

구름버섯 기원 항응고성 다당류의 혈액응고 저해기작

이현순 · 권미향 · 임왕진 · 성하진* · 양한철*
고려대학교 생명공학연구소, *고려대학교 생명공학원

Inhibitory Mechanism of Blood Coagulation by the Anticoagulant Polysaccharide from *Coriolus versicolor*

Hyun-Sun Lee, Mee-Hyang Kweon, Wang-Jin Lim,
Ha-Chin Sung* and Han-Chul Yang*
Institute of Biotechnology, Korea University
*Graduate School of Biotechnology, Korea University

Abstract

Inhibitory mechanism of the anticoagulant polysaccharide purified from the fruit body of *Coriolus versicolor* was investigated in this paper. The anticoagulant polysaccharide (CV-40-Va-1) was proposed to have functions of the inhibition of intrinsic pathway in the blood coagulation pathway together with the interruption of a human platelet aggregation induced by von Willebrand factor (vWF). CV-40-Va-I inhibited other factors of the coagulation cascade such as factor VIII, IX, and as well as thrombin. Especially, CV-40-Va-I inhibited the fibrin formation mediated by thrombin, however the polysaccharide did not affect the fibrin formation directly but affected the anticoagulant activity through the activation of antithrombin III. The sulfation of the anticoagulant polysaccharide increased the anticoagulant activity, showing that the sulfate concentration of anticoagulant polysaccharide was important factor in the blood coagulation cascade. Low molecular weight sub-fraction (MW 1,000) obtained by partial hydrolysis of the CV-40-Va-1 generated potent antiplatelet activity, but showed decreased anticoagulant activity.

Key words: anticoagulant mechanism, thrombin, aggregation, *Coriolus versicolor*

서 론

혈관내 혈액응고는 생성된 fibrin들의 응집에 의하여 hard clot 즉 혈전으로 전환되는데 체내의 불필요한 혈전생성은 뇌출혈, 심부전, 심근경색, 동맥경화, 고혈압 등의 혈관계 질환을 일으킬 수 있다⁽¹⁾. 천연물중에서 혈전의 생성을 억제하고 혈전을 용해하는 생리활성물질의 개발이 기대되는데 식물체중의 몇가지 플라보노이드 배당체들이 혈전을 용해할 수 있으며⁽²⁾, 미생물 대사물에서 분리된 수종의 peptide성분의 혈액응고 저해효과⁽³⁾가 알려지고 있다. 또한 heparin과 같이 다당류들의 항응고활성에 관한 연구도 활발히 진행되어 왔는데 이 들은 생약제제에서 분리되는 산성다당류⁽⁴⁾와 해조류들에서 분리되는 함황성다당류들인 fucoi-

dan들⁽⁵⁾로 대별될 수 있다.

혈액응고 저해제로서 임상적으로 널리 사용되는 heparin은 혈액의 응고기작 중에서 내인성 경로의 prothrombin activator 형성을 억제하여 thrombin 생성을 억제하거나 이미 형성된 thrombin의 저해제인 antithrombin III나 heparin cofactor II의 활성을 증가시킴으로써 매우 강력한 항응고 활성을 나타낸다⁽⁶⁾. 최근 보고에 따르면, antithrombin III는 혈액 응고 과정에 관여하는 factor중 serine proteinase (factor VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, Kallikreine, thrombin)도 함께 억제하나, heparin cofactor II는 단지 thrombin만을 억제하며 heparin과 함께 heparin cofactor II가 antithrombin III와 같은 정도의 thrombin 억제를 하기 위해서는 10배 이상의 heparin 농도가 필요한 것으로 알려지고 있다⁽⁷⁾. Heparin은 serine proteinase에 직접 작용하여 항응고 활성을 나타내지는 못하나 antithrombin III와 결합하여 antithrombin III의 활성을 증폭시켜 강력한 항응고

Corresponding author: Han-Chul Yang, Graduate School of Biotechnology, Korea University, 5-1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 현재까지 heparin과 antithrombin III의 결합 부위는 정확히 밝혀지지는 않았지만 heparin의 negative charge (sulfate)와 antithrombin III의 Lys-Arg 잔기 사이에서의 electrostatic interaction에 의한 결합이라고 보고되고 있다⁷⁾. 그밖에 해조류 유래의 fucoidan들의 항응고기작 및 작용부위에 관한 한정된 보고⁸⁾가 있으나 아직 이들에 대해 명확히 밝혀지지는 않고 있다.

