

Ginkgolide B 및 ginkgoflavonoids 의 *in vitro* 와 *ex vivo* 및 임상에서의 항혈전 작용

권광일[†] · 이영신

충남대학교 약학대학

(Received May 3, 1995)

Anti-platelet Aggregation Effect of Ginkgolide B and Ginkgoflavonoids, Extracted from *Ginkgo biloba*, *in Vitro*, *ex Vivo* and in Clinic.

Kwang-il Kwon[†] and Young-sin Lee

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-765, Korea

Abstract - The effects of ginkgolides(natural mixture of ginkgolides, ginkgolide B, ginkgolide C) and flavonoids(quercetin, kaempferol, myricetin), extracted from *Ginkgo biloba*, on ADP and PAF-induced platelet aggregation *in vitro* and *ex vivo* were investigated. In these experiments, both of ginkgolides and ginkgoflavonoids did not affect the ADP(5 μ M) induced platelet aggregation *in vitro*. The IC₅₀ value on PAF (0.3 μ M) induced platelet aggregation were 2.52 μ M (ginkgolide B) and 6.35 μ M (natural mixture of ginkgolides) and 2.80 μ M (mixture of ginkgolide B and quercetin).

Oral administration of ginkgolide B(1 and 3 mg/kg) and quercetin(3 and 9 mg/kg) to rabbits inhibited *ex vivo* PAF induced platelet aggregation in a dose-dependent manner. Ginkomin-F tablets administered to the diabetic patients showed inhibitory activities on the ADP and PAF induced platelet aggregation in a dose and time dependent manner.

Keywords □ Ginkgolide B, Ginkgoflavonoids, Anti-platelet Aggregation, PAF.

혈전증은 혈관내에 혈소판(platelet)이나 WBC, RBC, 지방질 혹은 평활근 세포 등이 혈전을 형성, 혈관 내벽에 침착되고 그 앞·뒤로 혈액이 정체되면서 섬유소가 형성되는 일련의 반응이 주위 혈관에 까지 파급되는 것^{1,2)}으로 혈전의 직접적인 원인인 혈소판 응집을 유발하는 주요 물질로는 혈소판에서 유리되는 ADP (adenosine diphosphate)와 epinephrine, 손상된 조직에서 유리되는 collagen, 아스피린에 의해 생성이 억제되는 arachidonic acid가 있으며 이 외에도 thrombin, PAF(platelet activating factor) 등이 있다^{3,5)}.

PAF는 1970년 Ig-E로 감작시킨 토끼의 basophils에서 발견된 1-O-alkyl-2-(R)-acetyl-glycero-3-phosphorylcholine(alkyl-acetyl-GPC)의 구조를 갖는

용해성의 액상의 매개체로 [³H] PAF를 사용한 radioligand binding study, PAF analog를 이용한 길항제들에 대한 연구 등을 통해 이 물질의 ether phospholipid 기가 혈소판 응집, 염증, 급성 알러지, 기관지 수축, 혈압감소, 국소빈혈 등에 중요한 작용을 하는 것으로 밝혀졌다⁶⁻¹³⁾.

*Ginkgo biloba*에서 분리된 ginkgoflavonoids(proanthocyanidins, kaempferol, quercetin, isorhamnetine glycosides etc.)와 non-flavonoid 분획인 ginkgoterpenes(ginkgolide A(BN 52020), B(BN 52021), C(BN 52022), J(BN 52024))이 혈소판 응집 억제효과를 보이는데 이 중 ginkgolides, 특히 ginkgolide B는 PAF receptor에 높은 친화력으로 결합하면서 lyso-PAF의 reacylation, phosphatidic acid 합성 및 PAF에 의해 유발되는 Ca²⁺의 세포내 유

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

입을 억제해 강한 혈소판응집 억제효과를 나타낸다^{6),14)}.

본 실험에서는 pyridazinone 구조를 갖고 강심작용, 혈소판 응집 억제작용, 말초혈관 확장 등의 약리작용을 나타내는 새로운 cyclic AMP-phosphodiesterase inhibitor인 KR 30289를 positive control로 하여 *Ginkgo biloba* 추출물인 ginkgolides(ginkgolides의 natural mixture 및 ginkgolide B, ginkgolide C)와 ginkgoflavonols (kaempferol, myricetin, quercetin) 및 ginkgolide C의 -OH group 을 acetylation 시킨 유도체인 CNU 201의 혈소판 응집에 대한 억제작용을 측정하였고, ginkgolide B와 flavonols의 혼합물의 혈소판 응집 억제효과를 측정해 두 약물의 상승효과의 여부를 *in vitro* 및 *ex vivo*에서 관찰하였다. 또한 은행잎 엑스제제 중의 하나인 징코민-FTM 정을 토끼와 혈액 순환 부전 증상과 망막장애 증상을 보이는 당뇨 환자에게 일정기간 투약하면서 혈액을 취해 이 제제의 혈소판 응집 억제효과를 측정하였다. 이러한 일련의 혈액응집 실험에 있어 응집 유도제로 ADP와 PAF를 사용하였다.

실험방법

실험 재료 및 동물 - Ginkgolides의 natural mixture, ginkgolide B, ginkgolide C는 충남대학교 약학대학 유기화학 실험실에서 추출한 것을, KR-30289는 한국화학연구소 유기화학 연구실에서 합성한 것을 사용하였으며 ginkgolide C의 -OH group을 acetylation 시킨 물질인 CNU 201은 충남대학교 약학대학 유기합성 실험실에서 합성한 것을 사용하였고 3종의 flavonols(quercetin, myricetin and kaempferol)과 징코민-FTM 정은 동방제약에서 제공받았다. 혈소판 응집 유도제로 쓰인 ADP와 PAF는 sigma chemical Co. Ltd.에서 구입하였다.

