

## 옥발에서 항응고물질의 정제와 특성

최상규 · 최혜신<sup>†</sup>

울산대학교 생명과학부

### Purification and Characterization of an Anticoagulant from Corn Silk

Sang-Kyu Choi and Hye-Seon Choi<sup>†</sup>

Dept. of Biological Sciences and Immunomodulation Research Center,  
University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

#### Abstract

An anticoagulant was purified from corn silk which has been used in Oriental Medicine. The anticoagulant from corn silk has a molecular mass of 135 kDa, and purified by 24 folds with a recovery of 11%. It was not sensitive to heat and protease treatment. However, periodate oxidation of the anticoagulant resulted in loss of activity significantly, implying that a carbohydrate was responsible for an anticoagulant activity. Galactose, glucose, mannose, fucose, glucosamine, and galactosamine were detected after acid hydrolysis by thin layer chromatography (TLC) and Bio-LC. It was confirmed that anticoagulant had OH and NH bonds by IR, supporting that the anticoagulant is composed of neutrosugar and aminosugar. Its anticoagulating activity was measured by delay in thrombin time (TT) and prothrombin time (PT) without affecting clotting by snake venom and delay in activated partial thromboplastin time (APTT). TT was more sensitive than PT, and was delayed two and three times at the concentration of 60 and 88 nM, respectively. The anticoagulating activity was reduced in the thrombin-induced clotting assay using purified fibrinogen according to the increase of fibrinogen concentration with the apparent *K<sub>i</sub>* value of 23 nM.

**Key words:** corn silk, anticoagulant, thrombin time, thrombin

#### 서 론

현대 의학의 발달로 인간의 평균 수명이 비약적으로 늘어났지만 평균 수명의 증가가 건강한 생활을 보장하지는 못하고 있다. 우리나라에서도 서구화된 식문화의 변화로 순환계 질병은 발생 빈도가 증가하고 사망원인의 1, 2위를 차지하고 있다. 생명 활동 유지를 위한 혈액순환 과정에서 혈액 응고계와 혈액 용해계의 장애는 심장혈관 질환(cardiovascular disease), 뇌경색(cerebral infarction), 심근 경색(myocardial infarction) 등의 병을 일으킬 수 있다. 혈액의 응고는 thrombin에 의해 fibrinogen의 polymer 형성에 의해 촉진되고 tissue plasminogen activator에 의해 활성화되는 plasmin system에 의해 분해된다(1-3). 피의 응고와 분해는 생명유지와 밀접한 관련이 있으므로 정교하게 조절되어져 있다. Anticoagulation이나 fibrinolysis를 억제하는 물질은 antithrombotic therapy를 위한 유망한 조절물질로 생각되어 많은 관심을 받고 있다(4-11). 생리적 응고억제인자인 activated protein C (12), 합성당인 SANORG34006(13), 한국과 일본의 전통발효식품인 청국장과 나토의 *Bacillus* sp.로부터 fibrinolytic

enzyme(14-16), *Hirudo medicinalis*에서 분리된 hirudin(17), *Pleurotus ostreatus*(18) *Flammulina velutipes*(19), *Ganoderma lucidum*(20), *Spirodela polyrhiza*(21)로부터 분리된 fibrinolytic protease들이 보고되어졌다.

옥발(corn silk)은 벼과에 속하는 옥수수(*Zea mays* Linne)의 수염으로서 옥미발이라고도 한다. 한방에서는 옥촉서라고 부르기도 하는 옥수수는 열대 아메리카 원산의 한해살이 식물로서 많이 재배되고 있다(22). 옥발의 성분에는 지방유, 정유, 식물 고무 물질, 지방, 쓴맛 배당체, saponin, alkaloid 외에 inositol, cryptoxanthin, pantothen산, vitamin C, vitamin K, sitosterol, stigmasterol, 사과산, 주석산, 포도당, 키실란, 갈락탄, 카테콜 등이 함유되어 있으며, 특히 상당량의 vitamin K가 포함되어 있다(23). 옥발은 고혈압, 강혈당, 토혈, 지혈, 비출혈, 평간, 설열, 각기, 축농증, 이담작용, 이뇨작용 등에 효능이 있다고 보고되어 왔다(24).

