

참도박의 혈액 항응고성 다당류의 정제

윤진아 · 유광원* · 전주진* · 조홍연*[†] · 손용석 · 양한철*

고려대학교 응용동물학과

*고려대학교 생명공학원

Purification of Blood Anticoagulant Polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*

Jin-A Yoon, Kwang-Won Yu*, Woo-Jin Jun*, Hong-Yon Cho*[†]
Young-Suk Son and Han-Chul Yang*

Dept. of Animal Science, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

This study was undertaken to purify the anticoagulant polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*. The anticoagulant compound (PE-2IVc-2-1) was isolated from the crude polysaccharide (PE-2) by the sequential steps such as ultrafiltration (PE-2IV), anion-exchange chromatography of DEAE-Toyopearl 650C (PE-2IVc), size-exclusion chromatography of Sepharose CL-6B (PE-2IVc-2), and HPLC Shodex OHPak column chromatography (PE-2IVc-2-1). The apparent molecular weight of purified polysaccharide (PE-2IVc-2-1) was approximately 710 kDa. It was mainly composed of galactose (48.6%) and 3,6-anhydrogalactose (44.0%) with 27.1% of sulfate residue, in addition a trace amount of xylose (3.6%), glucose (1.1%), mannose (1.1%), arabinose (0.8%) and fucose (0.8%). The IR spectrum of the polysaccharide showed the characteristic bands of S=O (1116.74 and 1143.17 cm^{-1}) and C-O-S (828.19 cm^{-1}) stretchings, respectively. The anticoagulant effect of PE-2 in *ex vivo* was proportional to the concentration of intravenously injected dose, up to 100 mg/kg.

Key words: *Pachymeniopsis elliptica*, anticoagulant, sulfate-containing polysaccharide

서 론

혈전의 생성은 신체 내에서 매우 중요한 과정이지만 비정상적인 혈전생성은 정맥 또는 동맥에서 혈액의 순환을 방해하여 조직으로의 영양분 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화증 등과 같은 중대한 성인병을 일으킨다(1). 이러한 혈전의 생성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 제제인 혈액 항응고제 중 가장 일반적으로 알려진 heparin은 정맥주사 시 내인성 경로의 prothrombin activator의 형성을 억제하거나 이미 형성된 thrombin의 저해제인 antithrombin III이나 heparin cofactor II의 활성을 증강시켜 항응고 활성을 나타낸다(2). Heparin과 antithrombin III의 결합에는 sulfate가 매우 중요한 역할을 하고 있어 최근 sulfated xylan(3), semisynthetic polysaccharide sulfates(4) 및 해조류 유래 sulfated polysaccharide(5) 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 특히 fucoidan sulfate의 항응고

활성에서 sulfate 함량은 thrombin에 의한 fibrinogen의 응고과정에 thrombin의 fibrinogen에의 결합력에 직접적으로 관여한다고 보고되고 있다(6). 지금까지의 이러한 보고를 기초로 항응고성 다당류들과 heparin cofactor II와의 결합력에서 sulfate에 의한 negative charge는 하나의 ionic interaction을 부여하는 중요한 역할을 부여하는 것으로 생각되고 있다(7). 또한 heparin에 의한 antithrombin III의 강화는 heparin의 분자량에 밀접하게 관련되어 있음이 밝혀졌고 pentosan sulfate 역시 고분자 핵분이 저분자 핵분보다 강한 heparin cofactor II 상승제로 작용한다고 보고된 것 외에도 항응고성 다당류의 분자량과 활성과의 상관관계를 연구한 다수의 보고가 있다(8). 그러나 sulfated polysaccharide들의 정확한 전체구조와 다당의 작용부위 및 그 작용 메커니즘은 아직 완전히 규명되지 않고 있는 바 본 연구팀은 이러한 기작들을 밝히기 위한 연구의 일환으로 황산기 함유 다당류가 해조류에 다량 함유되어 있는 점을 고려하여 수종의 해조류를 대상으로

[†]To whom all correspondence should be addressed

항응고 활성을 검색한 후 높은 활성을 보인 참도박을 선정하였고 추출조건을 최적화 실험을 통하여 조다당 획분을 조제하였다(9)

본 연구는 최종적으로 항응고 활성 황산기 함유 다당의 구조와 기작을 밝히기 위한 선행연구로서, 해조류 중에서 선정된 참도박으로부터 추출, 조제된 조다당 획분으로부터 항응고 활성을 갖는 다당을 분리, 정제하고 생체 내에서의 활성과 독성에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 참도박(*Pachymeniopsis elliptica*)은 속초시 수산협동조합에서 구입하여 사용하였으며 항응고 활성측정 시약인 Dade Actin Activated Cephaloplastin Reagent(aPTT 측정용), Dade Thromboplastin · C Plus (PT 측정용) 및 Dade Data-F1 Thrombin Reagent(TT 측정용)는 Baxter사 제품을, heparin(167 USP unit/mg)은 Sigma사 제품을 사용하였고 혈장(platelet pool plasma)은 고려대학교 부속병원 혈액원에서 구입하였다 한편, DEAE-Toyopearl 650C는 Tosoh사 제품을, Sepharose CL-6B는 Pharmacia사 제품을, standard dextran(T-2000, T-500, T-70, T-40, T-10, galactose)은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그 외 기타 시약은 시판 일급 혹은 특급시약을 사용하였다.

실험 동물

생후 5 주령의 건강상태가 양호한 ICR계 수컷 마우스를 국립보건원에서 분양 받아 실험실 환경에 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다 적응기간 중 사료와 물은 자유로이 섭취하게 하였으며 환경은 항온(22±0.5°C), 항습(상대습도 55±5%) 조건을 유지하여 인공조명에서 명암교대(1일 12시간 썩)를 유지하였다.

