

紅花當歸散의 抗血栓 效果에 對한 實驗的 研究

대전대학교 한의과대학 부인과학교실
류동훈, 신용완, 김의일, 김수민, 이정은, 유동열

ABSTRACT

The Experimental Study on Antithrombotic Effect of *Honghwadangguisan*

Ryou Dong-Hoon, Shin Yong-wan, Kim Eui-il,

Kim Su-min, Lee Jung-eun, Yoo Dong-youl

Dept. of Ob & Gyn, College of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

Purpose : The Purpose of this research was to investigate the effects of antithrombotic activities of *Honghwadangguisan*(HDS)

Methods : Measured the effect which was given to blood flow rate through the regular volume of glass tube after the blood was diluted five times with ACD solution. Antithrombotic effect was calculated as a percentage of the experimental animal figure protected from the paralysis of hind legs or death of the mouse that is caused from the administration of platelet aggregation reagent.

Each of the groups consisted in 8 mice, was divided into Normal, Control, and HDS. All of these 3 group were supplied a saline solution and after an hour the control group brought the dextran extravasated blood. Also the HDS group was dosed to the experimental mice with Oral Zonde one day before the experiment. After that, the mice were abstained from food. And then we gave a measured amount of it before an hour. Finally, it gave rise to dextran extravasated blood as well as the Control group.

Results : The results were obtained as follows. In vitro, HDS inhibited platelet aggregation induced by ADP and epinephrine significantly as compared with the control group. HDS showed fibrinolytic activity insignificantly as compared with the control group. HDS reduced blood flow rate in significantly as compared with the control group. In vivo HDS inhibited pulmonary embolism induced by collagen and epinephrine (inhibitive rate 50%). HDS increased number of platelet, fibrinogen amount and shortened prothrombin time, activated partial thromboplastin time significantly but reduced blood flow rate insignificantly as compared with the control group in thrombus model induced by dextran.

Conclusion : HDS is effective antithrombotic activity from experimental result.

Key words : *Honghwadangguisan*(HDS), antithrombus, extravasated blood.

I. 緒論

紅花當歸散은 《婦人大全良方》¹⁾에 수록되었으며, '治經候不行 腰膀重痛 小復堅硬'이라 하여 血瘀로 인한 經候不行을 治療할 목적으로 立方되었다.

經候不行은 經閉²⁾, 無月經³⁾, 月水不通⁴⁾이라고도 하며, 月經閉止의 뜻으로 閉經期에 達하기 전에 어떠한 原因으로 月經이 閉止되는 病的常況을 의미하는데²⁾ 그 病因病機는 복잡 다양하지만 대체적으로 虛證과 實證으로 大별한다. 虛證은 肝腎不足, 氣血虛弱, 陰虛血燥 등으로, 實證은 氣滯血瘀, 痰濕阻滯 등으로 세분할 수 있으며, 治療는 월경의 회복 및 배란주기의 확립을 통해 受胎力을 보존하는 것을 목표로 하는 바 補腎養肝, 補氣養血, 滋陰益精, 活血化瘀, 豁痰除濕의 治法이 활용되고 있다³⁾.

瘀血이란 生理的 機能을 喪失한 血液이 凝聚하여 形成된 一種의 病理的 產物인 同時에 致病因子가 되는 것으로 血液運行 循環 障礙와 血液 速度 減少의 病理 狀態를 包括한다^{5,6)}.

最近에는 瘀血에 관한 다양한 연구가 시도되어 循環障礙로 일어나는 訣血, 鬱血, 血栓形成 및 水腫 등과 代謝障礙로 일어나는 조직의 병리반응 및 細胞分化不良과 炎症으로 인한 조직의 滲出, 變成, 壞死, 萎縮 혹은 增殖 등이 瘀血의 病態와 유사하다고 보고 있으며, 瘀血이란 용어도 물질적인 血液의 성질보다는 機能的인 면의 營血 개념에서 血瘀라는 용어가 사용되기도 한다⁷⁻¹⁰⁾.

瘀血에 대한 실험적 연구로 少腹逐瘀湯¹¹⁾, 活絡丹¹²⁾, 身痛逐瘀湯¹³⁾, 和血通經散¹⁴⁾, 芎歸湯加味方¹⁵⁾, 四物湯¹⁶⁾, 坐宮丹¹⁷⁾, 加味生

化湯¹⁸⁾, 加味通經湯¹⁹⁾ 등이 抗血栓 효과가 있다고 보고된 바 있으나, 紅花當歸散에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者는 活血祛瘀의 效능이 있는 紅花當歸散의 抗血栓 效能을 究明하고자 in vitro에서 혈소판 응집, fibrinolytic activity, 그리고 혈전유발에 따른 혈류속도를 측정하였고, in vivo에서 폐색전(pulmonary embolism)유발 및 dextran에 의한 혈전증유발 후 혈소판수, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time (APTT), 그리고 fibrinogen 양을 측정하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

本 實驗에 使用된 쥐는 體重 180-250g의 SD(Sprague-Dawley)係 雄性 白鼠(大韓實驗動物센터, 충청북도 음성)와, 18-20g의 ICR(International Cancer Research)係 생쥐(대한실험동물센터, 충청북도 음성)로, 實驗 當日까지 固形 飼料(조단백질 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 供給하고, 室溫 22±2°C, 相對 濕度 50±10%, 照明 時間 12時間(07:00-19:00), 照度 150-300 Lux로 設定하여 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 體重 變化가 一定하고 健康한 動物만을 選別하여 實驗에 使用하였다.

2) 藥物

本 實驗에 使用한 紅花當歸散¹⁾에 使用된 藥材는 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入, 精選하였고, 한 첩의 內容과 用量(本 處方의 1/20)은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of *Honghwadangguisan* (HDS, 紅花當歸散)

韓藥名	生藥名	重量 (g)
紅花	<i>Carthami Flos</i>	4
當歸尾	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
紫葳	<i>Flos Campsis</i>	4
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	4
甘草(炙)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
蘇木	<i>Sappan Lignum</i>	4
桂心	<i>Cinnamomum Loureirii Nees</i>	3
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	18
白芷	<i>Angelicae dahuricae Radix</i>	3
劉寄奴	<i>Artemisiae Anomalaе Herba</i>	10
Total		58

3) 試藥 및 機器

實驗에 使用한 試藥은 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A; Sigma Co., USA.), normal saline(중외제약, Korea), Hank's balanced salt solution(HBSS: Sigma Co., USA), collagen(Sigma Co., USA.) ephineprine(Sigma Co., USA.), dextran(Sigma Co., USA), 3.8% sodium citrate(Sigma Co., USA), ADP reagent(Chrono-Log Corp., USA), collagen reagent(Chrono-Log Corp., USA), thrombin reagent(Chrono-Log Corp., USA), IL Test™ PT-Fibrinogen HS(Instrumentation Laboratory, USA.), IL Test™ APTT Lyophilized silica(Instrumentation Laboratory, USA.), fibrinogen(Sigma Co., USA.), acid citrate dextrous(ACD: Sigma Co., USA), heparin(Sigma Co., USA.), urokinase(Sigma Co., USA.), aspirin을 使用하였다.

