

청각 산추출물에서 정제한 함황다당류의 항응고활성

박미경 · 권미향¹ · 조흥연 · 양한철*

¹고려대학교 생명공학연구소, 고려대학교 생명공학원

초 록: 청각(1.2 kg) 을 0.8% 염산 수용액(24 l)으로 추출한 추출물을 메탄올 환류, 에탄올 침전 및 투석하여 활성이 약 2배 증가된 조다당(CF-1)으로부터 2종의 항응고활성 다당류를 정제하였다. 정제는 CF-1의 DEAE-Toyopearl 이온교환 크로마토그래피와 Sephadex G-75, Sephadex G-100, Sepharose CL-6B 겔여과 크로마토그래피, HPLC 등을 이용하였다. 최종 정제 다당류획분인 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1는 분자량이 각각 80,000과 40,000 Da 이었으며, 주구성당으로서 arabinose와 galactose가 약 2:1의 몰비율로 풍부하게 함유되어 있었고, 구성당 잔기에 12~13%의 유허을 함유하는 함황성 다당류들이었다. CF-1-VIa-1와 CF-1-VIIa-1의 항응고활성을 2.5 µg/mL의 농도에서 비교하였을 때 APTT활성은 대조군에 비하여 각각 262초, 250초이었고 TT활성은 각각 130초, 70초이었으며, 분자량이 큰 CF-1-VIa-1이 다소 높은 항응고활성을 보였다. CF-1-VIa-1와 CF-1-VIIa-1의 desulfation과 sulfation을 통한 항응고활성을 비교한 결과 desulfation시 항응고활성이 각각 약 80%와 50%로 감소하였으나 sulfation시에는 약 30%와 20%로 그 활성이 증가하였다. 두 다당류는 헤파린과 달리 농도 의존적으로 불용성 피브린의 형성을 억제하므로써 antithrombin III 비의존적 트롬빈 저해활성을 나타내었으며, 칼슘이온의 킬레이트에 의한 혈액응고 저해효과는 나타내지 않았다.(1999년 1월 19일 접수, 1999년 3월 25일 수리)

서 론

해조류는 육상식물보다 훨씬 오래된 역사를 가진 식물로서 구성분의 주체는 다당류이며 세포내에 저장되어진 추출 성분으로서의 다당류와 세포벽을 구성하는 다당류로 대별된다. 후자중에서 물 또는 염용액, 알칼리 용액에 녹는 점질 다당류들이 식품 첨가물로 많이 이용되어 왔으며, 근간에는 해양생물의 성인병 관련질환의 예방과 치료등 많은 생화학적 약리효과가 입증되므로써 해조류의 생리활성 성분을 이용한 기능성식품과 약제화 등에 많은 관심과 연구들이 집중되고 있다.¹⁾ 특히 갈조류에서 분리되는 fucoidan들의 항종양활성²⁾이나 항응고활성에 관한 보고들^{3,4)}이 발표되었다.

혈관계 질환을 유도하는 혈전의 생성을 방지하는 항응고성물질(anticoagulant)은 소의 심장이나 돼지의 소장에서 추출한 heparin,^{5,6)} 거머리에서 분리한 hirudin,⁷⁾ 유기 합성 제제인 coumarin⁸⁾과 warfarin⁹⁾ 등이 있다. 이들 중 현재 임상적으로 널리 사용되고 있는 헤파린은 주로 내인성경로에 작용하여 강력한 항응고활성을 보이거나 정맥주사로만 사용될 수 있고, 반감기가 짧고, 주사시 출혈을 유발하는 부작용을 갖고 있어^{5,6)} 이런 단점을 보완할 수 있는 새로운 항응고제에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

근간에 저자들도 국내산 식용 해조류들을 대상으로 혈전 생성을 예방하여 혈액순환의 개선이 기대되는 혈액 항응고 활성(anticoagulant activity)을 검색하여 활성물질의 본체에 관련한 연구결과를 보고한 바 있다.¹⁰⁾ 그중 국내에서 주로

김치의 부재료로 사용되는 녹조류인 청각의 산성 수추출물에서 가장 높은 항응고 활성(대조군에 비해 4.3배)을 보여 청각을 0.8% 염산 수용액으로 추출한 추출물을 메탄올 환류, 에탄올 침전 및 투석하여 활성이 약 2배 증가된 조다당 CF-1을 얻었다. CF-1은 80.8%의 다당과, 8.7%의 단백질 및 13.3%의 황산기로 구성되어 있었으며, 다당류는 arabinose, galactose, 및 glucose 등이 주구성당으로 존재하였다. 이 조다당류 획분인 CF-1의 항응고 활성 본체를 확인하기 위해 pronase처리와 periodate 산화를 행한 결과 pronase 처리시에는 활성의 변화가 없었으나 periodate 산화시에는 약 70%로 활성이 감소한다는 사실로부터 CF-1의 항응고 활성은 다당류에 의해 기인됨을 알 수 있었다.¹⁰⁾

