

Bacillus subtilis K-54가 생산하는 Fibrinolytic enzyme의 혈전생성 및 스트레스에 미치는 영향

이흥석¹ · 이철수¹ · 유천권² · 서원상³ · 강상모*³

¹한국보건산업진흥원, ²국립보건원, ³건국대학교,

The effect of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* K-54 on the thrombosis and stress *in vivo*. Lee, Hong-Seok¹, Chul-Su Lee¹, Cheon-Kwon Yoo², Won-Sang Seo³, and Sang-Mo Kang*³. ¹Korea Health Industry development Institute, Seoul 156-050, Korea, ²National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea, ³93-1 Mojin-dong, Guangjin-Gu, Department of Microbiological Engineering, Kun-Kuk University, Seoul 143-701, Korea – The effect of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* K-54 on the thrombosis and stress *in vivo* was investigated. Each partially purified fibrinolytic enzyme of 4 protein casein unit was administered orally for 3 days before intravenously injection with collagen and epinephrine. In the mice group administered with the enzyme, an increased life span of mice was observed in comparison with that of control. The result suggest that the enzyme may prevent the formation of thrombos *in vivo*. Administration of the enzyme did not influence to stress itself because 5-hydroxyindoleacetic acid concentration of brain in the mice group with stress did not decreased after the administration of the enzyme. The value of lipid peroxide (LPO) of the liver and brain cells in the group treated with the enzyme was lower than that of control. However, protein degradation (PD) value showed no significant difference between treatment and control groups. In addition, the value of activated partial thromboplastin time (APTT), protrombin time (PT) and antiplasmin in blood were higher in the stress group than that of the enzyme treated group.

Key words: fibrinolytic enzyme, thrombus, *Bacillus subtilis*

최근 생활수준의 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 급속히 높아져 가고 있는 추세이며, 특히 현대 도시 생활자들은 40대 중반부터 많이 발생하는 성인병의 예방과 치료에 대한 관심이 대단히 높다. 성인병 중에서 고혈압, 동맥경화, 심장병, 뇌졸중 등은 대표적인 순환기계 질병으로 지금까지 치료약제가 다수 개발되어 있음에도 불구하고 개선되지 않고 있다.

최근 선진국의 조사에 의하면 혈관 순환기계 질환이 현대인의 사망원인의 1위를 차지하고 있으며, 우리 나라 통계보고 (NSO, 1995)에서도 선진국에서와 마찬가지로 사망자수 및 원인에 있어서 1위는 악성종양으로서 약 21%, 2위는 뇌혈관 질환으로서 약 17%, 3위는 심장질환으로서 약 9%이다. 그런데 2위 및 3위의 질환은 모두 혈관내 장애에 의해 일어나며 그 사망률의 합계는 약 26%로서 악성종양보다 훨씬 상회하고 있는 추세이다. 이러한 혈관내 장애 중 특히 혈전에 의한 질환의 경우, 현재 의학적으로 많은 관심과 함께 활발한 연구가

진행되고 있다.

생체내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안 생성된 혈전은 즉시 분해되어 인체에 영향을 주지 않는다[27]. 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨지면 생성되는 혈전이 분해되는 혈전보다 많아지고 분해되지 않은 혈전은 혈관을 막게 되므로 혈액의 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소공급이 중단되게 되며 뇌졸중 및 심장질환의 원인이 되기도 한다. 이러한 혈전증의 시작은 노화에 따라 진행되는 혈관벽에서 발생하는 죽상경화의 일종이지만, 혈관중의 혈소판 응집력의 향진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 되기도 한다[2]. 이와 같은 경우 혈전형성을 방지하기 위해 항 혈전제가 필요하고, 이미 생성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전용해제가 필요하다. 혈전의 생성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 치료제를 개발하기 위해 지난 20여년 동안 매우 활발한 연구가 진행되어 왔다.

생체내에서 정상적으로 일어나는 지혈기전은 subendothelium에 대한 혈소판의 부착과정, 혈소판 응집 및 granule 성분의 유리, 혈액응고성분의 활성화, 혈구세포의 이동과 침착에 따른 fibrin 복합체 형성 등 일련의 과정으로 이루어져 있다[30]. 만약, 한가지 형태라도 결함이 있는

*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3524, Fax. 82-2-450-3517

E-mail: kangsm@kkucc.ac.kr

경우, 손상된 혈관으로부터의 출혈을 막는데 지장을 초래하게 된다. 대표적인 질환으로는 Bernard-Soulier syndrom[4], Glanzman thrombasthenia[21], von willebrand disease[27] 등이 있는데, 이들 질환은 혈소판이 subendothelium에 부착하는 능력이 결여된 경우로, 각각 낮은 농도의 GPIIb/IIIa 복합체에 의한 fibrinogen 부착능 결여, GPIb/IX, GPV 결여, vWF의 결여 등이 그 원인으로 알려져 있다. 이와 같이 어떤 비정상적인 원인에 의해 지혈에 관련되는 인자들의 활성이 증가되면 혈액응고가 촉진되고 따라서 혈전의 발생 확률은 높아진다.