최근 저자들은 구름버섯의 자실체에서 항응고성 다당류(CV-40-Va-1)을 분리하여 전보에서 보고한⁹⁾ 바 있는데 이 다당은 heparin과 같이 혈액응고계에서 주로 내인성 경로와 공통경로를 통하여 혈액의 응고를 저해하여 activated partial thromboplastin time (aPTT)과 thrombin time (TT)에서 높은 항응고활성을 나타내었다⁹⁾. CV-40-Va-1은 함황성다당체로서 주구성당으로 fucose, mannose, glucose들이 함유되었으나 산성당은 함유하지 않았으며, heparin과 fucoidan들보다 고분자체의 다당류(MW 7.2×10^5 Da)로 확인되었다. 본 연구에서는 CV-40-Va-1의 항응고기작을 검토하기 위하여 혈액응고계에서의 작용특성과 다당의 구조수식에 의한 활성변화를 조사하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에 사용한 구름버섯 유래 항응고성다당류(CV-40-Va-1)은 본 연구실에서 정제된 것을 사용하였으며 혈소판 응집능 검사용 시약과 항응고용 시약은 Dade Diagnostics of P.R. Inc. (U.S.A.)사, thrombin과 fibrinogen은 Sigma사에서 구입하였다. 항응고 활성 측정시 이용되는 혈장(platelet pool plasma, platelet rich plasma)은 고려대학교 부속병원 혈액원에서 구입하였고 그 외 기타 시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

혈소판 응집 억제능 검사(Platelet aggregation test)

정상인의 정맥혈로부터 혈소판수가 50,000/μL이 아닌 platelet pool plasma (PPP)와 150,000-250,000/μL인 platelet rich plasma (PRP)를 제조한 후 PPP를 100% 응집한 base line으로, 구름버섯 항응고성다당(CV-40-Va-1)을 PRP에 100 μg/mL의 농도로 용해시킨 PRP를 0% 응집된 base line으로 설정하였다. CV-40-Va-1을 함유한 PRP 450 μL를 silicon 처리된 glass cuvette에 magnetic bar와 함께 넣은 후 ADP (2.0 μM), collagen (0.19 mg/mL), epinephrin (1.0 mg/mL), ristocetin (1.2 mg/mL)의 응집원을 각각 50 μL씩 첨가한 후 platelet

aggregator (BIO/DATA coporation (Model PAP-4C) U.S.A.)를 이용하여 혈소판 응집억제능을 측정하였다.

항응고활성 측정

항응고활성은 activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT) 및 thrombin time (TT)을 이용하여 전보의 방법⁹⁾에 준하여 측정하였다.

Factor assay

항응고성다당 CV-40-Va-1의 혈액응고 저해기작중 작용 부위를 알아보기 위하여 정제다당(CV-40-Va-1)을 100 μg/mL 농도로 platelet pool plasma에 용해한 후 서울 의과학 연구소(SCL)에서 ACL-3000과 Coasuper를 이용하여, 외인계 인자(Factor II, V, VII, X)들은 PT측정법을, 내인계 인자(Factor VIII, IX, XI, XII)들은 aPTT법을 통하여²⁰⁾ 실시하였다.

Thrombin 저해양식 조사

항응고성다당 CV-40-Va-1의 thrombin에 대한 저해양식을 조사하기 위하여 순수 fibrinogen (1.5 mg/mL) 1.0 mL, thrombin (0.5 unit) 용액 0.1 mL, 시료(CV-40-Va-1) 용액 0.1 mL을 함유한 혼합액을 37°C에서 5분간 반응시킨 후 350 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다당의 sulfation과 desulfation

항응고성다당 10 mg을 2 mL의 무수 pyridine으로 3회 탈수하여 20 mL의 pyridine에 분산시킨 후, chlorosulfonic acid-pyridine (20 mL의 distilled pyridine에 3 mL의 ClSO₃H)을 가해 교반하면서 90분 동안 가열 환류 후 원심분리하여 얻은 잔사에서 에탄올침전하여 sulfated polysaccharide를 얻었다¹⁰⁾. 다당의 desulfation¹¹⁾은 10%의 물이 함유된 DMSO (dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 100°C에서 7시간 반응시키고 동량의 증류수로 희석한 다음 0.1 M NaOH를 이용하여 pH 9로 조정한 후 투석, 동결건조하여 시료로 사용하였다. 각각의 시료에 대하여 IR 분석(FT-IR spectrophotometer, BOMEM Michelson Series MB 102-C15)과 황산기의 화학정량후 항응고활성을 측정하였다.

