

탕전기의 抽出方法에 따른 加味玄附理經湯의 抗血栓 效能 比較 研究

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
정지혜, 이순이, 장윤정, 최창민, 조한백, 김송백

ABSTRACT

Comparative Study on Anti-thrombotic Effects of *Gamihyunbooleekyungtang* with Decoction Method

Ji-Hye Jeong, Soon-Yee Lee, Yun-Jeong Jang,
Chang-Min Choe, Han-Baek Cho, Song-Baeg Kim
Dept. of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose: In this study, we investigated anti-thrombotic effects of *Gamihyunbooleekyungtang* currently used clinical treatment of dysmenorrhea and compared effects by decoction methods.

Methods: *Gamihyunbooleekyungtang* was extracted by pressure extractor (GHYT) and nonpressure extractor(GHYT-1). Inhibitory effect of platelet cohesion, suppression effect of GPIIb/IIIa activity, inhibitory effect of TXB₂ and PGE₂ biosynthesis, and oxidative damage suppression effect were tested in vitro. Also suppression of pulmonary embolism was studied in vivo.

Results: In this study, both GHYT and GHYT-1 extract showed a safety in cytotoxicity of hFCs. Both showed dose-dependent inhibitory effect on platelet coagulation. GHYT-1 extract is usually higher than GHYT, especially for E_{max}. GHYT and GHYT-1 extract showed dose-dependent inhibitory effect on GPIIb/IIIa activities. GHYT extract suppressed significantly TXB₂ biosynthesis at 1000, 500 µg/ml and also suppressed significantly PGE₂ biosynthesis at 1000 µg/ml as compared with the control group. GHYT-1 suppressed significantly TXB₂ biosynthesis at 1000 µg/ml as compared with the control group. Also it suppressed pulmonary embolism triggered by collagen and epinephrine by respectively 50%, 75% as compared with the control group. Both GHYT and GHYT-1 extract showed dose-dependent decrease of oxidative damages caused by DPPH, whereas dose-dependent increase of superoxide dismutase like activity was observed.

Conclusion: These results suggest that *Gamihyunbooleekyungtang* can be used for treating dysmenorrhea caused by thrombosis. Nonpressure decoction method is a little more effective, but more detailed studies would be needed.

Key words: *Gamihyunbooleekyungtang*(GHYT), anti-thrombosis, dysmenorrhea, decoction method

I. 緒 論

玄附理經湯은 《晴崗醫鑑》¹⁾에 수록된 처방으로, 順氣 活血 化瘀 효능을 지니고 있어 氣滯血瘀로 인한 月經痛에 활용되고 있다.

“痛經”, “經行腹痛”, “經期腹痛” 등으로도 불리는 月經痛은 氣滯血瘀型, 寒濕凝滯型, 氣血虛弱型, 肝腎虧損型으로 변증되고 각각의 기본처방으로는 玄府理經湯, 少腹逐瘀湯, 十全大補湯, 大營煎등이 있다²⁾. 이 중에서 氣滯血瘀가 원인인 경우에는 氣機가 잘 통하지 않아서 血을 잘 운행하지 못하여, 瘀血이 형성되어 行經이 阻滯되므로 月經痛이 발생한다³⁾.

瘀血이란 혈액으로서 기능을 잃고 인체에 유해한 작용을 하는 것으로 혈액순환장애로 인한 혈류정체의 병리적 상태와 산물인 동시에 각종 질병을 유발하는 요인이 된다⁴⁻⁶⁾. 韓醫學에서 瘀血은 서양의학으로 보면 대체로 혈액순환 장애와 염증의 범주에 속하며⁵⁾ 혈관손상, 염증 및 혈액응고 기전 장애로 이해된다⁷⁻⁸⁾. 瘀血이 혈액학적 분석지표로 활용되기 시작하면서 혈액순환 장애, 혈액성분 변화, 결체조직의 증식 및 변성 등으로 해석되고 있으며, 血栓과 가장 유사한 개념으로 인식되고 있다⁹⁻¹¹⁾. 그 치료법으로는 주로 活血化瘀法을 사용하는데 이러한 치료법이 血栓으로 인한 질환에 효과가 있음이 많이 보고된다¹⁰⁾.

이에 대한 연구로는 月經痛 및 주기성 골반동통에 관한 여러 연구¹²⁻¹⁷⁾등이 있고, 抗血栓에 대한 실험적 연구로는 芎歸湯加味方¹⁸⁾, 坐宮丹¹⁹⁾, 和血通經散²⁰⁾, 加味生化湯²¹⁾ 등²²⁻²⁵⁾이 抗血栓에 유효하다는 보고가 있었다. 玄附理經湯加減이

氣滯血瘀型 月經痛에 진통효과가 있다는 임상 보고가 있었으나²⁶⁾, 抗血栓 효능에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 活血化瘀 理氣止痛하는 加味玄附理經湯의 抗血栓 효능을 규명하고 임상에서 당전 시 많이 사용되고 있는 압력식과 무압력식 추출방법에 따른 효능의 차이가 있는지 보기위해 加味玄附理經湯을 압력식 약탕기와 무압력 순환식 황토 약탕기 두 가지 방법으로 추출하고 in vitro에서는 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid에 의한 혈소판 응집 억제 효과, GPIIb/IIIa 활성화 억제 효과, TXB₂와 PGE₂ 생성 저해능에 대한 실험을 수행하였고, in vivo에서는 폐색전 유발 억제 효과에 대한 실험을 수행하였으며 血栓의 병리적 인자인 산화적 손상에 대한 항산화 효능에 대한 실험을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 18~20g의 ICR (International Cancer Research-대한실험동물센터, 충청북도 음성)계 생쥐로, 실험 당일까지 식이는 (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℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간 (07:00-19:00), 조도 150~300 Lux로 설

정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약재본 실험에 사용한 加味玄附理

經湯 (*Gamihyunbooleekyungtang* 이하 GHYT로 표기)의 처방구성 약재는 원광대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 한 첩 용량은 다음과 같다.

Table 1. The Prescription of *Gamihyunbooleekyungtang* (GHYT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
香附子	<i>Rhizoma Cyperi</i>	8
鷄血藤	<i>Caulis Spatholobi</i>	8
蒼朮	<i>Rhizoma Atractylodis Japonicae</i>	4
烏藥	<i>Radix Linderae</i>	4
玄胡索	<i>Rhizoma Corydalis</i>	4
陳皮	<i>Pericarpium Citri Reticulatae</i>	4
當歸	<i>Radix Angelicae Sinens</i>	4
白芍藥	<i>Radix Paeoniae alba</i>	4
川芎	<i>Rhizoma Chuanxiong</i>	4
枳殼	<i>Fructus Ponciri Seu Aurantii</i>	4
蓬朮	<i>Rhizoma Zedoariae</i>	4
挑仁	<i>Semen Persicae</i>	4
肉桂	<i>Cortex Cinnamomi</i>	2
木香	<i>Radix Saussurea Seu Inulae</i>	2
紅花	<i>Carthami Flos</i>	2
Total		62

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 PRP는 대전혈액원 (Korea)에서 공급 받았고, Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, collagen, epinephrine, tris-HCl, NaCl, CaCl₂, polyethylene glycol, trysin-EDTA 7.2 mM pyrogallol, 150 mM DPPH, 2 mM EDTA는 Sigma (U.S.A) 제품을 사용하였고, tris-HCl buffer(pH8.5)는 한국 바이오 세상 제품을, normal saline은 중외제약 (Korea) 제품을, arachidonic acid reagent, epinephrine reagent, ADP reagent, collagen reagent은 Chrono-Log (U.S.A) 제품을, aspirin은 바이엘 (U.S.A) 제품을, PAC-1-FITC는 Becton dickinson

(U.S.A) 제품을, prostaglandin E₂ EIA kit와 thromboxane B₂ EIA kit는 Cayman chemical (U.S.A)등 제품을 사용하였다.

