

調肝湯加減方의 抗血栓作用에 대한 實驗的 研究

대전대학교 한의과대학 부인과교실

이승아, 임현정, 신선미, 유동열

ABSTRACT

The Experimental Study on Anti-thrombotic Effect of *Jogantanggagambang* (JGTG)

Seung-Ah Lee, Hyun-Jung Lim, Sun-Mi Shin, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

Purpose: This study was performed to evaluate anti-thrombotic effect of *Jogantanggagambang* extract (JGTG).

Methods: 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 was caused from the administration of platelet aggregation reagent.

Results:

1. JGTG inhibited the platelet aggregation induced by ADP, epinephrine, collagen and arachidonic acid as compared with the control group.
2. JGTG inhibited pulmonary embolism induced by collagen and epinephrine (inhibitory rate is 37.5%).
3. JGTG increased platelet number and fibrinogen amount significantly and also JGTG shortened PT and APTT significantly as compared with the control group in thrombus model induced by dextran.
4. JGTG increased blood flow rate significantly as compared with the control group *in vivo*.

Conclusion: These results suggest that JGTG can be used for treating various female diseases caused by thrombosis.

Key Words: *Jogantanggagambang* (JGTG), anti-thrombotic effect, embolism, thrombosis.

I. 서 론

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 응결되어 형성된 병리적 산물이자, 속발성 병리인자로¹⁾, 현대에 있어서는 병리 및 증상 면에서 血栓과 유사한 개념으로 인식되고 있다²⁻⁶⁾.

血栓症이란 혈관이나 심장 내에서 혈액성분인 固形塊가 형성되어 혈관의 협착, 폐색을 야기하여 심장, 뇌, 폐, 신장 등에 허혈성 질환이나 경색 및 기능장애를 초래하는 것으로 동통, 울혈, 부종, 패혈증 등이 나타날 수 있는데, 이는 瘀血로 인한 증상인 刺痛, 出血, 腫塊 등과 밀접한 상관성을 보여주는 것이다⁷⁻¹³⁾.

調肝湯加減方¹⁴⁾은 補腎養血, 調肝緩痛의 효능이 있는 調肝湯^{15,16)}에서 山藥, 阿膠, 甘草를 去하고 續斷, 杜沖, 烏藥, 川棟子, 鬱金, 鷄血藤, 熟地黃, 益母草를 가한 처방으로, 補血滋陰, 清熱除濕, 散瘀止痛의 효능이 있어, 임상에서 瘀血, 濕熱 등으로 변증되는 혈전성 질환에 효과가 있을 것으로 판단된다.

瘀血에 대한 실험적 연구로 趙¹⁷⁾는 歸朮破癥湯이, 崔¹⁸⁾는 加味桂枝茯苓丸이, 高¹⁹⁾는 麻黃附子細辛湯이 혈전증에 유효성이 있다고 보고하였고, 김²⁰⁾, 이¹³⁾ 등은 각각 清熱消毒飲, 少腹逐瘀湯이 抗炎症 및 抗血栓 효과가 있음을 보고하였으나, 調肝湯加減方の 抗血栓 효과에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 調肝湯加減方¹⁴⁾의 抗血栓 효과를 알아보기 위해 adenosine diphosphate (ADP), epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의해 유도된 혈소판 응집에 대한 억제력, 폐색전유발에 대한 억제효과 및

dextran 어혈병태 모형에서의 혈소판수와 fibrinogen의 량, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), 어혈유발에 따른 혈류속도의 변화에 대한 실험을 시행하여 유의한 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 동 물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~200 g의 Sprague-Dawley계 (대한 실험동물센터, 충청북도 음성) 웅성 백서와, 18~20 g의 ICR(International Cancer Research-대한실험동물센터, 충청북도 음성)계 생쥐로, 실험 당일까지 고형 사료(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 배합사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22 ± 2°C, 상대 습도 50 ± 10%, 조명 시간 12 시간 (07:00-19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용한 調肝湯加減方 (이하 JGTG으로 지칭)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방의 내용과 1첩 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Jogantanggagambang* (JGTG)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
當歸	<i>ANGELICAE GIGANTIS RADIX</i>	5
白芍藥	<i>PAEONIAE RADIX ALBA</i>	5
山茱萸	<i>CORNI FRUCTUS</i>	5
續斷	<i>DIPSACI RADIX</i>	5
杜沖	<i>EUCOMMIAE CORTEX</i>	5
烏藥	<i>LINDERAE RADIX</i>	5
巴戟	<i>MORINDAE OFFICINALIS RADIX</i>	5
川棟子	<i>TOOSENDAN FRUCTUS</i>	5
鬱金	<i>CURCUMAE RADIX</i>	5
鷄血藤	<i>SPATHOLOBI CAULIS</i>	6
熟地黃	<i>REHMANNIAE RADIX PREPARAT</i>	10
益母草	<i>LEONURI HERBA</i>	10
total		71

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약 중 Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, collagen, ephineprine, dextran, 3.8% sodium citrate, fibrinogen, acid citrate dextrous, heparin는 Sigma (USA) 제품을 사용하였고, normal saline은 중외제약 (Korea) 제품을, arachidonic acid reagent, epinephrine reagent, ADP reagent, collagen reagent은 Chrono-Log (USA) 제품을 사용 하였으며, IL Test™ PT-fibrinogen HS와 IL Test™ AP TT lyophilized silica는 Instrumentation Laboratory (USA) 제품을, aspirin은 바이엘 (USA) 제품을 사용하였다.

