

혈전용해효소의 경구투여에 의한 생체 내 작용

이영훈 · ¹이성호 · ²박기훈 · ³최영주 · 이상원 · 김철호 · 조수정 · †갈상완
진주산업대학교 미생물공학과, ¹경상대학교 환경생명국가 핵심연구센터
²경상대학교 응용생명과학부, ³신라대학교 식품영양학부
(접수 : 2006. 6. 13., 게재승인 : 2006. 11. 10.)

In vivo Biological Function of a Fibrinolytic Enzyme after Oral Administration

Young-Hoon Lee, Sung-Ho Lee¹, Ki-Hoon Park², Young-Ju Choi³, Sang-Won Lee, Cheol-Ho Kim,
Soo-Jeong Cho, and Sang-Wan Gal

Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

¹Environmental Biotechnology National Core Research center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Department of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³Department of Food and Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea

(Received : 2006. 6. 13., Accepted : 2006. 11. 10.)

A fibrinolytic enzyme gene (BCF-1) was subcloned to the pEB vector which is high expression vector in the *Bacillus* host. The enzyme was purified by using FPLC after ammonium sulfate precipitation. The enzyme was oral-administrated to the rat and checked the bleeding time, blood clotting time and fibrinolytic effect of the serum. In the bleeding time retardation test, it was longer about 1.7 fold in the feeding rat than without feeding. The serum of rat fed with the enzyme had the fibrinolytic activity from 1 hour to 3 hours after oral-administration. After 3 hours from feeding, the fibrinolytic activity was decreased gradually. Also blood clotting time after bleeding was longer than that of control rat. The enzyme could be detected at band of 30,000 Da in the blood by western blotting. The enzyme was not harmful to the all internal organs of the rats. Taken together, the enzyme originated from *B. subtilis* BB-1 can be a candidate to develop the drug for thrombosis, arteriosclerosis and myocardial infarction.

Key Words : Fibrinolytic enzyme, oral-Administration, BCF-1, bleeding time, blood clotting time

서론

최근 생활수준의 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 급속히 높아져 가고 있는 추세이며, 특히 현대 도시 생활자들은 성인병의 예방과 치료에 대한 관심이 대단히 높다. 성인병 중에서도 손상된 혈관 내에서 혈액손실을 최소화하기 위한 지혈기능의 이상으로 유래되는 뇌혈관 질환이나 심장질환은 생명에 치명적이며 후유증 또한 심각하다. 현재 심혈관계 질환의 경우, 사회의 발달과 인구의 고령화에 따라 급속히 증가하고 있으며, 그 사망률의 합계는 악

성증양의 경우를 상회하고 있어 예방 및 치료제에 대한 개발이 매우 시급한 실정이다(6, 34).

생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안 생성된 혈전은 즉시 분해되어 인체에 영향을 주지 않는다(24). 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨지면 생성되는 혈전이 분해되는 혈전보다 많아지고 분해되지 않은 혈전은 혈류를 통하여 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(1). 이와 같은 경우 혈전형성을 방지하기 위해 항 혈전제가 필요하고, 이미 형성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전용해제가 필요하다. 혈전의 생성을 방지하고 생성된

† Corresponding Author : Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, 150 Chilamdong, Jinju 660-758, Korea

Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sangal@jinju.ac.kr

혈전을 용해하는 치료제를 개발하기 위해 지금까지 여러 치료법이 연구되어 왔다. 현재, 혈전증의 치료에 널리 사용되고 있는 urokinase(11, 23, 31), streptokinase(7), staphylokinase(18), tPA (tissue plasminogen activator)(3) 등은 가격이 매우 높은 단점이 있으며, urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능한 실정이다. 최근 혈관 주사되는 tPA 이외에 병행요법으로 직접 경구 투여함으로써 혈액내의 혈전용해능을 증가시키는 제제에 대한 관심을 갖기 시작하고 있다. 현재 경구 투여하는 혈전용해제는 지렁이 (*Lumbricus lubellus*)로부터 분리된 6가지의 혈전용해효소가 보고되고 있으며(20, 21), 우리나라에서도 명심과 같은 제제가 제약화되어 있다.

Sumi 등의 보고에 의하면 urokinase를 장내에 투입시켜 흡수시키면 혈액내의 혈전용해능이 현저히 증가한다고 하여 관심을 끌었다(25, 28-31). 즉, 장에서 흡수된 urokinase가 간에 도달하여 혈전을 용해시키는 효소의 합성을 증진 시킴으로써 혈전용해능이 증가하는 것으로 추측된다고 보고함으로써 혈전용해효소의 장내투여 응용성이 가능하다는 점을 시사하고 있다.

