

豨薺散이 血栓에 미치는 영향

김민상, 김윤식, 설인찬

대전대학교 한의과대학 순환기내과학교실

The Studies of the *Heechum-san*(HCS)'s Effects on the Thrombosis

Min-Sang Kim, Yun-Sik Kim, In-Chan Seol

Department of Circulatory Internal Medicine, College Of Oriental Medicine, Daejeon University, Taejeon, Korea.

Objectives : We aimed to identify the effects of *Heechum-san*(HCS) on the thrombosis.

Methods : We measured the protective effects of HCS on pulmonary thromboembolism induced by collagen and epinephrine, intravascular coagulation induced by dextran.

Results : HCS showed a effective inhibition on coagulation of platelets induced by ADP or epinephrine. HCS showed survival rate of 14.28% on pulmonary thrombo- embolism caused by collagen and epinephrine. On the measure of the blood flow rate induced by the thrombus, in vivo HCS accelerated the blood flow rate.

Conclusions : HCS has antithrombotic effects.

Key Words: *Heechum-san*(HCS), Thrombosis, Coagulation

서론

혈전이란 혈관내에서 형성된 혈액의 응고괴를 말하는 것으로^{1,2)}, 혈전의 발생은 내피세포의 상해, 혈류의 울혈 내지는 정지, 혈액의 성분이상 등의 원인에 의해 일어나며³⁾, 이러한 혈전으로 인해 순환장애를 일으킨 것을 혈전증이라고 한다^{1,3,4)}. 혈전은 심근경색, 허혈성 뇌혈관질환 등의 원인이 되며^{1,5,6)}, 이로 인한

순환기질환의 사망률은 2000년 통계청 발표 결과 우리나라 사망을 수위를 차지하고 있다⁷⁾. 또한 혈전은 허혈성 뇌혈관질환을 일으키는 인자로 알려져 있는데 특히 뇌경색을 유발하는 인자로 알려져 있으며^{24,27)}, 혈류속도 감소로 혈관벽에 혈소판이 부착하는 경우, 혈관벽의 기형 등으로 인한 혈류속도 변화, 혈관벽의 변성과 혈관의 국소압박 등으로 인한 혈관내피의 손상, 혈액의 구성성분의 변화 등으로 야기된다^{19,27)}. 이러한 혈전은 한의학에서는 濕痰과 瘀血의 범주로 보고⁸⁾ 다각적인 연구가 행해지고 있다^{12,13,14)}.

豨薺散은 理氣疎風, 祛痰活血祛瘀, 健脾滲濕 등의 효과를 가지고 있는 약물들로 구성되어 있어 중풍, 고혈압, 고지혈증 등에 활용되어 온 처방이다. 이에 저자는 豨薺散을 시료로 항혈전 작용을 평가하기 위해 폐색전, fibrinolytic activity, dextran 어혈 모델에서의

· 접수 : 2003년 5월 26일 · 논문심사 : 2003년 7월 25일
· 채택 : 2003년 8월 12일

· 교신저자 : 김민상, 천안시 구성동 476-8번지 대전대부속 천안한방병원 순환기내과
(Tel: 041-560-8705, Fax: 041-553-2225, E-mail: this76@chol.com)

혈소판수, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT) 및 혈류속도를 측정하여 실험하였던 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 동 물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 충북 음성에 대한 실험동물센터의 체중 180~250g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat과, 18~20g의 ICR(International Cancer Research)계 mouse로, 실험 당일까지 고형 사료(조단 백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간 (07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일 간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용된 稀散의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Compositions of Heechumsan(HCS : 稀散) Extracts

韓藥名	生藥名	用量(g)
稀 筵	Siegesbeckiae Herba	16.0
鷄 血 藤	Spatholobi Caulis	8.0
柴 胡	Bupleuri Radix	8.0
牛 膽 南 星	Pinelliae Rhizoma	5.0
茯 苓	Poria	5.0
黃 芩	Scutellariae Radix	5.0
芍 藥	Paeoniae Radix Alba	5.0
桂 枝	Cinnamomi Ramulus	4.0
龍 骨	Fossilia ossis Mastodi	4.0
牡 蠣	Ostreae Concha	4.0
大 黃	Rhei Radix et Rhizoma	3.0
枳 實	Aurantii immaturus Fructus	3.0
人 蔘	Ginseng Radix	2.0
甘 草	Glycyrrhizae Radix	2.0
山 查 肉	Crataegii Fructus	4.0
Total amount		72.0

2. 방 법

1) 검액의 조제

稀散(HCS) 2첩을 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml을 넣은 후, 3시간 가열 추출하고, 침전물을 3회 여벌(3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1첩당 26.3g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) In vitro test

(1) 혈소판 응집 측정

12시간 이상 공복을 유지한 지원자의 상박 정맥으로부터 채혈한 혈액을 3.8% 구연산나트륨이 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣고 원심분리 (900rpm/10분)하여 상등액으로부터 platelet rich plasma (PRP) 를 얻고 잔액을 다시 원심분리 (3000rpm/10분)하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻었다. PRP는 채취 즉시 변화를 막고 얼음이 들어있는 용기에 보관하였다.