혈소판의 응집은 혈액응고 및 혈전생성으로 이어지는 필수적인 단계로 혈소판 자체의 생리적 활성이 증가되면 혈액응고가 촉진되고, 혈장에서의 지질대사가 변화하여도 쉽게 영향을 받는다 또한 고지혈증, 동맥경화, 그 밖의 여러 대사성 질환에서는 혈장 지질성분의 증가 때문에 혈소판 응집능이 증가되며, 혈전의 발생도 증가된다[13]. 혈소판 부착능 증가 원인으로서는 혈소판 표면의 GPIIb/IIIa 복합체와 fibrinogen 사이의 반응성 증가 등이 보고되었고[31], 혈소판 응집능 향상은 arachidonic acid의 대사활성이 증가하므로서 혈소판 응집제인 TXA₂의 생성증가, 혈소판 내 calcium 농도조절 기전의 이상 및 이에 따른 세포내 free calcium 농도의 증가[25], cAMP 생성량 감소로 인한 혈소판 agonist에 대한 감수성 증가, 막신호전달 체계이상[16], dense granule[19] 및 유리되는 alpha granule[24] 성분의 증가 등 혈소판 기능항진으로 인한 결과라고 보고하고 있다.

혈전생성 요인은 여러 가지가 있으나, 그 중 stress가 하나의 요인으로 보고되고 있다[1]. 스트레스는 중추신경계에 의해 총괄되는 면역학적, 내분비계적 종합반응이며 장기간의 스트레스는 특히, 뇌조직에 신경전달물질의 대사 변화를 유발한다. 즉, 스트레스를 받으면 dopamine 대사와 serotonin의 합성과 분비가 일어나고[29] catecholamine이 증가하여 부신피질호르몬의 분비를 촉진시켜 cortisol이 분비된다. 또한, acetylcholin, γ -aminobutyric acid, β -endorphin, leu-enkephalin 등의 분비에 변화를 일으켜 생리적인 변화에 영향을 준다[26].

이러한 생리적인 변화는 혈액 성분에도 변화를 주는데 특히 스트레스 발생시 혈액내 혈액응고에 관계되는 tissue-type plasminogen activator (TPA)와 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen의 농도에 변화가 나타나는 것으로 보고하고 있다[7]. 즉, 변화된 PAI-1의 농도는 비만, insulin, triglyceride 농도 등 fibrinolytic system과도 관련 있는 것이 밝혀졌으며, 만성 스트레스는 PAI-1 합성을 증가시켜 그 결과 정상적인 fibrinolysis를 감소시킴으로 인하여 fibrin이 축적되고 atherothrombotic disease를 촉진시킬 수 있다는 가설이 대두되고 있다[17, 22].

따라서 본 연구에서는 쥐를 대상으로 *B. subtilis* K-54에

서 부분 정제한 fibrinolytic enzyme의 생체내 효과를 측정하고 스트레스로 인한 혈액 및 조직내 변화 등을 fibrinolytic enzyme의 투여와 연결하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 효소의 정제

본 연구에 사용된 균주, *Bacillus subtilis* K-54는 청국장에서 분리하였으며 이로부터 fibrinolytic enzyme의 정제방법은 전보[33]에 보고된 방법에 의하여 수행하였다.

실험동물의 사육

혈전 용해 실험을 위하여 ICR 계열의 쥐 (20 ± 1 g, ♀)를 사용하였다. 스트레스 유발시 생성되는 혈전과 fibrinolytic enzyme과의 관계 실험에는 ICR mouse를 random sampling하여 1개월간 사육하면서 실험하였다.

스트레스 조건과 식이

실험동물은 대조군 (no stress), 스트레스군, 스트레스 후 fibrinolytic enzyme 투여군으로 분류, 한 군당 10마리씩 하였으며 스트레스는 고정화 (immobilization)와 85 dB의 소음 (noise)을 하루에 3시간씩 동시에 가하였다. 고정화는 원통형 병에서 직립형으로 서있게 하였으며 1개월동안 스트레스를 가하였다. 1개월 동안 스트레스를 가한 후 다음 3주동안 하루에 한번씩 오전에 스트레스를 가하고 오후에 ion exchange chromatography로 부분 정제하여[33] 역가를 측정 한 fibrinolytic enzyme을 하루 1회씩 4 Plasmin Casein Unit (PCU)를 경구 투여하였다.

실험동물의 희생과 조직의 적출

스트레스와 혈전과의 관계 실험을 위해 fibrinolytic enzyme을 투여한 쥐를 단두 후 sodium citrate가 들어있는 tube에 채혈하여 혈액을 분석하였으며, 뇌와 간을 적출 후 스트레스시 변화하는 대사 산물, 항산화능 및 체내 산화적 손상을 측정하였다.

