

멸치액젓 중 혈전용해효소의 경구 투여 효과

정영기[†] · 양응석 · 김병기*

동의대학교 미생물학과

*생물학과

Effect of Oral Administration of Fibrinolytic Enzyme from a Fermented Anchovy, Myulchi Jeot-Gal

Yong-Keel Jeong[†], Woong-Suk Yang, and Byung-Ki Kim*

Department of microbiology, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea

*Department of biology, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

Effect of oral administration with fibrinolytic enzyme isolated from fermented anchovy(the traditional fermented food in Korea called Myulchi Jeot-gal) and its functionally active enzyme to rat, activation of plasma fibrinolysis was observed. The euglobulin fibrinolytic activities and the plasma levels of H-D-Val-Leu-Lys-pNA(S-2251) amidolysis reached a maximum at 3 hours after the administration to rat. And euglobulin lysis time(ELT) value after oral administration showed its activity 2~3 hours later. From the above result, it was confirmed the enzyme activity in blood by oral administration fibrinolytic enzyme through animal experiment.

Key words : Fibrinolytic enzyme, Oral administration, Myulchi Jeot-gal

서 론

혈전(fibrin)은 혈액내에서 복잡한 blood cascade mechanism에 의해 활성화 된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 응고된 중합체를 형성함으로써 생성된다¹⁾. 생성된 혈전은 잘 용해되지 않는 불용성의 덩어리로서 혈류를 따라 이동하기도하고 혈관벽에 cholesterol과 함께 부착하여 고혈압, 뇌졸중 등의 성인병을 유발시키는 원인이 되고 있다. 혈전에 의하여 병증을 나타내는 것을 혈전증이라 하는데, 지금까지 이를 위하여 여러 치료법이 연

구되어 왔으며 헤파린이나 dicumarol이 혈액응고 방지제로 사용되어 왔다. 그러나 혈액응고 방지제는 자칫 다량 사용하는 것에 의하여 부작용을 초래하게 되므로 형성된 혈전을 분해시켜 혈류를 용이하게하는 방법을 취해오고 있다. 예를 들면, 혈액내에서 혈전분해 작용에 관여하는 plasmin을 활성화하는 plasminogen activator가 있다. plasminogen activator로서 현재까지 많이 사용되고 있는 urokinase(UK)²⁾와 tissue-type plasminogen activator(tPA)³⁾가 있다. 그 외에 미생물이 생산하는 혈전용해효소에 대한 연구도 많이 보고 되고 있다⁴⁻⁶⁾ Streptococcus haemolyticus가 생산하는

[†] Corresponding author

streptokinase(SK)^{5,6)}와 *Staphylococcus aureus*에 의하여 생산되는 *staphylokinase*^{7,8)}가 미생물에 의하여 생산된 것이다.

혈전용해효소를 식품에서 발견하여 보고한 것은 Sumi등에 의해 연구된 일본식품인 natto 유래의 nattokinase이다⁹⁾. 그후 우리나라의 청국장에서도 혈전용해효소를 발견하여 보고한 바가 있다¹⁰⁾. Sumi등은 nattokinase와 UK를 쥐와 개에 먹여 경구투여 효과를 시험하여 이들 혈전용해효소의 경구투여 효과의 우월성을 보고 한 바 있다¹¹⁻¹⁶⁾.

최근 정 등은 우리나라의 전통식품인 김치의 혈전 용해 작용에 대하여 보고한 바 있다¹⁷⁾. 그들은 김치의 부재료 중 여러 가지의 것갈에 강한 혈전용해 작용이 있음을 함께 보고하였다. 그 중에서도 한국가정에서 김치 제조시에 가장 보편적으로 많이 사용되고 있는 멸치 것갈도 포함되고 있다.

본 연구에서는 한국의 전통 발효식품의 하나인 멸치 것갈에 존재하는 혈전용해효소가 경구투여시에 활성이 흡수되어 혈액내의 혈전을 분해시킬 수 있는 효과를 가질 수 있는 지를 동물실험을 통하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 조효소의 조제

시중에 판매하고 있는 재래식으로 제조된 멸치 액젓을 구입하였다. 액젓을 증류수를 외액으로 하여, 외액을 자주 교환하면서 48시간 투석하여 소금을 완전히 제거하였다. 80% 포화 ammonium sulfate로 침전하여 침전된 단백질을 회수하였다. 침전물을 멸균 증류수에 녹인 다음 다시 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 외액으로 하여 24시간 투석하였다. 투석된 조효소액을 동결건조하여 -20°C에 저장 하면서 사용하였다.

2. 혈전용해활성의 측정

혈전용해의 활성정도를 측정하기 위하여 Astrap등의 방법¹⁸⁾을 변형한 Jeong등의 변법¹⁹⁾에 따라 fibrin을 기질로 하는 fibrin평판법을 응용하였다.