약물의 항혈소판 응집효과는 Platelet Aggregation Profiler Model (PAP-4, BIO/DATA Co., USA)를 사용하였으며 최종농도는 ADP 6 μM와 Epinephrine 5μM이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37℃에서 incubation시킨 PRP 320 μl와 실험군 40 μl를 넣고 다시 incubation한 후 ADP 40 μl 또는 Epinephrine 40 μl를 가하여 5분간 반응시켰다.

실험군은 HCS을 증류수에 용해시키고 희석하여 사용하였으며 최종농도가 10, 5, 2.5mg/ml이 되도록 PRP에 가하고 응집 유도제를 넣기 전까지 37℃에서 3분간 incubation하였다. 실험의 처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 생리식염수 40 μl을 가한 뒤 최대응집 %를 측정하여 채혈 후 시간 경과로 인한 혈소판 변질로 나타날 수 있는 실험오차를 방지하였으며 PRP를 얻은 후 2시간 안에 모든 실험을 진행시켰다. 실험조작 동안 온도는 37℃로 유지하고 교반 속도는 500-1,500rpm으로 하며 528nm에서 응집

도를 측정하였다.

약물에 의해 aggregation이 억제되는 정도를 다음 식에 의거하여 transmission maximum reduction percent를 산출하였다.

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

A = control(vehicle)의 maximum aggregation %

B = 약물처리의 maximum aggregation %

각각의 농도에서의 aggregation(%)은 mean ± S.D.으로 나타내었고 시험약물의 통계적인 유의성은 Student t-test를 통해 검정하였다.

(2) Fibrinolytic activity의 측정

Fibrinogen(plasminogen-containing, Sigma)을 0.05 M babital buffer, pH7.8에 녹여 최종 0.7%가 되도록 한 뒤, 5ml의 용액을 0.1ml의 thrombin(100 NIH/ml)에 넣어 수 초 내에 petri dish(85 × 15mm)에서 혼합하였다. 이것을 37℃에서 30분간 방치하여 fibrin plate가 형성됨을 확인하고 형성된 fibrin plate 상에 disk를 이용하여 양성대조군 urokinase 0.1ml(100iu/ml)를 점적하고 시료를 농도별로 점적한 다음 37℃ incubation에 24시간동안 방치하여 용해되는 whole well의 크기를 측정하여 대조군과 실험군을 비교한다.

(3) 혈류속도 측정

In vitro test에서는 heparin(1000units/ml) 처리한 syringe를 이용하여 일반정상쥐의 심장천자를 통해 채혈하였다. 혈액을 acid citrate dextrous (ACD)용액으로 5배 희석한 다음 일정한 크기의 유리관을 통과하게 하여 혈류속도에 미치는 영향을 측정하였다. 혈액에 dextran을 넣은 일반군과 약물을 처리한 실험군으로 실험하였고, 사용한 희석혈액은 37℃가 유지되도록 하였으며 시료를 넣고 5분간 pre-incubation 시킨 후 상기 방법으로 혈류속도를 측정하였다.

5ml의 희석혈액을 기준으로 직경 2mm의 크기를 가진 유리관을 통과하는데 걸리는 시간을 측정하였다.

3) In vivo test

(1) 폐색전(Pulmonary thrombosis) 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura의 실험 방법(15)에 준하여 실시하였다. 실험 동물은 몸무게 약 18g-20g 정도의 수컷 ICR계 mouse를 사용하였고, HCS은 20g ICR mouse를 기준으로 검액 17.5mg/20g/day을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 2회 경구 투여하였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집시약(11.3 μg의 collagen과 1.32 μg의 epinephrine)을 Hank's balanced salt solution(HBSS) 200 μl에 함유되도록 조제하였고, ICR계 mouse의 몸무게 20g당 200 μl의 용량으로 尾靜脈에 주사하였다.

실험동물을 실험 전 24시간 절식시킨 후, 혈소판 응집 유발 시약의 정맥 주사 2시간 전에 상기한 농도의 HCS을 ICR계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 2mg/20g을 경구 투여하였다.

항혈전효과는 혈소판 응집 시약의 투여로 인하여 발생하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하며, 여기서 마비는 20분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

(2) Dextran 어혈 병태에 대한 실험

① Dextran 어혈병태 유발 및 약물 투여

SD계 rat 8마리를 1군으로 하여 정상군(Normal), 대조군(Control) 및 실험군(HCS)으로 각각 나누었다. 정상군은 생리식염수를 공급하고, 대조군은 생리식염수를 투여한 지 1시간 후에 dextran 어혈 병태를 유발하였으며, HCS 투여군은 175.3mg/200g/day을 생리식염수 2ml에 용해하여 oral zonde로 실험 하루 전에 1회 경구 투여하고, 이 후 절식시킨 후 실험하기 1시간 전에 다시 1회 경구 투여한 후 대조군과 동일한 방법으로 dextran 어혈 병태를 유발하였다.

