J. Fd Hyg. Safety 11(4), 273 - 276(1996)

파(*Allium fistulosum*)에 의한 혈소판 응집 억제작용

서동철 · 정승민 · 이주영 · 김영식* · 정진호†
서울대학교 약학대학, *서울대학교 천연물과학연구소

Effect of Oriental Onion (*Allium fistulosum*) on Platelet Aggregation

Dong-Chul Seo, Seung-Min Chung, Joo-Young Lee,
Young-Sik Kim* and Jin-Ho Chung†
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742,
**Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460 Korea*

ABSTRACT — Platelets serve many biological functions, including a major role in the haemostatic process. But platelets also play a crucial role in the formation of arterial thrombosis, arteriosclerosis and other pathologic processes. Thus, there have been many studies to develop new antiplatelet agents from foods and plants for decades. In this study, inhibitory effects of the oriental onion (*Allium fistulosum*) on platelet aggregation were investigated using platelet rich plasma (PRP). Water extracts of oriental onion was separated into two fractions (Fraction I and Fraction II) by Sephadex G-150 column. Platelet aggregations were inhibited by total water extracts as well as Fraction I and II. IC_{50} value of Fraction I was much lower than that of Fraction II. Inhibitory effects of total water extracts of oriental onion on ATP release by PRP were also observed.

Key words □ Platelet rich plasma(PRP), Platelet aggregation, Oriental onion extracts, ATP release

우리 나라의 경제수준이 높아짐에 따라 전체 국민 중 고혈압, 동맥 경화, 혈전증 등 혈액에 관련된 질병을 앓고 있는 환자의 수가 점점 늘어 가고 있는 추세다. 이와 같은 혈행장해에 있어서 혈소판은 매우 중요한 역할을 담당하고 있는 인자이다.[1] 예를 들어 혈전(thrombus)은 혈관내에 생긴 blood-derived mass를 말하는데, 이것은 병적 상태나 기계적 손상(trauma), 여러 화학물질에 의해 혈관벽이 손상받게 되면, subendothelium of vessel 특히 collagen이 노출되어 여기에 혈소판이 유착하게 된다. 유착된 혈소판은 ADP, thrombin, calcium 등을 유리하고, thromboxane A_2를 생성하여 주위의 혈손판을 활성화시켜 응집하게 된다. 이렇게 생긴 응집물(aggregate)이 혈류에 의해 떨어져나간 것을 혈전(thrombus)이라 하고, 혈전은 혈류를 따라 흐르다 미세혈관을 막아 심근경색(myocardiac infarction), 허혈(ischemia) 등의 혈행 장애를 유발하게 된다.[2] 그러므로 이와 같은 혈전의 생성을 막는 것은 혈관 질환의 예방과 치료에 매우 중요하다고 할 수 있다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

파(*Allium fistulosum*)는 우리 국민이 많이 섭취하는 음식물 중 하나로서, 예로 부터 청혈, 양혈, 등의 질병에 많이 쓰여져왔다. 파와 같은 계통의 식물인 마늘(*Allium sativum*), 양파(*Allium cepa*)도 비슷한 질병에 사용되어져 왔는데 최근의 연구결과 혈소판 응집을 억제하는 ajoene이라는 성분이 분리되었다.[3-6] 이 물질은 fibrinogen이 fibrin으로 변하는 것을 차단함으로써 작용을 나타내는 것으로 새로운 anticoagulant로 개발을 서두르고 있다.

따라 본 연구에서는 우리들이 자주 섭취하게 되는 파의 수용성 추출물에 대한 혈소판 응집 억제작용에 관하여 연구하고 혈관 질환의 예방에 사용될 수 있는가를 연구하였다.

실험재료 및 방법

시약

파은 재래시장에서 신선한 것을 구입하였고, thrombin은 Sigma 제품을 구입하여 사용하였다. Sephadex G-150은 Pharmacia 제품을 구입하였다. Luciferin-luciferase와 ATP standard는 Chrono-log 제품을 구입하였다.

실험 동물

유한양행에서 Sprague-Dawley(SD) female rat를 공급받아, 한달 이상 사육하여 무게가 200±30 gm 되는 것을 실험에 사용하였다. 물과 사료는 제한하지 않았으며, 물은 수도물을 사료는 제일제당 사료를 각각 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12시간씩 되도록 하였다.

파 추출법

신선한 파를 잘게 썰어 0.02 M citrate buffer(pH 5.0; 2 ml/g fresh wt)를 넣고 blender에 homogenization 시킨 후 nylon을 통하여 여과시킨다. 여과액을 6,000 g에 20분간 원심분리시키고 상등액 일부분은 냉동건조시킨다. 나머지 상등액은 ammonium sulfate 분말을 가하여 70%를 포화시킨 후, 침전물을 14,000 g, 20분간 원심분리시켜 물에 녹인 후 동일한 buffer로 dyalysis 시킨다.