항응고성 다당의 부분 가수분해

항응고성 다당(CV-40-Va-1) 10 mg을 50 mM TFA에 용해한 후 100°C에서 2시간 가수분해하였다. 감압 건조하여 TFA를 제거한 다음 DW로 평형화된 Sephadex G-25 column (2.0×28 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 4°C에서 겔여과 크로마토그래피를 행하여 2개의

획분으로 나는 후 각 획분에 대하여 항응고활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

항응고성 다당(CV-40-Va-1)의 혈소판 응집계에서의 작용

혈액응고계에서 혈소판은 복잡한 내부 구조를 갖는 미세한 혈중 세포로서 여러 자극에 의해 손상된 내피에 부착(adhesiveness) 또는 혈소판 자체끼리의 응집(aggregation)을 일으키면서 platelet plug를 형성한다⁽¹²⁾. 그리고 비정상적인 혈소판의 활성화는 혈소판 응괴 및 혈전 생성을 초래하며 특히 심근경색 및 뇌혈전증에서는 혈소판 응괴가 직접적인 원인이 되어 혈전 생성을 초래하게 된다⁽¹²⁾. 최근 대표적 항응고제로 알려진 heparin이 저분자로 존재시 항혈소판 활성을 나타낸다는 보고⁽¹³⁾에 따라 먼저 구름버섯에서 분리한⁽⁹⁾ 내인성 경로에 작용하는 항응고성 다당류인 CV-40-Va-1의 혈소판 응집능을 조사해 보았다. Fig. 1에서의 결과와같이 CV-40-Va-1에 혈소판 응집 야기물질로 알려진 ADP (adenosine diphosphate), collagen, epinephrin, ristocetin을 첨가시 ADP, collagen, epinephrin에서는 정상적 응집능을 나타내었으나 ristocetin은 정상적인 혈소판의 응집이 저해되는 것으로 나타났다. 이것은 CV-40-Va-1이 혈소판 응집 자체는 억제하지 못하나 응집된 혈소판이 혈관벽에 부착하여 plug를 형성하는데 필요한 von Willebrand factor (vWF)의 활성을 저해함을 의미한다⁽¹⁴⁾. vWF는 혈액응고 과정에서 factor VIII를 운반하거나 혈소판 점착능을 가지고 있는 factor로 Val 449와 Lys 728 사이의 잔기에 heparin-binding site를 가지고 있다고 보고되어 있는데⁽¹⁵⁾ Fig. 1의 결과에서 CV-40-

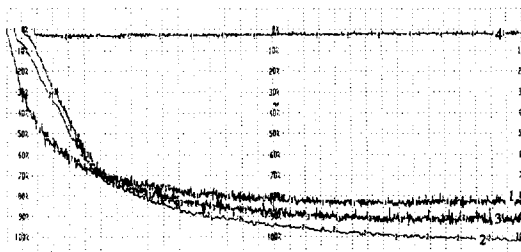
Va-1이 heparin-binding site에 직접 결합하는지는 알 수 없었으나 vWF의 활성을 저해함으로써 활성화된 혈소판의 응집속도를 낮추거나⁽¹⁴⁾ 혈소판의 혈관점착을 억제하는 것으로 추정된다.

CV-40-Va-1의 혈액응고계에서의 작용부위

항응고성다당 CV-40-Va-1는 혈액응고 저해기작중 내인성경로와 공통경로를 통해 항응고 활성을 나타내었으므로⁽⁹⁾ 내인성 경로에 관여하는 응고인자중 특히 어느 단계에 작용하는지 알아보기 위하여 factor assay를 실시하였다. Table 1의 결과에서 구름버섯 유래 항응고성 정제 다당(CV-40-Va-1)은 phospholipid 의존성의 lupus anticoagulant Ab의 활성에 영향을 주지 않았으나, 응고 과정에서 혈액응고 내인성경로의 factor VIII, IX, XI, XII의 활성을 억제함을 알 수 있었다.

