

## 蛇毒의 出血因子에 作用하는 微生物性 抗出血物質

徐正墳

경북대학교 자연과학대학 미생물학과  
(1986년 1월 30일 수리)

### Isolation and characterization of a microbial antihemorrhagic substance on snake venom.

Jung Hwn Seu

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea.

(Received January 30, 1986)

For the inactivation of venoms, the chemical methods are generally applied. In the chemical method many works have been carried out with the chemical reagents and immunological antisera. However, all inhibitory effect of these chemicals acting on snake venoms may well be due not to the specific, but to the nonspecific inhibitory action. Therefore, it is necessary to separate venom into its compositional active proteins and develop specific inhibitor which acts on the each protein. Until now, there have not been any reports about the substance which acts on snake venom as a specific inhibitor. Recently in 1979, we had actually isolated a specific venom inhibitor (ISV) which has a strong inhibitory activity against the proteinase of snake venom of *Colubridae*. In our experiments described here, a strain of *Aspergillus* sp., isolated from soil, was able to produce a biological active substance. The partial crystallized substance had a strong inhibitory activity against hemorrhagic action of snake venom of *Colubridae*. For the inhibitory action of the sample on the lethality of venom, the substance prevented completely the lethal action of the hemorrhagic factor when they were treated with enough amount of the substance. The edema factor of whole venom of *Agkistrodon bromohoffi brevicaudus* was completely inhibited, but those of HR-I and HR-II of *Trimeresurus flavoviridis* venom were inhibited about 50%, when they were treated with the substance of half amount of venom. On the other hand, from the result of subcutaneous hemorrhage in a rabbit, it was concluded that two kinds of antihemorrhagic substance might be produced by the strain used in this work.

현재 지구상에는 약 2,700종의 蛇類가 서식하고 있으며 이 중 毒腺(venom sack)을 가지며 특수한 구조를 한 毒牙(fang)을 가지는 약 800종을 毒蛇라고 분류하고 있으나<sup>(1)</sup>, 실제로는 이들 800종의 독사중 그 성질이 매우 공격적이고 또 蛇毒(venom)의 毒力이 강해 人畜에 피해를 많이 주는 약 380종을 일반적으로 독사라고 부르고 있다<sup>(2)</sup>. 독사는 그 형태적 특징에 따라 *Viperidae*, *Elapidae*, *Hydrophidae*, *Colubridae* 과로 나누고 있으며 *Viperidae*는 다시 *Crotalidae* (*Clotalinae*, 살무사亞科)와 *Viperidae* (*Viperinae*, 고리뱀亞科)로 나누어 총 5과로 분류하고 있다<sup>(1,3)</sup>. 우리나라에 서식하고 있는 *Agkistrodon bromohoffi brevicaudus* (살무사),

*Agkistrodon caliginosus* (부독사), *Agkistrodon saxatilis* (칠점사) 3종의 독사는 *Crotalidae* 과(亞科)에 속하고 있으며<sup>(4,5,6)</sup> 매우 공격적이고 사독 또한 毒力이 강해서 비교적 많은 피해를 주고 있다. 우리나라에 서식하고 있는 이들 독사의 독에 대해서는 거의 연구된 바가 없으며 우리나라 살무사와 유연관계가 큰 일본 Mamushi인 *Agkistrodon halys bromohoffi* 독에 대한 연구 결과와<sup>(7)</sup> 실제 우리나라 독사에 의한 咬傷에서 나타나는 증상을 보아 우리나라 毒蛇毒의 主因子는 出血毒과 組織壞死毒으로 추측되고 있다. 본인은 우리나라의 *Agkistrodon bromohoffi brevicaudus* 毒을 채취하여 DE-AE Sephadex A-50으로서 분획하여 proteinase (組

織壞死毒) 활성이 있는 8 개의 회분을 얻었으며<sup>(4)</sup> 이 중 2 개의 회분이 전체 proteinase 활성의 75%를 차지하며 이 활성 회분의 단백질량은 총 venom 단백질의 25.7%에 해당하였다. 또 같은 방법으로 5 개의 出血活性을 가지는 회분을 얻었으며 이 중 2 개의 회분이 전체 出血活性의 약 85%를 나타내고 총 단백질량의 25%에 해당한다는 결과를 얻은바가 있다<sup>(4)</sup>.

한편 *crotalidae* 蛇毒을 위시하여 여러가지 종류의 사독을 대상으로 하여 이들 venom을 불활성화시키려한 연구는 오래전부터 시도되어 왔으나, anti-serum<sup>(9)</sup>, EDTA<sup>(10)</sup>, dihydrothioctic acid<sup>(11)</sup>와 BAL<sup>(12)</sup> 같은 SH 화합물<sup>(13)</sup>, 그리고 glycyrrhizine<sup>(14)</sup> 이외에는 아직 효과적인 저해물질이 발견되어진 바 없다. *Agkistrodon halys bromohoffi*, *Trimeresurus flavoviridis* 毒에 대해서는 EDTA<sup>(15)</sup>, BAL, dihydrothioctic acid 및 glycyrrhizine 이 vitro에서 이 蛇毒의 proteinase 활성 뿐만 아니라 出血活性과 edema 활성도 거의 실패시킨다는 것이 알려져 있으나<sup>(16)</sup> 이들 물질은 蛇毒 개개의 활성물질에 비특이적으로 작용하고 있어 사독작용의 mechanism 규명 등 기초 연구에 크게 도움을 주지 못하고 있는 실정이다. 본인은 사독의 proteinase 만을 특이적으로 불활성화시키는 저해제를 penicillium 속의 한 균주로부터 분리하여 ISV로 명명하고 이의 작용을 우리나라의 독사독을 위시하여 *T. flavoviridis*, *A. acutus* 등 20 여종의 사독 proteinase 에 대하여 조사하였다. 또한 조직괴사독이 出血과 edema 活性에 미치는 영향 등을 규명하여 발표한 바 있다<sup>(16,17,18)</sup>. 그러나 *crotalidae* 科 사독의 치사활성이 주로 hemorrhagic fraction에 편재해 있는<sup>(1)</sup> 관계상 독작용의 규명에는 venom proteinase 저해제 외에 출혈인자에 작용하는 특수 저해제의 발견이 필수적이라고 인식되어진다. 본인은 이러한 점을 배경으로 하여 사독의 출혈인자를 특이하게 저해하는 물질을 미생물에서 검색하더 중 *crotalidae* 科의 독사인 *A. bromohoffi brevicaudus*, *A. saxatilis*, *T. flavoviridis*, *A. acutus* 등 사독의 출혈활성을 강하게 저해하는 물질을 분리하여 부분적으로 정제하였으며 이 시료의 작용에 대한 조사 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

