

蟾蜍의 血栓 溶解 酵素 分離 및 그 特性에 관한 研究

동국대학교 한의과대학 내과학교실
동국대학교 한의과대학 생화학교실 *

홍시내 · 정지천, 김철호*

ABSTRACT

A Study on the isolation and characteristics of
fibrinolysis-related enzymes from Holotrichia extract

Shi-Nae Hong · Ji-Cheon Jeong, Cheol-Ho Kim*
Dept. of Internal Medicine, Dept. of Biochemistry
and Molecular biology*,
College of Oriental Medicine, Dongguk University

A thrombus is a mass formed from the constituents of the blood within the vessels or the heart during life. The process of its formation is known as thrombosis. It has been generally accepted that Holotrichia is an useful medicine for thrombosis.

The rate of fibrinolysis of Holotrichia extracts increase as incubation times. Especially 52 days, the effect on the extracts has an maximum increased fibrinolytic activity. Heat-and-pH-stability of the extract on fibrinolysis is relative to temperature. At 37°C, it has activating effect between pH 4 and pH 12. At higher temperature, especially 80°C,

접수일 : 1999. 5. 10

심사일 : 1999. 7. 15

an excessive increase in temperature has a deactivating effect on the extracts. Optimal pH of the extract on fibrinolysis is between pH 7.0 and pH 8.5, it is effective within a relatively broad pH range.

In experiments of various inhibitors of Holotrichia extracts fibrinolytic activity, there are strong inhibitive effect on SBTI and Aprotinin, and a few inhibitive effect on DFP and t-AMCHA, no effect on PSMB and TLCK. Holotrichia extracts mixing with fibrinogen are observed Electron microscopy, it shows partially erosive-shaped fibrinolytic activity. In a SDS-PAGE of the extract having the fibrinolytic activity, three bands are found, protein 1, 2 and 3 having a molecular weight of 30,000, 45,000 and 60,000 Dalton.

Key Words : Scolopendrae corpus, two-stage carcinogenesis

I. 緒論

현대인의 가장 큰 사망 원인은 心血管 疾患 (cardiovascular disease)으로 보고되고 있는데¹⁾ 이에는 구체적으로 冠狀 動脈 疾患(coronary artery thrombosis), 腦血管 疾患(cerebrovascular thrombosis), 그리고 脈 血栓症(venous thrombosis) 등이 포함되어 있다²⁻⁴⁾. 本 疾患은 현재 매년 그 增加率이 높아지고 있으며 最近 우리 나라에서도 國民 所得의 向上과 食生活의 變化에 따른 心臟病 등으로 疾病 死亡率 가운데 1위를 차지하고 있다¹⁾. 心血管 疾患의 主된 原因은 血栓症으로 이는 生體內的 血管과 心臟內에서 凝固된 血液이 덩어리 卽 血栓(thrombus)을 만드는 현상으로, 主된 形成 要因으로는 血管 內皮 細胞의 損傷, 正常 血液流의 變化 및 血液의 過凝固性 變化 등이 있다²⁻⁵⁾.

血栓(thrombus)을 除去하기 위하여 最近까지 많은 研究가 進行되어 왔으며 그 結果 스트렙토키

나제(streptokinase), 유로키나제(urokinase)와 같은 plasminogen 活性 因子와 tPA(tissue-type plasminogen activator) 등의 遺傳工學的으로 開發한 醫藥品이 普遍的으로 使用되고 있다. 그러나, 이상과 같은 醫藥品은 臨床의 使用 時에 腎臟에 障礙가 있으며 血栓에의 非特異的 作用 등의 危險性和 高價의 비용, 經口 投與가 어렵다는 短點이 있다⁵⁾. 最近에는 既存의 血栓 용해제의 短點을 극복하기 위한 시도가 활발히 進行되고 있는데, 대표적인 것으로 血栓 溶解 活性이 강한 새로운 變移型 活性 因子의 개발과 자연 물질로부터 보다 우수하고 새로운 혈전 용해제를 개발하는 것이다⁶⁻¹¹⁾.

血栓症은 韓醫學에서 瘀血의 範疇에 屬하는데, 瘀血은 血液이 體內的 一定 部位에 阻滯되어 있는 病證으로 固定性 刺痛, 肌膚甲錯, 胸脇滿痛, 少腹硬滿, 大便色黑, 舌紫暗 或 瘀斑 등의 多樣한 臨床 症狀을 惹起시키고^{35,37,47)}, 驚悸怔忡, 鼓脹, 積聚, 癥瘕, 癲狂, 中風 등의 發病 原因이 되기도 한다¹²⁾. 이러한 瘀血의 治療에는 丹蔘, 當歸, 桃仁, 牛膝, 川芎, 紅花 등의 各種 活血劑가 使用되고 있

며 최근에는 破血 作用이 강한 水蛭, 蜈蚣, 全蝎, 蟾蜍, 地龍 등의 蟲類 藥物도 많이 活用되고 있는 趨勢이다¹³⁻¹⁶⁾.

蟾蜍는 主로 瘀血을 治療하는 藥物로 惡血, 血瘀痞氣, 破折血 在脇下滿痛, 月閉, 目中淫膚, 清翳白膜 등을 治療한다고 記載되어 있다¹⁷⁻²¹⁾. 蟾蜍에 관한 研究로는 文²²⁾, 安²³⁾ 등이 endotoxin을 처리한 흰쥐에서 血栓의 指標인 prothrombin 시간을 短縮시키고, fibrinogen의 量을 增加시키며, FDP의 濃度를 減少시켰다는 報告가 있다.