CV-40-Va-1의 thrombin에 대한 저해양식

항활성 다당인 heparin은 내인성 경로의 응고인자중 factor X 과 공통경로에서의 응고인자인 thrombin 모두에 작용하여 강력한 항응고력을 갖지만 직접 이 응고 인자에 작용하지는 않고 이미 존재하고 있는 항응고제인 antithrombin III (AC III)의 활성을 증폭시켜 항응고력을 갖는다⁽⁶⁾. 이에 반해 거머리에서 분리한 hirudin은 65~66개의 amino acid로 구성된 단백질로 thrombin에 직접 작용하여 항응고활성을 나타낸다고 보고되었다⁽¹⁵⁾. 전보⁽⁹⁾에 의하면 CV-40-Va-1은 농도에 비례하여 thrombin time이 증가하는 경향을 보였으며, Table 1에 의하면 thrombin 이외에도 내인성 경로의 여러 factor들에도 작용하는 것으로 나타났다. 따라서 CV-40-Va-1의 thrombin 저해활성이 hirudin과 같이 직접적인지 heparin의 경우와 같이 AC III 의존성 활성인지를 검토하기 위하여 plasma에 존재하는 AT III의 활성을 증폭시키는 지 확인하고자 순수 정제된 fibrinogen을 기질로하여 thrombin에 대한 저해효과를 heparin과 함께 측정하였을때(Table 2) CV-40-Va-1은



Comment	Aggregation(%)
1. ADP	83
2. Collagen	101
3. Epinephrin	93
4. Ristocetin	03

Fig. 1. Blood platelet aggregation test profile of CV-40-Va-1 from *Coriolus versicolor*.

Table 1. Factor assay of anticoagulant CV-40-Va-1 from *Coriolus versicolor*

Factor assay	Activity	Reference range	Unit
Lupus anticoagulant Ab	1.034	0.76~1.23	-
Factor VIII	23	60~140	%
Factor IX	30	60~140	%
Factor X	155	60~140	%
Factor XI	33	60~140	%
Factor XII	55	60~140	%
Fibronectin	175	200~400	g/mL

Table 2. Effect of CV-40-Va-1 and heparin on fibrin formation

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Turbidity (350 nm)
Heparin	25	0.12
	50	0.11
	100	0.10
CV-40-Va-1	100	0.16
	250	0.18
	500	0.19
	750	0.16
	1000	0.12

heparin과 유사하게 실험한 시료농도의 범위에서 350 nm의 흡광도 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 이것은 구름버섯 유래 항응고성다당이 heparin처럼 AC III가 존재하지 않은 상태에서는 직접적으로는 thrombin에 작용하지 못함을 의미하는 것이다. Factor assay와 thrombin의 저해 양식을 고려해 볼 때 CV-40-Va-1의 항응고 활성은 CV-40-Va-1에 의하여 antithrombin III가 활성화되어 혈액 응고 인자중 serine proteinase의 활성이 저해됨으로써 나타나는 결과로 해석되었다.

구름버섯 정제 다당의 화학적 구조 수식에 의한 활성 변화

Heparin과 항응고성 fucoidan들의 항응고 활성이 다당들의 황산기 함량과의 상관성에 관한 보고가 있어 왔으므로⁽¹⁶⁾ CV-40-Va-1의 항응고활성에서 황산기의 역할을 검토하기 위하여 다당을 각각 sulfation과 desulfation시킨 후에 활성의 변화를 관찰하였다. 각각의 시료의 황산기 분포를 IR 분석을 통하여 확인한 결과(Fig. 2), 모든 다당에서 820 cm^{-1} 과 859 cm^{-1} 부근의 C-O-S의 흡수 band는 거의 변하지 않았으나 1257.0

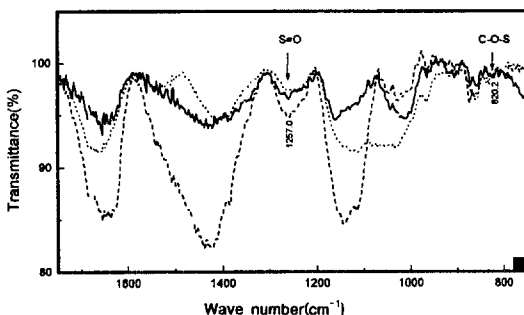


Fig. 2. FT-IR spectra of native, sulfated or desulfated anticoagulant polysaccharide CV-40-Va-1. —: Native CV-40-Va-1, ---: Desulfated CV-40-Va-1, ...: Sulfated CV-40-Va-1.