기기는 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), ACL-100 (Instrumentation Laboratory, USA.), silicon-treated cuvette, platelet aggregation profiler model PAP-4 (BIO/DATA Co. USA), simplastin kit (General, Diagnostics, USA)등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

JGTG 2 침을 3,000 ml round flask에 넣고 증류수 2,000 ml를 가한 후, 3 시간 가열 추출하여, 침전물을 3 회 여과 (3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 4 시간 동안 방치하고, 24 시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 29.5 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 혈소판 응집 (Platelet aggregation) 측정

12 시간 이상 공복을 유지한 지원자의 상박 정맥으로부터 채혈한 혈액을 3.8 % 구연산나트륨이 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣고 원심분리 (900 rpm 10 분)하여 상등액으로부터 platelet rich plasma (PRP)를 얻고 잔액을 다시 원심분리 (3,000 rpm 10 분)하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻었

다. PRP는 채취 즉시, 변화를 막고 얼음이 들어 있는 용기에 방치하였다.

약물의 항혈소판 응집 효과는 platelet aggregation profiler model PAP-4를 사용하였으며, 최종 농도는 ADP 10 μ m, epinephrine 10 μ m, collagen 5 μ g/ml과 arachidonic acid 5 mM이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation시킨 PRP 320 μ l와 실험군을 40 μ l를 넣고 다시 incubation한 후 ADP 40 μ l를 가하여 5 분간 반응시켰다.

실험군은 JGTG extract를 생리식염수에 용해시키고 희석하여 사용하였으며, 최종 농도가 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml가 되도록 PRP에 가하고 응집 유도제를 넣기 전까지 37°C에서 3 분간 incubation하였다. 실험의 처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 생리식염수 40 μ l를 가한 뒤 최대응집률 (%)을 측정하여 채혈 후 시간 경과로 인한 혈소판 변질로 나타날 수 있는 실험 오차를 방지하였으며, PRP를 얻은 후 2 시간 안에 모든 실험을 진행시켰다. 실험 조작 동안 온도는 37°C로 유지하고 교반 속도는 500~1,500 rpm으로 하며 528 nm에서 응집도를 측정하였다.

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

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

A = 대조군의 maximum aggregation %

B = 실험군의 maximum aggregation %

각각의 농도에서의 aggregation (%)은 mean \pm S.E.로 나타내었다.

3) 폐색전 (Pulmonary thrombosis) 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura 등²¹⁾의 실험 방법에 준하여 실시하였다. 실험동물은 몸무게 약 18~20 g 정도의 수컷 ICR계 생쥐를 사용하였고, JGTG 투여군은 20 g ICR계 생쥐를 기준으로 검역 9.6 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1 회씩 7 일간 경구 투여하였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집 시약 (11.3 μ g의 collagen과 1.32 μ g의 epinephrine)을 HBSS 200 μ l에 함유되도록 조제하였고, ICR계 생쥐의 몸무게 20 g당 200 μ l의 용량으로 미정맥에 주사하였다(대조군).

실험동물을 실험 전 24 시간 절식시킨 후, 혈소판 응집 유발 시약의 정맥 주사 2 시간 전에 상기한 농도의 JGTG를 ICR계 생쥐에게 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 2.0 mg/20g을 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수를 투여하여 실험군과 동일한 시각에 각종 지표를 검사하였다.

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

4) Dextran 어혈 병태 유발 실험

(1) Dextran 어혈병태 유발 및 약물 투여

SD계 웅성백서 8 마리를 1군으로 하여 정상군, 대조군 및 JGTG 투여군으로 각각 나누었다. 정상군은 생리식염수를 공급하고, 대조군은 생리식염수를 투여

한 지 1 시간 후에 dextran 어혈 병태를 유발하였으며, JGTG 투여군은 체중 200 g당 96.4 mg을 생리식염수 2 ml에 용해하여 oral zonde로 실험 하루 전에 1 회 경구 투여한 후 절식시키고, 실험 1 시간 전에 다시 1 회 경구 투여한 다음 대조군과 동일한 방법으로 dextran 어혈 병태를 유발하였다.

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

(2) 혈소판 수 측정

혈소판수 측정은 자동혈구계산기, Minos-ST를 사용하여 측정하였다.

(3) Prothrombin time (PT) 측정

PT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

(4) Activated partial thromboplastin time (APTT) 측정

APTT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

(5) Fibrinogen 량 측정

Fibrinogen 량은 simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

(6) 혈류 속도 측정

*In vivo*에서는 시료를 10 일간 SD계 웅성백서에 경구 투여하고, dextran으로 어혈 병태를 유발한 다음 heparin (1,000 units/ml)을 처리한 syringe를 이용하여 채혈하였다. 채혈한 혈액을 acid citrate

dextrous (ACD)용액으로 5 배 희석한 다음 직경 2 mm 크기의 유리관을 통과하는데 걸리는 시간을 통하여 혈류속도를 측정하였다.

5) 통계 처리

실험 결과는 Student's *t*-test를 사용하여 통계 처리하였으며 $P < 0.05$ 이하 수준에서 유의성을 검증하였다.

