

건강기능식품 기능성 평가 가이드

(민원인 안내서)

혈행 관련

2020. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(혈행 관련)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2020년 9월 일 담당자 확 인(부서장) 이 혜 영		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2020년 9월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4402, 4416, 4421, 4422, 4423, 4425, 4426, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2015-1-004	2015.12.	제정
2	안내서-0127-01	2017.6.1.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.)
3	안내서-0127-02	2020.9.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 Ⅰ 서 론	5
 Ⅱ 일반적 사항	5
1. 개요	5
2. 보건학적 중요성	15
 Ⅲ 기능성 시험 방법	17
1. 바이오마커의 선정	17
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	32
3. 시험 설계 시 고려사항	43
 Ⅳ 참고문헌	46

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

「건강기능식품에 관한 법률」 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5-HT	5-hydroxytryptamine
Alx	augmentation index
AM	acetomethyl
aPTT	activated partial thromboplastin time
AT	antithrombin
cGMP	cyclic guanosine-5'-monophosphate
COX	cyclooxygenase
DHA	docosahexaenoic acid
EDL	segment shortening
EIVD	endothelium-independent dilation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ESL	end-diastolic lengths
F	fluorescence
FDP	fibrin/fibrinogen degradation products
FID	flow-independent dilation
HCII	heparin cofactor II; LP(a)
IMT	intima media thickness
LP(a)	lipoprotein(a)
MAO	monoamine oxidase
NO	nitric oxide
PA	plasminogen activator
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAT index	peripheral arterial tonometry index
PGI2	prostacyclin I2
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet-rich plasma
PT	prothrombin time
PWV	pulse wave velocity
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule-1
SS	segment shortening
sVCAM-1	soluble vascular cell adhesion molecule-1

TAFI	thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TF	tissue factor
TFPI	TF pathway inhibitor
tPA	tissue plasminogen activator
TT	thrombin time
TXA2	thromboxane A2
TXB2	thromboxane B2
uPA	urokinase plasminogen activator
WP	washed platelets

I

서론

이 가이드는 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품안전처의 기능성(혈행 관련) 평가 원칙 및 기준 등을 알람으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 개요

가. 혈행

혈행은 혈액이 혈관을 통하여 신체의 각 부분으로 이동하는 것을 의미한다. 혈액은 신체의 각 조직으로 산소와 영양분을 공급하고, 세포에서 만들어낸 노폐물을 제거해 준다. 또한, 혈액은 호르몬을 작용부위로 운반하고, 외부 유해물질로부터 세포를 방어하며, 적당한 체온을 유지시켜주고, 지혈작용을 하는 등 신체 내 항상성을 유지시키는 역할을 한다. 따라서 원활한 혈액의 흐름은 신체기능을 유지하는 데 매우 중요하고, 혈행장애는 뇌심혈관계 질환의 발생 위험을 높일 수 있다.

나. 혈행에 관여하는 인자

(1) 혈구세포 및 혈액응고인자

혈액은 혈장 및 혈구세포로 구성되어 있다. 혈장에는 혈액응고와 관련된 다양한 혈액응고인자(coagulation factors)들이 존재하며, 주요 혈구세포(혈소판, 적혈구, 백혈구 등)와 혈액응고인자들은 다양한 상호 작용을 통해 각 세포 작용의 평형상태를 유지하고 혈액의 흐름을 조절한다(그림 1). 혈소판은 골수(bone marrow) 세포인 megakaryote의 세포질이 떨어져 혈액 중에 유리된 직경이 2-4 μ m의 작은 세포이다. 혈소판의 수명은 5-7일 정도로 짧다. 혈관이 손상되면 혈관내벽의 콜라겐, 피브로넥틴 등이 노출되면서 혈소판의 부착이 시작된다.

이와 같이 혈액을 구성하는 혈장과 혈구세포(적혈구 및 혈소판)는 혈관의 손상된 부위나 염증 부위에서 정상적인 지혈과 보호작용을 하여 혈류의 항상성을 유지 시킨다. 그러나 혈장 내 혈액응고 인자의 과도한 활성화, 혈소판 응집 촉진, 적혈구 변형능 이상은 혈류의 항상성 파괴하여 혈액의 점도 변화, 혈행 이상, 응집생성 등을 통하여 혈관 질환 발생 위험을 증가 시킨다.

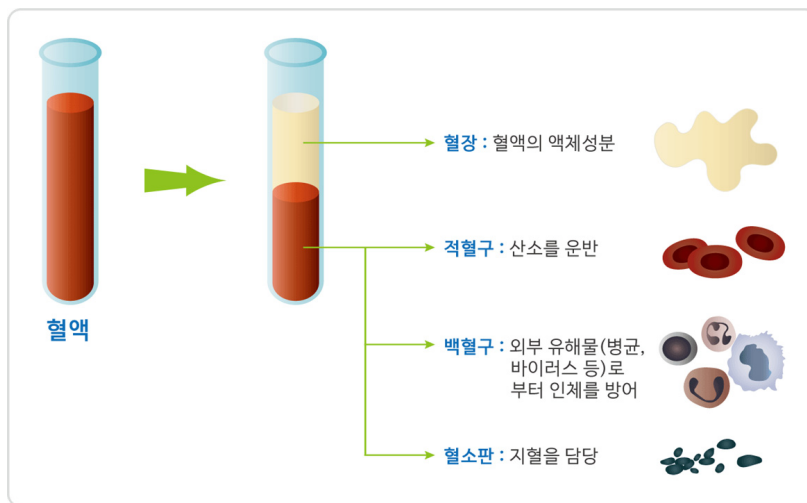


그림 1. 혈액의 구성 성분

[출처: 국가건강정보포털]

(2) 혈관 내피(Vascular endothelium)

혈관 내피(vascular endothelium)는 혈관 층의 내막(intima) 표면에 내피세포(endothelial cell)로 이루어진 단일층이다(그림 2). 혈관 내피는 생물학적 활성을 갖는 다양한 종류의 물질을 합성하고 분비함으로써 혈액의 유동성, 흐름, 혈관 긴장도(vascular tone) 등을 조절한다. 또한, 혈소판 응집과 혈전생성 및 용해 등에 관여함으로써 동맥혈관의 기능 및 건강을 유지하고 조절하는데 중요한 역할을 수행한다. 즉, 혈관 내피세포는 일차적으로 혈관벽 내에 순환하는 혈액의 유출을 방지하는 해부학적 장벽(barrier)으로서의 역할을 할 뿐만 아니라 혈관장력 조절, 혈관 벽의 부분적 세포 성장 및 세포 외 기질 침착 조절, 혈액 내 강력한 유해 결과를 초래하는 물질과 세포로부터 혈관 보호, 부분적 손상에 대한 혈액 응고, 염증, 그리고 수선 반응에 의한 혈관의 항상성 유지에 관여한다.

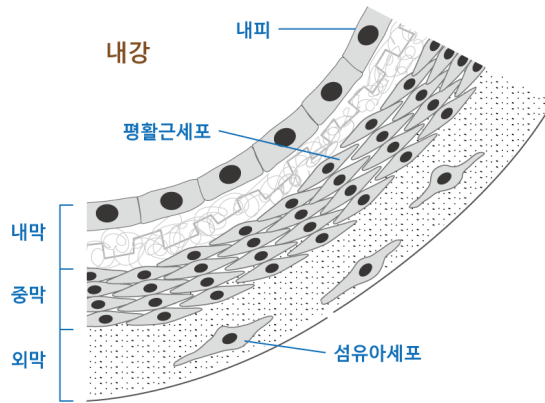


그림 2. 혈관의 구조

다. 혈행 장애의 원인 및 기전

(1) 적혈구의 변형능력 저하

혈액 내 적혈구는 산소를 전달하는 역할을 하며, 적혈구의 30%를 차지하는 헤모글로빈이 그 역할을 담당한다. 적혈구는 양쪽이 오목한 지름 약 $8\mu\text{m}$ 인 원판 모양이며, 산소 교환이 일어나는 모세혈관의 지름은 평균 $6\mu\text{m}$ 정도로 대체로 적혈구보다 지름이 작다. 그러므로 적혈구가 모세혈관을 통과하기 위해서는 적혈구의 형태가 적절하게 변화되어야 한다. 따라서 적혈구의 변형 능력은 모세혈관에서 혈액 흐름의 속도와 양에 영향을 미친다. 당뇨병, 고혈압 등 여러 가지 만성질환으로 단백질 또는 지방이 산화되거나 세포막의 유동성이 변화되는 경우, 적혈구의 변형력이 현저히 감소하여 혈액 흐름이 느려지거나 전단응력(shear stress)의 발생으로 혈액 흐름에 장애가 발생할 수 있다.

적혈구 막의 외부에는 스핑고마이엘린(sphingomyelin)과 포스파티딜콜린(phosphatidylcholin)이, 막의 내부에는 포스파티딜세린(phosphatidylserine)과 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol)이 존재한다. 그러나 적혈구가 외부 자극에 의해 손상 및 영향을 받게 되면 이러한 적혈구의 비대칭 구조가 파괴되어 포스파티딜세린이 밖으로 노출되며, 이로 인해 혈액응고 반응이 야기된다.

(2) 혈액점도

혈액 점도는 뇌심혈관계질환 발병 인자인 고혈압, 고지혈증, 당뇨, 흡연, 비만 등과 밀접한 관계가 있다. 혈액점도는 수축기 및 이완기에서 측정하며 과다점성증후군, 심뇌혈관 질환, 말초혈관 질환의 치료 및 예후에 사용된다.

(3) 과도한 혈액응고 반응 및 혈전생성

정상적인 상태에서는 혈관에 상처가 생겨 상처 부위로 피가 흘러나오게 되면 지혈반응(hemostasis)이 시작된다. 지혈반응은 크게 혈관단계, 혈소판단계, 응고단계를 거치는 순차적이고 복합적인 과정에 의해 진행된다. 즉, 혈액손실을 줄이기 위해 가장 먼저 혈관이 수축되는 ‘혈관단계’가 활성화되며, 다음으로 혈소판이 손상된 혈관내피세포에 달라붙고 서로 응집하여 초기에 손상된 부위를 메워주는 ‘혈소판단계’가 진행된다.

혈소판 자체는 원래 점착성이나 응집성이 없지만, 혈관 주위의 감염이나 혈관 손상부위에서 분비되는 여러 자극물질에 의하여 점착성과 응집성을 갖게 되어 혈관내벽에 달라붙을 수 있게 된다. 즉, 혈관 손상 시 혈관내벽의 콜라겐(collagen), von Willebrand factor(vWF), fibronectin 등에 의하여 혈소판의 부착이 촉진된다. 또한, 혈소판은 활성화되면서 세로토닌(serotonin), 칼슘(Ca^{2+}), 트롬복산 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 등을 유리하여 주위의 다른 혈소판의 응집을 증가시키고, 혈장에 존재하는 혈액응고인자와 반응하여 혈전(blood clot)을 형성함으로써 지혈이 더 신속하고 효과적으로 일어날 수 있도록 한다. 그러나 혈소판의 점착성과 응집성이 과도해지는 경우 혈관의 지름이 좁아져 혈액의 흐름을 방해할 수 있다. 이와 더불어 혈소판이 활성화 될 때 여러 가지 혈관조절인자들(serotonin, TXA_2 , platelet activating factor 등)이 유리되어 혈관을 수축시킬 수 있다. 혈관이 수축되면 혈류의 흐름을 막아 혈류 속도가 변화되어 혈소판 활성화가 증폭되며, 혈관내피손상이 진행되어 심혈관의 정상적인 기능이 저해된다. 이러한 혈액 및 혈관의 이상 변화 즉, 혈행 이상은 동맥경화를 유발하여, 심근경색, 허혈성 심질환, 뇌경색증 및 뇌출혈 등과 같은 혈관계 질환 발병의 중요한 원인이 된다.

마지막으로 혈액 내의 응고인자들이 순차적으로 활성화되면서 생성된 섬유소(fibrin)가 일차적으로 만들어진 혈전에 부착되면서 더욱 단단한 덩어리를 형성하여 출혈이 멎게 되는 ‘응고단계’가 일어난다. 지혈작용은 손상된 부위로부터의 혈액의 손실을 최소화하고 혈액의 정상적인 순환을 유지하기 위한 방어기전이라 할 수 있다. 정상 혈관에서는 지혈 기전의 활성화 반응과 함께 억제 반응이나 혈전 분해 반응들이 균형을 이루으로써 항상성을 유지하고 있다.

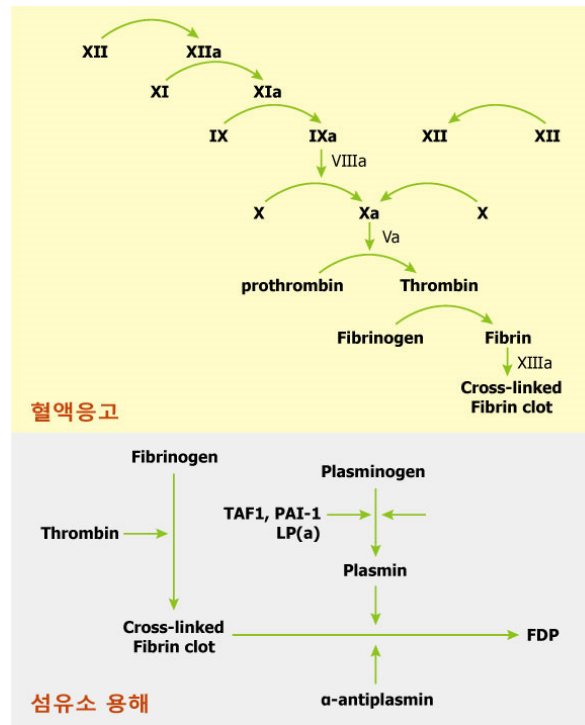
한편, 혈액응고인자의 활성화는 내인성 경로(intrinsic pathway)와 외인성 경로(extrinsic pathway)를 통해 섬유소를 형성하는 과정이다. 즉, 혈액응고인자의 활성화에 의해 혈소판응집

으로 이루어진 일차 지혈마개(hemostatic plug)에 섬유소가 합쳐져 견고한 이차 지혈마개가 완성된다. 내인성 경로에서는 접촉인자(contact factor)에 의해 XII 인자의 활성화가 이루어진 후 순차적으로 XI, IX, X 인자가 활성화되어 트롬빈(thrombin)을 형성한다. 외인성 경로에서는 손상 받은 조직에서 유출되는 조직인자(tissue factor, TF)가 VII인자와 결합하여 복합체를 합성하여 IX와 X 인자를 활성화시킨다.