기기는 centrifuge (Beckman Co., U.S.A.), rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), deep freezer (Sanyo Co., Japan), freeze dryer (Eyela Co., Japan), autoclave (sanyo Co., Japan), roller Mixer (Gowon scientific technology Co., Korea), vortex (Vision Co., Korea), platelet aggregation profiler model PAP-4 (BIO/DATA Co. U.S.A), High speed centrifuge (Hanil. Korea), FACS calibur (Becton Dickinson U.S.A.), ELISA reader (Molecular devis. U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 약물 추출

加味玄附理經湯 10첩을 압력 약탕기 (경서 기계 산업: GHYT)에 넣고 증류수 2500 ml를 가한 후, 3시간 가열 추출하였고, 또 다른 무압력 황토 약탕기(세라믹 약탕기(주): GHYT-1)에도 같은 방법으로 약물을 추출 하였다. 침전물을 3회 여과 (3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하였다. 압력 약탕기에서는 加味玄附理經湯 1첩 당 11.3 g, 무압력 황토 약탕기에서는 加味玄附理經湯 1첩 당 8.9 g의 분말을 얻어서, 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) *In vitro*

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 hFCs로 SRB assay 법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 x 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 압력식, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물(최종 농도 500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA를 50 µl를 가하여 1시간 동안 4 °C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용

액 (1% acetic acid 용액의 0.4% 용액) 100 µl를 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base (100 µl)로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 흔들어 준 후 ELISA Reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 血小板 凝集 (Platelet aggregation) 측정^{27,28)}

12시간 이상 공복을 유지한 지원자의 상박 정맥으로부터 채혈한 혈액을 3.8% 구연산나트륨이 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣었다. 이를 원심분리 (900 rpm 10분)하여 상등액으로부터 PRP를 얻고 잔액을 다시 원심분리 (3,000 rpm 10분)하여 PPP를 얻었다. PRP는 채취 즉시 변화를 막고 얼음이 들어 있는 용기에 방치하였다.

약물의 抗血小板 응집 효과 측정은 platelet aggregation profiler model PAP-4를 사용하였으며, 최종 농도는 ADP 8 µM, epinephrine 10 µM, collagen 4 µg/ml과 arachidonic acid 1 mM이 되도록 하였다. Micro-magnetic bar를 넣은 silicon-treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation 시킨 PRP 320 µl와 압력식, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 40 µl를 각각 넣고 다시 incubation한 후 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid를 각각 40 µl를 가하여 5분간 반응시켰다.

실험군은 증류수에 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 3분간 incubation 하였다. 실험의

처음과 마지막에는 PRP에 volume을 맞추기 위해 생리식염수 40 μ l를 가한 뒤 최대 응집율 (%)을 측정하여 채혈 후 시간 경과로 인한 血小板 변질로 나타날 수 있는 실험 오차를 방지하였으며, PRP를 얻은 후 2시간 안에 모든 실험을 진행시켰다. 실험 조작 동안 온도는 37°C로 유지하고 교반 속도는 500-1,500 rpm으로 하며 528 nm에서 응집도를 측정하였다.

Aggregation이 억제되는 정도를 다음 식에 의거하여 transmission maximum reduction percent를 산출하였다.

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

A = 대조군의 maximum aggregation %

B = GHYT, GHYT-1 투여군의 maximum aggregation %

(3) GPIIb/IIIa binding assay

GPIIb/IIIa binding assay는 Peter의 실험 방법²⁹⁾을 변형하여 실시하였다. PRP는 대전혈액원으로부터 공급받아 사용하였다. PRP는 tyroid buffer (129 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 8.9 mM NaHCO₃, 0.8 mM mgCl₂, 0.8 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 10 mM Hepes, 0.35% BSA, pH 7.4)를 이용하여 농도가 3 x 10⁸ platelets/ml 이 되도록 조정하였다. 이를 2 x 10⁸ platelets/ml로 희석한 후 collagen (5 μ g/ml)과 각 농도 (1,000, 500, 250 μ g/ml)의 압력식, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물을 더하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 수세하였다. 수세 후 PAC-1 (20 μ g/ml)을 더하여 4°C에서 30분간 반응 후 flow cytometry를 이용하여 측정하였다.

(4) TXB₂, PGE₂ 측정

혈소판 (3 x 10⁸ platelets/ml)에 collagen (50 μ g/ml)과 압력식, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물을 각각의 농도 (1,000, 500, 250 μ g/ml)로 혼합하여 37°C에서 3분간 반응 시킨 후 2 mM EDTA와 200 μ M indomethacin을 가하여 반응을 정지시켰다. 2분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 TXB₂와 PGE₂를 thromboxane B₂ EIA kit와 prostaglandin E₂ EIA kit로 측정하였다.

(5) 항산화 활성 측정

① DPPH 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 150 μ l에 압력식, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물을 1000, 500, 250, 125, 62.5 μ g/ml 농도로 희석하여 100 μ l씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

DPPH 소거능(%) =

$$\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{GHYT, (GHYT-1 extract 투여군의 흡광도)}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

② Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정

압력식, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 0.2 ml에 tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10분간 반응 후 1N HCl 0.1 ml로 반응을 정지시켰다. 반응액을 420 nm에서 흡광도를 측정하고, buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 활성도를 측정하였다.

SOD 유사활성(%) =

$$100 - \left(\frac{\text{GHYT, GHYT-1 extract 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) In vivo

(1) 폐색전 (Pulmonary thrombosis) 유

발 실험

실험적 血栓의 유도는 Kimura의 실험 방법³⁰⁾에 준하여 실시하였다. 실험동물은 몸무게 약 18-20 g 정도의 수컷 ICR계 mouse를 사용하였고, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군은 25 g ICR계 mouse를 기준으로 검액 4.7 mg을, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군은 25 g ICR계 mouse를 기준으로 검액 3.7 mg 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 血栓의 유발은 血小板 응집 시약 (11.3 μ g의 collagen과 1.3 μ g의 epinephrine)을 HBSS 200 μ l에 함유되도록 조제하였고, ICR계 mouse의 몸무게 25 g당 200 μ l의 용량으로 미정맥에 주사하였다. 실험동물을 실험 전 24시간 절식시킨 후 血小板 凝集 유발 시약의 정맥 주사 2시간 전에 상기한 농도의 압력식, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물을 ICR계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 0.1 mg/g을 경구 투여하였다. 抗血栓 효과는 血小板 凝集 시약의 투여로 인하여 발생하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였으며, 여기서 마비는 15분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

4) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계 처리하였으며 정상군과 비교는 + P<0.05 또는 ++ P<0.01, +++ P<0.001 수준으로, 대조군과 비교는 * P<0.05 또는 ** P<0.01, *** P<0.001 수준에서 유의성을 검정하여 나타내었다.