본 연구에서는 청각에서 분리된 항응고활성 조다당류 획분(CF-1)으로부터 항응고활성 다당류들을 정제하고 이들의 화학적 특성과 항응고활성 기작을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 해조류인 청각은 서울 경동시장에서 구입하였으며, 항응고 활성 측정시 이용되는 혈장(platelet pool plasma)은 고려대학교 부속병원에서 구입하여 사용하였다. Actin® Activated Cephaloplastin Reagent, Thromboplastin C Plus, Thrombin reagent (bovine)은 Dade사(USA) 제품을 사용하였다.

일반 성분 분석 및 구성당 분석

전당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric

찾는말 : 청각, 항응고활성, 함황성다당류

*연락처

acid법¹¹⁾으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법¹²⁾으로 정량하였으며, 황산기 함량은 K₂SO₄를 표준물질로하여 Dodgson의 방법¹³⁾을 변형하여 실시하였다. 구성당 분석은 Jones 등의 방법¹⁴⁾에 따라 중성당을 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography (GLC)로 분석하였고 GLC의 분석조건은 3% OV-225 chromosorb WHP 100/120의 packed column이 장착된 Shimadzu GC-14A/FID/Shimadzu C-R6A chromopac (column temp. 225°C, inject temp. 250°C, detect temp. 250°C)에서 실시하여 표준 구성당들과 retention time을 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

항응고활성 측정

항응고활성은 activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) 및 thrombin time (TT)을 이용하여 전보의 방법¹⁰⁾에 준하여 측정하였다.

항응고성 다당류의 정제

청각(1.2 kg)을 0.8% 염산 수용액(24 l)으로 추출한 추출물을 메탄올 환류, 에탄올 침전 및 투석하여 활성이 약 2배 증가된 조다당 획분(CF-1)을 DEAE-Toyopearl 650C column (Cl⁻ form, 3.5×28.5 cm)에 흡착시킨 후 증류수로 세척하고 NaCl 농도를 증가시키면서 8개의 흡착획분(CF-40-I→VIII)을 얻었다. 이 중 0.5 M NaCl에서 용출된 CF-1-VI 획분(50 mg)과 1 M에서 용출된 CF-1-VII (50 mg) 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sephadex G-100 column (2.5×95 cm)과 Sephadex G-75 column (2.5×95 cm)을 이용하여 0.2 ml/min의 유속으로 각각 겔여과 크로마토그래피를 실시하였다. Sephadex G-100에 의해 분리된 주요 항응고 활성 획분인 CF-1-VIa는 Sephadex G-75 column에, Sephadex G-75에 의해 분리된 주요 항응고 활성 획분인 CF-1-VIIb는 Sephadex G-100 column에서 재분획 하였으며, 주요 획분들을 Sepharose CL-6B column (2.5×95 cm)에서 각각 겔여과 크로마토그래피를 행하여 항응고활성 다당류인 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1을 정제하였다. 이 때 모든 정제과정은 4°C에서 실시하였으며, 각 획분들의 모니터링은 전당, 산성당, 단백질 함량과 APTT, PT, TT의 세가지 항응고활성을 비교하였다.

정제 다당류의 순도 및 분자량 측정

Sepharose CL-6B column에 의해서 단일 peak로 분리된 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1 획분의 순도를 확인하기 위하여 HPLC (Gilson, Shodex ionpack S-804)를 1 ml/min의 유속으로 실시하였으며, 정제다당의 분자량은 Dextran T-2000 (M.W. 2×10⁶), T-500 (M.W. 5×10⁵), T-70 (M.W. 7×10⁴), T-40 (M.W. 4×10⁴), T-10 (M.W. 1×10⁴), 그리고 glucose를 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-6B (2.4×89 cm)에서 구한 표준곡선과 K_{av}값을 비교하여 측정하였다.

적외선 흡수분광법 (Infra-red spectroscopy)

항응고활성 다당류 1 mg과 KBr 200 mg (200 mesh)을 혼합하여 KBr pellet을 만들어 FT-IR spectrophotometer (BOMEM Michelson Series MB 102-C15)를 사용하여 transmittance를 측정하였다.

Thrombin 저해양식 조사

항응고성다당류 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1의 thrombin에 대한 저해 양식을 조사하기 위하여 순수 fibrinogen (1.5 mg/ml) 1.0 ml, thrombin (0.5 unit) 용액 0.1 ml, 시료(CF-1-VIa-1, CF-1-VIIa-1, heparin) 용액 0.1 ml을 함유한 혼합액을 37°C에서 5분간 반응시킨 후 생성된 불용성 fibrin을 350 nm의 흡광도를 측정하였다.

