

皂角刺 추출물의 항응혈 활성

유지현, 정봉태, 길기정*

중부대학교 한약자원학과

Anticoagulant Activity of Gleditsiae Spina Extract

Ji-Hyun Yoo, Jung Bung Tea, Gi-Jung Kil*

Dept. of Oriental Medicine Resources, Joongbu University

ABSTRACT

Objectives : This research was investigated the anticoagulant effect of the Gleditsiae spina extract.

Methods : We researched prothrombin time (PT) assay, activated partial thromboplastin time (APTT) assay in vitro and *in vivo* using arteriovenous (A-V) shunt rat model and shortening Rat tail bleeding time (BT). A-V shunt and BT were treated with extract of Gleditsiae spina (GS) 400 mg/kg for a week.

Results : Bleeding time of Gleditsiae spina extract *in vivo* had a significant increase as about 1.2 times and thrombus weight of Gleditsiae spina extract had a significant reduction of thrombus weight as 26%. Gleditsiae spina extract represented an effect of anticoagulation by operating on extrinsic pathway factor II, V, VII, X and intrinsic pathway factor VIII, IX, X, XI, XII in the coagulation system.

Conclusions : Considering the above mentioned results, it is judged that a Gleditsiae Spina extract has a control effect of thrombus creation.

Key words : Gleditsiae Spina, Anticoagulant, Thrombosis, Prothrombin time, Bleeding time

서 론

최근 인구의 고령화와 사회 발달에 따라 혈관계 질환은 급속히 증대되고 있어 사회적 관심이 집중되고 있으며 발병 시 높은 사망률을 나타낼 뿐만 아니라 후유증 또한 심각하여, 치료보다는 예방에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있으며¹⁻³⁾, 아울러 기존 혈전 용해제의 단점을 극복하기 위한 새로운 혈전용해 제제에 대한 연구도 진행되고 있다.

혈액은 생체 내에서 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있어 정상적으로 순환하고 있는 동안에는 혈전이 생성되지 않는다. 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨져 혈전이 생성되면 혈관을 막게 되므로 혈액의 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소공급이 중단되게 되

어 심근경색이나 뇌경색 같은 치명적인 질병을 유발하게 된다. 심근경색과 뇌경색처럼 혈전이 혈관을 막아 일어나는 병을 통틀어 혈전증이라 하며, 혈전증의 시작은 나이가 들어서 진행되는 혈관벽의 죽상경화이지만, 혈관 중의 혈소판 응집력의 향진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 된다. 이와 같은 경우 혈전형성을 방지하기 위해 혈소판 기능을 약간 억제할 필요가 있고 그 역할을 하는 항혈소판제제, 즉 혈소판 활성화 억제제 등 항혈전제가 요구된다⁴⁾.

현재 심혈관계질환 치료에 사용되고 있는 Ginkgo biloba extract의 약리학적 주성분은 ginkgolides와 flavonoids이다^{5,6)}. Ginkgolides는 PAF길항작용으로 혈소판 응집을 억제하므로 항혈전의 약리효과가 입증 되고 있으며⁷⁾, 혈전 용해제로는 urokinase, streptokinase, plasmin, t-PA, 항

* 교신저자 : 길기정, 충남 금산군 추부면 대학로 101 중부대학교 한약자원학과
· Tel : 041-750-6225 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr
· 접수 : 2010년 2월 16일 · 수정 : 2010년 3월 18일 · 채택 : 2010년 3월 22일

응고제로 Coumarin 등이 혈전성 질환 예방 및 치료제로 사용되고 있으며, 혈전 생성억제를 위한 항응고제로 가장 많이 사용되고 있는 헤파린은 높은 가격, 출혈, 과민성 반응, 짧은 반감기 및 비경구투여의 문제점과 심각한 위장장애와 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있다^{8,9)}.

皂角刺(*Gleditsia spina*; 이하 GS)는 콩과(Leguminosae)에 속한 낙엽교목인皂角刺나무(*Gleditsia sinensis* LAM.)의 가시를 건조한 것으로, 性은 溫無毒하고 味는 辛하며 肝腎經에 들어가 消腫排膿, 祛風殺蟲하여 癰疽初起, 膿成不潰, 疥癬麻風을 치료하는 효능이 있다¹⁰⁾.