일반 분석

총당, 산성당 및 단백질 함량은 galactose, β-D-galacturonic acid 및 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 각각 phenol-sulfonic acid법(10), *m*-hydroxy-diphenyl법(11) 및 Lowry 등의 방법(12)으로 정량하였다. 황산기 함량은 Dodgson과 Price의 방법(13)을 변형하여 사용하였으며, 측정 방법은 1.0 N HCl로 105~110°C에서 4시간 동안 가수분해한 시료 0.2 mL에 4% TCA 용액 3.8 mL와 BaCl₂-gelatin reagent 1 mL을 첨가하여 20분간 방치한 후 360 nm에서 흡광도를 측정하고 K₂SO₄의 표준 정량선을 이용하여 정량하였다 구성당의 분석은 Jones와 Albersheim의 방법(14)에 따라 각각의 당을 2.0 M TFA

(trifluoroacetic acid)로 121°C에서 1.5시간 동안 시료를 가수분해한 후 NaBH₄를 이용하여 중성당을 alditol로 환원시키고, (CH₃CO)₂O를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 SP-2380 capillary column(30 m×0.25 mm×0.2 μm)이 장착된 Young Lin MD 600의 gas liquid chromatography로 측정하였다 Column의 온도는, 60°C(1분간 유지)→220°C(30°C/분)까지 상승 후 12분간 유지→250°C(8°C/분) 상승시키고 15분간 유지하였으며 flame ionization detector (FID)로 측정하였다. 각 당의 alditol acetate 유도체들은 standard solution(9개의 당)으로 alditol acetates를 제조한 후 GC-MS로 분석하고 GC에서의 당의 용출순서를 확인함으로써 알 수 있으며 이를 sample 측정치와 비교하여 구성당을 확인하였고 당의 mol %는 각 peak들의 면적비와 각각의 유도체의 분자량으로부터 계산하였다(15). 한편 3,6-anhydrogalactose의 정량은 Duckworth와 Yaphe의 방법(16)에 의해 분석한 후 전체 구성당의 mol.%에 적용하여 계산하였다 HPLC는 Shodcx OHpak KB-805 column(0.8×30 cm)이 부착된 Waters model 2690으로 분석하였는데 용매는 0.2 M NaCl (flow rate 1 mL/min)을, detector는 refractive index (RI) detector를 사용하여 분석하였다. 정제된 획분의 분자량 측정을 위해 표준물질로 dextran T-2,000(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 galactose을 사용하여 Shodex OHpak KB-805에서 구한 표준곡선과 K_{av} 값을 비교하여 측정하였다. 또한 항응고 활성은 blood coagulator (Clot-1a, HOSPITEX Diagnostics, Italy)를 사용하였다.

조다당 획분으로부터 항응고 활성 획분의 정제

물에 침지시켜 염분을 제거한 참도박 1 kg을 blanching (100°C, 5분)한 후 동결건조를 거쳐 homogenizer로 분쇄하고 메탄올-가용성 획분(수율; 7.1%)을 분리한 후 잔사에 증류수를 첨가하고 100°C에서 환류추출하여 원심분리한다. 상등액(수율; 38.8%)을 농축하고 에탄올을 70% 농도로 첨가하여 4°C에서 12시간 교반한 후 원심분리하여 조다당 획분(PE-2, 수율; 34.3%)을 조제하였다. 이와 같이 얻은 조다당 획분(PE-2)을 Fig. 1과 같이 증류수에 용해시킨 후 원심분리(8,000×g, 20분)하여 잔사를 제거한 수용성 획분을 Millipore사의 Masterflex 한외여과기를 이용하여 분자량 30 kDa 이하, 30 kDa~100 kDa, 100 kDa~300 kDa, 300 kDa 이상의 4개 획분(PE-2I, 수율, 1.1%, PE-2II, 수율; 2.0% PE-2III, 수율; 3.2%, PE-2IV, 수율; 28.0%)으로 분획하였다. 활성획분인 PE-2IV (300 mg)는 증류수로 평형화된 DEAE-Toyopearl 650C column (Cl form, 3.5×28.5 cm)에 흡착시킨 후 증류수 및 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출

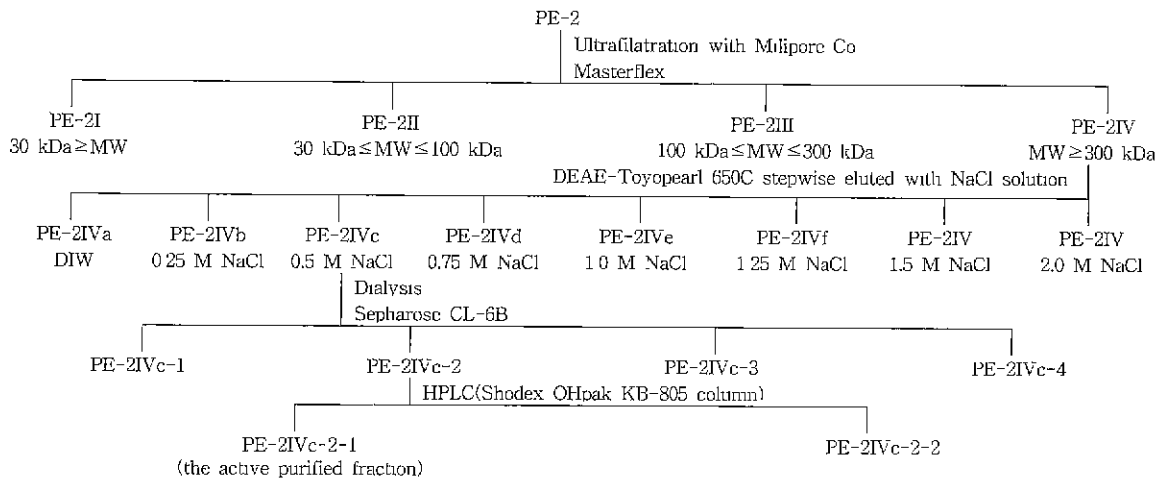


Fig. 1. Purification of the anticoagulant polysaccharide fraction PE-2IVc-2-1 from PE-2 of *Pachymeniopsis elliptica*.