혈전용해 효소의 생체내 효과 측정

20 ± 1 g 되는 쥐를 약 12시간정도 절식시킨 후 fibrinolytic enzyme (4 PCU/mL)을 3일간 경구투여하였다. 4일째 collagen과 epinephrin을 각각 1.5 mg, 150 μ L되게 주사하여 주사 후 15분내 사망하거나 마비가 15분 이상 지속되는지를 관찰하였다. Aspirin 및 crude lumbrokinase는 정맥 주사하였고 aspirin 투여군 (약 30 mg/kg)을 양성군으로 하여 각 군 당 20마리의 쥐를 사용하였다. 결과는 χ^2 로 분석하였다[8].

스트레스에 의해 발생하는 대사산물의 측정

5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)의 측정

쥐의 뇌조직으로부터 serotonin (5-HI)의 최종 대사산물인 5-HIAA를 정량하였다[6]. 뇌조직을 cold-acidified n-butanol로 15배 희석한 후 마쇄기로 균질화하였다. 균질액 2.5 mL에 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0) 0.3 mL을 넣고 1분간 교반하여 3,000 rpm에서 원심분리 후 아래층을 취하여 0.4 mL씩 시험관 A, B에 분주하였다. 분주 후 A 시험관에는 1% cysteine용액 0.04 mL을 넣고, A, B 시험관 모두에 염산 1 mL을 다시 넣은 후 A 시험관에 0.1% o-phthaldehyde (OPT) 용액 0.04 mL와 sodium periodate 용액 0.04 mL을 넣었다. 30분 후, B 시험관에 0.04 mL cysteine 용액과 OPT 용액 0.04 mL을 넣고 두 시험관 모두 95°C에서 10분간 반응시킨 후 냉각시켜 excitation 360 nm, emission 470 nm에서 형광도를 측정하였다. 두 시험관의 형광도 값 차이를 표준 시료와 비교하여 정량 분석하였다. 표준 시료로는 5-HIAA (15 µL/mL) 용액을 phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하여 사용하였다.

체내의 산화적 손상 측정

Protein degradation 측정

적출한 조직을 균질화시킨 후 균질액 0.25 mL에 PBS 0.75 mL와 20% trichloroacetic acid 0.1 mL을 넣고 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 상층액 0.25 mL와 HEPES buffer (pH 9.0) 1.25 mL, fluorescamine 용액 (0.3 mg/mL acetone) 0.5 mL을 넣고 25°C에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액을 excitation 395 nm, emission 450 nm에서 형광도를 측정한 후 표준 물질의 형광도와 비교하였다. 표준 물질로는 L-glycine을 사용하였다.

Lipid peroxide 분석

Thiobarbituric acid (TBA)의 반응 물질 (TBARS)로 정량 분석하였다[32]. 적출한 조직을 균질화한 후 바로 TBA reaction mixture (1% TBA:acetic acid:D.W. = 1:1:3)와 8.1% SDS를 가한 후 강하게 교반하여 100°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액에 butanol과 (NH₄)₂SO₄ 포화액을 넣어 섞은 후 원심분리하였다. Butanol층은 fluorescence spectrophotometer (HP 89090A, USA)를 사용하여 excitation 515 nm, emission 553 nm에서 측정하였고, 표준 물질로는 1,1,3,3,-tetraethoxy propane(TEP)를 사용하여 표준곡선을 작성하여 실험치를 정량하였다.

혈전 용해 효소 효과에 대한 혈액학적 분석

Activated partial thromboplastin time(APTT)의 측정

PTT-LA kit® (Stago Co. France)를 사용하였다. 항응고제 처리된 mouse 혈액 0.1 mL에 cephalin과 activator가 들어있는 PTT-LA를 0.1 mL을 넣고 37°C 항온조에서 0.025 M CaCl₂를 넣은 후 응고되는 시간을 측정하였다 [9].

Prothrombin time(PT)의 측정

Neoplastine CI kit®(Stago Co. France)를 사용하였다. 항응고제 처리된 mouse 혈액 0.1 mL을 37°C에서 약 2분간 항온 후 칼슘 용액과 thromboplastin을 섞은 시약 0.2 mL을 넣고 응고 시간을 측정하였다[12].

Antiplasmin 농도의 측정

Stachrom antiplasmin kit®(Stago Co. France)를 사용하였다. 항응고 처리된 mouse 혈액을 37°C로 약 1분간 항온 후 plasmin (2.6 nKat/mL) 0.1 mL을 넣고 약 30초간 반응시켰다. 여기에 합성기질인 MM-L-Tyr-Arg-pNA를 0.4 mL넣고 60초간 반응시키고 acetic acid를 넣어 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻어진 흡광도 값을 X축이 표준 antiplasmin농도(%)이고 Y축이 흡광도(A₄₀₅)인 표준곡선에 대입하여 값을 구하였다[28].