皂角刺에 대한 기존 연구로는 항돌연변이 및 항산화 활성에 관한 연구¹¹⁾, 항암작용에 대한 연구^{12,13)}, 항염증 작용에 대한 연구¹⁴⁾ 독성에 대한 연구¹⁵⁾ 등이 있으나, 현재까지皂角刺의 항응혈에 대한 연구는 거의 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 항응혈 활성 물질 탐색과정에서皂角刺의 항응혈 활성 효능을 탐색하였으며 향후 혈류개선을 위한 심혈관 질환 예방의 가능성과 안전하고 우수한 항응혈제 식품 및 의약품 개발을 위한皂角刺 추출물의 우수성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

皂角刺(*Gleditsia spina*; GS)는 중국 허북지방에서 구입하여 중부대학교 본초학교실에서 감정한 후 정선하여 4℃에서 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

2) 시약

PT reagent (Diagnostica Stago, France), APTT reagent (Diagnostica Stago, France), Calcium chloride (Sigma, USA), Ginkgo biloba extract (Schwab extracta KG, Germany), Saline (중외제약, 한국), 혈장(적십자, 한국)을 사용하였으며 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

혈장은 충남적십자혈액원에서 약물투여를 받지 않은 지원자의 전혈을 사용하였고 분리된 혈장을 냉동한 상태로 보관하였으며 사용 시 37℃에서 해동하여 사용하였다.

3) 실험동물 및 사육환경

본 연구에서 사용된 실험동물은 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐 12주령 체중 350 ± 10 g으로 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험당일까지 고형사료(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, Korea)와 물을 충분히 공급하였다. 사육환경은 실온 22 ± 2 ℃, 상대습도 50 ± 10 % 조명 시간

12시간(07:00~19:00), 조명도 150~300 Lux로 하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

皂角刺 50 g에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕추출기에서 3시간 가열하여 얻은 450 ml 추출액을 여과지(Whatman NO. 1)로 1회 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여, -80℃ deep freezer에 4시간 동안 정치하고 freeze dryer로 12시간 동안 동결 건조하여皂角刺 추출물에서 3 g(수거율 : 6%)의 분말을 얻어 냉장(4℃)보관하면서 본 실험에 필요한 농도 25 μ g/ml (GS 1), 250 μ g/ml (GS 2), 750 μ g/ml (GS 3)로 희석하여 사용하였다.

2) 항응혈 활성 측정

(1) 프로트롬빈 시간(Prothrombin time : PT)

Quick's one stage법¹⁶⁾을 사용하여皂角刺 추출물 농도별로 5 μ l를 취하고, 대조구로 증류수 5 μ l를 취하여 사용하였다. 각각 혈장 45 μ l를 취하여 37℃에서 5분간 가온한 후 PT 시약 100 μ l를 가하여 혈장이 응고되는 시간을 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(Activated partial thromboplastin time : APTT)

皂角刺 추출물 농도별로 5 μ l를 취하고 대조구는 증류수 5 μ l를 취하여 사용하였다. 각각 혈장 45 μ l를 취하여 37℃에서 2분간 가온한 후 APTT 시약 50 μ l를 취하고 37℃에서 5분간 가온한 후 25 mM calcium chloride (CaCl₂)를 100 μ l를 취하여 혈장이 응고되는 시간을 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 출혈시간(Bleeding time : BT)

皂角刺 추출물 400 mg/kg 농도로 6일 동안 경구투여한 다음 7일째 되는 날 약물 투여 60분 후에 1.25 g/kg 농도의 에테르를 복강 주사하여 마취시킨 다음 Han 등의 방법¹⁷⁾에 의하여 마취된 실험동물의 꼬리를 끝에서부터 0.3 cm 자른 후 즉시 37.5℃ 생리식염수에 꼬리를 5 cm 담가 지혈될 때까지의 시간을 측정하였다.

(4) 혈전중량(Thrombus weight) : A-V shunt

皂角刺 추출물 400 mg/kg 농도로 6일 동안 경구투여한 다음 7일째 되는 날 약물 투여 60분 후에 1.25 g/kg 농도의 에테르를 복강 주사하여 마취시킨 다음 왼쪽 경동맥과 오른쪽 정맥에 폴리에틸렌 도뇨관으로 주입하였다. 그런 다음 5 cm 실리콘 튜브에 면실을 넣고 생리식염수로 채운 후 동맥과 정맥에 연결된 튜브로 혈액을 흐르게 하여 shear-stress를 유도하여 15분간 혈전을 생성시켰다. 생성된 혈전을 건조시켜 무게를 측정하여 항응혈 활성을 평가하였다.

