

적토롱 추출 단백질의 프로테나제 유도 수용체-2의 활성화 및 혈행개선 효과

이철규[#] · 신장식 · 최영근 · 임채곤 · 조일환 · 김 철

신풍제약(주) 중앙연구소

(Received December 23, 1996)

Protein Fraction Extracted from the Earthworm *Lumbricus rubellus* Activates Proteinase Activated Receptor-2 and is Effective on Hemokinesis

Chul Kyu Lee[#], Jang Sik Shin, Young Keun Choi, Chae Kon Lim,
Il Hwan Cho and Chul Kim

Central Research Institute, Shin Poong Pharm. Co. Ltd.
Ansan, Kyunghi-Do, 425-100

Abstract—The proteinase-activated receptor (PAR-2) belongs to the family of seven transmembrane region receptors, like the thrombin receptor, it is activated by specific proteolytic cleavage of its extracellular amino terminus and a synthetic peptide (SLIGRL). The earthworm protein fraction (EPF) extracted from *Lumbricus rubellus* elicited dose- and endothelium-dependent relaxations in phenylephrine-contracted rat thoracic aorta, whereas heat inactivated EPF (0.5 µg/ml) had no effect. In the presence of the nitric oxide synthase inhibitor N^G-methyl-L-arginine (1.8 µM), EPF (0.5 µg/ml)-induced relaxations were partially inhibited. Furthermore, EPF (0.5 µg/ml) dramatically caused relaxation of thrombin-desensitized rat thoracic aorta. These results indicate that EPF activates PAR-2 in vascular endothelial cell. Intravenous injection of EPF (20 mg/kg, bolus) into anesthetized rats produced a marked depressor response. EPF (0~80 µg/ml, gradient) was very effective on increasing of perfusion volume in rabbit ear vessel preparations. These results imply the usefulness of EPF as a vascular smooth muscle relaxant and indicate that the activation of PAR-2 may be a mechanism of EPF on hemokinetic improvement.

Keywords □ Serine Proteinase, Blood Vessel Relaxation, PAR-2, Peripheral Flow, Blood Pressure.

심혈관계는 고도로 정밀한 혈액응고 용해계를 갖는다. 그러므로 외상등에 의한 출혈을 곧바로 응고계 활성화로 빠른 시간내에 지혈하며, 이렇게 생성된 혈전은 출혈과 동시에 활성화되기 시작한 용해계에 의해 분해된다. 응고/용해계의 이상은 인체에 심각한 질환을 유발하는데, 응고계이상 질환의 대표적인 예는 factor VII와 factor IX 결손의 혈우병 A, B이며, 용해계 이상의 질환은 심근경색, 뇌졸중, 심부정맥혈전증, 폐색전증

후천적요인으로 발생된 혈전에 기인한다. 혈전의 생성 억제와 분해하는 치료제로 heparin과 warfarin 등의 항응고제, aspirin이 대표하는 항혈소판제, 혈전용해제, Ca⁺⁺ 길항제등이 사용된다.

현재 사용되는 혈전용해제로는 streptokinase, urokinase 및 recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) 등이 있으나 개선해야 할 점을 많이 보유하고 있다.^{1,2)} Streptokinase는 β-hemolytic streptococci의 배양액에서 분리된 것으로 간접적으로 plasminogen을 활성화시키는 분자량 47,000의 비효소 단백질이나, 인체에서 항원성을 갖고 있어 투여

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0345-492-5789 (팩스) 0345-491-6193

시 14일에서 21일 사이에 현저하게 항체가 증가한다. 또한 혈관신경성 부종, 출혈, 알리지성 아나필락시스 유발등의 부작용을 동반한다. Urokinase는 뇨나 신장 세포에서 추출한 plasminogen activator로 항원성이 없어 최근 빈번히 사용되는 제재이나 출혈을 동반하며 1시간에서 12시간의 투여시간을 필요로하는 불편함을 갖고있다. rt-PA는 streptokinase나 urokinase와 달리 섬유소 선택성이 있어 출혈이 적고 혈전용해 효과가 뛰어나나 고가인 점이 문제이다.

현재 섬유소 특이적이며 저가의 신약 개발이 천연물 추출물을 통해 활발히 진행되고 있는데, 두각을 나타내는 천연물추출 혈전용해제로는 일본식 발효 음식인 natto에서 분리한 nattokinase, 구인에서 분리한 lumbrokinase 등이 있다. Nattokinase는 경구 투여로도 혈중 섬유소 분해능을 상승시키며³⁾, plasmin에 비해 약 4배의 강한 활성을 갖고 섬유소를 선택적으로 분해시킨다.⁴⁾ 구인은 동양권에서 오랜 전통을 갖는 민간 약제로서 중풍등 순환계 질환에 사용되었고, 1983년 Mihara 등⁵⁾에 의해 구인으로 부터 강력한 섬유소 선택성과 분해능을 갖는 lumbrokinase가 분리되었다. 최근에는 lumbrokinase를 함유한 구인 추출물을 사람에게 경구투여할 때 혈액내 섬유소 용해력이 상승하며⁶⁾, 실험동물에서는 플라즈민 활성증가, 응고시간 지연 및 혈전 분해산물인 D-dimer가 증가되었다⁷⁾는 보고가 있었으나 아직까지 구인추출물의 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았다.