Dextran 어혈 병태 유발 : Dextran(분자량 21만)을 생리식염수에 넣고 가열하면서 완전히 용해시켜 10% 농도의 용액을 만들어 1.1ml/200g씩 rat의 尾靜脈에 3분 이내에 전량 주사하고, 4시간 경과 후 심장 천자로 채혈하여 각종 검사를 실시하였다. 정상군 및 대조군은 실험 약물 대신 생리식염수를 투여하여 실험군과 동일한 시각에 각종 지표를 검사하였다.

② 혈소판수 측정

혈소판수 측정은 자동혈구계산기(Minos-ST, Cobas Co., France)를 사용하여 측정하였다.

③ Prothrombin time 측정

Prothrombin time은 Simplastin Kit(General Diagnostics., U.S.A.)를 사용하여 ACL-100(Instrumentation Laboratory, U.S.A.)으로 측정하였다.

④ Activated Partial Thromboplastin Time(APTT) 측정

Activated Partial Thromboplastin Time(APTT)은 Simplastin Kit (General Diagnostics., U.S.A.)를 사용하여 ACL-100(Instrumentation Laboratory, U.S.A.)으로 측정하였다.

⑤ Fibrinogen 양 측정

Fibrinogen 양은 Simplastin Kit(General Diagnostics., U.S.A.)를 사용하여 ACL-100(Instrumentation Laboratory, U.S.A.)으로 측정하였다.

(3) 혈류 속도 측정

In vivo에서는 시료를 10일간 SD계 rat에 경구투여 하고 dextran으로 어혈병태를 유발을 한 다음 heparin(1000units/ml)으로 처리한 syringe를 이용하여 채혈하였다.

채취한 혈액을 Acid Citrate Dextrous(ACD)용액으로 5배 희석한 다음 일정한 크기의 유리관을 통과하게 하여 혈류 속도에 미치는 영향을 측정하였다.

5ml의 희석 혈액을 기준으로 직경 2mm의 크기를 가진 유리관을 통과하는데 걸리는 시간을 측정하여 결정하였다. 실험에 사용한 희석혈액은 37℃가 유지 되도록 하였다.

4) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's t-test를 사용하여 통계 처리하였으며 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

■ In vitro test

1 혈소판 응집(Platelet aggregation) 억제 효과

1) ADP에 의한 혈소판 응집 억제 작용

In vitro test에서 최종농도 ADP(6μM)의해서 유도된 혈소판 응집에 대한 저해 효과를 측정하기 위하여 농도에 대한 최대응집율(%)과 억제율(%)을 산출하였다.

HCS을 농도별 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml로 하여, ADP(6μM)에 의해서 유도된 혈소판 응집 반응을 실험하였다.

실험한 결과 대조군의 최대응집율은 68%, HCS 투여군 중에서 10mg/ml는 최대 응집율 3%, 억제율은 95.58%, 5mg/ml는 최대응집율 20%, 억제율은 70.58%, 2.5mg/ml는 최대응집율 40%, 억제율은 41.17%로 나타났다(Table 2).

2) Epinephrine 에 의한 혈소판 응집 억제 작용

In vitro test에서 최종농도 epinephrine(5 μM)의해서 유도된 혈소판 응집에 대한 억제 효과를 측정하기 위하여 농도에 대한 최대응집율(%)과 억제율(%)을 산출하였다.

HCS를 농도별 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml로 epinephrine(5μM)에 의해서 유도된 혈소판응집반응을 실험하였다.

실험한 결과 대조군의 최대응집율은 80%, HCS투여군 중에서 10mg/ml는 최대응집율 6%, 억제율은 92.5%, 5mg/ml는 최대응집율 10%, 억제율은 87.5%, 2.5mg/ml는 최대응집율 10%, 억제율은 87.5%로 나타났다(Table 3).

2. Fibrinolytic activity

Fibrin plate 상에 disk를 이용하여 urokinase 0.1ml(100iu/ml)를 점적한 대조군과, 시료를 농도별로 점적한 HCS 투여군을 37℃ incubater에 24시간 동안

Table 2. Effect of HCS on Human Platelet Aggregation induced by ADP

Group	Concentration (mg/ml)	Rate of maximum aggregation(%)	Rate of inhibition (%)
Control	-	68	-
	10	3	95.58
HCS	5	20	70.58
	2.5	40	41.17

Control : ADP treated group.

HCS : ADP and HCS treated group.

Table 3. Effect of HCS on Human Platelet Aggregation induced by Epinephrine

Group	Concentration (mg/ml)	Rate of Maximum aggregation(%)	Rate of Inhibition (%)
Control	-	80	-
	10	6	92.5
HCS	5	10	87.5
	2.5	10	87.5

Control : Epinephrine treated group.

HCS : Epinephrine and HCS treated group.

Table 4. Effect of HCS on the Fibrinolytic Activity by Fibrin Plate

Group	Concentration	Fibrinolysis Size per Dilutions(cm)
Urokinase	10iu/disk	2.0
	10mg/disk	-
HCS	5mg/disk	-
	2.5mg/disk	-

Urokinase: 10iu/disk treated group.

HCS : HCS treated group.