수컷토끼는 삼육 실험동물 농장에서 구입해 충남대학교 약학대학 실험동물실에서 고형사료(푸리나 코리아)와 식수를 제한없이 공급하면서 사육하면서, 약 2~3주 정도의 순화기간을 거쳐 체중이 2.5~3.0 kg 정도가 되었을때 실험에 사용하였다. 실험동물실의 조건은 온도 22 ± 2°C, 습도 55~60%를 유지하도록 하였으며 조명시간은 12시간 단위로 조절하였다.

In vitro Aggregometry - 실험 약 1주일 전부터 약물(PDE 억제제, Ca⁺² 길항제), caffeine 함유 기호식품 및 마늘을 함유한 음식을 피하도록 한 건강한 지원자의

상박 정맥으로부터 50~60 μl의 혈액을 취해 실험하였다. 실험 당일 아침을 먹지 않은 상태에서 혈액을 취해 일회용 시험관에 혈액과 3.8 % sodium citrate를 9:1의 비율로 넣고 약하게 아래위로 흔들어서 응고를 방지한 후 이를 원심분리(160 g, 10분)하여 상등액으로부터 PRP(platelet rich plasma)를 얻고 잔액을 다시 원심분리(2000 g, 10분)하여 PPP(platelet poor plasma)를 얻었다.

PRP는 채취 즉시 시험관에 넣고 실험기간 동안 마개를 하고 얼음용기중에 방치하여 공기 노출 및 실험 중 온도상승에 의한 변화를 최소화하였다. PRP 내의 혈소판 농도를 일정하게 유지하기 위하여 광학적 밀도를 측정, PPP로 PRP의 농도를 보정하여 PRP의 광학적 밀도를 약 0.5~0.6 으로 일정하게 유지시켰다.

약물의 혈소판 응집 억제효과는 혈소판응집분석기를 사용하여 Born에 의한 탁도측정으로 측정하였다. 2차 증류수를 사용하여 분석기의 광학적 표준수위를 1,000 ± 250으로 맞추고 PRP의 광학적 밀도를 보정한 후, PRP 200 μl를 7.25 × 50 mm 실리콘 처리된 시험관에 취해 소형교반기를 넣고 1~2분간 방치한 후 각 channel에 시험약물이나 식염수(control용) 25 μl를 가하고 다시 3~5 분간 방치시킨 다음 PAF나 ADP를 25 μl 가하여 혈소판 응집을 유발시켰다. 실험조작 동안 온도는 37°C로, 교반속도는 500~1500 rpm으로 조절하였으며 528 nm에서 응집도를 측정하였다.

약물에 의해 응집이 억제되는 정도를 다음 식에 의거하여 광학적투과도의 감소율(%) 를 산출하였고, 농도-반응 곡선을 이용하여 IC₅₀ 값을 산출하였다.

$$\text{inhibition \%} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A = control(vehicle)의 최고 혈소판응집율 %

B = 약물 처리시의 최고 혈소판응집율 %

Ex vivo aggregometry I - 실험 2일전부터 절식시키고 10% dextrose 용액을 공급한 체중 2.5~3 kg의 건강한 토끼를 대상으로 하였다. 고정대에 토끼를 넣고 levin tube(18호) 를 사용하여 약물(혈탁액, 5 μl)을 경구투여하였다. 각 군의 각각에 ginkgolide B(1 or 3 mg/kg), quercetin(3 or 9 mg/kg), ginkgolide B 1 mg/kg + quercetin 3 mg/kg, ginkgolide B 1 mg/kg + quercetin 9 mg/kg, ginkgolide B 3 mg/kg + quercetin 3 mg/kg를 투여한 후 0.25, 0.5, 1.0, 1.5,

Table I—Patients profile

subject	sex	age	weight	remarks
A	F	72	62	retinopathy G II
B	F	70	48	retinopathy G II, cellulitis
C	F	60	46	retinopathy G II, neuropathy

2.0, 3.0 시간에 귀정맥으로부터 4.5 μ l씩 채혈하였다.

Ex vivo aggregometry II - 체중 3.0 kg의 토끼에 징코민-FR(현탁액, 5 μ l)을 1일 2회씩 10일간 경구투여하였다. 각 군의 예수를 5마리로 하여 saline(대조군), 징코민-F 5 mg 및 20 mg(유효성분으로써)을 투여하였다. 약물 투약 전과 투약 1, 2, 3, 5, 7, 10 일 후에 귀정맥으로부터 각각 4.5 μ l씩 혈액을 취해 혈소판 응집 억제효과를 측정하였다.

임상 실험

실험 약 1주일 전부터 투약기간 동안 약물(PDE 억제제, β 차단제 및 Ca^{+2} 길항제), caffeine 함유 기호식품 및 마늘을 함유한 음식을 피하도록 한 망막장애 증상이 있는 당뇨 환자를 대상으로 하여 1주일동안 징코민-F^R 정(ginkgoflavonglycoside 40 mg 함유)을 투여하면서 약물의 혈소판 응집 억제효과와 혈소판 수, GOT, GPT 등의 혈액 화학적 수치 변화를 측정하였다. 실험은 첫째날 아침을 먹지 않은 상태에서 상박정맥으로부터 10 ml의 혈액을 채혈한 후 징코민-F^R 2 정을 투약하고 30분, 1시간, 2시간 후에 각각 10 ml씩 채혈한 후 저녁에 다시 1정을 복용시켰다. 이로부터 일주일 동안 계속 약제를 동일한 방법으로 투약한 후 8일째 되는 날 아침에 역시 공복시에 약제 2정을 투약하고 30분 및 1시간 후에 10 ml씩 채혈하였다.