Table 3. Changes in the anticoagulant activity and the sulfate content of CV-40-Va-1 by sulfation or desulfation

	CV-40-Va-1	Sulfated	Desulfated
		CV-40-Va-1	CV-40-Va-1
Anticoagulant activity ¹⁾ (%)	aPTT	90.5	86.0
	PT	18.8	15.0
	TT	35.9	30.5
Sulfate content (%)	18.9	34.0	16.9

¹⁾Each anticoagulant activity of the polysaccharides was estimated at concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$.

cm^{-1} 부근의 S=O에서는 sulfation과 desulfation에 따른 흡수 band의 변화를 확인 할 수 있었다. 시료의 황산기 함량은 구조수식전의 모다당이 18.9%인데 sulfation시 34%로 증가하였으나 desulfation의 경우 16.9%로 크게 감소하지는 않았다(Table 3). 각각의 항응고 활성을 구조수식전의 모다당과 비교하였을 때, sulfation시 aPTT는 대조군에 비해 129%로 증가하였으며 TT와 PT의 활성도 약간 증가하는 경향을 보였다. 완전한 desulfation에 의하여 항응고활성이 좀더 감소할 것으로 예측되었으나 Table 3에서와 같이 충분한 desulfation이 이루어지지 못한 결과로 항응고활성이 크게 감소하지 않은 것으로 나타났다. 그러나 구름버섯의 항응고성 정제다당 역시 heparin이나 다른 함황성다당들과 마찬가지로 항응고활성에서 황산기가 관여하는 것으로 사료되었다.

정제다당의 분자량에 따른 활성 변화

항응고 물질의 분자량과 활성과의 상관성에 관한 보고에 의하면⁽¹⁷⁾ 분자량 감소는 anti-thrombin 활성이나 anti-factor Xa의 활성을 증가시킬 수 있으나 thrombin에 의한 fibrin 형성을 억제하기 위해서는 최소한의 분자량이 30,000이라고 하였다. 일반적인 heparin을 화학적이나 효소적으로 가수분해하여 평균 분자량이 4,000~5,000 정도인 저분자 heparin은 표준 heparin에 비해 anti-factor Xa과 anti-thrombin의 활성비가 1:1에서 2:1 또는 4:1로 변화하는데, 즉 heparin의 분자량 감소에 따라 factor Xa에 대한 항응고 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 이외에도 native heparin에 비해 체내 반감기의 증가 및 혈소판 응집억제능을 발휘하여 장기 투여시 출혈에 대한 안전성등이 증가에 관한 연구도 보고된 바 있다⁽¹⁸⁾. 7.2×10^5 정도의 고분자로 추정되는⁽⁹⁾ CV-40-Va-1의 분자량 감소에 따른 항응고활성 변화를 검토하고자 정제다당 10 mg을 50 mM의 TFA로 부분 가수분해 한후 Sephadex G-25에 용출시