蛇毒

① *Trimeresurus flavoviridis* 蛇毒은 Japan Snake Institute에서 제공받은 全毒을 소량의 증류수에 용해시킨 후 불용성분을 원심제거한 후 동결건조하여 사용하였다.

조하여 사용하였다.

② *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* (살무사) 및 *Agkistrodon saxatilis* (철점사)의 毒은 市中 鬻商人으로부터 生蛇를 구입하여 본 연구실에서 鬻을 분류하여 각각 採毒한 全毒을 증류수에 용해하여 불용성분을 원심제거한 후 동결건조하여 사용하였다.

③ HR-I (出血毒)은 *Trimeresurus flavoviridis* 全毒을 Sephadex G-100 column chromatography 로 분획하여 사용하였으며, 일부는 Okinawa Prefectural Public Health Laboratory로 부터 입수하여 서로 활성을 비교하여 사용하였다. HR-I 분획방법은 *T. flavoviridis* 全毒 500 mg을 Sephadex G-100 column을 사용하여 M/200 Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 용출시킨 후 유효부분을 동결건조시켜 HR-I

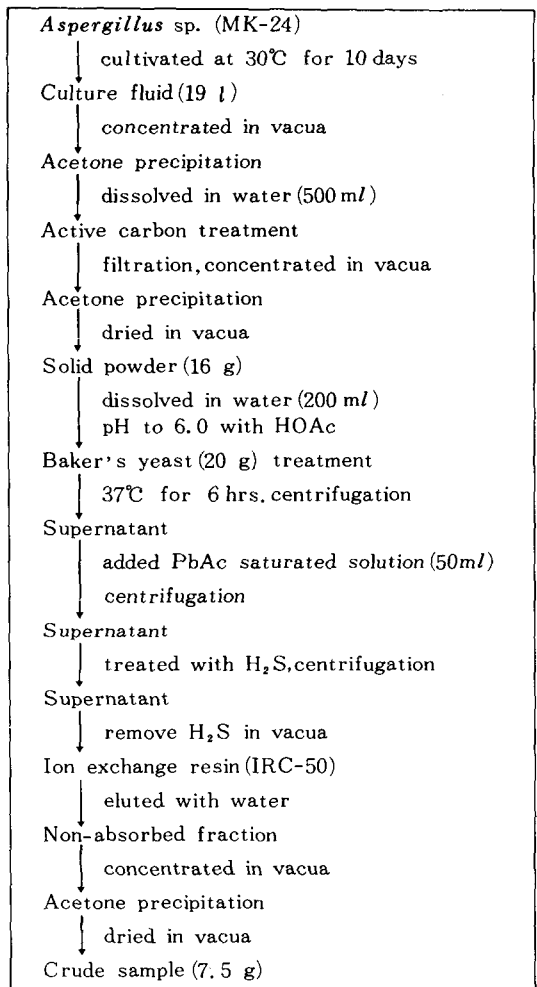


Fig. 1. Preparation procedure of crude sample of hemorrhagic inhibitor.

을 얻었다(35 mg).

④ *Trimeresurus flavoviridis* HR-II (出血毒) factor는 일본 Okinawa Prefectural Public Health Laboratory에서 제공받아 사용하였다.

⑤ *Agkistrodon acutus* venom는 Japan Snake Institute에서 제공받아 사용하였다.

**抗出血性 시료의 조제**

① 시료의 조정제

토양에서 분리선별한 *Aspergillus*속의 한 균주인 MK-24를 glucose 1.0%, NaNO<sub>3</sub> 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, 및 KCl 0.05%를 함유한 배지(pH 6.8)에 접종하여 30℃에서 10일간 정치 배양한 후 그 배양액을 여과하여 40℃에서 감압 농축하였다(최초량의 1/20). 여기에 냉 acetone을 가하여 생성된 적갈색의 oily한 침전을 모아 증류수에 용해한 후 활성탄으로 탈색하였다. 완전히 탈색되지 않은 처리액을 40℃에서 감압농축한 후 acetone를 가하여 점질성 침전을 얻고 acetone으로 수회 탈수하여 감압하에서 건조한 후 粗試料를 얻었다(842 mg/l). 이 적갈색의 粗試料(흡습성이 강함) 16.0g을 취하여 200 ml의 증류수에 용해한 후 HO-Ac로써 pH를 6.0으로 조절하였다. 여기에 *Saccharomyces cerevisiae* 균체 20g을 가하여 37℃에서 6시간 처리하여 제당한 후 원심분리하고, 그 상등액에 포화 PbAc용액 50ml를 가하여 30분간 방치한 후 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 이 상등액에 H<sub>2</sub>S를 제거한 후 cation exchange resin인 IRC-50에 통과시켰다. 이때 나오는 비흡착부분인 산성 流出部를 40℃에서 감압농축한 후 acetone으로 침전물을 얻어 건조하여 시료로 사용하였다(회수량 7.5g)(Fig. 1).