PRP 450 μ l를 7.25 \times 50 mm 실리콘 시험관에 취해 교반기를 넣고 1~2분간 방치 후 각 channel 에 PAF 또는 ADP를 50 μ l 가하여 혈소판 응집을 유발시켰다. 이때 약물에 의해 응집이 억제되는 정도는 *in vitro* 실험에서와 같은 방법으로 계산하였다.

결 과

In vitro Aggregometry - 인체혈액을 이용한 혈소판 응집 실험에서 ginkgolides의 natural mixture, ginkgolide B 와 ginkgolide C의 혈소판 응집 억제작용을

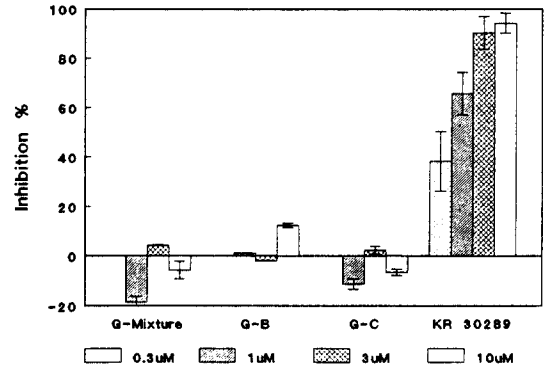


Fig. 1 - Inhibitory effect of natural mixture of ginkgolides(G-mixture), ginkgolide B(G-B), ginkgolide C(G-C) and KR 30289 on human platelet aggregation induced by ADP(5 μ M). Each bar shows the mean \pm S. E. M.(n=5).

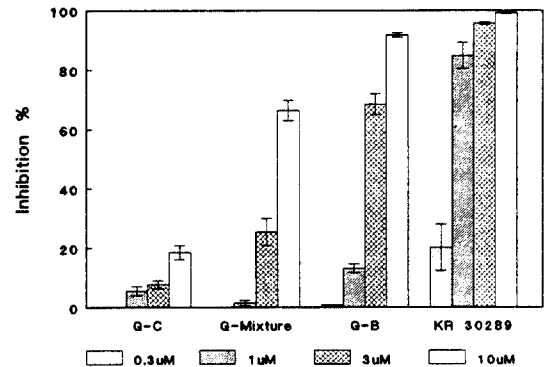


Fig. 2 - Inhibitory effect of natural mixture of ginkgolides(G-mixture), ginkgolide B(G-B), ginkgolide C(G-C) and KR 30289 on human platelet aggregation induced by ADP(0.3 μ M). Each bar shows the mean \pm S. E. M.(n=5).

실험한 결과를 Fig. 1, 2에 나타내었다. 세 약물 모두 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해서는 억제효과를 보이지 않았으나 PAF에 의한 혈소판 응집에 대해서는 ginkgolide B, natural mixture, C의 순으로 억제효과를 나타내었다. Ginkgolide B는 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해 10^{-6} M의 농도에서부터 효과를 나타내어 3×10^{-6} M에서 $68.47 \pm 3.54\%$, 10^{-5} M에서 $91.74 \pm 0.73\%$ 의 강한 억제효과를 나타내어 IC_{50} value가 2.52×10^{-6} M로 나타났다. Ginkgolides의 혼합물도 PAF에 의한 혈소판 응집에 대해 10^{-5} M의 농도에서 $66.40 \pm 3.45\%$ 의 억제효과를 보여 IC_{50} value가 6.35×10^{-6} M로 나타난 반면, ginkgolide C는 10^{-5} M의 높은 농도에서 $18.49 \pm 0.73\%$ 의 미약한 억제효과를

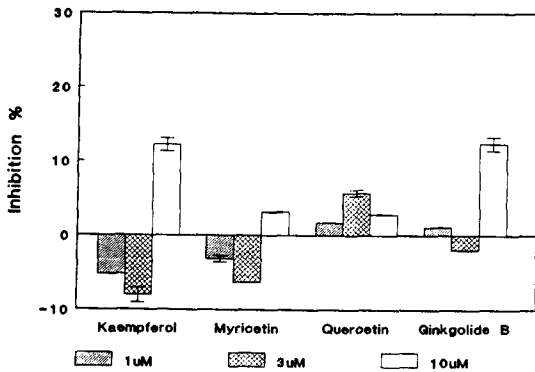


Fig. 3 — Inhibitory effect of three mixture of ginkgolides (G-mixture), ginkgolide B(G-B), ginkgolide C (G-C) and KR 30289 on human platelet aggregation induced by ADP(0.3 μM). Each bar shows the mean ± S. E. M.(n=5).

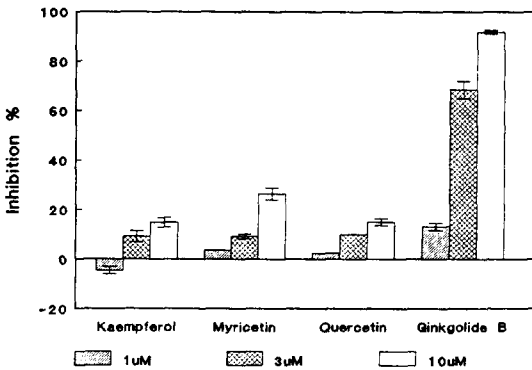


Fig. 4 — Inhibitory effect of three flavonoids(kaempferol, myricetin and quercetin) on human platelet aggregation induced by PAF(0.3 μM). Each bar shows the mean ± S. E. M.(n=5).