또한 일본의 전통 대두 발효식품인 natto로부터 분리된 nattokinase라는 효소를 경구 투여 시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있었다는 보고가 있어서(26, 27), 현재 일본에서는 natto가 혈전용해능을 지닌 건강식품으로서 판매량이 급격히 증가하고 있다. 우리나라에서도 일본의 natto와 마찬가지로 콩을 원료로 하여 발효시킨 전통식품인 청국장, 된장, 젓갈, 김치 등에서 혈전용해작용이 우수한 것을 보고한 바도 있으며(10, 13-16, 33), 특히 Jeong 등은 멸치액젓에서 생체 내 혈전용해작용에 대하여 보고한 바 있다(9).

이에 본 연구에서는 혈전 관련 질환예방 및 혈류개선을 목적으로 *Bacillus subtilis* BB-1 (KFCC 11344P)로부터 분리된 혈전용해효소 유전자 (BCF-1)를 대량발현 벡터인 pEB 벡터에 크로닝하여 순수분리된 혈전용해효소가 rat에 경구 투여시 효소가 장내로 흡수됨에 따라 혈액내의 혈전을 분해시킬 수 있는 효과를 가질 수 있는지를 동물실험을 통하여 검토하였으며, 혈전용해효소 단회경구투여에 따른 rat의 사망률, 장기의 이상여부, 중량 등을 측정하여 효소의 1차적 안전성을 확인하였다.

재료 및 방법

혈전용해효소 및 사용시약

본 연구에 사용된 혈전용해효소는 Lee 등(17)이 보고한 *B. subtilis* BB-1 (KFCC 11344P)에서 크로닝하여 얻어진 BCF-1 유전자에 의해 대량생산 및 정제된 혈전용해효소를 사용하였으며, 본 실험에서 사용된 fibrinogen, thrombin 그리고 plasmin 등의 모든 시약은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

혈전용해활성의 측정

Astrup와 Hullertz의 방법(2)을 변형하여 사용하였다. 0.4% Fibrinogen (Sigma, USA)을 sodium borate buffer (10 mM sodium borate, 160 mM boric acid, 40 mM NaCl, Merck,

Germany)에 녹인 후 직경 87 × 15 mm petri-dish에 10 ml 넣은 후 thrombin (1,000 unit/ml, Sigma, USA) 20 unit를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에서 30분간 반응하여 응고시켰다. 응고된 fibrin plate에 각 시료를 적당량 점적하여 37°C에서 반응시켜 생성된 혈전이 분해된 분해면적을 측정하였으며 표준 혈전분해효소로 1 unit의 plasmin (25 unit/ml, Sigma, USA)을 사용하여 비교하였다.

실험동물

각 실험에 사용한 동물은 체중 160 g 내외 (생후 6주령)의 Sprague Dawley Strain 수컷 흰쥐와 암컷 흰쥐를 대한 실험동물센터(주)에서 구입하여 사용하여 각각 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였으며 전 실험기간 동안 온도 25 ± 1°C 및 습도 55 ± 1%로 조정된 항온항습장치 내에서 사육하였고, 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

혈전용해효소에 경구투여에 의한 rat의 출혈시간 측정

정제된 효소의 경구투여에 따른 출혈시간을 측정하기 위하여 수컷흰쥐 4마리와 암컷흰쥐 4마리를 사용하였으며 이중 각 2마리씩은 대조군으로 나머지는 실험군으로 하여 정제효소 1 ml씩을 (1 mg/ml) 경구투여용 카테터를 이용하여 3일간 매일 1회씩 위까지 경구투여한 후 실험종료일에 McDonald 등의 방법(19)으로 출혈시간을 측정하였다. 에틸 에테르로 흰쥐를 마취시킨 후 꼬리 끝부분의 3~5 mm되는 곳을 절단하고 37°C의 생리식염수 용액에 꼬리 끝부분으로부터 5 cm 되는 부분까지 침지시켜 지혈될 때까지의 시간 (sec)을 stop watch로써 측정하였다.

