

한국산 지렁이 (*Lumbricus rubellus*)에서 분리한 Lumbrokinase의 약리학적 특성

²조 일 환 · ²이 철 규 · ^{3,1}임 헌 길 · † ¹이 형 환

¹건국대학교 생명과학과, ²신흥제약(주)중앙연구소, ³한양대학교 의과대학 심장연구센터
(접수 : 2004. 4. 11., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

Pharmaceutical Characteristics of Korean *Lumbricus rubellus* Lumbrokinase

Il Hwan Cho², Chul Kyu Lee², Hun Gil Lim³, and Hyung Hoan Lee^{1†}

¹Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

²Shinpoong Pharmaceutical Co., Ansan 425-100, Korea

³College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-792, Korea

(Received : 2004. 4. 11., Accepted : 2004. 6. 24.)

Six lumbrokinase (LK) fractions from *Lumbricus rubellus* lysates were purified by a series of column chromatographies. The molecular weights of the six LK fractions appeared to range from 24.6 to 33.1 kDa. In the experimental model of rat venous thrombosis, the thrombus weight and PAI activity decreased significantly when the LK was administered orally. However, the activities of APTT, PT and plasmin showed a significant increase. The aggregation of rat platelets pretreated with various LK doses was inhibited by thrombin, and the MDA generation decreased. The rat thoracic aorta and mesenteric arteries contracted with phenylephrine relaxed due to the treatment of the LK fractions. These results suggest that the fibrinolytic effects of LK were mediated not only by proteolytic activity, but also by the inhibition of platelet aggregation and the relaxation of blood vessels. It is concluded that the LK may be useful as a hemolytic agent for treatment of fibrin clot.

Key Words : *Lumbricus rubellus*, lumbrokinase, fibrinolytic effects, fibrin clot, thrombin

서 론

지렁이의 혈전분해효소는 Mihara 등(1)이 지렁이과에 속하는 *Lumbricus rubellus*로부터 6 종의 fibrin proteases를 분리하여 lumbrokinase라고 명명하였고, serine protease 류의 6 가지 효소를 총칭하는 것이며, Cho 등(2)도 한국토양에서 분리한 *L. rubellus*에서 유사한 혈전분해효소를 분리하였다. lumbrokinase는 분자량 25~32 kDa이며, 등전점 (pI) 3.7~4.0의 효소이고, 매우 넓은 최적 pH를 가지며, plasminogen 없이도 fibrin 및 혈전을 용해하며, 특히 경구투여 시에도 효과가 있는 것으로 보고 되었다(2, 3). 지렁이속에 속하는 *Eisenia fetida*에서 Yang 등(4)은 sodium dodecyl sulfate

(SDS)로 처리하였을 때, fibrin 분해활성이 있는 26 kDa와 18 kDa의 2개의 소단위체의 SDS-activated fibrinolytic enzyme를 분리하였고, Hrzhenjak 등(5)은 항응고작용과 fibrin 분해활성을 갖는 34 kDa와 23 kDa의 tyrosine 유사 serine peptidase를 분리하였다.

중국에서는 사람 혈장과 지렁이속에 속하는 *Pheretima aspergillum*과 *Allolobophora caliginosatrapezoides*의 추출물을 반응시켰을 때 혈소판 응집억제와 항응고 작용, 혈액점도 감소 및 혈전형성 억제, 뇌혈전 환자에게 지렁이 추출물 투여시 항응고 및 혈전용해 작용에 의한 환자의 신경기능 결손회복의 촉진효과 등이 확인되었고, 기존의 혈전용해효소와 비교하여 볼 때 *in vitro*에서는 fibrin 용해활성 뿐만 아니라 fibrin 형성억제 및 혈소판 응집억제의 활성이 있으나, *in vivo* 실험에서는 fibrinogen활성화 작용은 적고 fibrin에만 선택적으로 작용하여 고지혈증 및 뇌혈전에 대한 효과가 있다고 보고하였다(6).

Ryu 등(7)은 lumbrokinase를 polyurethane에 고정화시킨 후

† Corresponding Author : Department of Biological Sciences,
Konkuk University, Seoul 143-701, Korea,
Tel : +82-2-450-3426, Fax : +82-2-452-9715
E-mail : hhlee@konkuk.ac.kr

proteolytic activity와 fibrinolytic activity를 측정 한 결과 34%의 활성도가 있었으며, 온도와 pH의 변화에 더욱 안정하고 혈소판이 부착함으로 생기는 혈전의 생성 억제된다고 보고하였고, 인공장기를 이용한 실험에서 polyalylamine을 광활성 물질로 사용하여 한국형인공심장판막의 재질인 polyurethane에 lumbrokinase를 고정화시킨 인공심장과 고정화시키지 않은 인공심장을 50 kg의 건강한 양에 이식시켰을 때 대조군 양의 인공심장 판막의 내부에서는 혈전이 생성된 것을 관찰할 수 있었으나, lumbrokinase를 고정화한 판막에서는 혈전이 생성되지 않음을 보고하였다(8). 이러한 연구들을 통하여 *L. rubellus* lumbrokinase가 항혈전 약제로 개발될 수 있는 가능성이 제시되고 있다.

현재 *L. rubellus* lumbrokinase에 관한 연구는 효소의 분리와 기본적인 특성에 관한 연구(2, 9)와 lumbrokinase의 고정화를 이용한 인공장기로의 개발 등(6)의 응용연구에 있는 단계에 있으나 혈전용해효소에 대한 본격적인 약리학적 및 생화학적 연구에 관한 연구는 미흡한 상태이므로 이러한 연구의 필요성이 제기되어 본 연구를 하였다.

따라서 본 연구에서는 *L. rubellus*로부터 lumbrokinase 분리정제한 후에 쥐를 이용하는 혈전유도모델을 이용하여 혈전용해효과, 혈소판응집효과, 혈관 평활근 이완효과, 혈관근이완 기작시험을 통한 효소의 약리학적인 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

Sprague-dawley계 수컷 흰쥐 (250~350 g, 6~8 주령)와 New Zealand White계 수컷 흰 토끼 (2.5~3 kg)는 Charles River Japan (3371-8 Kotoh-cho, Hamamatsu, Shizuoka, Japan)에서 생산된 것을 우정화확(한국, 서울 서초구 양재동 103)을 통해 구입하여 사용하였다. 모든 동물은 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 환기 10~18회/시간, 명암 12시간 주기, 조도 300~500 Lux의 환경의 사육실에서 폴리카보네이트 사육 상자에 넣어 사육하였다.

지렁이목 뉘시지렁이과에 속하는 붉은지렁이 (*Lumbricus rubellus*)는 기흥 소재의 지렁이 전문 사육장에서 구입하였다. 마취용 ketamine은 유한양행 (한국 경기도 군포시 당정동)에서 구입하였다.

Lumbrokinase 효소의 정제

*Lumbricus rubellus*에서 lumbrokinase의 정제는 Scopes(10)와 Cho 등(2)의 방법을 사용하여 분리 정제하였다. 정제 순서는 10 kg의 지렁이의 분쇄액을 ammonium sulfate precipitation으로 침전을 시킨 후에, ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography와 gel filtration chromatography를 거쳐서 순수정제를 하였다(2).

Prostaglandine E1 (PGE1), bichononic acid (BCA), aspirin, N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), ethylene glycol-bis[β-aminoethylether]N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA), phenylephrine 등은 Sigma (USA)사로부터 구입하였다.

APTT, PT 및 TT 등의 응고시간 측정 kit는 Baxter

Healthcare (Deerfield, IL, USA)에서 구입하였다. Plasmin, antiplasmin, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, D-dimer 정량 등은 혈전우발용 stainless steel wire coil (dental paste carrier, Zipperer, size 40 cst)은 Pforzheim (Germany)에서 구입하였다.