3) 통계처리

실험군별 상호비교를 위한 평균치는 평균 ± 표준편차 (Mean ± SD)로 산출하였다. 실험군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석방법을 이용하여 $p \leq 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. PT에 미치는 영향

皂角刺 추출물을 농도별로 처리하여 PT에 대한 영향을 조사한 결과, 대조군은 12.0±0.2초였고, 25 µg/ml 처리군에서는 18.2±4.7초, 250 µg/ml 처리군에서는 24.0±0.3초로 나타났으며, 750 µg/ml 처리군에서는 36.8±4.3초로 나타나 대조군과 비교할 때 농도 의존적으로 PT가 길어지는 것으로 나타났으며 대조군과 비교할 때 750 µg/ml 에서 약 3배 정도 혈액응고 시간을 증가시키는 것으로 항응혈 활성과 관련하여 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다(Table 1).

Table 1. Effect of Gleditsiae Spina Extract on Prothrombin Time

Group	Concentration (µg/ml)	PT (sec)
Control	0	12.0±0.2
GS 1	25	18.2±4.7
GS 2	250	24.0±0.3***
GS 3	750	36.8±4.3**

Control : untreated, GS 1, 2, 3 : 25 µg/mL, 250 µg/mL, 750 µg/mL aqueous extract of Gleditsiae Spina

* : statistically significant value compared to control by Student's *t*-test (** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$).

2. APTT에 미치는 영향

皂角刺 추출물을 처리하여 APTT를 조사한 결과, 대조군은 88.2±2.2초이였으나, 25 µg/ml 처리군에서 110.2±17.0초, 250 µg/ml 처리군에서는 166.6±65.7초, 750 µg/ml 처리군에서는 26.6±6.25 초로 나타나 대조군에 비해皂

Table 2. Effect of Gleditsiae Spina Extract on Activated Partial Thromboplastin Time

Group	Concentration (µg/mL)	APTT (sec)
Control	0	88.2±2.2
GS 1	25	110.2±17.0
GS 2	250	166.6±65.7
GS 3	750	26.6±6.2***

Control : untreated, GS 1, 2, 3 : 25 µg/ml, 250 µg/ml, 750 µg/ml aqueous extract of Gleditsiae Spina.

* : statistically significant value compared to control by Student's *t*-test (** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$).

角刺 추출물 250 µg/ml 처리군이 약 2배 정도 혈액응고 시간을 증가시켜 유의성 있는 결과로 나타났다(Table 2).

3. 출혈시간에 대한 영향

혈액응고 시스템에서 표피에 아주 미세한 상처를 유도하여 상처부위에서 혈소판 응고상태를 살펴보기 위하여皂角刺 추출물을 투여한 실험군과 대조군의 응고반응 시간에 미치는 영향을 비교 실험한 결과, 정상군의 응고반응 시간은 517±14.8초였으며, GBE 투여한 대조군은 495.7±75.4초로 나타나 정상군과 비교하여 조금의 감소하였지만 유의적인 차이가 없었다.

皂角刺 추출물을 투여한 실험군은 573.3±16.5초로 나타나 정상군과 대조군에 비해 약 1.2배 정도 응고반응 시간이 증가됨을 알 수 있었다.

다소 연장된 출혈시간은 조직인자의 활성 조절과 관련된 것으로 생각된다(Fig. 1).

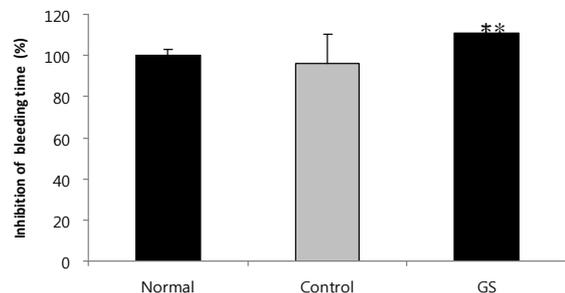


Fig. 1. Effect of Gleditsiae Spinae extract on the bleeding time

Rats were treated with oral administration of 400 mg/kg of GBE and GS, representatively.

Normal : untreated. Control : Ginkgo biloba extract. GS : Gleditsiae Spina extract

* : statistically significant value compared to control by Student's *t*-test (** : $p \leq 0.01$).