혈액 serum에 의한 fibrin 분해효과 및 혈액응고

정제된 효소의 rat에 대한 경구투여효과를 측정하기 위하여 정제효소 (1 mg/ml)를 saline solution에 녹여 시료로 사용하였다. 암수 각 1마리씩은 control로서 효소가 함유되지 않은 saline solution 1 ml을 경구 투여하였다. 그리고 나머지 암수 4마리씩은 3일 동안 매일 효소액 1 ml (1 mg/ml)을 경구 투여한 후 마지막 날에 각 시간별 (1, 2, 3, 4시간)로 에틸 에테르로 마취하여 심장을 통하여 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 즉시 원심분리 (13,000 × g, 15 min, 4°C)하여 상층의 serum 부분을 회수하여 -20°C에 보관하였다. control군의 혈액과 경구투여 후 각 시간별로 채혈한 군의 혈액으로부터 분리한 serum 100 μl를 fibrin plate에서 반응시켜 분해정도를 면적으로서 측정하였으며, 각 시간별로 채취된 혈액의 응고시간을 측정하기 위하여 control과 경구투여군의 혈액을 각각 100 μl씩 dish에 떨어뜨려 상온에서 혈액의 응고시간과 응고모습을 육안으로 관찰하였다.

항체제조와 Western Blot

순수분리된 혈전용해효소를 이용하여 제조된 항체는 Lee 등(17)이 제조한 것을 사용하였으며, Western blot은 Towbin 등의 방법(32)을 이용하여 rat의 혈액에서 채취, 분리한 serum을 전기영동한 후 단백질을 nitrocellulose membrane (Millipore Co., USA)에 250 mA로 1시간 30분간 transfer하였

다. 그 후 이 막을 pH 7.8의 phosphate buffer saline (PBS)에 5분씩 5회 세척한 후 1% skim milk가 함유된 PBS buffer에 1시간 30분간 blocking하여 불필요한 단백질의 부착을 억제시켰다. 그 후 1% skim milk를 포함하는 PBS buffer에 1 : 5,000 (v/v)의 비율로 primary antibody를 희석한 후 blotting wells에 넣어 rotator를 이용하여 상온에서 16시간동안 흔들면서 반응하였다. 반응이 끝난 후 PBS buffer를 이용하여 15분씩 3회 세척하여 1% skim milk가 포함된 PBS buffer에 anti-rabbit IgG (Sigma Co., USA)를 1 : 2,000 (v/v)로 희석하여 4시간 동안 상온에서 rotator를 이용하여 흔들면서 반응시켰다. 이를 PBS buffer로 15분간 3회 세척한 뒤 15 mg 4-chloro-1-naphthol, 45 ml Tris-Cl (pH 7.4), 90 μ l H₂O₂로 구성된 발색용액에 10분간 반응시킨 후 증류수로서 세척하고 건조하여 생성된 밴드를 육안으로 관찰하여 사진 촬영하였다.

혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성시험

단회경구투여 독성시험실험동물인 랫드는 6주령 (체중; 수컷 160 ± 5 g, 암컷 수컷 160 ± 5 g)을 5마리씩 사용하였으며, 투여용량은 경구투여효과에서 확인된 효소 1 ml (1 mg/ml)의 용량으로 경구투여용 카테터를 이용하여 강제 경구 투여하였다. 일반증상 및 사망동물은 투여당일 투여 후 1, 3 그리고 6시간 간격으로, 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회 이상씩 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 대조구와 비교 관찰하였고 중량의 변화는 2일 단위로 측정하였으며, 부검은 투여 후 14일째 에테르 마취 하에서 복대정맥을 통해 채혈하여 안락사 시킨 후 육안으로 모든 장기를 검사하였다.

결과 및 고찰

혈전용해효소에 경구투여에 의한 rat의 출혈시간 측정
 항 혈전작용 중의 생체 내 실험의 하나인 출혈시간을

측정하기 위하여 3일간 매일 1회 정제된 혈전용해효소 1 ml (1 mg/ml)을 경구투여한 후 조사된 출혈시간은 실험군과 대조군으로 구분 분리하여 실시하였으며, 대조군 (116.25 ± 6.88 sec)에 비하여 모든 실험군 (203.75 ± 7.46 sec)에서 출혈시간이 유의적으로 약 1.75배 이상 길게 나타남을 확인하였고 (P<0.05), 혈액의 출혈 또한 대조군보다 활발히 진행됨을 Fig. 1과 같이 관찰하였다. 출혈시간의 측정은 혈액 응고와 관련한 항 혈전 작용의 연구에 있어서 하나의 측정변수가 되고 있으며 출혈시간이 길어진다는 것은 혈관 내의 혈액이 혈전이나 기타 불순물에 의해 흐름이 방해받지 않고 혈류를 따라 원활하게 순환된다는 의미인 동시에 혈액이 맑고 혈관 내에 불순물이 없는 깨끗함을 의미(8)하는 것을 알 수 있으며 정제된 본 혈전용해효소를 경구투여 하였을 때 혈액 중에서 항 혈전작용 및 기생성된 혈전의 분해 작용이 동시에 이루어지는 것으로 판단되었다.