본 연구에서는 혈액 응고와 관련 있는 천연물인 옥발에서 항응고 활성을 갖는 물질을 추출하여 물리·화학적 특성과 생화학적 특성을 연구하고자 한다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: hschoi@mail.ulsan.ac.kr  
Phone: 82-52-259-2357. Fax: 82-52-259-1694

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 실험에 사용한 옥발은 1999년 서울경동시장 한약재료 상에서 국내산을 구입하여 사용하였다. 사람의 혈장은 건강한 자원자의 것을 사용했고 YM10 membrane은 Amicon에서 thrombin, sodium borate, boric acid, activated partial thromboplastin time kit, CaCl<sub>2</sub>, fibrinogen, Sephadex G-100, Sephadex G-150, DEAE-Sephadex A-50은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA), TLC plate는 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구했다. 원소분석은 울산대학교 공동기기센터에서, 당분석은 대덕의 기초과학연구원연구소에서 행해졌다.

### 혈액응고 저해물질의 정제

건조된 재료 100 g을 분쇄기로 충분히 파쇄한 후 500 mL의 증류수를 넣어 1시간 동안 혼합후 여러 겹의 거즈를 통해 여과시켰다. 여과된 부분을 모아서 8,000×g으로 40분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 모아 같은 부피의 ethyl acetate를 분별깔때기에 넣은 후 잘 혼합한 다음 2시간 이상을 대기한 후에 aqueous phase층의 용액을 모아서 evaporator로 수분을 증발시키고 농축하였다. 농축액을 hydrophobic column인 phenyl Sepharose(PS) column에 실어주었다. PS column(3×20 cm)은 1.7 M ammonium sulfate를 포함한 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 equilibration시키고 시료도 1.7 M ammonium sulfate로 농도를 맞춘 후 1.7 M ammonium sulfate에서 0 M ammonium sulfate로 농도를 gradient로 저하시키고 그 이후 0 M ammonium sulfate로 지속적으로 유지한다. 혈액응고저해물질은 PS에 단단히 부착되어 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 용출시에 PS에서 분리되었다. Ultrafiltration으로 다시 농축시키고 Sephadex G-100 gel을 column(3×98 cm)에 적재하여 flow rate을 1.5 mL/min으로 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 용출하였다. 항응고 활성이 있는 분획을 모아서 ultrafiltration으로 다시 농축하고 또 다른 gel filtration chromatography인 Sephadex G-150(3×100 cm)에서 다른 조건은 앞서와 같고 flow rate을 0.5 mL/min로 교정하여 용출하였다. 항응고 활성이 있는 분획들을 모아서 YM-10 membrane(Amicon, Millipore)을 이용하여 질소가스하에서 ultrafiltration으로 농축하고 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 3 차례의 buffer exchange 후 -20°C에 보관 사용하였다. 정제시 혈액응고저해는 thrombin time의 저해를 통해 측정했다.

### 혈액응고 저해활성 측정

건강한 자원자의 혈액(54 mL)을 6 mL의 3.8% sodium citrate에 넣어 잘 섞어주었다. Plasma는 초기의 혈액을 400×g, 10 min에서 원심분리하고 800×g, 20 min에서 두 번째 원심 분리하여 나머지 혈소판을 제거했다. Activated partial

thromboplastin time(APTT)과 thrombin time(TT)은 420 nm에서 흡광도의 증가에 의해 측정되었다. APTT assay는 1 mL에 0.3 mL의 platelet poor plasma, 0.3 mL의 APTT reagent와 다양한 농도의 분획을 포함했다. 반응용액은 37°C에서 2분간 배양하고 반응은 8 μL의 1 M CaCl<sub>2</sub>을 첨가하여 시작했다. TT는 APTT 시약과 CaCl<sub>2</sub>를 빼고 반응이 thrombin(0.8 μg/mL)을 첨가하면서 시작했다. Clotting time은 흡광도의 증가가 급격히 일어나는 시간을 기준으로 하였다( $\Delta A_{420} > 0.010$ ). 같은 방법이 snake venom, reptilase activity를 측정하기 위해 사용되고 4 μg/mL의 reptilase가 thrombin 대신에 사용되었다. Fibrinogen clotting time을 위한 반응용액은 정해진 농도의 fibrinogen을 50 mM NaCl을 포함하는 0.2 M borate buffer, pH 7.8에 넣어주고 반응은 1 μg/mL의 thrombin을 넣어 주었다.