III. 성 적

1. 혈소판 응집 억제 효과

1) ADP에 의한 혈소판 응집 억제 효과

JGTG extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml 농도로 투여한 후 ADP (10 μ m)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 99%의 응집율을 보인 반면, JGTG extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 98.9%, 10 mg/ml 농도에서 93.7%, 1 mg/ml 농도에서 16.16%, 0.1 mg/ml 농도에서는 -1.01%, 0.01 mg/ml 농도에서는 -2.02%, 0.001 mg/ml 농도에서는 -2.02%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 1).

2) Epinephrine에 의한 혈소판 응집 억제 효과

JGTG extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml 농도로 투여 한 후 epinephrine (10 μ m)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 95%의 응집율을 나타낸 반면, JGTG extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 100%, 10 mg/ml 농도에서 96.3%, 1 mg/ml 농도에서 4.21%, 0.1 mg/ml 농도에서 -1.05%, 0.01

mg/ml 농도에서 8.42%, 0.001 mg/ml 농도에서는 -5.26%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

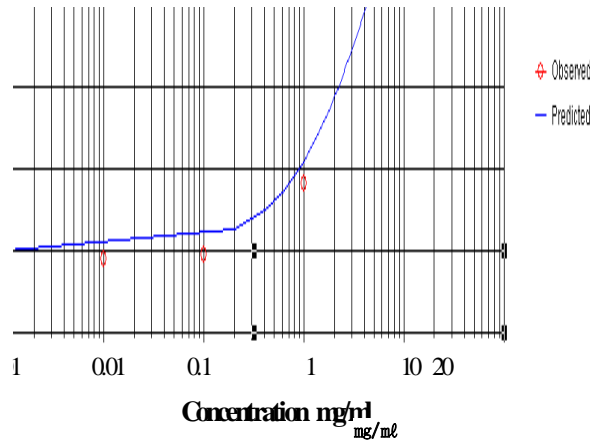


Fig. 1. Effect of JGTG extract on human platelet aggregation with 10 μ m of ADP.

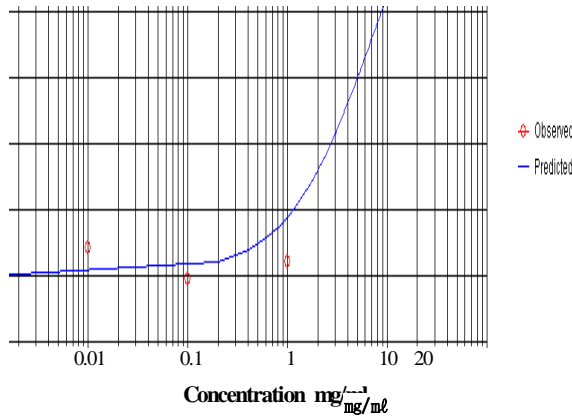


Fig. 2. Effect of JGTG extract on human platelet aggregation with 10 μ m of epinephrine.

3) Collagen에 의한 혈소판 응집 억제 효과

JGTG extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml 농도로 투여한 후 collagen (5 μ g/ml)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 93%의 응집율을 나타낸 반면, JGTG extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 97.5%, 10 mg/ml

농도에서 35.3%, 1 mg/ml 농도에서 9.6%, 0.1 mg/ml 농도에서는 2.1%, 0.01 mg/ml 농도에서는 15.0%, 0.001 mg/ml 농도에서 -7.5%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

4) Arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제 효과

JGTG extract 20 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml

농도로 투여한 후 arachidonic acid (5 mM)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응을 관찰하였다. 대조군은 88%의 응집을 나타낸 반면, JGTG extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서

100%, 10 mg/ml 농도에서 44.3%, 1 mg/ml 농도에서 37.5%, 0.1 mg/ml 농도에서 4.5%, 0.01 mg/ml 농도에서 -11.3%, 0.001 mg/ml 농도에서 2.2%의 응집 억제율을 나타냈다(Fig. 4).

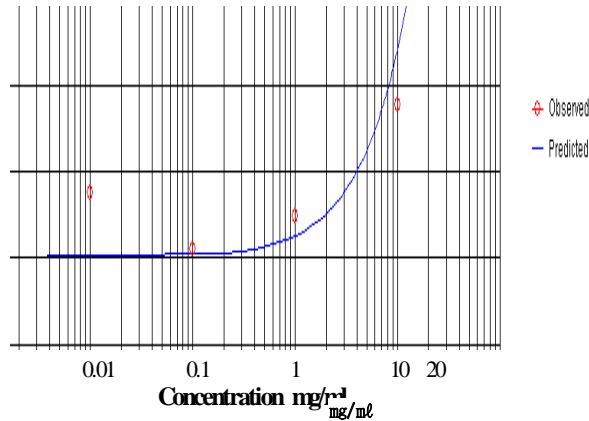


Fig. 3. Effect of JGTG extract on human platelet aggregation with 5 µg/ml of collagen.

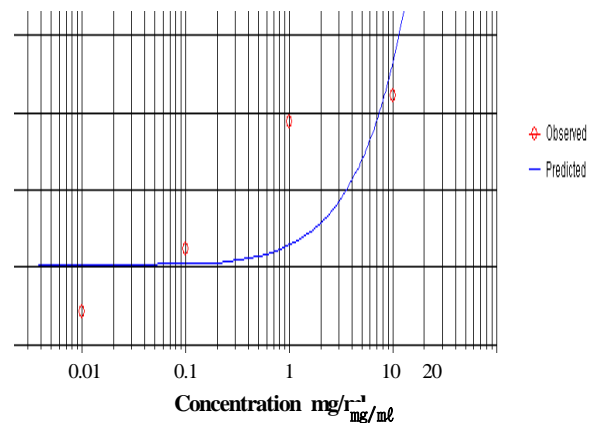


Fig. 4. Effect of JGTG extract on human platelet aggregation with 5 mM/ml of arachidonic acid.