실제 생체 내에서의 응고 기전은 TF/VIIa 인자 IX 인자를 활성화 시키면서 시작한다. 그 결과로 생긴 IXa 인자는 Va 인자 존재 하에 프로트롬빈(prothrombin)을 트롬빈(thrombin)으로 활성화시킨다. 트롬빈은 섬유소원(fibrinogen)에 작용하여 섬유소 중합체(fibrin polymer)를 생성하는데 여기에 XIII 인자가 작용하여 단단한 교차결합(cross-linking)을 갖는 섬유소가 형성된다. 트롬빈은 섬유소 합성뿐만 아니라 VIII, V, IX 인자를 활성화하여 응고 기전을 더욱 증폭시키는 역할을 한다. 혈소판의 인지질(phospholipid)과 칼슘(Ca^{2+})은 응고의 여러 단계에서 보조적인 역할을 담당한다.

섬유소 용해계는 혈전이 과도하게 형성되는 것을 억제하거나 혈전을 녹여 혈관의 개방성을 유지하는 역할을 한다. 섬유소 용해의 가장 중요한 인자는 혈장 내 플라스미노겐(plasminogen)이며, 플라스미노겐은 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator, PA)에 의해 플라스민(plasmin)으로 변환되어 섬유소 응괴를 용해시켜 섬유소(원) 분해산물(fibrin/fibrinogen degradation products, FDP)을 만든다. 플라스민은 섬유소뿐 아니라 섬유소원을 용해시킬 수 있으나 그 반응은 국소적이다. PA에는 유로키나제형(urokinase plasminogen activator, uPA)과 조직형(tissue plasminogen activator, tPA) 두 가지가 있는데 tPA는 주로 순환혈액에서 섬유소용해에 관여하는 반면, uPA는 수용체(uPA receptor)에 결합하여 세포결합 플라스미노겐의 활성을 증가시키는 작용을 한다(그림 3).

정상적인 상태에서는 지혈이 완료된 후에는 지혈작용이 억제되면서 혈전이 다시 분해되는 과정을 통하여 혈액의 항상성이 유지되나, 여러 가지 요인으로 인해 혈액응고 작용, 응고 억제 작용, 혈전 분해 작용 간에 균형이 깨지면 혈전이 생성된다. 또한, 혈관 벽이 손상된 경우 비정상적으로 혈소판 응집이 일어나 혈관 내 혈전 생성이 촉진됨으로써 혈행에 문제가 생긴다. 결국 생성된 혈전은 인체에 좋지 않은 영향을 미치는데, 정맥 내 혈전은 혈액 순환장애를 초래하여 부종, 통증, 및 염증을 일으키며 경우에 따라 폐와 뇌에 혈전색전증(thromboembolism)을 초래하기도 한다. 그리고 동맥 내 혈전은 폐, 심장, 뇌, 말초혈관 등에 치명적인 혈전색전증을 일으켜 사망에 이르게 하기도 한다.



AT, antithrombin; HCII, heparin cofactor II; LP(a), lipoprotein(a); PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TAFI, thrombin- activatable fibrinolysis inhibitor; TF, tissue factor; TFPI, TF pathway inhibitor; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase plasminogen activator

그림 3. 혈액 응고와 섬유소 용해

(3) 내피세포의 기능 이상

염증성 자극(예를 들어 산화 스트레스, 염증성 사이토카인, 병원성 물질에의 노출 등)이 지속될 경우 내피세포가 과도하게 활성화되거나 활성화 상태가 만성적으로 지속되면서, 내피 기능 이상이 초래될 수 있다. 특히, 이러한 상태에서 과도한 염증성 자극이 증폭되면 내피세포로부터 vWF 뿐만 아니라 soluble intercellular adhesion molecule-1(sICAM-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1(sVCAM-1), E-selectin, P-selectin과 같은 수용성 부착 분자(soluble adhesion molecule)의 분비가 과도하게 증가하게 되고, 손상된 부위로 산화된 콜레스테롤이 쌓여 플라크를 형성하면서 혈관내벽이 부풀어 오르고, 결국 혈관이 좁아져 혈액의 흐름이 방해받게 된다(그림 4).

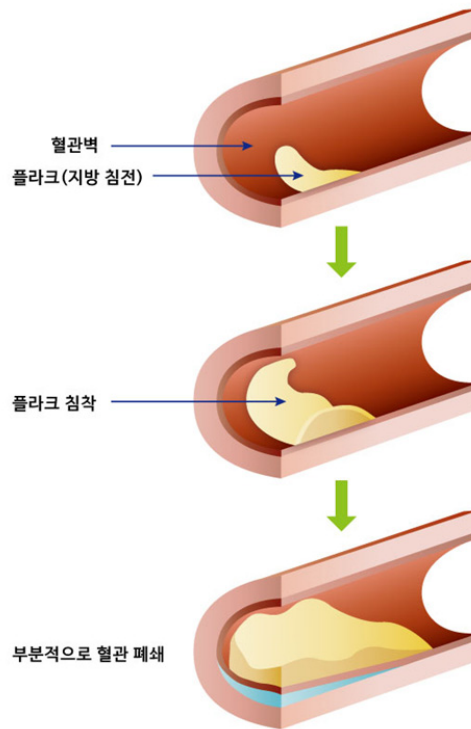


그림 4. 동맥경화성 플라크 형성과정

[출처 : 건강기능식품(개정판), 교문사, 2010]

내피세포 항상성 유지에서 산화질소(nitric oxide, NO)는 핵심적인 역할을 한다. NO는 내피세포에서 아미노산인 L-arginine으로부터 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)에 의해 생성된다. NO의 대표적인 기능으로는 혈관이완 작용을 들 수 있다. 생성된 NO는 혈관의 평활근세포(smooth muscle cell)로 확산되어 수용성 guanylate cyclase를 활성화시킴으로써 cyclic guanosine-5'-monophosphate (cGMP)로 매개된 혈관 이완을 유도한다. cGMP는 2차 전달자(second messenger)로 작용하여 평활근의 이완이나 혈소판 응집 억제와 같은 NO의 많은 생물학적 효과를 유도한다. NO는 혈관 이완 이외에도 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine), 케모카인(chemokine), 부착 분자(adhesion molecule) 등의 발현을 방해하여 백혈구의 혈관 내 모집(vascular recruitment), 혈관 평활근의 증식, 혈소판 응집을 차단하며 혈전 형성에 관여하는 조직인자(tissue factor)의 생성을 억제함으로써 혈관 내피세포 기능을 조절하는 핵심적인 역할을 담당한다(그림 5).

그러나 고혈압, 당뇨, 고지혈증 및 흡연 등의 혈관 질환의 위험 인자로 인해 혈관 내피세포의 기능적 그리고 구조적 변화가 발생하면, 내피세포는 앞서 언급한 방어적 역할을 하지 못하고 오히려 죽상동맥경화증을 초래하게 된다. eNOS에 의하여 NO의 생성이 잘 되지 않거나, 활성 산소종(reactive oxygen species)에 의하여 NO가 산화되어 ONOO^- 로 변환됨으로써 NO의 생체이용률(bioavailability)이 감소될 수 있다. 또한, 생성된 ONOO^- 는 eNOS의 조효소인 BH_4 를 산화시키거나 arginase의 활성을 증가시켜 eNOS의 기질인 L-arginine을 감소시키거나 BH_4 를 부족하게 함으로써 “eNOS uncoupling 현상 (eNOS의 비정상적인 작용으로 과량의 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 와 H_2O_2 가 생성되는 현상)”이 유도된다. 결과적으로 NO를 매개로 한 내피 의존적 혈관 이완(endothelium-dependent vascular dilation)에 장애가 유발됨으로써 혈행에 부정적인 영향을 미친다.

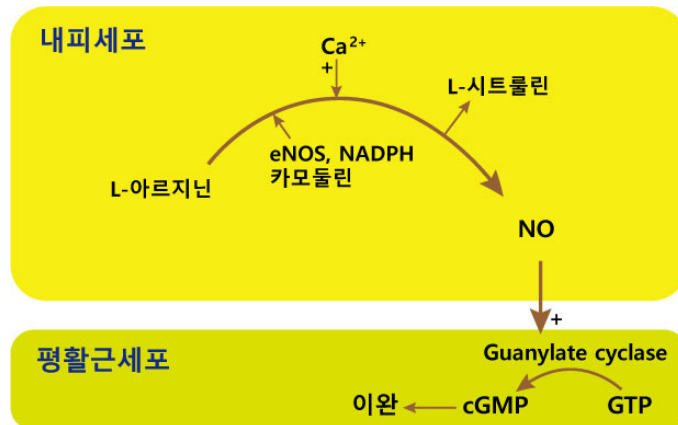


그림 5. NO(Nitric Oxide, 산화질소) 합성 경로

(4) 혈관 탄력성 저하

노화와 관련된 혈관 변화의 가장 큰 특징 중 하나는 중심 혈관 벽의 경직도(stiffness) 증가이다. 이는 혈관 벽에 반복적인 혈관 수축/이완으로 인한 장력(shear force)과 탄성성질(elastic recoil)에 의해 기인하는데, 노화로 인한 엘라스틴(elastin)의 분절과 감소, 혈관 벽 내 콜라겐의 증가, 혈중 크레아티닌(creatinine)과 노르에피네프린(norepinephrine)의 증가, 평활근 세포의 베타수용체(beta receptor) 긴장도의 감소, NO의 분비 감소, 엔도텔린(endothelin)의 분비 증가 등이 그 원인이다. 그러나 비정상적으로 노화가 촉진되거나, 고혈압, 고지혈증, 당뇨병 등의 혈관 관련 질환이 있는 경우, 혹은 흡연, 과식, 지나친 알코올 섭취 등의 잘못된 생활습관 및 식습관으로 인하여 혈관 경직도 증가가 나이에 비하여 심해질 수 있다.

심장에서 혈액이 분출될 때마다 동맥을 따라 맥파(pulse wave)가 이동한다. 정상적인 상태에서는 심장이 수축과 이완을 반복하면서 맥파가 혈관에 전달되어도 탄력성이 유지되기 때문에 문제를 초래하지 않는다. 그러나 혈관 질환의 위험 요인 등에 의하여 혈관 내피세포가 손상되고 혈관 벽의 탄력성이 소실되게 되면 맥파로 인한 맥압이 증가하게 된다. 이러한 맥압의 증가는 동맥의 경직도를 증가시키며, 이로 인하여 맥파의 전향파 전달과 반사파의 중심동맥으로의 귀환을 빠르게 하여 혈관에 더욱 강한 압력을 주게 되고 결국에는 죽상동맥경화증을 비롯한 혈관 질환 및 합병증을 유발하게 된다.

라. 혈행 저하와 관련된 위험인자

(1) 콜레스테롤

콜레스테롤은 체내 모든 세포막의 중요 구성 성분이며, 호르몬 합성에 필수적인 성분으로 우리 몸의 생명력을 유지하는 데 매우 중요한 지질성분이다. 사람의 혈청 내에는 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스터, 중성지방, 인지질 및 지방산 등이 있다. 이 중 중성지방과 지방산은 에너지원으로 사용되고 콜레스테롤과 인지질은 세포막과 호르몬 합성의 주요 성분으로 이용된다. 한편, 혈중 저밀도-콜레스테롤(LDL-cholesterol)이나 중성지방 농도가 높게 되면, 혈관 내 염증 반응 및 지질 축적으로 인하여 죽상동맥경화증이 발생하거나 악화된다. 그 결과 혈관 벽이 두꺼워져 탄력성이 감소하고 혈관이 좁아져 혈액의 흐름을 방해하게 된다. 따라서 콜레스테롤, 특히 저밀도-콜레스테롤 수치를 높지 않게 유지하도록 권장하고 있다. 이와는 달리 고밀도-콜레스테롤(HDL-cholesterol)은 혈청 내 수치가 감소할 때 오히려 동맥경화증 발생 가능성이 증가한다. 이처럼 혈액 내 LDL-콜레스테롤의 상승 및 HDL-콜레스테롤의 저하를 통하여 혈액 흐름에 이상이 생기면 뇌심혈관질환의 위험이 커진다.

(2) 고혈압

고혈압은 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 확장기 혈압이 90 mmHg 이상일 때를 말한다. 오랜 기간 고혈압이 지속되면 혈관벽이 압력을 받아 혈관이 탄력을 잃고 두꺼워지게 되며 내벽도 손상된다. 여기에 혈액 중 콜레스테롤 함량이 많아, 탄력을 잃고 두꺼워진 혈관에 지질이 침착되면 혈액의 흐름을 방해한다.