Casein 분해법

지렁이에서 분리한 Lumbrokinase에 의해 casein이 분해되는 정도를 Cho 등(2)의 방법을 이용하여 측정하였다. 기질로 사용한 4% α-casein (Sigma Co., USA) 2 ml에 67 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 1.6 ml와 0.4 ml의 lumbrokinase (1.0 mg/ml)를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시키고 15% trichloroacetic acid (TCA) 6 ml를 가하여 반응을 중지시킨 뒤 30분 방치하고 반응액을 filter paper (Whatman, No. 1, Whatman international Ltd, Maidstone, England)로 여과한 후 여액을 spectrophotometer (Hewlett-packard 8453, Germany)를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 효소의 역가를 결정하였다. 효소역가는 1시간동안 450 μg의 TCA-soluble tyrosine을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

Fibrin 평판법

Fibrin 평판의 제조는 fibrin plate buffer (FPB) (50 mM sodium barbital, 93 mM NaCl, 1.66 mM CaCl₂, 0.96 mM MgCl₂, pH 7.8, ionic strength 0.15)에 65% fibrinogen (Sigma Co., USA)을 0.5% 되게 용해한 후 페트리 접시에 10 ml씩 분주하고 20 NIH units/ml의 thrombin (Sigma Co., USA) 50 μl을 가하여 섞어준 다음 방치하여 응고시켰다(11).

Fibrin용해 표준효소로는 human plasmin (Sigma Co., USA)을 0.2~2.0 unit/ml까지 FPB로 희석한 후 fibrin 평판에 10 μl을 점적하고 37°C에서 15시간 항은 처리한 후 분해된 투명한 원의 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. Lumbrokinase의 활성은 각각의 분획을 1 mg/ml의 농도로 FPB에 용해한 후 fibrin 평판에 10 μl을 점적하고 37°C에서 15시간 항은 처리한 후 생성된 원의 면적을 구하고 미리 얻은 표준곡선을 이용하여 역가를 plasmin unit로 산출하였다 (11).

전기영동을 이용한 피브린 분해효소의 확인

10 ml의 FPB에 65% fibrinogen (Sigma Co., USA)을 최종 농도가 0.5%가 되도록 용해시켰다. 10 ml의 fibrin plate buffer (FPB) (50 mM sodium barbital, 93 mM NaCl, 1.66 mM CaCl₂, 0.96 mM MgCl₂, pH 7.8, ionic strength 0.15)에 160 mg의 low-melting agarose (Sigma Co., USA)를 넣고 가열하여 용해시킨 후 40°C까지 식힌 다음, 20 NIH unit/ml의 thrombin 100 μl을 첨가하였다. Agarose 용액과 fibrinogen 용액을 혼합한 다음, 수평을 맞춘 유리판 위에 놓인 12 x 8 cm의 틀에 붓고 30분 이상 방치하여 fibrin plate를 제조하였다 (12).

전기영동은 Laemmli 방법(13)에 따라 12% polyacrylamide gel 2장을 만들었고, 각 분획 1 mg에 단백질의 활성을 유지하기 위해 β-mercaptoethanol이 첨가되지 않은 500 μl loading

buffer에 용해하고 열처리하는 실시하지 않았다. 각각의 분획당 6 μ 씩 두 시료를 준비하여 2장의 gel에 나누어 loading하고 종료되면 한 쪽의 gel은 brilliant blue G colloidal concentrate (Sigma Co., USA)로 단백질을 염색하여 분석하고, 다른 한 쪽의 gel은 SDS를 제거하기 위해서 2% triton X-100 (Sigma Co., USA) 용액에 10분 동안 담가 교반시켰으며 triton을 제거하기 위해서는 증류수로 gel을 충분히 씻어 주었다. 이 gel을 fibrin plate layer에 얹은 후 37°C 항온기에서 약 5시간 방치하여 단일 밴드에 의해 fibrin이 분해되어 생성되는 zymogram을 얻었다. 염색된 gel의 밴드와 zymogram의 투명환과 비교하여 fibrin 분해활성을 확인하였다.

혈전분해 효과측정

흰쥐 정맥혈전 모델

흰쥐를 이용한 정맥혈전 모델은 Kumada의 방법(14)에 따라 만들었다. 즉, 흰쥐를 ketamine 100 mg/kg (i.p.)으로 마취하고 복부중양을 약 3 cm 절개한 후 하대 정맥의 좌심정맥에서 장골 정맥 쪽으로 stainless steel wire coil을 삽입한 후 봉합하였다. 혈전유발 후 7일간 lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK/ASF)을 10, 50, 250 mg/kg 용량으로 매일 1회 경구 투여하였다. 혈전유발 7일째에 하대동맥에서 동맥혈을 채혈한 후 혈액부피 10%에 해당하는 3.2% sodium citrate를 첨가하여 응고를 방지하였으며 이를 2,500 \times g로 원심분리하여 혈장을 얻었다.

혈액응고시간

Activated partial thromboplastin time (APTT)는 반응액 0.15 ml과 혈장 0.15 ml을 혼합한 후 37°C에서 3분간 반응시킨 후 20 mM calcium chloride 0.15 ml을 넣어 응고시간을 측정하였다. Prothrombin time (PT)는 혈장 0.15 ml을 37°C에서 2분간 반응시킨 후 PT 반응액 0.15 ml을 넣어 응고시간을 측정하였다. Thrombin time (TT)는 혈장 0.15 ml을 37°C에서 2분간 반응시킨 후 반응액 0.3 ml을 넣어 응고시간을 측정하였다.

Plasmin 활성

혈장 0.1 ml과 4°C 증류수 0.9 ml을 혼합한 후 곧바로 0.25% acetic acid 0.1 ml를 첨가하고 4°C에서 30분간 방치하였다. 방치한 후 1,500 \times g에서 5분간 원심분리하여 생긴 침전물 (euglobulin)을 회수하고 이를 0.1 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.4)로 용해하였다. 이 침전액 50 μ 를 37°C에서 5분간 반응한 뒤 75 pM 합성기질 (D-BUT-CHT-Lys-pNA, AcOH) 50 μ 를 넣고 37°C에서 65분간 반응시켰다. 50 μ 의 acetic acid를 첨가하여 반응을 종결시켰으며 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Antiplasmin 활성

혈장과 표준액 50 μ 를 37°C에서 2분간 반응하고 plasmin 200 μ 를 혼합한 후 37°C에서 30초간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 75 pM 합성기질 (MM-L-Try-Arg-pNA, AcOH) 50 μ 를 혼합한 후 37°C에서 정확히 60초간 반응시켰다. Glacial acetic acid 50 μ 를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 405 nm에

서의 흡광도를 측정하였다. 대조군은 glacial acetic acid, plasmin, sample, 기질을 각각 50 μ 씩 순서대로 혼합한 후 사용하였다.

Plasminogen activator 활성

혈장으로부터 분획한 euglobulin 효소액이 합성기질인 chromogenic substrate를 분해하는 amidolytic activity로 측정하였고, 활성도는 international unit (IU)로 표시하였다. euglobulin 또는 표준액 0.05 ml을 37°C에서 2분간 반응한 뒤 stimugen 50 μ 를 넣고 37°C에서 60분간 방치하였다. 187.5 pM 합성기질 (D-BUT-CHT-Lys-pNA, AcOH) 50 μ 를 넣고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응은 10% acetic acid 50 μ 를 첨가하여 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Plasminogen activator inhibitor 활성

측정하고자 하는 plasma와 표준 plasma (0, 22, 44 AU/ml의 활성을 갖는 plasma) 12.5 μ 에 urokinase (10 nKat/ml) 50 μ 를 첨가하여 37°C에서 4분간 반응시킨 후, 50 μ 의 plasminogen 2.5 PEU (plasma equivalent unit)/ml을 첨가하여 4분간 반응시켰다. 75 pM 합성기질 (MM-L-Tyr-Arg-pNA, AcOH)을 50 μ 를 첨가하여 1분간 반응시킨 후 10% acetic acid 50 μ 를 첨가하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