항응고활성 다당류의 sulfation과 desulfation

항응고성다당류 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 원심 분리하여 얻은 잔사에서 에탄올침전하여 sulfated polysaccharide를 얻었다. 다당의 desulfation은 10%의 물이 함유된 DMSO (dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 100°C에서 7시간 반응시키고 동량의 증류수로 희석한 다음 0.1 M NaOH를 이용하여 pH 9로 조정후 투석, 동결건조하여 시료로 사용하였다. 각각의 시료에 대하여 IR 분석(FT-IR spectrophotometer, BOMEM Michelson Series MB 102-C15)과 황산기의 화학정량후 항응고활성을 측정하였다.¹⁵⁾

결과 및 고찰

청각으로부터 항응고성 다당류의 정제

본 실험에 이용된 청각의 산 추출물에서 분획한 항응고 활성 획분 CF-1의 주성분은 다당류이었지만 소량의 단백질이 함유되어 있어 항응고 활성에 관여하는 당과 단백질의 영향을 검토한 결과 주로 다당류 부위에서 항응고활성이 기인됨을 보고한 바¹⁰⁾ 있으므로 CF-1으로부터 항응고활성 다당류를 정제하고자 하였다.

CF-1 획분을 DEAE-Toyopearl 650C (Cl⁻ form)를 이용하여 NaCl 농도증가 이온교환 크로마토그래피를 실시하여(크로마토그램 생략) 얻어진 8개의 획분에 대하여 APTT, PT, TT에 대한 항응고활성을 조사하였다. Table 1의 결과에서 각 획분을 250, 25, 2.5 µg/ml의 농도로 측정하였을 때 CF-1-VI (0.5 M NaCl 용출획분)과 CF-1-VII (1 M NaCl 용출획분) 시료에서 높은 항응고활성을 나타내었다. 또한 두 획분의 수율이 각각 31.5%와 21.5%로 다른 획분들에 비하여 높았으므로 이들을 대상으로 정제를 진행하였다.

CF-1-VI을 Sephadex G-100 칼럼을 이용한 겔여과크로마토그래피를 이용하여 분리한 획분들을 2.5 µg/ml의 농도로 항응고활성을 측정한 결과(Fig. 1), 분자량이 가장 큰 획분인 CF-1-VIa가 APTT 235.5초, PT 21.5초, TT 94초로 가장

Table 1. Anticoagulant activity of the subfractions of CF-1 by IEC on DEAE-Toyopearl 650 C column

	($\mu\text{g/ml}$)	APTT (sec)	PT (sec)	TT (sec)
CF-1-I	250	42	17	16
	25	40	17	15
	2.5	39	17	15
CF-1-II	250	40	17	15
	25	40	17	16
	2.5	40	17	16
CF-1-III	250	39	17	15
	25	40	16	17
	2.5	39	17	19
CF-1-IV	250	40	16	15
	25	40	17	15
	2.5	39	15	15
CF-1-V	250	42	16	17
	25	40	16	15
	2.5	40	16	15
CF-1-VI	250	>600	123	>600
	25	545	20	342
	2.5	152	16	25
CF-1-VII	250	>600	136	>600
	25	465	39	268
	2.5	165	25	56
CF-1-VIII	250	177	45	90
	25	65	17	20
	2.5	40	16	17

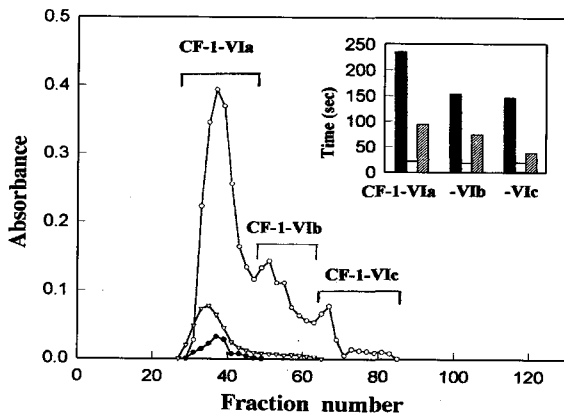


Fig. 1. Purification of the fraction CF-1-VI by gel permeation chromatography on Sephadex G-100 and the anticoagulant activity of its subfractions. Fraction CF-1-VI (50 mg) was applied to a column (2.5×95 cm) and eluted with 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.2 ml/min. The anticoagulant activity of each fraction was assayed at concentrations of 2.5 $\mu\text{g/ml}$. ○: Total sugar, ●: Uronic acid, ▽: Protein, ■: APTT, □: PT, ▨: TT.