시키고 부석, 농축 및 동결건조하여 8개의획분(PE-2IVa, 수율; 0.5%, PE-2IVb, 수율; 2.6%, PE-2IVc, 수율; 15.9%, PE-2IVd, 수율; 5.2%, PE-2IVe, 수율; 0.9%, PE-2IVf, 수율; 1.9%, PE-2IVg, 수율; 0.6%, PE-2IVh, 수율; 0.4%)을 얻었다. 활성획분인, PE-2IVc는 다시 Sepharose CL-6B column(2.2×95 cm)에서 0.2 M NaCl을 용매로 분획하고 투석, 농축 및 동결 건조하여 4개의획분(PE-2IVc-1~2IVc-4)을 분리하였으며, PE-2IVc-2(수율; 1.8%)로부터 Shodex OHpak KB-805 column(0.8×30 cm)이 부착된 Waters model 2690를 이용하여 0.2 M NaCl(flow rate 1 mL/min)을 용매로, refractive index(RI) detector로 활성획분인 PE-2IVc-2-1(수율; 0.8%)를 분리, 정제하였다.

적외선 흡수분광법

정제된 시료 1 mg과 KBr 200 mg을 혼합하여 KBr pellet 법으로 조제하고 FT-IR spectrophotometer(BOMEM Michelson Series MB 102-C15)로 측정하였다(17).

항응고 활성 측정

내인성 혈액응고 및 일반적인 항응고의 활성은 activated partial thromboplastin time(aPTT)으로 측정하였다(18). 즉, 시료를 함유한 100 μ L의 혈장을 aPTT 진단시약 100 μ L와 혼합한 후 37°C에서 정확히 3분간 예열하고 37°C에서 미리 예열된 20 mM CaCl₂ 100 μ L를 가해 blood coagulation analyzer를 이용하여 응고가 될 때까지의 시간으로 측정하였으며 대조구는 순수한 혈장 100 μ L를 이용하였다. 외인성 경로에 기인하는 항응고 활성은 prothrombin time(PT)으로 측정하였는데 시료를 함유한 100 μ L의 혈장을 37°C에서 정확히 3분간 예열하고 37°C

에서 미리 예열된 prothrombin time 진단시약을 100 μ L 가해 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고될 때까지의 시간으로 측정하였다(18). 한편, 응고과정의 제 3단계의 항응고 활성은 thrombin time(TT)으로 측정하였는데 시료를 함유한 100 μ L의 혈장을 37°C에서 정확히 3분간 예열하고 37°C에서 미리 예열된 thrombin time 진단시약 100 μ L를 가해 응고될 때까지의 시간으로 측정하였다(19).

참도박 조다당 획분(PE-2)의 생체 내에서의 독성 검사

경구투여에 의한 급성 및 이민성 독성 검사

각각의 시료를 식염수에 용해시킨 후 ICR계 마우스(5 주령, 1주일 적응)를 사용, 급성은 6마리를 1군으로 하여 각각의 농도별로 1회 경구에 투입한 후 14일까지 관찰하고 아만성은 10마리를 1군으로 하여 각각의 농도별로 37 일 동안 매일 오전에 경구투여하고 1, 3, 8, 13, 18, 24, 29, 37일 되는 날 체중을 관찰한 후 생존한 마리 수를 측정하여 백분율로 표시하였다.

Thrombin에 의한 항치사성 효과

ICR계 마우스(5 주령, 1주일 적응)를 2시간 절식시킨 후 식염수에 용해된 시료를 꼬리정맥에 주입한 15분 후, veronal buffer로 희석된(100 NIH unit/mL) thrombin 0.08 mL를 꼬리정맥에 주입하여 15분 동안 관찰하여 사망, 움직임이 없는 상태는 전신마비 그리고 활동이 가능한 상태를 회복으로 판독하여 회복된 개체 수를 생존 백분율로 표시하였다(20)

참도박 조다당 획분(PE-2)의 생체 내에서의 항응고 효과

꼬리정맥투여에 의한 항응고 효과

식염수에 PE-2를 0.1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90,

100 mg/kg의 농도별로 조제하여 꼬리정맥에 주사하고 30분 후 심장채혈법으로 마우스로부터 혈액 0.9 mL을 취하여 3.8% sodium citrate 용액 0.1 mL과 즉시 혼합한 다음 원심분리하여 혈구를 제거하고 혈장을 얻어 혈장 응고 활성측정법(aPTT, TT)으로 응고시간을 측정하였다(21).

꼬리정맥투여에 의한 생체 내에서의 잔존 효과

마우스에 PE-2, 100 mg/kg을 정맥 주사한 후 2시간 간격으로 심장채혈법으로 마우스로부터 혈액 0.9 mL을 취하여 3.8% sodium citrate 용액 0.1 mL과 즉시 혼합한 다음 원심분리하여 혈장을 얻어 혈장응고 활성측정법(aPTT, TT)으로 혈액응고시간을 측정하였다(21).