② 粗試料의 정제

위에서 얻은 粗試料 150mg을 Sephadex G-10 column(0.8×70 cm)을 사용하여 gel filtration 하였으며 물을 용매로 하여 3ml씩 분획하여 14~23번까지의 fraction을 모아 물과 acetone으로 결정화하였다. 이때 부분적으로 결정이 생성되었으나 과량의 acetone에서는 생성된 결정이 다시 oily한 상태로 변하기 때문에 정제된 시료를 얻을 수 없었으며 acetone 이외의 용매로서는 전혀 결정을 얻지 못하였다(Fig. 2, Photo. 1).

**抗出血성의 측정**

出血毒으로서 全毒 혹은 HR-I의 일정량과 抗出血性 시료 일정량을 M/15 phosphate buffer (pH 7.17)에 용해시켜 혼합한 후 37℃에서 30분간 전처리하고 그 0.1ml를 부화한지 10~24시간된 병아리 대퇴부 皮下에 주사하였다. 주사한 지 3시간 뒤에

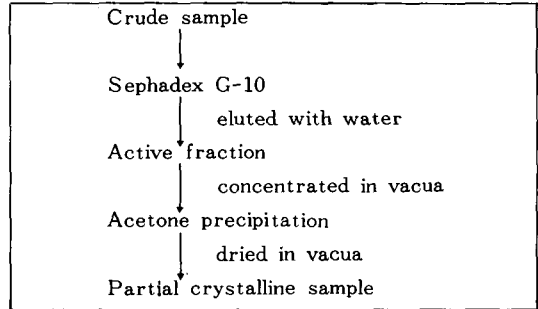


Fig. 2. Purification procedure of hemorrhagic inhibitor from crude sample.



Photo. 1. Photomicrograph of partial crystalline sample.

병아리를 죽여 대퇴부의 껍질을 벗긴 다음 나타나는 出血정도를 관찰하였으며 실험시 병아리 5마리씩을 한 群으로 사용하였고, 대조구로서는 全毒(혹은 HR-I)만을 전처리하여 주사하였다. 이때 사용한 병아리의 중간 차이는 전혀 발견할 수 없었다.

**抗出血성의 정량**

出血毒으로서 全毒, HR-I 혹은 HR-II 일정량과 항출혈성 시료 일정량을 M/15 phosphate buffer (pH 7.17)에 용해시켜 혼합한 후 37℃에서 30분간 전처리하고 그 0.05ml를 mouse (Albino)의 오른쪽 pad(右後足趾)에 주사하여 24시간 후 죽이고 mouse 뒷발의 ankle joint(下肢 關節部)를 절단하였다. 이 下肢部位의 중량을 측정하고 후 여기에 5ml의 증류수를 가하여 마쇄한 다음 원심분리하여 얻은 상등액을 다시 milipore filter로써 여과하였다. 이 투명한 溶血液 1ml에 0.12% Sodium carbonate용액 4ml를 가하여 20분간 방치한 후 540nm에서 total oxy-hemoglobin의 O.D.를 측정하여 true control의 O.D.치를 뺀 후 같은 방법으로 측정한 control 치와 비교하였다. 이때 control은 venom만을 주사하였으며, true control은 동일 buffer만을 주사하였다. 이때 사용한 mouse의 체중은 15g(±1g)이었으며 4마리를 한 群으로 사용하였다.

**抗致死性 조사**

全毒 혹은 HR-I 일정량과 抗出血性 시료 일정량을 M/15 phosphate buffer (pH 7.17)에 용해 혼합하

**Table 1. Antihemorrhagic activity of the sample on the various snake venoms**

(A)	<i>T. flavoviridis</i> : venom 20 $\mu$ g each					
	sample ( $\mu$ g)	0	5	10	20	40
	degree of hemorrhage	+++ ++	+	±	-	-
(B)	<i>Agk. acutus</i> : venom 10 $\mu$ g each					
	sample ( $\mu$ g)	0	5	10	20	40
	degree of hemorrhage	+++	++	+	+	+
(C)	HR-I of <i>T. flavoviridis</i> : venom 20 $\mu$ g each					
	sample ( $\mu$ g)	0	5	10	20	40
	degree of hemorrhage	+++	-	-	-	-
(D)	<i>Agk. saxatilis</i> : venom 20 $\mu$ g each					
	sample ( $\mu$ g)	0	5	10	20	40
	degree of hemorrhage	+++ ++	++	+	++	+
(E)	<i>Agk. bromohoffi brevicaudus</i> : venom 20 $\mu$ g each					
	sample ( $\mu$ g)	0	5	10	20	40
	degree of hemorrhage	+++ ++	+++	+++	++	++
(F)	<i>T. flavoviridis</i> : sample 20 $\mu$ g each					
	venom ( $\mu$ g)	2.5	5	10	20	40
	degree of hemorrhage venom only	+	+++	+++	+++	+++
	degree of hemorrhage venom and sample	-	-	-	-	+
(G)	<i>Agk. saxatilis</i> : sample 20 $\mu$ g each					
	venom ( $\mu$ g)	2.5	5	10	20	40
	degree of hemorrhage venom only	++	++	+++	++	+++
	degree of hemorrhage venom and sample	±	±	++	++	+++ ++
(H)	<i>Agk. bromohoffi brevicaudus</i> : sample 20 $\mu$ g each					
	venom ( $\mu$ g)	2.5	5	10	20	40
	degree of hemorrhage venom only	++	+++ +	+++ +	+++ ++	+++ +++
	degree of hemorrhage venom and sample	-	±	++	++	+++ ++

(I)	HR-I of <i>T. flavoviridis</i> : sample 20 $\mu$ g each					
	venom ( $\mu$ g)	2.5	5	10	20	40
	degree of hemorrhage venom only	-	-	+++	+++	+++ ++
	degree of hemorrhage venom and sample	-	-	-	-	+

(J)	<i>Agk. acutus</i> : sample 20 $\mu$ g each					
	venom ( $\mu$ g)	2.5	5	10	20	40
	degree of hemorrhage venom only	+	++	+++	+++	+++ +
	degree of hemorrhage venom and sample	-	-	+	+	+++

The test of antihemorrhagic activity was performed by the subcutaneous injection chicken legs. Symbols: -, no observing hemorrhage; + ~ +++ + + + +, degree of hemorrhage dense and size.