5) E_{max} 와 EC_{50} 값

응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 E_{max} 는 129.4%. EC_{50} 은 4.9 mg/ml로 나타났다으며, epinephrine는 E_{max} 가 145.1%, EC_{50} 은 7.1 mg/ml, collagen은 E_{max} 가 773.2%, EC_{50} 은 14.9 mg/ml, arachidonic acid는

E_{max} 가 573.1%, EC_{50} 은 9.7 mg/ml로 나타났다(Table 2).

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by E_{max} and EC₅₀ Model in Win Nolin Program

Inducer	parameter	E _{max} (%)	EC ₅₀ (mg/ml)
	ADP	129.4	4.9
	Epinephrine	145.1	7.1
	Collagen	773.2	14.9
	Arachidonic acid	573.1	9.7

2. 폐색전에 대한 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속이 되었다. 이에 비해 양성대조군인 aspirin 투여군은 8 마리 중 2 마리만이 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 75%의 억제율을 나타내었고, JGTG extract 투여군은 8 마리 중 5 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 37.5%의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of JGTG extract on Pulmonary Embolism Mice

Dose (mg/20 g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control HBSS	8/8	0
Aspirin 2	2/8	75
JGTG 9.6	5/8	37.5

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution
 Control : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group.
 Aspirin : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group after oral administration of 2.0 mg/20 g of aspirin.
 JGTG : 11.3 μg collagen and 1.32 μg epinephrine/200 μl/20 g treated group after oral administration of 9.6 mg/20 g of JGTG extract.

3. Dextran 어혈 병태에 미치는 효과

1) 혈소판 수에 미치는 효과

혈소판 수 변화에서는 정상군이 889.0 ± 18.8 (×10³/mm³)인데 비하여, 대조군은 686.0 ± 5.67 (×10³/mm³)로 정상군에 비하여 유의성 (P<0.01) 있는 감소 효과를 보였으며, JGTG extract 투여군은 972.6 ± 4.9 (×10³/mm³)로 대조군에 비하여 유의성 (P<0.001) 있는 증가 효과를 보였다(Table 4, Fig. 5).

Table 4. Effect of JGTG extract on Platelet in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	Platelet (×10 ³ /mm ³)
Normal	8	889.0 ± 18.8
Control	8	686.0 ± 5.67 ⁺⁺
JGTG	8	972.6 ± 4.9 ^{***}

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 JGTG : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 96.4 mg/200g of JGTG extract.
 +: Statistically significant value compared with normal group(++ : P<0.01)
 * : Statistically significant value compared with control group(*** : P<0.001)

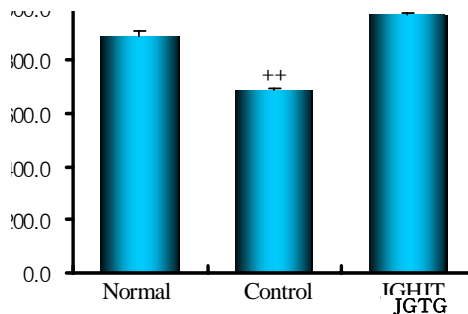


Fig. 5. Effect of JGTG extract on platelet in dextran treated rats.

+ : Statistically significant value compared with normal group(++ : P<0.01)
 * : Statistically significant value compared with control group(*** : P<0.01)

2) PT에 미치는 효과

PT에 대한 효과에서는 정상군이 10.95 ± 0.67 (sec)인데 비하여, 대조군은 13.8 ± 0.56 (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 (P<0.01) 있는 증가 효과를 보였으며, JGTG extract 투여군은 13.4 ± 0.64 (sec)로 나타내었다(Table 5, Fig. 6).

Table 5. Effect of JGTG extract on PT in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	Prothrombin time (sec)
Normal	8	10.95 ± 0.67
Control	8	13.8 ± 0.56 ⁺⁺
JGTG	8	13.4 ± 0.64

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 JGTG : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 96.4 mg /200 g of JGTG extract.
 + : Statistically significant value compared with normal group(++ : P<0.01)

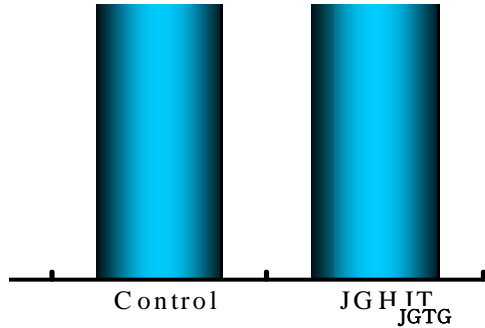


Fig. 6. Effect of JGTG extract on PT in dextran treated rats.

+ : Statistically significant value compared with normal group(++ : P<0.01)

3) APTT에 미치는 효과

APTT에 대한 효과에서는 정상군이 30.7 ± 1.3 (sec)인데 비하여, 대조군은 34.17 ± 1.1 (sec)로 나타나 정상군에 비

하여 유의성 (P<0.05) 있는 증가 효과를 나타내었으며, JGTG extract 투여군은 31.0 ± 1.7 (sec)로 나타내었다(Table 6, Fig. 7).