D-dimer

Fibrin이 분해 될 때 생성되는 D-dimer를 정량하였다. Mouse 단클론 항체인 D-dimer F(ab') fragment가 부착된 96 well microplate에 혈장 또는 표준액 0.2 ml을 넣고 실온에서 1.0시간 동안 반응한 후 kit 내에 있는 세척액으로 세척하고 peroxidase가 붙은 rabbit anti-fragment D antibody를 넣고 1.0시간 동안 실온에서 방치하였다. 세척액으로 5번 세척한 후 kit 내 기질 (ortho-phenylenediamine/H₂O₂)을 넣고 정확히 3분 동안 반응한 후 1.0 M HCl 0.1 ml을 넣어 반응을 정지시켰다. 10분 후에 microplate reader (Molecular Devices, Bohannon Drive Menlo Park, CA, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈전량

흰쥐의 복부중양을 절개하여 하대정맥을 노출시킨 후 stainless steel wire coil 삽입부위의 앞뒤의 혈류를 억제하고 3.2% sodium citrate를 혈관 내로 주입하여 혈액의 응고를 방지한 다음 혈관을 길이 방향으로 절개하여 혈전이 포함된 코일을 적출 하였다. 2%의 Na₂CO₃이 포함된 0.1 N NaOH 5 ml를 넣어 5분간 끓인 후 4%의 CuSO₄가 포함된 2% bicinchoninic acid 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

혈소판 응집 억제 효과

혈소판 분리 및 응집도 측정

혈소판 응집도 측정은 Rodomski 등(15)의 방법을 변형하여 수행하였다. 흰쥐의 하대동맥에서 9 ml의 혈액을 뽑은 후 3.2% sodium citrate 용액 1 ml을 첨가하여 혈액응고를 억

제하였다. 항응고 시킨 혈액을 200 × g, 15°C에서 20분간 원심분리하여 혈소판이 포함된 혈장을 분리하였고 0.3 µg/ml 농도의 PGE1을 1.0 ml 첨가한 후 2,000 × g로 15°C에서 20분간 원심분리하여 혈소판을 분리하였다. 분리된 혈소판은 혈장액 20 배 용량의 세척용 완충액 (130 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 11.5 mM glucose, 10 mM HEPES, 20 µM EGTA, 0.2% BSA, PGE1 0.3 µg/ml)으로 세척하였다. 세척된 혈소판은 현탁용 완충액 (130 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 11.5 mM glucose, 10 mM HEPES, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.0 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 0.2% BSA, pH 7.4)로 일정 혈소판 수가 되도록 용량을 조절하여 현탁하였다.

세척 혈소판이 0.9 × 10⁸ cells/ml인 현탁액 0.5 ml을 flat cuvette에 넣고 37°C로 보온된 aggregometer (560-VS, CHRONO-LOG, Havertown, PA, USA) 내에서 5분간 배양 후 5, 7.5, 10, 25 µg/ml 농도의 LK/ASF와 대조약물로 5 mg/ml 농도의 aspirin을 10 µl씩 첨가하고 30분간 반응시켰다. 2 unit thrombin을 첨가하여 혈소판응집을 유도하여 응집의 변화를 관찰하였다.

MDA 측정

MDA (malondialdehyde)의 측정은 Buege 등(16)의 방법에 따라 수행하였다. 현탁용 완충액으로 현탁하여 혈소판수가 2.6 × 10⁸ cells/ml이 되게 하였다. 현탁액 2 ml를 플라스틱 반응 튜브에 넣고 37°C 수조에서 30분 동안 방치하였다. 50, 100, 200 µg/ml 농도의 LK/ASF와 100 µg/ml 농도의 aspirin을 각각 0.1 ml씩 넣어 30분간 반응시켰고 thrombin 10 unit을 첨가하여 30분 동안 혈소판 응집을 유도하였다. TCA (1N HCl에 용해된 TCA 용액, 100% w/v) 1.0 ml을 첨가하여 반응을 종결시킨 후 3,000 × g로 4°C에서 30분간 원심분리하고 상층액 0.5 ml을 취하여 시험관에 넣고 thiobarbituric acid (TBA) (0.26 M tris buffer에 용해된 0.12 M TBA) 0.5 ml를 첨가하여 70°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료 후 상온에 방치하고 3,000 × g로 1시간 원심분리하였다. 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하여 MDA를 정량 하였다(MDA 분자 흡광계수 = 1.56 × 10⁵).

혈관근 이완작용

Hwa 등(17)의 방법을 이용하여 혈관 이완작용을 측정하였다. 흰쥐 (250~300 g) 및 토끼 (2.5~3 kg)를 마취 없이 경동맥을 절단하여 방혈 치사시켰다. 흉동맥과 장간막동맥을 적출한 후 주위의 지방조직 및 결합조직을 제거하고 2 mm 길이로 고리를 만들었다. 내피세포제거 혈관은 혈관내면을 부드럽게 문질러 내피세포를 제거한 뒤 같은 방법으로 제작하였다. 혈관 고리는 95% CO₂로 포화시킨 37°C physiological salt solution (PSS) (130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.18 mM NaH₂PO₄, 1.17 mM MgSO₄, 1.6 mM CaCl₂, 14.9 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose)에 넣고 동맥 고리를 force-displacement transducer (Hugo Sachs, March Hugstetten, Germany)에 연결시킨 후 PSS가 담긴 organ bath (Radnoti, West Maple Avenue Monrovia, CA, USA) 내에서 고정하고 안정장력은 0.5~2 g 하에 90분간 평형을 유지시켰다. PSS 용액은 95% O₂와 5% CO₂로 포화시켰다. Phenylephrine에 의

해 근수축이 일정한 높이로 유지될 때 lumbrokinase 6개 분획을 0.1, 1, 10 µg/ml 농도로 3분 간격으로 투여하였다. 각 실험에서 이완약물에 대한 용량 의존곡선은 60분 간격으로 반복하였다. 장력의 변화는 force transducer로 측정하였고 polygraph (Coulbourn, Penn Drive Allentown, PA, USA)로 기록하였다.

상기의 방법에 의해 제조된 동맥 환을 2개 군으로 나누고 혈관의 장력이 90분 동안 기저장력 1.0 g을 유지하면서 평형된 혈관을 0.5 µM phenylephrine으로 수축시키고 수축고가 평형을 유지하면 한 개의 군에는 soybean trypsin inhibitor 5 µg/ml, trypsin 0.5 unit/ml, LK/ASF 0.5 µg/ml, thrombin 0.5 unit/ml을 연속적으로 투여하면서 이완반응을 관찰하였고 다른 한 군은 100°C에서 10분간 처리한 LK/ASF 0.5 µg/ml, 1.8 µM N^G-methyl-L-arginine (NMA), LK/ASF 0.5 µg/ml, trypsin 0.5 unit/ml, thrombin 0.5 unit/ml를 연속적으로 첨가하면서 이완반응을 관찰하였다.

평형된 혈관근을 0.5 µM phenylephrine으로 수축시키고 수축고가 평형을 유지하면 0.5 unit/ml 농도의 thrombin을 연속 투여하여 혈관내피세포와 평활근세포에 존재하는 thrombin receptor들을 탈감작시키고 0.5 unit/ml 농도가 되도록 trypsin을 첨가하거나 0.5 µg/ml 농도가 되도록 LK/ASF를 첨가하여 Proteinase activated receptor 2 (PAR-2) 활성화에 따른 혈관근 이완반응을 관찰하였다.

통계처리

모든 결과는 평균±표준오차로 표시하였고 결과는 Student's t-test로 분석하여 비교하였다. 이들의 차이는 P < 0.05 이하에서 유의한 것으로 분석하였다.