여 37°C에서 30분간 전처리한 후 용액 0.1 ml 를 mouse 의 복강내에 주사하여 24시간까지의 致死를 조사하였다. 이때 사용한 mouse 의 체중은 15g (± 1g)이었으며 4마리를 한 群으로 하였다.

**浮腫 (edema) 측정**

全毒, HR-I 및 HR-II 일정량과 抗出血性 시료 일정량을 M/15 phosphate buffer에 용해한 후 37°C에서 30분간 전처리하여 0.05 ml를 mouse 의 pad (右後足趾)에 주사하였다. 24시간 후에 mouse를 죽인 다음 後肢의 ankle joint 부위를 절단하여 腫脹을 측정하고 buffer 혹은 venom만 주사한 true control 및 control구의 腫脹과 비교하여 그 浮腫度를 측정하였다.

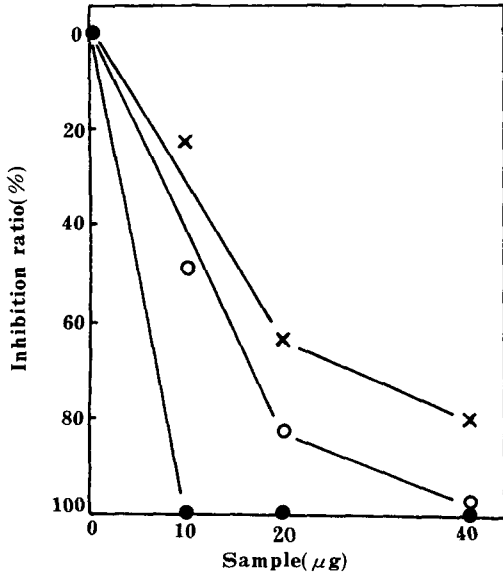
**皮内に 있어서 抗出血性의 측정**

出血毒으로서 全毒을 사용하였으며 全毒 일정량과 抗出血性 시료를 여러가지 농도별로 M/15 phosphate buffer (pH 7.17)에 용해 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 그 반응액 0.1 ml를 털을 깎은 家兔 (체중 약 3kg)의 皮内に 주사하였다. 24시간 후 토끼를 죽이고 脫皮하여 皮内に 나타나는 出血斑點의 면적을 산출하여 出血정도를 상호비교하였다.

**결 과**

**시료의 抗出血性 측정**

각종 venom과 시료를 혼합하여 37°C에서 30분간 전처리한 후 이 액 0.1 ml를 병아리 우측 대퇴부



**Fig. 3.** Inhibitory effect of the sample on hemorrhagic action of *T. flavoviridis* whole venom.

Inhibitory effect was determined by the injection in the pad of mouse. Symbols: ●-●, 2.5 μg of venom; ○-○, 5 μg of venom; ×-×, 10 μg of venom.

피하에 주사하였다. 3 시간 후 병아리를 Chloroform으로 죽이고 주사부위의 껍질을 벗긴 후 피하에 나타나는 출혈 정도를 관찰하므로써 시료의 抗出血性 정도를 측정하였다 (Table 1). Table 1에서 보는 바와 같이 본 연구에서 얻은 시료는 *T. flavoviridis* whole venom에 대해서는 동량에서 그 出血作用을 거의 완전히 저해시킬 수 있었으며 (Table 1: A, F), *T. flavoviridis* HR-I에 대해서는 1/2 량의 시료로서 HR-I의 작용을 저해할 수 있었다 (Table 1: C, J). 또 *A. acutus* venom에 대해서는 동량의 시료로서 대부분의 出血作用을 저해하나 (Table 1: K), 그 외의 *A. saxatilis*, *A. bromohoffi brevicaudus*, *A. coliginosus* venom에 대해서는 약 4 배량의 시료로서 이들의 작용을 거의 저해함을 알 수 있었다 (Table 1: D, E, G, H).

시료의 抗出血性 정량

① *Trimeresurus flavoviridis* venom에 대한 작용

*Trimeresurus flavoviridis* whole venom 2.5,

5.0, 10 μg에 시료 10, 20, 40 μg씩을 가하여 37°C에서 30분간 전처리하고 이 반응액 0.05 ml를 mouse pad에 주사하였다. 24시간 후 angle joint를 절단하여 homogenize하고 그 出血度를 total-oxy-hemoglobin法으로 측정하였다. 이때 사용한 mouse는 체중이 15 g (± 1g)이었으며, control 구는 venom만

주사한 것이며 true control 구는 buffer만 주사하였다 (Fig. 3). 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *T. flavoviridis* venom 2.5 μg에 시료 10 μg, 또는 venom 10 μg에 대해서 시료 40 μg을 첨가하였을 때 venom의 出血毒性이 80~100%까지 저해됨을 알 수 있었으며, 대체적으로 시료량에 비례해서 出血毒性의 저해가 비례됨을 알 수 있었다.