결과 및 고찰

참도박으로부터 항응고 활성물질의 정제와 특성

참도박의 열수추출물로부터 70% 에탄올의 첨가에 의해 조제된 조다당 획분인 PE-2를 Millipore사의 Masterflex 한외여과기를 이용하여 분자량에 따라 4개 획분(PE-2I, PE-2II, PE-2III, PE-2IV)으로 분획하여 항응고 활성을 측정할 결과, 300 kDa 이상의 분자량을 가지는 PE-2IV 획분이 500 µg/mL에서 600초를 넘는 응고시간을 보였으며 250 µg/mL의 농도에서도 459초로 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 1) 이러한 활성획분인 PE-2IV 획분은 당 58.2%와 산성당 24.7% 및 단백질 4.9%로 구성되었고, 주요 구성물질인 당은 53%의 galactose와 37.5%의 3,6-anhydrogalactose를 포함하고 있었으며 황산기를 이루는 것으로 추정되는 황 함량의 경우에는 25.6%이었다(Table 2). PE-2IV로부터 DEAE-Toyopearl 650C column (Cl⁻ form)을 이용한 이온교환 크로마토그래피로 분획하여 비흡착 획분(PE-2IVa)과 7개의 흡착획분(PE-2IVb ~ 2IVh)을 얻었다. 각각의 획분에 대하여 항응고 활성을 측정할 결과는 Table 1에서와 같이 0.5 M NaCl에서 용출된 PE-2IVc 획분이 500 µg/mL와 250 µg/mL의 시료농도에서 모두 600초를 초과하는 높은 활성을 보였으며 수율도 15.9%로 가장 높았다(Table 1) 한편 이 획분은 당이 53.6%, 산성당이 19.3% 그리고 단백질이 3.4%의 조성을 보였으며(Table 2), 당은 51.6%의 galactose와 39.3%의 3,6-anhydrogalactose가 주로 포함되어져 있었고 황 함량은 26.2%로 PE-2IV보다 약간 증가된 경향을 보였다(Table 2) Ion exchange chromatography에서 가장 활성이 높았던 획분인 PE-2IVc는 Sepharose CL-6B column의 gel filtration으로 분획하여 4개의 획분(PE-2IVc-1 ~ 2IVc-4)으로 분리되었으며(Fig. 2), 각 획분의 항응고 활성은 aPTT의 경우에는 1,000 µg/mL에서 PE-2IVc-1, 2, 3의 획분이 600초를 넘는 응고시간을 보였으나 100 µg/mL의 시료농도에서는 PE-2IVc-2가 가장 높은 75초의 활성을 보였고 PT와 TT에서도 높은 활

Table 1. Anticoagulant activities of subfractions obtained from PE-2 on Ultrafiltration and DEAE-Toyopearl 650C

	Dose (µg/mL)	Subfractions	aPTT activity ¹⁾ (sec)	
Experiment 1 (Ultrafiltration)	500	PE-2	≥600.0±0.0 ²⁾	
		PE-2I	83.3±1.2 ³⁾	
		PE-2II	162.4±2.6	
		PE-2III	235.8±2.5*	
		PE-2IV	≥600.0±0.0**	
Experiment 2 (DEAE-Toyopearl)	250	PE-2	378.0±2.0	
		PE-2I	45.3±0.6	
		PE-2II	74.1±0.8	
		PE-2III	104.8±1.2	
		PE-2IV	459.0±2.5**	
		500	PE-2IV	≥600.0±0.0
			PE-2IVa	33.3±0.5
			PE-2IVb	78.7±1.0
PE-2IVc	≥600.0±0.0**			
PE-2IVd	≥600.0±0.0**			
PE-2IVe	179.0±2.5			
PE-2IVf	72.2±1.2			
PE-2IVg	65.1±1.5			
250	PE-2IVh	74.6±2.5		
	PE-2IV	459.0±3.8		
	PE-2IVa	31.2±0.5		
	PE-2IVb	49.6±0.4		
	PE-2IVc	≥600.0±0.0**		
	PE-2IVd	348.3±2.7		
	PE-2IVe	39.4±0.4		
	PE-2IVf	47.7±0.5		
PE-2IVg	64.2±1.5			
PE-2IVh	49.3±0.6			

¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time and its control time was 30 sec.

²⁾The activity value of ≥600.0 means over-range of measurement.

³⁾All analyses are done in triplicate.

*p<0.05; **p<0.01. Significance between the original fraction and subfraction.

성을 보이지는 않았으나 PE-2IVc-2만이 1,000 µg/mL의 시료농도에서 각각 41초와 73초로 PT와 TT에서도 모두 높았다(Fig. 3). 한편, aPTT, PT와 TT에서 모두 활성을 보인 PE-2IVc-2는 59.2%의 당과 15.3%의 산성당 및 2.8%의 단백질을 포함하고 있었고 당은 50.8%의 galactose와 41.1%의 3,6-anhydrogalactose가 주요한 구성당을 형성하였으며 황 함량은 26.5%이었다(Table 2). 최종적으로 PE-2IVc-2 획분은 Shodex OHpak KB-805의 GPC column을 이용, HPLC로 재분획하여 2개의 획분(PE-2IVc-2-1과 PE-2IVc-2-2)을 얻었으며(Fig. 4A). 항응고 활성을 측정할 결과는 PE-2IVc-2-1이 1,000 µg/mL의 시료농도에서 aPTT, PT와 TT 모두 높은 활성을

Table 2. Physicochemical properties of subfractions purified from PE-2 of *Pachymeniopsis elliptica*

	PE-2	PE-2IV	PE-2IVc	PE-2IVc-2	PE-2IVc-2-1
Content (%)					
Carbohydrate ¹⁾	54.8	58.2	53.6	59.2	67.3
Uronic acid ²⁾	12.0	24.7	19.3	15.3	12.7
Protein ³⁾	4.9	4.9	3.4	2.8	1.2
Sulfur ⁴⁾	25.7	25.6	26.2	26.5	27.1
Yield	34.3	28.0	15.9	1.8	0.8
Component sugar (mol. %) ⁵⁾					
Fucose	1.2	0.9	0.9	0.8	0.8
Arabinose	trace	1.9	1.1	0.7	0.8
Xylose	4.5	4.6	4.5	3.8	3.6
Mannose	1.9	1.3	1.5	1.8	1.1
Galactose	45.3	53.0	51.6	50.8	48.6
Glucose	10.4	0.8	1.1	1.0	1.1
3,6-AnhydroGal	36.7	37.5	39.3	41.1	44.0

¹⁾Carbohydrate content · Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

²⁾Uronic acid content · *m*-hydroxydiphenyl method (as GalA).