결과 및 고찰

Fibrinolytic enzyme의 생체내 혈전용해 효과

Fibrinolytic enzyme을 3일간 경구투여 후 혈전 예방 효과를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 음성대조군의 경우 쥐 20마리 중 총 18마리가 collagen과 epinephrin을 투여 후 10분내에 사망하였으나, 양성 대조로 사용한 aspirin의 경우 20마리 중 10마리가 생존하였다. 시료인 fibrinolytic enzyme 4 PCU/mL을 투여한 실험군 쥐의 경우 혈전유발 물질인 collagen과 epinephrin을 투여했을 때 약 8마리가 생존하였다. 이를 분석한 결과 P<0.01범위에서 *B. subtilis* K-54주가 생산하는 fibrinolytic enzyme은 양성대조로 사용한 aspirin 보다는 약간 낮은 값을 보였으나 통계적으로 유의성 있는 값 (p=0.028)을 보여 혈전 예방에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

녹차의 경우 자발성 고혈압 쥐에 추출물을 10주에서 20주동안 식이했을 때 식이 기간 동안 14~17%정도의 혈압이 낮아짐을 보고한 바[23] 있으며, 차 성분중 epigallocatechin-3-gallate와 catechin이 혈소판 응집 억제 작용을 하여 혈전의 생성을 억제한다는 보고도 있다[11]. 그런데

Table 1. Effects of fibrinolytic enzyme on antithrombosis *in vivo*

	Treatment			Total
	Negative control*	Aspirin	Sample	
Survival	2	10	8	20
Death	18	10	12	40
Total	20	20	20	60

* Negative control : Collagen + Epinephrin

** Statistical significant value p=0.028

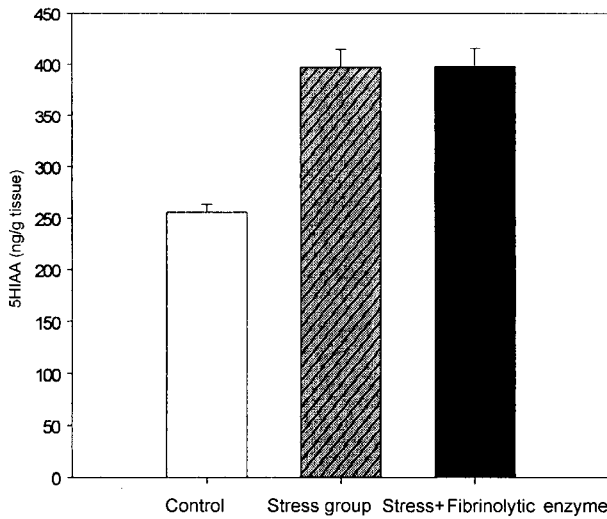


Fig. 1. 5-HIAA contents in brain tissue of test groups.

Means with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$.

녹차의 경우 투여량이 약 150 mg/100 g 이상으로 매우 고농도이며 투여기간도 장기간이다. 그러나 *B. subtilis* K-54의 fibrinolytic enzyme의 경우는 소량으로 효과를 나타내어 녹차보다 뛰어난 혈전 예방효과를 보였다.

스트레스 후의 생체내 5-HIAA의 정량

Serotonin (5-hydroxytryptophan, 5-HT)은 신경전달물질의 하나로 스트레스 발생시 신경계에서 활성이 증가하여 동물의 경우 행동의 불안감을 유발시키고 사람의 경우 편두통을 유발하는 물질로 알려져 있다. 또한 절식과 하루에 3시간씩 3주간의 immobilization 같은 스트레스가 생체에 가해졌을 경우 대뇌의 tryptophan과 serotonin의 대사물질인 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)의 농도는 증가되는 반면 serotonin 농도는 감소한다.

뇌조직에서 5-HIAA의 변화는 Fig. 1과 같다. 대조군은 255 ± 15.21 ng/g tissue였으나 스트레스를 가한 군은 397.2 ± 11.7 ng/g tissue였다. 이러한 5-HIAA의 증가는 스트레스시 5-HIAA가 증가한다는 보고와 일치하였으며[6] 스트레스가 정확히 가해졌음을 확인할 수 있었다.

Fibrinolytic enzyme를 투여군의 5-HIAA 값은 397.9 ± 17.6 ng/g tissue로 스트레스 처리군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 투여된 fibrinolytic enzyme이 스트레스로 일어나는 hormone 대사 자체에는 영향을 미치지 않기 때문으로 사료된다.

스트레스시 fibrinolytic enzyme 투여 후의 체내 산화적 손상

Protein degradation의 변화

Table 2. LPO contents in brain and liver tissue of test groups.

	Control	Stress	Stress +Fibrolytic enzyme
Brain	37.3±0.45a nmol/g tissue	43.3±0.1b nmol/g tissue	42.1±0.1b nmol/g tissue
Liver	306.45±1.0a nmol/g tissue	356.9±1.4b nmol/g tissue	277.7 ±1.1c nmol/g tissue

Means with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$.