이에 著者는 蟾蜍 抽出物에서 血栓 溶解 活性을 가지는 酵素 蛋白質을 分離하고 그 特性을 糾明하기 위하여 時間 經過에 따른 活性度, 溫度 및 pH의 影響, 蛋白質의 전기영동, 血栓 分解 産物에 對한 전자현미경 관찰 등의 實驗을 통하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥物

열처리하지 않은 신선한 蟾蜍 粉末 50g을 東國 大學校 附屬 韓方病院에서 구입하여 round flask에 넣고 4°C cold chamber 안에서 20mM sodium phosphate buffer(pH 6.0) 5ml를 넣고 2시간씩 3회, 총 150ml을 여과 추출하여 추출액을 시료로 사용하였다. 장기 보존을 위해서는 추출한 뒤여과 과정을 거친 후 동결건조로 농축하여 -20°C에 보관하였다.

2) 試藥

혈전 연구에 사용한 모든 試藥은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사

용하였으며 그 외는 모두 분석용 특급 시약을 사용하였다. Aprotinin, p-nitrophenyl-p-guanidinobenzoate(NPGB), soybean trypsin inhibitor(SBTI),

N-tosyl-lysylchloromethane(TLCK), bovine fibrinogen, diisopropyl fluorophosphate(DFP), p-chloromercuribenzoic acid(PCMB), trans-4-aminomethyl cyclohexanecarboxylic acid(t-AMCHA) 등은 모두 sigma사 제품이었다.

2. 方法

1) 血栓 溶解 酵素 活性 測定 方法 (fibrin plate法)

Astrup과 Mullertz 方法²⁴⁾을 變更하여 다음과 같이 測定하였다. 즉, 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 fibrinogen의 最終 濃度가 1%가 되도록 완전히 溶解시킨 溶液 5ml를 준비하고 여기에 tryptic soy agar 5ml를 添加하여 混合한다. 混合 溶液에 100NIH U/ml 濃度의 thrombin 溶液 0.1ml를 添加하여 混合한 후 다시 tryptic soy agar 15ml를 添加하여 미리 고화시킨 petri dish 위에 붓고 실온에서 5 내지 10분간 방치하여 고화시켰다. 다음 toyo membrane disk 위에 시료 용액 100μl를 놓고 37°C에서 24시간 동안 보온한 후 15% trichloroacetic acid를 부가하여 이때 생성된 투명환(clear zone)을 확인하였다.

2) 단백질의 정량

시료의 단백질 정량은 280nm에서 흡광도를 측정하거나 bovine serum albumin(Sigma)을 표준 물질로 하여 Lowry 方法²⁵⁾을 使用하였다.

3) 온도, pH 영향 측정

온도, pH 영향은 일반법에 따라 측정하였다.

4) 蛋白質의 전기영동

Laemmli 方法²⁶⁾을 이용하여 蛋白質의 SDS 전기영동을 수행하였으며, polyacrylamide gel의 濃도는 7.5% 또는 10%를 사용하였다.

5) 전자현미경 관찰

전자현미경의 관찰은 KIST에 의뢰하여 JEOL 사(Tokyo, Japan) 제품으로 측정하였다.

III. 實驗 成績

1. 血栓 溶解 酵素 活性의 檢出

蟾螭 抽出物의 血栓 溶解 酵素의 活性을 測定하기 위하여 fibrin plate法을 사용하였다. 抽出物을 Astrup과 Mullertz 方法²⁴⁾에 따라 fibrin plate 위에 toyo membrane disk를 놓고 抽出物 시료 용액 100 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 보온한 후 15% trichloroacetic acid를 부가하여 이때 생성된 투명환(clear zone)을 확인하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 농도에 따라 흰 clear zone이 나타나 활성이 강함을 알 수 있었다.

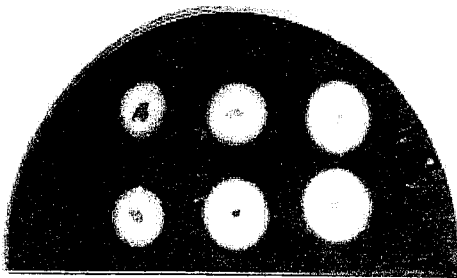


Figure 1. Demonstration of strong fibrinolysis in the *Holotrichia* extracts. Cell extracts were applied directly to a plasminogen-rich fibrin plate. The photograph was taken after 24 h at 37 $^{\circ}$ C

2. 血栓 溶解 酵素 活性의 特性

蟾螭 抽出物의 血栓 溶解 活性의 特性을 알아보기 위하여 抽出物을 0.5%의 NaN_3 溶液 内에서 時間 別로 56일간 抽出物을 37 $^{\circ}$ C에서 保溫하면서 그 活性의 變動을 fibrin plate法으로 測定하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 血栓 溶解 活性은 계속 增加하여 52일째에 最大值를 보였다. 이 結果로부터 血栓 溶解에 關與하는 酵素가 時間과 함께 活性化되고 있음을 보여줘 崔 등²⁷⁾이 報告한 地龍 抽出物과 같은 特性을 보였다.

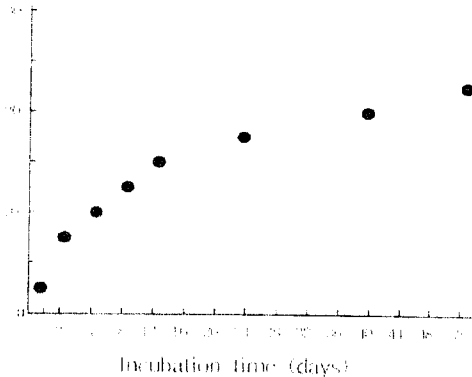


Figure 2. Incubation effect of *Holotrichia* extract on fibrinolysis. Lyophilized *Holotrichia* cell extracts were incubated for several days at 37 $^{\circ}$ C and then fibrinolytic activity was assayed in 50 μ l samples of the supernatant.

