

오매(Mume Fructus) 추출물의 혈행개선 효과

박승희[#] · 박금주 · 김재기

정산생명공학연구소

(Received July 16, 2009; Revised August 25, 2009; Accepted September 1, 2009)

The Effects of Mume Fructus Extracts on Blood Flow Improvement

Seung Hee Park[#], Keum Ju Park and Jae Ki Kim

R&D Center, Jung San Biotechnology, Gyeonggi 445-964, Korea

Abstract — Mume Fructus extract is used in folk medicine in Eastern Asian countries including Korea. However, its therapeutic effect on thrombosis is not known. Mume Fructus methanol extract (ME) dose-dependently inhibited ADP-induced platelet aggregation and also exhibited about 130% fibrinolytic activity compared to the natto. Oral administration of ME to mice significantly extended tail-bleeding time. ME prolonged both aPTT and PT in human citrated plasma also. These results suggest that the methanol extract from Mume Fructus have antithrombosis activity.

Keywords □ Platelet, Mume Fructus, antithrombosis, fibrinolysis, anticoagulant

혈전증은 생체내의 심혈관 및 혈관 내에서 혈액의 응고, 즉 혈전이 형성된 것으로 혈액이 혈관계 내를 흐르는 동안 생리적 손상을 받을 경우 혈액 성분의 하나인 혈소판이 침착하는 기전으로부터 발생된다. 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며, 정상적으로 순환되는 동안에는 혈전이 형성되지 않는다. 그러나, 여러 가지 병적인 요인으로 인해 균형이 깨지게 되면, 혈액의 흐름이 원활하지 못하게 되고 이로 인한 심혈관계 질환이 발생하게 된다. 따라서 혈액의 기능적 이상 및 순환 이상 발생은 다양한 혈관계 질환을 유발하게 되며, 이러한 기능 및 순환 장애가 뇌 및 심장 등에서 나타나는 경우, 생명에 치명적이 되며, 그 후유증 또한 심각하다.¹⁻⁴⁾

최근 우리나라에서도 경제수준의 향상으로 인하여 고영양, 고단백 등 식생활 양상의 변화에 따라 선진국과 같이 심혈관계질환으로 사망하는 인구수가 점차 증가하고 있다. 우리나라의 사망 및 사망원인에 대한 통계결과를 보면, 암·뇌혈관질환·심장질환 순으로 나타났다. 이를 단일 질환별 사망률로 보면, 순환계 질환이 가장 앞선다. 또한 지난 10년간 추이를 살펴봐도 여전히 심혈관계 질환이 주요 사망원인별 사망률 1위를 유지하고 있다.⁴⁾

현재까지 혈전질환의 예방 및 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 그리고 이미 형성된 혈전을 용해하는 혈전용해제 등으로 나누어져 있다. 특히 항혈소판제의 대표적인 약물로 사용되고 있는 아스피린은 항응고 효과가 탁월하지만 위장 장애 등의 부작용을 일으키며,⁵⁾ 그 외에 항응고제로 사용하고 있는 헤파린이나 쿠마린 등은 너무 고가의 약물이기 때문에 손쉽게 사용하기 어렵다. 따라서 약물의 부작용을 줄이면서도 동일한 효능을 보이는 물질을 찾기 위하여 천연물 또는 한방처방으로부터 혈액순환 개선 작용을 하는 물질에 대한 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다.^{6,7)}

본 연구에서는 천연물을 대상으로 항혈소판 응집억제와 혈전용해 효과를 중심으로한 혈행개선 소재를 발굴하고자 하였으며, 그 결과 오매(Mume Fructus)에서 항혈소판 응집억제와 혈전용해 효과를 확인하였다. 오매(Mume Fructus)는 장미과의 매실나무(*Prunus mume.*)의 덜 익은 열매를 매연으로 훈증시킨 약재를 말한다. 형태는 둥그스름한 모양이며 지름이 1.5~3 cm이며 표면은 윤기있는 흑색 혹은 갈흑색으로 주글주글하고 과핵은 단단하고 황갈색이며 표면에는 볼록한 점이 있다. 열매는 편원형으로 담황색이고 특이한 냄새가 있고 맛은 시다. 성분은 citric acid 19%, malic acid 15%, 호박산, 탄수화물, sitosterol, oleic acid를 함유하고 있다. 효능으로는 항균 작용, 항진균 작용 항알러지에 작용한다고 알려져 있지만, 혈소판 억제 및 혈전용해에 관련된 작용은 밝혀져 있지 않다.⁸⁻¹¹⁾