결 과

지렁이에서 lumbrokinase의 분리정제

10 kg의 *L. rubellus*를 분쇄, 자가 분해하여 원심분리한 후 상등 액을 규조토로 여과한 다음 동결건조 하여 870 unit/g의 casein 분해능이 있는 조추출물 1.0 kg을 얻었다. 이 조추출물을 30~60% ammonium sulfate 분별침전을 실시하고 초여과장치로 탈염, 농축한 후 동결 건조하여 17,300 unit/g의 casein 분해능이 있는 44 g의 1차 정제물인 lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK/ASF)을 얻었다(2). 1차정제물을 DEAE-toyopearl 650 column을 사용해 0~0.5 M NaCl 농도로 anion exchange chromatograph하여 fibrin 분해능이 있는 세 가지 분획물 I, II, III을 얻었고, DEAE-분획물 I로부터 phenyl-toyopearl column을 이용한 hydrophobic interaction chromatograph에서 1~0M ammonium sulfate로 descending gradient하여 fibrin 분해 역가가 있는 분획 F1과 F2를 얻었으며, DEAE-분획물 II를 phenyl-toyopearl column을 이용하여 1~0M ammonium sulfate 농도로 descending gradient하여 fibrin 분해 역가가 있는 분획 F3을 얻었다(2). DEAE-분획물 III을 benzamidine sepharose 6B column를 사용하여 affinity chromatograph를 실시하였고 benzamidine sepharose 6B column에 부착하지 않고 용출되는 분획 F4와 Benzamidine sepharose 6B column에 부착하여 0~0.5M arginine gradient

에 의해 용출되는 2개 분획 F5와 F6을 얻었다(2).

정제정도를 확인하기 위하여 β -mercaptoethanol을 첨가하지 않고 가열하지 않은 상태에서 SDS-PAGE와 zymograph를 실시한 결과, 6개 분획 모두 피브린 분해력을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1). 순수 분리된 lumbrokinase의 각 분획을 SDS-PAGE를 수행하여 얻은 분자량은 분획 F1이 24.6 kDa, F2는 26.8 kDa, F3은 28.2 kDa, F4는 25.4 kDa, F5는 33.1 kDa 그리고 분획 F6 은 33.0 kDa으로 확인되었으며 (Fig. 1A), 또한 각 분획의 효소들이 혈전분해능이 있는 것을 보여주고 있다(Fig. 1B).

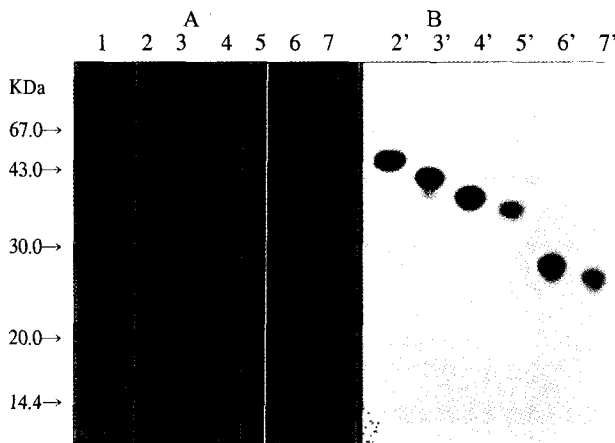


Figure 1. SDS-PAGE (A plate) and its zymogram (B plate) of lumbrokinase fractions purified from *L. rubellus*. Lanes in plate A, 1, molecular weight markers; 2, fraction 1 protease; 3, fraction 2 protease; 4, fraction 3 protease; 5, fraction 4 protease; 6, fraction 5 protease; and 7, fraction 6 protease.

정맥 혈전 유도 모델에서 혈전용해 효과

흰쥐의 혈전유도모델에서 lumbrokinase 투여에 의한 혈액 응고계, 선용계 및 혈전량의 변화를 Table 1에 나타내었다. Lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK/ASF)을 경구로 투여하였을 때, 혈액응고계 중 외인계인 prothrombin time (PT)는 음성대조군에 비해 LK/ASF의 10, 50, 250 mg/kg/day 투여군 모두에서 유의적으로 증가하였고, 또한 내인계인 activated partial thromboplastin time (APTT)도 음성대조군에 비해 LK/ASF의 10, 50, 250 mg/kg/day 투여군 모두에서 유의적으로 증가하였다. 그러나 혈액응고계 중 외인계와 내인계 모두에 영향을 받는 thrombin time (TT)의 변화는 없었다. 피브린을 분해하는 선용계 효소인 plasmin의 활성은 음성대조군에 비해 LK/ASF 10, 50, 250 mg/kg/day 투여군 모두에서 유의적으로 증가하였다. 그러나 plasminogen activator (PA) 활성과 fibrin clot의 용해에 의해 생성되는 D-dimer의 양은 변화가 없었다. 복부대정맥에 삽입된 코일에 생성된 혈전 양이 LK/ASF 투여에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 2). 250 mg/kg/day투여군의 혈전 양은 대조군에 비해 약 64.3%의 혈전중량 감소 효과가 나타났다. 항선용계에 있어서 plasminogen activator inhibitor (PAI)가 LK/ASF 10 mg/kg/day 투여 군에서만 음성대조 군에 비해 유의적으로 활성이 저하되었고 antiplasmin 활성의 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 lumbrokinase가 혈액응고계와 선용계 모두에 영향을

미쳐 혈전 생성 억제 및 혈전 용해 작용을 나타냄을 증명한다.

Table 1. Effects of lumbrokinase-ammonium sulfate fraction on the thrombosis model

Functions	Normal group	Negative group	Administration dose of LK/ASF (mg/kg/day)		
			10	50	250
PT (sec)	16.9±0.3	17.3±0.7	34.5±6.8**	38.0±2.8**	35.0±3.5*
APTT (sec)	20.4±1.4	19.3±0.5	22.6±1.1**	22.1±0.7**	22.1±2.4
TT (sec)	7.2±0.3	7.3±0.2	7.8±0.4	7.5±0.1	7.4±0.4
Plasmin activity (unit/mg protein)	23.2±6.6	13.9±4.1	58.4±22.6*	27.1±7.0*	29.0±8.2*
PA activity (unit/mg protein)	22.9±10.8	27.1±12.2	26.6±20.6	25.2±14.3	45.1±58.0
D-dimer (ng/ml)	4.4±0.8	4.5±1.7	5.3±1.4	4.5±0.8	4.4±0.9
PAI activity (unit/ml)	40.2±3.3	38.1±5.5	29.6±5.3*	39.8±2.6	38.8±2.3
Antiplasmin activity (% vs normal plasma)	122.6±8.4	122.6±5.5	114.1±3.8	122.8±5.0	114.1±5.5

PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; TT, thrombin time; PA, plasminogen activator; PAI, plasminogen activator inhibitor. *, p<0.05; **, p<0.01 vs negative control group.

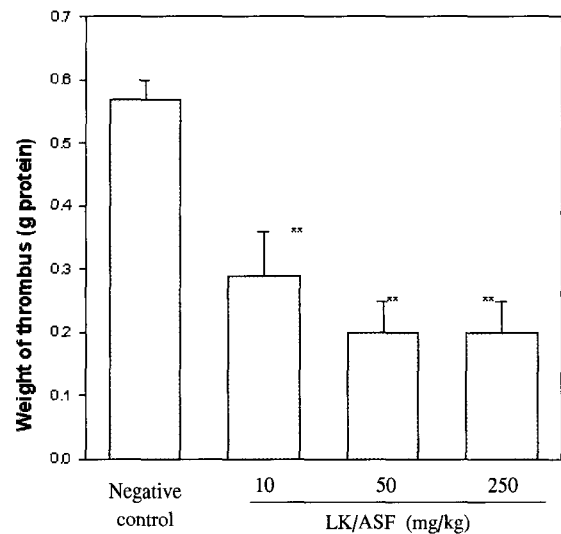


Figure 2. Thromolytic effects by oral administration of lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK/ASF) on the vena cava thrombosis model. **, p<0.01.

혈소판 응집 억제 효과

Thrombin (2 unit/ml)으로 유도된 혈소판 응집은 LK/ASF에 의해 농도 의존적으로 억제되었으며, 양성대조물인 aspirin은 5 mg/ml 투여군에서 약 65%의 억제를 나타내었다(Fig. 3). 또한 혈소판 응집시 방출되는 TXB2의 indicator인 MDA 양도 혈소판 응집 억제정도와 같이 농도 의존적으로 감소되었고, 비교약물인 aspirin 100 μ g/ml 투여군에서는 0.03 nM/2 \times 10² platelets로 나타났(Fig. 4).