3. 血栓 溶解 酵素 活性의 pH 依存性

蟾螭 抽出物의 血栓 溶解 活性에 있어서 pH 依存性과 溫度 依存性을 조사하여 差異를 비교하였다(Fig. 3). 즉, 30 $^{\circ}$ C에서 30日間 保溫한 蟾螭 抽出物을 0.5%의 NaN_3 溶液 内에서 37 $^{\circ}$ C, 30분간 加熱한 후 pH 3.0에서 pH 12.0 範圍에서 血栓 溶解 活性들을 조사한 결과 pH 4에서 pH 12까지 範圍에서는 活性이 檢出되었다. 한편, 60 $^{\circ}$ C에서

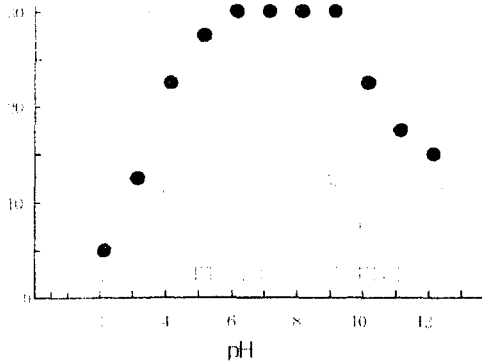


Figure 3. Heat- and pH-stability of the extract on fibrinolysis. Lyophilized *Holotrichia* cell extracts were incubated in water at several pH values and temperatures for 1 h. It was then neutralized by 30-fold dilution with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). The residual activities were assayed the lysis area on plasminogen-rich fibrin plates. Symbols: ●, 37°C incubation; ○, 60°C incubation; □, 80°C incubation.

30분간 加熱할 경우 pH 6과 pH 7 사이에서는 활성이 남아 있으나, 80°C에서 30분간 加熱하면 활성은 완전히 소실되었다. 이와 같은 결과는 Mihara 등⁸⁾이 밝힌 地龍 抽出物の 血栓 溶解 活性 成分들과 매우 類似한 反應 特性을 나타낸 것이다.

4. 血栓 溶解 酵素 活性의 最適 pH

蟾蜍 抽出物の 血栓 溶解 活性의 最適 pH는 pH 7.0에서 pH 8.5였으며, 넓은 pH 最適 活性을 가지고 있는 점이 特徵이었다(Fig. 4).

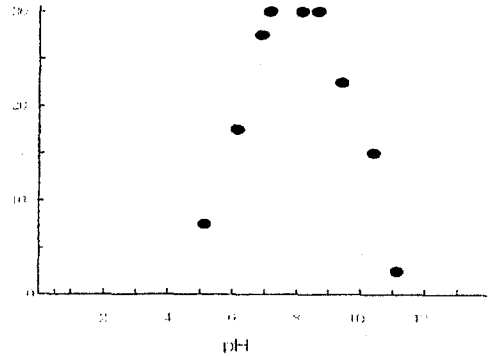


Figure 4. Optimal pH of the extract on fibrinolysis. Lyophilized *Holotrichia* cell extracts were incubated in water at several pH values for 1 h. Then the residual activities were assayed the lysis area on plasminogen-rich fibrin plates.

5. 血栓 溶解 酵素 活性에 대한 저해제 의 影響

血栓 溶解 活性에 대한 既存의 저해제들을 이용한 阻害 活性을 fibrin plate法으로 檢討하였다. 보통 血栓 溶解 活性이 fibrin plate 上에서 약 20 시간 後에나 檢出되지만 약 50일 정도 보존한 시료의 경우는 活性이 너무 強하므로 1시간 정도에서도 血栓 溶解 活性이 檢出되었다. Table 1에 나타났듯이 본 抽出物の 血栓 溶解 活性은 SBTI와 aprotinin에 依해서는 強하게 阻害를 받았으나 DFP와 t-AMCHA에 의해서는 若干 阻害를 받았다. 그러나, PSMB와 TLCK는 거의 阻害 效果가 發見되지 않았으며 DFP를 除外하고는 地龍의 結果와 비슷하였다⁸⁾. 이러한 阻害 效果는 본 抽出物の 血栓 溶解 活性을 갖는 主要 成分이 주로 serine protease 系統일 것을 시사하였다.

Table 1. Effects of various inhibitors of *Holotrichia* extracts fibrinolytic activity

Protease inhibitor	Concentration	Inhibitory activity
SBTI	10 mg/ml	+++++
Aprotinin	100 kIU/ml	+++++
DFP	10 mM	++
t-AMCHA	10 mg/ml	++
PCMB	5 mM	-
TLCK	5 mM	-

The reaction (1 ml) contained 50 μ l of the extracts (ca. 300 μ g protein), 1-10 mM each inhibitor and 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0. After incubation for 30 min at 37°C, the residual fibrinolytic activity was estimated by the plasminogen-rich fibrin plate method. Each value is the mean of 3 separate experiments.