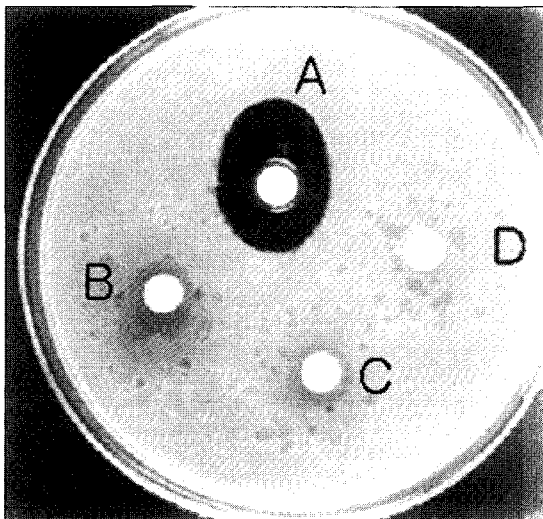


Fig. 1. Effect of HCS on the fibrinolytic activity by fibrin plate

- A: Urokinase 10iu/disk treated group.
- B: 10 β Σ /disk HCS treated group.
- C: 5 β Σ /disk HCS treated group.
- D: 2.5 β Σ /disk HCS treated group.

방치하여 용해되는 whole well의 크기를 측정한 결과, urokinase를 점적한 대조군에서는 2.0cm 정도로 혈전을 용해시켰고, HCS을 점적한 실험군에서는 효과가 없었다(Table 4, Fig. 1).

3. 혈전유발에 따른 혈류속도 측정

정상군의 혈액에 직접 약물을 투여 시켜 In vitro test로 혈류속도를 측정할 결과 정상군은 25.74 \pm 1.25, 대조군은 27.00 \pm 1.45, HCS 26.51 \pm 2.62로 혈류속도의 감소를 나타냈지만 유의성은 없었다(Table 5).

□ In vivo test

1. 폐색전(Pulmonary embolism)에 대한 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 Control군은 8마리 중 7마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 지속이 되었는데, aspirin 투여군은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속이 되었다. 이에 반하여 HCS 투여군은 8마리중 6마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 14.28%의 억제 효과가 나타났다(Table 6).

2. Dextran 어혈 병태에 미치는 효과

1) 혈소판수에 미치는 효과

혈소판수 변화에서는 정상군이 889.00 \pm 18.80(\times 103/mm³)인데 비하여, 대조군은 686.00 \pm 5.67(\times 103/mm³), HCS 투여군은 824.00 \pm 8.30(\times 103/mm³)으로 나타나 유의성 있는 혈소판 응집 억제효과를 나타냈다(Table 7).

2) Prothrombin time에 미치는 효과

Prothrombin time에 대한 효과에서는 정상군에서 13.50 \pm 1.73(sec)인데 비하여, 대조군은 15.40 \pm 1.39(sec)으로 나타났으며, HCS 투여군은 대조군에 비해 13.90 \pm 1.49(sec)로 유의성 있는 단축효과를 보였다(Table 8).

3) Activated partial thromboplastin time(APTT)에 미치는 효과

APTT에 대한 효과에서는 정상군이 54.50 \pm 1.40(sec)인데 비하여 대조군은 62.90 \pm 5.40(sec), HCS 투여군은 61.40 \pm 4.32(sec) 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 9).

4) Fibrinogen 양에 미치는 영향

Fibrinogen 양에 대한 효과에서는 정상군에서 235.00 \pm 6.57(mg/dl)인데 반하여, 대조군은 209.00 \pm

Table 5. Effect of HCS on Blood Flow Rate *in vitro* test

Sample Group	Flow Rate(sec)
Normal	25.74 ± 1.25a)
Control	27.00 ± 1.45
HCS	26.51 ± 2.62

a) : Mean ± standard error

Normal : normal blood.

Control : normal blood on 10% dextran.

HCS : normal blood on 10% dextran with 10mg/10ml of HCS.

Table 6. Effect of HCS on Pulmonary Embolism Mice

	Dose (mg/20g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control	-	7/8	0
Aspirin	2	2/8	71.42
HCS	15.7	6/8	14.28

※ HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

Control : 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrin/20g i.v. injected group.Aspirin : 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrin/20g i.v. injected group after oral administration of 2mg/20g of aspirin.HCS : 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrin/20g i.v. injected group after oral administration of 17.5mg/20g of HCS extracts.**Table 7.** Effect of HCS on Platelet in Dextran Treated Rat

Group	No. of animals	Platelet($\times 103/mm^3$)
Normal	8	889.00 ± 18.80a)
Control	8	686.00 ± 5.67++
HCS	8	824.00 ± 8.30***

a) : Mean ± standard error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

HCS : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 175.3 mg/200g of HCS.

+ : Statistically significant value compared with normal data
(+ : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$)* : Statistically significant value compared with control data
(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)**Table 8.** Effect of HCS on Prothrombin Time in Dextran Treated Rat

Group	No. of animals	Prothrombin time (sec)
Normal	8	13.50 ± 1.73
Control	8	15.40 ± 1.39
HCS	8	13.90 ± 1.49***

a) : Mean ± standard error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

HCS : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 175.3 mg/200g of HCS.