체내 단백질의 분해 및 생성은 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하며 이러한 균형의 변화는 단백질의 산화로 일어날 수 있다[5, 20]. 산화적 손상을 받은 단백질은 세포내의 활성화된 proteolytic pathway에 의해서 small peptide와 아미노산으로 분해되며 이렇게 생성된 아미노산은 체내의 산화적 손상 지표로 사용된다. 또한, 이러한 단백질의 분해는 second antioxidative defense system의 일종이며, superoxide dismutase(SOD), catalase 등과 같은 first antioxidative defense system을 보완한다[18].

따라서, fibrinolytic enzyme를 투여하므로써 변성된 단백질의 분해가 빠르게 일어난다면 혈류의 개선으로 인한 세포 복구능력의 향상 뿐만 아니라 second antioxidative defense system의 강화로 볼 수 있으며 이는 체내 보호 측면에서 장점을 가지고 있다고 추측할 수 있다.

본 실험에서는 각 군별로 뇌와 간조직을 분석하여 스트레스에 의해 손상된 단백질의 분해 (protein degradation)를 측정하였다 (Table 2). 뇌조직의 경우 스트레스 처리군이 397.4 ± 15.1 μmol/g tissue, 대조군에서는 380.6 ± 7.7 μmol/g tissue로 스트레스를 가하지 않은 대조군에 비해 높은 수치를 보였으며, fibrinolytic enzyme를 투여한 군에서도 400.1 ± 4.1 μmol/g tissue로 높게 나타나 스트레스 처리군과 fibrinolytic enzyme 처리군간 통계적 차이를 보이지 않았다.

이는 스트레스 처리시 뇌조직의 단백질이 산화적 손상에 의해 분해되고 있음을 보여주며, fibrinolytic enzyme 처리시에도 변화가 보이지 않는 것은 투여된 효소가 뇌조직의 산화적 손상의 개선에 도움을 주지 못하거나, 산화적 손상을 받은 단백질이 투여된 효소의 직간접적인 영향으로 분해되어 유리 아미노산이 많아졌기 때문으로 사료된다.

이러한 반응의 결과는 간 조직에서도 같은 경향을 보였는데, 이것도 투여 효소가 분해된 것으로 볼 수 있다. 그리고 간조직에서의 반응 수치가 뇌조직보다 훨씬 높았다. 이것은 간에는 뇌 간막과 같은 물질 투과 장벽이 없기 때문에 분해 단백질의 유리가 쉬웠거나 단백질 분해 반응

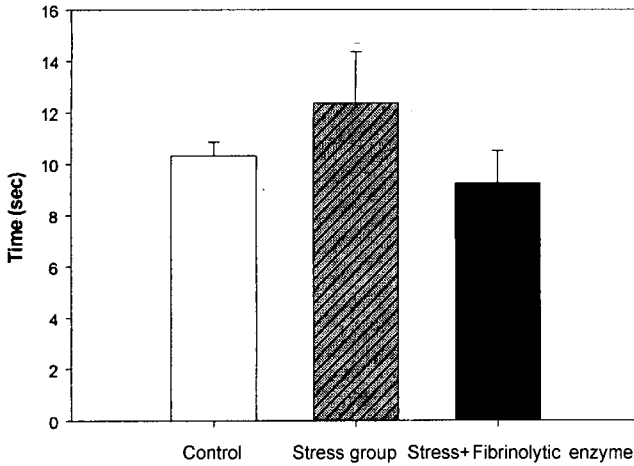


Fig. 2. Prothrombin time (PT) measured in mouse plasma of test group.
Means with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$.

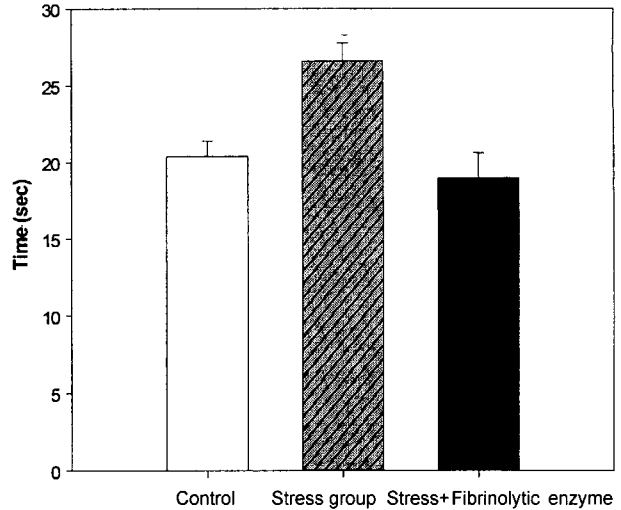


Fig. 3. Activated partial thromboplastin time (APTT) measured in mouse plasma of test group.
Means with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$.

이 간 조직에서 많이 발생하기 때문으로 생각된다.