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-373-1021 (팩스) 031-373-1023
(E-mail) parksh0123@jungsanbio.co.kr

본 연구에서는 민간 요법으로 사용되어 온 오매(Mume Fructus)의 추출물을 대상으로 *in vitro*, *in vivo*를 통하여 혈소판 응집 억제, 혈전용해 등을 검증하였으며, 그 효과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료

본 연구의 재료는 경동시장에서 구입하여 사용하였으며, 오매 100 g을 잘게 썰어서 Methanol 1,000 ml에 넣고 100°C에서 4시간 환류 냉각 추출하였다. 이 추출액을 여과한 후, 여액을 회전 감압농축기에서 감압으로 농축하고 이 오매(Mume Fructus) 농축액을 동결 건조하여 사용하였다.

혈소판 응집 억제작용 검색

윤 등^{12,13}의 Modified smear method을 이용하여 생약추출물의 혈소판응집 억제작용을 측정하였다. 즉 오매(Mume Fructus) 추출물(ME)을 DMSO에 필요 농도로 녹여 사용하였으며 이때 DMSO의 최종 농도는 1%가 되도록 하였다. 랫트(Sprague-Dawley) 혈액을 200×g로 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 혈소판혈장(Platelet rich plasma, PRP) 0.16 ml에 시료 용액 0.2 ml을 가하고 혈소판응집 유도물질로서 ADP(Sigma-Aldrich Chemical Co., USA)를 1 µg/ml이 되도록 가한 후 37°C에서 4분간 배양하였다. 배양액으로부터 현미경하에서 혈소판의 응집도를 관찰하였다.

Fibrinolytic activity 측정

섬유소 용해 활성은 Astrup¹⁴에 의한 섬유소 평판법에 의해서 측정하였다. 섬유소원 용액은 다음과 같이 조제하였다. 0.2 M borate-saline buffer(0.05 M Na₂B₄O₇ · 10H₂O : 0.2 M H₃BO₃ - 0.05 M NaCl=2 : 8, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA)에 녹인 0.8% bovine fibrinogen 용액의 10 ml을 10 cm petri dish에 조심스럽게 붓고 이 용액에 동일 buffer에 녹여진 20 U/ml bovine thrombin(Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) 0.5 ml 첨가하여 실온에서 30분간 응고시켰다. 응고된 plate 위에 시료 10 µl가 처리된 paper disk를 조심스럽게 점적하였다. 양성 대조구로는 시료 대신 대두발효추출물(13,000 FU/g; 납두균배양추출물CK114; Greenfarmer Co. Korea)을 사용하였다. 이들 plate를 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 fibrin이 가수분해됨에 따라서 생기는 투명환의 크기를 측정하였다.

Fibrinolytic activity (%)

$$= \frac{\text{Dimension of clear zone of sample/}}{\text{Dimension of clear zone of natto}} \times 100$$

DPPH법을 이용한 free radical 소거 활성

시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용하여 측정하였다.¹⁵ 에탄올에 용해시킨 0.4 M DPPH 용액 0.2 ml에 메탄올에 희석시킨 시료를 혼합하고 37°C에서 30분간 반응 후 UV-VIS spectrophotometer (Hewlett Packard. 8452A, USA)로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 메탄올을 넣었으며, DPPH용액 대신 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다.

자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{항산화력(\%)} = 100 - (\text{시료의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

Mice로부터 tail bleeding time 측정

Mice tail bleeding time은 Hornstra 법¹⁶을 수정하여 측정하였다. mice에 물, Clopidogrel, 그리고 오매추출물 50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg을 3일간 각각 경구투여 하였으며 마지막 투여 후 60분이 되었을 때 ketamin hydrochloride(75 mg/kg)으로 마취시키고 mice의 꼬리 끝으로부터 4 mm 되는 부분을 surgical blade로 자르고 꼬리의 나머지 부분을 37°C의 생리식염수에 직각으로 담갔다. Bleeding time은 꼬리를 자른 시간부터 측정하여 bleeding이 처음 멈춘 시간 까지를 기준으로 하여 측정하였다. 또한 300초 이상 bleeding이 된 경우 300초로 기록하였다.