(3) 당뇨병

당뇨병은 체내에서 요구하는 양의 인슐린이 생성되지 않거나 생성된 인슐린이 세포에 제대로 작용하지 못해 체내로 들어온 당을 효과적으로 조직으로 이동시키지 못하여 혈당치가 높아지는 질병이다. 체내 조직으로 이동하지 못하고 혈액 중에 과도하게 존재하는 혈당은 혈관 내부의 단백질이나 지단백 등과 결합하여 혈관의 기능을 손상시킨다. 예를 들어 LDL-콜레스테롤과 당이 결합하면 LDL-콜레스테롤이 혈관 벽에 쉽게 달라붙어 혈관이 좁아지게 된다. 뿐만 아니라 높은 혈당은 혈액의 점착성을 증가시키고 나아가 혈액의 흐름에 장애를 일으켜 죽상동맥경화증을 촉진한다. 아울러 혈당이 높으면 그 자체가 혈관 내막에 손상을 주기 때문에 혈전 형성을 촉진시킬 수 있다.

(4) 기타

그 외에도 흡연과 스트레스로 인한 혈관 수축, 과체중 등이 혈행을 방해하는 주요 인자로 알려져 있다.

2. 보건학적 중요성

혈액은 신체의 각 조직으로 산소와 영양분을 공급하고, 세포에서 만들어낸 노폐물을 제거하며, 우리 몸에 필요한 호르몬을 운반하고, 외부 유해물질로부터 세포를 방어하며, 적당한 체온을 유지시켜주고, 지혈작용을 하는 등 신체 내의 항상성을 유지시켜주는 역할을 한다. 따라서 원활한 혈액의 흐름은 이러한 신체기능을 유지하는 데 매우 중요하다.

혈관의 내피세포는 혈액 덩어리를 분해하는 물질 등 다양한 종류의 물질을 합성, 분비하거나 혈소판 응집과 혈전 생성 및 용해 등에 관여함으로써 혈액의 유동성, 흐름, 혈관 긴장도, 동맥 혈관의 기능 등을 조절하는 역할을 한다. 염증성 자극에 의해 내피세포가 손상되면 수용성 부착 분자의 분비가 과도하게 증가하게 된다. 손상된 부위로 산화된 콜레스테롤이 쌓여 플라크를 형성하면서 혈관 내벽이 부풀어 오르고, 결국 혈관이 좁아져 혈액의 흐름이 방해받게 된다. 또한, 혈관이 손상되면 지혈반응이 시작되는데, 지혈반응 중 혈소판의 점착성과 응집성이 과도해지는 경우 혈관의 지름이 좁아져 혈행 이상이 생길 수 있다. 혈소판 활성화에 따른 여러 가지 혈관조절인자들 또한 혈관 수축과 혈소판 활성화 및 혈관 내피손상을 유발한다. 비정상적인 혈소판 응집이 일어났을 때, 혈관 내 혈전 생성이 촉진됨으로써 혈행에 문제가 초래된다 (그림 6).

이러한 혈액 흐름에 장애가 생길 경우 동맥경화, 뇌졸중 등 뇌심혈관 질환의 발생 위험이 증가하는 것으로 알려져 있다. 혈액 흐름에 영향을 주는 주요 위험인자로는 높은 혈당, 높은 혈압, 높은 LDL-콜레스테롤, 흡연과 스트레스로 인한 혈관 수축, 과체중, 노화로 인한 혈관 탄력성 저하, 식습관, 생활방식, 유전적 요인 등을 들 수 있으며, 생활수준이 높아지고 식습관이 서구화 될수록 혈행 장애와 관련된 뇌심혈관 질환의 발병률이 증가하여 사회 경제적 문제를 야기하고 있다. 심장질환과 뇌혈관 질환은 전 세계적인 주요 사망원인이며, 우리나라에서도 심장질환과 뇌혈관질환은 2007년도 이후로 각각 사망원인의 2위와 3위를 차지하고 있다 (그림 7).

이와 같이 혈행 장애는 동맥경화, 뇌졸중 등 뇌심혈관 질환의 발생률을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 혈행 이상을 초래하는 위험인자들에 대한 적절한 관리가 필요하다.

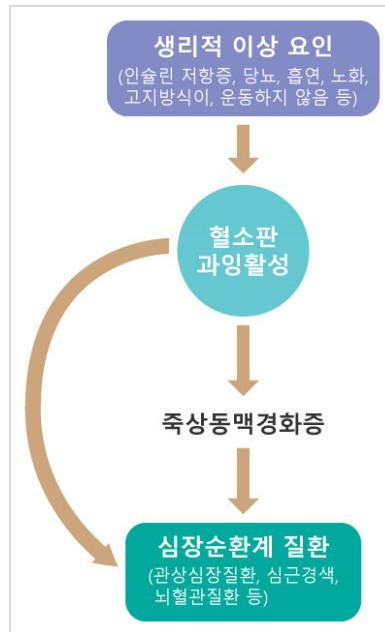


그림 6. 혈소판 활성화와 심장순환계질환

[출처: Eur J Nutr 56:461-482, 2017]

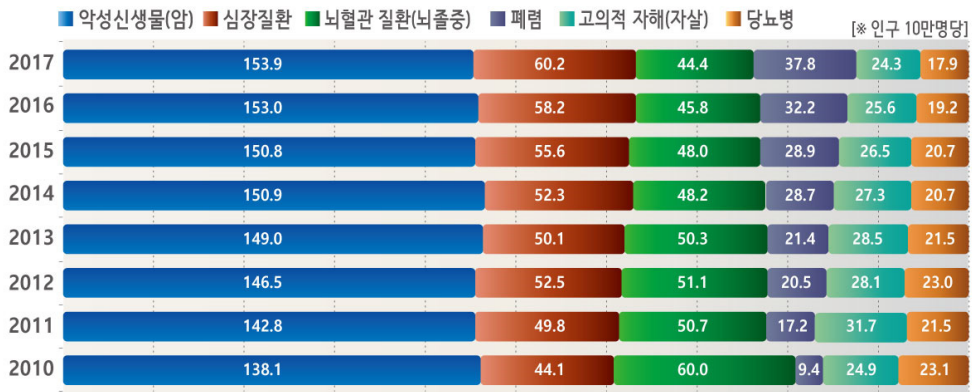


그림 7. 우리나라 주요 사망원인

[출처: 보건복지부. 2018 보건복지통계연보, 2018]

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

혈행 관련 기능성을 확인하기 위한 측정 가능한 연구유형별 바이오마커(biomarker)는 다음 표 1과 같다.

표 1. 혈행 관련 기능성 확인을 위한 바이오마커

구 분		바이오마커	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
적혈구 변형		적혈구 포스파티딜세린 노출정도	○	○	○
혈액점도		혈액 점도		○	○
혈액응고/ 섬유소 (원) 용해	혈소판 활성, 혈액 응고	세로토닌(Serotonin, 5-HT)	○	○	○
		트롬복산 A ₂ (TXA ₂)	○	○	○
		프로스타사이클린I (PGI)	○	○	○
		혈소판 수	○	○	○
		혈소판 내 칼슘 농도	○	○	○
		전단응력(Shear stress)에 의해 유도되는 적혈구 유래의 microvesicle 생성	○	○	○
		혈소판 응집반응	○	○	○
		프로트롬빈시간(PT)		○	○
		부분활성 부분 트롬보플라스틴시간 (aPTT)		○	○
		트롬빈시간(TT)		○	○
		동맥 혈전 생성(Arterial thrombosis) 평가		○	
		조직인자(TF)		○	○
		항트롬빈(AT)		○	○
		Protein C		○	○
		Protein S		○	○
		Lipoprotein (a)(Lp(a))		○	○
		Platelet activation factor(PAF)		○	○

구 분		바이오마커	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
	섬유소 (원) 용해	섬유소원(Fibrinogen)		○	○
		섬유소 단량체(Fibrin monomer, D-이합체(dimer), fibrin/fibrinogen degradation products(FDP)		○	○
		Prothrombin fragments F1+2(F1+2)			
		플라스미노겐(Plasminogen)		○	○
		플라스미노겐 활성화인자 억제 단백질 (PAI-1)		○	○
		조직형 플라스미노겐 활성화제(tPA)		○	○
		유로키나제형 플라스미노겐 활성화제(uPA)		○	○
		혈관 내피 기능	내피 세포 활성화	P-Selectin	○
E-Selectin	○			○	○
Soluble intercellular adhesion molecule (sICAM)-1	○			○	○
Soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM)-1	○			○	○
von Willebrand factor(vWF)				○	○
트롬보모듈린(Thrombomodulin)				○	○
혈관 수축/ 이완	Endothelin-1				
	산화질소(NO)		○	○	○
	Endothelial nitric oxide synthase(eNOS)		○	○	
	Bradykinin			○	○
	대동맥의 평활근 세포에서 L-type Ca2+ channel을 통한 내향성전류의 변화 측정		○		
	내피세포 의존 혈관 확장(ED-FMD)				○
	Peripheral arterial tonometry(PAT)				○
	Segment shortening(SS)			○	
	동맥 내강 직경			○	○
혈관 탄력성	맥파전달속도(PWV)		○	○	
	발목상완지수(ABI)			○	
	파형 증가 지수(AIx)			○	
	동맥순응도(Arterial compliance)		○	○	
	혈압		○	○	
	동맥 내 플라크의 성상, 크기 및 개수		○	○	
	혈액 흐름(Venous blood flow)			○	

나. 바이오마커 설명

(1) 적혈구 변형

적혈구 변형은 적혈구 막의 포스파티딜세린 노출 정도로 측정할 수 있다. 적혈구 막의 외부에는 스핑고마이엘린(sphingomyelin)과 포스파티딜콜린(phosphatidyl cholin)이, 막 내부에는 포스파티딜세린(phosphatidyl serine)과 포스파티딜이노시톨(phosphatidyl inositol)이 존재한다. 그러나 적혈구가 외부 자극에 의하여 손상 및 영향을 받게 되면 이와 같은 비대칭 구조가 파괴되어 포스파티딜세린이 밖으로 노출되며, 이로 인하여 혈액응고 반응이 야기된다. 그러므로 적혈구가 변형될 때 노출되는 적혈구 막의 포스파티딜 세린을 측정하면 혈액응고를 평가 할 수 있다.

(2) 혈액점도

혈액 점도는 혈관 내에서 혈액이 흐를 때 발생하는 내부 저항을 의미하며 혈액의 진한 정도와 끈적이는 정도로 표현될 수 있으며, 혈액의 흐름을 종합적으로 해석할 수 있는 지표이다. 혈액의 점도는 심혈관계 및 뇌혈관계질환, 내분비질환과의 상관성이 보고되고 있다.

(3) 혈액응고 및 섬유소(원) 용해

(가) 혈소판 활성화 및 혈액응고

① 세로토닌(Serotonin, 5-hydroxytryptamine, 5-HT)

세로토닌은 장크롬친화세포(enterochromaffin cell)와 뉴런 등에서 트립토판(tryptophan)으로부터 합성된다. 트립토판은 tryptophan hydroxylase에 의해 가수분해되어 5-hydroxy-L-tryptophan(5-HTP)이 되고, aromatic L-amino acid decarboxylase에 의해 탈카르복실화(decarboxylation)되어 세로토닌(5-hydroxytryptamine, 5-HT)으로 변환된다. 세로토닌은 간, 뇌, 혈관내피세포 등의 조직으로 유입되어 모노아민산화효소(monoamine oxidase, MAO)에 의해 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)로 대사되고, 5-HIAA나 5-HT는 소변으로 배설된다. 5-HT는 혈액에서는 대부분 혈소판에 저장되어 있다가 혈소판이 활성화되면 유리되어 다시 혈소판의 5-HT receptor에 작용하여 응집을 촉진시키기 때문에 혈소판 활성화의 바이오마커로 사용된다.

② 트롬복산 A(Thromboxane A, TXA)

TXA₂는 혈소판이 활성화되었을 때 혈소판응집작용을 하는 프로스타글란딘(prostaglandins) 중 하나이다. 세포막 인지질에 존재하는 아라키돈산(arachidonic acid)을 기질로 하여 사이클로옥시지나아제(cyclooxygenase, COX)에 의해 프로스타글란딘(prostaglandin) H₂가 생성되는데, 이로부터 TXA₂가 합성된다. TXA₂는 반감기가 짧으므로 안정한 대사체인 thromboxane B₂(TXB₂)(TXA₂의 최종 대사산물)를 정량하는 간접적인 방법으로 혈소판의 활성화 정도를 측정한다. 즉 혈액이나 소변의 TXB₂ 및 TXB₂ 대사물의 수준을 측정함으로써 TXA₂의 수준을 예측할 수 있다. 시험물질에 의해 TXA₂수준이 감소하면 혈액응고가 감소할 수 있다(그림 8)

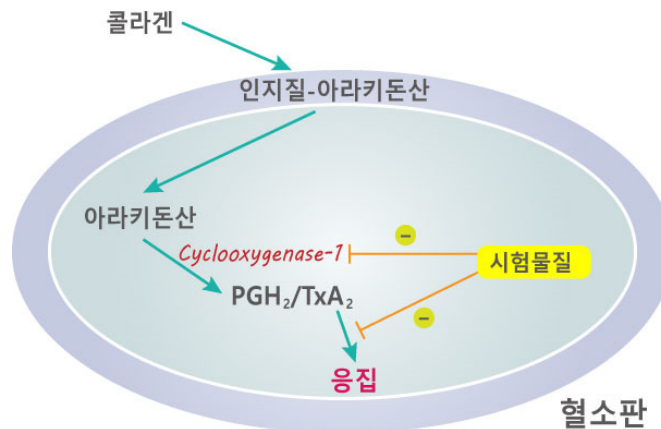


그림 8. 혈액응고에서 TXA₂ 작용억제

[출처: Biochimie 159:55-58, 2019]

③ 프로스타사이클린 I(Prostacyclin I, PGI)

세포벽의 인지질에서 phospholipase 작용으로 분리된 아라키돈산은 COX 작용으로 프로스타글란딘의 한 분류인 프로스타사이클린을 생성한다. 프로스타사이클린 중의 하나인 PGI₂(prostacyclin I₂)는 혈관 내피세포에서 가장 많이 생성되며 TXA₂와 길항작용을 함으로써 혈소판의 활성화 및 플라그 형성을 방해한다. 또한, 혈관 이완에도 관여하는 것으로 알려져 있다. PGI₂의 농도는 안전한 대사산물인 6-keto-PGF_{1α}로 판단할 수 있다. TXA₂/PGI₂의 비율을 계산하여 비율이 낮을수록 혈행 개선 효능이 있을 것으로 생각할 수 있다

④ 혈소판 수

혈소판은 생체 내에서 지혈, 혈전 생성과 각종 혈관 질환에 관여한다. 혈소판은 혈관이 손상되면 활성화되어 손상 부위에 응집됨으로써 지혈작용을 담당한다. 그러므로 혈소판 수 측정은 혈액응고 수준 평가에 도움이 될 수 있다. 성인 혈액 내 정상 혈소판 수는 150,000-450,000/uL이며, 혈소판수가 20,000/uL 이하로 떨어지면 자연 출혈이 일어나므로 적절한 수에 대한 평가를 해야 한다.