혈액 serum의 fibrin 분해효과 및 혈액응고

정제된 혈전용해효소 대신 saline만 투여한 control군의 혈액과 경구투여 후 각 시간별로 채혈한 rat군의 혈액의 serum 100 μ l를 fibrin plate에서 반응시켜 분해정도를 측정하였다. 측정된 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 경구투여 후 1시간째부터 채혈한 혈액 내에서 혈전용해효소의 활성이 검출되기 시작하여 3시간째 채혈한 혈액까지 높은 활성을 보였다. 이 결과는 Sumi 등(29)에 의해 보고된 urokinase를 이용하여 mouse에 실험한 결과와 Jeong 등(9)의 멀치액젯에서 분리한 조효소액을 이용한 rat에 시험한 결과와 비교할 때 다소 차이를 보였다. urokinase를 경구 투여하였을 때, 2시간에서 최고활성을 기록하여 3시간째부터 활성저하가 나타났다고 보고하였으며, 멀치액젯에서 분리한 조효소액에서는 1시간부터 활성이 검출되었으나 2시간째에는 급격한 증가의 폭을 보이지 않고 3시간째 가장 높은 활성을 나타내었다. 이것으로 본 연구결과를 비교해 볼 때 본 효소는 1시간째부터 3시간째까지 모두 강한 활성을 나타내었으며 4시간째부터 서서히 활성이 감소하는 것을

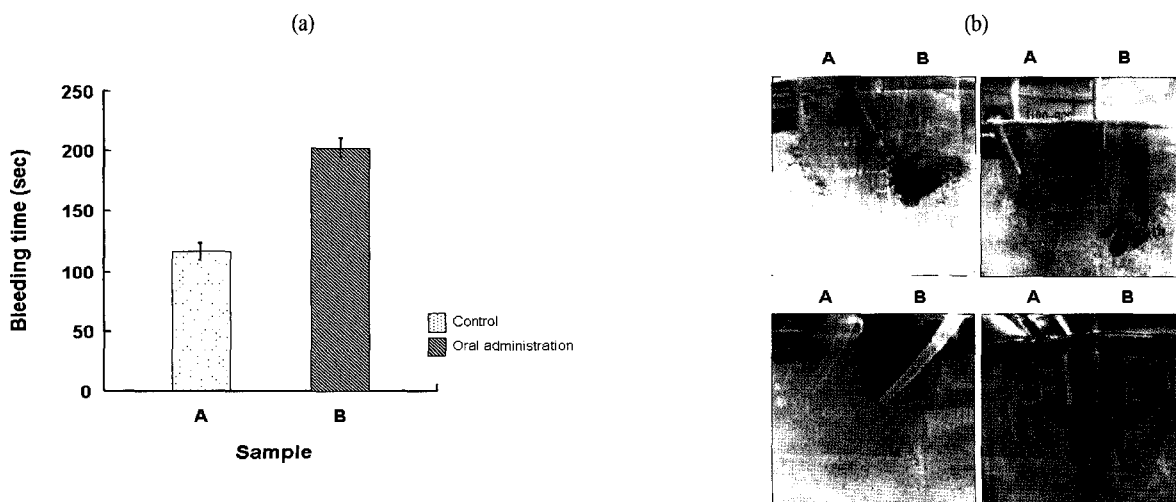


Figure 1. Bleeding time of the rats orally administrated with the fibrinolytic enzyme (BCF-1) for 3 days. Each bar is the mean values ± standard error (P<0.05) (I. graphs of bleeding time, II: photographs of bleeding in the water, A: control, B: orally administrated).