Human 혈장준비

채혈 지원자는 성인남자로 선정하고 채혈하기 일주일 전부터 아스피린이나 비스테로이드 항염증약을 복용하지 않도록 하였다. 일정시간에 채혈 한 후 혈액응고가 일어나지 않도록 하기 위해서 3.2% sodium citrate 항응고제가 들어있는 vacutainer(Becton Dickinson, USA)에 분주하여 잘 혼합하였다. 그리고 혈액을 200×g에 10분간 원심분리하여 상층액의 PRP(platelet rich plasma)를 얻었다. 혈소판 수는 혈구분석기(Sysmex, JP)로 측정하였다.

Activated partial thromboplastin time(aPTT) 측정

내인성 혈액응고 과정의 항응고 활성은 activated partial thromboplastin time(aPTT)으로 측정하였다. aPTT 측정은 생리식염수로 희석한 PRP 50 µl에 시료용액을 넣고 교반한 후 37°C 항온수조에서 1분간 가온하였다. 여기에 50 µl Actin® FS(Dade behring. Germany)을 첨가한 후 20 mM CaCl₂(Dade behring. Germany) 50 µl를 넣음과 동시에 응고시간을 측정하였다. Clotting time 측정은 Sysmex CA-540(Sysmex Co., Japan)으로 측정하였다.

Prothrombin time(PT)

외인성 경로에 기인하는 항응고 활성은 prothrombin time(PT)

으로 측정하였다. 생리식염수로 희석한 PRP 50 μ l에 시료용액 넣고 교반한 후 37°C 항온수조에서 1분간 가온하였다. 여기에 Thromborel[®] S(Dade behring, Germany) 100 μ l를 가한 후 응고시간을 측정하였다. Clotting time 측정은 Sysmex CA-540 (Sysmex Co., Japan)으로 측정하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균±오차(mean±SE)로 나타내었다. 통계 처리는 Student t-test로 검정하였고 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

실험 결과 및 고찰

혈소판 응집 억제 활성

혈소판 응집을 억제하는 물질은 혈소판 응집 유도 물질에 의한 응집 억제에도 영향을 줄 것으로 예상하고 Modified smear method^{12,13}방법을 이용하여 민간에서 사용하는 혈행개선에 관련된 생약 수종을 검색하였다(data not shown). 각각의 추출물

을 PRP에 혼합한 후 ADP에 의해서 혈소판의 응고를 유도 시켰다. Fig. 1A에서 대조군으로 PRP에 최종농도가 1% DMSO가 되도록 하여 단독 처리 하였을 때는 혈소판 응집이 일어나지 않았다. 그러나 Fig. 1B에서, 최종농도가 1% DMSO가 되도록 처리 후 ADP를 처리하였을 때 혈소판 응집이 유도 되었다. 오매(Mume Fructus) 추출물에서는 응고 유도물질에 의한 혈소판 응집이 1 mg/ml에서 약하게 일어났다 그러나 2 mg/ml, 4 mg/ml의 농도에서는 혈소판 응집 반응이 일어나지 않는 것이 확인 되었다. 또한 양성대조군으로 사용한 4 mg/ml clopidogrel에서도 혈소판 응집이 일어나지 않았다(Fig. 1). 오매(Mume Fructus) 추출물의 일정 농도이상에서 혈소판 응집이 억제되는 것으로 보아 이는 혈소판 응집억제에 작용하는 물질을 함유하고 있을 것으로 생각된다.

DPPH radical 소거능

오매(Mume Fructus) 추출물의 free radical scavenging 활성 측정은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정하였다. 오매(Mume Fructus) 추출물은 사용된 범위 내에서 농도 의존적으로 radical-scavenging 효과가 나타났으나, IC₅₀값이 185.1 μ g/ml로 항산화 효과는 거의 없는 것으로 판단되었다(Table I).

