

천연물 추출물의 항산화, 항균 및 항혈전 활성에 관한 연구: 기능성 소재로서의 가능성

손지원*, 고승나*, 권혁우**

극동대학교 임상병리학과 학사과정*, 극동대학교 임상병리학과 교수**

Antioxidation, Antimicrobial and Antithrombosis activities of natural products

Ji Won Son*, Seung Na Ko*, Hyuk-Woo Kwon**

Undergraduate student, Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University*,

Professor, Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University**

요약 본 연구는 천연물 추출물을 이용한 의약품 및 기능성 소재 개발을 목적으로, 다양한 추출물의 항균, 항산화, 항혈전 활성을 분석한 결과를 제시한다. 연구에서는 총 10종의 천연물을 70% 에탄올로 추출한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다. 그 결과, 10종의 천연물 모두에서 항균 활성이 확인되었으며, 특히 독활, 비파엽, 사간, 연잎이 우수한 항균 활성을 보였다. 추가적으로 추출물의 항산화 활성, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 독활, 비파엽, 사간, 연잎, 그리고 문형에서 높은 항산화 활성을 나타냈다. 또한, 항혈소판 활성을 분석한 결과 독활, 비파엽, 사간, 연잎, 문형이 항혈소판 효과를 보였다. 이 연구를 통해 항균, 항산화, 항혈소판 활성을 모두 지닌 5종의 천연물 추출물이 항균 관련 질환, 산화 스트레스 및 혈전 형성과 관련된 질환을 예방할 가능성이 있는 소재임을 확인하였으며, 이들 천연물은 기능성 식품 및 의약품 개발에 유망한 후보로 제시된다.

주제어 : 천연물, 항균, 항산화, 항혈소판, 산화스트레스

Abstract In this experiment, we evaluated the anti-microbial, anti-oxidant and anti-platelet activities using 70% ethanol extract of natural products. Natural products (*Lycium chinense*, *Aralia cordata*, *Achyranthes japonica*, *Mentha canadensis*, *Eriobotrya japonica*, *Belamcanda chinensis*, *Phlomis umbrosa*, *Lespedeza cuneata*, *Kalopanax septemlobus*, *Nelumbo nucifera*) were extracted with 70% ethanol, freeze-dried, and used in the experiment. All natural products exhibited antibacterial activities, and *Aralia cordata*, *Achyranthes japonica*, *Eriobotrya japonica*, *Belamcanda chinensis*, and *Nelumbo nucifera* showed strong antimicrobial effect. Next, we investigated the antioxidant activity, polyphenol and flavonoid content and antiplatelet activity of the natural products. As a result, *Aralia cordata*, *Achyranthes japonica*, *Eriobotrya japonica*, *Belamcanda chinensis*, and *Nelumbo nucifera* showed antiplatelet effect and Ca²⁺ inhibitory activity. Therefore, it was confirmed that the five natural product extracts have a potential to prevent antibacterial, antioxidant, and antiplatelet-related diseases, and it is suggested that they can be developed as materials for functional foods and pharmaceuticals in the future.

Key Words : Anti-microbial activity, Anti-oxidant activity, Anti-platelet activity, Natural products, Oxidative stress

본 연구는 2024년도 교육부의 지원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신사업의 결과임 (2024C0603024)

Received 22 Oct 2024, Revised 28 Oct 2024
Accepted 29 Oct 2024
Corresponding Author: Hyuk-Woo Kwon
(Far East University)
Email: kwonhw@kdu.ac.kr
ISSN: 2466-1139(Print)
ISSN: 2714-013X(Online)

© Industrial Promotion Institute. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

코로나19 팬데믹 이후 개인위생에 대한 관심이 높아지면서, 인체에 무해한 천연 항균 물질에 대한 수요가 증가하고 있다. 또한, 만성 질환 예방을 위한 항산화 및 항혈소판 활성 물질에 대한 관심도 지속적으로 높아지고 있다. 본 연구에서는 10종의 국내 자생 식물을 선정하여 항균, 항산화, 항혈소판 활성을 비교 평가함으로써, 새로운 천연 항균제 및 건강기능식품 소재 개발의 가능성을 탐색하고자 한다. 특히, 심혈관 질환과의 연관성이 높은 항혈소판 활성에 대한 연구는 상대적으로 부족한 실정이다. 본 연구에서는 선정된 천연물들의 항혈소판 활성을 중점적으로 분석하여, 심혈관 질환 예방 및 치료에 기여할 수 있는 새로운 소재를 발굴하고자 한다. 본 연구를 통해 항균, 항산화, 항혈소판 활성이 우수한 천연물을 발굴하고, 이를 기반으로 안전하고 효과적인 천연 의약품 또는 기능성 식품 개발의 가능성을 제시하고자 한다.