³⁾Protein content · Lowry method (as BSA).

⁴⁾Sulfur content · Dodgson' modified method (as K₂SO₄).

⁵⁾Component sugar of polysaccharide was determined by GC as alditol acetate derivatives.

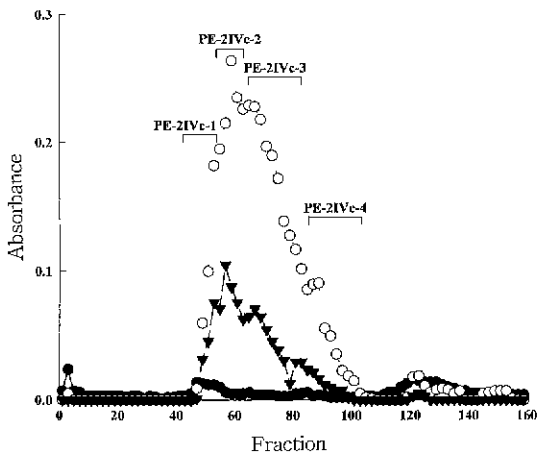


Fig. 2. Elution pattern of PE-2IVc on Sepharose CL-6B. The column (2.2 × 95 cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.2 M NaCl at flow rate of 0.2 mL/min and the fraction size was 3 mL/tube
○, Carbohydrate (490 nm) · ▼, Uronic acid (520 nm); ●, UV absorption (280 nm)

보였으며, 100 µg/mL에서도 각각 128, 14, 28초로 높은 활성을 보였다(Fig. 5). 이러한 활성회분은 당이 67.3%, 산성당 12.7% 그리고 단백질은 1.2%로 조당당 흰분예에 비해 당의 함량은 높아졌고 단백질은 현저히 감소된 흰분예를 알 수 있었다 한편 주요한 구성물질로 존재하는 당은 48.6%의 galactose와 44.0%의 3,6-anhydrogalactose로 구성되어 있는 다당류의 물질로 추정되며 황의 함량이 27.1%인 것으로 미루어 당의 상당부분이 황산기로 치환되어 있을 가능성을 보여주고 있다(Table 2). 한편 HPLC의 분석을 통해 얻어진 황산고 활성회분인 PE-2IVc-2-1을 Shodex OHPak KB-805 column을 이용하여 HPLC로 분석한 결과, 활성회분인 PE-2IVc-2-1은 단일 peak로

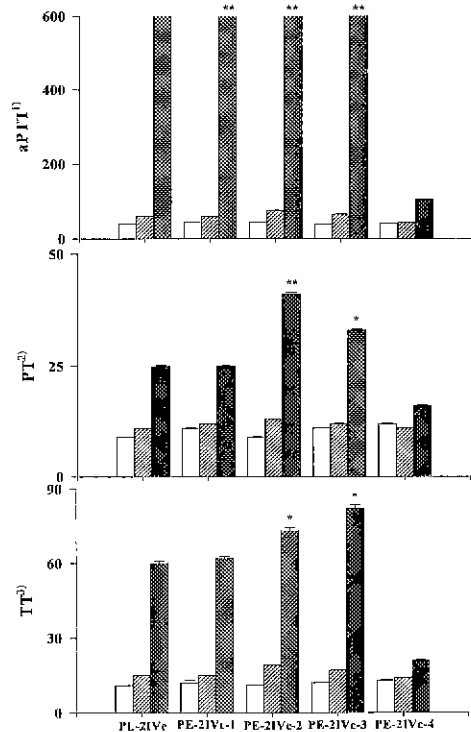


Fig. 3. Anticoagulant activities of subfractions obtained from PE-2IVc on Sepharose CL-6B. PE-2IVc-1, 2IVc-2, 2IVc-3 and 2IVc-4 were obtained from PE-2IVc using Sepharose CL-6B. ¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time and its control time was 30 sec. ²⁾Clotting time of prothrombin time and its control time was 15 sec. ³⁾Clotting time of thrombin time and its control time was 12 sec. Values represent the means ± S.D. (n=4) *p<0.05; **p<0.01. Significance between the original fraction and subfraction.
□, 10 µg/mL; ▨, 100 µg/mL; ▩, 1,000 µg/mL.

용출되어 단일물질로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 또한 정제된 획분의 분자량 측정을 위해 표준물질로 dextran T-2,000(M.W.: 2×10^6), T-500(M.W.: 5×10^5), T-70(M.W.: 7×10^4), T-40(M.W.: 4×10^4), T-10(M.W.: 1×10^4) 그리고 galactose를 사용하여 Shodex OHpak KB-805에서 구한 표준곡선과 K_{av} 값을 비교하여 측정된 결과, 정제 활성획분인 PE-2IVc-2-1은 약 710 kDa의 물질임을 알 수 있었다(Fig. 4B).

정제한 항응고 활성획분(PE-2IVc-2-1)의 IR 흡수 특성

Heparin은 antithrombin III과 결합함으로써 antithrombin III의 항응고 활성을 증폭시켜 활성을 나타내는데 이 두 물질 사이의 결합 부위는 명확히 밝혀지지는 않았으나 heparin의 negative charge인 황산기와 antithrombin III의 Lys/Arg 잔기 사이에서의 정전기적 상호결합(electrostatic interaction)에 기인한다고 보고되고 있다(17).