4. 혈전중량에 대한 영향

皂角刺 추출물A-V shunt의 thrombus weight (mg)와 inhibition 변화를 살펴보기 위하여皂角刺 추출물을 rat 에 투여하여 비교 실험한 결과, 정상군 thrombus weight 는 283.3 ± 15.3 mg이었고, 대조군은 253.3 ± 15.3 mg으로 나타나 정상군과 비교하여 조금의 감소는 있었지만 큰 차이가 없었다.皂角刺 추출물을 투여한 실험군은 73.3 ± 5.8 mg으로 나타나 정상군 대비 약 26%로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

혈액의 응고계는 다단계의 혈액응고 cascade를 가지므로 미세한 혈액응고 유발에도 이를 증폭하여 민감하게 반응할 수 있다. 혈관벽 손상과 같은 혈액응고유발은 내인계 경로를 통하여 혈액을 응고시키며, 또한 외상 등에 의한 유발은 외인계 경로를 통하여 혈액을 응고시킨다. 내인계 유발에 의한 혈액응고 시간은 APTT로 측정하며,

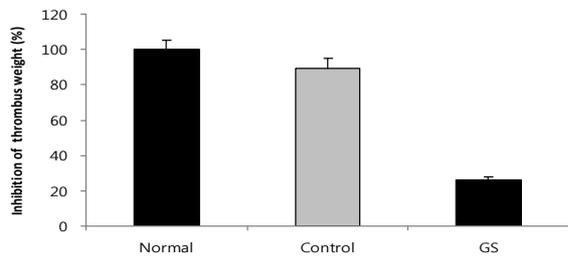


Fig. 2. Inhibition effect of Gleditsiae Spina extract on thrombus weight

Rats was treated with oral administration of 400 mg/kg of GBE and GS, representatively.

Normal : untreated. Control : Ginkgo biloba extract. GS : Gleditsiae Spina extract.

* : statistically significant value compared to control by Student's *t*-test(*** : $p \leq 0.001$).

외인계 유발에 의한 혈액응고 시간은 PT로 측정한다.

PT는 혈장에 조직 트롬보플라스틴과 칼슘을 첨가하면 피브리노로 석출될 때까지의 시간을 말하는 것으로 이 지표의 단축은 응고성 향진을 의미하며, 연장은 응고성 억제제를 의미하여 각종 출혈성 질환의 진단 및 치료에 중요한 역할을 하는데^{18,19}, 梔角刺 추출물을 처리한 혈장에 thromboplastin을 인위적으로 첨가해줌으로써 factor II, V, VII, X의 관여 하에 prothrombin이 thrombin으로 되고 thrombin이 혈장 내에 들어있는 fibrinogen을 fibrin으로 전환시켜 항응혈을 형성하는데 PT가 길어진다는 것은 prothrombin을 thrombin으로 바꾸는데 관여하는 extrinsic pathway factor들의 활성을 억제함으로써 thrombin생성을 지연시킨 결과이다.

따라서 梔角刺 추출물이 coagulation system에 대하여 억제제를 보인 것으로 항응혈 작용이 extrinsic pathway에 영향을 끼친 것으로 판단되었다.

또한 梔角刺 추출물의 APTT 활성 실험 결과에서 Factor XII, XI, IX, X, II, I을 비롯한 intrinsic pathway에 관여된 여러 factor들을 활성화시킴으로써 최종적으로 fibrin 형성에 의한 항응혈 활성이 있고, 반대로 PT는 연장되어 있는데 APTT는 정상이면 Factor VII 결핍으로 진단할 수 있는데, 실험 결과 梔角刺 추출물은 coagulation system에 대하여 억제제를 보인 것으로 항응혈 작용이 intrinsic pathway에 영향을 끼친 것으로 판단되었다.

In vivo 실험에서 梔角刺 추출물을 처리한 Rat의 혈액 응고반응 시간과 혈전 무게를 측정하여 실제 梔角刺 추출물의 흡수에 따른 반응을 판단하는 기준으로 삼을 수 있는데, 혈액 응고반응 시간은 tissue factor(TF)가 혈관 내피세포에 주로 존재하는 당단백질로서 정상적인 상태에서는 세포외막과 혈장 내에 소량 존재하다가 감염이나 다른 병적인 상태에서 세포외막의 TF가 증가되고 이때 TF가 혈액에 노출되면 외인계나 내인계의 단계적인 혈액응고반응이 시작되어 혈액이 응고되는데 이 혈액응고 촉진작용은 혈관 손상 시의 지혈반응에 필수적이므로 정

상군과 梔角刺 추출물군을 비교하였을 때 약 1.2배 혈액 응고 반응 시간이 연장되어 정상적인 지혈반응을 보이고 있다.