* : Statistically significant value compared with control data
(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)**Table 9.** Effect of HCS on Activated Partial Thromboplastin Time in Dextran Treated Rat

Group	No. of animals	APTT(sec)
Normal	8	54.50 ± 1.40
Control	8	62.90 ± 5.40+
HCS	8	61.40 ± 4.32

a) : Mean ± standard error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

HCS : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 175.3 mg/200g of HCS.

+ : Statistically significant value compared with normal data
(+ : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, +++ : $p < 0.001$)**Table 10.** Effect of HCS on Fibrinogen in Dextran Treated Rat

Group	No. of animals	Fibrinogen(mg/dl)
Normal	8	235.00 ± 6.57
Control	8	209.00 ± 7.31+
HCS	8	222.00 ± 7.36**

a) : Mean ± standard error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

HCS : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 175.3 mg/200g of HCS.

+ : Statistically significant value compared with normal data
(+ : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, +++ : $p < 0.001$)* : Statistically significant value compared with control data
(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)**Table 11.** Enhancement of Blood Flow Rate by Administration *in vivo*

Group	Flow Rate(sec)
Normal	26.44 ± 0.85
Control	33.75 ± 1.88+
HCS	27.66 ± 4.61*

a) : Mean ± standard error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

HCS : 1.1 ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 175.3 mg/200g of HCS.

+ : Statistically significant value compared with normal data
(+ : $p < 0.05$, ++ : $p < 0.01$, +++ : $p < 0.001$)* : Statistically significant value compared with control data
(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

7.31(mg/dl), HCS 투여군은 222.00 ± 7.36(mg/dl)으로 대조군에 비해 유의성 있는 증가 효과를 나타내었다 (Table 10).

3. 어혈유발에 따른 혈류속도 측정

어혈을 유발시킨 SD rat에서 혈액을 채취하여 혈류속도를 측정한 실험의 결과 정상군은 26.44 ± 0.85(sec), 대조군은 33.75 ± 1.88(sec), HCS 27.66 ± 4.61(sec)로 대조군에 비하여 혈류속도는 유의성 있는 감소효과를 나타내었다(Table 11).

고찰

혈전은 심혈관계 및 뇌혈관계 질환을 일으키는 중요한 원인으로서^{1,2,5,6}, 혈액이 심장이나 혈관에 응고되어 형성된 혈괴를 말하며¹², 혈전이 형성되어 순환장애를 일으킨 것을 혈전증이라고 한다^{1,3,4}.

혈전의 형성은 지혈 및 혈액응고기전과 밀접한 관계를 가지는데, 지혈은 혈관이 손상된 후 상처 부위의 collagen이 혈소판과 밀착되어 혈소판에서 혈관수축물질인 serotonin과 ADP가 유리되어 마개가 형성되는 일차적인 지혈이며, 혈액응고는 혈액응고인자들의 선택적 결합과 혈장내에 존재하는 여러 가지 단백질 가수분해 억제인자들과 길항작용을 하는 일련의 효소반응에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 일어나는 현상이다^{16,17}.

지혈 및 응고과정이 완전히 이루어지고 혈관조직의 재생이 이루어지면 형성된 fibrin polymer는 혈전용해계(fibrinolysis)에서 plasminogen이 활성화되어 생성된 plasmin에 의해 용해된다^{16,18}. Fibrin의 용해는 fibrinolysis의 주효소인 plasmin에 의해 일어나지만, plasmin은 혈액응고에 중요한 fibrinogen에 대해서도 높은 분해활성을 가지고 있다¹⁸. 따라서 plasmin이 과량 존재하면 출혈의 위험성이 높게 되므로 이러한 문제를 극복하기 위해 α2-antiplasmin과 α2-macroglobulin같은 생체내 억제인자가 존재하고 있다. 또한 plasminogen activator에 의해 plasminogen의 활성화가 fibrin clot이 형성된 곳에서만 일어나도록 정교하게 조절되고 있다^{17,19}.

서양의학에서 사용중인 혈전 제거 방법으로는 streptokinase, urokinase, t-PA 같은 혈전용해제와, aspirin과 같은 항혈소판제제, 그리고 heparin과 같은

antithrombin제제가 이용되고 있으며, 과량 사용할 경우 출혈의 위험성이 있는 것으로 알려져 있다²⁰.

뇌혈관질환은 뇌혈관의 색전, 혈전으로 생기는 뇌경색과 파열로 인한 뇌출혈 등으로 구분이 되며^{1,6,8,19,23}, 최근에는 뇌경색의 발생비율이 점차 증가하는 경향을 보이고 있다^{24,26}. 특히 혈전은 뇌경색을 유발하는 인자로 알려져 있으며^{24,27}, 혈류속도 감소로 혈관벽에 혈소판이 부착하는 경우, 혈관벽의 기형 등으로 인한 혈류속도 변화, 혈관벽의 변성과 혈관의 국소압박 등으로 인한 혈관내피의 손상, 혈액의 구성성분의 변화 등으로 야기된다^{19,27}. 어혈은 혈액의 점도, 농도, 응고성 및 적혈구응집이 증가된 상태라고 하여 혈관강의 협착, 폐색 등을 유발시켜 뇌경색이나 뇌출혈을 일으킨다고 하였으며, 혈전증, 고지혈증, 고점도혈증 등이 포함된다고 하였다. 최근에 어혈치료에 있어서活血化痰하는 방제나 약물을 이용하여 혈전에 대한 연구에는 薛²⁸의 補陽還五湯 등 여러 연구가 있으며, 또한 한의학에서 瘀血과 痰飲은 異名同源的 병리적인 산물^{29,30}로, 혈전증, 고지혈증, 고점도혈증, 심혈관질환, 뇌혈관질환 등을 유발한다고 하였다³¹. 瘀血과 痰飲은 중풍의 중요한 원인³²으로 인식되어 이를 치료하는 처방에 대한 실험적 연구로 金³³의 滌痰湯의 腦損傷에 대한 實驗의 여러 가지가 행해졌다.