### Periodate oxidation

혈액응고저해물질을 50 mM acetate buffer, pH 4.5에 용해시킨 후 50 mM NaIO<sub>4</sub>를 5 mL 가해 4°C의 암실에서 3일간 산화시켰다. 반응용액에 ethylene glycol을 5 mL 가해 1시간 동안 실온에서 방치 후 증류수에 투석하였다. 투석액을 농축하여 20 mL로 만들고 20 mg의 NaBH<sub>4</sub>를 첨가하여 실온에서 1시간 섞어주고 0.1 M acetic acid로 중화 후 다시 투석하였고 동결건조 후 활성을 측정하였다.

### 항응고물질의 화학적 성분분석

항응고물질을 구성하는 당 성분을 확인하기 위해서 가수분해시켰다. 산성당은 6 N HCl을 첨가하여 80°C에서 1시간 중탕하였고, 중성당은 trifluoroacetic acid(TFA)를 첨가한 후 100°C에서 4시간 그리고 아미노당을 확인하기 위해서는 6 N HCl을 첨가하여 100°C에서 4시간 중탕하여 가수분해시켰다. 일부의 시료는 대덕의 기초과학연구소에 Bio-LC분석을 의뢰하였고 나머지는 thin layer chromatography(TLC) plate (Cellulose on polyester)를 준비하여 각 시료를 적재하고, n-Butanol : Pyridine : D.W.가 6 : 4 : 3으로 구성된 용매에서 전개하였다. 중성당과 산성당을 확인하기 위해서 2% diphenylamin, 2% aniline, 85% phosphoric acid가 10%가 되도록 methanol에 넣은 용액을 뿌려서 100°C의 dry oven에서 15분간 구웠으며, 그리고 아미노당을 확인하기 위해서는 0.6 g의 ninhydrin을 200 mL n-butanol에 용해시킨 용액을 뿌린 후 100°C의 dry oven에서 7분간 구워 확인하였다.

IR spectrum의 측정은 건조된 시료 1 mg을 분광기용 KBr에 넣어서 혼합 분쇄한 후 700 kg/cm<sup>3</sup> 압력으로 15분 동안 압축하여 두께가 1~2 mm 정도의 투명한 원판(pallet)을 만들어 FT-IR spectrophotometer model Satellite(Thermo Mattsow, USA)를 사용하여 wave number 400 cm<sup>-1</sup>~4,000 cm<sup>-1</sup>에서 측정하였다. IR intensity의 계산은 wave number 1,500 cm<sup>-1</sup> intensity를 기준으로 하여 각 파수의 상대적 intensity를 구하였다.

Table 1. Purification of the anticoagulant from corn silk

Purification step	Total activity (units) <sup>1)</sup>	CHO (mg)	Yield (%)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)
Crude extract from corn silk	41,667	1,425	100	29	1.0
Ethyl acetate aqueous phase	41,667	1,150	92.31	36	1.24
Pheny. Sepharose column chromatography	16,667	37.6	40.00	443	15.27
Sephadex G-100 gel filtration chromatography	7,333	10.82	17.60	678	22.41
Sephadex G-150 gel filtration chromatography	4,600	6.48	11.04	710	24.48

<sup>1)</sup> 1 unit: folds of delay of clotting time induced by anticoagulant, compared to buffer control.