따라서 heparin 계통의 항응고성 물질에 있어서 황산기는 필수적인 부분이며 그 함량에 따라 활성이 좌우된다(22). 참도박으로부터 분리, 정제한 활성획분인 PE-2IVc-2-1의 경우에도 지금까지의 결과로부터 당의 상당부분이 황산기로 치환되어져 있는 다당류임을 확인하였으며 이에 따라 IR 흡수 특성을 조사하여 항응고 활성과의 상관관계를 검토한 결과, PE-2IVc-2-1은 IR spectrum에서 S=O 결합의 황산기가 존재함을 나타내 주는 1116.74 cm^{-1} 및 1143.17 cm^{-1} 부근의 강한 흡수 band가 나타났으며 약하지만 C-O-S 결합을 나타내는 828.19 cm^{-1} 부근의 흡수 band도 보여 항응고 활성에 관여하는 황산기의 존재 가능성을 제시하였다(23)

참도박 조다당 획분(PE-2)의 생체 내에서의 독성 검사
참도박의 열수추출물로부터 70% 에탄올 첨가에 의해

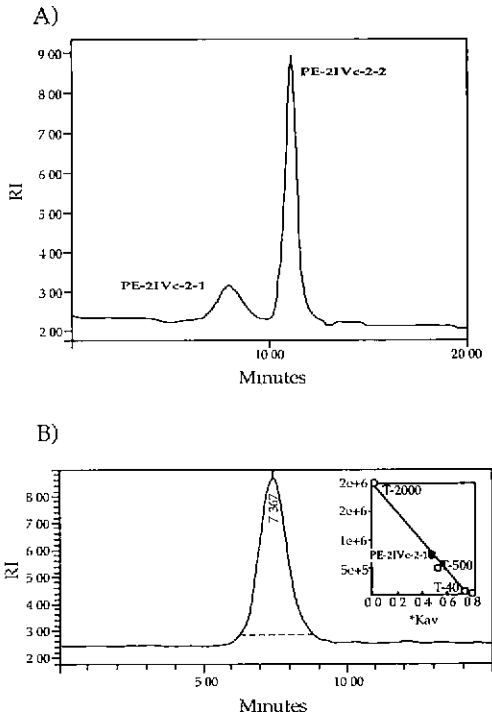


Fig. 4. (A) Elution pattern of PE-2IVc-2 by gel filtration on HPLC with Shodex OHpak KB-805. (B) HPLC profile of the active purified fraction, PE-2IVc-2-1 on Shodex OHpak KB-805. HPLC was performed on a Waters 2690 equipped with column of Shodex OHpak KB-805 and developed with 0.2 M NaCl at flow rate 1.0 mL/min. Molecular weights of polysaccharides were estimated from a calibration curve of elution volumes of standard dextran (T-2,000, 500, 40, 10 and glucose). Inset, standard calibration curve of elution volumes of standard dextran and PE-2IVc-2-1

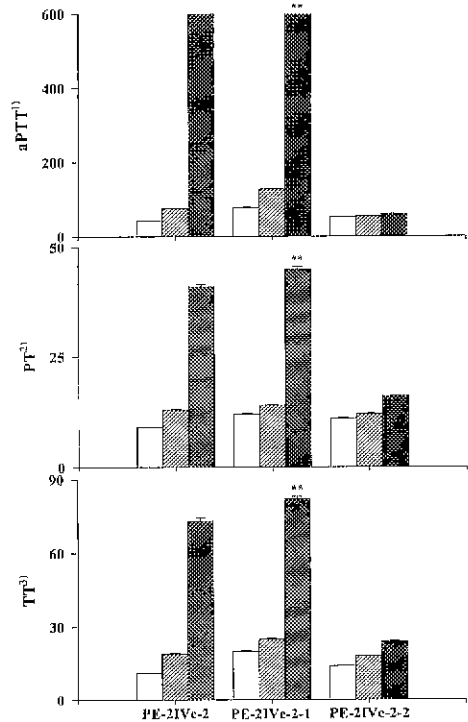


Fig. 5. Anticoagulant activities of subfractions obtained from PE-2IVc-2 on HPLC with Shodex OHpak KB-805. PE-2IVc-2-1 and 2IVc-2-2 were obtained from PE-2IVc-2 using HPLC ¹Clotting time of activated partial thromboplastin time and its control time was 30 sec ²Clotting time of prothrombin time and its control time was 15 sec. ³Clotting time of thrombin time and its control time was 12 sec Values represent the means \pm S.D. (n=4) ¹⁾p<0.01; ²⁾Significance between the original fraction and subfraction. □, 10 $\mu\text{g/mL}$; ▨, 100 $\mu\text{g/mL}$; ■, 1,000 $\mu\text{g/mL}$.

조제된 조다당 획분(PE-2)을 경구투여한 후 급성독성의 여부를 검토한 결과, 6,000 mg/kg의 투여농도에서도 독성을 보이지 않았다(Table 3A). 이러한 수치는 chitosan과 heparin의 LD₅₀이 각각 237 mg/kg과 700 mg/kg인 것과 비교할 때 독성이 없음을 알 수 있었다(24). 또한 PE-2를 시료의 농도별로(100, 300, 500 mg/kg) 37 일간 경구투여하고 생존률을 살펴 본 결과 100%로(Table 3B) 참도박의 조다당 획분은 경구투여에 의한 아만성 독성 또한 없음을 보였다. 한편, PE-2의 thrombin에 대한 *in vivo*에서의 항치사성 효과를 조사한 결과는 시료량 250 mg/kg에서는 생존률이 100%를 나타내었으나 시료량이 감소함에 따라 생존률도 감소하는 경향을 보여 thrombin에 대한 항

치사성 효과도 높은 것으로 추정된다(Table 4).