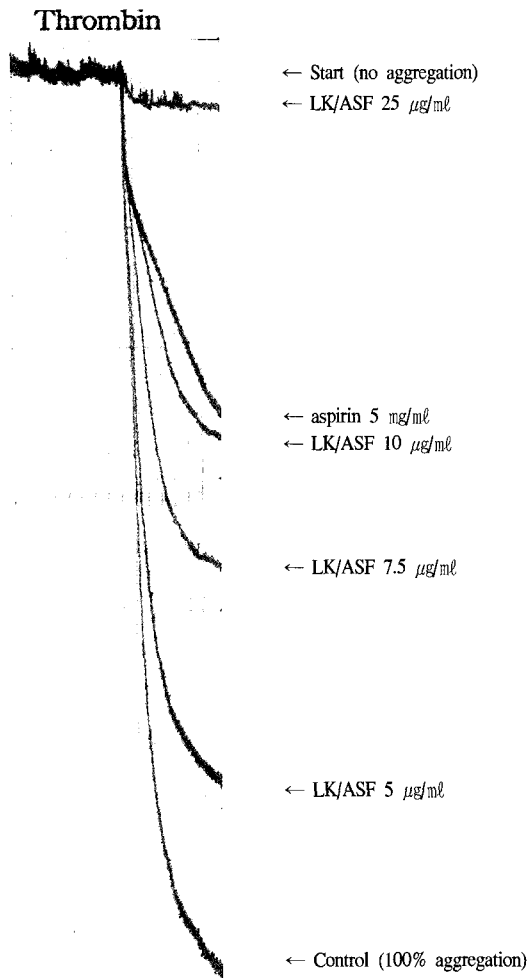


Figure 3. Thrombin (2 units/ml)-induced platelet aggregation in rat washed platelet suspension. The suspension was previously incubated with lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK/ASF) or aspirin before thrombin challenge.

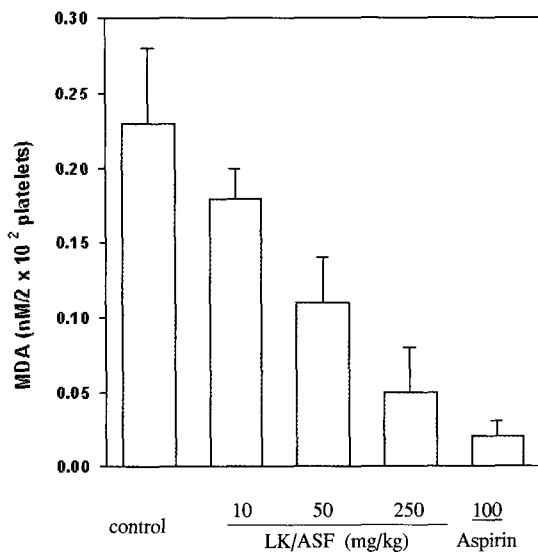


Figure 4. Inhibitory effects of lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK/ASF) on thrombin-induced malondialdehyde (MDA) generation in rat washed platelet suspension. Data were presented as the mean ± S.D.

혈관 이완 효과

흰쥐 혈관 평활 근에 대한 이완작용

흰쥐의 적출 동맥 혈관근 조직에 대한 lumbrokinase F1, F2, F3, F4, F5, F6 분획의 이완효과가 Fig. 5와 6에 제시되었다. 흉부 대동맥과 장간막 동맥에 0.3 µM phenylephrine으로 수축을 일으킨 후 각각의 lumbrokinase 분획들을 0.1, 1.0, 10 µg/ml 농도로 투여하였을 때, 흉부대동맥에서 F1 분획이 3.2, 38.2, 84.0%, F2 분획은 2.2, 36.4, 78.9%, F3 분획은 12.9, 52.8, 80.0, F4 분획은 1.6, 4.9, 13.5%, F5 분획은 30.0, 78.9, 81.0%, F6 분획은 57.3, 85.1, 76.7%의 이완효과가 있었으며(Fig. 5), 장간막 동맥에서는 F1 분획이 2.1, 39.6, 82.2%, F2 분획은 0.9, 38.1, 88.7%, F3 분획은 2.9, 57.3, 90.9%, F4 분획은 0.9, 12.4, 17.1%, F5 분획은 35.2, 81.9, 86.9%, F6 분획은 54.4, 76.0, 84.0%의 이완효과를 보여 농도가 증가함에 따라 이완효과도 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6).

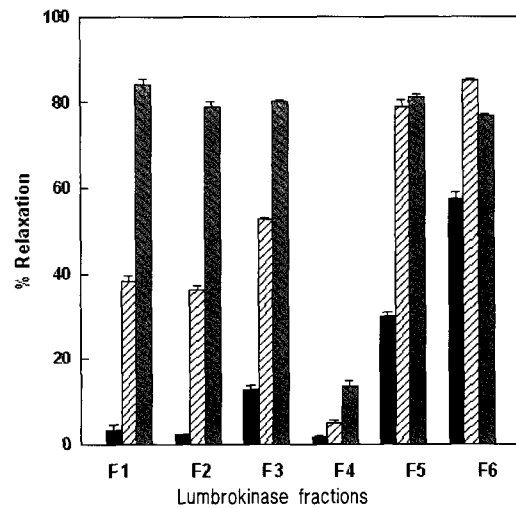


Figure 5. Lumbrokinase-induced relaxation of phenylephrine-contracted rat thoracic aorta with endothelium. Results are expressed as mean percent relaxation±S.D. of five aorta. Symbols: (■), 0.1 µg/ml treatment group; (▨), 1.0 µg/ml treatment group; (▩), 10 µg/ml treatment group.

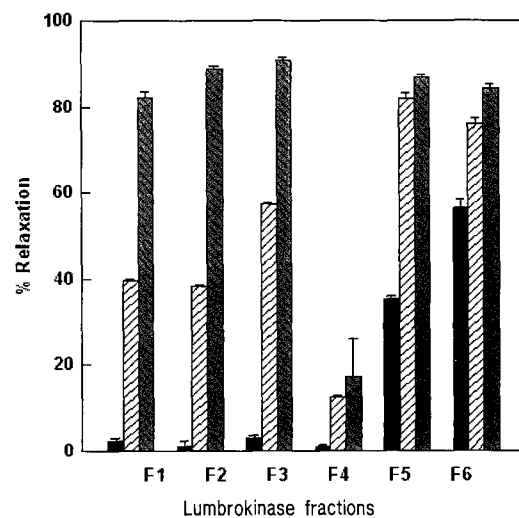


Figure 6. Lumbrokinase-induced relaxation of phenylephrine-contracted rat mesenteric artery with endothelium. Results are expressed as mean percent relaxation±S.D. of five aorta. Symbols: (■), 0.1 µg/ml treatment group; (▨), 1.0 µg/ml treatment group; (▩), 10 µg/ml treatment group.

토끼 혈관 평활근에 대한 이완작용

흰 토끼의 흉부 대동맥과 장간막 동맥에 0.3 μM phenylephrine으로 수축을 일으킨 후 각각의 lumbrokinase 분획들을 0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여하였을 때 흉부대동맥에서 F1 분획은 17.8, 23.2, 66.1%, F2 분획은 21.4, 36.6, 76.7%, F3 분획은 0.9, 9.8, 53.6%, F4 분획은 1.8, 6.3, 7.2%, F5 분획은 1.8, 28.6, 80.4%, F6 분획은 8.9, 62.5, 67.9%의 이완효과가 있었으며(Fig. 7), 장간막 동맥에서는 F1 분획이 22.3, 28.6, 67%, F2 분획은 28.6, 32.1, 69.7%, F3 분획은 6.3, 11.6, 25.9%, F4 분획은 1.8, 7.1, 8.0%, F5 분획은 15.2, 35.7, 87.5%, F6 분획은 13.4, 68.8, 79.5%의 이완효과를 보여 토끼의 혈관역시 농도가 증가함에 따라 이완효과도 증가함을 알 수 있었으나(Fig. 8) 흰쥐에서와는 달리 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여시에는 흉부대동맥과 장간막 동맥에서 F1 분획과 F2 분획이 F5 분획과 F6 분획보다 이완효과가 큰 것으로 나타나 동물 종간의 차이가 있음을 알 수 있었다.