혈전용해 활성

혈관이 생리적 손상을 받을 경우 혈소판의 침착으로 혈전이 발생하는데 이러한 혈전을 오매(Mume Fructus) 추출물이 용해하는지를 Fibrin plate method에 따라 농도별로 점적하여 혈전 용해 활성을 측정하였다. 투명환의 면적은 양성 대조군으로 사용한 대두발효추출물의 면적과 비교하였다. 양성대조군인 대두발효추출물을 2 mg/disk를 점적하고, 오매 추출물은 1 mg/disk, 2 mg/disk 그리고 4 mg/disk로 점적한 다음 37°C incubator에서 1시간 동안 방치하였다. 용해된 투명환의 크기를 측정할 결과 양성대조군인 대두발효추출물에서는 1.0±0.0 cm의 투명환이 측정되었고, 오매(Mume Fructus) 추출물 투여군은 2 mg/disk 그리고 4 mg/disk에서 각각 1.1±0.2 cm, 1.3±0.1 cm의 투명환이 측정되었다. 그러나 1 mg/disk에서는 반응이 없었다(Table II). 오매 추출물은 대두발효추출물에 비해 2 mg/disk 그리고 4 mg/disk에서 각각 100%, 130% 정도의 활성을 보였다. 본 연구에 사용한 오매 추출물은 다양한 물질이 혼재된 상태임을 고려할 때 활

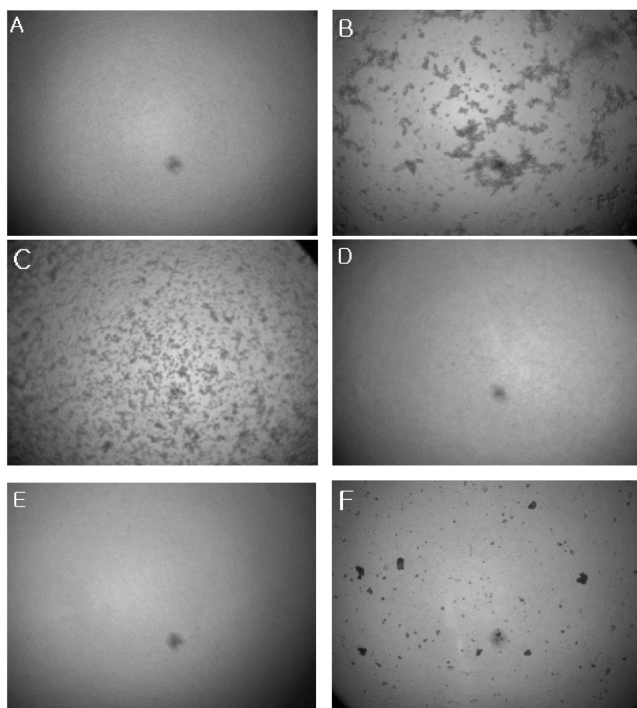


Fig. 1 – Effect of Mume Fructus extract (ME) on the ADP-induced Rat platelets aggregation. Platelets were preincubated with various concentrations of extract of Mume Fructus extract and then stimulated with 1 μ g/ml ADP at 37°C for 4 min. (A) DMSO and saline, (B) DMSO and 1 μ g/ml ADP, (C) 1 mg/ml ME and 1 μ g/ml ADP, (D) 2 mg/ml ME and 1 μ g/ml ADP, (E) 4 mg/ml ME and 1 μ g/ml ADP, (F) 4 mg/ml Clopidogrel.

Table I – Free radical scavenging of Mume Fructus extract (ME)

Concentration (μ g/ml)	Scavenging (%)	IC ₅₀ (μ g/ml) ¹⁾
25	20	
50	28	
100	37	185.1
200	56	
400	84	

¹⁾IC₅₀ value is the concentration of sample required for 50% inhibition.

Table II – Effect of Mume Fructus extract (ME) on fibrinolytic activity

Sample	Clear zone ¹⁾ (cm)
Natto 2 mg/disc	1.1±0.0 ²⁾
ME 2 mg/disc	1.1±0.2
ME 4 mg/disc	1.3±0.1*

¹⁾Average diameter of clear zone

²⁾Each value is mean±S.E (n≥3)

*Significantly different from the control group at p<0.05

성물질을 정제하면 높은 혈전용해 효과가 나타날 수 있을 것으로 추측된다. *In vitro*에서 혈소판 응집 억제와 혈전용해능은 농도의존적인 결과로 나타났으며, 이는 *in vivo*에서도 혈소판과 혈액 응고계의 항혈전작용 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

Mice로부터 tail bleeding time 효과

혈소판과 혈장인자들 그리고 혈관과 연관된 hemostatic plug가 형성되는 능력을 측정하기 위하여 tail bleeding time을 측정하였다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 오매(Mume Fructus) 추출물을 3일간 경구 투여 후, mouse tail bleeding time system을 이용하여 혈행개선 효과를 시험하였다. 물을 투여한 대조군의 경우 77.6±5.7초 이었다. 이는 김 등¹⁷⁾과 Kano 등²⁰⁾의 보고와 비슷한 시간으로 나왔다. 양성대조군으로 Clopidogrel을 3 mg/kg으로 투여하였을 때 300초 이상 연장되었다. 오매(Mume Fructus) 추출물의 농도를 50 mg/kg, 100 mg/kg, 그리고 250 mg/kg으로 하여 투여한 실험군의 경우 각각 124.6±4.5, 215.8±4.0, 그리고 300초 이상 bleeding time이 연장되었다(Table III).