단백분해 효소에 의해 활성화되는 proteinase activated receptor에는 thrombin receptor와 agonist가 밝혀지지 않은 proteinase activated receptor-2 (PAR-2) 가 있다. Thrombin receptor는 혈소판, 내피세포, 상피세포, 근세포 등에 분포되어 주로 혈액응고 작용에 관여한다.⁸⁻¹²⁾ 반면 PAR-2는 혈관 내피세포에 존재하며 혈관근 이완 등 혈관 압력을 조절한다.¹³⁻¹⁷⁾ 그런데 구인에는 PAR-2를 활성화하는 trypsin과 같은 계열인 serine proteinase가 많이 포함되어 있다.⁵⁾ 그러므로 본 저자들은 구인으로 부터 casein 분해 및 섬유소 분해 활성을 갖는 단백질군의 최대 수확법을 개발하였고 이렇게 해서 얻어진 구인단백분획 (EPF) 의 혈관근 이완 작용과 그 작용기전으로 PAR-2 활성화 효과를 실험하였고 이에 따른 혈압하강, 말초혈류량 증가 등의 혈행개선 효과를 연구하였다.

실험방법

구인단백분획 (EPF) 의 정제 - 구인 즉 환형동물문, 빈모강, 지렁이목, 뉘시지렁이과에 속하는 붉은 지렁이 (*Lumbricus rubellus*) 는 기흥의 전문 사육장에서 구입하여 다음과 같은 일련의 정제단계를 거쳐 가정제 단백질분획을 얻었다. 먼저 생구인을 증류수로 깨끗이 씻어 습식분쇄한 후 분쇄액을 원침시켰다. 그 상등액을 회수하여 규조토로 여과한 후 여과된 용액에 EtOH을 처리하여 40~80% EtOH에 침전되는 단백질을 회수하였다. 회수된 침전물을 증류수로 현탁한 후 membrane filter (0.45 μ m) 로 여과하여 불용성 물질을 제거하였고, 이를 다시 ultrafilter (NMWC 10,000) 로 여과하여 분자량 10,000 이상의 단백질만을 농축회수하였다. 또한 이를 동결건조하여 제반실험에 사용하였다. 이상의 모든 조작은 4°C에서 행하였다. 이렇게 얻어진 시료를 구인단백분획 (EPF) 이라 명하였는데 이것의 casein 분해 역가는 12,700 U/g이며 생구인 100 kg에서 770 g이 회수되어 회수율은 0.77%로 나타났다.

실험동물 - 실험에 사용한 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐는 Charles River Japan으로 부터 구입하여 1주간 사육장에서 순화시킨 후 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육실내의 온도는 22±2°C, 습도는 55%, 환기는 6시간 간격으로 1일 4회, 조명은 300 Lux로 12시간 명암주기가 되도록 조절하였다. 뉴질랜드 흰토끼는 삼육실험동물 연구소로부터 구입 후 사육장에서 순화시킨 후 사용하였다.

흰쥐흉부대동맥 - 수컷 S.D. 흰쥐 (250~300 g) 를 ether 흡입으로 마취시킨 뒤, 재빨리 흉부대동맥을 적출하여 krebs-henseleit 용액 (mM: NaCl 118, NaHCO₃ 27.3, KCl 4.8, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.0, CaCl₂ 1.25, glucose 11.1) 에 담가 놓았다. 해부현미경하에서 perivascular tissue를 제거하고 side branch가 없는 부위로 2 mm의 대동맥환을 만들었다.

혈관근 이완 - 혈관의 isometric circumferential tension을 측정하기 위해 organ bath는 37°C의 krebs henseleit 용액으로 채웠고, pH 7.4를 유지하기 위해 95% O₂, 5% CO₂로 포화시켰다. 장력의 변하는 Hugo-sachs force transducer (model K30) 로 측정하였고, coulourn polygraph로 기록하였다. 혈관의 길이는 90분동안 기저장력 0.5~1.0 g을 맞추기 위해

단계별로 증가시켰다. 내피세포가 제거된 혈관은 혈관 내면을 부드럽게 문질러 제작하였다. 평형된 혈관은 phenylephrine (0.5 μ M) 으로 수축시켰고, 수축고와 평형을 유지하면 EPF, trypsin, thrombin, trypsin inhibitor 등을 첨가하여 이완반응을 관찰하였다.