3. 동물실험에 의한 경구 투여 효과

농축된 효소(3,000 I.U)를 swine gastric mucin이 함유된 saline 0.5ml에 녹여 시료로 하였다. 동물은 생후 4주의

rat(평균체중 140g) 16마리를 실험에 사용하였다. 그중 1마리는 control로서 효소가 함유되지 않은 saline(swine gastric mucin을 함유) 0.5ml을 경구 투여 하였다. 그리고 각 시간별(0, 1, 2, 3, 4시간) 3마리씩 rat를 실험하여 평균값을 취하였다. 0시간의 군은 상기의 시료를 먹이자마자 곧 rat의 전 혈액을 채혈한 것이다. 그리고 시료 경구투여 후 1, 2, 3, 4시간 후에 각각의 rat의 심장을 통하여 전 채혈하였다. 채혈 한 후 곧 3.8%의 sodium citrate를 가하여 원심분리(3,000rpm, 30min, 4°C)하여 상등액 1ml을 취한다. 이 상등액에 10mM acetic acid buffer(pH5.3) 19ml을 가하면 침전물이 생성되는데 원심분리(12,000 rpm, 20min, 4°C)에 의해 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 0.01M phosphate buffer(pH7)에 녹여 euglobulin으로 사용하였다. control군의 혈액과 경구투여 후 각시간 별로 채혈한 군의 혈액으로부터 제작된 euglobulin 100μl로서 fibrin plate에서 반응시켜 분해정도를 측정하였다.

4. Euglobulin용해효과(ELT)

Sumi등의 방법^{12,13)}에 따라 시행하였다. 조효소액을 경구 투여한 rat의 혈액으로부터 분리한 0.4ml euglobulin에 0.8 unit의 thrombin을 첨가하여 응고시킨후 37°C incubator에서 항온을 유지하면서 용해되는 시간을 측정한다.

5. Euglobulin에 의한 amidolysis activity의 검정법

Sumi등의 방법^{12,13)}으로 조효소액을 경구 투여한 rat의 심장에서부터 전 채혈한 다음 euglobulin을 분리하여, 이로부터 합성 peptide를 기질로 하여 분해 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 혈액 euglobulin에 의한 fibrin의 분해 효과

조효소액 대신 saline만 먹인 control군의 혈액과 경구투여 후 각 시간 별로 채혈한 rat군의 혈액으로부터 제작된 euglobulin 100μl로서 fibrin plate에서 반응시켜 분해정도를 측정하였다. 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 경구투여 후 1시간째부터 혈액 내에서 혈전용해효소의 활성이 검출되기 시작하였다. 그 활성은 2시간째까지는 급격한 증가의 폭을 보이지 않았으나 3시간째에 가장 높은 활성을 보였다. 이 결과는 Sumi등¹³⁾의 실험에서 urokinase로서 mouse에

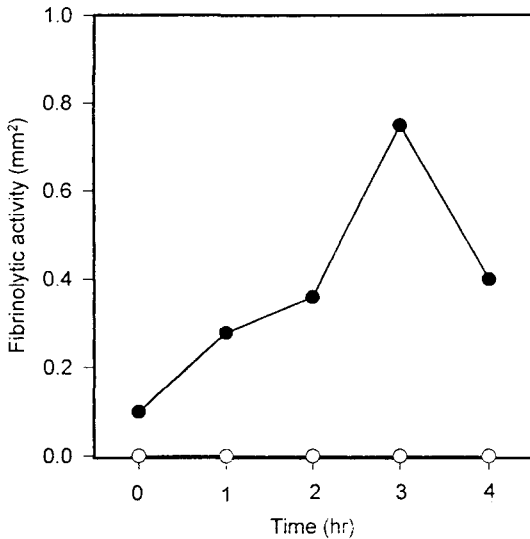


Fig. 1. ELT test using euglobulin fraction form fibrinolytic activity oral-administrated rat
 ○—○ : Control, —●— : Fibrinolytic activity

실험한 결과와 많은 차이가 있었다. 즉 urokinase를 경구투여했을때는 2시간에서 최고활성을 기록하여 3시간째부터 활성저하가 나타났다. 이것으로 미루어 볼 때 본 효소는 서서히 흡수되는 반면에 혈액 내에서의 반감기는 길어 질 수 있다는 가능성을 예측할 수 있었다.

2. 혈액 euglobulin의 용해효과(Euglobulin Lysis Time, ELT)

앞의 방법에서 설명한 것과 같이 혈액 euglobulin에 thrombin을 작용시킨후 37°C에서 응고 euglobulin의 용해되는 시간을 측정하였다. 그 결과 Table 1에서 보이는 바와 같이 2시간과 3시간의 군에서 ELT효과를 확인하였다. 이 결과는 Fig. 1의 결과와 거의 일치하였다. 이로서 액젓에서 분리된 혈전용해효소는 경구투여에 의하여 그 활성이 흡수되어 혈액내에서 효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 강하게 시사하고 있다.

3. Euglobulin에 의한 amidolysis activity의 확인

상기와 같은 방법으로 조효소액을 경구투여한 rat의 심장으로부터 전 체혈한 다음 euglobulin을 분리하여 합성 peptide기질(s-2251)을 이용하여 분해활성을 확인하였다.