Platelet rich plasma의 분리

Rat를 diethyl ether로 마취하고 개복하여 복대동맥으로부터 채혈하여 3.8% sodium citrate용액과 9대 1의 비율로 혼합한 뒤 150 g에서 15분간 원심분리하여 상층의 PRP (platelet rich plasma)를 취하고 잔사는 계속하여 1,500 g에서 20분간 더 원심분리하여 상층에서 PPP(platelet poor plasma)를 얻었다. PRP의 혈소판 수를 광학 현미경으로 세어, PRP는 PPP로 희석하여 혈소판 수가 5×10^8/ml가 되도록 하여 실험에 사용하였다.

혈소판 응집 실험

Aggregometer(Chrono-Log)를 사용하여 37°C에서 turbidometric 방법으로 혈소판 응집을 측정하였다.[5] PRP와 파 추출물을 aggregometer상에서 2분간 처리한뒤 thrombin(1.5 units)을 가해 혈소판 응집을 유도했다. 이때 시험물질 대신 물을 넣은 것을 대조군으로 하여 대조군의 응집력을 100%로 잡고 추출물의 농도별 억제율을 산출한 후 이를 logarithmic linear regression에 대입하여 회귀직선을 구한후 이 직선으로부터 각 시험물질의 50% 억제율인 IC_{50} 값을 구하였다.

ATP release 측정

Luciferin-luciferase와 ATP가 반응할 때 발생하는 luminescence로 ATP release를 측정하였다.[8] PRP와 파 추출물을 2분간 반응시키고 luciferin-luciferase를 넣었다. 30초 후 thrombin(1.5 units)을 가해 ATP release를 유도한 후, lumi-aggregometer로 luminescence를 측정하였다. 유리된 ATP의 양은 luciferin-luciferase 투여 30초 후에 ATP standard를 가해 발생한 luminescence를 측정하고 이것과 비교하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Platelet-rich plasma(PRP)를 분리하고 thrombin 1.5 units으로 혈소판 응집을 유도하여 파추출물의 혈소판 응집 억제 실험을 한 결과, 파 추출물은 혈소판 응집을 억제하였다 (Fig. 1A). 혈소판의 특징 중의 하나는 많은 secretable granule을 지니고 있다가, 활성화되면 이들을 분비한다. 이렇게 분비된 granule의 내용물에는 ATP, ADP, serotonin, Ca^{++} 등이 있는데 , 이들은 다른 혈소판이나, 혈장 단백, 혈관벽 등과 반응하여 혈전 생성, fibrinolysis의 조절, 혈관벽 재생 등에 관여한다. 혈소판이 활성화될 때 나타나는 granule secretion은 ATP release를 측정하면 알 수 있다.[7] 혈소판 활성을 나타내는 또 다른 지표인 granule secretion에도 위의 혈소판 응집 억제 실험과 같은 경향이 나타나는지 알아보기위해 파추출물의 granule secretion 억제능을 ATP release 실험을 통해 알아보았다. 먼저 혈소판 응집능 실험에 사용하였던 thrombin 1.5 units로 ATP release를 유도하고 파 추출물의 ATP release 억제 실험을 한 결과, 파 추출물은 ATP release를 완전히 억제하였다(Fig. 1B).

파 수용성 추출물의 ammonium sulfate precipitate 100

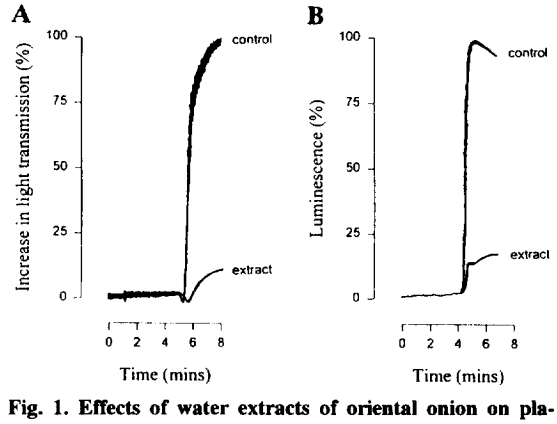

Fig. 1. Effects of water extracts of oriental onion on platelet aggregation and ATP release.
Platelet rich plasma (PRP) was pretreated with water extracts and then added thrombin (1.5 units) as an agonist for platelet aggregation. Platelet aggregation and ATP release were determined by changes of turbidity (A) and luminescence (B), respectively. More than 2,500 ug/ml concentration of water extracts were used.

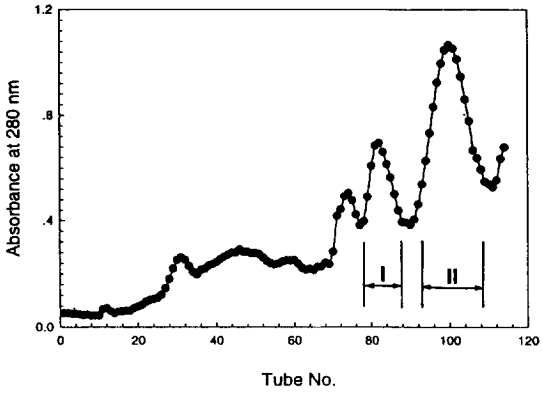

Fig. 2. Separation of water extracts of oriental onion by Sephadex G-150 column.