⑤ 혈소판 내 칼슘 농도

혈소판은 활성화되지 않은 상태에서 세포질(cytosol) 내 Ca 농도를 100nM 내외로 일정하게 유지하고 있다. 이 농도는 혈장 농도와 비교할 때, 10,000 배 이상 낮은 것으로 이 농도 구배는 세포막과 dense tubular system의 Ca-ATPase와 Na-Ca exchange 작용으로 유지된다. 혈액 내 증가된 Ca^{2+} 은 칼모듈린(calmodulin)과 결합하여 myosin light chain kinase를 활성화시켜 세포골격을 이루는 단백질인 myosin light chain을 인산화함으로써 혈소판의 형태 변화를 일으켜 응집을 유도한다. 칼슘 채널을 매개로 한 혈소판 내 칼슘 유입의 증가는 혈소판 활성화의 주요한 신호이다.

⑥ 전단응력(shear stress)에 의해 유도되는 적혈구 유래 소수포(microvesicles) 생성

소수포(microvesicles)는 세포막에 결합되어 있는 직경이 50-1,000 nm 정도 되는 분자로 세포 간의 신호에 관여하는 것으로 알려져 있다. 소수포 내에는 혈액 응고에 관여하는 조직 인자(tissue factor)가 다량 존재하므로 소수포가 혈액응고에 관여할 가능성이 있는 것으로 제안되고 있다. 또한 소수포는 혈액응고인자에 결합하거나 혈액응고인자의 발현을 증가시킴으로써 혈액응고를 촉진할 수 있다고 보고되고 있다. 적혈구와 대식세포에서 유래된 소수포가 죽상동맥경화성 플라크(atherosclerotic plaque)에 높은 수준으로 존재하는 것도 소수포가 혈액응고에 관여한다는 것을 간접적으로 나타낼 수 있다. 그러므로 적혈구의 소수포가 감소하면 혈행이 개선되었다고 볼 수 있다.

⑦ 혈소판 응집반응

㉮ Agonist에 의해 유도되는 혈소판 응집반응

혈소판은 agonist(트롬빈, ADP, 콜라겐, 혈소판활성인자, 세로토닌 등)에 의해 자극되면 응집이 일어난다. 그러나 과도한 혈소판 응집은 혈행 장애를 일으키게 된다.

④ 전단응력(Shear stress)에 의해 유도되는 혈소판 응집 반응

혈소판은 agonist 뿐 아니라 혈류에 의한 물리적인 전단응력에 의해서도 활성화된다. 이러한 전단응력에 의한 혈소판 응집은 agonist에 의한 혈소판 응집과는 다르게 정상적인 지혈작용에는 관여하지 않으나 병적인 상태에서의 혈전 생성과 관련이 많다. 그러므로 전단응력에 의해 유도되는 혈소판 응집 반응(shear stress-induced platelet aggregation, SIPA)은 혈소판 억제제를 평가하는 주요 평가지표로 사용된다.

⑧ 프로트롬빈 시간(Prothrombin time, PT), 활성 부분 트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time, aPTT), 트롬빈 시간(Thrombin time, TT)

프로트롬빈(prothrombin)은 혈장 중에 들어 있는 당단백질로서 혈액응고 과정에서 중요한 역할을 하는 물질이다. 프로트롬빈은 트롬보플라스틴(thromboplastin) 또는 프로트롬비나아제(prothrombinase)에 의해 트롬빈(thrombin)으로 전환되며, 트롬빈은 혈장 내 섬유소원(fibrinogen)을 섬유소(fibrin)로 전환시키는데, 섬유소는 혈액 속의 혈소판과 결합하여 혈전(blood clot)을 형성한다. PT는 혈액 응고 과정 중 외인성 경로와 공통경로에 관여하는 응고 인자에 미치는 영향을 평가하는 방법이다. aPTT는 내인성 경로와 공통경로에 관여하는 응고 인자에 미치는 영향을 평가하는 방법이다. TT는 공통경로를 평가하는 방법으로 섬유소원을 섬유소 중합체로 전환시키는 트롬빈의 활성을 평가하여 섬유소원의 감소나 질적 이상을 평가할 수 있다(그림 9).

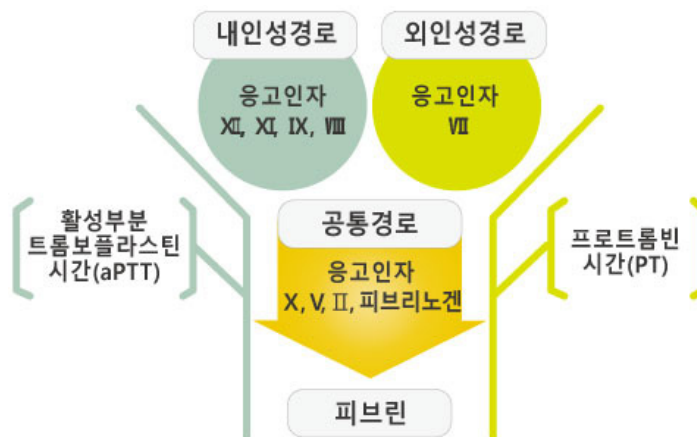


그림 9. 내인성과 외인성 혈액응고 기전

⑨ 동맥 혈전 생성(Arterial thrombosis) 평가

동맥 혈관 내막이 손상되면 지혈을 위해 혈소판이 혈관조직 손상 부위에 점착되고 혈소판의 형태 변화가 일어나 혈소판 응집이라는 일련의 혈전 생성과정이 일어난다. 혈관 내에서 비정상적으로 혈액이 응고되는 현상을 혈전증(thrombosis, 응고된 혈액은 혈전 - thrombi)이라 한다. 동맥에 혈전증이 생기면 신체 조직으로 혈액을 공급하지 못하여 말초에 혈액공급이 부족하게 되고 이로 인해 급성심근 경색증, 뇌졸중 등의 질병 위험이 증가된다.

⑩ 조직인자(Tissue factor, TF)

TF는 내피하조직(subendothelial tissue)과 백혈구에 존재하는 단백질이다. TF는 혈액 응고 과정에서 프로트롬빈으로부터 트롬빈이 형성되는 과정의 시작에 필요한 serine protease VIIa 인자의 세포 표면 receptor로 작용하여 외인성 경로의 혈액 응고를 활성화시키는 역할을 한다. TF는 혈액응고반응을 활성화시키므로 시험물질에 의해 TF가 감소하면 혈행 개선 기능성이 있을 것으로 생각할 수 있다.

⑪ 항트롬빈(Antithrombin, AT)

항트롬빈은 간에서 생성되는 당단백질로, 트롬빈의 작용을 억제할 뿐만 아니라 혈액 응고 과정에 관여하는 효소들을 불활성화시키는 작은 단백질 분자이다. 항트롬빈은 주로 IIa 인자와 Xa 인자를 억제하며, VIIa 인자, IXa 인자, XIa 인자등도 억제한다. 헤파린이 함께 있으면 2,000-4,000배 정도 그 억제 반응이 증가된다. 항트롬빈은 혈액 응고에 관여하는 인자들을 불활성화시키므로 항트롬빈을 증가시키는 시험물질은 혈행 개선 기능성이 있는 것으로 판단할 수 있다.

⑫ Protein C

Protein C는 비타민 K 의존성 생리적 항응고제로, 트롬빈이 내피세포 표면의 트롬보모듈린에 결합하면 활성화된다. 활성화된 protein C는 인지질, 칼슘, protein S의 도움을 받아 Va 인자 와 VIIIa 인자를 불활성화시키며, 플라스미노겐 활성화인자 억제 단백질을 비활성화하여 섬유소 용해를 촉진한다. 따라서 protein C 부족 시 정맥 혈전 및 색전 증상을 나타내게 된다.

⑬ Protein S

Protein S는 혈관 내피세포에서 합성되는 비타민 K 의존성 혈장 당단백질이다. 혈중에서 두 가지 형태, 즉 유리 형태와 complement protein C4b-binding protein과 결합한 복합체 형태로 존재하는데, 이 중 유리형은 혈액 응고 과정에서 활성화된 V 인자와 VIII 인자를 억제하는 protein C의 보조인자로 작용하여 혈액 응고 과정을 억제하는 역할을 한다.

⑭ Lipoprotein(a)(Lp(a))

Lp(a)는 지단백으로 콜레스테롤 에스터와 중성지방과 같은 지질성분과 apolipoprotein B-100(apoB-100)과 apolipoprotein(a)(apo(a)) 같은 단백질로 구성되어 있다. Apo(a)는 이황화결합에 의해 apoB-100에 결합되어 있다. Lp(a)의 apo(a)는 플라스미노겐과 구조적으로 유사하여 플라스미노겐과 피브린과의 결합을 경쟁적으로 억제함으로써 fibrinolysis를 손상시키고, 혈액응고를 증가시킨다. 이러한 특성으로 Lp(a)는 죽상경화 및 혈전 생성의 과정과 관련된 지표로 이용된다.

⑮ Platelet activation factor(PAF)

PAF는 인지질로 혈소판 응집을 촉진하며, 허혈에 의한 미세 혈관 손상과 염증반응에서 강력한 매개체로 작용한다. PAF에 의하여 혈관 저항 증가와 미세 혈관 손상이 유발될 뿐만 아니라 동맥의 수축으로 조직 허혈이 일어난다.

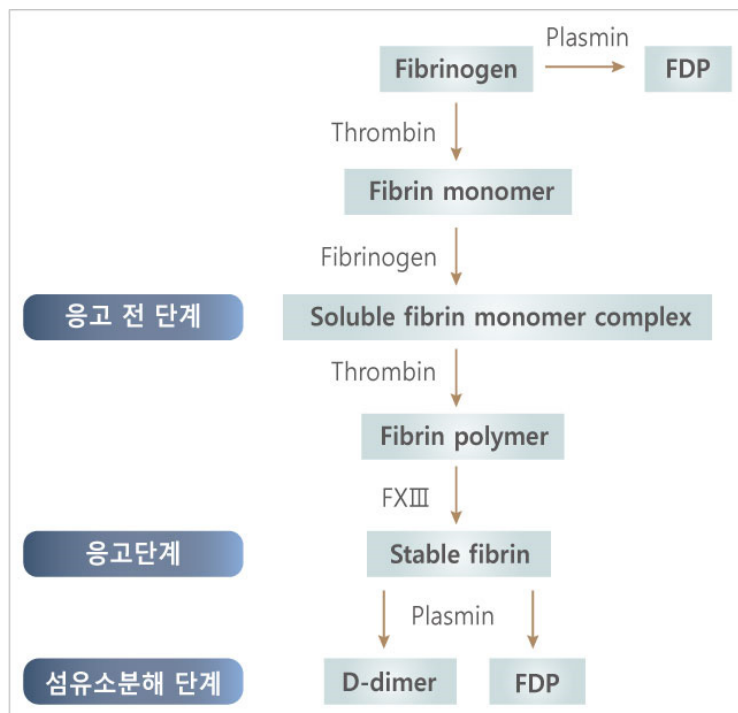
(나) 섬유소(원) 용해

① 섬유소원(fibrinogen)

수용성 섬유소원은 간에서 합성되어 혈액 응고 형성을 돕는 당단백질이다. 섬유소원은 혈중에 가장 풍부하게 존재하는 혈액 응고 인자이며, 트롬빈에 의하여 불용성 섬유소로 전환되고, 섬유소는 혈소판과 결합하여 혈전(blood clot)을 형성한다. 섬유소원 수준이 증가하는 것은 혈전생성의 위험을 증가시키는 것과 관련이 있다.

② 섬유소 단량체(fibrin monomer), D-이합체(dimer), fibrin/fibrinogen degradation products(FDP)

섬유소는 혈액 응고 메커니즘의 최종 생성물질로 혈전을 형성하기 위하여 혈소판들을 서로 결합시키는 불용성의 하얀 섬유질로 구성되어 있다. 수용성 섬유소원이 트롬빈에 의하여 섬유소 단량체를 만들고 단량체가 서로 결합하여 중합체(polymer)가 되며, 이렇게 형성된 섬유소는 죽상동맥경화 플라크를 더욱 크게 만들고 불안정화 시키는 역할을 할 수 있다. D-이합체는 일종의 섬유소분해산물로 혈액응고의 교차결합 섬유소 중합체가 여러 효소 작용으로 최종적으로 생성된 물질이다. D-이합체는 통상적으로 두 개의 D 도메인과 한 개의 E 도메인이 결합된 형태로 존재하며, 정상인의 혈장에는 E 도메인이 떨어져 나간 순수한 D-이합체는 혈액응고 기전이 활성화된 경우를 제외하고는 거의 나타나지 않는다(그림 10). 그러므로 D-이합체의 혈중 농도는 혈전증을 진단하는데 도움이 된다. 또한, 혈청 FDP의 증가된 수준은 myocardial infraction 또는 coronary artery diseases(CAD)를 가지고 있는 환자의 사망에서 독립적인 예견인자라는 보고가 있다.