Table 6. Effect of JGTG extract on APTT in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	APTT (sec)
Normal	8	30.7 ± 1.3
Control	8	34.17 ± 1.1 ⁺
JGTG	8	31.0 ± 1.7

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 JGTG : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 96.4mg /200 g of JGTG extract.
 + : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)

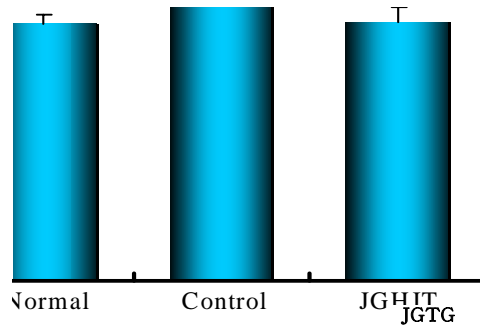


Fig. 7. Effect of JGTG extract on APTT in dextran treated rats.

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

4) Fibrinogen 량에 미치는 영향

Fibrinogen 량에 대한 효과에서는 정상군에서 290 ± 18.74 (mg/dl)인데 반하여, 대조군은 224 ± 16.17 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었으며, JGTG extract 투여군은 340 ± 37.7 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (P<0.05)

있는 증가 효과를 나타내었다(Table 7, Fig. 8).

Table 7. Effect of JGTG extract on Fibrinogen in Dextran treated Rats

Group	NO. of animals	Fibrinogen (mg/dl)
Normal	8	290 ± 18.74
Control	8	224 ± 16.17 ⁺
JGTG	8	340 ± 37.7 [*]

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 JGTG : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 96.4mg /200 g of JGTG extract.
 + : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)
 * : Statistically significant value compared with control group(* : P<0.05)

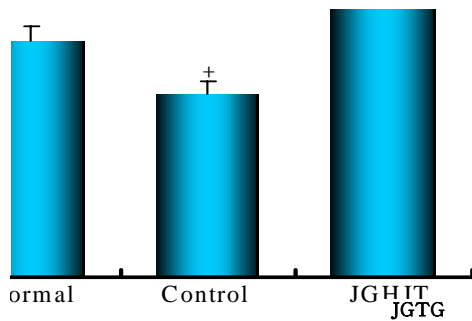


Fig. 8. Effect of JGTG extract on fibrinogen in dextran treated rats.

+ : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)
 * : Statistically significant value compared with control group(* : P<0.05)

4. 어혈 유발에 따른 혈류 속도에 미치는 효과

어혈을 유발시킨 SD계 웅성백서에서 혈액을 채취하여 혈류 속도를 측정 한 실험 결과, 정상군은 20.1 ± 1.48 (sec), 대조군은 27.2 ± 1.85 (sec)로 나타나 정상

군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 증가 효과를 나타내었으며, JGTG 투여군은 22.7 ± 1.34 (sec)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 8, Fig. 9).

Table 8. Enhancement of Blood Flow Rate by Administration *in Vivo*

Sample	Flow Rate (sec)
Normal	20.1 ± 1.48
Control	27.2 ± 1.85 ⁺
JGTG	22.7 ± 1.34 [*]

a) : Mean ± Standard Error
 Normal : Oral administration of normal saline.
 Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline.
 JGTG : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 96.4 mg /200 g of JGTG extract.
 +: Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)
 * : Statistically significant value compared with control group(* : P<0.05)

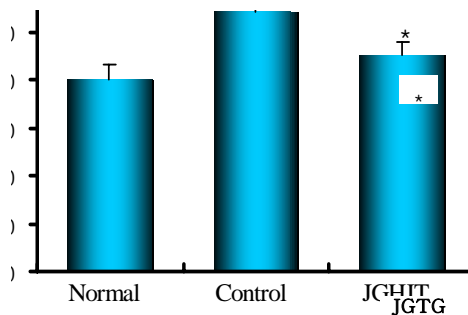


Fig. 9. Enhancement of blood flow rate by administration *in vivo*.

+ : Statistically significant value compared with normal group(+ : P<0.05)
 * : Statistically significant value compared with control group(* : P<0.05)

IV. 고 찰

우리의 몸은 출혈이 생기면 혈관의 상

처를 혈소판 마개로 막아 더 이상의 출혈이 생기지 않도록 하는데, 이러한 지혈과정은 혈관수축, 혈소판마개 형성, 혈관응괴(clot)의 형성, 손상된 부분을 영구히 봉합하기 위한 혈액 응괴 내 섬유조직 성장과 같은 기전에 의해 일어나게 된다²²⁻²⁴⁾.

지혈과정에서 혈관 내에서 비정상적으로 발생하는 응괴를 血栓이라 한다. 일단 응괴가 발생하면 응괴 주변을 지속적으로 흐르는 혈류에 의해 응괴가 떨어질 수 있으며, 이렇게 떨어진 응괴는 혈류를 따라 흐르게 되는데, 이러한 응괴를 塞栓이라 한다. 필요이상으로 큰 血栓은 순환부전을 일으키게 되고, 또 혈관이 파괴되기도 않았는데도 갑자기 혈관 내에 血栓이 형성되면 이것도 순환부전을 일으킨다²²⁻²⁴⁾.