機器는 serum separator(녹십자, Korea), minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., USA.), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Switzerland), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave(Hirayama, Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Corp., USA.), roller Mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), vortex(Vision Co., Korea), camera(Nikon, Japan), ACL-100

(Instrumentation Laboratory, USA.), platelet aggregation profiler (model PAP-4, BIO/DATA Co., USA), silicon-treated cuvette (BIO/DATA Co. USA)등을 使用하였다.

2. 方法

1) 檢液의 造製

紅花當歸散(HDS) 2貼을 3,000 ml round flask에 넣고 蒸溜水 2,000ml을 넣은 後, 3時間 加熱 抽出하고, 沈澱物을 3回 濾過(3M filter paper)하고, 이 濾過液을 rotary vaccum evaporator에서 減壓 濃縮하였다. Round flask에 濃縮된 溶液을 -70℃ deep freezer에서 4時間 동안 放置하고, 24時間 동안 freeze dryer로 凍結 乾燥하여 1貼당 3.94g의 粉末을 얻어서 實驗에 必要한 濃度로 生理食鹽水에 稀釋하여 使用하였다.

2) 血小板 凝集(Platelet aggregation) 測定²⁰⁻²³⁾

12時間 以上 空腹을 維持한 成人男子의 上膊 靜脈으로부터 採血한 血液을 3.8% 구연산나트륨이 들어있는 一回用 試驗管에 血液과 1:9의 比率로 넣고 遠心 分離 (900rpm 10분)하여 上等液으로 부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻고 잔액을 다시 遠心 分離 (3,000rpm 10분)하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. PRP는 採取 即時 變化를 막고 얼음이 들어있는 용기에 放置하였다.

藥物의 抗血小板 凝集 效果는 platelet aggregation profiler (model PAP-4, BIO/DATA Co., USA)를 使用하였으며, 最終 濃度는 Adenosine diphosphate (ADP) 6μM와 epinephrine 5μM이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37℃에

서 배양시킨 PRP 320 μ l와 實驗群을 40 μ l를 넣고 다시 incubation한 후 ADP 40 μ l를 加하여 5分間 反應시켰다.

實驗群은 蒸溜水에 溶解시키고 稀釋하여 使用하였으며 最終 濃도가 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3mg/ml이 되도록 PRP에 加하고 凝集 誘導劑를 넣기 전까지 37°C에서 3分間 배양하였다. 實驗의 처음과 마지막에는 PRP에 용적을 맞추기 위해 生理食鹽水 40 μ l을 가한 뒤 最大凝集 %를 測定하여 採血 後 時間 經過로 인한 血小板 變質로 나타날 수 있는 實驗 誤差를 防止하였으며, PRP를 얻은 後 2時間 안에 모든 實驗을 進行시켰다. 實驗 造作 동안 溫度는 37°C로 維持하고 교반 速度는 500-1,500rpm으로 하며 528nm에서 凝集 度를 測定하였다.

藥物에 의해 凝集이 抑制되는 程度를 다음 式에 依據하여 transmission maximum reduction percent를 算出하였다.

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

A = control(vehicle)의 maximum aggregation %

B = 對照群의 maximum aggregation %

各各의 濃度에서의 aggregation(%)은 mean \pm S.D.으로 나타내었고 試驗藥物의 統計的인 有意性은 Student t-test를 통해 檢定하였다.

3) Fibrinolytic activity 測定²⁴⁾

最終 0.7%가 되도록 섬유소원(plasminogen-containing)을 0.05M babital buffer, pH 7.8에 녹인 뒤 5ml의 溶液을 0.1ml의 thrombin(100 NIH/ml)에 넣어 數 秒 內에 petri dish (85 \times 15mm)에서 混合하였다. 이것을 37°C에서 30分間 放置하여 fibrin plate가 形成됨을

確認하고 形成된 fibrin plate 上에 disk를 利用하여 陽性對照群 urokinase 0.1ml (100IU/ml)를 點滴하고 試料를 濃度別로 點滴한 다음 37°C 배양 기기에 24時間 동안 放置하여 溶解되는 whole well의 크기를 測定하여 對照群과 實驗群을 比較하였다.

4) 血流速度 測定

(1) in vitro

heparin(1,000 units/ml) 處理한 주사기를 利用하여 一般 正常쥐의 心臟 穿刺를 통해 採血하였다. 血液을 ACD溶液으로 5倍 稀釋한 다음 一定한 크기의 유리관을 通過하게 하여 血流 速度에 미치는 影響을 測定하였다. 血液에 dextran만을 넣은 對照群과 藥物을 處理한 實驗群으로 實驗하였고, 使用한 稀釋 血液은 37°C가 維持되도록 하였으며, 試料를 넣고 5分間 pre-incubation 시킨 後 上記 方法으로 血流 速度를 測定하였다.

(2) in vivo

試料를 10日間 SD에 經口 投與하고 dextran으로 瘀血病態를 誘發한 다음 heparin(1,000 units/ml)을 處理한 주사기를 利用하여 採血하였다.

採血한 血液을 ACD溶液으로 5倍 稀釋한 다음 一定한 크기의 유리관을 通過하게 하여 血流 速度를 測定하였다.

5) 肺塞栓(Pulmonary thrombosis) 誘發 實驗

實驗的 血栓의 誘導는 Kimura의 實驗 方法²⁵⁾에 準하여 實施하였다. 實驗 動物은 몸무게 약 18-20g 정도의 수컷 ICR계 mouse를 使用하였고, HDS는 20g ICR 생쥐를 基準으로 檢液 2.58mg/20g/day을 生理食鹽水 0.2ml에 溶解시켜 oral zonde를 利用하여 2回 經口 投與하였다. 血栓의

誘發은 血小板凝集試藥(11.3 μ g의 collagen과 1.32 μ g의 epinephrine)을 HBSS 200 μ l에 함유되도록 造製하였고, ICR계 mouse의 몸무게 20g당 200 μ l의 用量으로 尾靜脈에 注射하였다.

實驗動物에게 實驗 하루 前에 1回 經口投與하고, 以後 24時間 絶食시킨 後, 血小板凝集誘發試藥의 靜脈注射 2時間 前에 上記한 濃度の HDS를 ICR계 mouse에 經口投與하였으며, 陽性對照群으로는 aspirin 100mg/kg을 經口投與하였다.

抗血栓效果는 血小板凝集試藥의 投與로 因하여 發生하는 mouse 뒷다리의 痲痺나 죽음으로부터 保護된 實驗動物 숫자의 百分率로 計算하였으며, 여기서 痲痺는 20分 以上 뒷다리의 機能을 喪失하거나 떨림 狀態가 持續될 때를 基準으로 하였다.