FDP: fibrin/fibrinogen degradation products

그림 10. 섬유소 단량체의 생성과 분해

[출처: World J Gastroenterol 23(12):2209-2216, 2017]

③ Prothrombin fragments F1+2

프로트롬빈은 활성화된 트롬빈과 prothrombin fragment F1+2(F1+2)로 분해된다. 그러므로 혈액에서 F1+2양이 증가하는 것은 혈액응고 활성의 지표로 사용된다.

④ 플라스미노겐(plasminogen)

플라스미노겐은 간에서 합성되는 당단백으로 다양한 활성인자에 의하여 플라스민(plasmin)으로 전환된다. 플라스민은 혈액응고인자 V와 VIII, 섬유소원 전구물질, 섬유소원을 분해한다. 플라스미노겐 결핍 시 섬유소용해의 저하로 혈전 및 색전증이 나타날 수 있다.

⑤ 플라스미노겐 활성화인자 억제 단백질 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)

플라스미노겐 활성화인자 억제 단백질은 급성기 단백질의 일종으로, 주로 혈관내피 세포에서 생성되며 조직 플라스미노겐 활성화 효소와 결합해서 혈액 용해를 방해하는데, 이는 원활한 혈액 흐름에 악영향을 주어 뇌심혈관질환 발생 위험성을 높인다(그림 11).

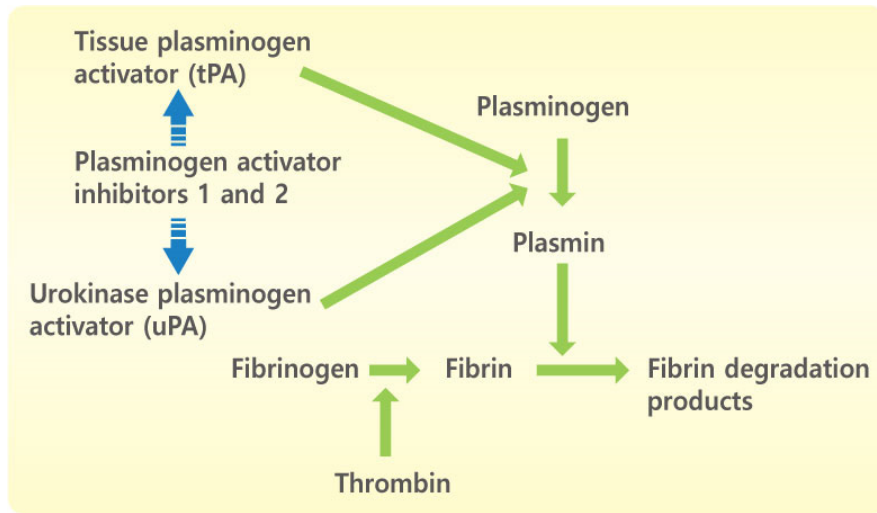


그림 11. 섬유소 용해에서 PAI-1의 역할

[출처: Scientific WorldJournal 2014:2014:858293]

⑥ 조직형 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator, tPA)

조직형 플라스미노겐 활성화제는 플라스미노겐을 플라스민으로 전환시키는 과정을 촉매하여 혈전의 분해에 관여하는 단백질로, 혈관의 내피세포에서 발견되는 serine protease이다. 혈장에서의 tPA/PAI-1 농도는 심장질환 발병 위험성과 관련성이 있다.

⑦ 유로키나제형 플라스미노겐 활성화제(urokinase-type plasminogen activator, uPA)

유로키나제형 플라스미노겐 활성화제는 원래 인간의 소변에서 분리되었으나 혈류나 세포 외 기질(extracellular matrix)에도 존재하며 플라스미노겐을 플라스민으로 전환시키는 과정을 촉매하여 혈전 용해에 관여하는 serine protease이다.

(4) 혈관 내피 기능

(가) 내피세포 활성화

① P-selectin, E-selectin

P-selectin과 E-selectin은 활성화된 혈관 내피세포의 표면에서 세포부착분자로 작용하여, 혈관 내피세포의 활성화를 나타내는 지표로 사용될 수 있다. 트롬빈에 의하여 혈관 내피세포의 표면에 E-selectin이 발현될 수 있고, 혈관 내피세포의 저장 과립인 Weibel-Palade bodies에서 P-selectin이 분비될 수 있다.

② Soluble intercellular adhesion molecule(sICAM)-1, Soluble vascular cell adhesion molecule(sVCAM)-1

sICAM-1은 혈관 내피세포나 면역계 세포의 표면에 발현되는 당단백질(glycoprotein)이다. sICAM-1은 보통은 낮은 수준으로 혈관 내피세포에 존재하다가 사이토카인에 의하여 자극 받으면 수준이 크게 증가한다. ICAM-1은 백혈구에서 발현되는 수용체인 LFA-1(integrin)에 대한 ligand로 작용하여 백혈구를 내피세포에 부착하게 하여 조직 안으로 이동시키는 역할을 하므로, 혈관 내피세포의 활성화를 나타내는 지표로 사용될 수 있다. sVCAM-1도 사이토카인에 의하여 혈관 내피세포가 자극되었을 때에 혈관에서 발현되는 단백질로, 림프구, 단핵구, 호산구, 그리고 호염기구들을 혈관 내피세포에 부착하게 하는 매개 역할을 한다.

③ von Willebrand factor(vWF)

vWF는 지혈작용에 관여하는 혈중 당단백질이다. 일반적으로 혈관에 손상이 생겨 출혈이 시작되면 혈소판이 서로 엉키게 되어 출혈부위가 막히게 되고 출혈이 멈추게 된다. vWF는 접착제와 같은 역할을 하여 혈소판이 잘 엉키게 도와주면서 혈액 응고를 촉진한다. 혈장에서 vWF의 수준이 높을 경우 혈전 형성의 위험이 높을 수 있다.

④ 트롬보모듈린(thrombomodulin)

트롬보모듈린은 혈관 내피세포의 표면에 발현되는 내재 막 단백질(integral membrane protein)로, 혈액 항응고 과정에서 트롬빈에 의하여 유도된 protein C의 활성화에 대한 보조인자로 작용하여 트롬빈을 procoagulant enzyme으로부터 anticoagulant enzyme으로 전환시킴으로써 혈액 응고 과정을 억제시킨다.

(나) 혈관 수축 및 이완

① Endothelin-1

Endothelin-1은 혈관 내피세포에서 생성되는 펩타이드(peptide)로 강력하게 혈관을 수축시키는 역할을 수행한다. Endothelin-1은 ETA와 ETB 두 가지 유형의 receptor에 작용하며, 두 receptor는 모두 평활근 세포에서 발현되어 수축을 일으키는 데 관여한다.

② 산화질소(Nitric oxide, NO)

산화질소는 내피세포에서 아미노산인 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase의 endothelial isoform(eNOS)에 의해 생성된다. NO는 강력하게 혈관을 이완시키는 역할을 수행한다. 그러므로 혈액 또는 소변 중의 산화질소 및 산화질소 대사물들의 농도를 측정하여 혈관 이완에 미치는 효과를 평가 할 수 있다.

③ Endothelial nitric oxide synthase(eNOS)

혈관 내피세포의 NOS는 아미노산인 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 효소이다. 그러므로 이 효소의 활성이 높아지면 NO 생성이 증가하여 혈관을 이완시키는 작용을 나타낼 수 있다.

④ Bradykinin

Bradykinin은 프로스타사이클린, NO, endothelium-derived hyperpolarizing factor 들을 분비하여 강력한 endothelium-dependent vasodilator로 작용한다.

⑤ 대동맥의 평활근 세포에서 L-type Ca^{2+} channel을 통한 내향성 전류의 변화 측정

대동맥의 평활근 세포에서 L-type Ca^{2+} channel을 통한 내향성 전류의 변화를 측정함으로써 평활근의 수축이나 이완에 의하여 혈관의 수축이나 이완에 영향을 미치는지 평가할 수 있다.

⑥ 내피세포 의존 혈관 확장(endothelium-dependent flow mediated dilation, ED-FMD)

내피세포 의존 혈관 확장(ED-FMD)는 비침습적인 측정 방법으로 내피세포 기능을 평가하는 표준 검사법으로, 그 재현성과 유용성이 연구에 의해 입증되었다. FMD는 물리적, 화학적 자극에 의해 혈관의 tone을 자율적으로 조절하거나 혈액 흐름에 적응하는 능력으로 혈관은 혈액흐름 증가에 반응하고 이완에 의해 스트레스를 shear하게 된다. FMD의 주요매개체는 내피세포에서 유래되는 NO이다. 내피의 박피 또는 NOS 억제제의 투여는 혈관에서 FMD가 없어지게 한다. 그러므로 FMD는 심장마비, 뇌졸중과 같은 심혈관계질환의 독립된 예견인자로

알려져 있으며 동맥에서 측정한다. 시험물질을 섭취한 후 공복 시 측정한 ED-FMD의 변화가 증가하면 시험물질에 의해 내피기능이 향상되었다고 볼 수 있다.

⑦ Peripheral arterial tonometry (PAT)

내피 기능 이상은 죽상 동맥경화증의 발병 기전에서 중요하며 임상적으로 명백한 심혈관 질환이 발병하기 전에 내피 기능의 변화가 발생한다. PAT는 말초 혈관 내 내피세포를 평가하는 지표로 맥박(pulse) 크기 변화를 측정하는 digital pulse amplitude를 평가한다. 말초에서 측정한 PAT값은 상완동맥에서 측정한 FMD 값과 잘 연관되어있다.

⑧ Segment shortening(SS)

좌 전방하행 관상동맥의 SS는 국소적인 심장 수축의 기능 평가를 위한 지표이다.

⑨ 동맥 내강 직경

동맥의 직경은 혈류와 관련된 혈관벽의 전단력에 좌우되고, 심근의 산소요구량을 증대시키거나 심근의 비후를 야기하는 환경 등에 영향을 받으며 유전적인 인자에 의해서도 영향을 받는다. 동맥 직경의 결정인자로는 체표면적, 체질량지수(body mass index; BMI), 키, 몸무게 등의 전신적 특성뿐 아니라 심장의 무게, 좌심실 질량(leftventricular mass; LV mass) 등에 의해서도 영향을 받는다.

(5) 혈관 탄력성

(가) 맥파전달속도(pulse wave velocity, PWV)

PWV는 혈관 탄력성을 측정하는 표준 검사법이라고 보고되어 있다. PWV는 혈관을 따라 이동하는 맥파가 전달되는 속도로 심장에서 혈액 분출에 의해 발생하는 동맥맥박이 한 지점에서 다른 지점까지 전달될 때 걸리는 시간을 측정하여 평가하며, 특정 혈관 구간의 혈관 경직도를 나타낸다. 고혈압과 노화 등에 의해 중심 탄성동맥이 경직되면 이완기 혈압은 떨어지고, PWV는 증가하는 경향을 보인다. PWV와 파형 증가 지수(AIx) 모두 중심 혈관 경직도를 나타내는 좋은 척도이고 PWV와 파형 증가 지수 사이에는 좋은 상관관계를 보인다. 차이점은 AIx는 혈압, 심박 수, 성별, 나이, 키, 혈관에 작용하는 약물에 의해 영향을 받지만, PWV는 이러한 요소로부터 상대적으로 영향을 덜 받으므로 혈관 경직도를 보다 정확하게 파악하기 위해서는 두 검사를 같이 시행하는 것이 좋다.

(나) 발목상완지수(ankle-brachial index, ABI)

ABI는 말초 동맥의 동맥경화 정도를 측정하는 방법의 하나이다. 말초혈관의 폐색유무에 따라 말초 동맥의 압력은 감소하게 된다. 말초혈관으로 갈수록 일반적으로는 혈관 저항 증가로 혈압이 높아지는 것이 정상인데 감소된 혈압을 보이는 경우 해당 부위의 병증 상태를 평가할 수 있다. ABI는 발목 수축기 혈압을 팔 수축기 혈압으로 나눈 값으로 정의한다. 오른쪽과 왼쪽을 따로 계산하기도 하며, 발동맥 혈압은 낮은 쪽을, 팔동맥 혈압은 높은 쪽을 선택하여 계산하기도 한다. 발목 동맥 중에서 발등동맥(anterior dorsalis artery)이나 뒤정강동맥(posterior tibial artery)의 혈압을 따로 측정하여 평균을 낸 값을 발동맥 혈압으로 이용하거나 낮은 쪽을 더 의미를 두어 발등 동맥혈압으로 계산하기도 한다.

(다) 파형 증가 지수(augmentation index, AIx)

AIx는 반사파에 의한 맥압 크기의 변화를 의미하고 간접적인 지표로 사용된다. AIx는 혈관 경직도를 반영하는데, 혈관이 경화되면서 심장에서 발생한 전진 맥파와 말초에서 심장으로 돌아오는 반사파의 속도가 빨라져서 반사파가 중심 동맥에 일찍 도착하면 중심 동맥의 수축기 맥압이 증가하여 수축기 혈압이 상승한다(그림 12). 이 상승한 부분을 수축기와 이완기 혈압의 차로 나눈 것을 파형 증가 지수로 정의한다. 파형 증가 지수는 좌심실 부하의 증가와도 연관되어 있으며, 뇌심혈관계질환 발생 및 예후와 밀접한 관계가 있다.