보였다. 그러나, CNU 201의 경우 원 물질인 ginkgolide C에 비해 혈소판 응집 억제효과가 오히려 감소한 것으로 나타났다. Positive control로 사용한 KR 30289는 ADP 및 PAF에 의한 응집에 대해 3×10^{-7} M의 농도에서 각각 $38.28 \pm 12.09\%$ 및 $20.12 \pm 7.82\%$ 의 억제효과를 보이고 10^{-6} M 이상의 농도에서는 60% 이상의 강한 억제효과를 보여 IC_{50} 값이 각각 4.35×10^{-7} M, 5.44×10^{-7} M로 나타났다.

3종의 flavonols(kaempferol, quercetin and myricetin)의 혈소판 응집 억제효과를 측정된 결과 myricetin이 10^{-5} M의 농도에서 PAF에 의한 응집을 $26.36 \pm 2.42\%$ 억제하는 것을 제외하고는 모두 유의성 있는 결과를 나타내지 않았다(Fig. 3, 4).

위의 3종의 flavonols와 ginkgolide B의 혼합물의

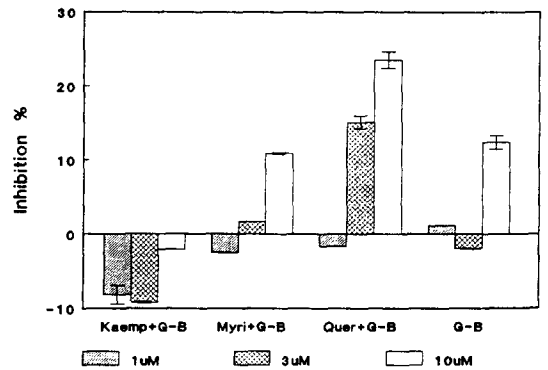


Fig. 5 — Inhibitory effect of mixture of ginkgolide B and flavonoids on human platelet aggregation induced by ADP(5 μM). Each bar shows the mean ± S. E. M.(n=5).

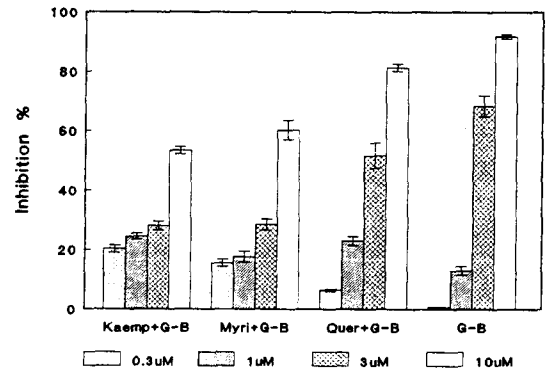


Fig. 6 — Inhibitory effect of mixture of ginkgolide B and flavonoids on human platelet aggregation induced by PAF(0.3 μM). Each bar shows the mean ± S. E. M.(n=5).
[Kaemp+ G-B: Kaempferol+ Ginkgolide B, Myri+ G-B: Myricetin+ Ginkgolide B, Quer+ G-B: Quercetin+ Ginkgolide B]

혈소판 응집 억제능을 측정된 실험에서 ginkgolide B와 quercetin의 혼합물이 10^{-5} M에서 ADP에 의한 응집에 대해 약한 억제효과($23.54 \pm 1.12\%$)를 보였고, PAF에 의한 응집에 대해서는 모든 혼합물에서 $3 \times 10^{-7} \sim 10^{-6}$ M에서 ginkgolide B 단독투여시보다 높은 억제효과를 보였다(Fig. 5, 6).

Ex vivo aggregometry I — 토끼에 ginkgolide B 및 quercetin을 1 회 경구투여한 후 경시적으로 혈액을 취해 약물의 혈소판 응집 억제효과를 측정된 결과를 Fig. 7, 8에 나타내었다. Ginkgolide B 투여군의 경우 1 mg/kg를 투여했을 때는 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해 억제효과를 나타내지 않았으나 3 mg/kg

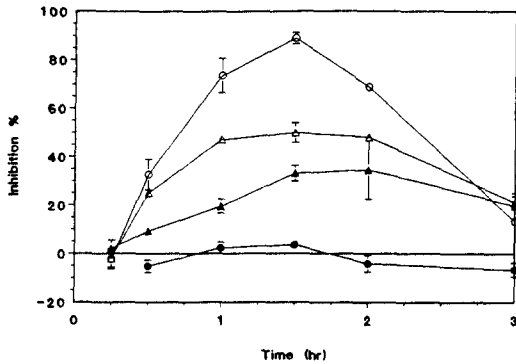


Fig. 7 - Inhibitory effect of ginkgolide B (●, 1 mg/kg; ○, 3 mg/kg) and quercetin (▲, 3 mg/kg; △, 9 mg/kg) on ex-vivo 0.3 μM of PAF induced platelet aggregation in rabbits. Each point shows the mean ± S. E. M. (n=3-4).