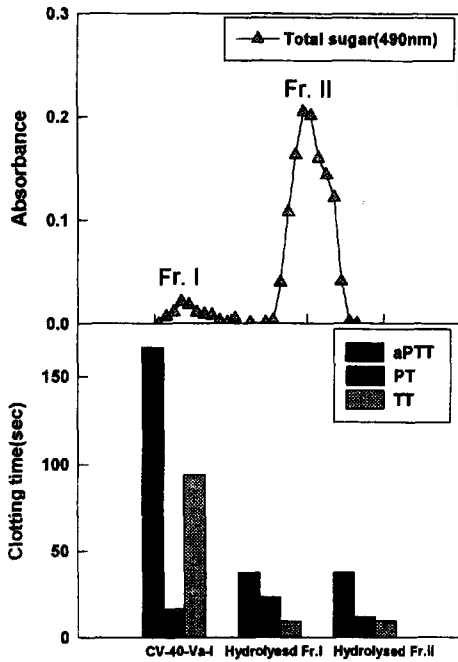
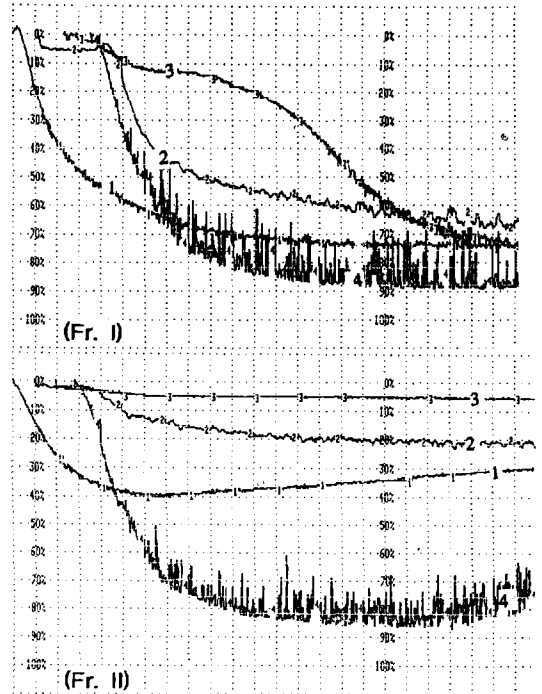


Fig. 3. Sephadex G-25 chromatography of CV-40-Va-1 hydrolysate and anticoagulant activity of native or hydrolysed CV-40-Va-I. The column (2.0×28 cm) of Sephadex G-25 was eluted with water at flow rate of 0.2 mL/min and the anticoagulant activity of each sample was estimated at concentration of 250 µg/mL.

켜 2개의획분으로분획하였다(Fig. 3). 표준 dextran들과 분자량을 비교하였을 때(결과생략) 분자량 5,000 내외로 추정되는 Fr. I과 분자량 1,000 내외로 추정되는 Fr. II의 항응고 활성은 두 획분 모두 가수분해 전 모다당과는 달리 aPTT의 활성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 이 결과는 해조류로부터 추출한 fucoidan이나⁶⁾ heparin의 가수분해 결과¹⁹⁾와는 상반되었다. 두 획분의 혈소판에 대한 응집능을 측정한 결과(Fig. 4) CV-40-Va-1이 vWF의 작용을 저해할 뿐 혈소판응집 억제 능이 없는것에 비해(Fig. 1) Fr. I은 vWF의 작용을 저해하지 않음과 동시에 혈소판 응집 억제도 나타내지 않았다. 그러나 Fr. II는 ADP, collagen, epinephrin에 의한 혈소판 응집을 강력히 억제하였다(Fig. 4). 이 결과에서 CV-40-Va-1이 저분자화될 때 혈소판응집 억제능을 새롭게 나타냄을 확인 할 수 있었으나 항응고 활성은 증가되지 않고 오히려 감소되었으므로 조건을 달리한 부분 가수분해와 효소적분해를 통한 다양한 크기의 다당을 얻어 분자량별 활성을 검색해 볼 필요가 있다고 생각되었다. 그리고 Fr.II의 구성당의 몰비율은 fucose : mannose : galatose : glucose가 1.00 : 0.19 :



1. ADP, 2. Collagen, 3. Epinephrin, 4. Ristocetin
Fig. 4. Blood platelet aggregation test profiles of two fractions obtained from the hydrolysed CV-40-Va-1.

0.09 : 0.18로서 가수분해되기 전의 CV-40-Va-1과⁶⁾ 구성당 비율에서 크게 차이가 없었으므로 가수분해에 따른 항응고활성의 변화는 다당크기의 감소에 따른 전체 구조변화에 의한 것이라고 사료되었다.