Ⅲ. 成 績

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 100 \pm 5.8 (%)로 나타난 반면, 압력식 加味玄附理經湯 추출물의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (μ g/ml) 농도 투여군에서는 각각 88.2 \pm 4.7, 97.1 \pm 3.1, 97.6 \pm 2.7, 105.6 \pm 4.6, 114.5 \pm 2.8(%)로 나타내었고, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (μ g/ml) 농도 투여군에서는 각각 87.6 \pm 3.8, 94.5 \pm 2.9, 96.5 \pm 4.1, 97.1 \pm 3.8, 101.4 \pm 3.0 (%)로 나타내었다(Fig. 1).

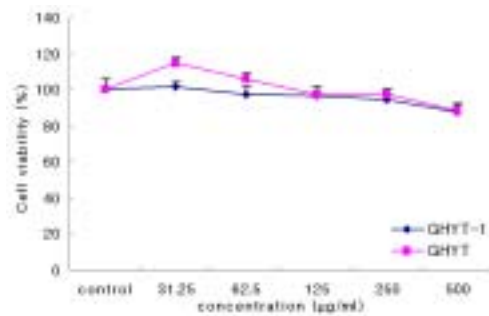


Fig. 1. Cytotoxicity of GHYT, GHYT-1 extract on human fibroblast cells. Human fibroblast cells were treated with various concentration of the GHYT, GHYT-1 extract. The results are the mean \pm S.D.

2. 血小板 凝集 (Platelet Aggregation)에 미치는 영향

1) ADP에 의한 血小板 凝集에 미치는 영향

ADP (8 μ M)에 의한 血小板 凝集 억제 효과를 검색한 결과, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 20, 10, 1, 0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 95.3 \pm 0.2, 81.9 \pm 0.2, 30.8 \pm 3.5, 7.6 \pm 1.5, 2.5 \pm 0.5 (%)의 凝集 억제율을 나타내었고, 무압력식 加味玄附

理經湯 추출물 20, 10, 1, 0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 82.1±6.7, 57.8±0.1, 7.65±1.6, 1.7±0.%, 0.65±0.7 (%)의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

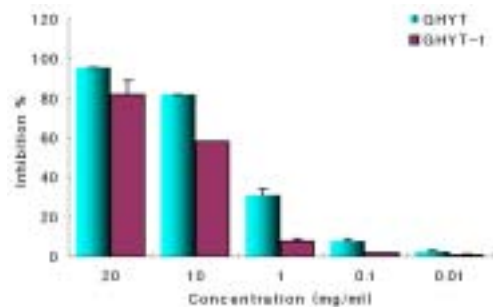


Fig. 2. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on human platelet aggregation with 8 μ M of ADP.

Platelets were pre-incubation for 5 mins with various concentrations of GHYT, GHYT-1 extract at 37°C before stimulation with 8 μ M of ADP. The results are the mean ± S.D.

2) Epinephrine에 의한 血小板 凝集에 미치는 영향

Epinephrine (10 μM)에 의한 血小板 凝集 억제 효과를 검색한 결과, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 20, 10, 1, 0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 43.8±12.5, 22.9±2.5, 10.2±7.8, 0, 0 (%)의 凝集 억제율을 나타내었고, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 20, 10, 1, 0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 72.4±3.5, 41.6±5.5, 2.0±2.0, 2.25±2.3, 0 (%)의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

3) Collagen에 의한 血小板 凝集에 미치는 영향

Collagen (4 μg/ml)에 의한 血小板 凝集 반응 억제 효과를 검색한 결과, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 20, 10, 1, 0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 42.2±4.8, 24.2±3.9, 20.5±0.2, 25.2±0.2, 2.0±2.0 (%)의 凝集 억제율을 나타내었고, 무압력식

加味玄附理經湯 추출물 20, 10, 1, 0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 67.8±5.3, 24.9±3.1, 6.0±3.0, 0±0.0, 0±0.0 (%)의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 4).

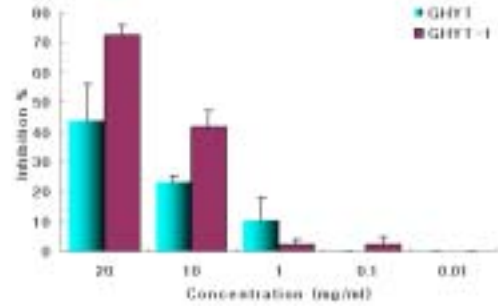


Fig. 3. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on human platelet aggregation with 10 μ M of epinephrine.

Platelets were pre-incubation for 5 mins with various concentration of GHYT, GHYT-1 extract at 37°C before stimulation with 10 μ M of epinephrine. The results are the mean ± S.D.

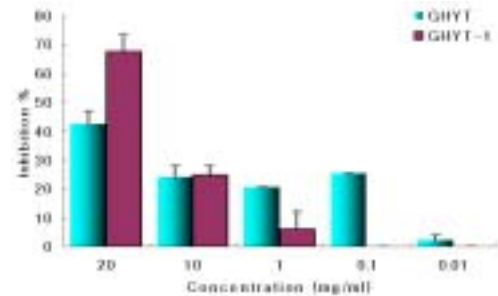


Fig. 4. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on human platelet aggregation with 4 μ g/ml of collagen.

Platelets were pre-incubation for 5 mins with various concentrations of GHYT, GHYT-1 extract at 37°C before stimulation with 4 μ g/ml of collagen. The results are the mean ± S.D.

4) Arachidonic acid에 의한 血小板 凝集에 미치는 영향

Arachidonic acid (1 mM)에 의한 血小板 凝集 억제 효과를 검색한 결과, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 20, 10, 1,

0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 36.2±3.3, 43.3±5.3, 20.3±2.0, 0±0.0, 0±0.0 (%)의 凝集 억제율을 나타내었고, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 20, 10, 1, 0.1, 0.01 (mg/ml) 농도에서 각각 88.0±5.0, 58.0±6.0, 13.9±0.9, 7.85±0.2, 1.21±1.2 (%)의 凝集 억제율을 나타내었다(Fig. 5).

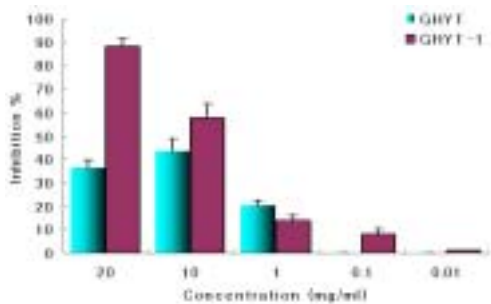


Fig. 5. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on human platelet aggregation with 1 mM of arachidonic acid. Platelets were pre-incubation for 5 mins with various concentrations of GHYT, GHYT-1 extract at 37°C before stimulation with 1

mM of arachidonic acid. The results are the mean ± S.D.