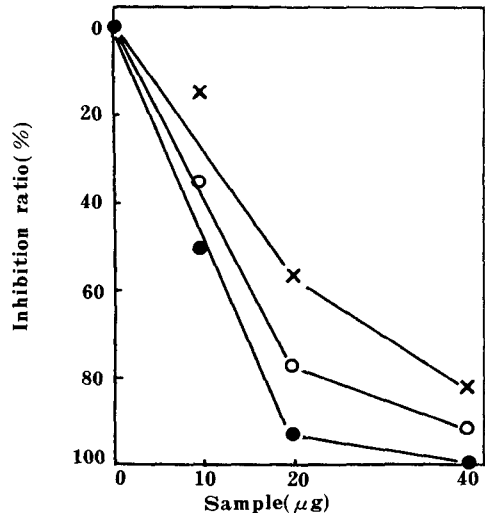
② *Agkistrodon bromohoffi brevicaudus* venom에 대한 작용

*A. bromohoffi brevicaudus* whole venom 2.5, 5.0, 10 μg에 시료 10, 20, 40 μg을 각각 가하여 *T. flavoviridis* venom의 경우와 같은 방법으로 시료의 저해능 (抗出血性)을 정량하였다 (Fig. 4).

그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 본 시료가 *T. flavoviridis* venom에서와 같이 강한 저해능은 나타내지 못하고 있으나, venom량의 8 배 정도의 시료로서 90% 이상의 비활성능을 나타내었으며, 역시 시료량에 비례하여 저해능이 나타나고 있었다.

③ HR-I에 대한 작용

*T. flavoviridis* HR-I 30 μg에 시료 10, 20, 40, 80 μg씩 그리고 HR-I 10 μg에 시료 10, 20, 40 μg씩 가하여 37°C에서 30분간 전처리한 후 *T. flavoviridis* whole venom때와 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 5 및 Fig. 6에서 보는 바와 같이 *T. flavoviridis*의 HR-I은 본 시료에 의하여 그 出



**Fig. 4.** Inhibitory effect of the sample on hemorrhagic action of *Agk. bromohoffi brevicaudus* whole venom.

Inhibitory effect was determined by the injection in the pad of mouse. Symbols: ●-●, 2.5 μg of venom; ○-○, 5 μg of venom; ×-×, 10 μg of venom.

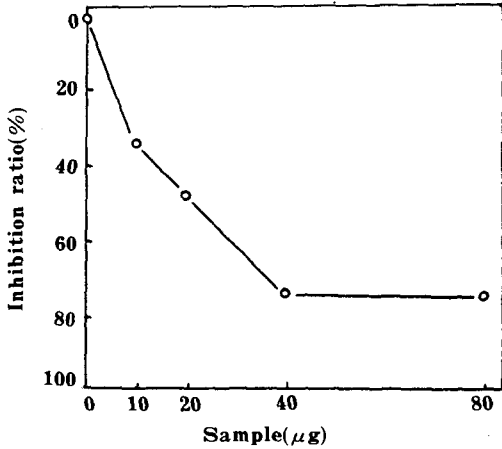


Fig. 5. Inhibitory effect of the sample on hemorrhagic activity of HR-I factor(30 μg) of *T. flavoviridis*.

血作用이 강하게 저해되며 약 4 배 정도의 시료량으로서 80% 정도 出血作用이 저해되었고, 이 경향은 whole venom을 사용했을 때와 같은 경향을 나타내고 있었다.

④ HR-II에 대한 작용

*T. flavoviridis* HR-II 5, 10, 15 μg 각각에 시료 25 μg을 가하여 37°C에서 30분간 전처리한 후 *T. flavoviridis* whole venom 때와 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과 Fig.7에서 보는 바와 같이 본 시료는 *T. flavoviridis* HR-II가 나타내는 出血活性을 강하게 저해하였다.

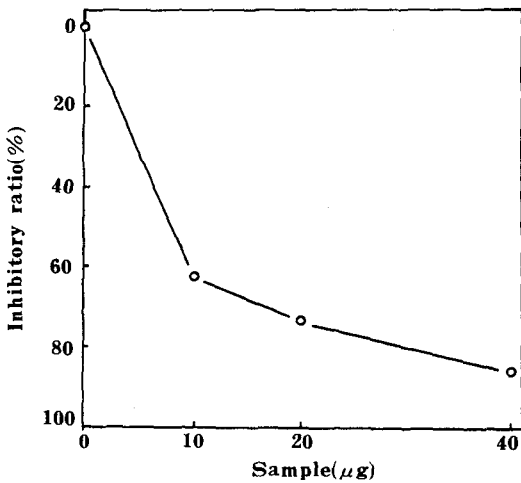


Fig. 6. Inhibitory effect of the sample on hemorrhagic activity of HR-I factor(10 μg) of *T. flavoviridis*.

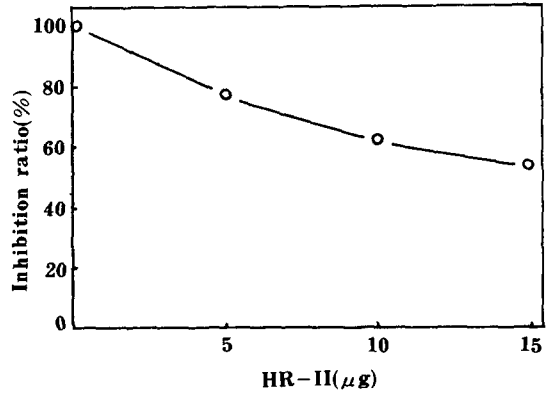


Fig. 7. Inhibitory effect of the sample(25 μg) on hemorrhagic activity of HR-II factor of *T. flavoviridis*.

시료의 抗致死性 조사

① *T. flavoviridis* venom에 대한 작용

*T. flavoviridis* venom 50~500 μg에 시료를 150~1,500 μg 가하여 37°C에서 30분간 전처리한 다음, 0.1 ml를 mouse의 복강내에 주사하고 24시간 동안 mouse의 致死를 조사하여 *T. flavoviridis* venom에 대한 시료의 抗致死性 결과를 조사하였다(Table 2). 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 본 시료는 *T. flavoviridis* whole venom의 致死活性도 비교적 강하게 저해하여 venom량에 대해서 약 7 배량의 시료를 적용하였을때 mouse에 대한 致死量의 약 3배 가량의 venom을 비활성화시킬 수 있었다.