PAR-2 활성화에 따른 혈관근 이완 반응 - 평형된 혈관근을 phenylephrine (0.5 μ M) 으로 수축시킨 후 thrombin (0.5 U/ml) 을 연속투여하여 혈관 내피세포와 평활근세포에 존재하는 thrombin receptor들을 탈감작시켰다. 두번째 thrombin 투여에는 혈관근이 이완하지 않는데 이는 단백질분해 효소인 thrombin에 의해 절단된 thrombin receptor가 recycling되기까지는 약 2시간이 소요되기 때문이다. 그러므로 탈감작된 혈관근 조직에는 PAR-2 만이 존재하게 되는데 이때 trypsin (0.5 U/ml) 또는 EPF (0.5 μ g/ml) 을 투여하여 PAR-2 활성화에 따른 혈관근 이완반응을 관찰하였다.

In vivo 혈압반응 - EPF의 PAR-2 활성화에 따른 혈압하강 효과를 알아보기 위하여 EPF를 흰쥐의 정맥에 투여한 후 혈압 변화를 측정하였다. 수컷 S.D. 흰쥐 (250~300 g) 는 phenobarbital sodium (100 mg/kg, i.p.) 으로 마취하였다. 좌경동맥에 캐놀라 (PE50) 를 삽입하고 pressure transducer (hugo sachs, model ISOTECTM) 에 연결하였으며 coulourn polygraph로 혈압을 기록하였다. 약물주입을 위해 우경정맥에 캐놀라 (PE35) 를 삽입하였고 직장 온도를 digital thermometer로 측정하여 체온이 37°C가 유지 되도록 가열판의 온도를 조절하였다. 수술조작이 끝나고 30분 동안 안정화시킨 후 vehicle 및 약물을 주입하였다. 혈압의 변화는 30분간 관찰하였다.

Ex vivo 말초혈류량 변화 - EPF가 혈관근 이완에 따른 말초혈류량을 변화시킬 수 있는지를 토끼 이자의 관류량 변화를 측정하여 알아보았다. 수컷 뉴질랜드 흰토끼 (1.9~2.1 g) 의 후두부를 강타하여 기절시킨 후 경동맥을 절단, 실혈시키고 기시부를 절단하였다. 적출귀의 절단부위 피부를 절개하고 중앙동맥에 카테터를 삽입한 다음 600 mmH₂O 압력으로 95% O₂, 5% CO₂로 포화시킨 krebs-henseleit 용액을 관류하였다. 약물 (0~80 μ g/ml) 은 peristaltic pump를 이용하여 중앙동맥에 점중적으로 주입하였다.

시약 - phenylephrine, trypsin, soybean trypsin inhibitor, N^G-methyl-L-arginine 등은 Sigma

Chem. Co. USA에서, thrombin은 Baxter Diagnostics Ins. USA.에서 구입하여 사용하였다.

결 과

EPF는 흰쥐 흉부대동맥 혈관근을 이완시킨다

Phenylephrine (0.5 μ M) 으로 수축된 흰쥐 흉부대동맥관은 EPF 농도의존적으로 이완되었다 (Fig. 1). EPF 0.1 g/ml 농도에서 혈관근이 이완되기 시작하여 EPF 10 μ g/ml로 최대 수축고의 약 83% 정도가 이완되었다. 혈관근 이완작용에 대한 EPF의 IC₅₀은 1.25 μ g/ml이었다. EPF의 이러한 이완은 혈관 내피세포의 존적이었다 (Fig. 1).

EPF는 단백질분해효소 활성화에 의해 혈관근을 이완시킨다

Soybean trypsin inhibitor (5 μ g/ml)로 전처리한 흉부대동맥은 trypsin (0.5 U/ml) 이나 EPF (0.5 g/ml)에 의해 혈관근 이완반응을 나타내지 않았으나 thrombin (0.5 U/ml)에 의해서는 이완되었다 (Fig. 2A). 또한 끓는 물에서 10분간 가열하여 단백질을 변성시킨 EPF (0.5 g/ml)는 어떠한 이완효과도 보이지 않았다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 EPF의 혈관근 이완효과가 그것의 효소 활성 즉 serine proteinase 활성화에

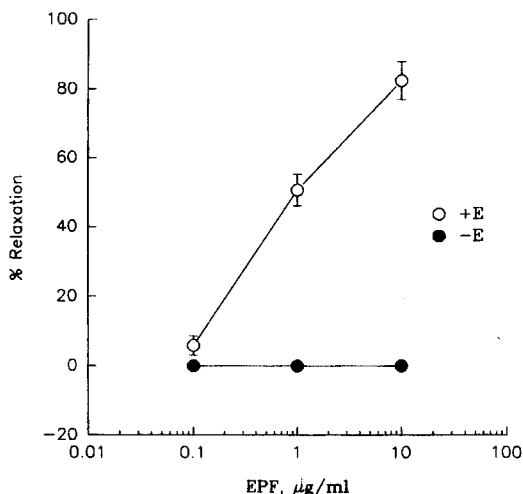


Fig. 1 - EPF-induced relaxation of phenylephrine (0.5 μ M)-contracted rat thoracic aorta with and without-functional endothelium (+E and -E, respectively). Results are expressed as mean percent relaxation \pm S.D. of five aorta.