6. 血栓溶解酵素蛋白質의 部分 정제와 전기영동 분석

血栓溶解 활성을 가진 抽出物의 蛋白質을 分析하기 위하여 전기영동법으로 分析하였다(Fig. 6). Fig. 6에서 lane 1은 粗蛋白質(crude extract)이며 lane 2와 lane 3, 4는 각각 전기영동 후 electroelution으로 活性이 강한 部分만을 분리하여 전기영동한 것이므로 分子量은 약 60,000 (lane 2의 윗 밴드)과 30,000(lane 2의 아랫 밴

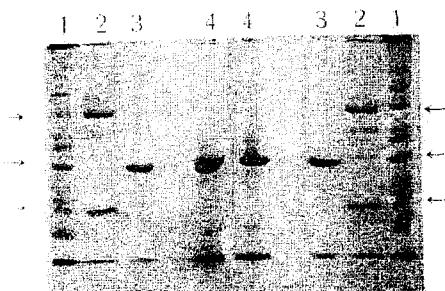


Figure 5. Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the extracts having the fibrinolytic activity

드) 그리고 약 45,000(lane 3과 lane 4) Dalton으로 확인되었다. 그 중에서도 lane 4의 分子量 약 45,000 Dalton의 蛋白質은 전체 蛋白質 중에서 量이 가장 많이 存在하는 것으로 확인되었다.

7. 血栓溶解酵素反應物의 전자현미경觀察

血栓溶解 樣式을 전자현미경으로 觀察하기 위해 fibrinogen과 本 抽出物을 섞어 1시간 동안 반응시킨 뒤 전자현미경으로 分解物을 觀察하였다. 그 結果 血栓은 部分的으로 侵蝕되어 가는 樣相으로 分解되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 6).

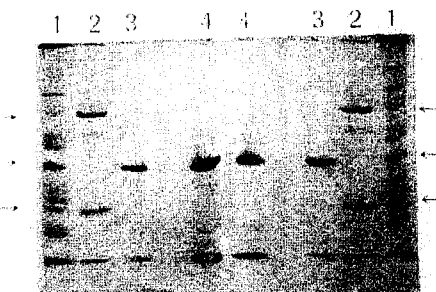


Figure 6. Electronmicroscopic observation of fibrinolytic activity
배율=200 times

IV. 考察

血栓症(thrombosis)은 活動 中인 心血管系 안에서 血液이 凝固壞를 形盛하는 것을 말하며 그 血液 凝固壞를 血栓(thrombus)이라 한다²⁾.

一般的으로 血液이 血管 內에서는 流動性을 가지고 人體를 循環하지만 일단 血管 밖으로 露出되어 나오면 急速히 凝固된다. 血管이 損傷되면 出血이 일어나게 되는데 보통 損傷 받은 血管이 動

脈 등의 큰 血管인 경우 手術로서 出血을 막아야 하지만 작은 損傷인 경우는 血管에서 自然히 止血된다. 血管 内部 表面은 內皮 細胞로 둘러 쌓여 있으며 이들 內皮 細胞는 정상적인 경우에는 血液의 凝固를 抑制하는 作用을 하고 損傷이 일어나는 境遇에는 迅速하게 止血하는 作用을 한다³⁻⁵⁾. 1

血管 內皮 細胞의 抗凝固(antithrombosis) 活性은 그 表面이 血小板의 表面과 같이 음전하(-)를 띠고 있으며 thrombomodulin 또는 heparan sulfate 등의 강력한 血液 凝固 因子를 分泌하는 것으로 유지된다. 이 때 heparan sulfate는 antithrombin-III의 活性을 促進시키는 作用을 하며 thrombomodulin은 thrombin의 酵素 活性을 抑制하는 동시에 protein C를 活性化하는 作用을 함으로서 血液의 凝固를 防止한다. 그러나 어떠한 要因에 의해 血管이 損傷되어 出血이 일어나면 血管 內에서 生理的 防禦 기작으로 止血 反應이 일어나 血液의 損失을 防止하게 된다. 즉, 血管이 損傷되는 境遇 먼저 血液의 흐름과 流出이 抑制된 다음 血液에서 循環하는 血小板이 모여서 粘着하게 된다. 그 뒤 血小板이 沈着하고 凝集한 結果 損傷 部位에 plug가 形成되고 마지막으로 損傷된 血管 周邊의 內皮 細胞와 血小板의 作用으로 폭발적인 트롬빈 생성이 血液 凝固 經路를 통하여 誘發된다.

生體 內의 生理的인 狀態에서 止血 現狀은 반드시 損傷된 血管 周邊에서만 制限的으로 일어나고 다른 部位에는 影響을 주지 않는다. 止血 過程이 완전히 끝나 血管 組織의 再生이 이루어지면 본 過程을 통해 形成된 fibrin polymer는 溶解되어야 한다. fibrin polymer는 plasmin이라는 物質에 의해 溶解되는데 plasmin은 血栓 溶解系에서 plasminogen이 活性化되어 生成된 것이다. 이와 같이 plasmin은 fibrin을 溶解하는 主酵素로 作用하지만 血液 凝固에 중요한 fibrinogen에 대해서도 높은 分解 活性을 가지고 있다. 따라서 자유 plasmin이 지나치게 多量으로 存在하면 血液 凝固 作用이 抑制되어 出血 危險性이 크므로 이러한

문제를 극복하기 위해서는 生體 內에 plasmin에 대한 抑制 因子가 血液 內에 存在한다. 또한, plasminogen 活性 因子(plasminogen activator)에 의한 plasminogen의 活性化도 血栓(fibrin clot)이 形成된 곳에서만 일어나도록 plasminogen 抑制 因子(plasminogen activator inhibitor, PAI)가 정교하게 조절하고 있다²⁻⁵⁾.