5) E_{max}와 EC₅₀값

응집 유도체로 사용한 경우, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군에서 ADP는 E_{max}가 65.0±1.8%, EC₅₀은 1.5±2.0 mg/ml로 나타났으며, epinephrine는 E_{max}가 52.6±3.7%, EC₅₀은 1.6±4.9 mg/ml, collagen의 경우는 E_{max}가 104.5±14.1%, EC₅₀은 3.3±0.2 mg/ml, arachidonic acid는 E_{max}가 34.3± 1.8%, EC₅₀은 3.2±1.2 mg/ml로 나타내었다. 또한 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군에서 ADP는 E_{max}가 93.7±7.6%, EC₅₀은 7.2±1.2 mg/ml로 나타났으며, epinephrine는 E_{max}가 96.0±3.1%, EC₅₀은 6.9±1.0 mg/ml, collagen의 경우는 E_{max}가 99.0±3.7%, EC₅₀은 5.6±0.7 mg/ml, arachidonic acid는 E_{max}가 90.3±1.2%, EC₅₀은 5.0±0.9 mg/ml로 나타내었다(Table 2).

Table 2. Pharmacodynamic Parameter Estimated by Emax Model in Win Nolin Program

Inducer	Parameter		EC ₅₀ (mg/ml)	
	E _{max} (%)			
	GHYT	GHYT-1	GHYT	GHYT-1
ADP	65.0 ± 1.8	93.7 ± 7.6	1.5 ± 2.0	7.2 ± 1.2
Epinephrine	52.6 ± 3.7	96.0 ± 3.1	1.6 ± 4.9	6.9 ± 1.0
Collagen	104.5 ± 14.1	99.0 ± 3.7	3.3 ± 0.2	5.6 ± 0.7
Arachidonic acid	34.3 ± 1.8	90.3 ± 1.2	3.2 ± 1.2	5.0 ± 0.9

The results are the mean ± S.D.

3. 血小板에서의 GP IIb/IIIa 발현에 미치는 영향

형광 유세포 분석을 통해 collagen에 의해 유발된 혈소판 응집에서 GP IIb/III a 발현을 측정된 결과, 정상군은 11.4%로 나타난 반면, 대조군에서는 99.3% 나

타나 凝集 정도가 현저하게 증가하였으며, 압력식 加味玄附理經湯 추출물의 농도가 250 µg/ml에서는 64.0%, 500 µg/ml 농도에서는 37.7%, 1000 µg/ml 농도에서는 18.2%로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 발현이 감소하였고, 무압

력식 加味玄附理經湯 추출물 역시 농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 78.7%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 57.6%, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는

26.1%로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 발현이 감소하였다(Fig. 6).

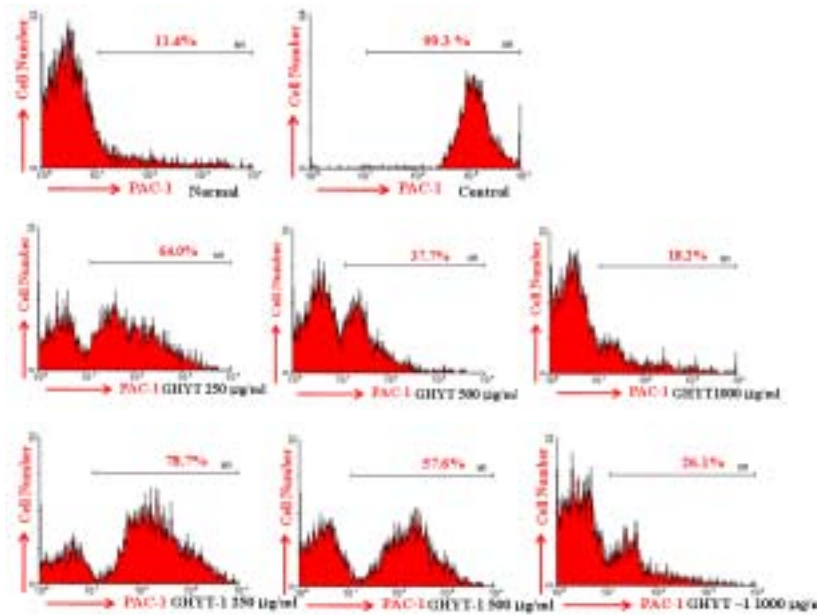


Fig. 6. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on binding of fibrinogen to platelet GPIIb/IIIa. The inhibitory effect of GHYT, GHYT-1 extract on binding of fibrinogen to platelet GPIIb/III a in collagen stimulated platelets was examined by flow cytometric analysis. Platelets were prepared and adjusted to 2×10^8 platelets/ml with modified tyroid buffer (pH 7.4). The fluorescence signal was measured 10 mins after collagen (5 $\mu\text{g/ml}$), PAC-1 (20 $\mu\text{g/ml}$) were added. The point show the fluorecence signal of collagen-activated platelets in the presence of various concentration of GHYT, GHYT-1 extract.

4. Thromboxane B₂(TXB₂) 생성 저해능에 미치는 영향

加味玄附理經湯 추출물에 의한 TXB₂의 생성 저해능을 측정 한 결과, 정상군에서는 0.29 ± 0.01 (OD), 대조군에서는 0.33 ± 0.02 (OD) 나타났으며, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 0.46 ± 0.02 (OD), 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 0.25 ± 0.03 (OD), 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 0.19 ± 0.05 (OD)로 나타나 1000, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는(*p<0.05,

*p<0.01) 감소를 나타내었고, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 0.30 ± 0.00 (OD), 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 0.30 ± 0.02 (OD), 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 0.24 ± 0.03 (OD) 나타나 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (*p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 7).

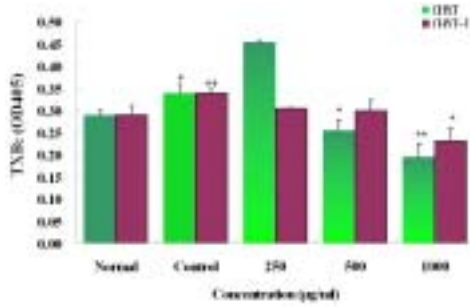


Fig. 7. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on thromboxane B₂ formation in collagen stimulated platelets.

Various concentrations of GHYT, GHYT-1 extract were pre-incubated with platelets (3×10^8 platelets/ml) at 37°C for 3 mins, followed by GHYT, GHYT-1 extract of collagen (50 µg/ml). After 6 mins the thromboxane B₂ formation was determined by 2 mM EDTA and 200 µM indomethacin.

Normal : Platelet.

Control : Platelet and collagen.

GHYT, GHYT-1 250 : Platelet, collagen add GHYT, GHYT-1 250.

GHYT, GHYT-1 500 : Platelet, collagen add GHYT, GHYT-1 500.

GHYT, GHYT-1 1000 : Platelet, collagen add GHYT, GHYT-1 1000.

Statistically significant value compared with normal by T test (+p<0.05, ++p<0.01).

Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01).

5. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 저해능에 미치는 영향

加味玄附理經湯 추출물에 의한 PGE₂의 생성 저해능을 측정 한 결과, 정상군에서는 0.20±0.01 (OD), 대조군에서는 0.38±0.02 (OD) 나타났으며, 압력식 加味玄附理經湯 추출물 250 µg/ml 농도에서는 0.34±0.03 (OD), 500 µg/ml 농도에서는 0.33±0.07 (OD), 1000 µg/ml 농도에서는 0.28±0.01 (OD)로 나타내어 1000 µg/ml 농도에서 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었고, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 250 µg/ml 농도에서는 0.39±0.06(OD), 500

µg/ml 농도에서는 0.37±0.03 (OD), 1000 µg/ml 농도에서는 0.30±0.05 (OD)로 나타내었다(Fig. 8).