② HR-I에 대한 작용

*T. flavoviridis* HR-I 50~400 μg에 시료를 200~400 μg 가하여 whole venom에서와 같은 방법으로 시료의 抗致死性 효과를 조사하였다(Table 3). 그 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 본 시료가 *T. fl-*

Table 2. Inhibitory activity of the sample on lethality of *T. flavoviridis* whole venom

venom (μg)	50	70	100	200	500
0	○ ○ ○ ○	○ ○ ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
150		○ ○ ○ ○			
300			○ ○ ○ ○		
600				○ ○ ● ●	
1500					● ● ● ●

These results were recorded up to 24 hours after injection and the mouse weight was 15g. Symbols ; ○, alive; ●, dead.

**Table 3. Inhibitory effect of the sample on HR-I of *T. flavoviridis* lethality**

venom ( $\mu\text{g}$ ) sample ( $\mu\text{g}$ )	50	100	150	200
0	○○●●	●●●●	●●●●	●●●●
200	○○○○	○○○○	●●●●	●●●●
400	○○○○	○○○○	○●●●	●●●●

These results were recorded up to 24 hours after injection and the mouse weight was 15g. Symbols: ○, alived; ●, dead.

*avoviridis* whole venom의 경우와 마찬가지로 HR-I의 致死活性에도 유효하게 작용하여 비활성화시키며, 양만 충분히 작용한다면 치사량의 數倍까지도 비활성화시킬 수 있을 것으로 추측되었다.

시료의 抗 edema활성 측정

① *T. flavoviridis*와 *A. bromohoffi brevicaudus* venom에 대한 작용

*T. flavoviridis*와 *A. bromohoffi brevicaudus* whole venom 2.5, 5.0, 10.0  $\mu\text{g}$ 에 시료의 일정량을 각각 가하여 37°C에서 30분간 전처리한 후 그 반응액 0.05 ml를 mouse pad에 주사하고, 24시간 후 angle joint를 절단하여 그 중량을 측정하였다. 이때 대조구로서는 venom만 주사하였고, true control로서는 buffer만 주사하였으며, 체중 20 g( $\pm 1.0$  g)의 mouse 4마리를 1群으로 사용하였다. 그 결과 Table 4와 5에서 보는 바와 같이 본 시료는 *A. bromohoffi brevicaudus* whole venom의 edema활성은 아주 강하게 저해하고 있으나, *T. flavoviridis* whole venom의 edema활성에 대해서는 한정된 효과밖에 나타내지 못하였다.

② HR-I에 대한 작용

*T. flavoviridis* HR-I 30 $\mu\text{g}$ 에 시료를 10~80  $\mu\text{g}$ 가 하여 whole venom에서와 같은 방법으로 측정하였다. 이때 체중 15 g( $\pm 1$  g)의 mouse 4마리를 한 test群

**Table 4. Inhibitory effect of the sample on edema activity of *T. flavoviridis* whole venom**

venom venom ( $\mu\text{g}$ ) sample ( $\mu\text{g}$ )	<i>Trimeresulus flavoviridis</i>		
	2.5	5.0	10.0
0	135 %	142 %	155 %
10	120	134	130
20	124	120	131
40	115	115	117

The inhibitory effect was determined by injection in mouse pad.

**Table 5. Inhibitory effect of the sample on edema activity of *Agk. bromohoffi brevicaudus* whole venom**

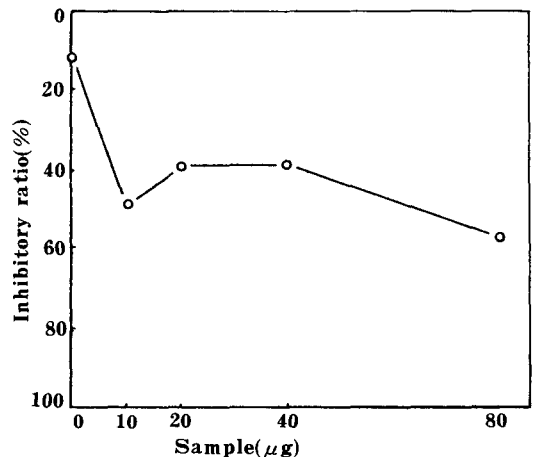
venom venom ( $\mu\text{g}$ ) sample ( $\mu\text{g}$ )	<i>Agkistrodon bromohoffi brevicaudus</i>		
	2.5	5.0	10.0
0	121 %	132 %	139 %
10	110	112	108
20	100	100	112
40	100	104	114

The inhibitory effect was determined by injection in mouse pad.

으로 하였다. 그 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 본 시료는 HR-II의 edema활성의 약 50%는 극소량의 시료(1/3량 이하)에 의해서 저해되나 잔존 edema활성은 시료량에 무관하게 저해되지 않음을 알았는데, 이는 HR-II가 가지고 있는 edema활성 인자가 적어도 複數로 존재함을 추측케하여 매우 흥미로운 일이라고 생각된다.

③ HR-II에 대한 작용

*T. flavoviridis* HR-II 5, 10, 15  $\mu\text{g}$ 에 시료 25  $\mu\text{g}$ 을 가하여 whole venom에서와 같은 방법으로 측정하였다. 이때 체중 15 g( $\pm 1$  g)의 mouse 4마리를 한 test群으로 하였다. 그 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 본 시료를 HR-II에 대해서 5, 2.5 및 1.7 배량을 첨가하여도 HR-II가 나타내는 edema활성을 약 30~40% 정도밖에 저해하지 못하고 있다. 이것은 edema인자의 구조상으로 활성부위가 複數로 존재하거나 혹은 HR-II에 edema인자가 복수로 존재하고 있다고 해석되어 더 검토해 볼 문제라 생각



**Fig. 8. Inhibitory effect of the sample on edema activity of HR-I factor(30 $\mu\text{g}$ ) of *T. flavoviridis*.**

**Table 6. Inhibitory effect of sample on edema activity of HR-II of *T. flavoviridis***

Sample	25 $\mu$ g each		
	5 $\mu$ g	10 $\mu$ g	15 $\mu$ g
HR-II			
Inhibition ratio on edema	39.0 %	41.5 %	30.0 %

된다.