의한 것임을 시사한다. EPF의 혈관근 이완이 endothelial derived relaxing factor (EDRF: nitric oxide, NO) 에 의해서 매개되는 지를 알아보기 위해, nitric oxide synthase 기질 저해물질인 N^G -methyl-L-arginine (NMA) 에 의해 그러한 반응이 억제되는 지를 실험하였다. EPF (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 의 혈관근 이완 작용이 NMA (1.8 μM) 에 의해 약 11% 억제되었으며 trypsin이나 thrombin의 혈관근 이완 작용도 일부 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 2B). 이상의 결과를 종합하면 EPF에 의한 혈관근 이완 반응은 그것의 serine proteinase 활성화에 의한 것임을 알 수 있다.

EPF는 PAR-2를 활성화시킨다

위의 실험에서 혈관근 이완효과를 나타내는 것은 EPF에 함유된 serine proteinase인 것으로 나타났는데 EPF에 함유된 proteinase의 주종이 serine proteinase일 것으로 사료된다. 왜냐하면 구인에서 분리되는 casein 분해능을 갖는 효소군 (lumbrokinases) 이 serine proteinase이기 때문이다. Serine prote-

inase인 thrombin과 trypsin에 의해 활성화되는 thrombin receptor와 PAR-2 중에서 EPF는 어느 수용체에 작용하는 지를 실험하였다. Phenylephrine (0.5 μM) 으로 수축된 혈관근에 thrombin (0.5 U/ml) 을 2회 연속 처리하여 thrombin receptor를 탈감작 (thrombin에 의한 수용체의 불가역적인 변화) 시키고 trypsin (0.5 U/ml) 과 EPF (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 을 처리하였다. 이미 보고^{14, 17)} 된 바와 같이 trypsin은 PAR-2를 특이적으로 활성화시켜 thrombin receptor가 탈감작된 흉부대동맥을 이완시켰다 (Fig. 3A). EPF 또한 trypsin과 동일하게 thrombin receptor가 불가역적으로 변화해 탈감작된 흉부대동맥을 이완시켰다 (Fig. 3B). 이상의 결과로 EPF는 serine (trypsin-like) proteinase 활성화에 의해 thrombin receptor와는 별개로 PAR-2를 활성화하는 것으로 사

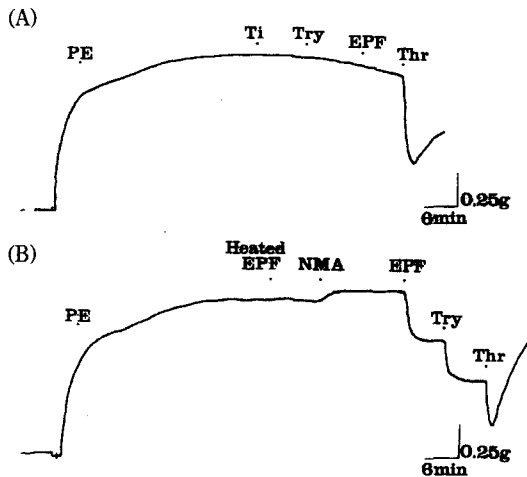


Fig. 2 — Representative tracings showing mechanism of EPF to rat thoracic aorta relaxation. Aortic rings were contracted to phenylephrine (0.5 μM), followed by soybean trypsin inhibitor (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (A) or NMA (1.8 μM) (B), and then challenged by trypsin (0.5 U/ml), thrombin (0.5 U/ml), and EPF (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A rat aorta was placed in an organ bath (10 ml) with a krebs-henseleit solution at 37°C. The solution was bubbled with a continuous flow of 5% CO_2 and 95% O_2 . PE, phenylephrine; Thr, thrombin; Try, trypsin; Ti, trypsin inhibitor.