심혈관계질환 중 하나인 죽상경화증 (atherosclerosis)은 혈관의 국소 부위에서 발생하는 질환으로 혈중 지질인 콜레스테롤의 침착으로 발생한다. 혈관 내막에 축적된 지방은 혈관을 좁게 만들어 혈관을 폐쇄하거나 산화되어 혈관내피세포에 염증을 일으키고 손상된 혈관내피세포는 혈소판의 지혈 반응을 일으켜 혈관을 더욱 좁게 만든다. 따라서 죽상경화증의 예방을 위해서는 항염, 항산화, 항혈소판 작용이 필요하다[1].

혈관내피세포의 염증은 지방의 산화 이외에도 미생물의 공격이나 미생물이 방출하는 독소에 의해서도 발생할 수 있으며, 인체혈소판 또한 미생물의 LPS나 산화된 LDL-cholesterol (oxLDL)에도 반응하며 염증 반응에 동원된다. 내피세포 주위 염증 반응은 백혈구를 혈관 내막으로 이끌게 되고 혈관 외 유출로 백혈구는 foam cell로 변화하여 지방의 산화를 촉진한다. 따라서 죽상경화증의 연구를 위해서는 포괄적으로 작용할 수 있는 천연물 소재의 발견이 필요하다. 기존의 천연물 연구는 항균, 항산화, 항혈소판에 관하여 각각의 연구가 수행되었다. 하지만 심혈관계질환에 중점을 두었을 때 어떠한 천연물이 효과가 있을지에 대한 포괄적인 연구는 수행되지 않았다. 따라서 본 연구는 항균, 항산화, 항혈소판에 동시에 작용할 수 있는 천연물을 발견하기 위하여 수행되었다.

실험에 사용된 천연물은 총 10종으로 구기자(*Lycium*

chinense), 독활(*Aralia cordata*), 문형(*Achyranthes japonica*), 박하(*Mentha canadensis*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 사간(*Belamcanda chinensis*), 속단(*Phlomis umbrosa*), 야관문(*Lespedeza cuneata*), 엄나무(*Kalopanax septemlobus*), 그리고 연잎(*Nelumbo nucifera*)을 사용하였다.

2. 실험

2.1 재료 및 추출

본 연구에 사용된 천연물들은 온라인 마켓인 한약재 시장에서 구매하여 사용하였다. 천연물은 분쇄기를 이용하여 80 mesh 크기로 분쇄하고, soxhlet 추출기를 이용하여 70% 에탄올을 용매로 하여 1시간 동안 추출하였다. 70% 에탄올은 극성 성분과 비극성 성분을 포괄적으로 추출할 수 있는 용매로 선택되었다. 추출액을 합하여 Whatman No. 1 여과지로 감압 여과한 후, 회전 진공 농축기를 이용하여 40°C, 50 mTorr에서 완전히 농축하였다. 이후 농축액을 동결건조기를 이용하여 -80°C에서 48시간 동안 동결건조하여 시료를 제작하였다. 얻어진 건조 시료를 DMSO를 사용하여 100 mg/mL로 용해시킨 후 실험에 사용하였다.

2.2 항균활성 분석 (Analysis of antibacterial activity)

표준 균주인 *Staphylococcus aureus* ATCC 21428를 한국 미생물보존센터로부터 분양받아 Mueller Hinton broth에서 37°C, 24시간 배양하여 활성화시켰다. 활성화된 균액을 0.5 McFarland 표준액에 맞추어 희석한 후, Mueller Hinton agar (4mm)에 희석 접종하였다. 디스크 확산법은 6 mm filter paper 디스크에 각 추출물을 12.5, 25, 50, 100 mg/mL의 농도로 10 μ L씩 분주하고, 배지 위에 놓았다. 양성 대조군으로 ampicillin 디스크, 음성 대조군으로 DMSO 디스크를 사용하였다. 37°C, 24시간 배양 후, 디스크 주변의 명확한 억제대를 측정하였다. 각 농도 별로 3회 반복 실험을 진행하였다.