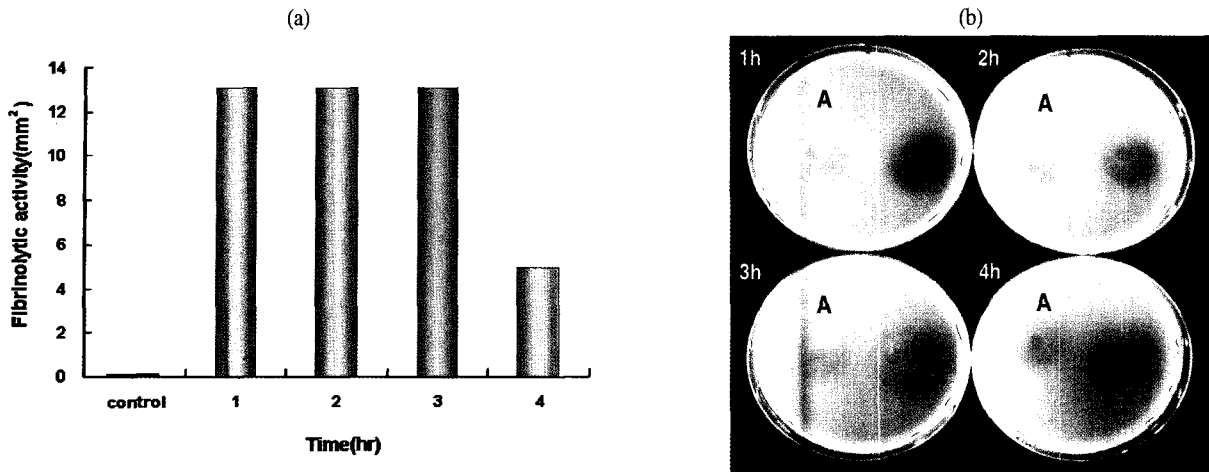


Figure 2. Fibrinolytic activities of serum from the rats orally administrated with fibrinolytic enzyme (BCF-1) (I: graphs of fibrinolytic activity, II: photographs of fibrinolytic activity, A: control, B: orally administrated).

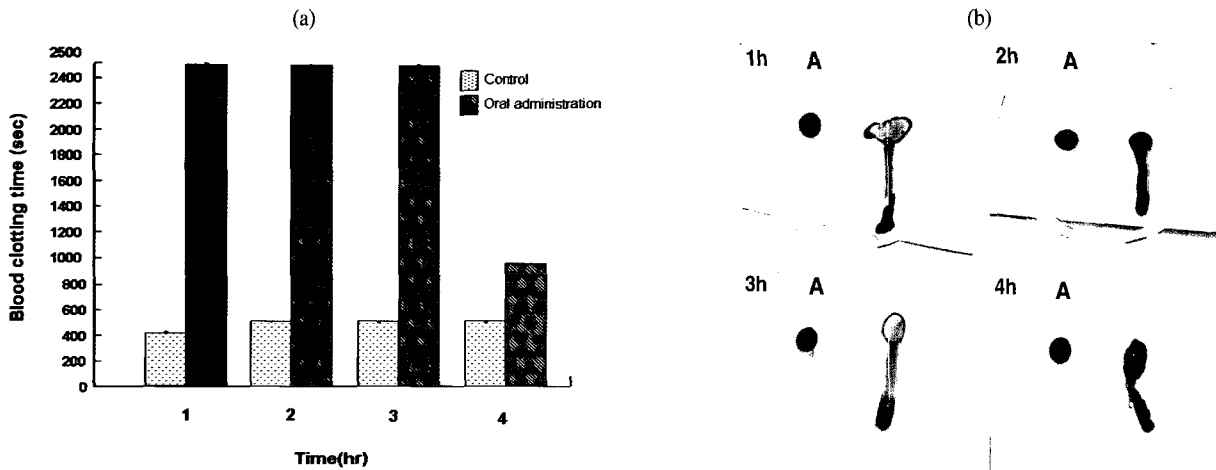


Figure 3. Blood clotting time in the rats orally administrated with fibrinolytic enzyme (BCF-1). Each bar is the mean values \pm standard error ($P < 0.05$) (I: graphs of fibrinolytic activity, II: photographs of fibrinolytic activity, A: control, B: orally administrated).

알 수 있었다. 따라서 본 효소는 경구투여 후 혈액으로 흡수는 확실히 섭취 후 3시간까지는 활발히 효소활성이 유지됨을 확인하였다. 그리고 혈전용해효소 경구투여에 의한 혈액의 응고를 측정된 결과 Fig. 3과 같이 1시간째에는 대조군 403.75 ± 9.43 sec와 실험군 2489.75 ± 6.89 sec, 2시간째 대조군 502.01 ± 3.39 sec와 실험군 2484.5 ± 3.84 sec 그리고 3시간째에는 대조군 499.04 ± 4.14 sec와 실험군 2485.75 ± 4.13 sec로 나타났으며 4시간째에는 대조군 499.00 ± 4.20 sec와 실험군 948.25 ± 7.45 sec로 각 시간대 별로 대조군에 비하여 경구 투여군에서의 유의적으로 혈액 응고시간이 상당히 지연되는 것을 나타내었다($P < 0.05$). 이 결과에서 볼 때 본 혈전용해효소는 혈액 내에서의 상당한 항 혈전작용이 있음을 관찰할 수 있었다.