Lipid peroxidase(LPO)의 변화

생체내 지질 과산화물은 분자내 peroxide 결합을 갖는 지질의 총칭이며 hydroperoxide, epiperoxide, polyperoxide 등이 포함된다. 지질 과산화물의 최종 산물로는 malondialdehyde (MDA)와 4-hydroxynoenal과 같은 고반응성 aldehyde들이 있으며 발암성 등 세포 독성이 보고되어 있다[3].

뇌조직과 간조직에 대하여 LPO를 측정 한 결과 (Fig. 2) 뇌조직의 경우 스트레스군이 43.3 ± 0.1 nmol/g tissue로 대조군 (37.3 ± 0.45 nmol/g tissue)보다 높았으며 fibrinolytic enzyme을 투여한 군은 42.1 ± 0.1 nmol/g tissue로 약간 낮아졌다. 간 조직의 경우, 보다 뚜렷한 차이를 보여 스트레스 투여군이 356.9 ± 1.4 nmol/g tissue로 대조군 306.45 ± 1.0 nmol/g tissue보다 높았으며 fibrinolytic enzyme을 투여한 군은 277.7 ± 1.1 nmol/g tissue로 낮아졌다.

이는 지질 대사가 뇌보다 간조직에서 활발히 일어나기 때문이며 스트레스를 받을 경우 혈류내 과산화물 생성이 많아지기 때문으로 생각된다. 또한 fibrinolytic enzyme의 투여시 LPO 값이 낮아졌는데 이는 혈류의 개선으로 인한 세포복구 능력의 향상으로 생각할 수 있다.

즉, fibrinolytic enzyme의 투여는 세포내 단백질 분해도를 경감시키지 못한 반면, 간에서의 지질 과산화를 억제하였다. 뇌의 경우 투여된 효소가 뇌간막을 통과하지 못함을 고려할 때 간접적으로도 뇌에서의 대사에는 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 그러나 간에서 fibrinolytic enzyme

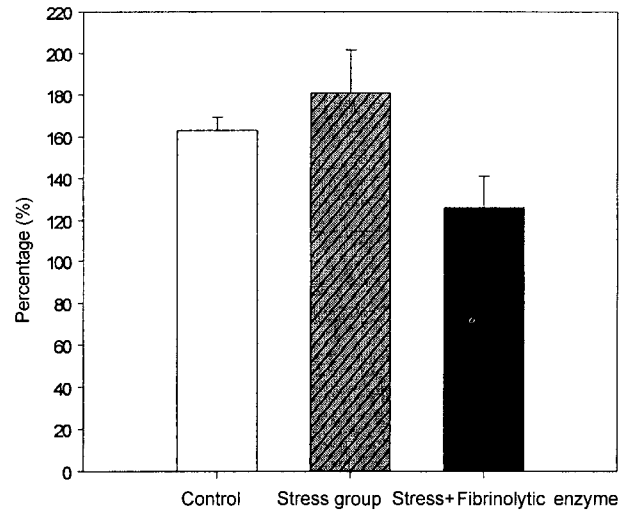


Fig. 4. Antiplasmin concentration measured in mouse plasma of test group.
Means with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$.

의 투여와 무관하게 PD값이 높았는데 특히 fibrinolytic enzyme의 투여군에서의 높은 PD값은 투여된 효소들의 분해에 의한 것일 가능성도 있다. 따라서 효소의 분해에 의하여 PD값이 증가한 것이라면 fibrinolytic enzyme에 의한 second antioxidative denfense system의 강화의 결과로 생각할 수 있으나 현재까지 직접적인 실험실적 증거가 보고되지 않아 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

스트레스시 fibrinolytic enzyme 투여 후의 혈액변화

Activated partial thromboplastin time(APTT)과 prothrombin time(PT)의 변화는 혈액 응고계 중 내인계(intrinsic pathway)와 외인계(extrinsic pathway)의 변화를 측정하는 방법으로 PT는 prothrombin, factor VII, factor Xa, Ca^{++} , phospholipid 등 혈액응고계 중 외인계, APTT는 factor XII, kaolin, phospholipid 등의 내인계에 작용하는 인자의 이상 유무를 알 수 있다[3].

Mouse에 스트레스를 가한 후 혈액응고와 관련이 있는 PT, APTT 및 antiplasmin activity를 측정하였다. 그 결과 PT와 APTT에서 스트레스를 가하지 않은 대조군은 각각 10.3초, 20.4초였으나 스트레스를 가한 군에서는 12.5초, 26.6초로 길어졌다 (Fig. 3, 4). 이는 스트레스가 혈액응고계의 내인계와 외인계의 인자들에게 영향을 끼친 결과로 사료된다. 즉, 혈액응고 시간 (APTT와 PT)이 길어진 것은 스트레스시 응고 인자의 소비성 결핍으로 볼 수 있고 응고 인자의 소비는 혈관내 혈전의 발생 가능성이 있을 것으로 추측할 수 있다. 일반적으로 관상동맥질환의 경우 생성된 혈전에 의해 혈관벽이 협착하여 혈압이 높아지는데 이때는 APTT나 PT가 연장될 수 있으며, 이 혈전을 녹이는 혈전용해제를 투여하면 일시적으로 APTT나 PT가 정상을 회복할 수 있다[14].