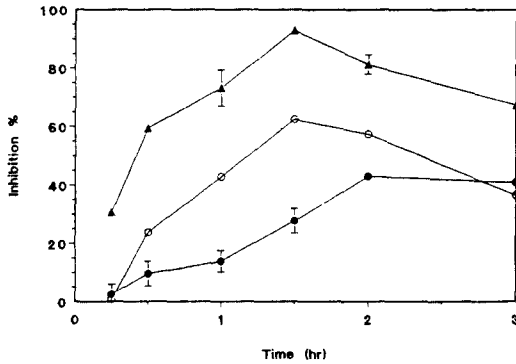


Fig. 8 - Inhibitory effect of mixture of ginkgolide B and quercetin on ex-vivo 0.3 μM of PAF induced platelet aggregation in rabbits. Each point shows the mean ± S. E. M. (n=3-4).
 [●, ginkgolide B 1 mg/kg+ quercetin 3 mg/kg;
 ○, ginkgolide B 1 mg/kg+ quercetin 9 mg/kg;
 ▲, ginkgolide B 3 mg/kg+ quercetin 3 mg/kg].

의 용량을 투여한 경우 0.5시간 경과 후부터 응집 억제 효과를 나타내어 1.5시간 후에 88.96 ± 2.34%의 강한 억제효과를 보였고 이러한 효과는 그 후 점차 감소하여 3.0시간 후에는 13.29 ± 0.43%의 억제효과를 나타내었다. Quercetin의 경우에도 1.5~2.0 시간 경과 후에 33.04 ± 3.29% (3 mg/kg 투여군) 49.87 ± 4.06% (9 mg/kg 투여군)의 억제효과를 나타내었다. Ginkgolide B 1 mg/kg과 quercetin 3 mg/kg을 병용투여한 실험에서는 투약 2시간 경과 후에 42.86 ± 1.56%의 억제효과를 나타내었고 이러한 효과는 투약 3시간 경과후에도 계속 지속되었다. Ginkgolide B 1 mg/kg + quercetin 9 mg/kg 투여군과 ginkgolide B 3 mg/

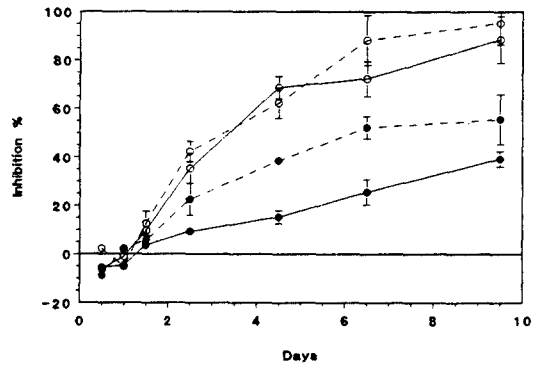


Fig. 9 - Inhibitory effect of Ginkomin-FR tablet (●, 5 mg; ○, 20 mg) on rabbit platelet aggregation induced by PAF(dot plot, 0.3 μM) or ADP(solid plot, 5 μM). Each point shows the mean ± S. E. M. (n=5).

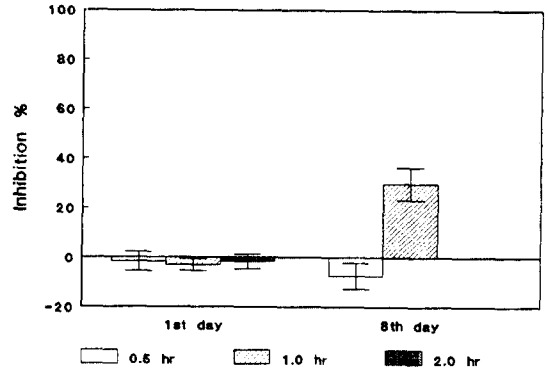


Fig. 10 - Inhibitory effect of Ginkomin-FR tablet on human platelet aggregation induced by ADP(5 μM). Each bar shows the mean ± S. E. M. (n=3).

kg + quercetin 3 mg/kg 투여군의 경우 단독실험시와 유사한 곡선양상을 보였고 두 경우 모두 투약 1.5시간 경과후에 가장 높은 억제효과(62.36 ± 0.97%, 92.83 ± 0.76%)를 보였다.

Ex-vivo aggregometry II - 징코민-FR 정제를 토끼에 10 일 동안 반복투여 하면서 얻은 항혈소판 응집효과를 Fig. 9에 나타내었다. ADP에 의한 응집에 대해 징코민-FR 정제 투여 약 3일째부터 5 mg 투여군과 20 mg 투여군에서 각각 9.22 ± 0.66%, 35.22 ± 4.06%의 억제효과를 보였고 7일째에는 25.51 ± 2.88%, 72.30 ± 5.23%의 효과를 보였으며 투여 10일째에는 39.2 ± 2.06% 및 88.52 ± 10.29%의 강한 억제효과를 나타냈다. PAF에 의한 응집에 대해서도 유사한 경향의 억제효과를 나타내 5 mg 투여군에서 3일째에 22.44 ±

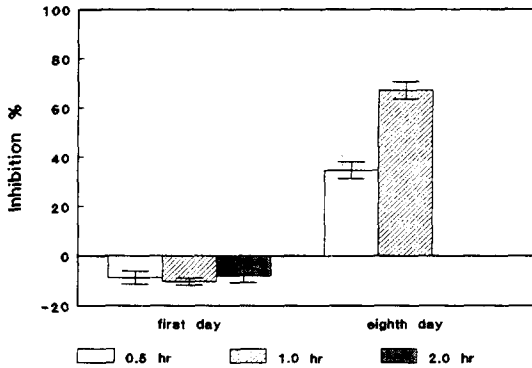


Fig. 11 — Inhibitory effect of Ginkomin-FR tablet on human platelet aggregation induced by PAF (0.3 μ M). Each bar shows the mean \pm S. E. M. (n=3).