Western Blot에 의한 rat의 혈액에서 혈전용해효소의 검출

혈전용해효소 경구투여에 의한 rat의 혈액에서 혈전용해효소 검출 여부를 확인하기 위하여 채취, 분리된 serum 20 μ l를 항원으로 하고 혈전용해효소를 이용하여 토끼를 통해 제작된 항체에 의한 항원항체 반응을 분석한 결과 혈전용

해효소를 섭취하지 않은 대조군에서는 아무런 밴드가 관찰되지 않았으며, 경구투여를 실시한 투여군에서는 육안으로 확인시 30,000 Da에서 아주 약한 밴드가 검출되었다(Fig. 4).

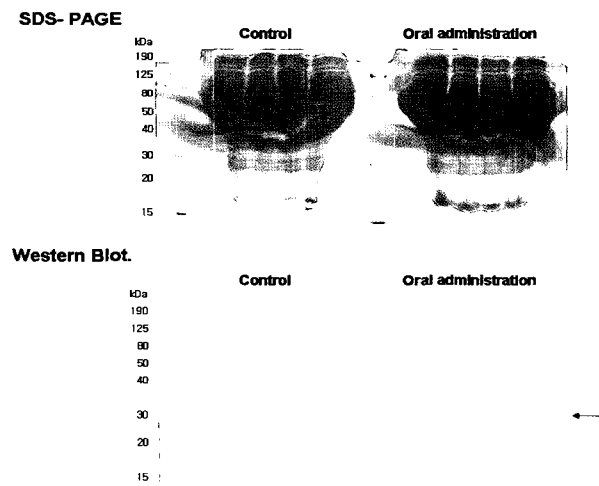


Figure 4. Western blot analysis of fibrinolytic enzyme in the blood of rat orally administrated.

혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성시험

Rat에 대한 단회 경구투여 독성검사에서 암, 수 모두 정제효소 투여군에서 최초 투여 일부터 14일간 사망동물이 관찰되지 않았다. 그리고 암, 수 모두 정제효소 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며(Fig. 5), 시험 전 기간 동안 아무런 임상증상이 관찰되지 않았다(Table 1). 또한 부검시의 암, 수 모두 육안적 이상소견이 Fig. 6과 같이 확인되지 않았다. Jeong 등(5)이 보고한 항 혈전제인 아스파라톤에서의 생식독성과 Kauffman(12)과 O'Grady 등(22)의 아스피린의 독성시험에서 위출혈 및 위궤양을 일으키는 부작용으로 인하여 임상에서의 폭넓은 사용이 제한되고 있는 것에 비교해 볼 때, 본 혈전용해효소의 경구투여에 대한 rat의 단회경구투여 독성시험에서는 전혀 무해함을 판정할 수 있었으며, 의학적으로 이용시 1차적인 독성에 대한 문제점은 배제할 수 있으리라 판단되어진다.

Table 1. Clinical signs of rats orally administered with fibrinolytic enzyme, BCF-1

Signs observed	Control	Oral Administration
Male		
Appears normal	5/5*	5/5*
Weakening	0/5	0/5
Increase of locomotor activity	0/5	0/5
Decrease of locomotor activity	0/5	0/5
Salivation	0/5	0/5
Soiled perineal region	0/5	0/5
Contused wound	0/5	0/5
Death	0/5	0/5
Female		
Appears normal	5/5*	5/5*
Weakening	0/5	0/5
Increase of locomotor activity	0/5	0/5
Decrease of locomotor activity	0/5	0/5
Salivation	0/5	0/5
Soiled perineal region	0/5	0/5
Contused wound	0/5	0/5
Death	0/5	0/5

* No. of animals with the sign/ No. of animals examined

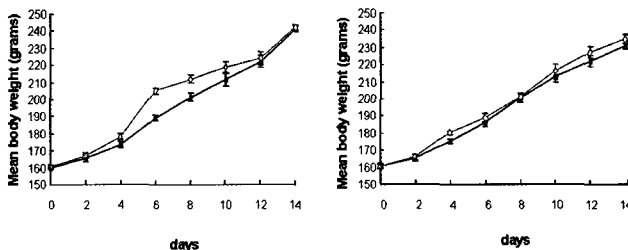


Figure 5. Comparison of body weights of male and female rats orally administered with fibrinolytic enzyme, BCF-1. Each bar is the mean values \pm standard error ($P < 0.05$) (—●—: Control, —□—: 1 mg/ ml).