**皮内に 있어서 抗出血性の 측정**

*T. flavoviridis* venom 일정량과 시료 일정량을 여러가지 농도별로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 그 반응액 0.1 ml를 토끼의 皮内に 주사하고, 24시간 후 脫皮하여 皮内に 나타나는 出血斑點의 면적을 상호비교하였다. 이때 대조구는 venom만을 주사하였으며, 결과는 2 회반복의 평균치이다(Table 7). 그 결과 Table 7에서 보는 바와 같이 토끼의 皮内반응에서도 시료의 활성이 나타났으나 그 出血活性의 저해작용은 단순하지 않음을 알 수 있었다. 즉 일련의 조정제 과정을 거친 시료는 병아리 皮下 및 mouse의 足趾内 주사에서는 각 venom의 出血作用을 강하게 저해하였으나 토끼의 皮内 주사에 있어서는 거의 저해효과를 나타내지 못하였고, 정제가 별로 되지 않은 粗시료에서는 상당히 강한 활성을 나타내고 있었다.

**Table 7. The relative inhibitory activity of the different fraction of samples on the hemorrhagic action of *T. flavoviridis* whole venom**

Sample amount ( $\mu$ g)	Sample fraction venom ( $\mu$ g)	Aceton ppt'd sample**	Final sample
		1.0	1.0
0		100*	100*
1.0		70.7	124.9
5.0		68.4	89.1
10.0		5.3	60.7
20.0		0	-

\* The hemorrhagic activity was determined by the intracutaneous injection on rabbit and the hemorrhage was compared with relative size of hemorrhaging area.

\*\*Aceton ppt'd sample: evaporated culture broth and precipitated with acetone.

**고 찰**

蛇毒의 독작용은 신경독과 출혈독(혈관독)으로 대별할 수 있으며 前者는 *Elapidae* 및 *Hydrophidae* 科 사독의 主毒이고, 後者は *Colubridae* 科 사독의

主毒이라고 밝혀져 있다<sup>(1)</sup>. *Colubridae* 科의 사독에는 출혈독을 위시하여 조직괴사독 및 浮腫을 일으키는 성분이 혼재하여 독작용의 주원인이 되고 있다<sup>(7,19)</sup>. 이 출혈독, 조직괴사독, 부중에 관계하는 성분에는 대해서는 그동안 많은 연구가 이루어졌으나, 아직 성분의 단리에 미흡한 점이 많으며 그 개개의 작용 mechanism에 대해서도 별로 밝혀져 있지 못하다. 특히 우리나라 살무사 科 사독에 대해서는 proteinase 활성이 강한 蝮분과 출혈독에 대한 약간의 연구<sup>(8)</sup>밖에 없는 실정이므로 서론에서 언급한 바와 같이 본인은 이미 우리나라 사독중 proteinase 활성을 거의 100% 저해할 수 있는 물질을 분리동정한 바 있다<sup>(16,17,18)</sup>. 본 연구에서는 출혈독을 비활성화시키는 물질을 역시 미생물로부터 얻어 이 물질이 사독에 미치는 영향을 연구하였다. 본 물질은 *Aspergillus* 속의 한 균주가 생산하는 것으로서 통상적인 배양방법으로 얻을 수 있으나, 이의 정제에 있어서는 통상적인 생화학적 수법으로서 좋은 결과를 얻지 못하였다. 즉 Fig. 1 및 Fig. 2의 방법으로 부분적인 결정을 얻을 수 있었으나 일단 형성된 결정도 과량의 acetone으로 다시 非結晶化되었으며, alcohol류를 사용했을 때는 본 물질의 일부가 실패되었고, 그의 용매로서는 부분적인 정제마저 불가능하였다. 부분적으로 정제된 시료가 나타내는 抗出血性を 보면 *Colubridae* 科에 속하는 여러 독사의 출혈독을 강하게 저해하였으며 (Table 1) 특히 효과가 큰 것은 *T. flavoviridis*의 全毒이지만, HR-I 毒量의 약 1/2량의 시료로서 출혈활성이 대부분 실패되었다.

이때 HR-I이 全毒에 비해 더 강하게 저해되는 것은 출혈독의 co-worker 기능을 가진 단백질분해 활성인자와 浮腫인자가 제거된 상태라고 믿어진다. 우리나라의 2종의 사독 및 *A. acutus* 사독에 대해서는 *T. flavoviridis* 사독과 비교해서 약하게 저해되었으며, 특히 우리나라의 *A. bromhoffi brevicaudus*에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. 한편 mouse의 pad에 주사하여 항출혈성을 정량적으로 측정해 본 결과 Fig. 3~6에서 보는 바와 같이 *T. flavoviridis*에서나 *A. bromhoffi brevicaudus*에서 다 같이 강한 저해효과를 나타내었으며, 특히 정량적으로 작용하고 있으므로 본 시료의 활성을 더욱 정확하게 확인할 수 있었다.