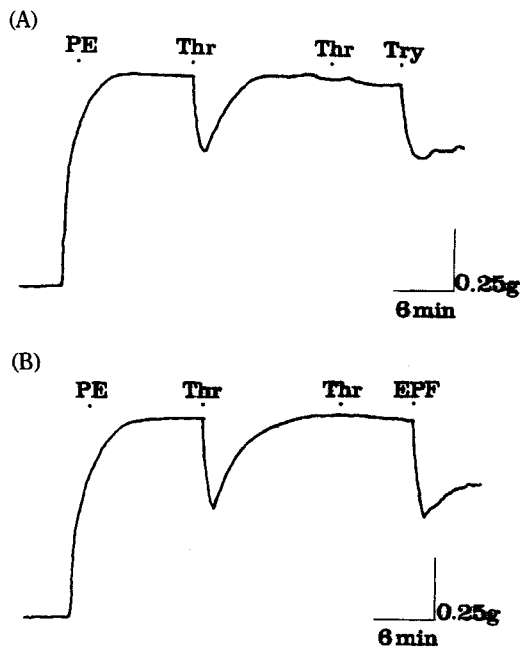


Fig. 3 — Representative tracings showing selective activation of EPF to PAR-2. Aortic rings were contracted to phenylephrine (0.5 μM), followed by sequential exposures to thrombin (0.5 U/ml), and then challenged by trypsin (0.5 U/ml) (A) or EPF (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (B). A rat aorta was placed in an organ bath (10 ml) with a krebs-henseleit solution at 37°C. The solution was bubbled with a continuous flow of 5% CO_2 and 95% O_2 . PE, phenylephrine; Thr, thrombin; Try, trypsin.

료된다.

EPF는 현쥐의 혈압을 하강시킨다

EPF가 PAR-2를 활성화하여 평활근을 이완시키므로 실제 생체에서 혈압을 변화시킬 수 있는 지를 알아보기 위해 EPF 정맥투여에 의한 혈압반응을 관찰하였다. EPF (20 mg/kg, bolus) 를 투여하자 혈압은 급격히 하강하였고 이러한 혈압하강효과는 약 3분간 지속되었다 (Fig. 4). Hwa 등의 보고에 의하면 thrombin receptor를 활성화하는 peptide인 SFLLRN (1 mg/kg, iv, bolus) 을 투여할 때는 혈압이 상승한 반면 PAR-2를 활성화하는 SLIGRL (1 mg/kg, iv, bolus) 을 투여할 때는 혈압이 하강되었다. 그러므로 EPF는 SLIGRL이나 trypsin과 같이 PAR-2를 활성화하여 혈

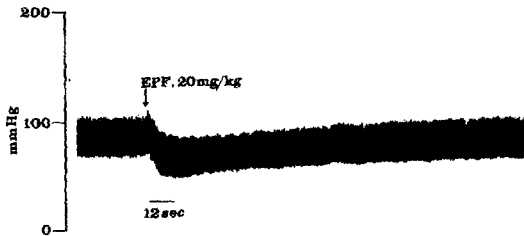


Fig. 4—Representative tracings demonstrating blood pressure changes after intravenous injection of EPF (10 mg/kg, bolus) in anesthetized S.D. rats.

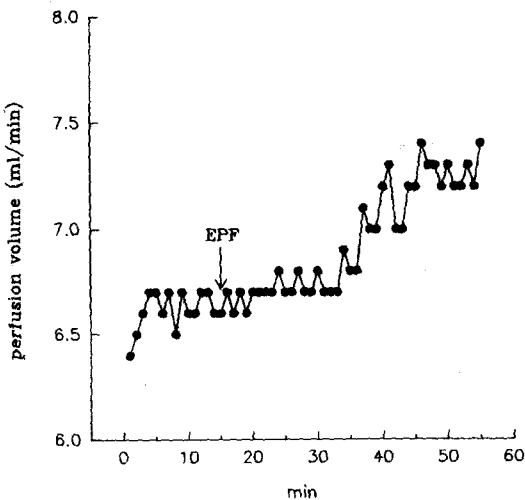


Fig. 5—Effects of EPF on perfusion volume of isolated ear vessel in a rabbit. The perfusion pressure was 600 mmH₂O. EPF was gradually applied zero to 80 µg/ml to the cannulated ear artery at (↓).

압을 하강시키는 것으로 사료된다.

EPF는 말초혈량을 증가시킨다

적출된 이각에 600 mmH₂O로 60분간 krebs henseleit 용액을 관류시켜 분당 관류량이 일정해지면 EPF를 0 mg/ml에서 0.08 mg/ml까지 점증적으로 중앙동맥에 주입하였다. 평형시 분당 관류량은 6.6 ml/min 였으나 EPF의 주입농도가 증가할수록 농도의존적으로 분당관류량이 증가하여 최고 80 µg/ml 주입시에는 분당 관류량이 7.3 ml/min으로 상승하였다 (Fig. 5).

고 찰

Mihara 등⁵⁾에 의해 최초로 구인으로부터 정제된 lumbrokinase는 serine proteinase의 일종이며 섬유소에 높은 친화력을 갖고 있어 체내 plasminogen을 활성화하지 않고 직접 혈전을 분해할 수 있고 경구투여로도 체내 혈전분해 효과를 볼 수 있다.^{6,7)} Lumbrokinase는 이러한 차세대 혈전용해제로서의 여러 장점을 갖고 있어 구인으로부터 순수 정제된 후 약제로서 개발하려는 시도가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 그러나 lumbrokinase 정제에는 많은 비용이 소요되어 약제로 개발시 고가가 필연적이다. 그래서 저자들은 casein 분해 및 섬유소 분해 역가가 높으면서 수율이 높은 단백질 분획법을 개발하였는데 이렇게 해서 얻어진 시료가 EPF이다. EPF의 분말 회수율은 0.77%이고 casein 역가 회수율은 87%이며 casein 분해 역가는 12,700 U/g였다. EPF는 대부분이 serine proteinase이며 분획되지 않은 lumbrokinase가 포함되어 있을 것으로 사료된다.