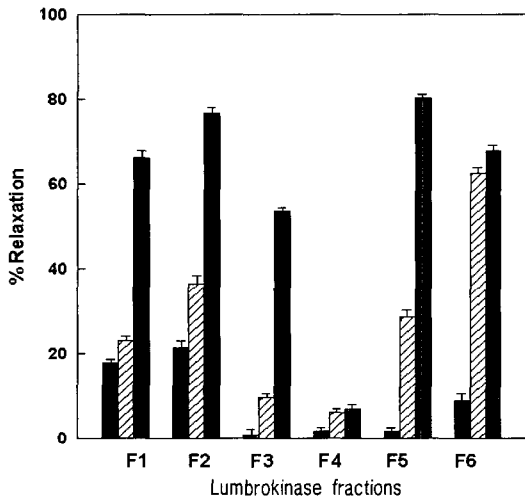


Figure 7. Lumbrokinase-induced relaxation of phenylephrine-contracted rabbit thoracic aorta with endothelium. Results are expressed as mean percent relaxation \pm S.D. of five aorta. Symbols: (■), 0.1 $\mu\text{g/ml}$ treatment group; (▨), 1.0 $\mu\text{g/ml}$ treatment group; (▩), 10 $\mu\text{g/ml}$ treatment group.

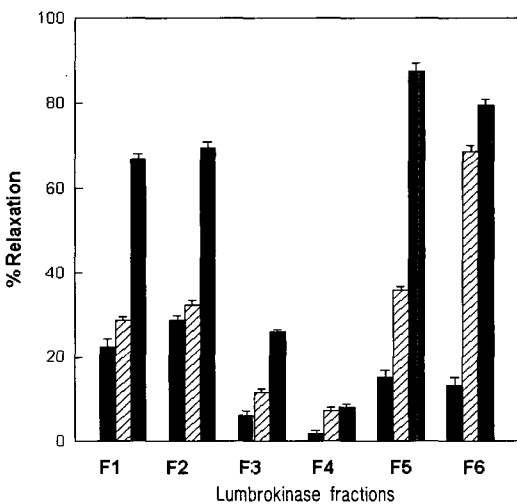


Figure 8. Lumbrokinase-induced relaxation of phenylephrine-contracted rabbit mesenteric artery with endothelium. Results are expressed as mean percent relaxation \pm S.D. of five aorta. Symbols: (■), 0.1 $\mu\text{g/ml}$ treatment group; (▨), 1.0 $\mu\text{g/ml}$ treatment group; (▩), 10 $\mu\text{g/ml}$ treatment group.

혈관내피세포 존재 유무에 따른 혈관근 이완효과

흰쥐 흉부 대동맥 혈관의 내피 세포가 제거된 혈관근과 제거되지 않은 혈관근으로 동맥환을 만들어 0.5 μM phenylephrine으로 수축시킨 다음, LK/ASF를 투여하였을 때, 혈관내피세포가 제거되지 않은 혈관근은 LK/ASF 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 최대 수축고의 약 83% 정도가 이완되었으며 혈관근 이완작용에 대한 LK/ASF의 EC_{50} (median effective concentration)은 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 이었으나, 혈관내피세포가 제거된 혈관근은 LK의 투여에도 불구하고 이완되지 않았다 (Fig. 9). 이 결과로 LK가 혈관 내피세포에 작용하여 혈관근이 이완되는 것을 알 수 있었다.

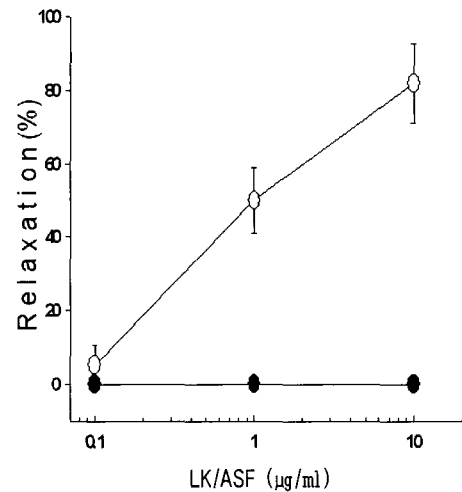


Figure 9. Lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK/ASF)-induced relaxation of 0.5 μM phenylephrine contracted rat thoracic aorta with and without functional endothelium. Results are expressed as mean percent relaxation \pm S.D. of five aorta. Symbols: (○), rat thoracic aorta with functional endothelium; (●), rat thoracic aorta without functional endothelium.

효소활성에 의한 혈관근 이완 효과

Soybean trypsin inhibitor 5 $\mu\text{g/ml}$ 로 전 처리한 흉부대동맥은 trypsin 0.5 unit/ml이나 LK/ASF 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에 의해 혈관근 이완 반응을 나타내지 않았으나 thrombin 0.5 unit/ml에 의해서는 이완되었다(Fig. 10A). 또한 끓는 물에서 10 분간 가열하여 단백질을 변성시킨 LK/ASF 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 은 어떠한 이완효과도 보이지 않았다(Fig. 10B). 이러한 결과는 lumbrokinase의 혈관근 이완효과가 특이적 단백질분해효소 활성화, 즉 serine proteinase 활성화에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한, lumbrokinase의 혈관근 이완이 endothelial derived relaxing factor (EDRF)인 nitric oxide (NO)에 의해서 매개되는지를 알아보기 위해, nitric oxide synthase 저해물질인 NG-methyl-L-arginine (NMA)에 의해 이완 반응이 억제되는지를 조사하였다. LK/ASF 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에 의한 혈관근 이완 작용이 1.8 μM NMA에 의해 약 11% 억제되는 것으로 나타나(Fig. 10B), 혈관근 이완반응에 nitric oxide가 일부 관여하는 것으로 판단되었다.

PAR-2 활성화에 따른 혈관근 이완 효과

PAR-2 활성화에 따른 혈관근 이완 효과에 관한 연구 결과는 Fig. 11에 제시되었다. 0.5 μM phenylephrine으로 수축된 흰쥐 흉부대동맥환에 thrombin 0.5 unit/ml을 연속 처리하여

thrombin receptor를 불감화(thrombin에 의한 수용체의 불가역적인 변화)시키고 trypsin 0.5 unit/ml과 LK/ASF 0.5 µg/ml을 처리하였을 때, trypsin은 thrombin receptor가 불감화된 흉부 대동맥을 이완시켰으며(Fig. 11A), LK/ASF 역시 trypsin과 동일하게 thrombin receptor가 불가역적으로 변화한 흉부대동맥을 이완시켰다(Fig. 11B). 이상의 결과로 trypsin과 같이 lumbrokinase는 thrombin receptor와는 별개로 PAR-2를 활성화하여 혈관근 이완을 일으키는 것을 알 수 있었다.