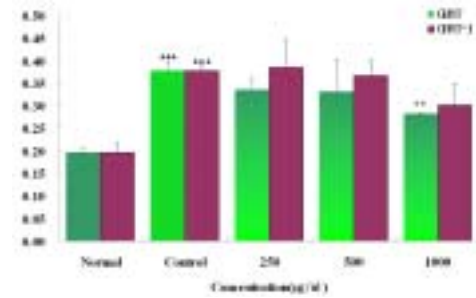


Fig. 8. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on prostaglandin E₂ formation in collagen stimulated platelets.

Various concentrations of GHYT, GHYT-1 extract were pre-incubated with platelets (3×10^8 platelets/ml) at 37°C for 3 mins, followed by GHYT, GHYT-1 extract of collagen (50 µg/ml). After 6 mins the prostaglandin E₂ formation was determined by 2 mM EDTA and 200 uM indomethacin.

Normal : Platelet. Control : Platelet and collagen.

GHYT, GHYT-1 250 : Platelet, collagen add GHYT, GHYT-1 250.

GHYT, GHYT-1 500 : Platelet, collagen add GHYT, GHYT-1 500.

GHYT, GHYT-1 1000 : Platelet, collagen add GHYT, GHYT-1 1000.

Statistically significant value compared with normal by T test (+++p<0.001).

Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01).

6. 폐색전(Pulmonary embolism)에 대한 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8마리 중 8마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속 되었다. 이에 반하여 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군은 8마리 중 4마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 50.0%

의 억제 효과를 나타내었고, 무압력식 加味 玄附理經湯 추출물 투여군은 8마리 중 2마

리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 75.0%의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of GHYT, GHYT-1 on Pulmonary Embolism Mice

	Dose (mg/mouse)	No. of killed or paralyzed / No. tested	Protection ratio (%)
Control	HBSS*	8/8	0
Aspirin	2.5	2/8	75.0
GHYT	4.7	4/8	50.0
GHYT-1	3.7	2/8	75.0

Control : Collagen(11.3 μg) and epinephrine(1.3 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}/25 \text{ g}$) treated group.
 Aspirin : Collagen(11.3 μg) and epinephrine(1.3 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}/25 \text{ g}$) treated group after oral administration of aspirin (0.1 mg/g).
 GHYT : Collagen(11.3 μg) and epinephrine(1.3 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}/25 \text{ g}$) treated group after oral administration of GHYT extract(4.7 mg/25 g).
 GHYT-1: Collagen(11.3 μg) and epinephrine(1.3 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}/25 \text{ g}$) treated group after oral administration of GHYT-1 extract(3.7 mg/25 g).

7. 항산화 활성에 미치는 영향

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 압력식 加味 玄附理經湯 추출물 1000, 500, 250, 125, 62.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 58.5 \pm 2.6, 52.0 \pm 3.7, 38.9 \pm 3.2, 7.6 \pm 4.3, -3.2 \pm 2.0 (%)의 소거 활성 효과를 나타내었고, 무압력식 加味 玄附理經湯 추출물 1000, 500, 250, 125, 62.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 66.6 \pm 4.8, 58.9 \pm 3.6, 38.7 \pm 2.0, 29.0 \pm 2.7, 25.3 \pm 0.9 (%)의 소거 활성을 나타내었다(Fig. 9).

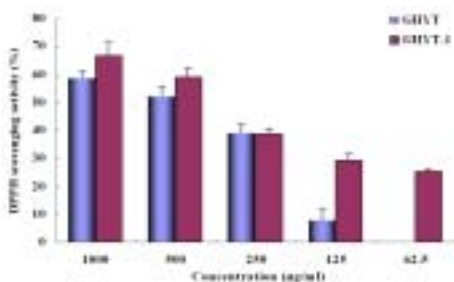


Fig. 9. Scavenging activities of GHYT, GHYT-1 extract on DPPH free radical. GHYT, GHYT-1 extract were reacted with DPPH for 30 mins at 37°C, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean \pm SD.

2) SOD 유사 활성에 미치는 영향

SOD 유사 활성은 압력식 加味 玄附理經湯 추출물 1000, 500, 250, 125, 62.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 51.2 \pm 3.5, 39.2 \pm 0.4, 31.5 \pm 6.3, 21.2 \pm 7.3, 2.3 \pm 12.5 (%)의 유사 활성 효과를 나타내었고, 무압력식 加味 玄附理經湯 추출물 1000, 500, 250, 125, 62.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 45.9 \pm 2.0, 38.7 \pm 2.3, 38.9 \pm 2.3, 21.8 \pm 5.8, 9.2 \pm 3.4 (%)의 유사 활성 효과를 나타내었다(Fig. 10).

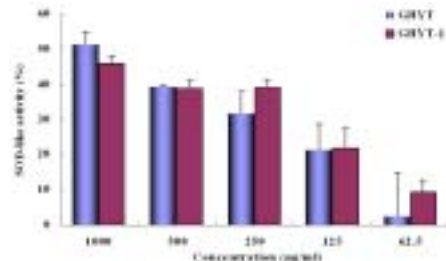


Fig. 10. Effects of GHYT, GHYT-1 extract on superoxide dismutase like activity. GHYT, GHYT-1 extract were reacted with tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 ml and 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml for 10 mins at 25°C, and determined at 420 nm after stopping the reaction by adding 0.1 ml of 1 N HCl. The results are the mean \pm S.D. of three independent experiments.

IV. 考 察

月經痛은 월경과 관련된 주기성 동통으로 월경 기간 혹은 월경기간을 전후하여 나타나는 하복부와 치골상부의 동통을 의미하며 “痛經”, “經行腹痛”, “經期腹痛” 등으로도 말한다²⁾. 서양의학에서는 주기성 골반통에 해당되며, 골반내 기질적 병변 없이 유발되는 원발성 月經痛과 골반내 근원적 병적 상태가 존재하는 속발성 月經痛으로 구분한다³¹⁾. 月經痛은 가임기 여성의 52%가 가지고 있고 이 중 10%는 매 월경 주기 마다 1-3일간은 아무 일도 할 수 없을 정도로 무력해져 활동에 지장을 초래한다는 보고가 있다³²⁾. 원인으로는 최근 난소 스테로이드 호르몬의 감소와 함께 프로스타글란딘이 증가되어 비정상적 자궁 수축이 증가되어 月經痛이 발생한다고 밝혀졌으며 약물적 치료로는 비스테로이드 소염제, 경구피임제, 프로스타글란딘 합성 억제제가 사용되나³¹⁾ 치료가 잘 안 되는 질환으로 인식되고 있고³³⁾, 일부 연구에서는 月經痛을 겪는 여대생의 40%가 진통제를 복용한다는 보고³⁴⁾가 있을 정도로 약물남용 및 부작용이 우려된다.