Table 1. Fibrinolytic activity by euglobulin lysis time after oral administration of purified fibrinolytic enzyme

Time after oral administration(hr)	ELT ¹⁾ (hr)
0	48
1	45
2	18
3	20
4	48

Health male rats(4weeks, 140g)were given 3,000 I.U each of fibrinolytic enzyme Plasma was collected and the ELT was measured.

¹⁾Euglobulin lysis time

그 결과 Table 2에서 보이는 바와 같이 경구투여 후 1시간부터 활성을 나타내기 시작하여 3시간째에 가장 높은 활성을 보였다. 이 결과는 Fig. 1에서 보인 euglobulin으로 fibrin plate에서 fibrin의 분해활성을 시험한 결과와 일치하였다. 단 2시간째의 활성이 낮게 나타난 것은 실험상의 오차라 사료된다.

이상으로 식품에 존재하는 혈전용해효소는 경구투여에 의해 그 효과를 가질 수 있다는 확신을 본 연구 결과에서 보여 주고 있다.

Table 2. Measurement of amidolytic activity by rat euglobulin

Time after oral administration(hr)	Peptide substrate	Amidolysis (nM/ml)
0	s-2251	0
1	s-2251	17.4
2	s-2251	6.8
3	s-2251	24.9
4	s-2251	18.1

Amidolytic activity in I.U/ml was determined by adding 0.2ml of each plasma to 3×10^{-4} M s-2251 substrate (synthetic substrate for plasmin)

요 약

멀치액젓으로부터 분리한 혈전용해효소를 rat에 경구투여하여 혈액내에서 효소활성을 확인 하였다. 경구투여 후 0, 1, 2, 3, 4시간 후에 혈액을 채취하여 fibrin분해활성을 본

결과 1시간부터 활성이 나타나기 시작하여 3시간째에 가장 높았다.

Euglobulin lysis time(ELT)도 경구투여 2, 3시간 후에 활성을 보였다. 또한, euglobulin에 의한 amidolysis activity도 1시간부터 활성이 보이기 시작하여 3시간 후에 최고 활성에 달했다. 이상의 결과로 동물실험을 통한 혈전용해효소의 경구투여에 의한 활성을 혈액내에서 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 1994년도 학술진흥재단공모과제 학술연구조성비 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Voet, D. and Voet, J. G : *Biochemistry*, 9. 1087-1095. John Wiley & Sons, New York(1990).
- Wun, T. C., Schleuning, W. D., and Reich, E. : Isolation and characterization of urokinase from human plasma. *J. Biol. Chem.*, 257, 3276-3283(1982).
- Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H., Goeddel, D. V., and Collen, D. : Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*, 301, 214-221(1983).
- El-Aassar, S. A. : Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidroseum*. *Biotechnol. Lett.*, 17, 943-948(1995).
- Reed, G. L., Lin, L. F., Parhami-Seren, B., and Kussie, P. : Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of functional streptokinase plasminogen activator complex. *Biochemistry*, 34, 10266-10271(1995).
- Lijnen, H. R., van Hoef, B., de Cock, F., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., and Collen, D. : On the mechanism of fibrin specific plasminogen activation by staphylokinase. *J. Biol. Chem.*, 266, 11826-11832(1991).
- Medved, L. V., Solovjov, D. A., and Ingham, K. C. : Domain structure, stability and interactions in streptokinase. *Eur. J. Biochem.*, 239, 333-339(1996).
- Arai, K., Mimuro, J., Madoiwa, S., Matsuda, M., Sako, T., and Sakata, Y. : Effect of staphylokinase concentration of plasminogen activation. *Biochem. Biophys. Acta*, 1245, 69-75(1995).
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. mihara and H. Maraki : A novel fibrinolytic enzyme in vegetable cheese Natto : a typical and popular soybean food in the Japanese diet, *Experientia*, 43, 1110-1111(1987).
- Kim, W. K., Choi, K. H., Kim, Y. T., Park, H. H., Choi, J. Y., Lee, Y. S., Oh, H. I., Kwon, I. B., and Lee, S. Y. : Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 screened from chung-kook-jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2482-2488(1996).
- Sumi, H., Maruyama, M., Yoneta, T., and Mihara, H. : Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haematol.*, 70, 289-295(1983).
- Sasaki, K., Moriyama, S., Sumi, H., Toki, N., and Robbins K. C. : The transport of ¹²⁵I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with simulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood*, 66, 67-75(1985).
- Abe, T., Kazama, M., Kinoshita, T., Naito I., Ogushi, T., Yoshimura, Y., Teruya, J., and Shimizu, N. : Shift of fibrinolysis system at oral administration of urokinase in human subjects : double blind cross over study. *Blood Vessels*, 13, 472-479(1982). (in Japanese)
- Sumi, H., Toki, N., Sasaki, K., and Robbins, K. C. : Oral administration of urokinase. *Thromb. Res.*, 20, 711-714(1980).
- Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M., and Mihara, H. : Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*, 33, 121-127(1985).
- Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I., and Robbins, K. C. : Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.*, 75, 1212-1222(1985).
- Jeong, Y. K., Yang, W. S., Kang, J. O., Kong, I. S., and Kim, J. O. : Fibrinolysis of fermented Kimchi, *Korean J. Life Science* 5(4), 203-210(1995).