생체 내에서의 항응고 활성과 잔존 효과

참도박으로부터 열수추출하여 조제한 조다당 획분인 PE-2의 생체 내에서의 항응고 효과를 알아보기 위해 농도별(0~100 mg/kg)로 시료를 마우스의 꼬리에 정맥투여하고 30분 후 심장채혈법으로 혈액을 취하여 혈장응고 활성 측정법(aPTT, TT)으로 혈액응고 시간을 측정한 결과(Fig. 6), 시료를 투여하지 않은 대조군의 혈액응고 시간은 평균적으로 aPTT는 32~35초, TT는 15~18초인 반면 시료를 투여한 실험군은 투여량에 비례하여 마우

Table 3. Effect of the crude polysaccharide fraction, PE-2 on A) acute and B) subchronic toxicity of mouse by oral administration

A) acute toxicity

Group	Mouse No.	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Survived mouse No	Survival rate (%)
Saline (Control)	6	28.82±1.52 ¹⁾	33.95±1.85	6	100
500 mg/kg	6	29.85±1.55	35.17±1.97	6	100
1,000 mg/kg	6	29.55±1.75	35.07±1.77	6	100
2,000 mg/kg	6	29.86±2.06	34.35±2.15	6	100
4,000 mg/kg	6	28.85±1.25	34.67±1.27	6	100
6,000 mg/kg	6	29.83±2.47	34.15±1.55	6	100

¹⁾The values represent the gram of weight with standard deviation of the mean of 6 mice per group

B) subchronic toxicity

Days	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	500 mg/kg
1	28.21±1.76 ¹⁾	28.45±1.96	28.06±1.76	28.44±1.98
3	29.89±1.81	30.50±2.50	29.43±1.77	29.94±2.16
8	31.49±1.01	32.03±2.23	31.92±1.42	30.83±2.37
13	32.67±1.43	34.53±2.97	33.18±2.97	32.57±2.97
18	34.10±1.50	35.60±2.60	34.90±1.60	34.40±2.90
24	35.60±1.70	37.90±3.30	36.20±1.10	35.80±2.40
29	37.50±1.60	39.60±3.70	37.40±1.50	37.70±2.80
37	37.70±1.90	40.10±4.20	37.70±1.20	37.90±2.60
Survival rate (%)	100	100	100	100

¹⁾The values represent the gram of weight with standard deviation of the mean of 10 mice per group.

Table 4. Antilethal effect of the crude polysaccharide fraction, PE-2 against thrombin by intravenous injection

Group ¹⁾	Mouse No	Time (h)				Survival rate (%) ²⁾	
		Death					
		1	3	6	24	48	
Saline	10	6	1	1	0	0	20
50 mg/kg	10	1	2	2	1	0	40
100 mg/kg	10	2	1	1	1	0	50
150 mg/kg	10	1	0	1	1	0	70
200 mg/kg	10	0	0	0	0	1	90
250 mg/kg	10	0	0	0	0	0	100

¹⁾Sample was administered intravenously into the tail veins of mice

²⁾Survival ratio (%) expressed as the percentage of No of alive mice to No of all tested mice.

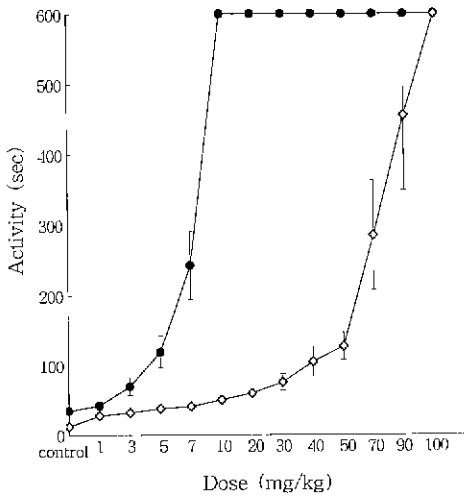


Fig. 6. Ex-vivo effect of PE-2 fraction by intravenous injection on anti-coagulant activity
The crude polysaccharide fraction, PE-2, was administered intravenously into the tail veins of mice at different dose. Values represent the means \pm S.D. (n=4) ●, aPTT (Clotting time of activated partial thromboplastin time and its control time was 30 sec); ◇, TT (Clotting time of thrombin time and its control time was 12 sec)

스의 혈액응고 시간을 지연시켜 aPTT인 경우 10 mg/kg 이상의 시료량에서 600초를 초과하는 높은 생체 내 활성을 보여주었다. 임상적으로 혈액 응고의 이상이 있다고 판정되는 환자의 응고시간은 정상인의 30% 이상임을 고려하면 참도박의 조다당 획분인 PE-2의 생체 내에서의 항응고 효과는 상당히 높은 것으로 생각되어진다. 또한 이러한 PE-2의 생체 내에서의 시간 경과에 따른 항응고 활성의 잔존효과를 알아보기 위해 100 mg/kg을 마우스에 정맥 주사한 후 2시간 간격으로 마우스로부터 심장체혈법으로 혈액을 취하여 혈장 응고 활성 측정법(aPTT, TT)으로 측정한 결과(Fig 7), 대조군과 비교하여 정맥주사 후 24 시간까지 항응고 효과가 지속됨을 관찰할 수 있었다

요 약

국내산 헤조류의 항응고 활성 검색에 의해 활성과 수율 면에서 우수한 속초 산 참도박(*Pachymeniopsis elliptica*)의 열수추출물로부터 70% 에탄올 침전으로 조제된 조다당 획분(PE-2)을 환외여과(PE-2IV), DEAE-Toyopearl650C의 이온교환 column(PE-2IVc), Sepharosc CL-6B의 겔 여과 column(PE-2IVc-2) 및 Shodex OHpak KB-805 column의 HPLC로 분획하여 710 kDa의 분자량을 갖으면서 galactosc(48.6%)와 3, 6-anhydrogalactosc(44.0%)로 주로 구성되어 있고 황황량이 27.1%이며 소량의 xylose(3.6%), glucose(1.1%), mannose(1.1%), arabinose(0.8%)