2.3 항산화 효능 분석 (Analysis of antioxydant activity)

항산화 활성을 분석하기 위하여 7 mM ABTS시약과 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 빛이 없는 환경에서 24시간가량 방치 하여 ABTS stock을 제조하고, ABTS stock을 734 nm에서 흡광도가 0.6이 되도록 희석한 실험에 사용하였다[2]. 계단 희석한 추출물 및 ascorbic acid를 각각 96 well plate에 50 μ L씩 분주한 후 희석된 ABTS시약과 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 분석하였다. 억제율은 추출물의 흡광도와 대조군의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다. 항산화 활성평가의 대조물질로는 ascorbic acid가 사용되었다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [1 - (A - B) / C] \times 100$$

A; absorbance of the sample,

B; absorbance of the blank,

C; absorbance of the ABTS solution

2.4 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석 (Analysis of polyphenol and flavonoid content)

폴리페놀 함량은 folin-ciocalteau phenol reagent 비색법을 사용하여 측정하였다[3]. 폴리페놀 분석을 위해 천연물 추출물과 표준물질인 gallic acid를 농도 별로 희석한 후 분석에 사용하였다. 실험을 진행하기에 앞서 만들어 둔 15% Na_2CO_3 와 folin-ciocalteau phenol reagent를 조성에 맞게 첨가하여 반응시키고 96 well plate에 분주하여 760nm에서 흡광도를 분석하였다. 플라보노이드 분석을 위해 천연물 추출물과 표준물질인 quercetin을 농도 별로 희석한 후 분석에 사용하였다. 이후 1 M potassium acetate, 80% ethanol, 10% aluminum nitrate 을 첨가하여 반응시키고 96 well plate에 분주 한 뒤 415 nm에서 흡광도를 분석하였다.

2.5 혈소판 응집능 분석 (analysis of platelet aggregation)

실험에 사용된 인체 혈소판은 대한적십자사 경기혈액원(Changwon, Korea)으로부터 구입 하여 실험에 사용하였다. 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP)은 1300 g에서 10분간 원심분리하여 혈소판을 분리한 후

washing buffer (10 mM sodium citrate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% dextrose, pH 7.4) 로 2회 세척 한 뒤 tyrode's buffer (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO_3 , 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4) 에 부유하여 최종 농도가 $2.5 \times 10^8/\text{mL}$ 가 되도록 조정하였다[4]. 이후 혈소판 부유액과 다양한 농도의 추출물(50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 유리 cuvette으로 옮긴 후 2분간 배양 한 뒤 혈소판 응집자극제인 collagen을 사용하여 혈소판 응집능을 유발하였다. 혈소판의 응집능은 투과도를 바탕으로 계산되었으며 aggregometer (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA)에 의해 (%)로 환산되었다. 이 실험은 기관생명윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다(P01-202401-02-010).

2.6 세포독성 분석 (analysis of cytotoxicity)

천연물의 세포독성을 확인하기 위하여 혈소판 부유액 ($2.5 \times 10^8/\text{mL}$)과 다양한 농도의 천연물(50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 섞고 2분간 사전 배양하였다. 이후 1300 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하여 상층액에 존재하는 lactate dehydrogenase (LDH)농도를 분석하여 세포 독성도를 평가하였다. LDH농도 분석은 LDH EIA kit를 사용하여 ELISA reader (TECAN, Salzburg, Austria)로 분석하였다.

2.7 Ca^{2+} 동원 분석 (Analysis of Ca^{2+} mobilization)

혈소판 풍부혈장(PRP)에 칼슘분석을 위한 형광 시료인 Fura 2-AM을 처리하고 60분간 배양하였다. 그 후 혈소판 부유액을 1300g에서 7분간 원심분리하고 washing buffer와 tyrode's buffer를 이용하여 세척과 혈소판 부유액을 제조하였다. 이후 혈소판 부유액($2.5 \times 10^8/\text{mL}$)과 다양한 농도의 추출물(50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 유리 cuvette으로 옮긴 후 함께 섞고 2분간 사전 배양하고, collagen (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 응집자극제로 응집반응을 유도하여 5분간 반응하여 형광 파장을 분석하였다. 형광 파장은 Grynkiewicz[5]의 방법을 사용하여 형광 광도계 (F-2700; Hitachi, Japan)로 분석하였다.

2.8 혈전 수축 분석 (Analysis of clot retraction)

PRP를 반응 tube로 옮긴 후 항혈소판 효과를 보이는 천연물의 최대 농도(200 $\mu\text{g/mL}$)를 첨가하여 37° C에서 10분간 전 처리한 후, 0.2 U/mL thrombin으로 반응을 유도하였다. 20분간 반응 후 사진을 촬영하고, 혈병이 수축된 면적을 Image J 프로그램(National Institutes of Health, USA)을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 항균 활성 효과 (Antibacterial activity of natural products)

본 연구에서는 <표 1> 10종의 천연물 추출물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성을 평가하였다. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)는 호흡기계 및 피부에 풍부하게 존재하는 상재균 중 하나이며 수술이나 피부 접촉을 통해 감염이 발생하며 *S. aureus*가 생산하는 독소인 enterotoxin은 내열성이며 식중독을 일으킬 수 있다[6]. 따라서 항균 활성을 확인하기 위한 지표 균주로 *S. aureus*를 사용하여 항균 활성을 분석하였다.