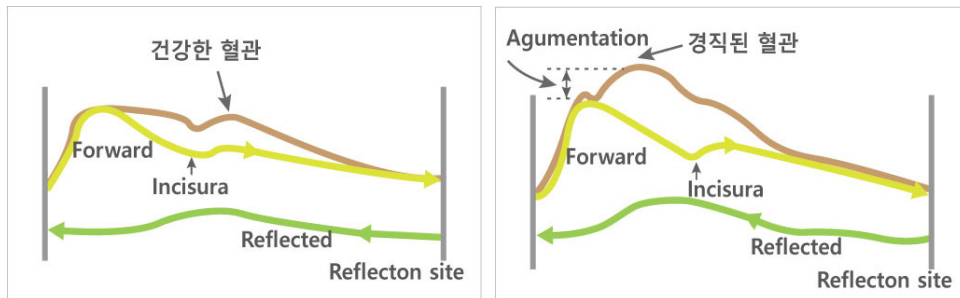


그림 12. 건강한 혈관과 경직된 혈관에서 반사파 조기 귀환에 의한 augmentation 발생

[출처: 박정배, 대한심장학회혈관연구회 임상혈관학: 125-136, 2009]

(라) 동맥 순응도(arterial compliance)

동맥 순응도는 동맥의 경직성 증가에 의한 압력에 반응하여 혈관이 확장하고 수축하는 능력을 말한다. 즉 동맥 순응도는 혈관의 한 부위에서 혈압 변화에 따른 혈관 직경(또는 면적)의 변화이다. 즉 심장이 수축할 때마다 수축기 및 이완기 혈압이 생기고 이 혈압 차이에 대한 혈관의 내경(면적)이 얼마나 유연하게 변화하는지를 측정할 수 있다.

(마) 혈압

혈관의 탄력성이 낮아지거나 혈관 벽이 두꺼워지면 혈액의 흐름을 방해하게 되고 혈압이 높아진다. 즉, 혈행 개선의 여부 평가 시 사용되는 여러 바이오마커와 혈압을 함께 평가하여 개선 여부를 확인한다.

(바) 동맥 내 플라크의 성상, 크기 및 개수

동맥 내 플라크의 성상, 크기 및 개수는 죽상동맥경화 진행 정도를 평가하는 지표로 이용된다.

(사) 혈액 흐름(venous blood flow)

건강한 정맥은 bicuspid valves를 가지고 있어, 하위 사지로부터 심장 쪽으로 한 방향으로 혈액이 이동할 수 있도록 한다. 이러한 valve는 완전하지 않을 수 있어서 반대로 혈액이 이동할 수 있다(venous reflux). 정맥역류(venous reflux)는 혈액 return의 손상과 증가된 정맥압으로 특정 지을 수 있으므로 정상적인 정맥혈류를 유지하는 것은 생리학적으로 이점을 준다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

가. 적혈구 변형

적혈구 변형은 적혈구가 변형될 때 노출되는 포스파티딜 세린을 측정하여 평가할 수 있다. 적혈구가 변형되면 막을 구성하고 있는 인지질 중 포스파티딜세린이 노출되고 혈액응고가 시작되므로 포스파티딜 세린의 노출 정도를 측정함으로써 혈액응고 반응을 평가할 수 있다. 포스파티딜세린은 포스파티딜세린과 특이적으로 결합하는 아넥신-V(annexin-V)를 이용하여 측정한다. 적혈구를 세척 한 다음 Annexin V-FITC과 propidium Iodide 용액을 가한 후 빛을 차단하고 실온에서 15분 동안 배양한다. Binding buffer를 가한 후 한 시간 내에 flow cytometry로 분석한다. Annexin V의 값이 증가하면 세포막의 변형이 증가함을 의미한다.

나. 혈액점도

혈액점도검사(스캐닝 모세관법)는 중력과 압력차를 통해 모세관에 혈액 유동을 발생시켜 미세시간당 유체 높이 변화를 측정해 유속을 얻어 혈액점도를 계산한다. 참고치는 수축기 남자 3.80-5.90 cP, 여자 3.40-5.00 cP 이며, 이완기는 남자 11.31-19.50 cP, 여자 9.80-16.80 cP이다.

다. 혈액응고 및 섬유소(원) 용해

(1) 혈소판 활성 및 혈액응고

(가) 세로토닌(Serotonin, 5-hydroxytryptamine, 5-HT)

세로토닌(5-HT)은 혈소판에서 측정할 수 있다. 혈소판이 풍부한 혈장에 산화 방지를 위하여 아스코르빈산을 첨가한 후 HClO_4 를 첨가하여 원심분리하여 상층액을 얻는다. 상층액에 NaOH와 유기용매제를 첨가한 후 다시 원심분리하여 유기층을 채취하고, 0.1N HCl을 첨가하고 원심분리한 후 시료를 얻는다. 세로토닌 양은 high-performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC- MS/MS) 등을 이용해 측정한다.

(나) 트롬복산 A(Thromboxane A, TXA)

TXA₂ 농도는 혈액이나 세포배양액에서 대사물질인 TXB₂ 농도를 측정하여 평가한다. TXB₂ 농도는 상용화된 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(다) 프로스타사이클린 I(Prostacyclin I, PGI)

프로스타사이클린은 세포배양액이나 혈액, 소변에서 PGI₂ 농도 및 안정한 대사체인 6-keto-PGF_{1α}(prostaglandin F_{1α}) 농도를 측정하여 평가한다. 6-keto-PGF_{1α} 농도는 상용화된 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다. TXA₂/PGI₂의 비율을 계산하여 비율이 낮을수록 혈행 개선 효능이 있을 것으로 생각할 수 있다.

(라) 혈소판 수

혈소판 수는 시험물질을 섭취한 실험동물이나 인체의 혈액을 채취하여 측정한다. 혈소판 수는 채취한 혈액을 항응고제와 혼합한 후 자동혈구 분석기를 이용하여 측정한다.

(마) 혈소판 내 칼슘 농도

혈소판 내 칼슘이온 농도([Ca²⁺]_i)는 quin2/acetomethyl(AM) ether를 사용하여 측정한다. 혈소판 부유액에 quin2/acetomethyl(AM) ether를 첨가하여 함께 배양한다. 완충 용액으로 희석한 후 원심분리하여 상층액을 버리고 혈소판을 얻는다. 혈소판 수 1×10⁸ cells/mL가 되도록 완충 용액에 재부유시킨다. 혈소판의 형광(F; fluorescence)은 spectrofluorometer로 측정한다. 혈소판을 용해시켜 혈소판 세포질 내 quin 2를 세포 밖으로 빠져나오게 해서 칼슘 이온 포화 상태의 최대 형광치(F_{max})를 측정한다. 이후 ethyleneglycol bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraacetic acid(EGTA)를 첨가하여 칼슘 이온 결핍 상태에서의 최소 형광치(F_{min})를 측정한다. 혈소판 자체의 기저 형광치를 보정하기 위해서 quin2/acetomethyl(AM) ether로 처리하지 않은 혈소판의 형광치를 측정하고, Triton X-100과 EGTA로 처리 후 각각의 형광치를 측정한 후 quin2/acetomethyl(AM) ether로 처리한 혈소판의 각각의 형광치에서 빼주어 보정한다.

(바) 전단응력(Shear stress)에 의해 유도되는 적혈구 유래 소수포(Microvesicles) 생성

적혈구 유래의 소수포 생성을 측정하기 위해 혈액으로부터 적혈구를 분리한다. 적혈구 수가 4×10⁹ cells/mL이 되도록 현탁 시킨 후, cone-plate 점도계(cone-plate viscometer)와 쿠클렌 회전점도계(couette rotational viscometer)를 이용하여 일정하고 균일한 전단응력을 가한 후, 전단응력을 가하지 않은 대조군과 비교하여 전단응력을 가한 시료에서 소수포 생성 정도를 측정하여 평가한다.

(사) 혈소판 응집 반응

① Agonist에 의해 유도되는 혈소판 응집 반응

혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP) 또는 세척 혈소판(washed platelets, WP)을 조제 하여 실험한다. 혈소판 풍부 혈장은 동물시험과 유사한 시험계이며 세척 혈소판은 혈소판에 대한 효과만을 다른 영향 없이 관찰할 수 있는 장점이 있다. 혈소판 풍부 혈장 및 세척 혈소판의 light transmission을 0%, 혈소판이 거의 없는 혈장(platelet poor plasma, PPP)과 suspension buffer의 light transmission을 100%로 해서 혈소판의 응집 정도에 따른 light transmission을 측정한다.

② 전단응력(shear stress)에 의해 유도되는 혈소판 응집 반응

혈소판은 혈류와 같은 물리적인 전단응력에 의해 활성화되므로 혈소판에 전단응력을 가한 후 혈소판 응집능력을 측정한다. Cone-plate 점도계나 쿨형 회전점도계를 사용하여 전단응력을 가한다. 이 중 cone-plate 점도계는 적은 양의 시료에도 적용할 수 있는 장점이 있어 널리 사용되고 있다. 전단응력을 가하지 않은 시료를 대조군으로 하여 전단응력을 가한 시료에 존재하는 단독 혈소판의 수를 측정한 후 혈소판 응집 정도를 측정한다.

(아) 프로트롬빈 시간(Prothrombin time, PT), 활성화부분트롬보플라스틴 시간(activated Partial thromboplastin time, aPTT), 트롬빈시간(Thrombin time, TT)

PT는 혈장에 트롬보플라스틴, 인지질, 칼슘 이온을 첨가한 후 섬유소 응괴(clumping)가 생길 때까지의 시간을 측정한다. aPTT는 내인성 경로와 공통경로에 관여하는 응고인자에 미치는 영향을 평가하는 방법으로 혈장에 인지질, 내인성 경로 활성화제, 칼슘 이온을 첨가한 후 섬유소 응괴가 형성될 때까지의 시간을 측정한다. TT는 혈장에 트롬빈을 첨가한 후 섬유소 응괴가 형성될 때까지의 시간을 측정한다.

(자) 동맥 혈전 생성(arterial thrombosis) 평가

동물모델에서 동맥 혈관에 FeCl_3 를 처리한 여과지를 부착하여 폐색(occlusion)시키면 혈전 생성을 유도할 수 있는데, 시험물질 처리 여부에 따라 혈전 생성 시간과 혈전의 크기 변화를 측정함으로써 혈전 생성 억제능력을 파악할 수 있다.

(차) 조직인자(tissue factor, TF)

TF는 시험물질을 섭취한 실험동물의 조직이나 혈액, 인체의 혈액에서 유전자 발현으로 측정할 수 있다. RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척

하여 진조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 TF의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(카) 항트롬빈(antithrombin, AT)

Platelet poor plasma(PPP)를 만든 후에 PPP를 1:18(v/v) 비율로 PBS에 희석시킨다. 희석한 PPP에 heparin을 첨가하고 37℃에서 2분간 반응시킨다. 여기에 트롬빈과 트롬빈의 특이기를 첨가한 후 형성된 트롬빈의 양을 측정하여 항트롬빈을 분석한다.

(타) Protein C

혈장에서의 protein C 수준은 ELISA assay를 이용해서 분석할 수 있다. Protein C의 활성은 PPP를 특이한 촉진제로 활성화시키고, 특이발색기질(synthetic chromogenic substrate)과 반응시킨 후 색의 변화를 흡광도를 관찰함으로써 측정한다.

(파) Protein S

혈장에서의 protein S 수준은 ELISA assay와 Latex particle-based agglutination assays를 이용해서 분석할 수 있다. Protein S의 활성은 APTT-based functional Protein S assay와 PT-based functional Protein S assays를 이용하여 혈액응고시간을 측정하므로 측정한다.

(하) Lipoprotein(a)(Lp(a))

혈장에서의 Lp(a) 측정은 apo(a)의 항체를 이용한 면역학적 방법을 사용하여 측정한다 (immunonephelometry, immunoturbidimetry, ELISA). 또한, ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry를 이용하여 측정할 수 있다.

(거) Platelet activation Factor(PAF)

혈장에서의 PAF 양은 상용화된 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(2) 섬유소(원) 용해

(가) 섬유소원(fibrinogen)

섬유소원은 혈장에서 섬유소원 항체를 이용한 ELISA assay로 측정할 수 있다. 섬유소원의 기능성 활성을 측정하는 방법으로는 fibrin clot 형성 시간을 기초로 하는 Caluss assay와 prothrombin time-derived fibrinogen assay가 있다.

(나) 섬유소 단량체(fibrin monomer), D-이합체(dimer), fibrin/fibrinogen degradation products(FDP)

섬유소 단량체는 혈장에서 latex agglutination assays를 기초로 하는 상용화된 kit를 사용하여 측정한다. D-이합체는 전혈과 혈장에서 항체를 이용한 면역학적 방법에 의한 상용화된 kit를 이용하여 측정할 수 있다(agglutination assays, enzyme-linked immunosorbent (ELISA), immunofluorescent assays(ELFA), latex agglutination assays). Fibrin/fibrinogen degradation products(FDP)는 enzyme-linked immunosorbent(ELISA), latex agglutination assay 등으로 측정할 수 있다.

(다) Prothrombin fragments F1+2(F1+2)

F1+2는 혈장에서 ELISA법으로 상용화된 kit를 이용하여 측정한다.

(라) 플라스미노겐(plasminogen)

플라스미노겐양은 혈장에서 자동응고측정기로 측정할 수 있다.

(마) 플라스미노겐 활성화인자 억제 단백질(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)

PAI-1양은 혈장에서 ELISA법으로 상용화된 kit를 이용하여 측정한다.

(바) 조직형 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator, tPA)

tPA의 활성은 혈장이나 조직액에서 pNA(chromopore)를 분비시키는 특이기를 분해하는 원리를 이용하는 상용화된 kit를 이용하여 측정할 수 있다. 분리된 pNA양을 흡광도로 측정하여 분리된 pNA양이 많으면 tPA의 활성이 높다고 분석한다.