月經痛의 原因을 여러 醫家에서 어혈로 보았는데, 《婦人大全良方》³⁵⁾에서는 “經候頓然不行 臍腹疼痛 … 氣鬱抑而不舒 滯則血結 … 宜服桂枝桃仁湯”이라 하였고, 《萬氏婦人科》³⁶⁾에서는 “凡經水將行 腰脹腹痛者 此氣滯血實也 桃仁四物湯主之”라고 하였으며 《醫學入門》³⁷⁾에서는 “痛滯經前 虛後呼. 此言腹痛也 經事欲行 臍腹絞痛者 爲血滯”라고 하였다. 또 《濟陰綱目》³⁸⁾에서는 “經水將來作痛은 血實이

며, … 經行時에 腰腹疼痛은 鬱滯하여 瘀血이 있기 때문이다.”라 하였다.

月經痛은 크게 虛實에 따라 經後腹痛과 經前腹痛으로 나뉘며, 經前腹痛의 대부분은 氣滯血瘀로 인한 것이다. 氣鬱血滯가 되면 瘀血이 형성되어 行經이 阻滯하므로 심한 下腹痛과 腰痛을 수반하며 소복과 유방이 창통하다. 월경량은 적거나 배출이 원활하지 못하고 월경색은 검붉으며 덩어리가 있기도 하며, 대개 血塊가 배출되면서 통증이 줄어든다^{2,3)}.

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 응결되어 형성된 병리적 산물이자, 속발성 발병 인자이다^{6,9,39)}. 血凝, 留血, 着血, 惡血, 血瘀 등이 瘀血의 범주에 속하며⁴⁰⁾, 원인은 氣滯, 氣虛, 寒邪, 熱邪, 七情, 外傷등이 주가 되며^{2,39)}, 그 중에서도 氣와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다⁴¹⁾. 《金匱要略·驚悸吐衄下血胸滿瘀血病脈證治》⁴²⁾에서 최초로 ‘瘀血’이란 명칭이 언급되었고, 서양의학으로 보면 대체로 혈액순환 장애와 염증의 범주에 속하며⁵⁾ 혈관손상, 염증 및 혈액응고 기전 장애로 이해된다. 血栓과 가장 유사한 개념으로 인식되고 있어, 抗瘀血劑의 효능평가에 주로 血栓 유관 인자가 측정 지표로 사용되고 있으며, 活血化瘀 약물이나 처방이 抗血栓 효과가 있음이 많이 보고되고 있다¹⁸⁻²⁵⁾. 血栓症(thrombosis)은 혈관내피 또는 심내막이 손상되어 혈액의 응고성이 촉진됨으로 인해 인체 순환계 내에서 혈액이 응고된 응집괴가 형성되어 혈액순환 장애를 일으키는 것을 말한다⁴³⁻⁴⁵⁾.

혈소판은 1-4 μm 의 원판형의 혈구세포로서, 혈전구(thrombocyte)라고도 하며 혈액응고에 중요한 역할을 한다. 세포막

은 교원질, 혈관벽의 von Willebrand factor 및 섬유소원에 대한 수용체를 가지고 있고, 세포질에는 응고단백질, 성장인자를 함유한 α 과립과, ADP, 세로토닌등을 함유한 고밀도 과립을 함유하고 있다⁴⁶⁾. 혈관 손상 시 혈관벽의 세포외 기질에 혈소판이 노출되어 활성화되면서 혈액 응고과정이 시작된다. vWF에 의하여 혈소판 표면의 수용체인 glycoprotein Ib과 콜라겐의 부착하면 수초 내 혈소판이 활성화 되면서 ADP, 세로토닌 등이 분비되고, TXA₂등이 생성된다⁴⁷⁾. 이와 같은 자극 물질에 의해서 혈소판 특유 수용체인 GPIIb/IIIa가 활성화되면서 혈소판 응집이 시작되고, 가용성 섬유소원(soluble fibrinogen)이 불용성 섬유소(insoluble fibrin)로 변화되어 더욱 경고한 응혈 덩어리를 만들게 되어 지혈과정이 완성된다^{46,47)}.

加味玄附理經湯은 《晴崗醫鑑》¹⁾에 수록된 玄附理經湯에서 活血舒筋通絡 효능이 있는 鷄血藤을 가한 임상처방으로, 順氣 活血 化痰 효능을 지니고 있어 氣滯血瘀로 인한 月經痛에 활용되고 있다.

구성약물 각각의 효능을 살펴보면, 香附子는 理氣解鬱, 調經止痛하는 효능이 있고 鷄血藤은 活血, 舒筋通絡하는 효능이 있으며 蒼朮은 燥濕健脾, 祛風하는 효능이 있다. 烏藥은 順氣止痛, 散寒溫腎하는 효능이 있으며 玄胡索은 活血祛瘀, 理氣止痛하는 효능이 있고 陳皮는 理氣健脾, 燥濕化痰하는 효능이 있다. 當歸는 補血活血, 調經止痛하는 효능이 있고 白芍藥은 養血斂陰, 平抑肝陽, 柔肝止痛하는 효능이 있으며 川芎은 活血行氣, 祛風止痛하는 효능이 있다. 枳殼은 行氣寬中으로 除脹하는 효능이 있고 蓬朮은 行

氣破血, 消積止痛하는 효능이 있으며 桃仁은 破血祛瘀하는 효능이 있다. 肉桂는 溫中散寒하는 효능이 있고 木香은 行氣止痛, 健脾消食하는 효능이 있으며 紅花는 活血通經, 祛瘀止痛하는 효능이 있다⁴⁸⁾.

본 실험과 관련된 구성 약물의 실험적 연구로 白芍藥⁴⁹⁾, 紅花⁵⁰⁾, 木香⁵¹⁾, 桃仁과 當歸⁵²⁾로 抗血栓에 대한 효능을 보고한 바 있다.

따라서 본 실험에서는 현재 임상에서 月經痛에 활용되는 加味玄附理經湯의 抗血栓 효능을 규명하고, 압력식과 무압력식 추출방법에 따른 효능을 비교 연구하고자 두 가지 전탕방법으로 추출한 것을 각각 다음과 같이 실험하였다. 먼저 in vitro에서는 혈액 응고 인자인 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid로 유발된 혈소판 응집 억제 효과, GPIIb/IIIa 발현억제 효과, TXB₂와 PGE₂ 생성 저해능에 대한 실험을 수행하였고, in vivo에서는 폐색전 유발 억제 효과에 대한 실험, 마지막으로 항산화 손상에 대한 항산화 효능에 대한 실험을 수행하였다.

ADP는 혈액응고 과정에서 다른 혈소판을 잡아 끌어 혈소판 응집을 유도하는 응집 유도체이다⁵³⁾. 농도별로 나누어 ADP (8 μ M)에 의한 血小板凝集 억제 효과를 검색한 결과, 압력식과 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군 모두 농도 의존적으로 억제하였고 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군에 비해 좀 더 높은 억제율을 나타냈다.

Epinephrine은 부신 수질에서 분비되는 호르몬으로 심박수및 심장에서 보내는 혈액량을 증가시키고, 혈관을 수축시키는 작용을 하는데, 혈소판 응집 단계

에서는 혈소판에 있는 α 와 β -epinephrine type의 receptor에 작용하여 혈소판 응집을 일으킨다⁵⁴. Epinephrine (10 μ M)에 의한 血小板 凝集 억제 효과를 검색한 결과 1 mg/ml 농도를 제외하고는 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군보다 높은 응집 억제율을 보였다.

