물로부터 에탄올 및 아세톤 침전 과정을 거쳐 얻은 친수성 고분자 물질은 sodium citrate를 사용하여 채혈한 흰쥐의 혈액에 대해 신속한 응고 작용을 나타내었다. 사상자 성분의 혈액 응고 작용은 aspirin 전처리 의해 감소되지 않았으며 혈소판에 직접 작용하는 것이 아니라 혈청중에 존재하는 혈액 응고 인자중 heparin에 의해 억제되는 응고 인자를 활성화 시키거나 fibrin polymerization을 유발

시킴으로써 그 작용을 발현하는 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) 小學館: 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, 동경 제 1 권, p.251 (1985)
- 2) 한대석, 유시명: 본초학, 동명사, 서울 p.181 (1964)
- 3) 정보섭, 신민교: 도해 향약(생약)대사전, 영림사, 서울 p.416 (1990)
- 4) Hamberg, M. and Samuelsson, B.: Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* **71**(9), 3400 (1974).
- 5) Mower, R.L., Landolfi, R. and Steiner, M.: Inhibition *in vitro* platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavone. *Biochem. Pharmacol.* **33**(3), 357 (1984).
- 6) Ingerman-Wojenski, C.M. and Silver, M.J.: A Quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood lumi-aggregometer. *Thromb. Hemostasis.* **51**(2), 154 (1984).
- 7) Gresele, P., Zoja, C., Deckmyn, H., Arnout, J., Vermylen, J. and Verstraete, M.: Dipyridamole inhibits platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Hemostasis.* **50**(4), 852 (1983).
- 8) Nunez, D. and Levy-Toledano, S.: Further chara-

- cterization of human platelet activation in the absence of aggregation: Phosphorylations of specific proteins and relationship with platelet secretion. *Thromb. Hemostasis*. **51**(2), 198 (1984).
- 9) Feinstein, M.B. and Fraser, C.: Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. *J. Gen. Physiol.* **66**, 561 (1975).
- 10) Di Mino G. and Silver M.J.: Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 57 (1983).
- 11) Takagi, J., Imada, T., Kikuchi, T., Saito, Y. and Inada, Y.: A New Platelet Aggregation factor from *Gynostemma pentaphyllum* MAKINO. *Chem. Pharm. Bull.* **33**(12), 5568 (1985).