生體 反應 기작으로 腦血管에 血栓이 生成되어 腦血栓症이 일어나면 半身不隨가 되고, 腦의 微細 血管이 破裂되어 腦出血이 일어나 腦와 頭蓋骨 사이의 空間으로 出血되는 蜘蛛膜下 出血 등이 일어나면 生命에 치명적인 상태를 야기한다. 또한, 血栓에 의해 心臟 血管이 막히면 心不全症이나 心臟 麻痺가 발생된다. 따라서 사망의 중요한 원인이 되는 血栓(thrombus)을 제거하기 위하여 많은 연구가 進行되어 왔으며 그 결과 스트렙토키나제(streptokinase)와 유로키나제(urokinase) 같은 plasminogen 活性 因子가 매우 有用함이 알려져 이들을 정맥 주사하여 血栓 溶解系(fibrinolytic system)를 活性化하는 治療法이 지난 30여년간 普遍的으로 사용되어 왔다. 이 두 가지 藥劑를 實際로 使用하였을 때 血栓 溶解에 상당한 效果가 있음이 이미 수많은 臨床 例에서 입증되었으나 다른 한편으로는 血栓에 대한 特異性이 없으므로 治療 동안에 全身 出血(systemic haemorrhage) 등의 부작용이 있다고 보고되었다. 以外에도 1987년 유전 공학적 방법으로 tPA (tissue-type plasminogen activator)가 개발되었는데 이는 血栓과 직접 結合함으로써 그 選擇性이 높아 처음에는 理想的인 血栓 溶解劑로 認識되었다. 그러나 실제 臨床 治療 結果에서는 스트렙토키나제(streptokinase)나 유로키나제(urokinase) 투여시와 같은 부작용이 여전히 나타나고 血液 內 半減期가 6分 정도로 매우 짧아 사용이 불편한 問題點 등이 지적되었다²⁻⁴⁾.

따라서, 最近에는 이들 既存의 혈전 용해제의 短點을 극복하는 좀 더 나은 血栓 溶解劑를 제공하기 위한 시도가 활발히 進行되고 있다. 그 代表

의인 것으로 첫째는 血栓 溶解 活性이 강한 새로운 변이형 活性 因子를 開發하는 것이며 두번째는 自然 物質로부터 보다 우수한 血栓 溶解能을 가지는 動物, 植物 또는 微生物 由來의 새로운 血栓 용해제를 개발하는 것이다. 自然界의 여러 生物에서 存在하는 血栓을 溶解할 수 있는 物質을 廣範圍한 探索 技術을 活用하여 새로운 혈전 용해제로 개발할 수 있으므로 이러한 目的으로 수많은 시도가 이루어졌다. 특히, 植物을 이용한 研究가 활발하여 이미 TFPI (tissue factor pathway inhibitor)에 대한 많은 연구가 보고되어 있다. 具體적으로 은행잎에서 추출한 성분이 血流 循環을 원활히 해 주는 것으로 알려져 이를 사용한 제제들이 개발되어 상품화되었다.

한편, 動物에서도 血栓을 溶解하는 것으로 알려진 많은 物質들이 存在한다고 報告되어 왔다. 具體적인 例로는 1989년 미국 Merck사 연구소에서 흡혈 박쥐의 침샘으로부터 분리한 신규 plasminogen 活性 因子⁷⁾, 蛇毒에서 분리한 살모나제 (Salmonase)⁶⁾, 水蛭에서 분리한 헤멘틴(hematin) 그리고 蜈蚣에서 분리된 피브린 분해 효소 (fibrinolytic enzyme)⁸⁾ 등을 새로운 血栓 용해제로 보고한 바 있다.

또한, 微生物에서도 여러 가지 血栓 溶解 物質이 확인되었다. 그 대표적인 것으로 β -헤모리틱 스트렙토코커스(β -haemolytic streptococci)에서 분리한 스트렙토키나제(streptokinase)가 있으며 以外에 1948년에 보고된 스타필로코커스(staphylococcus)에 존재하는 스타필로키나제(staphylokinase), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)에서 발견된 CA-7, 브리노라제(brinolase), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)에서 발견된 피브리노리신(fibrinolysin), 바실러스 속(*Bacillus sp.*) 균주에서 발견된 피브린 분해 효소(fibrinolytic enzyme)¹¹⁾ 등이 血栓 용해제로 보고되고 있다.

현재까지 血栓症(thrombosis)의 治療에 널리 사용되어 왔던 의약품인 스트렙토키나제(strept-

okinase), 유로키나제(urokinase) 그리고 tPA (tissue-type plasminogen activator) 등과 같은 의약품은 臨床적으로 사용하기에 몇 가지의 短點이 있었다. 이는 구체적으로 본 약제들이 우선 부작용의 위험성이 크고 高價이며 유로키나제(urokinase)를 除外하고는 經口 投與가 不可能하다는 것이다.

따라서 최근에는 血栓 溶解劑를 血管 注射로만 投與할 수 있는 以外에 直接 經口 投與하여 또는 血管 注射와 병용하여 血液 內的 血栓 溶解能을 증가시킬 수 있는 제제에 관심을 갖게 되었다. 현재 經口 投與 가능한 혈전 용해제로는 地龍(*Lumbricus lubellus*)으로부터 분리한 6가지 血栓 溶解 酵素가 있으며 이는 우리 나라에서 제약화되어 있다^{9,10)}. 또한, Sumi 등의 보고에 의하면 유로키나제(urokinase)를 장내에 투입하여 흡수시키면 血液內的 血栓 溶解能이 현저히 증가한다고 보고하였다²⁸⁾. 이는 腸에서 吸收된 유로키나제가 肝으로 運搬되어 血栓을 溶解하는 酵素의 合成을 促進함으로써 血栓 溶解能이 증가하는 것을 나타내는 것으로서 이러한 사실은 血栓 溶解 酵素를 腸內에 직접 투여하여 血液內的 血栓 溶解能을 증가시키는데 사용할 수 있는 應用性을 시사하였다²⁹⁻³²⁾. 또한, 일본의 전통 발효 식품인 시오카라(shiokara)와 낫토(natto)에서 血栓 溶解 酵素가 存在함이 알려져 직접 그 酵素가 분리되었는데, 그중 낫토로부터 분리된 낫토키나제(nattokinase)라는 酵素는 經口 投與하는 경우에도 生體 內的 血栓 溶解能을 높일 수 있다는 보고가 있다^{33,34)}.