6) Dextran 瘀血病態에 對한 實驗²⁶⁾

(1) Dextran 瘀血病態誘發 및 藥物投與
白鼠 8마리를 1群으로 하여 正常群(Normal), 對照群(Control) 및 實驗群(HDS)으로 各各 나누었다. 正常群은 生理食鹽水を 供給하고, 對照群은 生理食鹽水を 投與한 지 1時間 後에 dextran 瘀血病態를 誘發하였으며, HDS 投與群은 26mg/200g/day을 生理食鹽水 2ml에 溶解하여 oral zonde로 實驗 하루 前에 1回 經口投與하고, 이 後 絶食시킨 後 實驗하기 1時間 前에 다시 1回 經口投與한 後 對照群과 同一한 方法으로 dextran 瘀血病態를 誘發하였다.

Dextran 瘀血病態誘發 : Dextran(분자량 21만)을 生理食鹽水에 넣고 加熱하면서 完全히 溶解시켜 10% 濃度の 溶液을 만들어 1.1 ml/200g(rat)씩 白鼠의 尾靜脈에 3分 以內에 全量 注射하고, 4時間 經過 後 心臟 穿刺로 採血하여 各種 檢査를 實施하였다.

正常群 및 對照群은 實驗 藥物 대신 生理食鹽水を 投與하여 實驗群과 同一한 時刻에 各種 指標를 檢査하였다.

(2) 血小板數 測定

血小板數 測定은 自動血球計算機, minos-st를 使用하여 測定하였다,

(3) Prothrombin time(PT) 測定²⁷⁾

PT는 simplastin kit(General Diagnostics, USA)를 使用하여 ACL-100으로 測定하였다.

(4) Activated partial thromboplastin time(APTT) 測定

APTT는 simplastin kit를 使用하여 ACL-100으로 測定하였다.

(5) Fibrinogen 量 測定

Fibrinogen 量은 simplastin kit를 使用하여 ACL-100으로 測定하였다.

7) 統計處理

實驗 結果는 unpaired student's T-test를 使用하여 統計 處理하였으며 P<0.05 또는 P<0.01 수준에서 有意性을 檢定하였다.

III. 成績

■ In vitro

1. 血小板凝集(Platelet Aggregation) 抑制效果

1) ADP에 의한 血小板凝集 抑制效果

HDS을 濃度別 30mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml로 ADP(6 μ M)에 의해서 誘導된 血小板凝集反應을 實驗하여, 最大凝集率은 82.4%로 나타난 反面, HDS 30mg/ml 濃度에서의 凝集率(%)은 15.04%, 20mg/ml 濃度에서는 43.93%, 10mg/ml 濃度에서는 64.44%, 5mg/ml 濃度에서는 87.62%, 2.5mg/ml 濃度에서는 100%, 1.25mg/ml 濃度에서는 100%의 凝集率(%)을 나타낸다.

2) Epinephrine에 의한 血小板 凝集 抑制 效果

Epinephrine에 의해서 誘導된 血小板 凝集에 대한 沮害 效果에서는 對照群의 最大 凝集率이 92.2%로 나타난 반면, HDS 30mg/ml 濃度에서의 凝集率(%)은 3.79%, 20mg/ml 濃度에서는 26.03%, 10mg/ml 濃度에서는 54.01%, 5mg/ml 濃度에서는 57.48%, 2.5mg/ml 濃度에서는 61.82%, 1.25mg/ml 濃度에서는 71.36%의 凝集率(%)을 나타낸다.

3) ADP와 epinephrine에 대한 E_{max} , EC_{50} 및 γ 값

各 濃度에 對한 inhibition %는 computer program WinNonlin을 利用하여 E_{max} model에 適用하여 fitting하였다. Fitted된 그래프로부터 算出된 E_{max} , EC_{50} 및 γ 의 pharmaco-dynamic parameter는 (Table 2)에 定理하였는데, 凝集 誘導體로 ADP를 使用한 경우 E_{max} 는 236.82%로 나타났고, EC_{50} 은 66.26 μ g/ml 로 나타났

다. Epinephrine의 경우는 E_{max} 가 91.04%, EC_{50} 은 5.72g/ml으로 나타나, E_{max} model에서는 epinephrine의 값이 sigmoidicity가 크게 나타났다(Table 2).

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by E_{max} Model in WinNolin Program

Inducer	parameter	
	E_{max} (%)	EC_{50} (μ g/ml)
ADP	236.82	66.26
Epinephrine	91.04	5.72

2. Fibrinolytic activity에 미치는 效果

Fibrin plate 上에 disk를 利用하여 陽性對照群인 urokinase를 0.1ml(100IU/ml)를 點適하고, 試料를 濃度別로 點適한 다음 37 $^{\circ}$ C incubater 機器에 24時間 동안 放置하여 溶解되는 whole well의 크기를 測定한 結果 HDS 投與群에서 溶解되는 whole well이 보이기는 하나 效果 있는 結果를 나타내지는 않았다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Effect of HDS on the Fibrinolytic Activity by Fibrin Plate

Group	Concentration	Fibrinolysis size per Dilutions(cm)
Sam A	10IU/disk	4.8
Sam B	10mg/disk	-
Sam C	2.5mg/disk	-

Sam A ; Urokinase: 10IU/disk treated group.

Sam B ; 10mg/disk HDS treated group.

Sam C ; 5mg/disk HDS treated group.

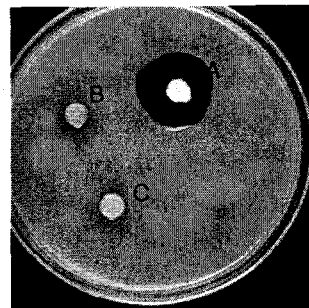


Fig. 1. Effect of HDS on the fibrinolytic activity by fibrin plate.

3. 血栓 誘發에 따른 血流速度에 미치는 效果

正常群의 血液에 직접 藥物을 投與시켜 vitro 實驗으로 血流速度를 測定한 結果 正常群은 20.07 \pm 1.47(sec), 對照群

은 27.5 \pm 2.05(sec), HDS 投與群은 25.4 \pm 2.25(sec)로 나타나 對照群에 비해 혈류속도 減少效果를 나타내었으나 유의성은 없었다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Effect of HDS on Blood Flow Rate in Vitro

Sample	Flow Rate(sec)
Normal	20.07±1.47
Control	27.5±2.05+
HDS	25.4±2.25

a) : Mean ± Standard Error

Normal : Normal blood.

Control : Normal blood on 10% dextran.

HDS : Normal blood on 10% dextran with 10mg /10ml of HDS extract.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+: P<0.05)

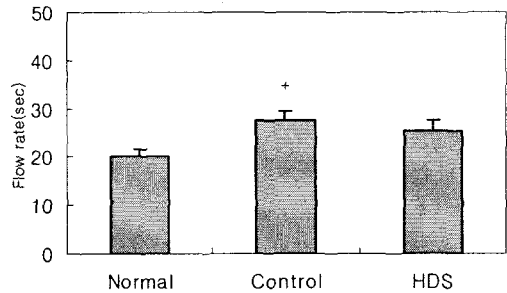


Fig. 2. Enhancement of blood flow rate by administration in vitro.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+: P<0.05).