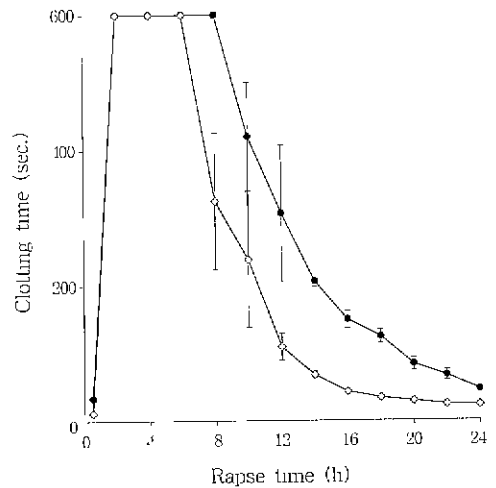


Fig. 7. Time course of anticoagulant activity of PE-2 fraction after intravenous injection.
The crude polysaccharide fraction, PE-2, was administered intravenously into the tail veins of mice at 100 mg/kg ●, aPTT (Clotting time of activated partial thromboplastin time and its control time was 30 sec.) ◇, TT (Clotting time of thrombin time and its control time was 12 sec.).

와 fucose(0.8%)를 포함하는 다당획분, PE-2IVc-2-1를 정제하였다. 또한 PE-2IVc-2-1의 IR 측정결과, S=O 결합을 나타내는 1116.74 cm^{-1} 와 1143.17 cm^{-1} 와 C-O-S 결합의 828.19 cm^{-1} 에서 각각 특이적인 흡수 band를 보임으로써 PE-2IVc-2-1 중에 황산기가 존재하고 있음을 알 수 있었다. 한편, 조다당 획분인 PE-2를 꼬리 정맥에 주사하고 채혈하여 ex vivo로 항응고 활성을 측정한 결과, 생체 내에서 100 mg/kg의 농도까지도 시료량에 의존하는 항응고 활성을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 해양수산부의 연구비지원에 의해 이루어진 결과이므로 이에 감사드립니다

문 헌

- 1 Kim, Y T. Identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkook-jang. Ph. D. Dissertation, Sejong University (1995)
- 2 Kenneth, A.B ' Natural anticoagulants and the prethrombotic state. In *Blood, Principles and practice of hematology*, J.B. Lippincott Company. Philadelphia, p.1319-1332 (1995)
- 3 Doctor, V.M. and Sauls, V. Isolation and anticoagulant properties of a new sulfated xylan, Comparison with heparin and a sodium pentosan polysulfate. *Thromb. Res.*, **30**, 573-578 (1983)

4. Doctor, V.M., Lewis, D., Coleman, M., Kemp, M.T., Marbley, E. and Sauls, V. : Anticoagulant properties of semi-synthetic polysaccharide sulfates. *Thromb. Res.*, **64**, 413-425 (1991)
5. Nishino, T., Takabe, Y. and Nagumo, T. : Isolation and partial characterization of a novel β -D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var *longissima*. *Carbohydr. Polym.*, **23**, 165-173 (1994)
6. Nishino, T. and Nagumo, T. : The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydr. Res.*, **214**, 193-197 (1991)
7. Larsen, B., Haug, A. and Painter, T. : Sulfated polysaccharides in brown algae. 3. The native state of fucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Acta Chem. Scand.*, **24**, 3339-3352 (1970)
8. Alban, S. and Franz, G. : Anticoagulant activities of β -1, 3-glucansulfates dependence on their molecular weight. *Pure Appl. Chem.*, **66**, 2403-2406 (1994)
9. Yoon, J.A., Yu, K.W., Jun, W.J., Jo, H.Y., Soon, Y.S. and Yang, H.C. : Screening of anticoagulant activity and optimization of extraction condition from edible seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, accepted (2000)
10. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956)
11. Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. : New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489 (1973)
12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Rindall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-275 (1951)
13. Dodgson, K.S. and Price, R.G. : A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, **84**, 106-110 (1962)
14. Jones, T.M. and Albersheim, P. : A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, **49**, 926-936 (1972)
15. York, W.S., Darvill, A.G., McNeil, M., Stevenson, T.T. and Albersheim, P. : Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol.*, **118**, 3-40 (1986)
16. Duckworth, M. and Yaphe, W. : Preparation of agarose by fractionation from the spectrum of polysaccharides in agar. *Anal. Biochem.*, **44**, 636-641 (1971)
17. Lee, H.S., Kweon, M.H., Lim, W.J., Sung, H.C. and Yang, H.C. : An anticoagulant polysaccharide isolated from the alkali extracts of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 369-375 (1997)
18. Casu, B., Oreste, P., Torri, G., Zoppetti, G., Choay, J., Lormeau, J.C., Petitou, M. and Sinay, P. : The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ^{13}C nuclear-magnetic-resonance. *Biochem. J.*, **197**, 599-609 (1981)
19. Irving, F., Adrian, D., Peter, L., Jane, E., Kathleen, F., Elizabeth, L., Don, H., Tim, M., John, W. and John, M. : Anticoagulant activity of HirulogTM, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Blood Coagul. Fibr.*, **69**, 157-165 (1993)
20. Suzuki, N., Kitazato, K., Takamatsu, J. and Saito, H. : Antithrombotic and anticoagulant activity of depolymerized fragment of the glycosaminoglycan extracted from *Stichopus japonicus* Selenka. *Thromb. Haemost.*, **65**, 369-373 (1991)
21. Kim, J.S. : Blood coagulant activity of extracts from the mycelia of *Phellinus luteus*. *Master Thesis*, Korea University (1998)
22. Kim, K.I., Seo, H.D., Lee, H.S., Jo, H.Y. and Yang, H.C. : Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1204-1210 (1998)
23. Chang, H.D. : *Analytical Chemistry* HagMoon-Dang, Seoul, p.166 (1994)
24. Horton, D. and Renst, K.J. : Preparation from chitin of (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranuronan and its 2-sulfoamino analog having blood-anticoagulant properties. *Carbohydr. Res.*, **29**, 173-179 (1973)

(2000년 7월 24일 접수)