Phenylephrine (0.5 µM) 으로 수축된 혈관근은 EPF에 의해 농도의존적으로 이완되었으나 혈관내피세포를 제거했을 때는 아무런 반응도 나타나지 않았다 (Fig. 1). 또한 이러한 혈관근 이완반응이 EPF의 proteinase 활성에 의한 것인 지를 실험하였다. 즉, proteinase inhibitor에 의한 EPF의 혈관근 이완반응 변화와 가열처리하여 변성시킨 EPF의 혈관근 이완반응 간 존 여부를 실험하였다. Trypsin inhibitor (5 µg/ml) 로 전 처리한 혈관근은 trypsin (0.5 U/ml) 이나 EPF (0.5 µg/ml) 에 의해 이완이 유발되지 않았으나, trypsin inhibitor에 의해 활성이 저해되지 않는 thrombin (0.5 U/ml) 은 이완반응을 나타냈다 (Fig. 2A). 또한 가

열하여 단백질을 변성시킨 EPF (0.5 µg/ml) 는 더 이상의 혈관근 이완효과를 보유하지 않았다 (Fig. 2B). 또한 nitric oxide synthase 억제제인 NMA (1.8 µM) 에 의해 EPF (0.5 µg/ml)의 혈관근 이완효과는 일부 억제되었다 (Fig. 2B). 이상의 결과로 EPF는 trypsin-like serine proteinase의 일종이며²⁰⁾ 그 고유의 단백질 분해 활성에 의해 혈관근 이완을 일으키는데 이러한 반응에 nitric oxide가 일부 관여하는 것으로 사료된다.

혈관내피세포에 존재하는 thrombin receptor는 처음으로 클론된 G-protein coupled receptor이며 세포 바깥쪽 부분에 있는 아미노 말단이 thrombin에 의해 절단됨으로 그 활성을 갖는다.⁸⁾ 이러한 불가역적인 반응은 새로운 아미노산의 노출을 야기함으로써 수용체의 다른 domain에 결합하는 'tethered peptide ligand'로 작용하여 수용체를 활성화시킨다.⁹⁾ 활성화되어 세포내로 신호를 전달한 thrombin receptor는 세포막으로 분리되어 세포질내로 endosome을 형성하는데, 이중 25% 정도는 세포표면으로 재순환되며 나머지는 용해된다.¹⁰⁾ Thrombin receptor의 N-terminal peptide인 SFLLN은 혈관내피세포 (HUVEC)의 thrombin receptor를 활성화시켜 세포질내 Ca⁺⁺ 농도와 prostacyclin 생산을 증가시킨다.¹¹⁾ 또한 SFLLRN은 혈소판을 활성화시켜 cAMP 형성 억제, 세포질내 Ca⁺⁺ 증가 및 tyrosine phosphorylation 등을 야기한다.¹²⁾ 최근 proteinase activated receptor-2 (PAR-2) 가 mouse^{13,14)}, rat¹⁵⁾, human^{16,17)}등에서 cloning 되었다. Mouse의 PAR-2는 thrombin receptor와 약 30% identity를 갖으며, human PAR-2와는 약 83%의 identity를 갖는다. PAR-2는 thrombin에 의해 활성화되지 않고 trypsin 또는 합성 peptide인 SLIGRL에 의해 활성화되는데 이는 단백질 서열상에 thrombin receptor에는 존재하는 thrombin/hirudin-binding exosite가 PAR-2에는 없기 때문으로 사료된다.¹³⁾ PAR-2는 혈관내피세포에 thrombin receptor와 구별되어 존재하며¹⁸⁾, agonist 특이성은 두번째 extracellular loop에 의해 결정되는 것으로 보고되었다.¹⁹⁾ PAR-2의 생리학적 기능과 내재성 활성화자 (agonist) 는 아직 밝혀지지 않았으나 PAR-2 mRNA은 신장, 소장, 위등의 고도로 vascularize된 기관내에 존재하며 blood vessel tone을 조절하는 역할을 담당할 것으로 사료된다.¹³⁾ 그러므로 PAR-2의 활성은 순환계 조절에 중요한 의미를 함축하고 있다. 앞서