血栓症은 韓醫學에서 瘀血의 概念으로 파악³⁵⁾되고 있는데, 瘀血은 血液의 運行이 障礙를 받아서 脈管 또는 脈管을 벗어난 어떤 부위에 瘀滯된 것을 말한다³⁶⁾. 이때 瘀血은 정상적인 생리 기능을 상실한 血液이 凝集하여 형성된 一種의 病理 現狀이다³⁷⁾. “瘀血”은 『金匱要略』의 “驚悸吐衄下血胸滿瘀血病”篇에 最初로 收錄되어 있으며 實質적인 內容 面에서는 『內經』과 『靈樞』중의 “惡血”³⁸⁾에서 그 起源을 찾을 수 있다³⁹⁾. 以後 歷代

醫家에 의하여 發展되어 왔는데 그 名稱에 있어서도 留血, 惡血, 衄血, 敗血, 畜血, 積血, 死血, 汚血, 血凝 등^{38,40-44)}으로 다양하게 표현되어 각종 疾病을 일으키는 原因으로 제시되고 있다.

瘀血은 正氣不足, 津液不足, 內熱 및 기타 打撲傷 등이 原因³⁶⁾으로 部位에 따라서 心血이 瘀滯되면 心痛 胸悶 口脣靑紫하고, 肺血이 瘀滯되면 胸悶 咯血하고, 肝血이 瘀滯되면 脇痛 痞塊하고, 胃脘에 瘀血이 있으면 嘔血 便血하고, 瘀血이 上焦에 있으면 或髮脫不生 或骨膊胞隔頑硬刺痛 目不了了하며, 中焦에 있으면 腹痛脇痛 腰臍間刺痛 着滯血府하고, 下焦에 있으며 季脇少腹脹滿刺痛 大便黑하며 脈沈細澁하는 등의 症狀이 나타난다고 하였다³⁹⁾.

近代로 오면서 瘀血은 “血氣不和 百病乃變化而生”이라 하여 단순히 血毒으로서의 非生理的인 血液만을 의미하는 것이 아니라 血滯라는 循環障礙의 病理的 狀態를 基盤으로 하는 특수한 症候群까지도 포함한다³⁶⁾. 이는 西洋醫學에서의 血液 循環障礙로 인한 鬱血, 出血, 血栓 및 水腫 등과 炎症으로 인한 組織의 滲出, 變性, 괴사, 萎縮 혹은 增殖 등과 代謝 障礙로 인한 組織의 變化 등을 포괄하는데⁴⁵⁾ 最近 尹 등^{46,47)}은 血栓症을 瘀血의 範疇에 포함시켰으며, 俞 등^{48,49)}은 瘀血 治療劑가 血栓症 治療에 效果가 있음을 實驗的으로 立證하였다.

蟻螞는 풍뎅이의 幼蟲인 굼벵이를 乾燥한 것으로, 『神農本草經』¹⁹⁾에 最初로 記載되어 있으며 蟻, 蟻螞, 蜚齊, 乳齊, 地蠶, 應條, 老母虫, 核桃虫 등의 異名이 있다. 性溫 味鹹하고 肝經에 入하며 主治는 여러 文獻에서 主惡血, 血瘀痞氣, 破折血在脇下滿痛, 月閉, 目中淫膚, 清翳白膜, 金瘡內塞, 赤白游疹 등으로 記載되어 있으며 主로 瘀血을 治療하는 藥物로 사용되어 왔다¹⁷⁻²¹⁾.

이에 著者는 이와 같은 人體의 血栓 關聯 疾患을 背景으로 韓醫學에서 活血劑로 주로 쓰이는 動物性 藥材인 蟻螞 抽出物에서 血栓 溶解 活性을 가지는 蛋白質 酵素의 特性을 實驗的으로 糾明하

여 그 效果를 檢討하였다.

蟻螞 抽出物의 血栓 溶解 活性을 檢出하기 위하여 37℃에서 24시간 保溫한 후 fibrin plate法을 사용한 결과 투명환(clear zone)이 나타나는 것이 확인되었다. 이 투명환은 濃度 增加에 比例하여 環의 크기가 增加하는 것을 볼 수 있는데 이는 蟻螞 抽出物의 濃度 增加에 따라 活性 또한 增加한다는 것을 시사하는 것이다. 이 實驗에서 蟻螞는 他 血栓 溶解劑에 비하여 강력한 血栓 溶解 活性을 지니고 있음을 알 수 있었다.

蟻螞의 血栓 溶解 活性의 特性을 알아보기 위하여 56일간 37℃에서 保溫하면서 活性의 變動을 測定한 實驗에서는 酵素가 時間 經過와 함께 活性化되었으며 52일째 最大値를 나타내었다. 52일 이후에는 活性이 減少되었으며 活性의 增加는 初期 12일째까지는 急速하게 이루어졌으며 12일부터 52일째까지는 緩慢한 活性의 增加를 보였다.