항응고물질의 원소 분석은 정제된 시료에서 염성분을 제거하기 위해서 ultrafiltration concentrator(Amicon 8200, YM10 membrane, Beverly, USA)로 3회 정제한 후 freeze dry system에서 동결 건조한 시료를 울산대학교 공동기기 센터에 의뢰하여 elemental analyzer(Asons Inst. EA1108-CHNS & EA1108-O Detector)를 통해서 원소 구성비를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 옥발에서 항응고물질의 정제

옥발(corn silk)에서 항응고물질(anticoagulant)을 분리 정제하기 위해서 crude extract로부터 같은 양의 ethyl acetate 혼합 후 분별하여 aqueous phase를 농축하여 hydrophobic chromatography인 phenyl Sepharose gel filtration과 Sephadex G-100 gel filtration 그리고 Sephadex G-150 gel filtration 단계의 chromatography 과정을 이행하였다. Table 1은 옥발에서 항응고물질의 정제 단계별 회수율과 정제율인데 phenyl Sepharose gel filtration chromatography 단계에서 가장 specific activity의 증가가 높게 일어났다. 옥발에서 정제된 항응고물질의 specific activity는 710 U/mg으로 약 11% 회수되어 24배로 농축되었다.

### 옥발에서 항응고물질의 물리, 화학적 특성분석

마지막으로 분리된 정제된 분획을 dextran을 standard로 사용했을 때 분자량이 135,000 dalton 상태로 측정되었다. 온도에 대한 옥발의 항응고물질의 영향을 조사하기 위해서 70°C와 100°C에서 15분간 열처리 후 thrombin의 clotting 형성 assay를 하였을 때 95%와 80%의 활성을 보유하고 있는 것으로 보아 열에 상당히 안정한 것으로 보인다(data not shown).

옥발의 항응고활성을 나타내는 물질이 단백질인지, 탄수화물인지를 확인하기 위해 비특이적 단백질 가수분해 효소 처리와 periodate oxidation 후 항응고활성을 측정했다. 비특이적 단백질 가수분해 효소(subtilisin Carlsberg)를 처리 후 배양시에도 활성이 82% 유지되는 반면, 산화후에는 항응고 활성이 34% 보유로 현저한 활성의 저하가 일어났다 (data not shown). 따라서 옥발에서 추출된 항응고물질의 활성은 당 성분에 의해 나타나는 것으로 사료된다. 항응고물질이 heparin과 유사한 sulfated carbohydrate인지 확인하기 위해

원소분석시 항응고물질은 주로 C, H, O와 약간의 N으로 구성되었고 S의 존재가 확인되지 않아 heparin과는 전혀 다른 구성분의 당으로 추정되고, 또 낮은 N 성분으로 보아 항응고 물질이 당단백질은 아닌 것으로 추정된다(data not shown).

옥발의 항응고물질을 구성하는 성분을 분석하기 위해서 중성당과 산성당 그리고 아미노당 분석을 위해 각각의 조건에서 산 가수분해시킨 후 TLC로 분석하였다. 옥발의 항응고물질을 중성당 조건으로 산 가수분해시켰을 때 4개의 분리된 Rf 값(0.760 / 0.584 / 0.400 / 0.142)이 나타났으며, 비슷한 Rf 값을 보인 당으로는 fucose(0.756), mannose(0.580), galactose(0.375) 그리고 glucose(0.425)이다. 아미노당 조건으로 산 가수분해시켰을 때 3개의 분리된 Rf 값(0.238/0.150/0.125)이 나타났으며 galactosamine(0.175)와 glucosamine(0.235)이 옥발의 anticoagulant와 비슷한 Rf 값을 보였다. 산성당조건으로 산 가수분해시켜 전개하였을 때 뚜렷한 Rf 값은 확인할 수 없었으며, 전개된 산성당과는 연관을 찾을 수 없었다. 당성분 분석에 의하면 옥발의 항응고물질은 fucose, mannose, galactose, glucose, galactosamine, glucosamine 으로 이루어졌다. 각당의 비율을 알기 위해 같은 시료를 Bio-LC로 분석했다. 당의 조성은 TLC 결과와 유사하고 Table 2에서와 같이 중성당 중에서는 galactose, glucose, mannose 가 주를 이루고 있었고 소량의 fucose가 확인되었고, 아미노당에서는 glucosamine과 galactosamine이 4:1의 비율로 확인되었다. 옥발의 항응고물질의 IR spectrum 분석에서는 OH group과 NH group에 해당하는 흡수 spectrum이 확인되어 옥발의 항응고물질이 중성당 및 아미노당으로 구성되어 있음을 뒷받침해 주고 있다. 감꼭지에서 추출된 항응고물질