또한 스트레스와 함께 fibrinolytic enzyme을 3주간 경구 투여했을 경우 APTT와 PT가 다시 정상인 9.2초, 19초로 돌아왔다 (Fig. 3, 4). 이는 투여된 효소가 혈액응고계에 영향을 미친다는 것으로 응고에 관여하는 인자의 소모가 줄어들어 혈액응고시간이 정상으로 회복된 것으로 생각할 수 있으며, 또한 스트레스로 인해 생성된 혈관내 혈전의 생성방지로 인하여 응고 인자의 소모가 줄어들었을 가능성을 추측할 수 있다.

α_2 -Antiplasmin은 응고된 혈액, 즉 혈전을 분해하는 plasmin의 활성을 저해하는 인자이다. Antiplasmin 농도는 스트레스를 가하지 않은 대조군에서 161%였고 스트레스 시약 182%로 늘어났다 (Fig. 5). 이는 스트레스 발생시 antiplasmin의 농도가 증가하므로써 plasmin의 활성을 저해하여 생성된 혈전을 분해하지 못하기 때문으로 생각되며, fibrinolytic enzyme를 투여한 이후에는 농도가 130%로 낮아졌는데 이는 투여된 효소가 생성된 혈전을 분해하여 antiplasmin의 농도가 회복된 것으로 생각된다.

이상의 결과로 볼때 투여된 효소가 혈액 응고계 및 혈전 분해계에 영향을 미쳐 생성된 혈전을 분해하였기 때문으로 생각되며 antiplasmin 농도의 변화는 스트레스시 antiplasmin의 농도가 증가하므로써 plasmin의 활성이 저해되어 혈전을 분해하지 못하다가 투여된 효소의 직접 또는 간접적인 작용에 의해 혈전이 분해 되므로써 antiplasmin의 농도가 회복된 것으로 생각된다.

투여된 효소의 흡수에 관하여는 아직까지 논란이 계속되

고 있다. Albumin이나 효소들이 장관계에서 일부 흡수되어 직접 기질에 도달하여 효능을 나타낸다는 주장[10]과 소화계에서 분해되어 효소의 활성부위가 장관계에서 흡수되어 효능을 나타내는 system을 활성화 시킨다는 주장[15]등 아직까지 결론을 내리지 못하고 있다.

요 약

B. subtilis K-54에서 생산된 fibrinolytic 효소의 혈전증과 스트레스에 대한 효과를 mouse를 이용하여 조사하였다. 부분 정제된 효소의 역가를 4 PCU (Protein Casein Unit)로 조정된 후 매일 1회씩 쥐에게 3일간 경구 투여하였다. 효소가 투여된 쥐에 인공적으로 collagen과 epinephrine을 이용하여 혈전을 유발시킨 후 생존 여부를 관찰한 결과 쥐의 수명이 대조군에 비하여 연장됨을 확인하였다. 또한 효소를 투여 한 group의 5-hydroxyindoleacetic acid(HIAA) 수치가 감소하지 않아 이 효소는 스트레스 자체에는 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다. 간 및 뇌 조직의 과산화 지질 값 및 혈액내의 antiplasmin, Activated Partial Thromboplastin Time(APTT)과 Protrombin Time(PT) 값의 경우 효소를 투여한 스트레스군의 수치가 대조군에 비하여 낮았다. 그러나 단백질 분해의 경우에는 각 군당 별 차이를 나타내지 않았다.

REFERENCES

1. Aarno, H. and T. P. Toronard. 1996. Arteriosclerosis, thrombosis & vascular biology. *Fact on File*. 16: 3-10.
2. Arbige, M. and W. H. Pitcher. 1989. Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends Biotechnol.* 7: 330-335.
3. Barber, A. A. and F. Bernheim. 1967. Lipid peroxidation-its measurement, occurrence and significance in animal tissue. *Adv. Gerontol. Res.* 2: 355-403.
4. Berndt, M. C., C. Grerogy, B. M. Chang, H. Zola and P. A. Castaldi. 1983. Additional glycoprotein defects in Bernard Soulier's syndrom.: confirmation of genetic basis by parental analysis. *Blood*. 62: 800-802.
5. Cervera, J and R. L. Levine. 1988. Modulation of the hydrophobicity of glutamine synthetase by mixed-function oxidation. *FASEB J.* 2(10): 2591-5.
6. Curzon, G. and A. R. Green. 1970. Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and hydroxyindole acetic acid in small reagents of brain. *Brit. J. Pharmacol.* 39: 653-655.
7. Desouza, C. A., D. R. Dengel, M. A. Rogers, and R. F. Macko. 1997. Fibrinolytic response to acute physical activity in older hypertensive men. *J. Appl. Physiol.* 4: 48-51.
8. Diminno, G. and M. J. Silver. 1983. Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by