■ In vivo

1. 肺塞栓(Pulmonary embolism)에 對한 效果

Collagen과 epinephrine에 의해 誘導된 肺塞栓 實驗에서 對照群은 8마리 中 8마리가 죽거나 30分間 以上 痲痺가 持續이 되었는데, 陽性對照群인 aspirin 投

與群은 8마리 中 2마리만이 죽거나 15分 以上 痲痺가 持續이 되었다. 이에 反하여 HDS 投與群은 8마리 中 4마리가 죽거나 15分 以上 痲痺가 持續되어 50%의 抑制效果를 나타내었다(Table 5, Fig. 3).

Table 5. Effect of HDS on Pulmonary Embolism Mice

Dose (mg/20g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control HBSS	8/8	0
Aspirin 2	2/8	75
HDS 2.58	4/8	50

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

Control : 11.3µg collagen and 1.32µg epinephrine/200µl/20g treated group.

Aspirin : 11.3µg collagen and 1.32µg epinephrine /200µl/20g treated group after oral administration of 50mg/kg of aspirin.

HDS : 11.3µg collagen and 1.32µg epinephrine/200µl/20g treated group after oral administration of 2.58mg/20g of HDS extract.

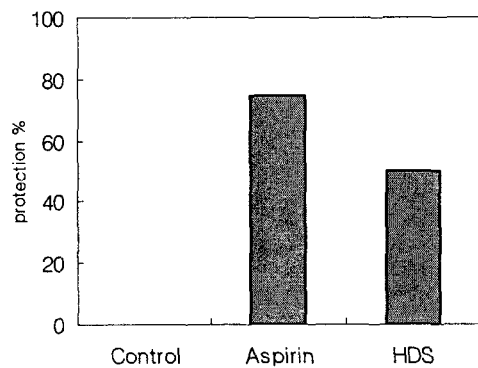


Fig. 3. Effect of HDS on Pulmonary Embolism Mice

2. Dextran 瘀血 病態에 미치는 效果

1) 血小板數에 미치는 效果

血小板數는 正常群이 $889 \pm 18.8 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 인데 비하여, 對照群은 $686 \pm 5.67 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$, HDS 投

與群은 $725.3 \pm 4.21 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 로 對照群에 비하여 有意性 ($P < 0.001$) 있게 증가하였다 (Table 6, Fig. 4).

Table 6. Effect of HDS on Platelet in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Platelet ($\times 10^3 / \text{mm}^3$)
Normal	8	889 ± 18.8
Control	8	$686 \pm 5.67^{+++}$
HDS	8	$725.3 \pm 4.21^{***}$

a) : Mean \pm Standard Error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : $1.1 \text{ml} / 200 \text{g}$ dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

HDS : $1.1 \text{ml} / 200 \text{g}$ dextran i.v. injected group after oral administration of $25.8 \text{mg} / 200 \text{g}$ of HDS extract.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+++ : $P < 0.001$)

* : Statistically significant value compared with control data (*** : $P < 0.001$)

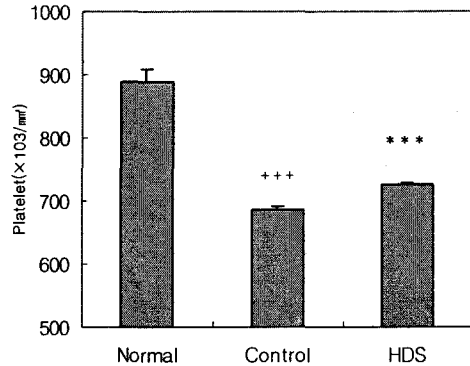


Fig. 4. Effect of HDS on platelet in dextran treated rat.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+++ : $P < 0.001$)

* : Statistically significant value compared with control data (*** : $P < 0.001$)

2) Prothrombin time에 미치는 效果

Prothrombin time은 正常群이 $17.26 \pm 0.43 (\text{sec})$ 인데 비하여, 對照群은

$30.55 \pm 8.14 (\text{sec})$, HDS 投與群은 $16.95 \pm 0.56 (\text{sec})$ 로 對照群에 비하여 有意性 ($P < 0.05$) 있는 短縮 效果를 보였다 (Table 7, Fig. 5).

Table 7. Effect of HDS on Prothrombin Time in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Prothrombin time (sec)
Normal	8	17.26 ± 0.43
Control	8	$30.55 \pm 8.14^+$
HDS	8	$16.95 \pm 0.56^*$

a) : Mean \pm Standard Error

Normal : oral administration of normal saline.

Control : $1.1 \text{ml} / 200 \text{g}$ dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.

HDS : $1.1 \text{ml} / 200 \text{g}$ dextran i.v. injected group after oral administration of $25.8 \text{mg} / 200 \text{g}$ of HDS extract.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+: $P < 0.05$)

* : Statistically significant value compared with control data (* : $P < 0.05$)

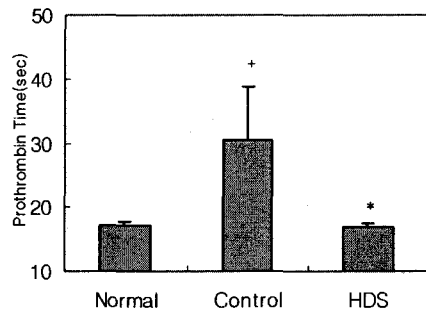


Fig. 5. Effect of HDS on prothrombin time in dextran treated rat.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+: $P < 0.05$)

* : Statistically significant value compared with control data (* : $P < 0.05$)

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

APTT는 正常群이 44.0±1.35(sec)인데 비하여 對照群은 67.8±2.02(sec), HDS

投與群은 39.52±2.73(sec)로 나타나 對照群에 比하여 有意性(P<0.001) 있는 단축 效果를 나타내었다(Table 8, Fig. 6).

Table 8. Effect of HDS on Activated Partial Thromboplastin Time in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	APTT(sec)
Normal	8	44.0±1.35
Control	8	67.8±2.02+++
HDS	8	39.52±2.73***

a) : Mean ± Standard Error

Normal : oral administration of normal saline.

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

HDS : 1.1ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 25.8mg/200g of HDS extract.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+++ : P<0.001)

* : Statistically significant value compared with control data (*** : P<0.001)

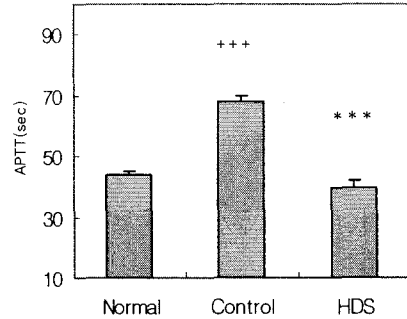


Fig. 6. Effect of HDS on activated partial thromboplastin time in dextran treated rat.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+++ : P<0.001)

* : Statistically significant value compared with control data (*** : P<0.001)

4) Fibrinogen 量에 미치는 影向

Fibrinogen 量은 正常群이 263.3±10.58(mg/dl)인데 비하여, 對照群은 181.5±11.5(mg/dl), HDS 投與群은

231.0±7.66(mg/dl)으로 對照群에 比하여 有意性(P<0.01)있는 增加效果를 나타내었다(Table 9, Fig. 7).