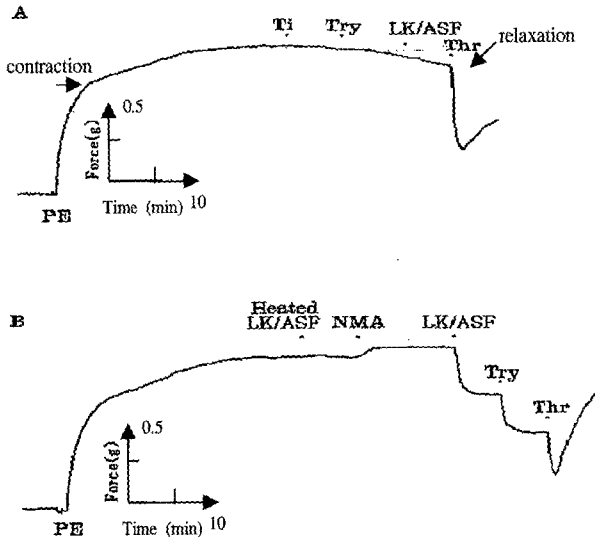


Figure 10. Representative tracings showing mechanism of LK/ASF to rat thoracic aorta relaxation. Aortic rings were contracted by phenylephrine (0.5 µM), followed by soybean trypsin inhibitor (5 µg/ml) (A) or NMA (1.8 µM) (B), and then challenged by trypsin (0.5 unit/ml), thrombin (0.5 unit/ml), and lumbrokinase ammonium sulfate fraction (LK) (0.5 µg/ml). Abbreviations: PE, phenylephrine; Thr, thrombin; Try, trypsin; Ti, soybean trypsin inhibitor; NMA, N^G-methyl-L-arginine

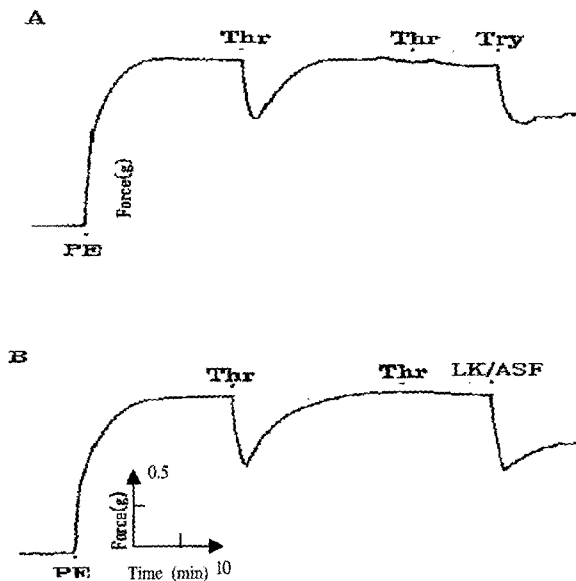


Figure 11. Representative tracings showing selective activation of LK/ASF to PAR-2. Aortic rings were contracted by phenylephrine (0.5 µM), followed by sequential exposures to thrombin (0.5 unit/ml), and then challenged by trypsin (0.5 unit/ml) (A) or lumbrokinase ammonium sulfate fraction (0.5 unit/ml) (B). Abbreviations: PE, phenylephrine; Thr, thrombin; Try, trypsin.

고찰

본 연구에는 한국산 *L. rubellus* 분쇄액으로 부터 lumbrokinase (LK)의 일차 정제는 염농도에 의한 분별 침전 방법을 적용하였는데 30%~60% ammonium sulfate 포화용액에서 얻은 침전물에 67% 이상의 fibrin-용해 활성이 존재하였다(Table 1). 다양한 column chromatography를 수행하여 F1, F2, F3, F4, F5 F6의 6종류의 효소를 정제하였고 분리된 각 분획으로 zymography를 실시하여 fibrin 분해능을 관찰한 결과 6개 분획 모두 활성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

흰쥐 정맥혈전모델을 통한 혈액학적 연구와 혈전용해효과를 보면, LK에 의해 혈액응고의 내인계인자인 APTT와 외인계인자인 PT 모두 음성 대조군에 비해 증가하였으나 TT에는 변화가 없었고, fibrin을 분해하는 선용계의 중추적 역할을 담당하는 효소인 plasmin의 활성이 LK 투여군 모두에서 유의하게 증가되었으나 plasminogen activator 활성에는 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다(Table 1). LK 투여에 의해 혈전중량이 현저히 감소하였는데 특히 LK 250 mg/kg 투여군의 혈전중량은 대조군에 비해 약 64.3%의 혈전중량 감소효과를 나타내었다(Fig. 2). 따라서 흰쥐 정맥혈전유도모델에 경구투여된 LK는 체내로 흡수되어 혈행에 관련되는 응고계 및 선용계 효소에 작용하여 혈액응고시간을 지연시키며 plasminogen activator에는 영향을 주지 않고 직접 혈전을 용해하는 것으로 판단되어진다.

혈소판 응집 억제 효과에서도 thrombin으로 유도된 혈소판 응집이 LK에 의해 농도의존적으로 억제되었는데, LK 25 µg/ml 투여 군에서는 혈소판 응집이 95% 억제되었고(Fig. 3), 혈소판 응집시 방출되는 TXB2의 indicator인 MDA 양도 LK에 의해 방출 양이 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타나(Fig. 4), LK에 의해 혈소판의 응집이 억제되는 것을 알 수 있었다. 이러한 응집 억제는 혈소판에 존재하는 thrombin receptor에 대해 LK가 thrombin과 경쟁적으로 작용하는 것으로 추측되는데 이에 대한 연구가 더 이루어져야 될 것으로 여겨진다.

각각의 LK 분획에 대한 흰쥐와 토끼의 흉부 대동맥과 장간막동맥의 이완작용을 조사한 결과는 흰쥐의 평활근에 대해 각 분획들이 농도 의존적으로 이완반응을 증가시켰다. 특히 분획 F6은 0.1 µg/ml의 저 농도에서도 흰쥐 평활근에 대한 이완효과가 큰 것으로 나타났는데(Fig. 5와 6), 토끼의 평활근에서는 분획 F2가 저 농도에서 이완효과가 큰 것으로 나타나(Fig. 7과 8) 동물의 종간에 어느 정도 차이가 있는 것으로 판단되어진다.

혈관근 이완기작 연구에서 0.5 µM phenylephrine으로 수축된 혈관근이 LK에 의해 농도 의존적으로 이완되었으나 혈관내피세포를 제거했을 때는 이완되지 않았는데(Fig. 9), 이것은 혈관내피세포에 LK가 작용하여 혈관근이 이완되는 것으로 판단된다. 이러한 혈관근 이완반응이 LK의 proteinase 활성에 의한 것인지를 조사한 결과는 trypsin inhibitor 5 µg/ml로 전처리한 혈관근은 trypsin 0.5 unit/ml 또는 LK 0.5 µg/ml에 의해 이완이 유발되지 않았으나, trypsin inhibitor에 의해 활성이 저해되지 않는 thrombin 0.5 unit/ml은 이완반응을 나타냈고(Fig. 10A), 가열하여 단백질질을 변성시킨 LK 0.5 µg/ml은

혈관근 이완효과가 없음을 알 수 있었다. 또 nitric oxide synthase 억제제인 N^G-methyl-L-arginine 1.8 μM 에 의해 LK 0.5 μg/ml의 혈관근 이완효과는 일부 억제되었다(Fig. 10B). 이상의 결과로 LK는 trypsin 유사 serine proteinase의 일종이며(9) 고유의 단백질분해활성에 의해 혈관근을 이완시키며, 이러한 반응에 nitric oxide가 일부 관여하는 것으로 판단되어진다.

최근 proteinase activated receptor-2 (PAR-2) 유전자가 mouse(18, 19), rat(20), human(19, 21)에서 클로닝되었다. PAR-2는 thrombin에 의해 활성화되지 않고, trypsin 또는 합성 peptide인 serine-leucine-isoleucine-glycine-arginine-leucine에 의해 활성화되는데, 이는 thrombin receptor에 존재하는 thrombin/hirudin-binding exosite가 PAR-2에는 없기 때문인 것으로 알려져 있고(18), PAR-2는 혈관내피세포에 thrombin receptor와 구별되어 존재하고 있으며(17), agonist 특이성은 두 번째 extracellular loop에 의해 결정되는 것으로 보고되었다(22). PAR-2의 생리학적 기능과 내래성 활성인자는 아직 밝혀지지 않았으나 PAR-2의 mRNA는 신장, 소장, 위 등의 고도로 vascularize된 기관 내에 존재하며 blood vessel tone을 조절하는 역할을 담당할 것으로 추측되어지고 있다.