높은 활성을 나타내었다. CF-1-VIa를 Sephadex G-75에서 재분획하여 얻어진 세 개의 획분에 대하여 동일농도(2.5 $\mu\text{g/ml}$)에서 항응고활성을 비교한 결과(Fig. 2), APTT와 TT의 활성은 분자량 크기에 따라 CF-1-VIa-1 > CF-1-VIa-2 > CF-1-VIa-3의 순서로 나타났으며, PT경로의 활성은 세 획분 모두 뚜렷하지 않았다. IEC에서 얻은 항응고활성 획분 CF-1-VII도 Sephadex G-75 column에서 2개의 획분으로 분리하여 동일한 방법으로 항응고활성을 조사한 결과(Fig. 3),

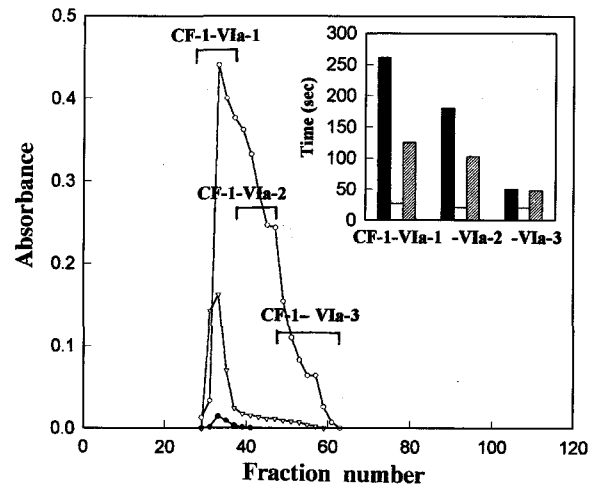


Fig. 2. Purification of the fraction CF-1-VIa by gel permeation chromatography on Sephadex G-75 and the anticoagulant activity of its subfractions. Fraction CF-1-VIa (50 mg) was applied to a column (2.5×95 cm) and eluted with 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.2 ml/min. The anticoagulant activity of each fraction was assayed at concentrations of 2.5 $\mu\text{g/ml}$. ○: Total sugar, ●: Uronic acid, ▽: Protein, ■: APTT, □: PT, ▨: TT.

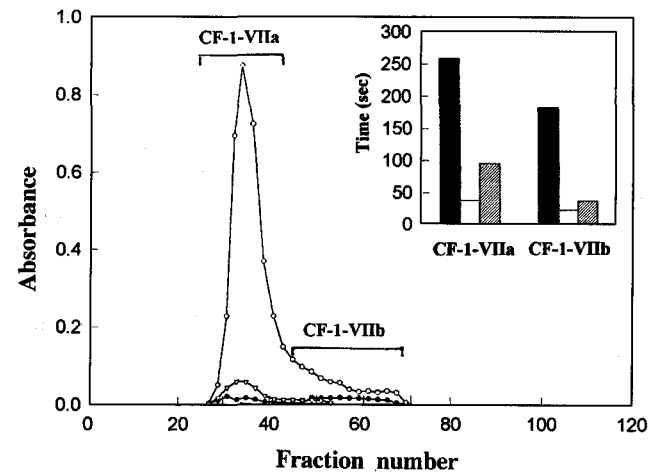


Fig. 3. Purification of the fraction CF-1-VII by gel permeation chromatography on Sephadex G-75 and the anticoagulant activity of its subfractions. Fraction CF-1-VII (50 mg) was applied to a column (2.5×95 cm) and eluted with 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.2 ml/min. The anticoagulant activity of each fraction was assayed at concentrations of 2.5 $\mu\text{g/ml}$. ○: Total sugar, ●: Uronic acid, ▽: Protein, ■: APTT, □: PT, ▨: TT.

CF-1-VIIa가 APTT 258.5초, PT 37.3초, TT 94.6초로 CF-1-VIIb보다 높았다. CF-1-VIIa를 Sephadex G-100에서 재분획하여 얻어진 2개의 획분에 대하여 항응고 활성을 조사한 결과(Fig. 4), 역시 분자량이 큰 획분인 CF-1-VIIa-1에서 항응고활성이 높았으나, APTT가 250초로 CF-1-VIIa에 비하여 약간 감소되는 경향을 보였다. 주요 활성획분인 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1을 Sepharose CL-6B 컬럼에서 겔여과를 실시하여 최종 정제한 후(크로마토그램 생략), HPLC에서 거의 단일한 획분으로 얻을 수 있었다(Fig. 5).