Table 9. Effect of HDS on Fibrinogen in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	APTT(sec)
Normal	8	263.3±10.58
Control	8	181.5±11.5+++
HDS	8	231.0±7.66**

a) : Mean ± Standard Error

Normal : oral administration of normal saline.

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

HDS : 1.1ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 25.8mg/200g of HDS extract.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+++ : P<0.001)

* : Statistically significant value compared with control data (** : P<0.01)

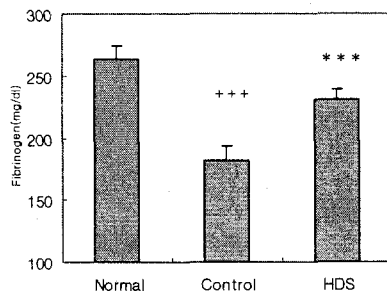


Fig. 7. Effect of HDS on fibrinogen in dextran treated rat.

+ : Statistically significant value compared with normal data (+++ : P<0.001)

* : Statistically significant value compared with control data (** : P<0.01)

3. 瘀血誘發에 따른 血流速度에 미치는 영향
 正常群은 21.07±2.48(sec), 對照群은 26.26±2.81(sec), HDS 投與群은

25.16±4.56(sec)로 나타나 對照群에 比하여 血流 速度의 減少는 보였으나 有意性 있는 結果는 나타나지 않았다(Table 10, Fig. 8).

Table 10. Enhancement of Blood Flow Rate by Administration in Vivo

Sample	Flow Rate(sec)
Normal	21.07±2.48
Control	26.26±2.81
HDS	25.16±4.56

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 HDS : 1.1ml/200g dextran i.v. injected group after oral administration of 25.8mg/200g of HDS extract.

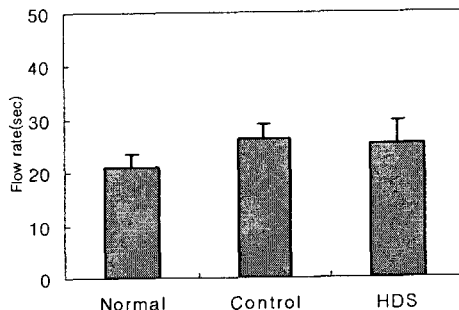


Fig. 8. Enhancement of blood flow rate by administration in vivo.

IV. 考 察

紅花當歸散은 《婦人大全良方》¹⁾에 수록되었으며, ‘治經候不行 腰膀重痛 小復堅硬’이라 하여 血瘀로 인한 經候不行을 治療할 목적으로 立方되었는데, 宋²⁾은 獨身女性の 經閉에 응용하였다.

瘀血이란 生理的 機能을 喪失한 血液이 凝聚하여 形成된 一種의 病理的 産物인 同時에 致病因子가 되는 것으로 血液 運行 循環 障礙와 血液 速度 減少의 病理 狀態를 包括한다^{5,6)}. 韓醫學에서는 《黃帝內經》에서 “惡血” “死血” “留血” 등의 名稱으로 表現되다가 《金匱要略·驚悸吐衄下血胸滿瘀血病》에서 瘀血의 名稱이 最初로 사용되었다⁶⁾.

瘀血의 病因 및 病機에 대하여 張²⁸⁾은 瘀熱在裏를, 巢²⁹⁾는 寒熱과 正氣少를, 孫^{30,31)} 등은 從高墮下 落馬折傷 등을, 朱³²⁾는 鬱證의 範疇에서 血鬱을 주로 言及하

였고, 李³³⁾는 發汗利小便이 不當한데 發汗利小便하여 亡津液으로 인해 蓄血이 된다고 보았으며, 王³⁴⁾은 飲食起居를 失宜하면 血이 瘀滯不行한다고 보고 汚血을 強調하였다. 張³⁵⁾은 氣가 舒暢하지 못하거나 氣虛하여 瘀血이 形成된다고 하였고, 葉³⁶⁾은 氣滯와 陽衰를, 王³⁷⁾은 氣虛 血瘀說을 主張하였으며, 唐³⁸⁾은 各種出血의 證治에서 瘀血과 出血의 關係를 重要視하고 瘀血로 인한 各種疾患을 敘述하였다. 顏³⁹⁾은 瘀血을 血管內瘀血, 血管外瘀血 및 血液成分異常등으로 分類하여 그 範圍를 擴大하였으며, 俞⁴⁰⁾는 血液因素, 血管因素 및 心臟因素 등의 現代的 觀點의 病因을 述하였다. 最近에는 歷代 醫家들의 瘀血에 대한 病理觀을 綜合하여 瘀血은 汚穢不潔한 血液 및 離經之血이 體內에 停留하였거나 血行이 不暢한 것 또는 久病이 脈絡에 影響을 미쳐서 出現하는 모든 病變으로 보고 있으며^{41,42,43)}, 血熱血瘀, 血寒血瘀, 氣滯血瘀, 濕

滯血瘀, 氣虛血瘀 및 陰虛血瘀 등으로 分類하고 있다.⁴⁴⁾

瘀血의 症狀은 固定性刺痛, 腫塊, 出血, 肌膚甲錯, 日輕夜重, 小腹硬滿, 胸脇滿痛, 舌紫暗或瘀斑, 脈細澀或結代 등의 多様な 症狀이 나타나는데⁴⁵⁻⁴⁹⁾, 韓醫學에서의 瘀血은 西洋醫學에서의 血液循環障導로 인한 缺血, 鬱血, 出血, 血栓 및 水腫 등과 炎症으로 인한 組織의 滲出, 變性, 壞死, 萎縮 或 增殖 등과 代謝障導로 인한 組織의 變化 및 組織의 無制限의인 增生이나 細胞分化不良 등을 包括하고 있으며⁵⁰⁾, 이러한 瘀血性 疾患의 治療에는 行氣逐瘀, 通經逐瘀, 清熱逐瘀, 散寒逐瘀, 軟堅逐瘀, 攻下逐瘀, 利水逐瘀, 扶正逐瘀, 溫經化瘀, 理氣化瘀, 祛風化瘀, 滋陰化瘀 등의 方法이 活用되고 있다^{39,42,45,50)}.

臨床의으로 常用되는 處方으로는 桃紅四物湯, 膈下逐瘀湯, 小腹逐瘀湯, 通竅活血湯 등이 있고, 藥物로는 當歸尾, 赤芍藥, 川芎, 丹蔘, 桃仁, 紅花, 鬱金, 三七根, 玄胡索, 乳香, 沒藥, 三稜, 蓬朮, 澤蘭, 水蛭, 凌霄花(紫葳), 大黃 등이 있다⁵¹⁻⁵³⁾.