Table 2. The composition of carbohydrate in the anticoagulant from corn silk by Bio-LC

Sugars/Sample	Corn silk (µg/mL)	Neutrosugar (%)	Aminosugar (%)
Galactose	574	33.24	6.13
Glucose	417	28.34	1.96
Mannose	304	15.51	-
Glucosamine	124	5.51	71.52
Galactosamine	30	-	20.39
Fucose	25	1.26	-
n.i. <sup>1)</sup>	-	15.90	-
n.i.	-	0.24	-
Total	1,474	100	100

<sup>1)</sup> n.i.: not identified.

의 경우도 분자량이 130,000~180,000 dalton 정도의 다당류로 옥발에서 추출된 물질과 유사하나 당성분은 glucose가 주가 되고 galactose, mannose가 더 낮은 비율로 존재하여 옥발과는 다른 비율의 당들로 구성된 것으로 보인다(25).

결과를 종합해 보면 옥발의 항응고물질은 열과 비특이적 protease에 민감하지 않고 원소분석시 낮은 N 성분을 가지고 있는 것으로 미루어 N은 단백질보다는 아미노당에서 기인되어진 것으로 보이고 당성분은 fucose, mannose, galactose, glucose, galactosamine, glucosamine으로 이루어진 heterogenous polysaccharide로 보인다. 당들 사이에 어떤 결합이 이루어져 있는지는 분석하지 못했지만 polysaccharide를 이루면서 물에 대한 용해도의 저하로 hydrophobic column에서 빠른 시간에 떨어져 나가지 못하고 보유되었던 것으로 보인다.

옥발에서 항응고물질의 생물학적 활성분석

옥발의 항응고물질이 혈액 응고 과정에서 내인성 경로와 외인성 경로 그리고 통합 경로 중 어느 단계에 영향을 주는지 알아보기 위해서 thrombin time(TT), snake venom activity, activated partial thromboplastin time(APTT) 그리고 prothrombin time(PT)을 측정하였다. 옥발의 항응고물질은 TT, PT를 지연시키고 상대적으로 APTT, snake venom에 의한 응고에는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 1). TT를 60 nM, 88 nM에서 각각 2배, 3배 지연시켰고 PT를 2배 지연시키는 농도는 175 nM이었다. 옥발의 항응고 물질은 트롬빈(thrombin)에 특이적으로 작용하여 응고 반응의 저해를 유도하는 것으로 생각된다. 옥발의 항응고물질의 thrombin과의 작용

을 규명하기 위해 정제된 fibrinogen을 thrombin으로 응고시키는 반응에서 항응고물질의 영향을 보았다. Fibrinogen의 농도를 증가시켰을 때, 옥발의 항응고물질은 응고 저해 정도가 감소되어 항응고물질이 thrombin의 fibrinogen binding site를 fibrinogen과 경쟁하는 것으로 보인다. 항응고물질은 thrombin의 exosite인 fibrinogen binding site에 부착하여 응고저해 현상을 유도하는 것으로 사료된다. 정제된 fibrinogen과 thrombin을 반응시킨 후 thrombin의 clotting 억제 효과를 나타내는  $K_i$  값은 23 nM이었다(Fig. 2).