이상의 결과를 종합해 보면 梔角刺 추출물은 coagulation system에 대하여 항응혈 활성 효과를 나타냈으며 향후 정확한 기전에 대한 연구와 항응혈 활성에 대한 梔角刺 추출물의 임상적 활용에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 梔角刺 추출물에서 항응혈 활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 梔角刺 추출물은 혈액 응고 기전에서 외인성 경로 요소 II, V, VII, X와 내인성 경로 요소 VIII, IX, X, XI, XII에 대해 유의성 있게 연장되므로 항응혈 활성을 나타냈다.
2. 梔角刺 추출물은 *in vivo*에서 정상군과 비슷한 출혈 시간이 유의성 있게 나타났으며, 혈전 중량은 약 74% 정도 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 보아 梔角刺 추출물은 항응혈 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 정확한 기전에 대한 연구와 항응혈 치료에 있어서 梔角刺 추출물의 임상적 활용에 대한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Cattaneo F, Trento F, Pescador R, Porta R, Furro L. Pharmacodynamics of the antociagulant activity (APTT) of an algal polysaccharide. *Thrombosis Research*. 2002 ; 105 : 455-7.
2. Molina V, Arruzazabala ML, Mas CR. Synergistic effect of D-003 and aspirin on experimental thrombosis models. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2003 ; 68 : 305-10.
3. Katira R, Chauhan A, More RS. Direct thrombin inhibitors: novel abtithrombotics on the horizon in the thrombo prophylactic management of atrial fibrillation. *Postgraduate Medical Journal*. 2005 ; 81 : 370-5.
4. Verstraeta M, Lijnen HR, Collen D. Thrombolytic agents in development. *Drugs*. 1995 ; 50 : 29-42.
5. Akkerman JWN. Interaction between the PAF receptor and fibrinogen binding sites on human

- platelets. In : *Gingkolide* (Braquet P ed). JR Prous barcelona. 1998 ; 93(1).
6. Koltai M, Tosaki A, Guillon JM, Hrosford D Braquet. PAF antagonists as potential therapeutic agents in cardiac anaphylaxia and myocardial ischaemia. *Cardiovasc Drug Rev.* 1989 ; 77(7).
 7. Simon MF, Lamnt V, Lachachi H, Plantavid M, Mauco G, Chap H, Douste-blazy L. PAF Metabolism and signalling process inhibition by ginkolides. *Gingkolides* (Braquet P ed). JR Prous barcelona. 1988 ; 127(1).
 8. Gwak HS, Chun IK. Performulation study of aspalatone, a new antithrombotic agent. *Journal Appl Pharmacol.* 2000 ; 8 : 332-7.
 9. Hsieh KH. Thrombin interaction with fibrin with polymerization sites. *Thrombosis Research.* 1997 ; 86 : 301-16.
 10. Oriental medical university herbal medicine the National History Compilation Committee. *Clinical Traditional Herbalogy.* Seoul : Younglimsa. 2006 : 305, 306.
 11. Lee SK, Shin JI, Seo UK, Jeong JC. A Study on Activities of Antioxidant and Antimutagenecity of the Extracts from *Gleditsia sinensis*. *Journal of Korean oriental internal medicine.* 2001 ; 22(2) : 215-22.
 12. Kang SY, Cho KW, Han JH, Cho NG. Effect of *Gleditsiae Spina* on Hep G2 cells cytotoxicity and Apoptosis and No. *Journal of Korean oriental internal medicine.* 1997 ; 18(1) : 48-61
 13. Park YK, Kang BS, Kim JT, Park IS, Ahn SH. The Experimental Study on Antitumor effects of *Gleditsia spina*. *Journal of Herbology.* 1997 ; 12(1) : 53-66.
 14. Park EH, Shin MJ. Anti-inflammatory Activity of Aqueous Extract from *Gleditsiae Spina*. *Yakhak Hoeji.* 1993; 37(2) : 124-8.
 15. Kim CH, Hah DS, Leu JD, Heo JH, Jung MH, Choe YT, Kim GS, Kim JS. Oral Toxicity Studies for 2 weeks of *Gleditschia-saponin* in Sprague Dawley Rats. *Journal of toxicology and public health.* 2002 ; 18(3) : 285-92.
 16. Quick J. The prothrombin in haemophilia and in obstructive jaundice. *Journal of Biological Chemistry.* 1935.
 17. Han YN, Baik SK, Kim TH, Han BH. Antithrombotic activities of saponins from *Ilex pubescens*. *Archives of Pharmacal Research.* 1987 ; 10 : 115-22.
 18. Berry CN, GirardD, Lochot S, Lecoffre C. Antithrombotic actions of argatrobas in rat medels of venous, mixed and arterial thrombosis, and its effects on the tail transection bleeding time. *Br J Pharmacol.* 1994; 113 : 1209-14.
 19. Butenas S, Ribarik N, Mann KG. Synthetic substrates for human factor VIIa and factor VII atissue factor. *Biochemistry.* 1993 ; 32 : 6531-8.