<표 1> 추출물의 항균 활성

Extracts	Inhibition Zone (mm)			
	Extracts (mg/mL)			
	12.5	25	50	100
<i>Lycium chinense</i>	7	10	16	18
<i>Aralia cordata</i>	11	16	19	25*
<i>Achyranthes japonica</i>	6	12	14	17
<i>Mentha canadensis</i>	7	11	15	19
<i>Eriobotrya japonica</i>	12	16	20	22*
<i>Belamcanda chinensis</i>	8	10	14	18
<i>Phlomis umbrosa</i>	10	14	17	20*
<i>Lespedeza cuneata</i>	8	10	13	16
<i>Kalopanax septemlobus</i>	7	9	11	18
<i>Nelumbo nucifera</i>	12	15	18	24*

* $p < 0.05$ versus antibacterial activity of DMSO

항균 실험 결과, 독활(*Aralia cordata*) 추출물이 가장 우수한 항균 활성을 나타냈으며, 연잎(*Nelumbo nucifera*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 속단(*Phlomis umbrosa*) 추출물에서도 항균 활성을 보였다. 특히, 독활의 경우 기존 연구에서 보고된 바와 같이 사포닌 성분이 항균 활성에 기여했을 가능성이 높다. 본 연구 결과는

독활 추출물이 새로운 천연 항균제 개발을 위한 유용한 소재임을 시사하며, 향후 독활의 항균 작용 기전에 관한 추가 연구가 필요하다.

3.2 항산화 효과 (Antioxydant activity of natural products)

활성산소종(reactive oxygen species)은 인체 노화의 주원인으로 생체 내 항산화 방어체계에 부담을 주고 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다[7,8]. 따라서 항산화 효능을 갖는 다양한 천연물 소재의 발견이 필요하다. 따라서, 우리는 천연물 10종의 ABTS 라디칼 소거 활성을 대조군인 ascorbic acid와 비교하여 평가하였다. 항산화 활성 효과는 50% 억제되었을 때의 농도(RC₅₀)을 분석하여 <표 2>에 정리하였다.

<표 2> 추출물의 라디칼 소거 활성

Extracts	Radical scavenging activity
	(RC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)
<i>Lycium chinense</i>	2145.2
<i>Aralia cordata</i>	940.4
<i>Achyranthes japonica</i>	920.2
<i>Mentha canadensis</i>	2654.5
<i>Eriobotrya japonica</i>	1004.2
<i>Belamcanda chinensis</i>	1206.2
<i>Phlomis umbrosa</i>	2445.6
<i>Lespedeza cuneata</i>	1988.5
<i>Kalopanax septemlobus</i>	1804.4
<i>Nelumbo nucifera</i>	950.5
Ascorbic acid	10.2

RC₅₀: The concentration required for 50% scavenging against particular free radical species.

추출물 중에서 가장 항산화 활성이 강력한 물질은 문형(*Achyranthes japonica*)이며 RC₅₀의 농도는 920.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 분석되었다. 다음으로 독활(*Aralia cordata*)의 RC₅₀의 농도는 940.4 $\mu\text{g/mL}$ 로, 연잎(*Nelumbo nucifera*)의 RC₅₀의 농도는 950.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 분석되었다. 비파엽(*Eriobotrya japonica*)과 사간(*Belamcanda chinensis*)의 RC₅₀의 농도는 1004.2 $\mu\text{g/mL}$ 와 1206.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 각각 분석되었다.

3.3 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 (Polyphenol

and flavonoid content of natural products)

본 연구에서는 <표 3> 10종의 천연물 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 분석하였다. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량의 결과는 문형 (*Achyranthes japonica*), 독활(*Aralia cordata*), 연잎 (*Nelumbo nucifera*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 사간 (*Belamcanda chinensis*)의 순으로 높은 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 갖는 것으로 분석되었다. 문형의 총 폴리페놀 함량은 452.6 ± 0.12 mg/g으로 분석되었으며 총 플라보노이드 함량은 155.4 ± 0.22 mg/g으로 분석되었다.