몸의 조절 체계에는 순환부전을 일으키지 않도록 하기 위해 혈액응고에 영향을 미치는 50개 이상의 중요한 물질이 관여한다. 이 물질 중에는 혈액과 조직에 존재하는 응고를 촉진하는 응고인자 및 응고를 억제하는 항응고 인자가 있다. 혈액 흐름 내에서 항응고 인자는 정상적으로 우월하여 혈액이 혈관 내에서 순환하고 있는 동안에는 응고되지 않으나, 혈관이 파열되면 손상된 조직 내의 응고 인자가 활성화되어 항응고 인자를 압도하여 응괴가 형성된다. 또한 혈류의 저류나 과류가 있을 때 활성화된 응고인자의 회석과 청소가 안되는 경우와 혈관 내피의 손상에 의해 혈소판의 응고덩어리가 핵이 되어 血栓을 형성하는 경우, 그리고 혈소판 수나 성질의 변화, 패혈증이나 암에 동반된 응고항진상태 및 경구용 피임약을 장기 복용할 때 나타날

수 있는 혈액조성 변화에 기인하는 경우 血栓이 다발하여 血栓이나 塞栓으로 인한 여러 증상을 유발한다²²⁻²⁵⁾.

抗血栓요법에는 항혈소판요법, 항응고요법, 혈전용해요법의 3가지가 있는데, 항혈소판요법과 항응고요법은 血栓형성을 저지하는 목적으로 실시하고, 혈전용해요법은 만들어진 血栓을 제거하는 목적으로 실시한다^{22,25)}.

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 凝聚하여 형성된 일종의 병리적 산물인 동시에 致病因子가 되는 것으로 혈액운동장애와 혈류속도감소의 병리상태와 결체조직 증식 및 변성상태를 포괄하는데 이는 서양의학의 血栓의 개념과 비슷하다^{26,27)}.

역대 의가들은 瘀血의 개념, 병인, 임상증상 및 발병특징 등에 대하여 비교적 상세히 기술하였다. 《內經》에 瘀血이란 말은 직접 나타나 있지 않지만 비슷한 용어로 ‘惡血’, ‘死血’, ‘血凝泣’ 등이 언급되었고, 《傷寒論》에서는 ‘蓄血’ 과 ‘瘀血’ 이, 《金匱要略》에서는 ‘乾血’ 과 ‘瘀血’ 자가 사용되었다. 葉天士는 積聚, 癥瘕, 瘡母, 便秘, 月經, 胎產 등의 병증에서 活血化瘀·通絡의 효능이 있는 약물을 광범위하게 사용하였으며, 涼血散血의 치법을 주장하였다^{27,28)}. 王清任²⁹⁾은 《醫林改錯》에서 瘀血 발병의 병리에 대해 기술하면서 ‘離經之血’ 도 瘀血의 범주에 귀속시켰으며, 逐瘀나 活血의 명칭이 있는 방제를 창안하였다.

調肝湯加減方¹⁴⁾은 補腎養血, 調肝緩痛의 효능이 있는 調肝湯^{15,16)}에 山藥, 阿膠, 甘草를 去하고 續斷, 杜沖, 烏藥, 川楝子, 鬱金, 鷄血藤, 熟地黃, 益母草를 가

한 처방으로, 구성약물의 효능을 살펴보면, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 白芍藥은 養血柔肝, 緩急止痛, 山茱萸는 益精氣 養肝腎, 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡, 續斷은 補腎, 固衝任, 杜冲은 溫補腎陽, 補益腎精, 川棟子는 柔肝理氣, 鬱金은 行氣化瘀, 烏藥은 理氣行滯, 巴戟은 溫腎益衝任, 養血柔筋, 熟地黃은 保養精血, 補血滋陰, 益母草는 清內熱, 理氣行滯止痛 川芎은 行血散瘀 하는 효능을 가지고 있다.^{30-34,16)} 그러므로 調肝湯加減方¹⁴⁾은 補血滋陰, 清熱除濕, 散瘀止痛의 효능이 있어 瘀血로 대별되는 血栓性 질환에 효과가 있을 것으로 생각되었다. 이에 저자는 調肝湯加減方의 抗血栓 효과를 규명하기 위하여 본 연구에 착수하였다.

Collagen은 교원질로서 동물에서 가장 흔한 단백질이며 결합조직의 세포외기질에서 발견되는 주된 섬유이다. 이는 기질 분비세포의 endoplasmic reticulum에서 합성되는 tropocollagen에서 만들어지며 tropocollagen이 세포의 기질로 분비될 때 교원질로 변형된다. 교원질은 유전적으로 몇 가지 종류가 있으며, 섬유조직, 기저막, 골, 연골 및 각막이나 심장판막과 같은 조직의 주된 구성 요소이다.^{35,36)} Epinephrine은 생체 내에 존재하는 중요한 catecholamine중 하나로, 부신수질 hormone으로서 부신수질에서 혈중으로 분비되어 순환하면서 여러 표적장기에 작용하는 순환 hormone이다. 생리적으로는 심장 부활작용, 당이나 지질에 미치는 작용이 강력한데, 심박수 및 심장에서 내보내는 혈액량을 증가시키고 혈관벽에 작용하여 혈관을 수축시킨다. 위장관에서는 수축 및 운동성을 감소시키고 기관과 기관지에 대해서는 긴장을 약화