血栓症이란 血管이나 心臟內에서 血液成分인 固形塊가 形成되어⁸⁻⁹⁾ 血管腔의 狹窄, 閉塞을 惹起하여 心臟, 腦, 肺, 腎臟, 肝臟 등에 虛血性 疾患이나 硬塞 및 臟器의 機能障導를 招來하는 것¹⁰⁾으로 또한, 止血에 相應하는 病的 狀態로, 閉鎖血管內에서 各種 過敏 反應에 依하여 止血 機轉이 活性化 되고, 이에 依해서 血小板 凝集塊 등의 血栓이 形成됨에 따라 血管內의 圓滑한 血液의 흐름이 妨害를 받는 狀態이다. 그 過程에는 血小板, 血漿, 凝固系, fibrin 溶解系 등의 各種 血液 構成 因子, 血管內皮細胞 및 血液의 活動性 등이 相互 上昇的, 抑制的으

로 매우 複雜하게 關與하는데⁵⁴⁻⁵⁸⁾, 이러한 病理와 性狀으로 因하여 韓醫學에서는 瘀血의 範疇로 認識되고 있다⁵⁹⁾.

紅花當歸散은 活血祛瘀의 效능이 있는 紅花, 當歸尾, 紫葳, 牛膝, 蘇木, 赤芍藥, 劉寄奴, 協助緩和諸藥의 效능이 있는 甘草(炙), 溫經通絡의 效능이 있는 桂心, 通竅發汗의 效과가 있는 白芷로 구성 되어 있다.

이상으로 보아 紅花當歸散은 活血祛瘀의 效능이 있어 血瘀로 인한 經閉를 治療하기에 적합한 방제임을 알 수 있다.

이에 著者는 紅花當歸散의 活血祛瘀하는 效能을 究明하고자 in vitro 에서 血小板 凝集 抑制作用 및 fibrinolytic activity, 그리고 血栓誘發에 따른 血流速度를 測定하였고, in vivo 에서 紅花當歸散을 白鼠와 생쥐에 投與하여 肺塞栓 誘發 實驗과 dextran에 의한 血栓症 誘發後 血小板數, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, 그리고 fibrinogen 量을 測定하였다.

實驗結果, HDS를 濃度別 30mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml로 ADP(6 μ M)에 의해서 誘導된 血小板 凝集 反應을 實驗한 결과, 最大凝集率은 82.4%로 나타난 反面, HDS 30mg/ml 濃度에서의 응집률은 15.04%, 20mg/ml 濃度에서는 43.93%, 10mg/ml 濃度에서는 64.44%, 5mg/ml 濃度에서는 87.62%, 2.5mg/ml 濃度에서는 100%, 1.25mg/ml 濃度에서는 100%의 응집률이 나타났다. Epinephrine에 의해서 誘導된 血小板 凝集에 대한 沮害 效果에서는 對照群의 最大 凝集率이 92.2%로 나타난 반면, HDS 30mg/ml 濃度에서의 응집률은 3.79%, 20mg/ml 濃度에서는 26.03%, 10mg/ml 濃度

에서는 54.01%, 5mg/ml 濃度에서는 57.48%, 2.5mg/ml 濃度에서는 61.82%, 1.25mg/ml 濃度에서는 71.36%의 응집률을 나타냈다. 各 濃度에 對한 억제율은 computer program WinNonlin을 利用하여 E_{max} model에 適用하여 fitting하였다. Fitted된 그래프로부터 算出된 E_{max} , EC_{50} 및 γ 의 pharmaco-dynamic parameter는 (Table 2)에 定理하였는데, 凝集 誘導體로 ADP를 使用한 경우 E_{max} 는 236.82%로 나타났고, EC_{50} 은 66.26 μ g/ml 로 나타났다. Epinephrine의 경우는 E_{max} 가 91.04%, EC_{50} 은 5.72g/ml으로 나타나, E_{max} model에서는 epinephrine의 값이 sigmodicity가 크게 나타났다(Table 2). 즉 HDS는 血小板 凝集 抑制 效果에 有意성이 있는 結果를 보였다.

Fibrin plate 上에 disk를 利用하여 陽性對照群인 urokinase를 0.1ml(100IU/ml)를 點適하고, 試料를 濃度別로 點適한 다음 37 $^{\circ}$ C incubater 機器에 24時間 동안 放置하여 溶解되는 whole well의 크기를 測定한 結果 HDS 投與群에서 溶解되는 whole well이 보이기는 하나 效果 있는 結果를 나타내지는 않았다(Table 3, Fig. 1).

血栓 誘發에 따른 血流速度에 미치는 影響은 正常群의 血液에 직접 藥物을 投與시켜 vitro 實驗으로 血流速度를 測定한 結果 正常群은 20.07 \pm 1.47(sec), 對照群은 27.5 \pm 2.05(sec), HDS 投與群은 25.4 \pm 2.25(sec)로 나타나 對照群에 비해 血流速度 減少 效果를 나타내었다(Table 4, Fig. 2). 瘀血을 誘發시킨 SD에서 血液을 採取하여 血流速度를 測定한 in vivo 실험에서는 正常群은 21.07 \pm 2.48(sec), 對照群은 26.26 \pm 2.81(sec), HDS 投與群은

25.16 \pm 4.56(sec)로 나타나 對照群에 比하여 血流 速度의 減少는 보였으나 有意性 있는 結果는 나타나지 않았다(Table 10, Fig. 8).

Collagen은 膠原質로 硬蛋白質의 하나이며, 骨, 軟骨, 靱帶, 眞皮 等に 存在한다. 물이나 묽은 산, 묽은 알칼리 溶液에 長其間 끓이면 水溶性 gelatin이 된다. Epinephrine은 副腎髓質에서 分泌되는 hormone의 한가지로 生理的으로는 心臟에 作用하여 心搏數 및 心臟에서 내보내는 血液量을 增加시키고 血管壁에 作用하여 血管을 收縮시킨다.

肺塞栓(Pulmonary embolism)에 對한 效果는 collagen과 epinephrine에 의해 誘導된 肺塞栓 實驗에서 對照群은 8마리中 8마리가 죽거나 30分間 以上 痲痺가 持續이 되었는데, 陽性對照群인 aspirin 投與群은 8마리中 2마리만이 죽거나 15分 以上 痲痺가 持續이 되었다. 이에 반하여 HDS 投與群은 8마리中 4마리가 죽거나 15分 以上 痲痺가 持續되어 50%의 抑制 效果를 나타내었다(Table 5, Fig. 3).

Dextran은 蔗糖으로부터 만들어진 葡萄糖으로 構成된 水溶性多糖類로서 血漿 增量劑로 使用되고, 抗原抗體反應을 일으킬 可能性이 많고 血小板凝集을 妨害하며 赤血球 凝集을 促進시키므로, 이를 利用하여 瘀血을 誘發시킨 後 紅花當歸散을 投與하여 血小板數, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen 量을 測定하였다.