<표 3> 추출물의 성분 분석

Extracts	Content (mg/g)	
	Total flavonoid	Total polyphenol
<i>Lycium chinense</i>	21.5 ± 0.14	55.6 ± 0.31
<i>Aralia cordata</i>	150.5 ± 0.18	400.1 ± 0.05
<i>Achyranthes japonica</i>	155.4 ± 0.22	452.6 ± 0.12
<i>Mentha canadensis</i>	32.4 ± 0.33	125 ± 0.16
<i>Eriobotrya japonica</i>	106.1 ± 0.25	354.4 ± 0.14
<i>Belamcanda chinensis</i>	85.6 ± 0.15	77.54 ± 0.19
<i>Phlomis umbrosa</i>	21.4 ± 0.16	54.5 ± 0.23
<i>Lespedeza cuneata</i>	16.8 ± 0.12	56.5 ± 0.12
<i>Kalopanax septemlobus</i>	10.6 ± 0.02	43.2 ± 0.32
<i>Nelumbo nucifera</i>	142.2 ± 0.16	396.6 ± 0.11

대표적인 항산화 물질로 알려진 폴리페놀(polyphenol)은 분자 하나에 페놀(phenol) 그룹이 2개 이상 있는 작용기로 여러 개의 수산기(hydroxyl, -OH)를 갖고 있으며, 우리 몸에 있는 활성 산소를 제거하는 항산화작용으로 노화를 방지하는 효과가 있으며 다양한 질병으로부터의 위험을 낮추는 것으로 보고되었다. Flavonoid 구조는 두 개의 페닐(phenyl) 고리와 산소를 포함하는 헤테로사이클(heterocycle)로 구성되어 있으며 항산화 활성, 자유 라디칼(free radical) 소거 능력, 항염증 등의 효능을 갖는 분자구조이다. 실험에서 항산화 활성이 뛰어난 문형 (*Achyranthes japonica*), 독활(*Aralia cordata*), 연잎 (*Nelumbo nucifera*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 사간 (*Belamcanda chinensis*)의 결과는 폴리페놀과 플라보노이드 함량의 결과에서도 높은 함량을 갖는 것으로 나타났다.

3.4 혈소판응집반응 억제 효과 (Inhibitory

effect of platelet aggregation by natural products)

심혈관계질환(cardiovascular disease)은 심장 및 혈관 등 순환계통 질환의 총칭이며 주요 질병으로는 심장병과 혈관질환이 있다. 하위 분류로는 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 죽상경화증(동맥경화증), 부정맥, 뇌혈관 질환, 뇌졸중 등이 있다[9]. 심혈관계질환은 우리나라의 대표적인 사망원인 중 하나로 2022년 통계자료에 따르면 심혈관계질환이 전체 사망원인 중 2위를 차지하며(65.8%), 현재까지도 꾸준한 상승세를 유지하고 있다. 혈소판은 심혈관계 질환을 유발 시킬 수 있는 세포로 알려져 있다[10]. 일반적인 지혈작용을 벗어난 과도한 혈소판의 활성화는 혈전을 생성시켜 심혈관계 질환을 일으킬 수 있으므로 혈소판의 기능을 적절하게 조절할 필요가 있다. 따라서 우리는 천연물 중에서 혈소판의 기능을 억제할 수 있는 물질을 발견하기 위한 연구를 수행하였다. 10종의 천연물 추출물을 사용하여 혈소판 응집반응을 수행한 결과 5종의 천연물에서 항혈소판 활성을 확인하였다. 그 결과 collagen으로 응집을 유도한 혈소판은 86.4%의 응집률을 나타냈지만, 5종의 추출물에 의해 농도 의존적인 억제 활성을 나타냈다. 천연물의 혈소판 응집 억제율은 <표 4>에 정리하였다.

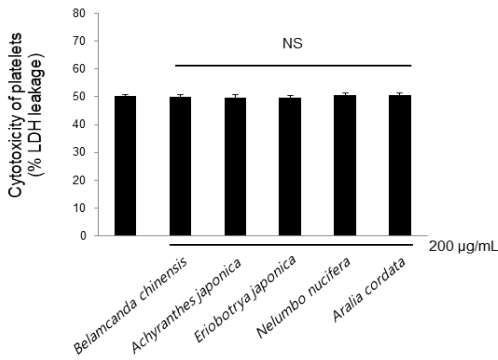
<표 4> 추출물의 혈소판응집반응 억제율

Extracts (µg/mL)	Inhibition rate of aggregation (%)			
	50	100	150	200
<i>Aralia cordata</i>	40%	63%	82%	92%
<i>Achyranthes japonica</i>	34%	50%	70%	82%
<i>Eriobotrya japonica</i>	36%	56%	72%	86%
<i>Belamcanda chinensis</i>	10%	33%	45%	51%
<i>Nelumbo nucifera</i>	44%	65%	78%	90%

혈소판응집반응의 억제율은 최대농도인 200 µg/mL기준으로 독활(*Aralia cordata*)에서 92%의 억제율을 나타냈다. 다음으로 억제 활성이 강한 천연물은 연잎 (*Nelumbo nucifera*)이며 억제율은 90%를 나타냈다. 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 문형(*Achyranthes japonica*), 사간(*Belamcanda chinensis*)의 억제율은 각각 86%, 82%, 51%로 나타났다.