豨薺散은 祛風濕, 通經絡하는 豨薺(九蒸)³⁴을 君藥으로 하고, 疏肝解鬱, 行血活絡하는 柴胡, 鷄血藤³⁴을 臣藥으로 하며, 燥濕化痰, 祛風散結하는 牛膽南星³⁴, 利水滲濕하는 茯苓³⁴, 除濕熱하는 黃芩³⁴, 涼血祛瘀하는 芍藥³⁴을 佐藥으로 하고, ³⁴, 助陽化氣, 平肝潛陽, 鎮驚安神하는 桂枝, 龍骨, 牡蠣³⁴와 逐瘀經痛, 破氣散結하는 大黃, 枳實³⁴과 , 補氣生津하는 人蔘³⁴, 調和諸藥하는 甘草³⁴, 消積散瘀하는 山楂³⁴를 使藥으로 하여 구성된 처방으로 中風, 高血壓, 高脂血症 및 心臟疾患 등에 活用되고 있다.

이에 저자는 현재 대전대학교 한방병원에서 중풍 치료에 사용 중인 豨薺散의 혈전에 대한 치료효과를 실험적으로 규명하고자 *in vitro test*에서는 ADP와 epinephrine에 의한 혈소판 응집반응에 대한 억제 작용을 관찰하였고, fibrinolytic activity를 측정하였으며,

dextran으로 어혈병태를 유발한 모델에서 혈류속도를 측정하였다. 또한 *in vivo* test에서는 collagen과 epinephrine으로 유발한 폐색전 모델에서 生存率을 관찰하였으며, dextran으로 어혈병태를 유발한 모델에서 혈소판수, PT, APTT, fibrinogen 양 및 혈류속도에 미치는 영향을 측정하였다.

혈소판은 거핵구 세포질의 작은 파편으로³⁵⁾, 혈관 내막이 손상된 경우 노출된 내피하층에 혈소판이 응집하여 지혈이 이루어지며, 혈소판 막에 함유된 다량의 인지질을 중심으로 혈액의 응고작용이 이루어지는 등 생체내에서 응혈 및 혈전형성에 큰 역할을 담당한다^{17,35)}.

ADP(adenosin diphosphate)는 serotonin, Ca²⁺, K⁺와 함께 혈소판의 응고요소가 되는데, 혈액응고 과정에 있어서 ADP는 다른 혈소판을 잡아 끌어 혈소판 덩어리를 구축하여 지혈막을 형성하는 역할을 한다¹⁶⁾. 또한 epinephrine은 혈소판 응집단계에서 혈소판막에 있는 α 및 β -epinephrine type의 receptor에 작용하여 혈소판 응집을 일으킨다.³⁵⁾ ADP를 이용한 혈소판 응집에서 실험한 결과 대조군의 최대응집율은 68%, 羶散 투여군 중에서 10mg/ml는 최대 응집을 3%, 응집억제율(inhibition)은 95.58%로 나타내었고, 5mg/ml는 최대응집을 20%, 억제율은 70.58%로 나타내었고, 2.5mg/ml는 최대응집을 40%, 억제율은 41.17%로 나타나 羶散의 농도에 따라 혈소판응집 억제효과가 높게 나타나 유의성 있는 결과를 보였다.(Table 2). Epinephrine에 의한 혈소판 응집에서는 대조군의 최대응집율은 80%, 羶散투여군 중에서 10mg/ml는 최대응집을 6%, 억제율은 92.5%로 나타내었고, 5mg/ml는 최대응집을 10%, 억제율은 87.5%로 나타내었고, 2.5mg/ml는 최대응집을 10%, 억제율은 87.5%로 나타나 ADP의 경우와 마찬가지로 羶散농도에 따른 유의성 있는 효과를 나타내었다(Table 3).

이는 羶散이 혈관벽과 혈액의 유형성분, 특히 혈소판과 혈액응고계를 이루고 있는 혈장응고인자들의 상호작용에 관여하여 혈전형성을 억제하는 것으로 사료된다.