요 약

Bacillus subtilis BB-1 (KFCC 11344P)으로부터 분리된 혈

전용해효소 유전자 (BCF-1)를 대량발현 벡터인 pEB 벡터에 크로닝하여 순수분리 된 혈전용해효소를 rat에 경구 투여하여 출혈시간, 혈액의 응고, serum의 혈전용해능 등에 대한 *in vivo* 실험을 실시하였으며, 혈전용해효소의 단회경구투여에 따른 독성을 검사하였다. 효소의 경구투여에 따른 rat의 출혈시간에서는 대조군에 비하여 모든 경구 투여군에서 출혈시간이 유의적으로 약 1.75배 이상 길게 나타남을 확인하였고($P < 0.05$), 혈액의 출혈시간 또한 활발히 진행됨을 관찰하였다. 혈액으로부터 분리된 serum의 혈전용해작용 있어서는 경구투여 후 1시간부터 채혈한 혈액 내에서 혈전용해효소의 활성이 검출되기 시작하여 3시간째까지 높은 활성을 보였으며 4시간째부터 서서히 활성이 감소하는 것을 확인하였고 혈액의 응고 역시 대조군에 비하여 경구 투여군에서 상당히 지연되는 것을 알 수 있었다. Western blot에 의한 효소 검출에서는 경구 투여군에서 30,000 Da 크기의 단일밴드를 확인하였으며, 혈전용해효소의 rat에 대한 단회경구투여 독성실험에서 중량의 변화, 장기의 이상여부, 사망률 등에서 어떠한 이상이나 병변이 발견되지 않았다. 이상의 결과로 동물실험을 통한 혈전용해효소의 경구투여에 의한 작용을 혈액 내에서 확인 할 수 있었으며, 본 효소의 단회 경구투여 시의 독성은 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

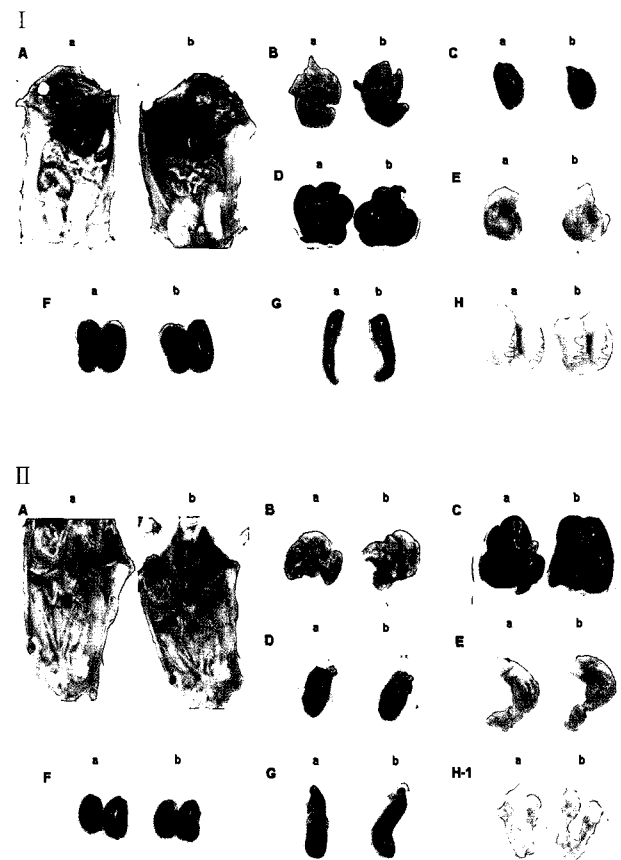


Figure 6. Gross findings of necropsy in male and female rats orally administered with fibrinolytic enzyme, BCF-1 (I : Male rats, II : Female rats, a: control, b: administered orally with fibrinolytic enzyme (1 mg/ml), A: all of necropsy, B: lung, C: liver, D: heart, E: stomach, F: kidney, G: pancreas, H: testis, H-1: ovary).