(사) 유로키나제형 플라스미노겐 활성화제(urokinase-type plasminogen activator, uPA)

uPA는 실험동물의 조직이나 혈액, 인체의 혈액에서 측정할 수 있다. uPA의 조직이나 혈액에서의 발현 정도는 면역조직학적 방법, ELISA kit, 전기영동법을 통하여 단백질 발현으로 측정할 수 있다. 전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화 한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membrane에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, uPA 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출 시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

라. 내피 기능

(1) 내피세포 활성화

(가) P-selectin, E-selectin

P-selectin과 E-selectin 양은 상용화된 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(나) Soluble intercellular adhesion molecule(sICAM)-1, Soluble vascular cell adhesion molecule(sVCAM)-1

sICAM-1과 sVCAM-1은 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액이나 조직, 인체의 혈액에서 양과 단백질 발현, 유전자 발현을 측정할 수 있다. sICAM-1과 sVCAM-1양은 상용화된 ELISA kit로 측정할 수 있다. 단백질 발현은 전기영동법으로 측정할 수 있다. 전기영동법을 통한 단백질발현을 측정하기 위해 시료를 균질화 한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, sICAM-1과 sVCAM-1 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다. RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 개별 사이토카인의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(다) von Willebrand factor(vWF)

vWF양은 상용화된 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(라) 트롬보모듈린 (thrombomodulin)

트롬보모듈린양은 상용화된 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(2) 혈관 수축 및 이완

(가) Endothelin-1

Endothelin-1 양은 상용화된 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(나) 산화질소(Nitric oxide, NO)

NO 농도는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액이나 조직, 인체의 혈액에서 양에서 Griess reaction 법, ELISA법에 의한 상용화된 kit, chemiluminescent technique, spectrometry-based method 등으로 측정할 수 있다. Griess reaction 법은 시료 중에 존재하는 NO^{2-} 의 형태를 griess reagent를 이용하여 측정한다. 시료를 96 well plate에 넣고 griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 1% α -naphthylamide in H_2O)와 혼합하여 실온에서 방치한 후 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정한다.

(다) Endothelial nitric oxide synthase(eNOS)

eNOS는 혈관내피세포에서 유전자 발현을 측정한다. RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 eNOS의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(라) Bradykinin

Bradykinin은 ELISA법에 의해 측정할 수 있다.

(마) 대동맥의 평활근 세포에서 L-type Ca^{2+} channel을 통한 내향성전류의 변화 측정

분리된 심근 세포를 inverted microscope 위에 얹혀져 있는 chamber에 고정시킨 후 whole cell 전압 고정법을 사용하여 측정한다.

(바) 내피세포 의존 혈관 확장(flow mediated dilation, FMD)

ED-FMD는 내피세포기능을 측정하는 표준방법이다. ED-FMD는 혈류 매개 혈관 확장에 의해 혈류를 증가시키는 반응성 충혈상태(reactive hyperemia)를 이용하여 상완동맥의 직경 변화를 측정함으로써 계산한다. 상완동맥의 혈관 반응도의 측정은 Celermajer와 Deanfield가 제안한 기법을 이용하여 측정한다. 인체 적용 시, 검사 시작 전 대상자는 누운 자세로 10분간 충분히 안정을 취한 후, 1부와 2부 검사로 나누어 약 40분가량 검사를 진행한다.

1부 검사는 대상자를 똑바로 눕힌 후 10분간 휴식 후에 고해상도 초음파 탐촉자(10.0 MHz linear-array transducer)를 이용하여 우측 상완동맥에서 영상을 얻는다. Antecubital fossa 전방부에서 상완동맥의 기준 영상을 얻는다. 동맥의 영상은 장축으로 중심부를 전후하여 혈관 내막층(intima layer)이 가장 깨끗하게 보이는 곳을 골라 중심을 맞춘다. 팔은 검사를 하는 동안 움직이지 않게 한 후 적절한 위치가 정해지면 피부에 표시한다. 여기에서 기준 영상을 얻고 혈관과 70도의 각도로 pulsed doppler를 이용하여 동맥 혈류의 속도를 측정한다. 혈관 내경의 면적과 혈류 속도를 이용하여 혈류량을 계산한다. 내피세포-의존성 혈관 확장 정도는 혈류 매개 혈관 확장(flow mediated vasodilation)에 의해 혈류를 증가시키는 반응성 충혈상태(reactive hyperemia)를 이용하여 상완동맥의 직경 변화를 측정함으로써 계산한다. 상완부에 압박대(cuff)를 감은 후에 250 mmHg의 압력으로 5분 동안 압박대를 팽창시켜 상완부로의 혈류를 차단한 후 압박대를 이완시키면 상완부의 산소 결핍을 보완하기 위하여 상완동맥의 혈류량이 증가하게 된다. 압박대를 이완시킨 후 동맥 혈류 속도를 15초 동안 측정하고 90초까지 계속적으로 상완동맥의 영상을 얻는다(그림 13).

2부 검사(endothelium-independent vasodilation measurement: flow-independent dilation, FID)에 앞서 약 15분간 안정을 취한 후 상완동맥이 기저 상태로 돌아온 후 상완동맥의 기본직경과 혈류 속도를 측정한다. 내피세포 비의존성 혈관 확장 반응을 보기 위하여 nitroglycerin 0.6 mg(이하 NTG)을 설하 투여하고 약 3분 후 혈관의 직경과 혈류 속도를 측정한다. 혈관 확장 반응(flow mediated dilation)은 기저치 직경에 대한 늘어난 직경을 백분율로 계산하여 구한다.



그림 13. FMD 검사 모습

[출처: 한승환 외, 대한심장학회혈관연구회 임상혈관학: 99-108, 2009]

(사) Peripheral arterial tonometry(PAT)

PAT는 비침습적인 신뢰성 있는 혈관 내피 기능 측정 방법이다. 양손 엄지손가락에 탐침을 착용시키고 5분 동안 맥파를 기록한 후, 한쪽 팔에 압박대를 감은 후에 5분 동안 압박대를 팽창시켜 상완부로의 혈류를 차단한 다음 압박대를 이완시키면 상완부의 산소 결핍을 보완하기 위하여 상완동맥의 혈류량이 증가하게 된다. 압박대를 이완시킨 후 적어도 5분 동안 맥파의 진폭을 계속적으로 얻으며, PAT index는 양쪽 손가락의 혈류 차단 전후 평균 신호 크기 간의 비로 표시된다. 자동화된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 최대-안정시의 column의 비율을 이용하며 구하는 공식은 다음과 같다.

$$\% \text{ Endothelial function by PAT} = (\text{최대 확장 시 동맥의 column} - \text{안정 시 동맥의 column}) / \text{안정 시 동맥의 column} \times 100$$

(아) Segment shortening (SS)

SS는 분절수축기 단축률(systolic segment shortening %SS)로 다음과 같은 공식으로 계산한다.

$$SS = [(\text{mean EDL} - \text{mean ESL}) / \text{mean EDL}] \times 100\%$$

(EDL, end-diastolic lengths; ESL, end-systolic lengths)

(자) 동맥 내강 직경

동맥 내강 직경의 크기는 광학 현미경이나 초음파를 통하여 측정할 수 있다.

마. 혈관 탄력성**(1) 맥파전달속도(Pulse wave velocity, PWV)**

PWV는 혈관을 따라 이동하는 맥파가 전달되는 속도로, 심장에서 혈액 분출에 의해 발생되는 동맥 맥박이 한 지점에서 다른 지점까지 전달될 때 걸리는 시간을 측정하여 평가하며, 특정 혈관 구간의 혈관 경직도를 나타낸다. PWV는 누운 자세에서 최소 5분 안정 후 자동파형분석기(automatic waveform analyzer)를 사용하여 측정한다.

(2) 발목상완지수(Ankle brachial index, ABI)

상완 및 발목의 혈압과 맥파는 양팔과 발목에 oscillometric 센서를 가진 압박대를 감아 기록한다. 1회 맥파 기록 시의 측정 시간은 10초이며, 연속 2회를 기록하여 평균값을 사용한다. 맥파 속도 측정은 안정 시간을 포함하여 대부분 10분 이내에 시행한다. 맥파 속도를 결정하는데 필요한 시간간격과 측정지점 간의 거리는 대상자의 키를 근거로 하며 파형분석기에서 맥파의 이동거리(cm) 대 전달시간(sec)의 비로 계산된다.

(3) 파형 증가 지수(Augmentation index, AIx)

AIx는 혈관기능 평가 방법 중 비침습적인 pulse wave analysis 방법으로 혈관 경직도를 반영한다. 혈관이 경화되면 심장에서 발생한 전진 맥파와 말초에서 심장으로 돌아오는 반사파의 속도가 빨라져서 반사파가 중심동맥에 일찍 도착하면 중심동맥의 수축기 맥압이 증가하여 수축기 혈압이 상승하는데 이 상승부분(augmentation pressure)을 수축기와 이완기 혈압의 차로 나눈 것을 파형 증가 지수로 정의한다. 구하는 공식은 아래와 같다.

$$AIx = \frac{\text{Augmentation pressure}}{\text{Systolic blood pressure} - \text{Diastolic blood pressure}}$$

(4) 동맥순응도(Arterial compliance)

동맥 순응도는 초음파를 이용해서 대동맥, 경동맥, 대퇴동맥에서 측정한다.

(5) 혈압

혈압은 자동 전자 혈압계와 수은 혈압계로 측정할 수 있는데 측정 방법은 동일하나, 다른 점은 수은 혈압계로 측정할 경우에는 감압하면서 청진기에 들리는 소리로 혈압을 판단할 수 있다는 점이다. 대상자를 의자에 앉게 하고 최소한 5분간의 안정 후 상완위를 심장과 같은 높이로 하여 혈압계 압박대의 하부가 팔꿈치 안팎으로 2cm 상부에 오도록 한 후 압박대의 압력을 올린다. 대개 최초 혈압보다 20~30 mmHg 높은 지점까지 압박한 후 2~3 mmHg/sec 속도로 압박대의 압력을 낮추어 처음 소리가 들리는 지점을 수축기로 간주하고 소리가 완전히 사라지는 지점을 이완기로 간주하여 혈압을 측정한다. 2분 간격을 두고 2회 측정하여 평균을 내고 2회의 평균치가 5 mmHg 이상 차이가 나면 추가로 측정하여 평균을 구한다.

동물실험의 경우 혈압을 측정할 때 쥐가 움직일 경우 혈압 측정이 불가능하므로 몸체에 꼭 맞는 것을 사용해야 한다. 꼬리 동맥이 완전히 확장되게 한 후 꼬리 위쪽에 occlusion 압박대를 끼운 후 압박대에 physiograph와 연결해놓은 pneumatic pulse sensor를 부착한다. 압박대의 압력을 올렸다가 감압시키면서 나타나는 맥박을 physiograph로 기록한다. 처음 맥박이 나타날 때가 수축기 혈압이다. 각 동물 당 5회 측정해서 그 평균값을 실험동물의 혈압으로 한다.

(7) 동맥 내 플라크의 성상, 크기 및 개수

동맥 내 플라크의 성상, 크기 및 개수는 초음파를 이용하여 측정한다.

(8) 혈액 흐름(Venous blood flow)

혈액 흐름 속도를 초음파를 이용하여 직접 측정한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관시험

(1) 시험계

시험관 시험을 위해서 표준 혈장과 농축 혈소판을 구매하여 사용하거나 건강한 실험동물에서 혈액을 얻어 실험할 수 있다. 세포실험은 인간혈관내피세포(human umbilical vascular vein endothelial cells, HUVECs)를 사용하여 실험할 수 있다. 또한, 동물에서 동맥을 적출하여 평활근세포를 분리하여 실험할 수 있다.

(2) 바이오마커

시험물질의 작용기전을 설명하기 위하여 바이오마커의 양, 시간, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 동물시험

(1) 실험동물

건강한 동물이나 고지방식이등으로 고지혈증을 유발시킨 혈행 장애 모델에서 실험할 수 있다. 또한, 수술로 경동맥을 노출시킨 후 FeCl_3 로 혈전을 유발시킨 동물모델을 사용하여 시험물질 섭취에 의한 바이오마커의 변화를 관찰한다.

(2) 바이오마커

실험동물에게 시험물질을 경구 투여 또는 식이와 함께 섭취한 후에 혈액, 조직에서의 혈행 개선 바이오마커 변화를 측정한다. 시험물질의 작용기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 시간, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

인체적용시험의 대상자의 선정/제외기준은 원료의 특징과 작용기전에 따라 인체적용시험 IRB 승인 시 구체적으로 결정할 수 있다. 본 평가 가이드는 인체적용시험의 선정/제외기준을 설정 시 고려되어야 할 사항을 예시로 제공하고 있다.

(가) 시험대상자(예시)

- 건강한 사람
 - 혈소판 응집반응이 55~70%* 이상인 사람
- (* Collagen과 Adenosine Diphosphate(ADP) 모두 만족하는 경우)

(나) 대상자 제외기준(예시)

- 질병상태
 - 백혈병환자, 자가면역질환자, 염증성 전신질환자, 감염성 질환자
 - 6개월 이내 심혈관질환/부정맥/심부전/심근경색/심장조율기 사용/동맥 혈관성 형술, 관상동맥 부행로 수술을 받은 자
 - 심부전, 심근경색, 뇌혈관질환, 동맥경화 환자
 - 고혈압환자
 - 고지혈증환자
 - 출혈과 관련된 질병을 가진 자
 - 당뇨병 환자
 - 위장질환(크론병)/위장절제수술/과민성 대장증후군환자
 - 간 질환자
 - 신장 질환자
 - 갑상선 질환자
 - 신경·정신장애(우울증, 조현병), 심리치료를 받은 자
 - 암 환자

- 갑상선 또는 호르몬 이상증세/이상 갑상선 수치를 가진 자
- 생리적 상태
 - 임신부, 임신을 준비하는 자
 - 수유부
 - 출산 후 6개월 이내 여성
- 약물복용
 - 약물중독자
 - 혈중 지질농도에 영향을 줄 수 있는 약물 복용자
 - 자율 또는 심혈관 기능에 영향을 줄 수 있는 약물 복용자
 - 스타틴 관련 약물 복용자
 - 항생제 복용자
 - 항응고제 복용자
 - 비스테로이드성 항염증제 복용자
- 생활 습관
 - 알코올 섭취 (남자: <30 g/일(맥주 3잔, 소주 3잔 정도),
여자: <20 g/일(맥주 2잔, 소주 2잔 정도))
- 알레르기
 - 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자
- 기타
 - 최근 1개월 내 다른 임상시험에 참가한 자
 - 그 외 연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 자

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다.