혈액응고

Steinhoff 등²¹⁾에 의하면 인간과 설치류 간에 혈소판의 수용기에 차이가 있다고 하였다. 따라서 설치류에서 효능이 검증된 오매(Mume Fructus) 추출물에 대한 사람의 혈액 응고에 미치는 영향을 평가 하였다. 김 등²¹⁾의 보고에 의하면 정상인의 경우 aPTT 23.9~38.0초 PT의 경우 9.3~12.4초 나왔다. 본 실험에서도 대조군으로 사용한 생리식염수에서의 aPTT와 PT의 값은 29.7±1.8, 8.7±0.1로 각각 나타났다. 이는 김 등²²⁾의 보고한 정

Table III – Effect of Mume Fructus extract (ME) on mouse tail bleeding time

Group	N	Concentration (mg/kg)	Tail bleeding time (seconds)
Control	8	Vehicle (Water)	77.6±5.7
Clopidogrel	8	3	>300*
	8	50	124.6±4.5*
ME	8	100	215.8±4.0*
	8	250	>300*

Values are mean±S.E

*Significantly different from the control group at p<0.05

Table IV – Effect of Mume Fructus extract (ME) on the aggregation of human platelets

Group	Concentration (mg/ml)	APTT (seconds)	PT (seconds)
Control	Vehicle (DMSO)	29.7±1.8	8.7±0.1
Clopidogrel ME	2.5	61.6±4.2*	22.3±0.8*
	1	32.6±3.4	10.1±0.8*
	2.5	53.0±8.9*	17.2±3.1*
	4	>120*	>60*

Values are mean±S.E

*Significantly different from the control group at p<0.05

상인의 범위에 포함된다. 그리고 양성 대조군으로 사용한 2.5 mg/ml의 clopidogrel의 aPTT와 PT의 값은 61.6±4.2초, 22.3±0.8초로 각각 나타났다. 오매(Mume Fructus) 추출물을 처리한 군에서는 1, 2.5, 4 mg/ml에서 농도 의존적으로 응집이 연장되었다. 즉 aPTT, PT의 값은 1 mg/ml에서는 정상범위에 포함되었으며, 2.5 mg/ml에서는 각각 53.0±8.9초, 17.2±3.1초 그리고 4 mg/ml에서는 각각 120초 이상, 60초 이상으로 나왔다(Table IV). 이 결과, 오매 추출물은 사람의 혈액에서도 혈액 응고 저해 효과가 나타났다. 일반적으로 항혈전 활성이 매우 우수한 것으로 알려진 단삼 추출물의 경우 혈액응고 저해와 혈전용해 두 가지 효능이 있다고 하였다.²³⁾ 본 연구에 사용한 오매의 경우에도 단삼과 같이 혈액응고 저해 및 혈전용해 모두에서 효능이 있었다. 이는 오매 추출물이 혈전 예방과 치료에 유용할 것으로 판단된다. 따라서 혈전용해 및 혈소판의 응집억제작용을 모두 가지고 있는 오매의 혈행개선 성분 및 기전에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 한국에서 민간요법으로 사용되고 있는 장미과의 매실나무(*Prunus mume.*)의 덜 익은 열매를 매연으로 훈증시킨 오매(Mume Fructus) 추출물을 이용하여 혈소판의 응고, 항산화능, 혈전용해, mice tail bleeding time, aPTT, 그리고 PT에 미치는 효과를 알아보았다. 그 결과, 혈소판 응고 억제, 혈액 응고시간 연장 및 혈전용해 활성 모두에 효과가 좋은 것으로 나타났다. 따라서 오매(Mume Fructus) 추출물은 혈액 응고 억제와 혈전용해 작용을 동시에 가진 소재로 혈관계에서 발생하는 혈전을 조절하여 혈전 예방과 치료에 유용할 것으로 판단된다.