항응고물질로 가장 일반적으로 사용되는 heparin의 경우 황산기를 가진 아미노당과 산성당이 반복되어 15,000 dalton 정도의 분자량을 이루고 있는데 아직도 세포내의 자세한 작용기작은 확실하게 알려지지 않았지만, 그중 하나가 thrombin의 fibrinogen binding site에 산성당과 황산기의 음이온기를 이용하여 부착을 방해하여 혈액응고를 지연시키는 것으로 알려져 있다. 옥발의 항응고물질은 당성분조사시 산성당이 검출되지 않았고 원소분석에서 황이 전혀 검출되지 않았다. 원소분석의 결과로는 황산기를 보유하지 않아 heparin과는 전혀 다른 구성의 당으로 보이거나 biological activity의 결과로 보아 산성당은 어느 정도 보유한 것으로 보인다. 산성당의 경우 산가수분해에 민감하므로 검출시 저평가될 가능성이 높다(25).

알려진 antithrombotic agent중 fibrinogen binding site에 부착하여 fibrinogen과 경쟁적으로 작용하는 제제들이 thrombin의 활성자리에 작용하는 제제보다 *in vivo* 효과가 더 탁월할 것으로 기대된다. Thrombin의 활성자리에 작용하는 제제는 fibrinogen을 fibrin으로 전환하는 율을 저하시킬 뿐만 아

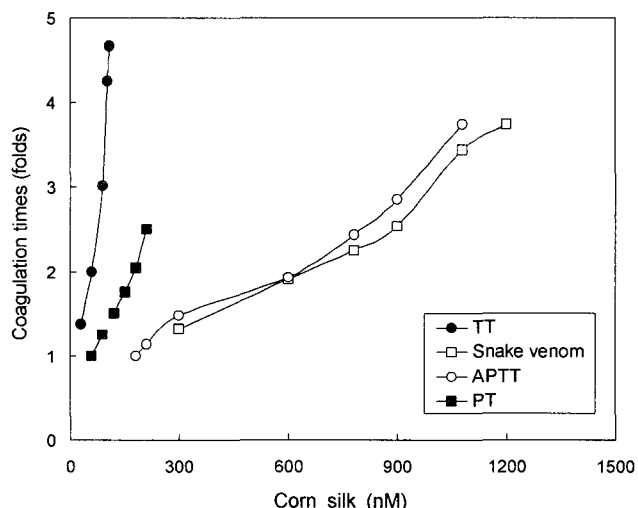


Fig. 1. Anticoagulant activity of the purified fraction from corn silk. The effect of the anticoagulant from corn silk on thrombin time (TT, ●—●), APTT (○—○), PT (■—■), and clotting by snake venom (□—□) was measured by adding the extract to 0.3 mL of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C, using the increase the absorbance at 420 nm. Each set of assays was performed in single subject.

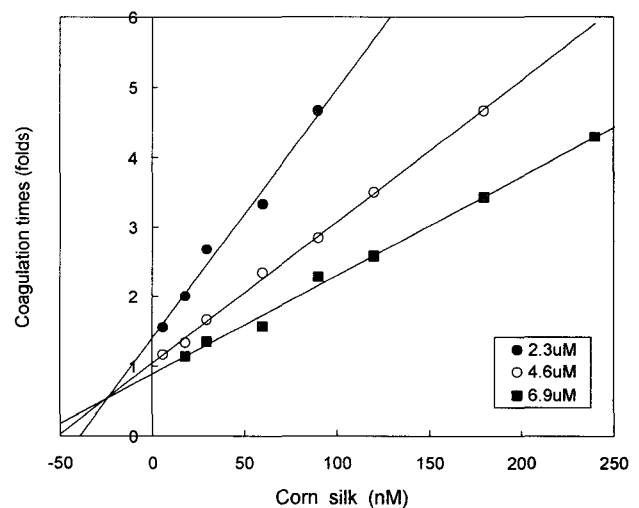


Fig. 2. Inhibition of clotting by corn silk anticoagulant at different fibrinogen concentrations. The clotting time was measured after thrombin was added to the concentrations indicated of fibrinogen in 0.2 M borate buffer, pH 7.8, containing 50 mM NaCl at 37°C with the increase in absorbance at 420 nm being monitored. The apparent  $K_i$  value was 23 nM (at 2.3  $\mu$ M of fibrinogen, ●—●; at 4.7  $\mu$ M of fibrinogen, ○—○; at 9.4  $\mu$ M of fibrinogen, ■—■).