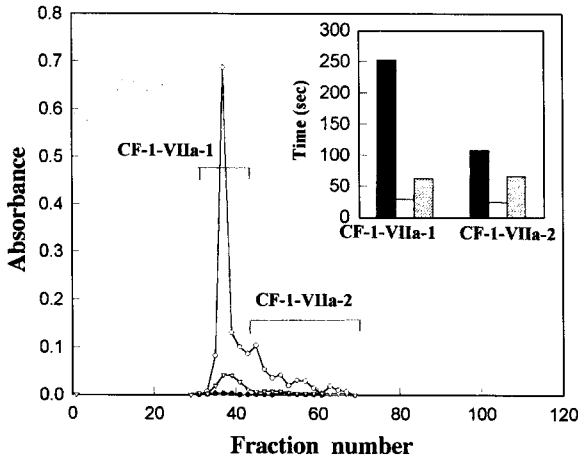


Fig. 4. Purification of the fraction CF-1-VIIa by gel permeation chromatography on Sephadex G-100 and the anticoagulant activity of its subfractions. Fraction CF-1-VIIa (50 mg) was applied to a column (2.5x95cm) and eluted with 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.2 ml/min. The anticoagulant activity of each fraction was assayed at concentrations of 2.5 µg/ml. ○: Total sugar, ●: Uronic acid, ▽: Protein, ■: APTT, □: PT, ▨: TT.

Table 2. Chemical analyses of the purified anticoagulant polysaccharides from *Codium fragile*

	CF-1-VIa-1	CF-1-VIIa-1
Total sugar (%)	90.8	88.1
Uronic acid (%)	1.3	2.3
Protein (%)	0.9	1.2
Sulfate (%)	13.0	12.3
Molecular weight (Da)	80,000	40,000
Component sugar (molar ratio)		
Rhamnose	1.0	1.0
Fucose	0.4	1.2
Arabinose	47.1	38.5
Xylose	0.7	1.7
Mannose	0.5	<0.1
Galactose	20.1	20.2
Glucose	2.7	<0.1

분자량은 갈조류 기원의 항응고성 다당류들인 fucoidan(미역 38,000 Da, 다시마 31,000 Da)들³¹⁾과는 비슷한 수준이었다. 항응고성 다당류들의 분자량과 상호활성간의 관계에서 분자량이 큰 경우에 오히려 활성이 감소된다는 보고¹⁸⁾가 있으나 CF-1-VIa-1의 경우 분자량이 작은 CF-1-VIIa-1보다 다소 활성이 큰 점은 특이하였다. Table 2의 결과에서 두 다당류는 모두 기존의 heparinoid들과 fucoidan성 다당류들과 유사하게 황산기를 함유하고 있으나 그 함량은 보고된 fucoidan성 다당류들(23~26%) 보다는 낮은 12% 정도로 측정되었다. CF-1에 10% 정도 함유된 단백질¹⁹⁾은 정제가 진행됨에 따라 점차 감소되었으며 최종 정제 다당류인 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1에는 거의 1% 미만으로 존재하는 것으로 보아 항응고활성에서 단백질이 관여하지 않을 것으로 판단한 전보의 연구결과와 일치하였다. 다당류들의 구성당 조성을 비교하였을 때(Table 2), heparinoid들에 다량 존재하는 산성당이나 갈조류 기원의 fucoidan에 다량 존재하는 fucose는 미량 검출되었으며 arabinose와 galactose들이 대부분의 구성당으로 존재하는 arbinogalactan 형태의 특성을 보였다. CF-1-VIa-1의 경우 arabinose와 galactose의 몰비가 약 5:2이었으며 나머지 glucose, rhamnose, xylose등이 미량 함유되어 있었으며, CF-1-VIIa-1도 주구성당으로서 arabinose와 galactose가 2:1의 몰비로 구성되어 있었으며 CF-1-VIa-1과는 달리 glucose는 검출되지 않았다.

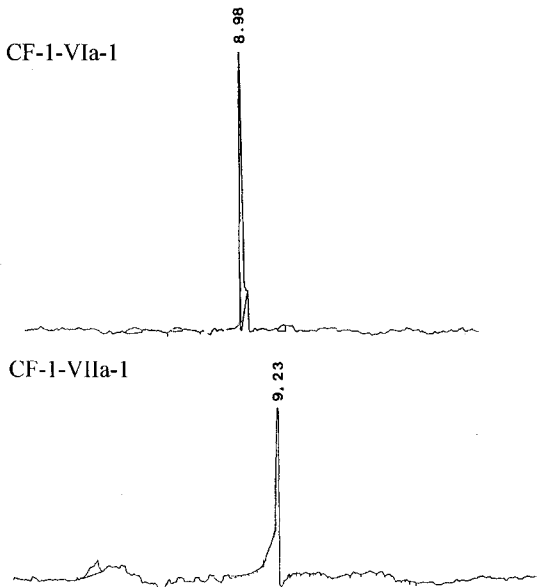


Fig. 5. HPLC pattern of CF-1-VIa-1 and CF-1-VIIa-1. HPLC was performed on a Gilson instrument equipped with RI detector and Shodex ionopack S805 using isocratic 0.2M NaCl.