요 약

구름버섯 자실체에서 분리된 항응고성 다당류의 혈액응고 저해기작을 검토하였다. 항응고성 다당(CV-40-Va-1)은 vWF의 활성을 감소시킴으로써 혈소판응집을 억제시키는 것으로 나타났으며, 혈액응고인자중 thrombin뿐만이 아니라 내인성경로의 factor VII, IX, XI, XII의 활성 또한 억제 하였다. 그러나 CV-40-Va-1의 항응고 활성은 thrombin에 직접 작용하는 것이 아니라 antithrombin III 의존적 활성을 보였다. Sulfation에 의하여 CV-40-Va-1의 항응고활성의 증가와 다당의 desulfation시 상반된 결과에서 CV-40-Va-1의 황산기가 항응고활성의 중요한 인자임을 알수 있었다. CV-40-Va-1을 TFA로 부분가수분해하여 얻은 획분들(Fr.I, Fr. II)에서는 항응고 활성이 감소하였으나 분자량 1,000정도로 추정되는 획분(Fr. II)은 오히려 혈소

판응집을 강력하게 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 농진청 농업특정연구개발사업의 연구비에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

문헌

1. 김용택 : 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp.가 생산하는 혈전용해소의 특성에 관한 연구. 세종대학교 박사학위논문, 서울 (1995)
2. 한용남 : 혈액응고계의 조직인자에 대한 저해제. 생체기능조절 천연소재 심포지움, 한국과학재단 중점과제연구회, 고려대학교, p. 23 (1994)
3. 이상화 : *Streptomyces* 균주가 생성하는 *Rhabdophis tigrinus* 맹독의 prothrombin 활성화 효소의 작용과 thrombin의 작용을 억제하는 물질. 경북대학교 박사학위논문, 대구 (1994)
4. 김영식 : 식물성 산성당으로부터 헤파리노이드의 제조. 약학회지, **36**, 350 (1992)
5. Nishino, T., Kiyohara, H., Yamada, H. and Nagumo, T.: An anticoagulant fucoidan from brown seaweed *Ecklonia kurome*, *Phytochemistry*, **30**, 535 (1991)
6. 김영식 : 헤파린의 구조와 활성. 생화학뉴스, **10**, 36 (1990)
7. Kenneth A.B.: Natural anticoagulants and the prethrombotic state. In *Blood*, Lippincott, J. B. (Ed.) Company, Philadelphia, p.125 (1995)
8. Frank C.C., Meada, J.B., Treanor, R.E. and Herbert C. W.: Antithrombin activity of fucoidan. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3618 (1989)
9. 이현순, 권미향, 임왕진, 성하진, 양한철 : 구름버섯 알카리 추출물에서 분리한 항응고성 다당류. 한국식품과학회지, **29**, 369 (1997)
10. Riccardo, A.A., Muzzarelli, F.T. and Monica, E.: Sul-

fated N-(carboxylmethyl) chitosan, novel blood anticoagulants. *Carbohydr. Res.*, **126**, 225 (1984)

11. Kinzo, N., Yuko, I. and Toshio, K.: Solvoltyl sulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. *Carbohydr. Res.*, **58**, 47 (1977)
12. 김제훈, 유영선, 맹미호, 윤혜숙 : 수종 생약제제들의 혈소판 응집 억제 작용. 생약학회지, **21**, 126 (1990)
13. Longenecker, G.L.: Platelet arachidonic acid metabolism. *The Platelet Physiology and Pharmacology*, **159**, 1885
14. Haverstick, D.M., Cowan, J.F. Yamada, K.M. and Santoro, S.A.: Inhibition of platele adhesion to fibronectin, fibrinogen and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood*, **66**, 946 (1985)
15. Electricwala, A., Sawyer, R.T., Powell, C.J. and Atkinson, T.: Isolation of thromin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, **2**, 83 (1991)
16. Doctor, V.M., Lewis, D., Coleman, M., Kemp, T., Marbly, E. and Sauls, V.: Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates. *Thrombo. Res.*, **64**, 413 (1991)
17. Alban, S. and Franz, G.: Anticoagulant activities of β -1, 3-gulcansulfates dependence on their molecular weigh. *Pure and Appl. Chem.*, **66**, 2403 (1994)
18. Laurence, A.H.: Principles and practice of hematology. Antiplatelet and anticoagulant Therapy. In *Blood*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, p.56 (1995)
19. Robert, J., David, B. and Rosenberg, R.: Fractionation of low molecular weight heparin spices and their interaction with antithrombin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2902 (1979)
20. 권현영, 김영주, 노명희, 문공만, 오현숙, 정소웅, 조정진 : 혈액 응고계 검사. 혈액학실습서, 고려의학, 서울, p. 329 (1993)

(1997년 2월 24일 접수)