Collagen은 결합 조직의 세포외 기질에서 발견되는 주된 섬유로, 혈소판의 활성화를 유도한다⁵⁵. 본 실험에서는 collagen (4 μ g/ml)에 의한 血小板 凝集 반응 억제 효과를 검색한 결과, 고농도(20, 10 mg/ml)에서는 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이, 저농도(1, 0.1, 0.01 mg/ml)에서는 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이 더 높은 응집 억제율을 나타내었다.

Arachidonic acid는 혈소판 막지질과 결합에서 되어 있다가 혈소판이 노출된 collagen에 의해 활성화 되면서 분해 방출됨으로써 여러 종류의 프로스타글란딘을 만들고, 혈소판 응집 작용을 나타낸다^{56,57}. 본 실험에서는 arachidonic acid (1 mM)에 의한 血小板 凝集 억제 효과를 검색한 결과, 1 mg/ml 농도를 제외하고 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군보다 높은 응집 억제율을 보였다.

응집 유도체로 사용한 경우, E_{max} 를 비교해 볼 때 collagen에 의한 응집 실험에서만 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군보다 높았으나 큰 차이는 없었고, 전체적으로 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이 높게 나왔다(Table 2).

GP IIb/IIIa수용체는 혈소판 막에 존재하는 당단백으로 혈소판의 침착이나 응집 작용을 촉진한다⁵⁸. 형광 유세포 분석을 통해 collagen에 의해 유발된 혈소판 응집에서 GP IIb/IIIa 발현을 측정 한 결과, 압력식 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 모두 대조군에 비하여 농도 의존적으로 발현이 감소하였다.

본 실험에서는 arachidonic acid의 연속 반응의 대사물인 TXB₂와 PGE₂⁵⁹에 대한 억제능을 관찰하였다. 우선 加味玄附理經湯 추출물에 의한 TXB₂의 생성 저해능을 측정한 결과, 압력식 加味玄附理經湯 추출물은 1000 μ g/ml 농도(*p<0.05), 500 μ g/ml 농도(**p<0.01)에서 유의성 있는 감소를 나타내었고, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물은 1000 μ g/ml 농도에서 유의성(*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다.

加味玄附理經湯 추출물에 의한 PGE₂의 생성 저해능을 측정한 결과, 압력식 加味玄附理經湯 추출물이 1000 μ g/ml 농도에서 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다.

폐색전은 장시간 같은 자세를 유지하여 하지 정맥의 혈류가 정상적이지 않을 때 정맥 내에서 생성되는 혈액의 덩어리가 폐에 운반되어 폐혈관을 폐색하였을 때 일어난다⁶⁰. Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8마리 중 8마리가 죽거나 30분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속 되었다. 이에 반하여 압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군은 8마리 중 4마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 50%의 억제

효과를 나타내었고, 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군은 8마리 중 2마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 75.0%의 억제를 나타내었다(Table 3).

활성산소는 안정한 분자 상태인 ground state triplet oxygen이 반응성이 매우 큰 상태로 전환된 것으로, 강력한 산화 작용으로 세포 손상을 일으킨다. 활성산소에 의해 혈액 중의 인지질이나 콜레스테롤 에스테르가 산화되면 산화 LDL이 증가되어 혈관 내피세포에 작용해서 血栓의 원인이 되기도 한다⁶¹⁾. 본 실험에서는 항산화 효능을 평가하는 가장 기본적인 방법인 DPPH 소거능, SOD 유사 활성을 측정하였다.

DPPH의 소거 활성 측정은 약물에 들어있는 여러 가지 항산화 물질에 의한 항산화능을 측정하는 방법⁶²⁾으로 안정한 라디칼을 이용한 까닭에 간편하고 재현성이 뛰어나 산화적 손상의 기본 실험에 사용된다. 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 투여군이 압력식 加味玄附理經湯 추출물보다 고농도에서는 조금 높게 나왔고, 저농도(62.5)에서도 20%이상의 DPPH 소거활성을 나타내었다.

SOD는 superoxide를 H₂O₂와 H₂O로 분해하는 항산화 효소로, SOD나 SOD 유사 활성 물질이 존재하는 경우 pyrogallol의 자동 산화가 억제됨으로써 항산화 물질임을 증명하는 것이다⁶³⁾. 압력식, 무압력식 가미현부이경탕 추출물 투여군 모두 농도 의존적으로 SOD 유사 활성이 증가되어 DPPH 소거 활성 결과와 부합되었다. 압력식 加味玄附理經湯 추출물과 무압력식 加味玄附理經湯 추출물 사이 큰 차이는 없었다.

이상의 결과로 보아 加味玄附理經湯은

추출방법과는 상관없이 抗血栓 효능이 인정되어 瘀血 및 이와 관련된 혈행장애로 인한 여성의 月經痛등에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 압력식과 무압력식 추출에 따른 抗血栓 효능의 차이를 비교했을 때, 각 실험에 따라 효과적인 것이 달랐으나 혈소판 응집 억제 실험에서 E_{max}값이 전체적으로 무압력식 加味玄附理經湯 추출물이 높았고 또한 생체 내 실험에서 무압력식 加味玄附理經湯 추출물이 압력식 加味玄附理經湯 추출물보다 폐색전을 25% 더 억제한 것으로 보아 무압력식 加味玄附理經湯 추출물이 조금 더 효과적인 것을 볼 수 있었으나, 다른 처방들의 실험을 통해 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

현재 임상에서 月經痛에 활용되는 加味玄附理經湯의 抗血栓 효능을 규명하고, 탕전 시 주로 사용되는 압력식과 무압력식 추출 방법에 따른 抗血栓 효능의 차이가 있는지 살펴보고자 加味玄附理經湯을 압력식 약탕기와 무압력식 약탕기 두 가지 방법으로 추출, 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 압력식, 무압력식으로 추출한 加味玄附理經湯 모두 hFCs에 대해 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 압력식, 무압력식으로 추출한 加味玄附理經湯 모두 ADP, epinephrine, collagen, arachidonic acid로 유발된 혈소판 응집을 농도 의존적으로 감소시켰다. E_{max}

를 비교해 볼 때 collagen에 의한 응집실험에서만 압력식으로 추출한 加味玄附理經湯이 무압력식보다 높았으나 큰 차이는 없고, 전체적으로 무압력식으로 추출한 加味玄附理經湯이 높게 나왔다.

3. 압력식, 무압력식으로 추출한 加味玄附理經湯 모두 GPIIb/IIIa의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.
4. 압력식으로 추출한 加味玄附理經湯은 대조군에 비해 TXB₂ 생성이 1000,500 μg/ml농도에서, 무압력식은 1000 μg/ml 농도에서 유의성 있게 감소하였다.
5. 압력식으로 추출한 加味玄附理經湯은 대조군에 비해 PGE₂ 생성이 1000μg/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.
6. 압력식, 무압력식으로 추출한 加味玄附理經湯은 대조군에 비하여 collagen, epinephrine에 의해 유도된 폐색전을 각각 50%, 75% 억제 하였다.
7. 압력식, 무압력식으로 추출한 加味玄附理經湯 모두 DPPH의 소거 활성과 SOD유사 활성이 농도 의존적으로 높게 나타났다.

□ 투 고 일 : 2009년 7월 29일

□ 심 사 일 : 2009년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2009년 8월 10일

參考文獻

1. 金永勳. 晴崗醫鑑. 서울:성보사. 1984:391.
2. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학上. 서울:도서출판 정담. 2002:180-5.
3. 宋炳基. 한방부인과학. 서울:행림출판.