의 실험에서 EPF가 serine protease 활성에 의해 내피세포의존적으로 혈관근을 이완시키므로 EPF가 혈관근 내피세포에 존재하는 thrombin receptor와 PAR-2 중 어느 수용체에 작용하는 지를 실험하였다. 즉, 혈관근에 thrombin (0.5 U/ml) 을 2회 연속투여하여 thrombin receptor를 탈감작한 후 EPF (0.5 µg/ml) 를 처리하여 혈관근이 이완되는 지를 관찰하였다. 또한 이미 PAR-2를 선택적으로 활성화하는 것으로 보고된 trypsin (0.5 U/ml)을 탈감작된 혈관근에 투여하여 EPF와 비교하였다. EPF는 thrombin receptor가 탈감작된 혈관근을 이완시켰다 (Fig. 3A). PAR-2 활성화 양성 비교물질로 사용한 trypsin 또한 EPF와 같이 thrombin receptor가 탈감작된 혈관근을 이완시켰다 (Fig. 3B). 이상의 결과로 EPF는 trypsin과 같이 PAR-2를 선택적으로 활성화시키는 것으로 사료된다.

PAR-2는 활성화될 때 세포질 내의 Ca⁺⁺ 농도^{13,17)} 와 cGMP 농도²¹⁾가 상승하며, 아주 작은 농도 (300 pM 정도) 의 trypsin으로도 활성화되나 정상 혈청내 trypsin의 농도는 거의 희박하다.²²⁾ 그러나 trypsin-like enzyme은 mast cell 또는 T-cell 활성화에 의해서도 방출되며²³⁾, porcine aortic 평활근 세포는 serine proteinase를 분비하여 평활근 세포내 insulin-like growth factor 기능을 유의적으로 변화시키는 것으로 보고되었다.²⁴⁾ 또한 tumor cell은 침투와 extracellular matrix 분해를 위해 trypsinogen isoenzyme을 분비한다.²⁵⁾ 이렇듯 순환계 여러 세포에 의해 trypsin이 방출되나 아직 PAR-2와의 연관성은 연구되지 않았다. 그러나 최근 염증 증재자의 PAR-2 유전자 expression 유발²⁶⁾, PAR-2 탈감작과 재감작 기전²⁷⁾, PAR-2의 HUVEC mitogenic response 증대²⁸⁾ 등이 보고되며 PAR-2에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 곧 생체내 agonist가 밝혀 질 것으로 사료된다. 또한 PAR-2의 활성화는 암세포의 colony 형성을 억제한다는 보고도 있어 혈관계 암세포 성장과의 관계에 주목받고 있다.¹⁶⁾ 혈소판, 내피세포, 혈관 평활근 세포등의 thrombin receptor의 활성은 중요한 생물학적 반응을 일으킨다. 혈소판의 경우에 이러한 반응은 과립분비, 피브린노젠 수용체 발현, 응집형성 등이 포함된다. 그러나 이와 대조적으로 PAR-2 활성화는 혈소판 응집, 평활근 수축 (혈압상승) 등을 야기하지 않으므로 순환계내에서 병원으로 작용하지 않고 순환계 질환 개선으로 나타날 것으로 사료된다.¹⁸⁾

현대 성인병에 의한 사망자 수중에 순환기계 관련 질병이 1위를 차지하는데 이러한 질환의 요인으로 혈전이 직, 간접적으로 작용한다. 그러므로 인류 최대 사망 원인인 혈전의 제거는 국내의 제약 및 의학계가 해결해야 할 과제이나 많은 노력에도 불구하고 혈전증에 의한 사망자수는 증가일로에 있다. 그런 의미에서 혈전을 선택적으로 용해하며 혈관근 이완시키는 EPF의 효과는 과히 고무적이다. 왜냐하면 혈행을 개선하는데 혈전용해 만큼이나 혈관근 이완 작용은 중요한 의미를 갖기 때문이다. 실제 EPF는 thrombin에 의한 세척 혈소판의 응집을 억제하였으며 (data not shown), 동맥 투여 (20 mg/kg, bolus)에 의해 흰쥐의 혈압을 하강시켰다 (Fig. 4). 반면 thrombin receptor 활성화 인자인 thrombin과 합성 peptide SFLLRN은 세척혈소판을 응집시키며 혈압을 상승시키는 것으로 보고되었다.¹⁸⁾ 또한 EPF (0~80 µg/ml)는 흰토끼 이각 관류량을 농도의존적으로 증가시켰다 (Fig. 5). 이상의 결과로 EPF는 혈행개선에 매우 효과적이며 이러한 효과는 PAR-2 활성화에 따른 혈관근 이완에 기인한 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 선도기술사업 신기능 효소제 개발 과제의 일환으로 수행된 것으로 이에 감사드린다.