3.5 천연물의 세포독성 평가 (Evaluation of cytotoxicity of natural products)

천연물의 세포독성을 확인하기 위하여 혈소판응집 억제 활성을 갖는 사간(*Belamcanda chinensis*), 문형(*Achyranthes japonica*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 연잎(*Nelumbo nucifera*), 독활(*Aralia cordata*) 200 μ g/mL의 농도에서 혈소판에 미치는 세포독성을 평가하였다. 그 결과 5가지 천연물 모두 세포독성을 나타내지 않았다 [그림 1]. 이 결과는 천연물의 항혈소판 효과가 세포의 손상이나 사멸이 아닌 올바른 억제 효과임을 증명한다.



[그림 1] 천연물의 세포독성 결과. NS, not significant.

3.6 Ca²⁺ 동원 억제 효과 (Inhibitory effect of Ca²⁺ mobilization by natural products)

혈소판 내부에 증가하는 Ca²⁺은 혈소판의 활성화를 통해서 발생한다. 혈소판의 Ca²⁺은 dense tubular system이라 불리는 저장소에서 세포질로 분비되며, 동원된 Ca²⁺은 Ca²⁺ 의존성 효소의 활성을 일으켜 혈소판의 형태변화(shape change)와 과립방출(granule release)을 일으켜 혈소판의 응집을 더욱 촉진한다[11]. 따라서 천연물들이 혈소판 내부의 Ca²⁺ mobilization 조절 활성을 평가 해야 한다. 우리는 항혈소판 활성을 나타낸 독활(*Aralia cordata*), 연잎(*Nelumbo nucifera*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 문형(*Achyranthes japonica*), 사간(*Belamcanda chinensis*)을 사용하여 인체 혈소판의 Ca²⁺ mobilization에 미치는 영향을 평가하였다 <표 5>.

<표 5> 추출물의 혈소판 내부 Ca²⁺ 동원 억제율

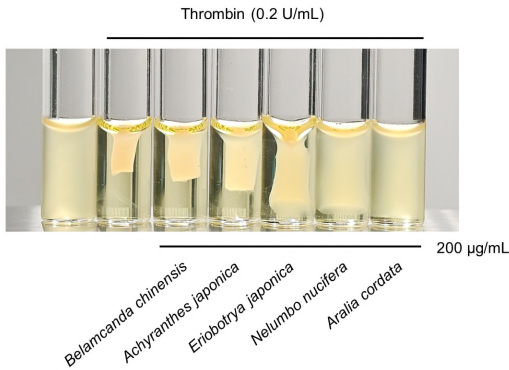
	Inhibition rate of Ca ²⁺ mobilization (%)		
	Extracts (μ g/mL)		
	50	100	200
<i>Aralia cordata</i>	51%	65%	90%
<i>Achyranthes japonica</i>	40%	50%	78%
<i>Eriobotrya japonica</i>	42%	52%	82%
<i>Belamcanda chinensis</i>	11%	28%	60%
<i>Nelumbo nucifera</i>	48%	54%	88%

인체혈소판을 collagen으로 자극하여 Ca²⁺ mobilization을 평가한 결과 억제 활성은 혈소판응집 억제 활성과 유사한 경향을 나타냈으며, 독활(*Aralia cordata*), 연잎(*Nelumbo nucifera*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 문형(*Achyranthes japonica*), 사간(*Belamcanda chinensis*)의 순서로 억제율이 높았다. 독활 200 μ g/mL의 억제율은 90%를 나타냈다.