7.15%, 7일째에는 $52.22 \pm 6.23\%$, 10일째에 $55.58 \pm 12.29\%$ 의 억제효과를 나타내었고 20 mg 투여군에서는 3일째에 $42.22 \pm 1.11\%$, 7일째에 $88.26 \pm 8.13\%$ 및 10일째에 $95.25 \pm 10.80\%$ 의 강한 억제효과를 나타내었다.

임상실험

3 명의 당뇨 환자를 대상으로 하여 실험한 징코민-FR 정제의 혈소판 응집에 대한 효과를 Fig. 10, 11에 나타내었다. 대상환자 모두 첫번째 투약 후에는 ADP와 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집에 대한 저해효과가 보이지 않았으나 일주일간 징코민-FR 정제를 계속 투약한 후 8일째 채혈하여 측정된 결과 대상환자 모두에게서 유의성 있는 혈소판 응집 저해효과가 나타났다. 8일째 측정결과를 보면 ADP에 의한 응집에 대해서 투약 1시간 후 $29.82 \pm 6.55\%$ 의 억제효과를 보였고, PAF에 의해 유도된 응집에 대해서는 투약 30분 후에 평균 $34.7 \sim 3.4\%$ 의 혈소판 응집 저해효과를 보였으며, 1시간 후에는 $67.1 \sim 3.5\%$ 의 유의성 있는 항혈소판 응집작용을 나타내었다.

고 찰

Ginkgolides는 PAF 길항제로 PAF가 수용체에 결합하는 것을 억제할 뿐만 아니라 lyso-PAF의 reacylation, phosphatidic acid 합성 및 PAF에 의해 유발되는 Ca^{+2} 의 세포내 유입 등을 억제한다. *In vitro* 항혈

전 실험 결과 ginkgolide B가 $10^{-5}M$ 의 높은 농도에서 ADP에 의한 혈소판 응집에 대해 $12.35 \pm 0.92\%$ 의 억제효과를 보인 것을 제외하고는 ginkgolides 혼합물, ginkgolide C 및 CNU 201 모두 ADP에 의한 응집에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타난 반면, PAF에 의한 혈소판 응집에 대해서는 모두 억제효과를 나타냈다. 이들 약물 중 ginkgolide B의 효과가 가장 높아 IC_{50} value가 $2.52 \times 10^{-6}M$ 로 나타났고, ginkgolides의 natural mixture의 IC_{50} value는 $6.35 \times 10^{-6}M$ 로 나타난 반면, ginkgolide C 및 CNU 201은 혈소판 응집 억제효과가 거의 없었던 것으로 나타났다. Positive control로 사용한 KR 30289는 ADP 및 PAF에 의한 응집에 대해 두 경우 모두에서 $3 \times 10^{-7}M$ 의 농도에서 약 20~40%의 약한 억제효과를 보이고 $10^{-6}M$ 이상의 농도에서는 강한 억제효과를 보여 IC_{50} value이 각각 $4.35 \times 10^{-7}M$, $5.44 \times 10^{-7}M$ 로 나타났는데 이는 PDE 억제에 의한 세포내 cyclic GMP와 cyclic AMP 농도 증가에 기인하는 것으로 간주된다⁴⁾. Ginkgoflavonols인 kaempferol, quercetin과 다른 한 종의 flavonol인 myricetin의 혈소판 응집 억제효과를 측정된 결과 myricetin이 $10^{-6}M$ 의 농도에서 PAF에 의한 응집을 $26.36 \pm 2.42\%$ 억제해 미약한 억제효과를 보인 것을 제외하고는 모두 유의성 있는 혈소판 응집 억제효과를 나타내지 않았다. 그러나, 3종의 flavonols를 ginkgolide B와 혼합하여 항혈전효과를 측정된 실험에서는 ginkgolide B와 quercetin 혼합물의 혈소판 억제능력이 ADP에 의해 유도된 응집에 대해 ginkgolide B를 단독으로 실험했을 때 증가한 양상을 보였는데 이러한 결과는 quercetin이 PDE를 억제해 세포내 cyclic GMP와 cyclic AMP의 level을 높여 응집 유도제의 종류에 무관하게 활성을 나타낸 것으로 간주된다. 또한 약물 혼합 실험시 PAF에 의한 응집에 대해서도 세 조합 모두 $3 \times 10^{-7} \sim 10^{-6}M$ 농도에서 ginkgolide B 단독 실험시보다 높은 억제효과를 보였다. 이러한 결과는 위의 quercetin의 경우와 마찬가지로 flavonol들이 일련의 혈액응집 과정 중 ginkgolide B와는 다른 경로에 작용하여 상승효과를 가져온 것에 기인한 것으로 볼 수 있다^{7,11)}.