문 헌

- Collen, D. : Thrombolytic therapy. *Ann. Rev. Med.* **39**, 405 (1988).
- Bang, N. U., Wilhelm, O. G., and Clayman, M. D. : Thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. *Ann. Rev. Med.* **29**, 323 (1989).
- Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., and Hiratani, H. : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of natto-kinase. *Acta Haematol.* **84**, 139 (1990).
- Fujita, M., Hong, K. S., Ito, Y., Fujii, R., Kariya, K., and Nishimuro, S. : Thrombolytic effects of natto-kinase on a induced thrombosis model in rat. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1387 (1995).
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M., and Maruyama, M. : Novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn. J. Physiol.* **41**, 461 (1991).
- Hong, S. Y., Yang, D. H., Oh, D. Y., and Park, S. Y. : Lumbrikinase effect on physiologic fibrinolytic activity. *The Korean Journal of internal medicine.* **40**, 77 (1991).
- Chang, C. S., Lee, C. K., Shin, J. S., Cho, I. H., and Sur, J. J. : Fibrinolytic and anticoagulant effects of earthworm, *Lumbricus rubellus*, extracts. *Yakhak Hoeji* **39**, 666 (1995).
- Vu, T-K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I., and Coughlin, S. R. : Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057 (1991).
- Gerszten, R. E., Chen, J., Ishii, M., Ishii, K., Wang, L., Nanevich, T., Turck, C. W., Vu, T-K. H., and Coughlin, S. R. : Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature* **368**, 648 (1994).
- Hoxie, J. A., Ahuja, M., Belmonte, E., Pizarro, S., Parton, R., and Brass, L. F. : Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 13756 (1993).
- Ngaiza, R. and Jaffe, E. A. : A 14 amino acid peptide derived from the amino terminus of the cleaved thrombin receptor elevates intracellular calcium and stimulates prostacyclin production in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1656 (1996).
- Vassallo, R. R. Jr., K-Emmons, T., Cichowski, K., and Brass, L. F. : Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J. Biol. Chem.* **267**, 6081 (1992).
- Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., and Sundelin, J. : Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9208 (1994).
- Nystedt, S., Larsson, A-K., Aberg, H., and Sundelin, J. : The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene: molecular cloning and functional expression. *J. Biol. Chem.* **270**, 5950 (1995).

- 15) Saifeddine, M., A-Ani, B., Cheng, C-H., Wang, L., and Hollenberg, M. D. : Rat proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): cDNA sequence and activity of receptor-derived peptides in gastric and vascular tissue. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 521 (1996).
- 16) Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A-K., Strombeck, B., and Sundelin, J. : Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur. J. Biochem.* **232**, 84 (1995).
- 17) Bohm, S. K., Kong, W., Bromme, D., Smekens, S. P., Anderson, D. C., Connolly, A., Kahn, M., Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Payan, D. G., and Bunnett, N. W. : Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor 2. *Biochem. J.* **314**, 1009 (1996).
- 18) Hwa, J. J., Ghibaudi, L., Williams, P., Chintala, M., Zhang, R., Chatterjee, M., and Sybertz, E. : Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res.* **78**, 581 (1996).
- 19) Lerner, D. J., Chen, M., Tram, T., and Coughlin, S. R. : Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor: importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J. Biol. Chem.* **271**, 13943 (1996).
- 20) Barrett, A. J. : Classification of peptidases. *Methods in Enzymology* **244**, 1 (1994).
- 21) Rapoport, R. M., Draznin, M. B., and Murad, F. : Mechanisms of adenosine triphosphate-, thrombin-, and trypsin-induced relaxation of rat thoracic aorta. *Circ. Res.* **55**, 468 (1984).
- 22) Montalto, G., Lorello, D., Carroccio, A., Sparacino, V., Vecchi, M. L., Soresi, M., Ruggeri, M. I., and Notarbartolo, A. : Serum trypsin in chronic renal failure transplant patients. *Am. J. Gastroenterol.* **87**, 1175 (1992).
- 23) Caughey, G. H. : Serine proteinases of mast cell and leukocyte granules: a league of their own. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **150**, s138 (1994).
- 24) Gockerman, A. and Clemmons, D. R. : Porcine aortic smooth muscle cells secrete a serine protease for insulin-like growth factor binding protein-2. *Circ. Res.* **76**, 154 (1995).
- 25) Koivunen, E., Ristimaki, A., Itkonen, O., Osman, S., Vuento, M., and Stenman, U-H. : Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. *Cancer Res.* **51**, 2107 (1991).
- 26) Nystedt, S., Ramakrishnan, V., and Sundelin, J. : The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells: comparison with the thrombin receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 14910 (1996).
- 27) Bohm, S. K., Khitin, L. M., Grady, E. F., Aponte, G., Payan, D. G., and Bunnett, N. W. : Mechanism of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 22003 (1996).
- 28) Mirza, H., Yatsula, V., and Bahou, W. F. : The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells: molecular characterization and evidence for functional coupling to the thrombin receptor. *J. Clin. Invest.* **97**, 1705 (1996).