3.7 혈전 수축 억제 효과 (Inhibitory effect of clot retraction by natural products)

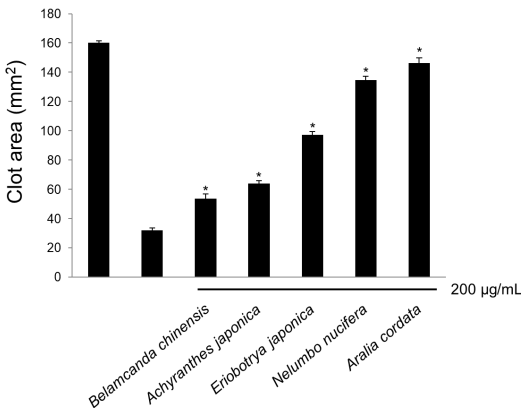
혈관 손상 부위에 점착한 혈소판은 활성화되고 활성화된 혈소판의 α IIb/ β 3는 구조가 변환되며 인접한 혈소판들과 fibrin 및 fibrinogen을 매개로 그물구조를 형성한다[12]. 혈장 단백질인 fibrinogen은 혈액응고인자 (blood coagulation factor)들의 연쇄작용에 의해 fibrin으로 변환된다. 혈소판의 인테그린 glycoprotein IIb/IIIa는 혈소판에서 가장 풍부한 인테그린이며, 혈소판의 활성화로 인해 형태가 변환되어 fibrin에 친화성을 갖는다. 혈관의 손상은 혈소판의 활성화와 혈액응고인자의 연쇄작용을 유도하고 혈소판의 지혈 마개 형성에 참여한다. 혈소판의 응집반응은 수축하면서 지혈 부위를 견고하게 봉인한다. 독활(*Aralia cordata*), 연잎(*Nelumbo nucifera*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 문형(*Achyranthes japonica*), 사간(*Belamcanda chinensis*)은 collagen으로 자극한 인체 혈소판 응집반응과 Ca²⁺ mobilization을 억제하였기 때문에 혈전 수축(clot retraction)작용에 미치는 영향을 평가하였다. 혈전 수축의 agonist로 사용된 thrombin은 혈소판의 agonist로서 작용하면서, 동시에 fibrinogen을 fibrin으로 전환 시키므로 clot retraction 실험에 사용되었다 [13]. Thrombin으로 유도한 clot retraction반응은 독활과 연잎, 그리고 비파엽에서 강력한 억제 활성을 나타냈다

[그림 2].



[그림 2] 천연물의 혈전 수축 억제 효과.

Clot retraction 실험의 억제율을 살펴보면, 가장 강력하게 clot retraction을 억제한 추출물은 독활(*Aralia cordata*)이며 thrombin 단독으로 유도한 수축면적에 대한 독활 200 µg/mL의 수축 억제율은 78.3%를 나타냈다 [그림 3].



[그림 3] 혈전 수축 면적 분석 (mm²).

The data is expressed as the mean ± standard deviation (n=4). **p* < 0.05 versus thrombin-stimulated PRP.

다음으로 높은 억제율을 나타낸 추출물은 연잎 (*Nelumbo nucifera*)이며 200 µg/mL에서 억제율은

76.4%를 나타냈다. 비파엽(*Eriobotrya japonica*)과 문형 (*Achyranthes japonica*)에서는 각각 67.3%와 50.2%의 억제율을 나타냈다. 사간(*Belamcanda chinensis*)의 효과는 가장 미약하였으며 200 µg/mL에서 40.7%의 억제율을 나타냈다.

4. 결론

본 연구는 천연물의 다양한 생리활성을 규명하고, 이를 바탕으로 새로운 기능성 식품 소재 개발의 가능성을 탐색하기 위해 수행되었다. 특히, 심혈관 질환의 주요 원인 중 하나인 죽상경화증에 대한 예방 효과를 기대하며, 항균, 항산화, 항혈소판 활성을 나타내는 천연물을 선별했다. 10종의 천연물 추출물을 대상으로 항균, 항산화, 항혈소판 활성을 평가한 결과, 독활, 문형, 비파엽, 사간, 연잎 등 5종의 추출물에서 우수한 효능을 확인하였습니다. 특히, 독활은 세 가지 활성 모두에서 뛰어난 효과를 나타냈다.

죽상경화증은 혈관 내벽에 지질이 축적되고 염증 반응이 발생하여 혈관이 좁아지는 만성 질환이다. 본 연구에서 선별된 천연물들은 항산화 작용을 통해 혈관 내벽 손상을 억제하고, 항균 작용을 통해 혈관 염증을 일으키는 요인들을 완화하며, 항혈소판 작용을 통해 혈전 형성을 억제함으로써 죽상경화증 진행을 억제할 가능성이 있다. 독활의 경우, 기존 연구에서 보고된 바와 같이 사포닌 성분이 항산화 및 항염증 효과에 기여할 수 있으며, 이러한 효과가 죽상경화증 예방에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

본 연구 결과는 선정된 5종의 천연물이 항균, 항산화, 항혈소판 기능성 식품 소재로 개발될 수 있는 가능성을 제시한다. 특히, 독활은 심혈관 질환 예방을 위한 기능성 식품 개발에 있어 유용한 소재가 될 수 있을 것으로 기대된다. 향후 동물 모델을 이용한 추가 연구를 통해 독활의 죽상경화증 억제 효과를 명확히 규명하고, 활성 성분을 분리하여 기능성 식품 개발에 활용할 수 있을 것이다.