여기서 얻은 결과를 전술한 병아리 피하출혈반응의 결과 (Table 1)와 비교해 볼때 사독의 종류에 따른 결과의 불일치가 다소 있는 것은 동물의 종류와 작용하는 부위의 차라고 생각된다. 원래 *Colubridae* 科의 *T. flavoviridis* 사독의 치사활성은 출혈독



에서 주로 나타나고 있는데, 본 시료가 사독의 치사활성에 미치는 영향은 Table 1의 A, C, F, J 와 Fig. 3, 5, 6에서 보는 바와 같이 皮下반응의 경우 venom과 동일량의 수준에서는 거의 완전하게 출혈 독을 저해하고 있으나, mouse의 조직내 반응에 있어서는 10배량에서 80% 수준의 저해를 나타내고 있으며 치사활성도 후자의 경우와 같은 경향을 나타내고 있다. 이러한 현상을 규명한다면 사독의 각 부위에 있어서의 작용 mechanism을 밝힐 수 있을 것이며, 출혈활성을 나타내기 위해서는 작용하는 생체부위에 따라 서로 다른 활성부위가 있을 것으로 추측된다. 이런 점에 대한 연구는 본 시료와 같은 specific inhibitor가 없이는 규명할 수 없는 것이며 이에 관련한 문제는 추후에 더 연구하고자 한다. 또 본 시료가 사독의 浮腫작용에 미치는 효과를 보면 Table 5에서 보는 바와 같이 *A. bromohoffi brevicaudus* 全毒의 浮腫활성에는 정량적으로 작용하여 거의 100% 저해시킬 수 있으나 *T. flavoviridis* 사독에 대해서는 일정 수준 밖에 저해하지 못하고 있다 (Table 4). 이것은 Fig. 8 과 Table 6에 나타나 있는 *T. flavoviridis* HR-I 및 HR-II에서도 같은 경향을 나타내고 있다.

이 이유는 HR-I 과 HR-II의 浮腫활성부위의 구조상 특징때문에 완전히 실활되지 않고 부분적으로 불활성화 된다고 해석되며, 부분의 아미노산 배열을 결정해 봄으로서 사독뿐만 아니라 독성 단백질의 작용 해명에 크게 도움이 될 것으로 사료된다.

이상 중요한 작용에 대해 고찰하였으나 이와같은 inhibitor를 사독 뿐만 아니라 미생물성 독소에 까지 적용해 볼 필요성이 있다고 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 토양으로 부터 분리한 *Aspergillus* 속의 한 균주가 *Colubridae*科 독사의 사독 주성분인 출혈독을 강하게 불활성화 시키는 물질을 생성하므로 이 물질을 분리한 후 부분적으로 정제하여 結晶이 형성됨을 확인하였다. 본 물질은 *Colubridae*科의 *Agkistrodon bromohoffi brevicaudus*, *A. saxatilis*, *Trimersurus flavoviridis*, *A. acutus* 사독의 출혈독을 정량적으로 불활성화 시키며, 최대 저해율은 80~90%에 이르며, 실험한 대상 동물에 따라 활성차이가 다소 있음이 인정되었다. 예로서 병아리 皮下반응에 있어서는 *T. flavoviridis* 사독을 동량의 시료로서 처리하였을때 완전히 출혈활성이 저해되나 mouse 足趾 조직내 반응에서는 사독의 8배량의 시료로서 출혈활성이 거의 저해되었다. 또 본 시료는 출혈독이 지니고 있는 치사활성에 있어

서도 독량의 약 3배량의 시료에 의해서 거의 치사활성을 저해하며, *T. flavoviridis* 사독의 HR-I 및 HR-II의 浮腫활성에 대해서는 본 물질의 1/2 량 이상의 농도에서는 시료농도에 관계없이 약 50% 정도로 저해하는 반면 *A. bromohoffi brevicaudus* 全毒의 浮腫은 거의 완전히 저해하였다. 사용 균은 2종의 항출혈성 물질을 생성하고 있음이 家兔皮内 반응에서 확인되었다.

## 사 사

본 연구는 1984년도 한국과학재단의 연구조성비에 의하여 이루어졌으며 관계하신 여러분께 깊은 감사를 드리는 바입니다.

## 참고문헌

1. Anthony, T.T.: Venoms—chemistry and molecular biology, A wiley-interscience publication, New York, 1st ed., (1977).
2. Nandor, P.: *Science*, **117**, 47 (1953).
3. Anthony, T.T., P.J. Gordon and C. Azucena: *Toxicon*, **3**, 5 (1965).
4. Gloyd, H.K.: *Proc. Biol. Soc.*, **85**, 557 (1972).
5. Sawai, Y.: *The Snake*, **7**, 40 (1972).
6. Sawai, Y. and K.Y. Lah: *The Snake*, **9**, 39 (1978).
7. Oshima, G., S.T. Omori, S. Iwanaga and T. Suzuki: *J. Biochem.*, **72**, 1483 (1972).
8. Seu, J.H. and K.S. Kwon: In press.
9. Seth, S.D.S., R.B. Arona and J.S. Guleria: *J. Exp. Biol.*, **19**, 181 (1971).
10. Goucher, C.R. and H.H. Flower: *Toxicon*, **2**, 193 (1964).
11. Sawai, Y., Y. Kawamura, T. Fukuyama and H.L. Keegan: *Jap. J. Exp. Med.*, **37**, 125 (1967).
12. Seu, J.H.: Studies on the snake venoms, Research Report of Kyungpook University, Taegu, Korea (1974).
13. Kurihara, N. and K. Shibata: *Jap. J. Pharmacol.*, **21**, 253 (1971).
14. Sawai, Y., M. Makino and Z. Kawamura: *Minophagen. Med. Rev.*, **6**, 78 (1961).
15. Suzuki, Y.: *The Snake*, **2**, 75 (1970).
16. Seu, J.H. and D.H. Yi: *The Snake*, **11**, 184 (1979).
17. Seu, J.H. and Y. Sawai: *The Snake*, **13**, 38 (1981).
18. Seu, J.H. and Y. Sawai: *The Snake*, **13**, 99 (1981).
19. Omori, S.T. and A. Ohsaka: *Biochem. Biophys. Acta.*, **207**, 432 (1970).
20. Takahashi, T. and A. Ohsaka: *Biochem. Biophys. Acta.*, **207**, 65 (1970).