血栓 溶解 活性의 差異를 比較하기 위하여 pH 依存性과 溫度 依存性을 조사한 結果 37℃에서 30分間 加熱한 경우 pH 4에서 pH 12까지 범위에서 活性이 검출되었으며, 80℃에서 加熱할 경우 活性은 완전히 소실되었고, 60℃에서는 pH 6과 pH 7 사이에서 活性이 남아 있었다. 이 實驗에서 알 수 있는 것은 蟻螞의 血栓 溶解 活性은 體溫과 유사한 範圍에서 가장 우수한 效果를 나타내며 高溫으로 加熱할 경우 蛋白質의 變性에 의해 血栓 溶解 活性이 消失되는 점을 알 수 있었다. 이 實驗 結果로 미루어 보아 蟻螞는 煎湯을 하지 않고 沖服하거나 散劑로 服用하는 편이 더 優秀한 效果를 나타낸다고 사료된다. 血栓 溶解 活性의 가장 適合한 pH는 7.0에서 8.5였으며 넓은 pH 最適 活性을 가지고 있는 것으로 나타났다.

血栓 溶解 活性을 나타내는 蛋白質 分解 酵素로는 serine protease와 SH protease 系統이 있다. 蟻螞의 血栓 溶解 活性을 나타내는 成分을 알아보기 위하여 기존의 저해제들을 이용한 阻害 活性 實驗을 시행한 결과 SBTI과 aprotinin에 의해서는 강하게 阻害를 받았으며 PSMB와 TLCK는

거의 阻害 效果가 發見되지 않았다. 이는 地龍의 實驗 結果와 유사하였는데 이로 인하여 蟻螞 抽出物의 血栓 溶解 活性의 主要 成分은 serine protease 系統일 것으로 推定되었다⁴⁾.

蟻螞 抽出物의 血栓 溶解 樣式을 알아보기 위하여 전자현미경으로 관찰한 결과 血栓은 광범위한 범위에서 部分的으로 侵蝕되어서 分解되고 떨어져 나가는 양상을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

血栓 溶解 活性을 가진 酵素 蛋白質을 分析하기 위하여 전기영동법을 시행하여 活性이 강한 부분을 분리하여 다시 전기영동한 결과 分子量이 약 60,000과 30,000 그리고 45,000 Dalton의 3종류의 酵素 蛋白質을 확인하였으며 그 중 分子量 45,000 Dalton의 蛋白質이 가장 多量 存在하였다. 이 蛋白質들이 蟻螞 抽出物에서 血栓 溶解 活性을 가지는 신규 酵素로 추정된다.

以上の 實驗 結果들을 綜合하면 蟻螞 抽出物의 血栓 溶解 活性은 一定 時間까지는 時間 經過에 따라 活性이 增加하여 52일째까지 나타나고, 37°C에서 가장 우수한 血栓 分解能을 나타내며 最適 pH는 7.0-8.5이고 主成分은 serine protease 系統의 分子量 30,000과 45,000 혹은 60,000 Dalton의 蛋白質 酵素로 생각된다. 그리고 기존의 血栓 溶解劑가 주로 靜脈 注射를 통해 投與되는 것과 비교해 볼 때 蟻螞의 血栓 溶解性 酵素 蛋白質은 血管 注射 뿐만 아니라 經口 投與도 可能하므로 血管 注射劑와 併用하여 使用할 수 있는 長點이 있기에 앞으로 酵素 蛋白質의 분리 및 정제, 實際的인 有用性을 확인하기 위한 溶血 活性 (hemolytic activity) 등에 대한 研究가 필요할 것으로 여겨진다. 또한, 蟻螞의 酵素 蛋白質의 安定的인 生産, 정제, 공급을 위해서는 蟻螞의 mRNA 抽出物로부터 cDNA를 合成, 上記 3개 酵素 蛋白質을 暗號化하는 클론을 分離하고 遺傳子의 발현을 통한 分子生物學的인 研究가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

蟻螞에서 抗血栓 效果를 나타내는 血栓 溶解 酵素 蛋白質의 特性을 규명하기 위하여 蛋白質 定量, 전기영동 실험, 溫度 및 pH 依存性, 그리고 전자현미경 觀察을 통하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 血栓 溶解에 관여하는 酵素가 初期에는 時間 經過에 比例하여 活性化되었으며 37°C에서 保溫하였을 경우 活性度는 52일째 最大值를 나타내었다.
2. 血栓 溶解 酵素 活性의 溫度 및 pH 의존도에서 37°C에는 pH 4에서 pH 12 사이, 60°C에서는 pH 6과 pH 7사이에 活性이 남아 있었으며 80°C에는 活性이 消失되었고, 最適 pH는 7.0-8.5로 넓은 最適 活性을 가지고 있었다.
3. 血栓 溶解 活性에 對한 저해제 實驗의 경우 SBTI와 aprotinin에 의해서는 강하게, DFP와 t-AMCHA에 의해서는 약간 阻害를 받았으며 PSMB와 TLCK는 거의 阻害 效果가 發見되지 않았다.
4. 蛋白質의 전기영동 實驗에서 活性이 강한 3가지의 酵素 蛋白質이 존재하였고 이들의 分子量은 若 30,000과 45,000 그리고 60,000 Dalton이며 그 가운데 分子量 45,000 Dalton의 蛋白質이 가장 많이 存在하였다.
5. 전자현미경 觀察에서 血栓은 部分的으로 侵蝕되어 가는 양상으로 分解되고 있었다.