LK가 serine protease 활성에 의해 내피세포 의존적으로 혈관근을 이완시키므로 LK가 혈관근 내피세포에 존재하는 thrombin receptor와 PAR-2 중 어느 수용체에 작용하는지를 확인하기 위해 혈관근에 thrombin 0.5 unit/ml을 2회 연속 투여하여 thrombin receptor를 탈감작한 후 LK 0.5 μg/ml를 처리하여 혈관근이 이완되는지를 조사하였고, 또한 이미 PAR-2를 선택적으로 활성화하는 것으로 보고된 trypsin 0.5 unit/ml을 탈감작된 혈관근에 투여하여 LK와 비교하였다. LK는 thrombin receptor가 탈감작된 혈관근을 이완시켰으며 PAR-2 활성화 양성 비교물질로 사용한 trypsin 역시 LK와 같이 탈감작된 혈관근을 이완시켰다(Fig. 11). 이상의 결과로 LK는 trypsin과 같이 PAR-2를 선택적으로 활성화시키는 것으로 판단된다.

LK는 구강투여에 의하여 혈전을 용해시켰으며(Fig. 2), thrombin에 의한 세척 혈소판의 응집을 억제하였고(Fig. 3), 혈관근을 이완시켰다(Fig. 5). 이상의 결과로 LK는 혈행 개선에 매우 효과적이는데 이 효과는 직접적인 혈전 용해효과와 간접적인 PAR-2 활성화에 따른 혈관근 이완 및 혈소판 응집억제에 기인한 것으로 생각된다.

요 약

한국산 지렁이 (*Lumbricus rubellus*) 분쇄액으로부터 연속적인 column chromatography로 6종의 lumbrokinase (LK) fractions를 얻었다. 여섯 종의 LK fractions의 분자량은 24.6~33.1 kDa 사이였다. rat venous thrombosis를 이용한 실험모델에서, LK분획을 oral administration한 쥐에서 thrombus 중량은 유의하게 감소하였고, APTT, PT와 plasmin 활성도 유의하게 증가하였고, PAI activity도 유의하게 감소하였다. rat platelets를 LK 분획으로 전 처리하였을 때에 thrombin에 의한 응고는 억제되었고, MDA 생산도 감소되었다. 쥐의 흉대동맥과 장간막동맥을 phenylephrine으로 수축을 시킨 후에

LK 분획을 각각 처리하였을 때에 혈관이 이완되었다. 상기의 결과는 LK분획이 fibrinolytic activity 뿐만 아니라 platelet 응집의 억제와 혈관의 이완작용에도 영향을 준다는 것을 의미한다. 결론적으로 LK는 fibrin clot치료를 위한 hemolytic agent로서 유용하다고 판단한다.

2-아릴프로피온산 계열의 키랄 의약품의 효소적 dynamic kinetic resolution (DKR) 공정에서 라세미화 염기촉매로 트리옥틸아민이 지금까지 주로 사용되어 왔으나 반응매질에 녹은 상태로 작용해 회수 및 재사용이 어려웠다. 본 연구에서는 이를 개선하고자 라세미화 반응을 위한 고효율 고체 염기를 탐색해 보았다. 45°C, 아이소옥탄 내에서 (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 씨오에스터를 기질로 무기 염기류, 염기성 음이온교환수지류, resin-bound 염기류 등을 시험한 결과, 약 염기성 음이온교환수지인 DIAION WA30을 사용하였을 때 가장 효과적이었다. DIAION WA30의 2차 interconversion constant (k_{im}^*)는 $8.6 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 이며 동일한 실험조건 하에서 수행한 트리옥틸아민 ($k_{im}^* = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$)에 비해 약 3배가 높았다. 효소 활성에 필수적인 물의 양에 따른 DIAION WA30의 라세미화 효율에 관하여 실험한 결과, 물의 양이 증가할수록 그 효율은 감소하였다. DIAION WA30을 라세미화 촉매로 사용하여 아이소옥탄 내에서 라세믹 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 씨오에스터의 효소적 DKR 반응을 수행해 보았다. 그 결과 DIAION WA30을 사용하지 않은 경우에 비해 반응 전환율과 생성물의 광학 순도는 급격히 향상되었다. 전통적 광학 분할 반응의 최대 50%라는 전환율의 제한이 본 연구에서 찾은 DIAION WA30을 첨가함으로써 성공적으로 극복되었다. 또한 고체 염기촉매인 DIAION WA30의 사용은 라세미화 촉매의 회수 및 재사용이 가능하게 해준다.

REFERENCES

- Mihara, H., H. Sumi, K. Akazawa, T. Yoneda, and H. Mizumoto (1983), Fibrinolytic enzyme extracted from the earth worm. *Thromb. Haemostas.* **50**, 258-261.
- Cho, I. H., E. S. Choi, H. G. Lim, and H. H. Lee (2004), Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from Earthworm *Lumbricus rubellus*, *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 199-205.
- Mihara, H., T. Yineta, H. Sumi, M. Soeda, and M. Maruyama (1989), A possibility of earth worm powder as therapeutic agent for thrombosis, *Thromb. Haemosta.* **62**, 545-549.
- Yang, J. S. and B. G. Ru (1997), Purification and characterization of an SDS-activated fibrinolytic enzyme from *Eisenia fetida*, *Com. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **118**, 623-631.
- Hrzenjak, T. M., M. Popovic, and L. Tiska-Rudman (1998), Fibrinolytic activity of earthworms extract (G-90) on lysis of fibrin clots originated from the venous blood of patients with malignant tumors, *Pathol. Oncol. Res.* **4**, 206-211.
- Kim, O. (1994), Fibrinolytic activity of worm, Chinese medicinal herb Journal. Beijing Center of cardiac and blood vessel hospital **25**, 44-47.
- Ryu, G. H., S. Park, M. Kim, D. K. Han, Y. H. Kim, and B. G. Min (1994), Antithrombogenicity of lumbrokinase immobilized polyurethane, *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 1069-1077.
- Park, Y., E. Ryu, H. Kim, J. Jeong, J. Kim, J. Shim, S. Jeon, Y. Jo, W. Kim, and B. Min (1999), Characterization of antithrombotic activity of lumbrokinase-immobilized Polyurethane valves in the total artificial heart, *Artif. Organs.* **23**, 210-214.

9. Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki, and M. Maruyama (1991), A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Jpn. J. Physiol.* **41**, 461-472.
10. Scopes, R. K. (1987), Protein purification, *Springer-Verlag New York Inc. New York*.
11. Astrup, T. and S. Mullertz (1952), The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity, *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
12. Beynon, R. J. and J. S. Bond (1989), Proteolytic enzymes, *Oxford University Press, New York*. p47-48.
13. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
14. Kumada, T., M. Ishihara, H. Ogawa, and Y. Abiko (1980), Experimental model of venous thrombosis in rats and effect of some agents, *Thrombosis Research* **18**, 189-203.
15. Rodomski, M. and S. Moncada (1983), An improved method for washing of human platelets with prostacyclin, *Thrombosis Research* **30**, 383-389.
16. Buege, J. A. and S. D. Aust (1978), Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, Vol. LII, p302-310.
17. Hwa, J. J., L. Ghibaudi, P. Williams, M. Chintala, R. Zhang, M. Chatterjee, and E. Sybertz (1996), Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells, *Circ. Res.* **78**, 581-587.
18. Nystedt, S., K. Emilsson, C. Wahlestedt, and J. Sundelin (1994), Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9208-9214.
19. Nystedt, S., A. K. Larsson, H. Aberg, and J. Sundelin (1995), The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene: molecular cloning and functional expression, *J. Biol. Chem.* **270**, 5950-5955 .
20. Saifeddine, M., B. A-Ani, C-H. Cheng, L. Wang, and M. D. Hollenberg (1996), Rat proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): cDNA sequence and activity of receptor-derived peptides in gastric and vascular tissue, *Br. J. Pharmacol.* **118**, 521-526.
21. Bohm, S. K., L. M. Khitin, E. F. Grady, G. Aponte, D. G. Payan, and N. W. Bunnett (1996), Mechanism of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2, *J. Biol. Chem.* **271**, 22003-22007.
22. Lerner, D. J., M. Chen, T. Tram, and S. R. Coughlin (1996), Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor: importance of extracellular loop interactions for receptor function, *J. Biol. Chem.* **271**, 13943-13947.