Ginkgolide B와 quercetin을 토끼에 경구투여 한 후 경시적으로 혈액을 취해 약물의 혈소판 응집 억제능을 측정된 결과 ginkgolide B 투여군(3 mg/kg)의 경우 0.5 시간 경과 후부터 time-dependent하게 억제효

과가 증가되어 1.5시간 후에는 $88.96 \pm 2.34\%$ 의 강한 억제효과를 나타냈고, quercetin을 투약한 경우에도 ginkgolide B 보다는 낮지만 시간 및 용량 의존적으로 억제효과를 보여 1.5시간 경과 후에 $33.04 \pm 3.29\%$ (3 mg/kg 투여군) $49.87 \pm 4.06\%$ (9 mg/kg 투여군)의 억제효과를 나타내었다. 이 두 약물을 병용투여한 결과 ginkgolide B 1 mg/kg과 quercetin 3 mg/kg을 병용투여한 실험에서는 투약 2시간 경과 후에 $42.86 \pm 1.56\%$ 의 억제효과를 나타내었고 이러한 효과는 투약 3시간 경과 후에도 계속 지속되었다. Ginkgolide B 1 mg/kg, quercetin 9 mg/kg 혼합 투여군과 ginkgolide B 3 mg/kg, quercetin 3 mg/kg 혼합 투여군의 경우 단독실험시와 유사한 곡선양상을 보였고 두 경우 모두 투약 1.5시간 경과 후에 가장 높은 억제효과($62.36 \pm 0.97\%$, $92.83 \pm 0.76\%$)를 보였다. 이러한 결과로 미루어 보아 ginkgolide B는 1 mg/kg의 용량에서는 응집 억제효과를 나타내지 못하지만 quercetin과 병용투여시 quercetin의 효과를 증가시켜 주는 것을 알 수 있었고 ginkgolide B 3 mg/kg과 quercetin 3 mg/kg을 병용투여한 경우에는 ginkgolide B 3 mg/kg 단독투여시와 비교시 투약 2~3시간 경과 후에도 60% 이상의 억제효과를 지속적으로 나타내는 것으로 보아 quercetin이 ginkgolide B의 혈소판 응집 억제효과를 지속시켜 주는 것을 알 수 있는데 이러한 일련의 약물 상호작용은 위에서 언급한 것과 동일한 이유에 의한 것으로 추측된다.

이들 여러 항혈소판 응집 실험결과 specific한 PAF antagonist인 ginkgolides 및 quercetin 등에서 유의한 효과를 관찰할 수 있었는데, 실제로 현재 은행잎 추출물질이 폭넓은 연구의 대상이 되어 혈류개선 및 혈전증 치료제로 널리 사용되고 있고, 또한 SAR(structure activity relationship)에 의거, ginkgolide B의 lipophilicity를 증강시켜 ginkgolide B 보다 독성이 낮고 지속성 및 효력이 큰 약물을 개발하려는 노력이 시도되고 있다.

은행잎 엑스 제제들의 성분이 주로 kaempferol, quercetin, isorhamnetin 등의 배당체 복합물질인 ginkgoflavonglycoside이므로 이들 제제중의 하나인 징코민-FR 정을 토끼와 당뇨환자에게 투여한 결과 실험토끼의 경우, 약물투여 3일째부터 시간 및 용량 의존적으로 ADP와 PAF에 의해 유도된 응집을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 retinopathy GII 이상인 당뇨

환자를 대상으로 하여 실험한 결과도 첫날 첫번째 투약 후에는 혈소판 응집 저해효과를 나타내지 않았으나 일주일간 징코민-FR 정제를 계속 투약한 후 8일째 채혈하여 측정된 결과에는 3환자 모두에게서 일관성 있게 유의성 있는 혈소판응집 억제효과를 나타내었다. 8일째 징코민-FR 정제를 투여한 후 혈소판 응집 억제능을 측정한 결과 PAF에 의해 유도된 응집에 대해 투약 1시간 후 평균 $67.1 \sim 3.5\%$ 의 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. 이러한 실험결과로 미루어 보아 말초 혈액 순환부전이 일반적인 합병증으로 문제시되고 있는 당뇨 환자 및 심장순환계 질환 환자의 합병증 예방 및 치료에 은행잎 제제들이 유효한 임상효과가 있을 것으로 기대된다.

결 론

Ginkgo biloba 추출물인 ginkgolides, ginkgoflavonols와 은행잎 제제인 징코민-FR 정의 항혈전능을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *In vitro* platelet aggregation 실험 결과 ginkgolides의 natural mixture, ginkgolide B, ginkgolide C, CNU 201은 모두 ADP에 의해 유도된 응집에 대해서는 유의한 효과를 나타내지 않았으나, PAF에 의해 유도된 혈소판 응집의 경우 ginkgolide B와 ginkgolides의 natural mixture의 IC_{50} 값이 각각 $2.52 \times 10^{-6}M$, $6.35 \times 10^{-6}M$ 로 PAF에 특이성 있는 억제효과를 보인 반면 ginkgolide C와 CNU 201은 혈소판 응집 억제효과가 거의 없었던 것으로 나타났다. Ginkgoflavonol인 kaempferol, myricetin, quercetin 등은 단독으로 실험시는 모두 혈소판 응집 억제효과를 보이지 않았으나 ginkgolide B와 병용실험시 $3 \times 10^{-7} \sim 10^{-6}M$ 농도에서 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해 약 15~25%의 응집 억제효과를 나타내어 ginkgolide B의 효과를 상승시킨 것으로 나타났고, 특히 ginkgolide B와 quercetin의 혼합물은 $10^{-5}M$ 에서 ADP에 의한 응집에 대해서도 약한 억제효과($23.54 \pm 1.12\%$)를 보였다.