以上の 結果로 보아 蟻螞 抽出物의 血栓 溶解 活性 蛋白質 酵素는 分子量 30,000과 45,000 혹은 60,000 Dalton의 物質로 강한 血栓 溶解 活性을 가지며 向後 그 溶解 機轉 研究를 계속해야 될 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 統計廳 編 : 1994년도 死亡原因 統計年譜(人口 動態 申告에 의한 集計), 統計廳, 1995 ;15: 27, 32~33.
2. 대한병리학회 편 : 病理學, 서울: 고문사, 1995; 112, 113.
3. Anderson, W.A.D. AND and Scotti, T.M. : Synopsis of Pahology, 10th ed., Mosby Co., St. Louis, 1980; 107~109, 111.
4. Guytion AC : Textbook of Medical physiology 7th ed. WB Saunders, Philadelphia, 1986; 76~86.
5. Wyngaarden, J.B. et al : Cecil Textbook of Medicine 19th ed., WB Saunders, Philadelphia, 1992; 999, 1012.
6. Chung, K.H. and Kim, D.S. : *Thromb. Haemost*, 1991;65: 953~954.
7. Gardell, S.J. : *Circulation*, 1991;84: 24 4~253.
8. Kim, K.Y., Chung, K.H. and Moon, H.M. : *Thromb. Haemost*, 1993;65: 953~954.
9. Mihara, H. : *Japn. J. Physiol*, 1991;41: 461~464.
10. Nakajima, N. : *Biosci. Biotech. Biochem*, 1993;57: 1730~1735.
11. 김철호 : 대한민국 특허 출원 번호 96~657643호, 1996.
12. 田炳薰 : 鬱證, 痰證, 瘀證에 관한 文獻의 考察, 東醫病理學會誌, 1989;4: 103~112.
13. 金永安 : 中風 治療에 應用되는 竹瀝과 地龍의 效能에 대한 文獻의 考察, 大田大學校 論文集, 1993;2(1): 91~104.
14. 朴昌國 : 熊膽 및 水蛭이 瘀血病態 模型에 미치는 影響, 東西醫學, 1994;19(2): 5~42.
15. 임준식 : 中風 治療에 있어서 活血化瘀法에 대한 文獻的 考察, 惠和醫學, 1996;5(1): 115~128.
16. 홍 석, 변 일 : 水蛭에 대한 文獻의 考察, 惠和醫學, 1993;1(2): 55~66.
17. 江蘇中醫學院編 : 中藥大辭典, 香港: 上海科學技術出版社, 1979: 2379.
18. 唐慎微 : 重修政和經史證類備用本草, 北京: 人民衛生出版社, 1986; 428.
19. 孫星衍 選 : 神農本草經, 臺北: 自由出版社, 1973: 185~186.
20. 李尙仁 : 本草學, 서울: 修書院, 1981: 471.
21. 李時珍 : 本草綱目, 서울: 高文社, 1975: 1300.
22. 文成煥, 高炳熙, 宋一炳 : 血栓症에 미치는 蟾螬의 效能에 관한 實驗的 研究, 慶熙醫學, 1992;8(2): 177~181.
23. 安圭錫 : 蚯蚓, 水蛭, 蟾螬 및 蜈蚣이 血栓症에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 1990;11(2): 92~101.
24. Astrup, T. and Mullertz, S. : The fibrin method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys*, 1952;40: 346 ~ 359.
25. Lowry, O.H. and Roserbrough, J., Farr, L. and Randall, J. J. *Biol. Chem*, 1951; 193: 265~275.
26. Laemmli, U.K. : *Nature*, 1970: 227, 680.
27. 최의성 등 : 蚯蚓로부터 혈전 분해 효소의 개발 연구, 과학기술처 최종 연구 보고서, 1996.
28. Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsumishima, H., Maruyama, M. and Mihara, H. : *Enzyme*, 1985;33: 121~127.
29. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : *Acta Haematology*, 1990;84: 139~143.
30. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I. and Robbins, K.C. : *J. Clin. Invest*,

- 1985;75: 1212~1222.
31. Sumi, H., Toki, N., Sasaki, K. and Robinsons, K.C. : *Thromb. Res*, 1980;20: 711~714.
 32. Sasaki, K., Moriyama, S., Sumi, H., Toki, N. and Robbins, K.C. : *Blood*, 1985;66: 67~75.
 33. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H. and Mihara, H. : *Experimentia*, 1987;43: 1110~ 1111.
 34. 須見洋行 : *Bioindustry*, 1990;7: 725~729.
 35. 姜春華 : 活血化癥研究, 上海: 上海科學技術出版社, 1981; 27, 28, 41.
 36. 金完熙, 崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울: 成輔社, 1982; 59, 61~62.
 37. 田炳薰 : 癥血의 概念에 關한 東醫學的 考察, 東醫病理學會誌, 1989;4: 93~102.
 38. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울: 東洋醫學研究院出版社, 1981; 38, 55, 57, 78, 83, 86, 88, 104, 107, 110.
 39. 安德馨 : 活血化癥療法臨床實踐, 雲南: 雲南人民出版社, 1984; 1~3.
 40. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울: 大星文化社, 1984; 2, 46~47.
 41. 張機 : 仲景全書, 臺北: 集文書局, 1972; 172~173, 228, 236.
 42. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울: 南山堂, 1975; 106~114.
 43. 李梴 : 醫學入門, 臺聯: 國風出版社, 1980; 109, 380, 385, 404, 406, 408, 410, 413~420, 425, 591.
 44. 王肯堂 : 六科准繩, 서울: 柳林社, 1982; 176, 181, 188.
 45. 黃杏開 : 試論祛癥活血治虛的實質, 遼寧中醫雜誌, 1985;4: 5~7.
 46. 尹吉榮 : 韓醫學의 客觀化와 東西醫學病名 統一을 위한 方法, 東西醫學, 1976;2: 7~15.
 47. 康舜洙 : 韓醫學에서 癥血에 대한 概念, 大韓韓醫學會誌, 1984;5(1): 138~140.
 48. 俞企英 : 疏經活血湯이 血栓症에 미치는 影響, 慶熙韓醫大 論文集, 1984;7: 23~25.
 49. 崔昇勳 : 血府逐癥湯이 血栓症과 皮下血腫에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 석사학위논문, 1986.