- ethyl alcohol. *J. Pharma. Exp. Therap.* **225**(1):57–60.
9. Forastiero, R. R., G. S. Cerrato, and L. O. Carreras. 1994. Evaluation of recently described tests for detection of the lupus anticoagulant. *Thromb. Haemostasis.* **72**(5): 728–733.
 10. Fujita, M., H. Kyungsu, Y. Ito, S. Misawa, and S. Nishimuro. 1995. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.* **18**(9): 1194–1196.
 11. Gao, Y. T., J. K. McLaughlin, W. J. Blot, and J. F. Graumeni. 1994. Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J. Nat'l. Cancer Inst.* **86**: 855–858.
 12. Ghonnaess, H. and M. K. Fagerhol. 1975. Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* **54**: 363–367.
 13. Gomez, C. C., R. Simoncarballo, A. C. Coma, T. Sanchez de Leon, D. E. Montero, and P. R. Rodriguez. 1991. The relationship between lipid peroxidation and platelets aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia* **43**: 241–246.
 14. Harlan, J. M. and L. A. Harker. 1981. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorders. *Med. Clin. North. Am.* **65**: 855–901.
 15. Hijikata, A., M. Hirata, and H. Kitaguchi. 1994. Effect of proteases on plasminogen activator release from isolated perfused dog leg. *Thromb. Res.* **20**: 521–531.
 16. Ishii, H., F. Umeda, T. Hashimoto, and H. Nawada. 1991. Increased inositol phosphate accumulation in platelets from patients with NIDDM. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **14**: 21–24.
 17. Katri, R., R. Lassila, L. Keltikangas and Hautanen. 1996. Association of clonic stress with plasminogen activator inhibitor-1 in healthy middle age men. *Arter. Throm. Vascul. Biol.* **16**: 363–367.
 18. Kelvin, J. and A. Davies. 1986. Intracellular Proteolytic Systems may Function as Secondary Antioxidant Defense: An Hypothesis. *J. Free Radic. Biol. Med.*, **2**: 155–173.
 19. Kutti, J., H. Wadenvik, B. Hanestam, and G. Stenstorm. 1986. Evaluation of platelet reactivity in diabetic mellitus. *Act. Med. Scand.* **219**: 195–201.
 20. Levine, R. L. 1983. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.* **258**(19): 11823–11827.
 21. Lindahl, T. L., J. Lundahl, C. Netre, and N. Egberg. 1992. Studies of the platelet fibrinogen receptor in Glanzman patients and uremic patients. *Throm. Res.* **76**: 457–461.
 22. Masao, I., I. Tsuritani, Y. Noborisaka, Y. Yamada, and H. Nakagawa. 1996. Relationship between job stress and plasma fibrinolytic activity in male Japanese workers. *Int'l Arch. Occup. Environ. Health.* **68**: 315–320.
 23. Masashi, O. 1995. Effect of anaerobic treated tea on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *The 3rd Int'l symp. on green tea*, 53–58.
 24. Mehta, J. L., F. A. Nicolini, W. H. Donnellu, and W. W. Nichols. 1992. Platelet leucocyte-endothelial interaction in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **69**: 80–88.
 25. Moriyama, T., H. Yakamura, H. Narita, K. Tanaka, T. Matsuur, and M. Kito. 1988. Elevation of cytosolic free calcium is directly evoked by Thromboxane A2 in human platelets during activation with collagen. *J. Biochem.* **103**: 901–907.
 26. Roisser, J. R. and G. F. Bloom. 1978. Foot shock induced stress decrease leu-enkephalin immunoreactivity in rat hypothalamus. *J. Pharmacol.* **48**: 465–466.
 27. Ruggeri, E. M. and T. S. Zimmerman. 1985. Platelets and Willebrands disease. *Semin. Hematol.* **22**: 203–206.
 28. Teger-Nilsson, A. C., P. Friberger, and E. Gyzander. 1977. Determination of a new rapid plasmin inhibitor in human blood by means of a plasmin specific tripeptide substrate. *Scand. J. Lab. Inv.* **37**: 403–409.
 29. Thirry, A. M., J. P. Tassin, G. Blanc, and J. Glowinski. 1976. Selective activation of the mesocortical DS system by stress. *Nature.* **263**: 242–244.
 30. Tsunehisa, S. T., H. Tsuju, H. Tohyama, and T. Osawa. 1984. Interaction of human platelet membrane glycoprotein with collagen and lectins. *Biochem. Biophys. Acta.* **797**:10–15.
 31. Winocur, P. D., D. W. Pery, and R. L. Klnlough-Ruthbone. 1992. Hypersensitivity to ADP platelets from diabetic rats associated with enhanced fibrinogen binding. *Eur. J. Clin. Invest.* **22**: 19–22.
 32. Yagi, K. 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**: 212–216.
 33. Yoo, C. K., W. S. Seo, C. S. See, and S. M. Kang. 1998. Purification and characterization of Fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *Chung Guk Jang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 507–514.

(Received November 1, 1999)