참고문헌

- 1) 김춘원 : 病理學, 신광출판사, 서울 p. 66 (1983).
- 2) 손태중 : 病理學 概論, 고문사, 서울 p. 84 (1982).
- 3) Marks, D., Marks, A. and Smith, C. : *Basic Medical Biochemistry*, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 107 (1996).

- 4) Korea National Statistical Office. A study on causes of death for 2007.
- 5) Miwa, K., Kambara, H. and Kawai, C. : Effect of aspirin in large doses on attacks of variant angina. *Am. Heart J.* **105**, 351 (1983).
- 6) Jeon, W.-K., Kim, H.-K., Lee, J.-H., Ko, B.-S., Lee, A.-Y., Lee, K.-G. and Shin, H.-K. : Study on Anti-thrombotic Activities of KIOM2003-080. *Korean Journal of Oriental Medicine* **13**, 143 (2007).
- 7) Lee, M. S., Roh, S. S., Lim, R. C., Song, H. C., Shin, S. S. and Kim, S. H. : Antithrombotic activity and protective effects of hexane fraction of kamihylbuchukeotang (KHBCT) on brain injury by KCN and MCA occlusion. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**, 373 (2000).
- 8) 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 : 중약대사전 도서출판 정담 p. 3952 (1998).
- 9) Kwon, H. A., Kwon, Y. J., Kwon, D. Y. and Lee, J. H. : Evaluation of antibacterial effects of a combination of Coptidis Rhizoma, Mume Fructus, and Schizandrae Fructus against Salmonella. *Int. J. Food Microbiol.* **30**, 180 (2008).
- 10) Choi, J. H., Kang, O. H., Park, P. S., Cane, H. S., Oh, Y. C., Lee, Y. S., Choi, J. G., Lee, G. H., Kweon, O. H. and Kwon, D. Y. : Mume Fructus water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Med. Food* **10**, 460 (2007).
- 11) Shen, H., Cheng, T., Qiao, C., Su, Z. and Li, C. : Antitumor effect in vitro and immuno-response in vivo of fructus Mume. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **20**, 365 (1995).
- 12) Yun-Choi, H. S., Kim, S. O., Kim, J. H., Lee, J. R. and Cho, H. I. : Modified smear method for screening potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources. *J. Nat. Prod.* **48**, 363 (1985).
- 13) Yun-Choi, H. S., Kim, J. H. and Lee, J. R. : Screening of potentialinhibitors of platelet aggregation from plant sources (II). *Kor J Pharmacogn.* **17**, 19 (1986).
- 14) Astrup, T. and Mullertz, S. : The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* **40**, 346 (1952).
- 15) Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1198 (1958).
- 16) Hornstra, G., Christ-Hazelh, C., Haddeman, E., ten Hoor, F. and Nugteren, D. H. : Fish oil feeding lowers thromboxane and prostacyclin production by ratplatelets and aorta and doses not result in the formation of prostaglandin I₃. *Prostaglandins.* **21**, 727 (1981).
- 17) Kim, Y.-D., Bae, O.-N., Chung, S.-M. and Chung, J.-H. : improvement of haemostasis mediated by anti-platelet activities by plant vinegar. *J. Toxicol. Pub. Health* **20**, 137 (2004).
- 18) Fox, J. G., Barthold, S., Davisson, Newcomer, C. E., Quimby, F. W. and Smith, A. : The mouse in biomedical research. Second edition. Academic Press. p. 157 (2007).
- 19) Wang, X. and Xu, L. : Anoptimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research. *Thromb Res.* **115**, 95 (2005).
- 20) Makino, T., Wakushima, H., Okamoto, T., Okukubo, Y., Saito, K. and Kano, Y. : Effects of kangern-karyu on coagulation system and platelet aggregation in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 523 (2002).
- 21) Steinfoff, M., Buddenkotte, J., Shpacovitch, V., Rattenholl, A., Moormann, C., Vergnolle, N., Luger, T. A. and Hollenberg, M. D. : Proteinase-activated receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev.* **26**, 1 (2004).
- 22) Kim, H. S., Nam, K. H. and Lee, D.-H. : Measurement of PT, APTT, and fibrinogen by automatic coagulation analyzer, sysmex CA-540. *J. Clin. Pathol. & Quality Control.* **22**, 1 (2001).
- 23) Yang, S.-A., Im, N.-K. and Lee, I.-S. : Effects of methanolic extract from salvia miltiorrhiza bunge on *in vitro* antithrombotic and antioxidative activities. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 83 (2007).