나라 antithrombin III에 의한 thrombin의 비가역적 저해도 억제한다. 이 두과정 모두가 활성자리를 필요로 하는 과정이기 때문이다. 그러나 활성자리가 아닌 다른 자리인 fibrinogen binding site를 점령하는 제제의 경우 thrombin에 대한 antithrombin III에 대한 효과보다 fibrinogen processing을 더 심각히 저해될 것이므로 결과적으로 생성된 fibrin clot의 양을 줄일 수 있다(20). 연구되어지고 있는 antithrombotic agent중 fibrinogen binding site에 부착하여 fibrinogen과 경쟁적으로 작용하는 제제들이 옥발의 당성분의 항응고물질 외에도 *Ganoderma lucidum*의 fibrinolytic protease, *Spirodela polyrhiza*의 fibrinolytic protease, *Taraxacum playcarpum*에서의 anticoagulant protein 등이 밝혀졌다(20,21,26). 이들은 반응양식은 유사하나 옥발, *Ganoderma lucidum*의 fibrinolytic protease, *Spirodela polyrhiza*의 fibrinolytic protease, *Taraxacum playcarpum*에서의 anticoagulant protein의  $K_i$  값이 각 23 nM, 300 nM, 4.5 nM, 11 nM로 fibrinogen binding site에 대한 친화력에는 큰 차이를 보이고 있다. 또 이들의 구성성분이 서로 판이하므로 thrombin 외의 혈장에서 antithrombin III, 다른 coagulation factor들과의 반응이 상이하리라 기대되므로 실지 in vivo에서의 역할은 예측하기 어렵다. *Spirodela polyrhiza*의 fibrinolytic protease의 경우 rat에서 정맥주사시와 구강투여시 APTT를 지연시키는 것이 보고되어졌다(27).

## 요 약

한약재의 재료로 사용되는 옥발에서 항응고물질(anticoagulant)을 추출하여 정제하였다. 정제된 항응고물질의 분자량은 135 kDa으로 측정되었고 옥발로부터 정제된 항응고물질의 회수율은 11%이고, 24배 농축되었다. 옥발의 항응고물질은 열에 안정하고 비특이적 단백질 가수분해 효소 처리 후에도 활성을 유지하였으나, periodate 산화 처리 시 현저하게 활성이 소실되어 항응고물질의 성분은 당류인 것으로 추정된다. 옥발의 항응고물질을 thin layer chromatography (TLC)와 Bio-LC로 구성당을 분석한 결과 galactose, glucose, mannose, glucosamine, galactosamine, fucose로 구성되어있고, IR을 통하여 확인된 OH, N-H bond가 확인되어 항응고물질이 중성당과 아미노당으로 구성된 것을 뒷받침해주고 있다. 옥발의 항응고물질은 thrombin time(TT)에 가장 민감하고, TT에서 항응고 활성을 2배, 3배 지연시키는 농도는 60 nM와 88 nM이었다. Prothrombin time(PT)에도 민감하였지만, snake venom activity와 activated partial thromboplastin time(APTT)의 clotting activity에는 상대적으로 별 영향을 끼치지 않았다. 옥발의 항응고물질을 정제된 fibrinogen을 이용하여 thrombin과의 반응 시 fibrinogen의 농도가 증가함에 따라 응고 저해 정도가 감소하여 thrombin에 대해 fibrinogen과 결합자리를 경쟁하고, 이 때  $K_i$  값은 23 nM이다.