항응고활성 정제 다당류들의 화학적 특성

청각 산추출물로부터 정제한 항응고활성 다당류들의 화학적 성질을 비교하고자 Sepharose CL-6B column을 이용하여 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1의 분자량을 표준 dextran들과 비교하여 측정한 결과(크로마토그램 생략) 각각 80,000 Da과 40,000 Da 정도로 측정되었다(Table 2). 이는 Yamamoto¹⁸⁾ 등이 보고한 청각 기원 다당류들의 평균 분자량(90,000 Da)과는 다소 차이가 있지만 해조류가 계절, 서식지 등에 따라 성분의 변화와 추출방법의 차이로 추정된다. 일반적으로 heparinoid들의 항응고 활성이 분자량 1,000~3,000에서 가장 높다는 기존의 연구결과들³⁴⁾에 비하여 상당히 큰 편이나 CF-1-VIIa-1의

청각 항응고활성 다당류들의 작용특성

Heparin이 혈액응고계에서 주로 외인성 경로를 통하여 작용하는 것과는 달리 청각에서 정제한 항응고성 다당류인 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1는 APTT와 PT에서 동시에 혈액응고를 지연시키으로써 혈액응고계에서 내인성 경로와 공통경로에 작용하여 항응고 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이들의 APTT의 항응고 활성은 heparin의 약 40%에 해당되는 크기였으나 fucoidan들보다는 20~30% 이상 높은 수준이었다.³¹⁾ Heparin은 antithrombin III 와 결합함으로써 antithrombin III의 항응고 활성을 증폭시켜 항응고 활성을 나타내는데 이 두 물질 사이의 결합 부위는 명확히 밝혀지지 않았으나

Table 3. IR absorption of the two anticoagulant polysaccharides

CF-1-VIa-1	857 cm ⁻¹ , 890 cm ⁻¹ , 1046 cm ⁻¹ , 1248 cm ⁻¹ , 1637 cm ⁻¹ , 3442 cm ⁻¹ ,
CF-1-VIIa-1	668 cm ⁻¹ , 760 cm ⁻¹ , 854 cm ⁻¹ , 1253 cm ⁻¹ , 1647 cm ⁻¹ , 2351 cm ⁻¹ , 3445 cm ⁻¹

Table 4. Changes in the anticoagulant activity of the anti-coagulant polysaccharides by sulfation or desulfation

	APTT (sec)	PT (sec)	TT (sec)
Native	259	28	125
CF-1-VIa-1 Sulfated	328	31	157
Desulfated	46	21	18
Native	249	33	67
CF-1-VIIa-1 Sulfated	296	31	120
Desulfated	105	23	29

The concentration of each sample was 2.5 µg/ml.

heparin의 negative charge 즉 황산기와 antithrombin III의 Lys/Arg 잔기 사이에서의 정전기적 상호결합(electrostatic interaction)이라고 보고되고 있다.⁵⁰ Heparin과 항응고성 fucoidan들의 항응고 활성이 다당류들의 황산기 함량과의 상관성에 관한 보고가 있어 왔으므로¹⁶⁾ CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1의 항응고활성에서 황산기의 역할을 검토하기 위하여 다당을 각각 sulfation과 desulfation시킨 후에 활성의 변화를 관찰하고자 하였다. 모 다당류들의 IR 분석 결과에서 (Table 3) 모두 1250 cm⁻¹부근의 과장(CF-1-VIa-1: 1248.34 cm⁻¹, CF-1-VIIa-1: 1253.43 cm⁻¹)을 흡수하므로 구성당 잔기의 hydroxyl 기에 sulfate ester 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 deesterification을 통한 다당류의 desulfation과 free hydroxyl기에 sulfation을 화학적으로 유도하고 IR분석을 통하여 sulfate ester의 흡수패턴으로 구조수식 정도를 확인한 후, 각각을 모다당류와 항응고활성을 비교하였다. Table 4의 결과에서 desulfation시 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1 모두 APTT와 TT 경로의 항응고활성이 모다당류에 비하여 50% 이상 급격히 감소하였으나, 다당류들의 sulfation시 오히려 APTT와 TT의 항응고활성이 20-30% 증가하였다. 이와같이 다당류의 sulfation을 통한 항응고활성의 증폭과 desulfation을 통한 항응고활성의 감소 경향은 CF-1-VIIa-1보다 CF-1-VIa-1에서 더 뚜렷하였다. 따라서 청각중의 항응고성 다당류들도 heparin이나 다른 fucoidan성 함황다당류들과 마찬가지로 항응고활성에 황산기가 관여할 것으로 사료되었다.