Ammonium sulfate precipitate (100 mg) was applied on Sephadex G-150 (1.5 cm×110 cm). The absorbance of each fraction was read at 280 nm. Low molelular weight fractions I (79~88) and II (92~105) were collected and freeze dried for the measurement of inhibition of platelet aggregation.

mg을 Sephadex G-150(1.5×110 cm)에 elution시 각 fraction의 흡수를 280 nm에서 측정하였다(Fig. 2). Low molecular weight fractions I (79-88) 및 II (92-105)를 분리하여 혈소판 응집 억제를 관찰하고 각각의 IC_{50}를 구하였다(Table 1). 혈소판 응집을 50% 억제시키는 파 추출물 농도가 total extract, Fraction I, and Fraction II에서 각각 1,974 μg/m*l*, 1,697 μg/m*l*, 2641 μg/m*l*로 나타나 Fraction I이 가장 효과적이었다.

Table 1. IC_{50} values for the inhibitory effect of oriental onion extracts on platelet aggregation

	Total extract (μg/m*l*)	Fraction I (μg/m*l*)	Fraction II (μg/m*l*)
IC_{50} values	1974±2	1697±87	2641±391

Values are means ± standard error for more than two experiments.

이상과 같은 결과를 종합하면 PRP 혈소판 실험계를 사용하여 식품중 파에 의한 혈소판 응집 억제 효과 및 ATP release 억제능을 검색한 결과 효율적으로 혈소판 작용을 억제시켰으며 각 분획에서도 혈소판 응집을 억제시킴을 관찰하였다.

국민이 많이 먹는 파가 혈액 중의 혈소판에 미치는 영향을 조사함으로써, 파가 국민 건강에 미치는 영향을 알아볼 수 있다. 특히 성인병 중 고혈압, 동맥 경화, 혈전증 등의 심혈관 질환에 대한 파의 치료 및 예방 효과를 기대할 수 있다. 또한 파로부터 항혈소판 작용에 관여하는 성분을 규명하여, 새로운 약물을 개발할 수 있을 것이다. 현재 서구 사회에서 질병에 의한 사망율 중 혈행 장해에 의한 사망율이 제일 높다는 사실과 우리나라에서도 고혈압, 동맥 경화 등의 발병율이 점점 높아지고 있다는 사실을 감안하여 볼 때, 파로부터의 새로운 항혈소판작용 물질 동정은 앞으로 계속 연구되어야 할것이다.

국문요약

본 연구에서는 파 수용성 추출물 및 Sephadex G-150 column을 통과시킨 Fraction I 및 Fraction II를 대상으로 혈소판 응집 억제능을 platelet rich plasma(PRP) 실험계를 사용하여 실험하였다. 그 결과 파 추출물의 IC_{50}는 각각 1,974 μg/m*l*, 1,697 μg/m*l*, 2,641 μg/m*l*로서, Fraction I이 파 추출물의 혈소판 응집 억제 작용에 가장 민감한 것으로 나타났다. 혈소판 활성을 나타내는 또다른 지표인 granule secretion에 미치는 파 추출물의 영향을 ATP release 억제 실험을 통해 검색하였다. 그 결과 ATP release를 파 추출물은 완전히 억제시켰다. 이상의 결과는 식품 중의 파의 수용성 추출물 및 그 분획 각각에서 혈소판 응집 억제능을 함유하고 있으며 구체적인 유효성분은 추후 실험을 통하여 규명되어야 할것이다.

참고문헌

1. Longenecker, G.L.: The platelets :physiology and pharmacology, Academic Press, Orlando, pp. 1-14 (1985).
2. Hawiger, J.: Platelets: receptors, adhesion, secretion, Academic Press, San Diego (1989).
3. Morimitsu, Y. and Kawakishi, S.: Inhibitors of platelet aggregation from onion, *Pytochemistry*, **29**, 3435-3439

(1990).

4. Chen, C.H. and Huang, T.F.: Antiplatelet actions of paraxynol and ginsenosides isolated from ginseng. *Biochim. Biophy. Acta*, **990**, 315-322 (1989).
5. Castro, R.A., Cabrera, S., Cruz, M.R., Ledezma, E. and Jain, M.K.: Effects of garlic extracts and of three pure components isolated from it on human platelet aggregtion, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure, *Thromb. Res.*, **32**, 155-169 (1983).
6. Apitz-Castro, R., Escalante, J., Vargas, R. and Jain, M.K.: Ajone, the antiplatelet principle of garlic, synergistically potentiates the antiaggregatory action of prostacyclin, forskolin, indomethacin and dypiridamole on human platelets, *Thromb. Res.*, **42**, 303-311 (1986).
7. Feinm, R.D, Lubowsky, J., Charo, I. and Zabinski, M.P.: The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets, *J. Lab. Clin. Med.*, **90**, 125-129 (1977).