(3) 바이오마커

시험물질의 작용기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 시간, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 한 가지 지표의 변화가 아닌 일련의 바이오마커의 변화를 종합적으로 평가한다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

IV

참고문헌

1. 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정, 식품의약품안전처 고시
2. 건강기능식품(개정판), 김미경, 권오란, 전향숙, 원혜숙, 김지연, 강병철, 제정환, 한재갑, 홍성화, 복혜숙, 김우선, 피재호, 박현용, 김현정, 교문사, 2010
3. 건강기능식품 기능성평가 해설서, 식품의약품안전처, 2008
4. 건강기능식품 시험법 가이드(I), 식품의약품안전처, 2005
5. 국가건강정보포털. <http://health.mw.go.kr>
6. 김민경, 이현희, 김수성, 신지혜, 심효은. 혈액점도 검사 참고치 설정. 대한임상병리사협회 학술대회 초록집 6:29-30, 2018
7. 대한의사협회 의학용어위원회 <http://term.kma.org>
8. 박정배. 파형 증가 지수(Augmentation Index). Clinical Vascular Medicine: 125-136
9. 보건복지부. 2018 보건복지통계연보, 2018
10. 세계보건기구. <http://www.who.int>
11. 정진호. 건강기능식품의 혈행개선 효능평가법. 한국식품영양과학회 학술대회 발표집. 11:49-51, 2003
12. Adj A, Hirata K, O'Rourke MF. Clinical use of indices determined non-invasively from the radial and carotid pressure waveforms. Blood Press Monit 11:215-221, 2006
13. Ariëns RA. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. J Thromb Haemost 11(Suppl 1):294-305, 2013
14. Asmar R. Arterial stiffness and pulse wave velocity: Clinical applications 1st edn. Paris: Elsevier; 1999
15. Bernat A, Vallee E, Maffrand JP, Gordon JL. The role of platelets and ADP in experimental thrombosis induced by venous stasis in the rat. Thromb Res 52:65-70, 1988
16. Bernat A, Vallée E, Maffrand JP, Roncucci R. Antithrombotic effect of ticlopidine in a platelet-independent model of venous thrombosis. Thromb Res 37:279-285, 1985
17. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(2):168-175, 2003
18. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role

- of oxidant stress. *Circ Res* 87(10):840-844, 2000
19. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol Nutr Food Res* 56(7): 1073-1080, 2012
 20. Carrera V, Sabater E, Vilanova E, Sogorb MA. A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 847(2):88-94, 2007
 21. Corban MT, Hung OY, Mekonnen G, Eshtehardi P, Eapen DJ, Rasoul-Arzrumly E, Al Kassem H, Manocha P, Ko YA, Sperling LS, Quyyumi AA, Samady H. Elevated Levels of Serum Fibrin and Fibrinogen Degradation Products Are Independent Predictors of Larger Coronary Plaques and Greater Plaque Necrotic Core. *Circ J* 80(4):931-937, 2016
 22. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 39(2):257-265, 2002
 23. Daleke DL, Lyles JV. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* 1486:108-127, 2000
 24. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115(10):1285-1295, 2007
 25. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 61(1-2):122-131, 2008
 26. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113(13):1708-1714, 2006
 27. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980
 28. Ganz P, Vita JA. Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 108:2049-2053, 2003
 29. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction

- for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 41:1769-1775, 2003
30. Grassi D, Desideri G, Di Giosia P, De Feo M, Fellini E, Cheli P, Ferri L, Ferri C. Tea, flavonoids, and cardiovascular health: endothelial protection. *Am J Clin Nutr* 98(6 Suppl):1660S-1666S, 2013
 31. Guichardant M, Vericel E, Lagarde M. Biological relevance of double lipoxygenase products of polyunsaturated fatty acids, especially within blood vessels and brain. *Biochimie* 159:55-58, 2019
 32. Guidance for the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health . *EFSA J* 16(1):5136, 2018
 33. Guyton AC. et al. In *Textbook of Medical Physiology*. 152-160, W.W. Saunders Co., Philadelphia, 2000
 34. Harker LA. Platelets and vascular thrombosis. *N Engl J Med* 330:1006-1007, 1994
 35. Harrison DG, Kurz MA, Quillen JE, Sellke FW, Mügge A. Normal and pathophysiologic considerations of endothelial regulation of vascular tone and their relevance to nitrate therapy. *Am J Cardiol* 70:11B-17B, 1992
 36. Herbert JM, Bernat A, Maffrand JP. Importance of platelets in experimental venous thrombosis in the rat. *Blood* 80:2281-2286, 1992
 37. Hodgson JM. Effects of tea and tea flavonoids on endothelial function and blood pressure: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(9):838-841, 2006
 38. Holmsen H, Dangelmaier CA. Measurement of secretion of serotonin. *Methods Enzymol* 169:205-210, 1989
 39. Joist JH, Bauman JE, Suter SP. Platelet adhesion and aggregation in pulsatile shear flow: effects of red blood cells. *Thromb Res* 92:S47-S52, 1998
 40. Kang HJ, Jeon IH, Kwon TO, Choi JW, Kim SZ, Jang SI. Effect of Mori Folium extract on improvement of blood flow in ferric chloride-induced carotid artery damage rat model. *J Physiol Pathol Korean Med* 28(6):607-613, 2014
 41. Kim SR, Lee JY, Lee MY, Chung SM, Bae ON, Chung JH. Association of quinone-induced platelet anti-aggregation with cytotoxicity. *Toxicol Sci* 62:176-182, 2001
 42. Kleinegris MC, Ten Cate-Hoek AJ, Ten Cate H. Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn* 122(11):557-566, 2012

43. Kochi M, Shimomura M, Hinoi T, Egi H, Tanabe K, Ishizaki Y, Adachi T, Tashiro H, Ohdan H. Possible role of soluble fibrin monomer complex after gastroenterological surgery. *World J Gastroenterol* 23(12):2209-2216, 2017
44. Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 46:1978-1785, 2005
45. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Chung WJ, Ahn JY, Seo YH, Kang MH, Ahn TH, Choi IS, Shin EK. Additive beneficial effects of losartan combined with simvastatin in the treatment of hypercholesterolemic, hypertensive patients. *Circulation* 110:3687-3692, 2004
46. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* 88:1525-1541, 1996
47. Kwon YJ, Lee JH, Moon HS, Kim HR, Choi HJ, Kim SH, Won YG, Shin MG. Analytical Performance and Reference Interval of a Microfluidic Viscometer, Viscore-300 for the Measurement of Whole Blood Viscosity. *Lab Med Online* 8(1):1-6, 2018
48. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, Lubin BH. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood* 87:1179-1187, 1996
49. Kuypers FA. Phospholipid asymmetry in health and disease. *Curr Opin Hematol* 5:122-131, 1998
50. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 107:139-146, 2003
51. Lee JW, Joo SJ, Park YS. Effect of regular exercise on platelet cytoplasmic calcium during treadmill exercise in healthy young males. *Korean Circulation J* 29(10):1112-1120, 1999
52. Lee JY, Lee MY, Chung SM, Chung JH. Chemically induced platelet lysis causes vasoconstriction by release of serotonin. *Toxicol Appl Pharmacol* 149:235-242, 1998
53. Lee JY, Lee MY, Chung SM, Chung JH. Menadione-induced vascular endothelial dysfunction and its possible significance. *Toxicol Appl Pharmacol* 161:140-145, 1999
54. Lee MY, Bae ON, Chung SM, Kang KT, Lee JY, Chung JH. Enhancement of platelet aggregation and thrombus formation by arsenic in drinking water: a contributing

- factor to cardiovascular disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 179:83-88, 2002
55. Lee MH, Sung HJ, Kwon CS, Sohn HY. Anti-coagulation and Anti-platelet Aggregation Activities of Black Ginger(*Kaempferia parviflora*). *J Life Sci* 28(9):1068-1075, 2018
56. Leone G, Sica S, Chiusolo P, Teofili L, De Stefano V. Blood cells diseases and thrombosis. *Haematologica* 86:1236-1244, 2001
57. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315:1046-1051, 1986
58. Marangoni F, Poli A. Clinical pharmacology of n-3 polyunsaturated fatty acids: non-lipidic metabolic and hemodynamic effects in human patients. *Atheroscler Suppl* 14(2):230-236, 2013
59. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 7:516-522, 1993
60. Mensink RP, Aro A, Den Hond E, German JB, Griffin BA, ten Meer HU, Mutanen M, Pannemans D, Stahl W. PASSCLAIM - Diet-related cardiovascular disease. *Eur J Nutr* 42 [Suppl 1]: I/6-I/27, 2003
61. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasan RS, Levy D. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: The Framingham Heart study. *Hypertension* 43:1239-1245, 2004
62. Nichols WW, O'Rourke MF. McDonald's blood flow in arteries. 5th ed. London: Arnold; 2005
63. O'Kennedy N, Raederstorff D, Duttaroy AK. Fruitflow®: the first European Food Safety Authority-approved natural cardio-protective functional ingredient. *Eur J Nutr* 56:461-482, 2017
64. Packham MA. Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 72:278-284, 1994
65. Park KJ, Kwon EH, Kim HJ, Kim SH. Evaluation of the Diagnostic Performance of Fibrin Monomer in Disseminated Intravascular Coagulation. *Korean J Lab Med* 31(3):143-147, 2011
66. Pubmed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
67. Riksen NP, Rongen GA, Smits P. Acute and long-term cardiovascular effects of

- coffee: implications for coronary heart disease. *Pharmacol Ther* 121(2):185-191, 2009
68. Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner AE. Polyphenols from cocoa and vascular health-a critical review. *Int J Mol Sci* 10(10):4290-4309, 2009
69. Roman MJ, Kizer JR, Ali T, Lee ET, Galloway JM, Fabsitz RR, Howard BV. Central blood pressure better predicts cardiovascular events than does peripheral blood pressure: The STRONG heart study. *Circulation* 112(17):U844-U854, 2005
70. Sheehan JP, Lan HC. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood* 92:1617-1625, 1998
71. Shenkman B, Savion N, Dardik R, Tamarin I, Varon D. Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by the cone and plate(let) analyzer: role of platelet activation, fibrinogen and von Willebrand factor. *Thromb Res* 99:353-361, 2000
72. Shin WY, Seo MS, Park RJ. Performance Evaluation of Innovance Antithrombin, Berichrom Protein C and Innovance Free Protein S Assays Using the Automated Coagulation Analyzer Sysmex CS-5100. *Clin Exp Thromb Hemost* 4(1):11-15, 2018
73. Skarja GA, Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Rubens FD, Brash JL. A cone-and-plate device for the investigation of platelet biomaterial interactions. *J Biomed Mater Res* 34:427-438, 1997
74. Sudano I, Spieker LE, Hermann F, Flammer A, Corti R, Noll G, Lüscher TF. Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 2:S136-S150, 2006
75. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 108(5):1433-1446, 2009
76. Taniuchi Y, Sakai Y, Hisamichi N, Kayama M, Mano Y, Sato K, Hirayama F, Koshio H, Matsumoto Y, Kawasaki T. Biochemical and pharmacological characterization of YM-60828, a newly synthesized and orally active inhibitor of human factor Xa. *Thromb Haemost* 79:543-548, 1998
77. Turpie AG, Esmon C. Venous and arterial thrombosis-pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb Haemost* 105(4):586-596, 2011
78. Viridis A, Neves MF, Duranti E, Bernini G, Taddei S. Microvascular endothelial dysfunction in obesity and hypertension. *Curr Pharm Des* 19(13):2382-2389,

2013

79. Vogel RA. Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol* 20(5):426-432, 1997
80. Wang Q, Liang X, Wang L, Lu X, Huang J, Cao J, Li H, Gu D. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 221(2):536-543, 2012
81. Watson SP. et al. *A Practical Approach*, 10-12, Oxford University Press., New York, 1996
82. Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Berent R, Eber B. Arterial stiffness, wave reflections, and the risk of coronary artery disease. *Circulation* 109:184-189, 2004
83. Weitz JI, Fredenburgh JC, Eikelboom JW. A test in context: D-dimer . *J Am Coll Cardiol* 70(19):2411-2420, 2017
84. Williams B1, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D, Hughes AD, Thurston H, O'Rourke M, CAFE Investigators; Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Investigators; CAFE Steering Committee and Writing Committee. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: Principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation* 113:1213-1225, 2006
85. Wood BL, Gibson DF, Tait JF. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 88:1873-1880, 1996
86. Yildiz SY, Kuru P, Oner ET, Agirbasli M. Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Scientific WorldJournal* 2014:2014:858293

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- 혈행 관련 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이혜영, 김종수, 윤태형, 권광일, 국주희, 김규현,
김준영, 주도영, 오재명, 방수진, 류은채, 안정선,
조정화, 김선후, 문상은, 김아름

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2020년 9월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구과

(043-719-4402, 4416, 4421, 4422, 4423,
4425, 4426, 4430)

건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

혈행 관련



【부패. 공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패.공익신고” 코너
- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담” 코너