감 사

본 연구는 2003~2006년 농림부 첨단기술과제 생명공학 분야 (203069-03)로 수행하였으며, 이 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Arbige, M. and W. H. Pitcher (1989), Industrial enzymology; a look towards the future, *Trends Biotechnol.* **7**, 330-335.
- Astrup, T. and S. Mullertz (1952), The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346.
- Astrup, T. and I. Stermdorff (1956), The plasminogen activator in animal tissue. *ACTA Physiol. Scand.* **363**, 250.
- Bradford, M. M. (1976), Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chung, M. K., S. J. Lee, J. C. Kim, and S. W. Song (1998), Reproductive Toxicity study of Aspalatone, A New Antithrombotic Agent: Teratogenicity study in Rats, *J. Applied Pharmacology* **6**, 151-158.
- DaKa, M. D. and C. P. Semba (1995), Thrombolytic therapy in venous occlusive disease, *J. Vasc. Interv. Radiol.* **6**, 73-77.
- Fletcher, A. P. and A. J. Johnson (1975), Methods employed for purification of streptokinase, *Por. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 233.
- Han, Y. N., S. K. Baik, T. H. Kim, and B. H. Han (1987), Assays for antithrombotic activity, *Arch. Pharm. Res.* **10**, 115.
- Jeong, Y. K., W. S. Yang, and B. K. Kim (1998), Effect of oral Administration of fibrinolytic enzyme from a fermented anchovy, *Myulchi Jeot-Gal*, *Korean J. Life Science* **8**, 737-740.
- Jeong, Y. K., W. S. Yang, J. O. Kang, I. S. Kong, and J. O. Kim (1995), Fibrinolysis of fermented kimchi, *Korean J. Life Science* **5(4)**, 203-210
- Kalu, D., E. J. Masoro, B. P. Yu, R. R. Hardin, and B. W. Hallis (1988), Modulation of age-related hyperparathyroid and senile bone loss in Fischer rats by soy protein and food restriction, *Endocrinology* **122**, 1847.
- Kauffman, G. (1989), Aspirin-induced gastric mucosal injury: Lessons learned from animal models, *Gastroenterology* **96**, 606.
- Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. Kang (1997), Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermenter fish, *J. Ferment. Bioengin.* **84**, 307-312.
- Kim, S. H. (1998), New trends of studying on potential activities of *Doen-jang*, *Korea Soybean Digest* **15**, 8-15.
- Kim, Y. T., W. K. Kim, and H. S. Oh (1996), Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from *chungkookjang*. *Appl. Environ. Microbiology* **2482-2488**.
- Lee, Y. H., S. H. Lee, J. M. Jeon, H. C. Kim, Y. U. Cho, K. H. Park, Y. J. Choi, and S. W. Gal (2005), Cloning and characterization of a gene for fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BB-1 isolated from black bean *chung-kuk*, *Korean J. Life Science* **15**, 513-521.
- Lee, Y. H., S. H. Lee, K. H. Park, Y. J. Choi, Y. K. Jeong, and S. W. Gal (2006), Cloning and High Expression of Nattokinase Gene from *Bacillus subtilis* BB-1, *Korean J. Life Science* **16(2)**, 274-281.
- Lijnen, H. R., Van Hoef, and D. Goolen (1992), Interaction of staphylokinase with different molecular form of plasminogen, *Biochem. Biophys. ACTA* **144**, 1118.
- McDonald, B. E., J. M. Gerrard, V. M. Bruce, and E. J. Corner (1989), Comparison of the effect of canola oil and sunflower oil on plasma lipids and lipoproteins and *in vivo* thromborane Az and prostacyclin production in healthy young men, *Am. J. Clin. Nutr.* **50**, 1382.
- 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 lubellus*, *Jap. J. Physiology* **41**, 461-472.
- Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi (1993), Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus lubellus*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1726-1730.
- O'Gray, J. and S. Moncada (1978), Aspirin: a paradoxal effect on bleeding time, *Lancet* **2**, 780.
- Plug, J. and O. kieldgarrd (1957), Urokinase an activator from human urine. I. Isolation and proper ties, *Biochem. Biophys. ACTA* **61**, 624.
- Ruggeri, J. R. and T. S. Zimmerman (1985), Platelets and Willebrands disease, *Semin. Hematol.* **22**, 203-206.
- Sasaki, K., S. Moriyama, Y. Tanaka, H. Sumi, N. Toki, and K. C. Robbins (1985), The transport of ¹²⁵I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and release of plasminogen activators, *Blood* **66**, 69-75.
- Sumi, H. (1987), Development of nattokinase and healthy natto (in Japanese), *Bioindustry* **7**, 725-731.
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki (1987), A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet, *Experientia* **43**, 1110-1111.
- Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta, and H. Mrhara (1983), Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative, *Acta Haemat.* **70**, 289-295.
- Sumi, H., K. Sasaki, N. Toki, and K. C. Robbins (1980), Oral administration of urokinase, *Throm. Res.* **20**, 711-714.
- Sumi, H., M. Seiki, N. Morimoto, H. Tsushima, M. Moriyama, and H. Mihara (1985), Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats, *Enzyme* **33**, 122-127.
- Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha, and K. C. Robbins (1985), Transports of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.* **75**, 1212-1222.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon (1979) Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Yoo, C. K., W. S. Seo, C. S. Lee, and S. M. Kang (1998), Purification and characterization of fibrinolytic enzyme extracted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *chunggukgang*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 507-514.
- Korea National Statistical Office (2000), A study on cause of death for 1999.