血小板은 단지 血液疾患뿐만 아니라, 感染症, 或은 腫瘍에 依한 疾患 等に 있어 그 診斷, 症狀, 豫後의 判定, 治療效果와 全身狀態를 把握하기 위한 重要한 指

標가 된다. 특히 膜에 含有된 多量의 磷脂質을 中心으로한 血液의 凝固作用, 細胞構成因子와 代謝物質에 依한 血管運動, 炎症反應, 動脈硬化現狀과 關聯이 있다고 알려져 있다.

血小板數의 測定은 凝血 및 血栓形成 與否의 代表的인 指標가 되며, 血小板數의 減少는 紫斑證이나 感染症, 貧血 등을 誘發할 수 있다.

Dextran 瘀血 病態에 미치는 效果 중 血小板數에 미치는 效果에서 血小板數는 正常群이 $889 \pm 18.8 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 인데 비하여, 對照群은 $686 \pm 5.67 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$, HDS 投與群은 $725.3 \pm 4.21 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 로 對照群에 비하여 有意性($P < 0.001$) 있게 증가하였다(Table 6, Fig. 4).

Prothrombin은 血液凝固因자의 第二因子로 凝固時 重要的 作用을 하며, 肝臟에서 形成되는데 prothrombin time의 測定은 各種出血性 疾患의 診斷 및 治療에 있어 重要的 役割을 할 뿐만 아니라 肝障礙의 種類와 黃疸의 鑑別診斷, 呼吸障礙의 有無判定 등에 應用된다. Prothrombin time에 미치는 效果에서는 正常群이 $17.26 \pm 0.43 (\text{sec})$ 인데 비하여, 對照群은 $30.55 \pm 8.14 (\text{sec})$, HDS 投與群은 $16.95 \pm 0.56 (\text{sec})$ 로 對照群에 비하여 有意性($P < 0.05$) 있는 短縮效果를 보였다.(Table 7, Fig. 5).

Thromboplastin은 血液凝固에 重要的 役割을 하는 第三因子로 出血時에 血漿 속에 있는 prothrombin을 thrombin으로 바꿈으로서 止血에 關與하는 것으로 thrombokinase라고도 하며, 胎盤, 肝臟, 腦實質 등의 組織에 多量으로 含有되어 있다. Activated partial thromboplastin time의 檢查目的은 止血기구의 異常이

어디에 있는가를 調査하는것으로 이 檢査에서 異常値를 보이는 것은 內因係 凝固障礙가 있음을 意味하는 것이며, 주로 肝膽道疾患의 診斷, 血友病等に 應用된다. 이러한 APTT에 대한 效果에서는 正常群이 $44.0 \pm 1.35 (\text{sec})$ 인데 비하여 對照群은 $67.8 \pm 2.02 (\text{sec})$, HDS 投與群은 $39.52 \pm 2.73 (\text{sec})$ 로 나타나 對照群에 비하여 有意性($P < 0.001$) 있는 단축효과를 나타내었다(Table 8, Fig. 6).

Fibrinogen은 血液凝固 기전의 最終段階에 位置하는 凝固因子이며 血液이 凝固할 때 析出되는 gel 모양의 蛋白質인 fibrin의 前驅體로 心筋梗塞, 肝疾患, 出血證 등의 豫測 및 治療에 應用되고, 重症 肝疾患, 惡性貧血, 巨大血栓症, 白血病 등에서 減少하는 傾向을 나타낸다. 이러한 fibrinogen 量에 대한 效果에서는 正常群에서 $263.3 \pm 10.58 (\text{mg} / \text{dl})$ 인데 반하여, 對照群은 $181.5 \pm 11.5 (\text{mg} / \text{dl})$, HDS 投與群은 $231.0 \pm 7.66 (\text{mg} / \text{dl})$ 으로 對照群에 비하여 有意性($P < 0.01$) 있는 增加 效果를 나타내었다(Table 9, Fig. 7).

以上の 實驗結果, 紅花當歸散은 血小板凝集 抑制와 肺塞栓 抑制 및 瘀血病態實驗에서 모두 有意性있는 抗血栓效果를 보여주었으므로 血瘀로 인해 야기되는 婦人科 諸疾患에 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結論

紅花當歸散의 活血化於하는 效能을 實驗의으로 究明하기 위하여 血小板凝集, fibrinolytic activity, 血流速度, pulmonary embolism, 血小板數, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT), fibrinogen

량의 測定을 통하여 抗血栓作用을 評價한 結果는 다음과 같다.

1. ADP로 誘導된 血小板 凝集 抑制 效果에서 E_{max} 와 EC_{50} 이 각각 236.82%, 66.26 μ g/ml로 나타났고, epinephrine으로 誘導된 경우는 91.04%, 5.72g/ml으로 나타났다.
2. Fibrinolytic activity에 대한 效果는 HDS 投與群에서 陽性對照群에 비하여 有意적인 結果가 나타나지는 않았다.
3. 血流速度에 미치는 效果에서는 in vitro, in vivo에서 各各 速度의 增加는 보였으나 有意性 있는 結果는 나타나지 않았다.
4. 肺塞栓에 대한 效果는 HDS 投與群이 50%의 抑制效果를 나타내었다.
5. Dextran 瘀血 病態 모델에서 HDS 投與群이 血小板數나 fibrinogen 量에 대해서는 有意性 있는 增加를 나타내었고, prothrombin time과 activated partial thromboplastin time에서는 有意性 있는 短縮 效果를 나타내었다.

以上の 結果로 보아 紅花當歸散은 抗血栓作用을 가지고 있어 血瘀로 인한 經閉에 活用할 수 있을 것으로 사료된다.

□ 투 고 일 : 2005년 07월 21일

□ 심 사 일 : 2005년 08월 01일

□ 심사완료일 : 2005년 08월 10일

參考文獻

1. 陳自明: 校註婦人大全良方, 北京, 文光圖書有限公司印行, p.15, 1975.
2. 宋炳基 : 漢方婦人科學, 서울, 杏林出版社, pp.182-193, 1978.
3. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會 : 韓醫婦人科學, 서울, 정담 pp.115-124, 2001.
4. 南京中醫學院編 : 諸病源候論校釋, 北京, 人民衛生出版社, pp.54-56, 1983.
5. 帥學忠 : 韓英雙解常用中醫名詞述語, 長沙, 湖南科學技術出版社, p.162, 1983.
6. 文濬典 等 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.74-76, 1990.
7. 張之南 等 : 血瘀證與活血化瘀 研究, 上海, 上海科學技術出版社, pp.429-431, 1990.
8. 安秉哲 : 針灸 및 Laser 光線針刺戟이 Endotoxin에 의한 血栓症에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院, 1984.
9. 崔昇勳 : 血府逐瘀湯이 血栓症과 皮下血腫에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院, 1987.
10. 廣東中醫學院編 : 新編中醫概要, 香港, 商務印書館, pp.229-300, 1976.
11. 이상수 : 少腹逐瘀湯이 抗血栓 및 消炎, 鎮痛에 미치는 影響, 圓光大學校大學院, 1995.
12. 강승범 : 活絡丹의 抗炎, 鎮痛 및 抗血栓 效果에 關한 研究, 圓光大學校大學院, 1996.
13. 유지용 : 身痛逐瘀湯의 抗炎, 鎮痛 및 抗血栓效果에 關한 研究, 圓光大學校大學院, 1996.
14. 김광겸 : 和血通經散의 抗炎, 抗血栓 및 鎮痛效果에 對한 研究, 圓光大學校大學院, 1996.
15. 윤현자 : 芎歸湯加味方の 抗血栓效果에 關한 研究, 圓光大學校大學院, 1996.
16. 趙炳旭 : 四物湯 構成藥物이 抗血栓