또한 fibrinogen은 혈액응고 과정의 최종 단계에서

thrombin과 결합하여 fibrin을 생성하며, 혈전 급성기, 염증, 악성 종양, 신장 질환, 당뇨병 등에서 증가하는 경향이 있는데³⁵⁾, 본 실험의 fibrinolytic activity에서는 urokinase를 점적한 양성 대조군에 비해서는 유의성이 없었다(Table 4, Fig. 1). 이는 羶散이 urokinase처럼 혈전을 용해시키는 작용으로 혈전 예방하는 효과를 나타내지는 않는 것으로 사료할 수 있다.

폐색전을 일으키는 방법으로 본 실험에서는 collagen과 epinephrine을 사용하였는데, 혈소판 응집시약인 collagen은 血小板에서 adenosine diphosphate(ADP)를 배출시켜 응집을 일으키고, epinephrine은 위에서 언급한 바와 같이 혈소판 응집 단계에서 혈소판 막에 있는 α 및 β -epinephrine type의 receptor에 작용하여 응집시킨다³⁵⁾.

본 실험에서 폐색전에 따른 항혈전작용에 대한 효과를 관찰한 결과 대조군은 mouse 8마리 중 7마리가 죽거나 30분간 마비가 지속이 되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8마리 중 2마리만 죽거나 15분간 마비가 지속되었으며, 회침산 투여군에서는 8마리 중 6마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 대조군에 비하여 14.28%의 억제효과를 나타내었다(Table 6). 그러나 최근 연구결과에 의하면 폐색전 유발실험에서 척당탕은 50%, 가미척당탕은 70%, 통비음은 40%의 억제효과를 보인 것으로 보고되었으며³³⁾ 본 실험에서 aspirin은 71.42%의 억제효과를 보인 것으로 보아 羶散의 폐색전에 대한 효과는 최근까지의 실험에 비해 다소 미약한 것으로 나타났다.

혈전 시험에 사용되고 있는 dextran은 적혈구 응집, 미세혈류의 변화, 미세한 혈전형성, 혈류속도감소, 혈관주위 삼출, 출혈, 미세동맥의 경련, 미세정맥의 확장, 전혈점도와 혈장점도의 증가 및 혈소판 점착성 증가 등을 유발시키는 물질로서, 尾靜脈 주사 시 10-20분 사이에서 상기 증상이 뚜렷하게 나타난다³⁶⁻³⁸⁾.

혈소판은 정상지혈과 혈전증에 중추적 역할을 하는데^{17,35)}, 본 실험에서 혈소판수는 羶散 투여군은 유의성($p < 0.001$)있는 감소효과가 있어(Table 7), 薛 등³⁸⁾의 실험과 같은 효과가 나타났는데, 이는 羶散이 혈전 억제작용을 보여 dextran 혈전형성에 따른 혈소

판의 파괴항진을 감소시킨 결과로 생각된다.

PT는 혈장에 조직 thromboplastin과 calcium을 첨가하여 fibrin이 검출될 때까지의 시간을 측정하는 것으로, 이 반응은 II, V, VII, X 인자와 fibrinogen이 관여하므로 외인성 및 공통성의 응고과정의 이상을 검출하는 방법으로 prothrombin 활성만을 측정하는 것은 아니며, 전반적인 응고기능을 검토하기 위한 검사이다³⁵⁾. APTT의 검사 목적은 PT와 마찬가지로 지혈기구의 이상이 어디에 있는가를 조사하는 검사로 이 검사에서 이상치를 보이는 것은 내인계 응고장애가 있음을 의미하는 것이다³⁵⁾. 본 실험에서 PT는 희침산 투여군은 유의성($p < 0.001$)인 단축효과를 보였고 (Table 8), APTT는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성 있는 감소 효과를 나타내지는 않았다(Table 9).

또한 fibrinogen 양에 대한 효과에서는 희침산 투여군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.01$)인 증가 효과를 나타내었다(Table 10).

혈전증 유발에 따른 혈류 속도 측정은 in vivo test에서 정상군보다 유의성($p < 0.05$)인 속도 감소가 있었으나, in vitro test에서는 대조군에 비해서 약간의 혈류속도의 감소를 나타냈지만 유의성 있는 효과는 보이지 않았다(Table 15). 이는 豨薺散이 다양한 기전이 이루어지는 생체에서 보다 효과적인 것으로 사료된다.

따라서 豨薺散은 혈소판 생성기전 및 혈액점도에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 그 기전에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

結 論

豨薺散이 혈전에 미치는 효과를 검증하기 위하여 SD rat 및 ICR계 mouse에 실험한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 豨薺散은 ADP 및 epinephrine에 의한 혈소판 응집반응에 대해서 유의성 있는 억제효과가 있었다.
2. 豨薺散은 폐색전 유발 실험에서 14.28%의 사망 억제 효과가 있었다.
3. 豨薺散은 혈전용해정도를 알기 위해 실시한

fibrinolytic activity 측정 결과, urokinase처럼 유의성 있는 혈전용해 효과는 없었다.

4. 豨薺散은 dextran으로 유발된 혈전실험에서 유의성 있는 혈소판수 감소억제 효과가 있었으며, PT는 유의성 있는 단축 효과를 보였으나, APTT에서는 연장되었으나 유의성은 없었다.