2. Ginkgolide B와 quercetin을 토끼에 투여한 후 채혈하여 분석한 결과 모두 농도 의존적으로 억제효과를 나타내었다. Ginkgolide B 투여군의 경우 1 mg/kg 투여시에는 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해 억제효과를 나타내지 않았으나 3 mg/kg의 용량을 투여한 경우에는 1.5시간 후에 $88.96 \pm 2.34\%$ 의 강한

억제효과를 보였고, quercetin을 투여한 경우에도 1.5시간 경과 후에 33.04~49.87% 억제효과를 나타내었다. 이러한 억제효과는 1.5시간 경과 후에 가장 강했고 그 이후 점차 감소하였다. 두 약물을 병용투여한 경우에도 비슷한 곡선양상을 보였으며 두 약물의 병용투여에 의해 혈소판 응집 억제효과가 2~3시간 후에도 계속 지속되는 것으로 나타났다.

3. 징코민-FR 정(5 and 20 mg)을 토끼에게 1일 2회 씩 10일간 반복투여하면서 혈소판 응집 억제능을 측정 한 결과 투여 3일째부터 ADP 및 PAF에 의해 유도된 응집에 대해 모두 시간 및 용량 의존적인 억제효과를 보였다. 또한 망막장애가 있는 3명의 당뇨병자를 대상으로 징코민-FR 정의 혈소판 응집 억제효과를 실험한 결과 3환자 모두 첫날에는 ADP 및 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해 영향을 미치지 못했으나 일주일간 계속 투약한 후 8일째 투약 1시간 후에 채혈하여 측정 한 결과 ADP와 PAF에 의해 유도된 응집에 대해 각각 $29.82 \pm 6.55\%$ 와 $67.10 \pm 3.50\%$ 의 억제효과를 나타 내 3환자 모두 유의성 있는 혈소판 응집 억제효과를 나타냈다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신약개발센터(ERC) 지원에 의해 연구된 결과의 일부로써 이에 감사드리며 또한 본 실험에 필요한 시약 등을 지원해 주신 (주) 동방제약에게도 감사드립니다. 본실험에 사용된 추출물과 합성시료를 제공하여 주신 충남대학교 약학대학 안병준, 정상현 교수와 한국화학연구소 유성은박사께 감사 드립니다. 또한 임상실험을 시행하여 주신 충남대학교 의과대학 김삼용교수께도 감사 드립니다.

문 헌

- 1) 한용남: Assay for Antithrombic Activity, 서울대학교 생약연구소 (1990).
- 2) 許仁會 外: 疾病과 藥物, 정서립, 서울, 155-166, 378-382 (1991).
- 3) Emms H., Lewis G. P.: The roles of prostaglandin endopoxides, thromboxane A2 and ADP in collagen induced aggregation in man & the rat. *Br. J. Pharmacol.* **87**, 109-115(1986).

- 4) Hidaka H., Hayashi H., Kohri H., Kimura Y., Hosokawa T. & Igawa T.: Selective inhibitor of platelet c-AMP phosphodiesterase, Cilostamide, inhibits platelet aggregation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**(1) 26-30 (1979).
- 5) Doebber T. W., Wu M. S.: PAF induced cellular and pathophysiological responses in the cardiovascular system. *Drug Develop. Res.* **12**, 151-161 (1988).
- 6) Michael C.: Comprehensive Medicinal Chemistry, 3rd Ed, **716-725**, 739-746 (1990).
- 7) Braquet P., Shen T. Y., Touqui L. and Vargafing B. B.: Perspectives in platelet activating factor research. *Pharmacol. Review* **39**(2), 97-145 (1987).
- 8) Chau, L. Y.: Characterization of [3H] labeled PAF receptor complex solubilized for rabbit platelet membrane. *Biochem. Biophys. Acta* **970**, 103-112 (1988).
- 9) Honda, Z.: Cloning by functional expression of PAF receptor from guinea pig lung. *Nature* **349**, 342-345 (1991).
- 10) Nakamura, M.: Molecular cloning and expression of Platelet activating factor receptor from human leukocytes. *J. Biol. Chem.* **266**(30), 20400-20404 (1991).
- 11) Hwang, S.: Ionic and GTP regulation of binding of Platelet activating factor to receptor and PAF-induced activation of GTPase in rabbit platelet membrane. *J. Biol. Chem.* **261**, 532-537 (1986).
- 12) Tarashita Z. I., Imura Y. & Nishikawa K.: Inhibition by CV-3988 of the binding of [³H] PAF to the platelet. *Biochem. Pharmacol.* **34**(9), 1491-1495 (1985).
- 13) Valone F. H., Reinhold V. R., Coles E. and Goetzl A. J.: Specific binding of phospholipid PAF by human platelet. *J. Immunol.* **129**(4), 1637-1641 (1982).
- 14) Ward S. G., Westwick J.: Antagonism of the PAF induced rise of the intracellular Ca¹² ion concentration of U 937 cells. *Br. J. Pharmacol.* **93**, 769-774 (1988).
- 15) Tzeng S. H., Ko W. C., Ko F. N. and Teng C. M.: Inhibition of platelet aggregation by some

- flavonoids. *Thromb. Res.* **64(1)**, 91-100 (1991).
- 16) Jean P. C., Alain B. & Robert A.: The effects of flavonoids on human platelet function. *Flavonoids and Bioflavonoids*, ELSEVIER 373-380 (1985).
- 17) Robak J., Korbut R., Shridi F., Swies J.: On the mechanism of anti aggregatory effect of myricetin. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **40(3)**, 337-340 (1988).
- 18) Drieu K., Moreau J. P., Eck C. R. & Skinner S.: Animal distribution and preliminary human kinetic studies of the flavonoid fraction of a standardized *Ginkgo biloba* extract. *Flavonoids and Bioflavonoids*, ELSEVIER 351-372 (1985).
- 19) 韓大錫 外: *Natural Product Chemistry*, 217-226 (1989).