- 및 抗 stress 效果에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1998.
17. 趙善花 : 坐宮丹이 抗菌 抗血栓 및 鎮痛作用에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 2001.
 18. 孫泰熏 : 加味生化湯의 抗血栓 및 鎮痛效果에 對한 研究, 大田大學校 大學院, 2001.
 19. 이해경 : 加味通經湯의 抗血栓, 消炎 및 鎮痛作用에 對한 研究, 大田大學校 大學院, 2002.
 20. Lee. J.H., Lee, Y.S. and Kwon, K.I. : Protective effects of Phellinus linteus on reperfusion of the isolated perfused Guinea pig hearts and anti-platelet aggregation effects of Phellinus linteus. J. Pharm. Sci.(C.N.U) 10:17-25, 1994.
 21. Guerra-Fernando, J.I. et al. : Effect of losartan on human platelet activation. J. Hypertension 17:447-452, 1999.
 22. Lewis, S.M. and Verwilghen, R.L. : Quality assurance in hematology, 113-145.
 23. Platelet aggregation PROFILER model PAP-4 : operating instructions and methods manual. BIO/DATA corporation.
 24. Jansen JW, van den Brink H, Hoogenboom PH. : Method to measure in vivo blood fibrinolytic activity with a 125i-fibrin coated aorta loop validated with agents which affect blood fibrinolytic activity, Thromb Res, 104(3): 223-232, 2001.
 25. Kimura, Y., Tani, T., and Watanabe, K. : Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Arzneim. Forsch./Drug Res, 35(II):1144-1149, 1985.
 26. Song YM et al : Effects of aspirin and nifedipine alone or in combination on mesenteric microcirculation of rats, Zhongguo Yao Li Xue Bao Chinese, 17(2):189-192, 1996.
 27. Leadley RJ Jr et al : Pharmacodynamic activity and antithrombotic efficacy of RPR120844, a novel inhibitor of coagulation factor Xa, J Cardiovasc Pharmacol, USA, 34(6):791-799, 1999.
 28. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 裕昌德書店, 編一, p.172, 173, 228, 236, 編二, p.93, 1960.
 29. 巢元方 : 諸病源候論, 臺北, 集文書局, p.54, 72, 101, 144, 193, 387, 400, 410, 1976.
 30. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 大星文化社, p.46, 205, 222, 455, 1984.
 31. 王 燾 : 外臺秘要, 臺北, 國立中國醫藥研究所, pp.462-468, 862-864, 983-989, 1983.
 32. 方 廣 : 丹溪心法附餘, 서울, 杏林書院, p.278, 298, 320, 325, 423, 1965.
 33. 李 杲 : 東垣十種醫書, 서울, 大星文化社, pp.193-194, 275, 280, 1983.
 34. 王肯堂 : 證治準繩, 上海, 上海科學技術出版社, p.280, 1984.
 35. 張介賓 : 景岳全書, 서울, 翰成社, p.21, 145, 199, 1983.
 36. 葉 桂 : 臨證指南醫案, 서울, 翰成社, p.144, 1982.
 37. 王清任 : 醫林改錯, 臺北, 方行書局有限公司, p.30, 52, 1983.

38. 唐容川 : 血證論, 上海, 人民出版社, pp.86-88, 353-357, 1980.
39. 顏德馨 : 活血化瘀療法 臨床實踐, 雲南人民出版社, pp.1-10, 33-40, 1980.
40. 俞芝江 : 血瘀證的診斷和治療, 上海, 上海中醫學院出版社, pp.6-8, 1989.
41. 上海中醫學院編 : 中醫學基礎, 香港, 商務印書館, p.43, 109, 1981.
42. 章眞如 : 風火痰瘀論, 北京, 人民衛生出版社, p.102, pp.107-114, 1986.
43. 宋鷺冰 : 中醫病因病機學, 北京, 人民衛生出版社, p.116-120, 1987.
44. 中國中醫研究院編 : 中醫症候鑑別診斷學, 北京, 人民衛生出版社, p.35, 1987.
45. 文濬典 等 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.74-76, 1990.
46. 湖北中醫學院主編 : 中醫學概論, 上海科學技術出版社, p.52, 1978.
47. 金完熙, 崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, p.59, pp.371-375, 1985.
48. 上海中醫學院編 : 中醫學基礎, 香港, 商務印書館, p.43, 109, 1981.
49. 章眞如 : 風火痰瘀論, 北京, 人民衛生出版社, p.102, pp.107-114, 1986.
50. 中醫大辭典編輯委員會編 : 中醫大辭典基礎理論分冊, 上海, 人民衛生出版社, p.205, 232, 236, 1979.
51. 李佩文主編 : 中西醫臨床腫瘤學, 北京, 中國中醫藥出版社, pp.102-154, 1996.
52. 孟琳升 等 編 : 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, pp.98-144, 1994.
53. 李佩文 主編 : 惡性腫瘤併發症實用療法, 北京, 中國中醫藥出版社, pp.19-26, 1995.
54. 大韓病理學會 編 : 病理學, 서울, 高文社, pp.125-146, 449-455, 479-485, 1259-2261, 1990.
55. Kurt J.Isselbacher : Principle of international medicine(13th ed.), 헤리슨 번역 편찬 위원회, Harrison's 내과학, 서울, 정담, pp.341-346, 1145-1165, 1189-1189, 1944-1958, 2409-2435. 1997.
56. 서울大學敎 醫科大學 內科學敎室 : 內科學, 서울, 군자출판사, pp.146-147, 176-186, 212-218, 226-227, 1996.
57. 서울大學敎 醫科大學 : 血液學, 서울, 서울大學敎出版部, pp.229-261. 335-357. 1993.
58. 徐德揆, 羅鐘石, 李建燮, 金哲雄, 宋在壅, 鄭昭雄, 吳大成, 吳賢淑 : 血液學, 서울, 高文社, pp.103-110, 237-239, 1988.
59. 金定濟 等 : 東醫病理學, 大田, 주민출판사, pp.348-356, 1998.