5. 豨薺散은 혈전 유발에 따른 혈류속도 측정에서 in vivo 실험에서 유의성 있는 혈류속도 증가가 나타났으며, in vitro 실험에서는 유의성이 없었다.

이상의 결과로 보아 豨薺散은 항혈전효과는 우수한 효과가 있으므로 항혈전작용이 요구되는 급성기 뇌경색과 심근경색 등의 질환에 응용가치가 높을 것으로 보이며 그 작용기전에 대한 보충연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학 II. 서울:고문사. 1995:112-29.
2. 李善敬. 最新病理學概論. 서울:靑丘文化社. 1992:31-3.
3. 이종달. 그림으로 설명한 병리학. 서울:고려의학. 1990:127-34.
4. 金昌鍾. 病態生理學. 서울:癸丑文化社. 1988:132-5.
5. 해리슨 번역 편찬위원회 역. HARRISON'S 내과학. 서울:도서출판경당. 1997:2409.
6. 郭隆璘. 圖解腦神經外科學. 서울:第一醫學社. 1992:394-7.
7. 統計廳. 死亡原因統計年譜. 大田:統計廳. 2000:16-7.
8. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 東醫心系內科學. 서울:書苑堂. 1995:(上)203, 438-62, (下)72-3.
9. 馬元臺 외. 黃帝內經素問靈樞合編. 臺北:臺聯國風出版社. 1972:(素問)20, 31, 66, 198, 204, 218, 286, 291, 294, 408, 412, 422, 629, (靈樞)180, 199, 306, 388, 405, 435, 445, 468.
10. 劉完素. 劉河間三六書. 서울:成輔社. 1976:281-2, 323.
11. 李 杲. 東垣十種醫書. 서울:大星文化社. 1992:158.
12. 方 廣. 丹溪心法附錄. 서울:大星文化社. 1981:67-8.
13. 唐容川. 血證論. 台北:力行書局有限公司. 1973:115-20.
14. 王清任. 醫林改錯. 서울:一中社. 1992:54-61.
15. Kimura Y, Tani T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Arzneimittel forschung:Drug Res. 1985;35(7A): 1144-9.

(30) 대한한의학회지 제25권 제1호(2004년 3월)

16. 성호경 외. 생리학. 서울:의학문화사. 2001:120-4.
17. 권현영 외. 혈액학. 서울:고려의학. 1993:209-25.
18. 이원석 외. Antithrombotic effect of freeze-dried extract from *Lumbricus rubellus*. 서울:Kor. J. Pharmacol. 1995:31.
19. Kurt J. Isselbacher. HARRISON'S Principles of Internal Medicine (13th edition). 서울:정담. 1997:156, 341-7, 1914, 2409, 2452.
20. 大韓神經外科學會. 神經外科學. 서울:中央出版社. 1998:275.
21. 서울대학교의과대학. 신경학. 서울:서울대학교출판부. 1995:295, 179-87, 301-3.
22. 黃星垣 외. 中醫急症大成. 北京:中醫古籍出版社. 1987:312-25.
23. 陳輝 외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993:242-3, 791-7.
24. 醫學教育研修院. 家庭醫學. 서울:서울대학교출판부. 1993:294-99.
25. 徐舜圭. 成人病·老人病學. 서울:고려의학. 1992:107-22, 186, 189-93, 196-210.
26. 鄭紹周 외. 中風急症. 天津:天津科技翻譯出版公私. 1994:1-8, 163-5, 174-6.
27. 홍사석. 이우주의 약리학 강의. 서울:선일문화사. 1990:378-9, 397, 401.
28. 薛仁燦. 補陽還五湯이 高血脂症, 血栓, 高粘度血症, 高血壓 및 腦損傷에 미치는 影響. 韓方成人病學會誌. 1998;4(1):133-62.
29. 金聖勳 외. 東醫病理學. 大田:한림원. 1994:333.
30. 全國韓醫科大學 韓方病理學教室. 東醫病理學. 서울:一中社. 1999:137-8, 505-7.
31. 張伯臾 외. 中醫內科學. 北京:人民衛生出版社. 1988:451-69.
32. 裴秉哲, 郭東烈. 實用中風治療學. 서울:成輔社. 1997:24-8, 42-3.
33. 金允植. 滌痰湯과 加味滌痰湯이 腦損傷 및 血栓에 미치는 影響. 大田大學校 大學院. 2000.
34. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울:永林社. 1997:124-5, 149-50, 178-9, 242-4, 276-7, 302-4, 350-1, 369-70, 445-6, 450-1, 491-2, 513-4, 531-2, 540-1, 581-3.
35. 이귀녕, 이종순. 임상병리파일. 서울:의학문화사. 1996:753, 1273, 138-9, 735-6, 764-9, 785-7, 858-62, 1263-64.
36. 李儀奎 主編. 中藥藥理實驗方法學(初版). 上海:上海科學技術出版. 1991:89, 141-2.
37. 陳可冀 主編. 活血化癥研究與臨床. 北京:北京醫科大學中國協和醫科聯合出版社. 1991:3-28, 169-239.
38. 陳小野 主編. 實用中醫症候動物模型學. 北京:北京醫科大學中國協和醫科聯合出版社. 1993:204-7.