혈액응고계에 있어서 청각 항응고성 다당류들의 트롬빈에 대한 저해양식을 조사하고자 순수 정제된 피브리노겐을 기질로 하여 트롬빈에 대한 저해활성을 측정하였다. Table 5의 결과를 보면 다당류들의 농도가 증가할수록 350 nm에서의 흡광도가 감소하는 경향을 볼 수 있는데 이것은 두 다당류들이 농도 의존적으로 가용성의 피브리노겐에서 불용성의 피브린으로의 전환을 억제함을 의미한다. 이에 비해 헤파린의 경우는 350 nm에서 흡광도가 농도에 비의존적으로 감소하므로 헤파린의 트롬빈에 대한 작용기작은 기존의 보고⁵⁰와 같이 혈액중에 정상적으로 포함되어 있는 thrombin III의 활성을 증폭시켜 간접적으로 트롬빈의 활성을 저해함을

Table 5. Effect of CF-1-VIa-1, CF-1-VIIa-1 and heparin on fibrin formation

	Concentration (µg/ml)	Turbidity (350 nm)
Heparin	25	0.20
	50	0.23
	100	0.19
CF-1-VIa-1	100	0.20
	200	0.19
	300	0.18
	400	0.17
CF-1-VIIa-1	100	0.21
	200	0.20
	300	0.19
	400	0.18

Table 6. Effect of calcium ion on the anticoagulant activity of CF-1-VIa-1 and CF-1-VIIa-1

Calcium conc. (M)	Control (sec)	CF-1-VIa-1 (sec)	CF-1-VIIa-1 (sec)
0.02	39.0	69.5	62.0
0.03	40.0	76.0	70.5
0.04	46.0	99.5	81.5
0.05	53.0	98.5	88.5

The polysaccharides were assayed by ATPP at concentration of 1 µg/ml.

관찰할 수 있었다. 즉, CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1는 heparin과는 달리 antithrombin III 유무에 관계없이 직접적으로 트롬빈 저해를 일으킬 수 있으며, 기존의 fucoidan성 다당류들^{3,4)}과는 다른 기작을 통하여 항응고활성을 나타내는 것으로 생각되었다.

정제다당류들의 항응고 활성에 대해 칼슘 농도의 효과를 알아보기 위해 0.02~0.05 M의 칼슘 농도에서 항응고활성을 APTT 법으로 측정해 보았다. Table 6의 결과에서 보듯이 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1은 고농도의 칼슘이온 존재에서도 저농도와 마찬가지로 즉 칼슘농도에 관계없이 비슷한 항응고 활성을 나타냈다. 이 결과는 미생물 기원의 펩타이드성 항응고물질²⁰⁾과 같이 정제다당류들의 항응고 활성이 칼슘 이온을 chelating함으로써 혈액응고를 저해하기 보다는 혈액응고 효소에 직접적으로 작용하여 항응고활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이것은 혈액응고과정에서 주로 외인성 경로를 통하여 항응고활성을 나타내는 tissue factor들이 외인계뿐 아니라 내인계에도 관여한다는 최근의 보고²¹⁾에서 본 다당류들이 tissue factor로서 작용할 가능성도 배제할 수 없으므로 확인해 볼 필요가 있을 것 같다.

결론적으로 청각에서 분리한 항응고활성 다당류들인 CF-1-VIa-1과 CF-1-VIIa-1은 혈액응고계에 기존의 heparin이나 fucoidan성 함황다당류들과는 달리 APTT와 PT에서 동시에 혈액응고를 지연시킴으로써 혈액응고계에서 내인성 경로와 공통경로에 작용하여 항응고 활성을 나타내며, 직접적으로 thrombin을 저해하여 antithrombin III 비의존적으로 혈액응고를 억제할수있는 것으로 판단되었다. 이들 다당류들의 마우스에 대한 독성실험 결과 독성은 없는 것으로 확인되었으며 현재 이다당류들의 식이실험을 통한 항응고활

성이나 혈전생성 억제능 등을 조사하여 혈액순환 개선용 기능성식품 제품화의 가능성 여부를 검토중에 있다.