시켜 확장시키는 작용을 한다.^{37,38)}

ADP (10 μ m)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응 결과로 대조군은 99%의 응집율을 보인데 비해, JGTG extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 98.9%, 10 mg/ml 농도에서, 93.7%, 1 mg/ml 농도에서 16.16%, 0.1 mg/ml 농도에서는 -1.01%, 0.01 mg/ml 농도에서는 -2.02%, 0.001 mg/ml 농도에서는 -2.02%의 응집 억제율을 나타내었고(Fig. 1), epinephrine (10 μ m)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응 결과로 대조군은 95%의 응집율을 보인데 비해, JGTG extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 100%, 10 mg/ml 농도에서 96.3%, 1 mg/ml 농도에서 4.21%, 0.1 mg/ml 농도에서 -1.05%, 0.01 mg/ml 농도에서 8.42%, 0.001 mg/ml 농도에서는 -5.26%의 응집 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

Collagen (5 μ g/ml)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응의 실험 결과는 대조군은 93%의 응집율을 나타낸 반면, JGTG extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 97.5%, 10 mg/ml 농도에서 35.3%, 1 mg/ml 농도에서 9.6%, 0.1 mg/ml 농도에서는 2.1%, 0.01 mg/ml 농도에서는 15.0%, 0.001 mg/ml 농도에서 -7.5%의 응집 억제율을 나타내었으며(Fig. 3), arachidonic acid (5 mM)에 의해 유도된 혈소판 응집에 관한 억제 반응 실험 결과는 대조군은 88%의 응집율을 보인데 비해, JGHJT extract 투여군은 20 mg/ml 농도에서 100%, 10 mg/ml 농도에서 44.3%, 1 mg/ml 농도에서 37.5%, 0.1 mg/ml 농도에서 4.5%, 0.01 mg/ml 농도에서 -11.3%, 0.001 mg/ml 농도에서 2.2%의 응집 억제율을 나타냈다(Fig. 4).

응집 유도체로 ADP를 사용한 경우 E_{max} 는 129.4%, EC_{50} 은 4.9 mg/ml로 나타났고, epinephrine의 경우는 E_{max} 가 145.1%, EC_{50} 은 7.1 mg/ml로, collagen은 E_{max} 가 773.2%, EC_{50} 은 14.9 mg/ml, arachidonic acid는 E_{max} 가 573.1%, EC_{50} 은 9.7 mg/ml로 나타났다(Table 2). 여기서 E_{max} 는 최대 응집 억제율을 나타내고, EC_{50} 은 50%의 억제율을 보이는 농도를 나타낸다.

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속되었다. 이에 비해 양성대조군인 aspirin 투여군은 8 마리 중 2 마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 75%의 억제율을 나타내었고, JGTG extract 투여군은 8 마리 중 5 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 37.5%의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Dextran에 의해 유발된 어혈병태 실험에서 JGTG extract 투여군이 유의성 있는 결과를 보여주었다. 혈소판 수 변화에서는 정상군이 $889.0 \pm 18.8 (\times 10^3/mm^3)$ 이고, 대조군은 $686.0 \pm 5.67 (\times 10^3/mm^3)$ 로 정상군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있는 감소 효과를 보였으며, JGTG extract 투여군은 $972.6 \pm 4.9 (\times 10^3/mm^3)$ 로 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.001$) 있는 증가 효과를 보였다 (Table 4, Fig. 5). PT에 대한 효과에서는 정상군이 10.95 ± 0.67 (sec)인데 비하여, 대조군은 13.8 ± 0.56 (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있는 증가 효과를 보였으며, JGTG extract 투여군은 13.4 ± 0.64 (sec)로 나타내었다 (Table 5, Fig. 6). APTT에 대한 효과에서는 정상군이 30.7 ± 1.3 (sec)인데 비하여, 대조군은 34.17

± 1.1 (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 증가 효과를 나타내었으며, JGTG extract 투여군은 31.0 ± 1.7 (sec)로 나타내었다 (Table 6, Fig. 7). Fibrinogen 량에 대한 효과에서는 정상군에서 290 ± 18.74 (mg/dl)인데 반하여, 대조군은 224 ± 16.17 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소 효과를 나타내었으며, JGTG extract 투여군은 340 ± 37.7 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 7, Fig. 8).

*In vivo*에서 혈류속도에 미치는 효과에 대한 실험에서 어혈을 유발시킨 SD 계 웅성백서에서 혈액을 채취하여 혈류속도를 측정된 결과, 정상군은 20.1 ± 1.48 (sec), 대조군은 27.2 ± 1.85 (sec)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 증가 효과를 나타내었으며, JGTG extract 투여군은 22.7 ± 1.34 (sec)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 8, Fig. 9).

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 調肝湯加減方(JGTG)은 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집에 대한 억제효과를 보였으며, collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 억제하였고, dextran 어혈병태 유발실험에서 유의성 있는 결과를 나타내었기에 항혈전 효과가 있음을 알 수 있다.