## 문 헌

- Sherry S. 1987. Recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA): is it the thrombolytic agent of choice for an evolving acute myocardial infarction? *Am J Cardiol* 59: 984-989.
- Duval-Jobe C, Parmely MJ. 1994. Regulation of plasminogen activation by human U937 promyelocytic cells. *J Biol Chem* 269: 21353-21357.
- Stringer HA, Pannekoek H. 1995. The significance of fibrin binding by plasminogen activator inhibitor 1 for the mechanism of tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis. *J Biol Chem* 270: 11205-11208.
- Jakubowski JA, Maraganore JM. 1990. Inhibition of coagulation and thrombin-induced platelet activities by a synthetic dodecapeptide modeled on the carboxy-terminus of hirudin. *Blood* 75: 399-406.
- Tsiang M, Lentz SR, Dittman WA, Scarpati EM, Sadler JE. 1990. Equilibrium binding of thrombin to recombinant human thrombomodulin: Effects of hirudin, fibrinogen, factor Va, and peptide analogues. *Biochemistry* 29: 10602-10612.
- Olson ST, Bjo I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD, Choay J. 1992. Role of the antithrombin-binding pentasaccharides in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. *J Biol Chem* 267: 12528-12538.
- Strube KH, Kroger B, Bialojan S, Otte M, Dodt J. 1993. Isolation, sequence analysis, and cloning of haemadin. *J Biol Chem* 268: 8590-8595.
- Friedrich T, Kroger B, Bialojan S, Lemaire HG, Hoffken HW, Reuschenbach P, Otte M, Dodt J. 1993. A kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 268: 16216-16222.
- Holsat J, Lindblad B, Bergqvist D. 1994. Antithrombotic effect of recombinant truncated tissue factor pathway inhibitor (TFPI1-161) in experimental venous thrombosis—a comparison with low molecular weight heparin. *Thromb Haemost* 71: 214-219.
- Rezaie AR, Cooper ST, Church FC, Esmon CT. 1995. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 270: 25336-25339.
- Noeske-Jungblut C, Haendler B, Donner P, Alagon A, Possani L, Schleuning WD. 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J Biol Chem* 270: 28629-28634.
- Dahlback B, Stenflo J. 1993. A natural anticoagulant pathway: biochemistry and physiology of protein C, S, C4b-binding protein and thrombomodulin. In *Haemostasis and thrombosis*. 3rd ed. Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, eds. Churchill livingstone, London. p 671-698.
- Herbert JM, Herault JP, Bernat A, van Amsterdam RGM, Lormeau JC, Petitou M, van Boeckel C, Hoffmann P, Meuleman DG. 1998. Biochemical and pharmacological properties of Sanorg 34006, a potent and long-acting synthetic pentasaccharide. *Blood* 91: 4197-4205.
- Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y, Oh H, Kwon I, Lee S. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jang. *Appl Environ Microbiol* 62: 2482-2488.
- Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43: 1110-1111.
- Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, Hiratani H. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of NK. *Acta Haematol* 84: 139-143.

17. Naski MC, Fenton II JW, Maraganore JM, Olson ST, Shafer JA. 1990. The COOH-terminal domain of hirudin. *J Biol Chem* 265: 13484-13489.
18. Choi HS, Shin HH. 1998. Purification and characterization of a fibrinolytic protease in *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 90: 674-679.
19. Shin HH, Choi HS. 1999. Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J Microbiol* 36: 20-25.
20. Choi HS, Sa YS. 2000. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycologia* 92: 545-552.
21. Choi HS, Sa YS. 2001. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Spirodela polyrhiza*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 781-786.
22. 전국한의과대학교수공편. 1991. 본초학. 영림사, 서울. p 217-419.
23. 고경식, 김윤식. 1989. 한국원색식물도감. 도서출판 아카데미서적, 서울. p 264.
24. 과학백과사전출판사 엮음. 1991. 약초의 성분과 이용. 일월서각, 서울. p 187-189, 519, 651-652.
25. Sa YS, Kim KA, Choi HS. 2003. Purification and characterization of anti-coagulant activity from persimmon stem. *J Korean Soc Foods Sci Nutr* 32: 1323-1327.
26. Yun SI, Cho HR, Choi HS. 2002. Anticoagulant from *Taraxacum platycarpum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1859-1864.
27. Cho HR, Choi HS. 2003. Effects of anticoagulant from *Spirodela polyrhiza* in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 881-883.

(2004년 5월 17일 접수; 2004년 9월 8일 채택)