감사의 글

이 연구는 해양수산부 수산특정연구개발과제의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과와 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Choi, J. H., Kim, I. S., Kim, J. I. and Yoon, T. H. (1992) Studies on anti-aging action of brown algae, *Undaria pinnatifida*. *Bull. Korean Fish Soc.* **25**, 181-188.
- Furusawa, E. and Furusawa, S. (1990) Anti-tumor potential of low dose chemotherapy manifested in combination with immunotherapy of Viva-natural, a dietary sea weed extract, on Lewis lung carcinoma. *Cancer Letters* **50**, 71-75.
- Nishino, T., Kiyohara, H., Yamada, H. and Nagumo, T. (1991) An anticoagulant fucoidan from brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochem.* **30**, 535-541.
- Frank, C. C., Meade, J. B., Treanor, R. E. and Whinna, H. C. (1989) Antithrombin activity of fucoidan. *J. Biol. Chem.* **264**(6), 3618-3622.
- De Swart, C. A. M., Nijmeyer, B., Roelofs, J. M. M. and Sixma, J. J. (1982) Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans. *Blood* **60**, 1251-1257.
- Kumada, T. and Abiko, Y. (1981) Comparative study on heparin and a synthetic thrombin inhibitor No. 805(MD-805) in experimental antithrombin deficient animals. *Thromb. Res.* **24**, 285-289.
- Irving, F., Adrian, D., Peter, L., Jane, E., Elizabeth, F., Tim, M. and John, M. (1993) Anticoagulant activity of Hirulog™, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Blood Coagul. Fibro.* **69**, 157-163.
- Reider, W. (1986) Vitamin K antagonism of coumarin anti-coagulation. *Biochem. J.* **236**, 685-690.
- Dzung, T., Robert, T., Weitert, B., Savilla, K. J. and Sammel, I. R. (1994) The international normalized ratio (INR) for monitoring warfarin therapy. Reliability and relation to other monitoring methods. *Ann. Inter. Med.* **120**, 552-556.
- Kweon, M. H., Park, M. K., Ra, K. S., Sung, H. C. and Yang, H. C. (1996) Screening of blood anti-coagulant polysaccharides from edible plants. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 60-66.
- Kweon, M. H., Sung, H. C. and Yang, H. C. (1994) Acidic heteroglycans with anti-complementary activity from the water extract of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Foods and Biotechnology* **3**, 83-89.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. and Rindall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-260.
- Dodgson, K. S. and Price, R. G. (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* **84**, 106-107.
- Jones, T. M. and Albersheim, P. O. (1972) A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant. Physiol.* **49**, 926-931.
- Kinzo, N., Yuko, I. and Toshio, K. (1977) Solvoltyl sulfation of glycosaminoglucuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. *Carbohydr. Res.* **58**, 47-53.
- Yamamoto, M. (1980) Some physicochemical properties of sulfated polysaccharides of several species of seaweeds. *Agric. Chem. Biol.* **44**, 673-678.
- Ku, J. H. (1994) Extraction, purification, and properties of fucoidans isolated from Korean brown algae. Ph.D. Thesis, Korea Univ., Seoul, Korea.
- Robert, J., David, B. and Rosenberg, R. (1979) Fractionation of low molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin. *J. Biol. Chem.* **254**, 2902-2906.
- Nishino, T. and Nagumo, T. (1991) The sulfate-content dependence the anticoagulant activity of fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydr. Res.* **314**, 193-199.
- Chi, C. W., Liu, H. Z., Liu, C. Y., Chibber, B. and Castellino, F. C. (1989) The inhibition of the enzymatic activity of blood coagulation and fibrinolytic serine proteases by a new leupeptin-like inhibitor and its structural analogues isolated from *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* **42**, 1506-1511.
- Kenneth, A. B. (1995) Natural anticoagulants and the pre-thrombotic state. In *Blood*, Lippincott, J. B. (Ed.) Company, Philadelphia, p.125.

Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Codium fragile*

Mee-Kyung Park, Mee-Hyang Kweon¹, Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang* (*Institute of Biotechnology, Korea University; Graduate School of Biotechnology, Korea University*)

Abstract : We have isolated two anticoagulant polysaccharides from an acidic extract of *Codium fragile*. The purification was conducted using three consecutive chromatographies of DEAE-Toyopearl 650C, Sephadex G-100 (G-75), and Sepharose CL-6B by measuring activated partial thromboplastin time (APTT). The two purified anticoagulant polysaccharides, CF-1-VIa-1 and CF-1-VIIa-1, were found to be nearly homogenous on HPLC using a gel permeation column and appeared to have molecular weights of about 80,000 Da and 40,000 Da, respectively. The polysaccharides consisted mainly of arabinose and galactose in a molar ratio of about 2 : 1, and also comprised 12-13% of sulfates at their constituent sugars. CF-1-VIa-1 and CF-1-VIIa-1 inhibited blood coagulation via both the intrinsic and the extrinsic pathways. The polysaccharides unlike heparin showed an inhibitory activity on thrombin when a pure fibrinogen without antithrombin III was used as a substrate. Structural modifications using sulfation and desulfation affected the anticoagulant activities directly, suggesting that the content of sulfate plays an important role in the blood coagulation cascade. The polysaccharides may inhibit some proteases involved in the blood coagulation cascade, judging from the independence of calcium concentrations in their anticoagulant activity.

Key words : *Codium fragile*, anticoagulant activity, sulfated polysaccharide

*Corresponding author