1995:207.

4. 김영일, 강순수. 어혈에 관한 문헌적 고찰. 방제학회지. 1992;3(1):39-51.
5. 전병훈 등. 어혈의 개념에 관한 동의학적 고찰. 대한동의병리학회지. 1989;4(1):93-102.
6. 강순수. 한의학에서 어혈에 대한 개념. 대한한의학회지. 1984;5(1):138-40.
7. 전병훈, 정우열. 실험적 혈전증에 미치는 한약재의 항혈전 효과에 대한 연구. 대한동의병리학회. 1996;10(1):72-8.
8. 張之南 등. 瘀血證與活血化瘀研究. 상해:상해과학기술출판사. 1990:429-31.
9. 陳可冀 등. 實用瘀血證學. 북경:인민위생출판사. 1999:1-16.
10. 金琦顯 등. 실험적 연구의 방향 모색을 위한 고찰. 대한동의병리학회지. 1989;4(1):93-102.
11. 永田藤太郎 등. 瘀血血栓性疾患 瘀血研究 3. 瘀血綜合科學研究會編. 1983:43-51.
12. 이인선 등. 소음인 곽향정기산가미방을 투여한 월경통 환자 20예에 대한 임상보고. 대한한방부인과학회지. 2004;17(2):168-83.
13. 문덕빈 등. 여고생 월경통에 대한 주증당귀환의 효능에 관한 임상적 연구. 대한한방부인과학회지. 2005;18(2):83-99.
14. 장준복 등. 칠제향부환제제의 원발성 월경통에 대한 임상적 효과. 대한한방부인과학회지. 2005;18(1):156-68.
15. 최가야 등. 계지복령환의 생리통 환자에 대한 임상효과. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):178-86.
16. 정학수 등. 청소년기 원발성 월경통 환자에 대한 이침 치료의 임상적 연구.

- 대한한방부인과학회지. 2002;15(4):183-92.
17. 주병주 등. 체침치료가 청소년기 원발성 월경통 환자의 즉각적인 진통에 미치는 효과에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):232-41.
 18. 윤현자. 芎歸湯加味方의 抗血栓 효과에 관한 연구. 원광대학교 대학원. 1996.
 19. 조선화. 坐宮丹이 항균 항혈전 및 진통작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2001.
 20. 김광겸. 和血通經散의 항염 항혈전 및 진통효과에 대한 연구. 원광대학교 대학원. 1996.
 21. 손태훈. 加味生化湯의 항혈전 및 진통효과에 대한 연구. 대전대학교 대학원. 2001.
 22. 임민철. 玄胡索散의 항혈전작용에 대한 연구. 대전대학교 대학원. 2003.
 23. 이해경. 加味通經湯이 항혈전 소염 및 진통작용에 대한 연구. 대전대학교 대학원. 2002.
 24. 제종민. 稜莪消積湯의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2007.
 25. 임동욱 등. 複方紅藤敗醬散의 항혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):151-74.
 26. 임정한 등. 玄府理經湯加減의 기체혈어형 월경통이 미치는 효과에 대한 임상적 고찰. 대한한방부인과학회지. 2002;15(4):228-37.
 27. Park MK et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of indole-carbinol in vivo and in vitro. *Phytother Res.* 2007.
 28. Scott R et al. Inhibition of long-chain fatty acid metabolism dose not affect platelet aggregation responses. *European Journal of Pharmacology.* 1998;356:207-13.
 29. Peter K et al. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein GPIIb/IIIa inhibitors. *Blood.* 1998;92(9):3240-9.
 30. Kimura Y et al. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 1985;35(II):1144-9.
 31. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울:고려의학. 2007:134.
 32. Rees M. Dysmenorrhea. *British journal of Obstet and Gynecology.* 1988;95:33-5.
 33. 오성택. Dysmenorrhea and cyclic pelvic pain. 대한산부인과학회 춘계 학술대회. 1998;21-5.
 34. 이인숙. 일부 여대생들의 월경양상과 월경 시 불편감에 관한 조사 연구. 한국보건간호학회지. 1998;12(1):116-31.
 35. 陳自明. 婦人大全良方. 북경:인민위생출판사. 1966:31-3.
 36. 西昌裘. 萬氏婦人科. 서울:동남출판사. 1985.
 37. 李梴. 편주의학입문(下). 서울:대성출판사. 1996:284.
 38. 武之望. 濟陰綱目. 북경:인민위생출판사. 1996:12.
 39. 전국한의학대학병리학교실. 동의병리학. 서울:일중사. 1999:153-63.
 40. 최승훈, 김광호. 血府逐瘀湯이 혈전증과 피하혈종에 미치는 영향. 경희대 경희한의대 논문집 7. 1987:605-25.
 41. 이정은, 유동열. 加味補陽還五湯의 항

- 혈전 및 항염작용에 대한 실험적 연구. 동생리병리학회지. 2006;20(4): 57-965.
42. 張機. 仲景全書. 集文書局. 1972:172, 73, 228, 236.
 43. 김창중, 서병세. 일반병리학 제3개정판. 서울:신일상사. 2000:148.
 44. 최명애 등. 병태병리학. 서울:계축문화사. 2001:175.
 45. 광성규 등. 기초병리학. 서울:정문각. 1998:70-2.
 46. 고려대학교 의과대학 병리학교실. 병리학. 서울:신광출판사. 2001:96-7.
 47. 김길영. 임상지혈혈전학. 서울:군자출판사. 1998:1-30.
 48. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 1997: 180, 236, 240, 308, 464, 466, 469, 477, 478, 479, 483, 518, 530, 534, 540.
 49. 白榮奎. 백작약의 항혈전 작용에 대한 실험적 연구. 대전대 대학원. 1998.
 50. 安鐘石. 홍화의 항혈전 작용에 대한 실험적 연구. 대전대 대학원. 1998.
 51. 유호룡. 목향의 혈액강하 및 항혈전 작용에 대한 실험적 연구. 대전대 대학원. 2000.
 52. 박태석. 도인 당귀미의 항혈전효과에 대한 실험적 연구. 경원대 대학원. 2003.
 53. Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptor in platelet function. *Front Biosci.* 2006;11:1977-86.
 54. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules, *Blood Rev.* 1993;7:52-62.
 55. Cowan DH. Platelet adherence to collagen role of prostaglandin-thromboxane synthesis. *Br J haematol.* 1981;49: 425-34.
 56. Horn PT et al. Antagonism of prostanoid-induced vascular by 13-azaprostanic acid (13-APA). *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 6. 1984;609-13.
 57. Rola-Pleszczynski M et al. Evidence for the involvement of the thromboxane synthase pathway in human natural cytotoxic cell activity. *Journal of Immunology.* 1985;135:4114-39.
 58. Wang WY et al. Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa activation by 3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2006;70(4):1380-9.
 59. Tanikawa N et al. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;(291):884-49.
 60. 김효수. 급성 심근 경색증의 치료의 최신 지견. *대한내과학회지.* 2006;70(6): 608-16.
 61. Takizawa S. Free radical production in ischemic cerebrovascular disease. *Nitroisoi,* 2003;40:319-21.
 62. Blosis ML. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199-224.
 63. Marklund D, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974;47:469-74.