실제로 항혈소판 효과를 통하여 기능성 소재로 이용된 대표적인 천연물은 인삼과 은행나무잎이다. 인삼의 성분 중 ginsenoside Rg3는 홍삼에 함유되어 있는 성분으로 인삼을 홍삼으로 가공하는 과정에서 생성되는 사포닌이다. 다양한 항혈소판 활성이 in vivo와 in vitro에서

규명되어 건강기능식품 개별인정형 기능성 원료로 승인 받아 혈행개선의 제품으로 개발되었다. 은행나무잎 추출물 또한 혈소판 기능을 억제하는 건강기능식품 개별인정형 기능성 원료로서 제품화되었다. 따라서 본 연구는 심혈관질환을 예방할 수 있는 새로운 기능성 소재의 개발에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- [1] P. von Hundelshausen, C. Weber, "Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease", *Circ. Res* 100(1), pp. 27-40, (2007)
- [2] O. Erel, "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clin. Biochem.* 37(4), pp. 277-285, (2004)
- [3] E. A. Ainsworth, K. M. Gillespie, "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent", *Nature protocols.* 2(4), pp. 875-877, (2007)
- [4] G. V. R. Born, M. Hume, "Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma", *Nature.* 215(5105), pp. 1027-1029, (1967)
- [5] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, "A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties", *J. Biol. Chem.* 260, pp. 3440-3450, (1985)
- [6] M. A. Argudi n, M. C. Mendoza, M. R. Rodicio, "Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins", *Toxins.* 2(7), pp. 1751-1773, (2010)
- [7] J. M. Hyun, Y. J. Jo, Y. B. Kim, S. M. Park, K. S. Yoon, N. H. Lee, "Antiinflammatory and Anti-oxidative Activities of Flavonoids Extracted from Dendranthema indicum Flowers in Jeju Island", *Journal of the Korean Applied Science and Technology.* 36(4), pp. 1259-1267, (2019)
- [8] J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, S. N. Park, "Antioxidative and Antiaging Effects of Jeju Native Plant Extracts (II)", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 33(3), pp. 165-173, (2007)
- [9] H. Thomas, J.,Diamond, A. Vieco, S. Chaudhuri, E. Shinnar, S. Cromer, A. E. Moran, "Global atlas of cardiovascular disease", *Glob Heart.* 13(3), pp. 143-63, (2018)
- [10] S. P. Jackson, "Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly", *Nat. Med* 17, pp. 1423-1436, (2011)
- [11] D. Varga-Szabo, A. Braun, B. Nieswandt, "Calcium signaling in platelets", *J. Thromb. Haemost.* 7, pp.1057-1066, (2009)
- [12] K. P. Fong, H. Zhu, L. M. Span, D. T. Moore, K. Yoon, R. Tamura, J. S. Bennett, "Directly activating the integrin α IIb β 3 initiates outside-in signaling by causing α IIb β 3 clustering", *J. Biol. Chem.* 291(22), pp. 11706-11716, (2016)
- [13] D. Bottechia, G. Fantin, "Platelets and clot retraction", *Thromb. Haemost.* 30(06), pp. 567-576, (1973)
- [14] P. von Hundelshausen, C. Weber, "Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease", *Circ. Res* 100(1), pp. 27-40, (2007)

손 지원 (Ji Won Son)



- 2021년 3월~현재: 극동대학교 임상병리학과 재학생
- 관심분야: 천연물, 항균, 항산화, 항혈소판
- E-Mail: sjw7552@naver.com

고 승 나 (Seung Na Ko)



- 2021년 3월~현재: 극동대학교 임상병리학과 재학생
- 관심분야: 천연물, 항균, 항산화, 항혈소판
- E-Mail: isc09134@naver.com

권 혁 우 (Hyuk-Woo Kwon)



- 2011년 3월~2017년 2월: 인제대학교 (의학 박사)
- 2018년 3월~현재: 극동대학교 임상병리학과 조교수
- 관심분야: 천연물, 항균, 항산화, 항혈소판
- E-Mail: kwonhw@kdu.ac.kr