V. 결 론

調肝湯加減方の 抗血栓 효과를 실험적

으로 규명하기 위하여 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의해 유도된 혈소판의 응집 억제효과, collagen과 epinephrine에 의해서 유도된 폐색전에 대한 억제력 및 dextran에 의한 혈전증 유발 후 혈소판수, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen 량에 미치는 영향과 어혈 유발에 따른 혈류속도를 측정 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 調肝湯加減方은 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의해 유도된 혈소판 응집에 대해 억제효과를 나타내었다.
2. 調肝湯加減方은 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 37.5%의 억제 효과를 나타내었다.
3. 調肝湯加減方은 dextran에 의한 혈전증 유발 후 혈소판수와 fibrinogen의 량에 있어 유의성 있는 증가를 나타내었고, prothrombin time과 activated partial thromboplastin time에 있어 유의성 있는 단축 효과를 나타내었다.
4. 調肝湯加減方은 어혈 유발에 따른 혈류속도를 유의성 있게 증가 시켰다.

이상의 실험결과로 보아 調肝湯加減方은 항혈전 작용이 인정되므로 肝腎虧虛를 겸한 여성의 瘀血性 疾患에 광범위하게 應用될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 張機. 仲景全書. 臺北: 集文書局. 1972 :172-173, 228, 236.

2. 康舞洙. 한의학에서 瘀血에 대한 개념. 대한한의학회지. 1984;5(1):138-140.
3. 陳可冀, 史裁祥. 實用血瘀證學. 北京: 인민위생출판사. 1999;1-3, 5-8, 15-16.
4. 한방병리학교재편찬위원회 編. 한방병리학. 서울: 한의문화사. 2007;111-117.
5. 易法銀. 醫瘀血證診療大全. 北京: 中國中醫藥出版社. 1999;1-11, 664.
6. 安圭錫, 朴種鉉, 朴耕模. 瘀血病態모형 개발에 관한 연구. 대한동의병리학회지. 1999;13(1):25-35.
7. 홍지선. 桃紅飲이 collagen 등으로 유발된 혈전 및 혈액점도에 미치는 영향에 대한 연구. 방제학회지. 1998;6(1):199-214.
8. 전병훈, 정우열. 실험적 혈전증에 미치는 한약재의 항혈전 효과에 관한 연구. 대한동의병리학회지. 1996;10(1):72-78.
9. 韓忠熙. RAW 264.7 세포주와 염증 생쥐모델에서 抗炎症作用에 대한 清熱活血湯加鷄血藤의 效果. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):92-109.
10. 이혜경. 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.
11. 제종민. 稜莖消積湯의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 大田大學校大學院. 2007.
12. 임동욱, 유동렬. 複方紅藤敗醬散의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):151-174.
13. 이상주, 박병렬. 少腹逐瘀湯이 항혈전 및 소염 진통에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):81-96.
14. 潘鴻鶴. 중의학치료염증학. 군사의학

- 과학기술출판사. 2000;3-15, 329, 650, 683.
15. 傅青主. 傅青主女科. 서울: 大成文化社. 1984;97.
 16. 한의부인과학(상). 대한부인과학회 교재편찬위원회. 서울: 정담. 2001;449.
 17. 조홍건. 歸朮破癥湯이 Endotoxin으로誘發된 白鼠의 實驗的 血栓症에 미치는 影響. 대전대학교대학원. 1994.
 18. 최창우. 加味桂枝茯苓丸이 血栓症에 미치는 實驗的 研究. 대전대학교대학원. 1991.
 19. 고광석. 麻黃附子細辛湯 및 處方構成藥材가 Endotoxin으로 誘發된 血栓症에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1990.
 20. 김호민. 淸熱消毒飲이 실험적 염증 및 혈전에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1995;10:267-293.
 21. Kimura Y, Tani T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim Forsch Drug Res.*1985;35(II):1144-1149.
 22. Guyton, Hall. 의학 생리학. 서울: 정담. 2002;479-492.
 23. 新谷太. steps to internal medicine 1 권. 서울: 정담. 2002;204-214.
 24. 吉利和. 內科診斷學. 서울: 제1의학사. 1994;6-8.
 25. 신태양사 편집국 백과사전부. 원색최신의료대백과사전 20권. 서울: 신태양사. 1996;66-68.
 26. 최승훈. 黃帝內經에서의 瘀血의 인식에 대한 병리적 연구. 대전대학교논문집. 1987;6(2):313-320.
 27. 전국한외과대학병리학교실편. 한방병리학. 서울: 일중사. 2002;81-85.
 28. 葉桂. 臨證指南醫案. 서울: 輪成社. 1985;513, 596.
 29. 王清任. 醫林改錯. 서울: 宿昌德書店. 1975;44, 61-62.
 30. 上海中醫學院. 中草藥學. 上海: 商務印書館香港分館. 1983;140-142, 154-155, 205, 238, 392, 418.
 31. 新編中藥大辭典(上篇). 臺灣: 新文豐出版公司. 1982;851.
 32. 顏正華. 中藥學. 北京: 人民衛生出版社. 1989;197-199.
 33. 李時珍. 本草綱目. 北京: 中國中醫藥出版社. 1996;486.
 34. 李梴. 編註醫學入門. 서울: 大星出版社. 1994;408, 462, 477, 501.
 35. 大韓病理學會. 病理學II. 서울: 高文社. 1995;71-104, 112-120, 540-542.
 36. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울: 고려의학. 1998;62-94.
 37. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 서울: 의학문화사. 2003;587-600, 1096-1099, 1118-1121, 1147-1151, 1212-1214.
 38. 이정은, 유동열. 加味補陽還五湯의 抗血栓 및 抗炎작용에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):957-965.