Journal of Life Science **2009** Vol. 19. No. 2. 289~298 ©JLS / ISSN 1225-9918

Nattokinase fibrinol의 섭취가 혈전 용해능 및 동맥경화에 미치는 영향

노경희 · 박충무 · 장지현 · 신진혁 · 조미경 · 김정옥[1] · 송영선*

인제대학교 BK21 식의약생명공학과, 식품과학연구소 및 바이오헬스 소재 연구센터, [1](주)HK 바이오텍

Received February 4, 2009 / Accepted February 23, 2009

Effects of Nattokinase fibrinol supplementation on Fibrinolysis and Atherogenesis. Kyung-Hee Noh, Chong-Mu Park, Ji-Hyun Jang, Jin-Hyuk Shin, Mi-Kyung Cho, Jeong Ok Kim[1] and Young-Sun Song*. *BK21 Center of Smart Foods and Drugs, Food Science Institute, and Biohealth Product Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Republic of Korea, [1]HK Biotech Co., Ltd., Jinju 660-972, Republic of korea*
- Effects of Nattokinase fibrinol (NKF), defined as a fibrinolytic product, on fibrinolytic and atherogenetic markers were studied for healthy adults (20-31 years old), who is smoking more than 20 cigarettes per day. Subjects were divided into 29 for NKF group and 10 for placebo group in a short term study. They were given 2 tablets of NKF (4,000 unit) or placebo tablet and thereafter blood samples were collected at 0, 2, 4 hr prerid. For a 4-week long term study, 15 subjects for NFK group and 10 subjects for placebo group were supplemented one tablet of each NKF (2,000 unit) and placebo per day, respectively. Blood samples were collected at 0, 1, 2, 4 weeks later. The short-term experimental trial showed that NKF remarkably increased fibrinolytic activity at 2hr after consumption, which was maintained up to 4 hr, relative to that of placebo, while NKF reduced the euglobulin clot lysis time (ECLT) and retarded the activated partial thromboplastin time (aPTT), as compared to placebo group. NKF supplementation for 4 weeks elevated fibrinolytic activity, shortened ECLT and retarded aPTT. Furthermore, NKF supplementation increased anti-atherogenic index by decreasing triglyceride (TG) and elevating high-density lipiprotein (HDL)-cholesterol. These results indicate that NKF supplementation for short term or long term might have beneficial effects on preventing and treating cardiovascular disease by increasing fibrinolytic activity and improving atherogenic markers such as hyperlipidemia.

Key words : Nattokinase fibrinol (NKF), fibrinolysis, euglobulin clot lysis time (ECLT), activated partial thromboplastin time (aPTT), high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol

서 론

혈전증(thrombosis) 및 동맥경화증(artherosclerosis)은 과다한 혈소판 응집과 혈액응고 및 혈중 지질의 상호작용에 의해 발생하며 고혈압 및 흡연도 동맥경화의 위험인자로 알려져 있다. 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안 생성된 혈전은 즉시 분해된다[1]. 혈전은 생체에 상처가 생길 때 혈액 구성분인 fibrinogen이 thrombin에 의해 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성된다. 혈전이 정맥에서 생성되면 혈액순환장애가 야기되어 부종이나 염증이 발생하지만, 동맥에서 발생하면 허혈이나 경색을 유발하여 동맥경화, 심근경색증, 뇌졸중 및 폐동맥 색전증 등의 심혈관계 질환을 초래하게 된다[9,22-24]. 혈전증은 혈관에 혈전이 쌓여 혈액의 흐름을 방해하여 세포 성장 장애 및 기능 장애를 유발시켜 뇌경색, 심근경색 등 여러 형태의 성인병을 일으키는 주요 원인이다.

***Corresponding author**
Tel : +82-55-320-3235, Fax : +82-55-321-0691
E-mail : fdsnsong@inje.ac.kr

혈전형성을 방지하기 위해서는 항혈전제(anti-coagulants)가 필요하고 형성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전용해제(fibrin clot disintegrator)가 필요하다[23]. 혈전용해제는 혈전용해효소와 plasminogen activator (PA)로 분류된다. PA는 혈액 중의 plasminogen에 작용하여 plasmin을 생성하고, plasmin에는 urokinase (UK) [34], streptokinase [5,20], staphylokinase [20], nattokinase (NK) [28], tissue type plasminogen activator (tPA) [3] 등이 포함된다. 혈전성 질환의 예방과 치료에 heparin, qumarin, asprin UK 등의 항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제 등이 사용되고 있으나 고가일 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장해 및 과민성 반응, 비경구투여 등의 문제점으로 인해 사용이 한정되고 있다[10,17,26,28,36]. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근 *Bacillus* sp. 유래 혈전용해효소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

일본의 전통 *Bacillus subtilis natto* 대두발효식품 natto에는 혈전용해 효소인 NK가 함유되어 있다[27,28]. NK는 경구투여 시 혈전증 위험을 감소시키는 혈전용해능(fibrinolytic activity)이 있다는 보고[29-30]가 있어 현재 일본에서는 natto가 fibrinolytic activity을 지닌 건강식품으로서 판매량이 급

격히 증가하고 있다[4,7,15,19,33]. NK는 일종의 microbial serine protease로서 경구 투여 시 체내에 흡수되어 plasminogen activator로 작용하여 plasminogen을 plasmin으로 전환시키고, 이 plamin이 응고혈액의 fibrin을 용해시켜 fibrinolytic activity을 갖는다[12,28,37,38]. NK는 *in vitro*에서 직접적으로 closs-linked fibrin을 분해 할 뿐 아니라 tPA 생성을 촉진하며 tPA의 상대적 비에 의해 총 혈전용해능을 조절하고 혈전용해(fibrin clot lysis)의 1차 저해제인 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 불활성과 분해를 통하여 혈전용해를 강화시킨다[8,35]. 일본에서는 1,000년 이상 NK가 함유된 natto를 식품으로 상용해 왔고, 독성에 관한 보고가 없고, 경구투여의 편리성, 효력의 확인, 지속적인 효과 및 비용을 포함하여 많은 유익함이 있어 예방의 차원에서 사용할 수 있다[31]. 그러나 삶은 대두에 *Bacillus* sp.를 접종하고 고체배양하여 NK를 생성시키는 일본의 재래적인 발효방법은 fibrinolytic activity를 일정하게 조절할 수 없을 뿐만 아니라 NK 이외의 다른 성분을 많이 함유하고 있어 1일 권장 섭취량이 200 g으로 섭취에 있어 편이성이 떨어진다. 또한, 짧은 유통기한 때문에 생산자, 유통, 소비자가 불편하다.

본 연구에서는 natto균을 액체배양 한 후 여과 농축한 것을 신령버섯균사체 액체배양 추출물과 혼합하여 분말화한 다음, 섭취가 편리하도록 이를 정제화하여 나토키나제 피브리놀(Nattokinase fibrinol; NKF)을 제조하였다. 흡연을 하는 건강한 성인을 대상으로 NKF를 1회만 경구섭취 하는 단기실험과 4주간 매일 섭취하는 장기시험으로 구분하여 NKF의 fibrinolytic activity와 동맥경화 개선효과를 연구하였다.

재료 및 방법

재료

Natto 균(*B. subtilis natto*: KCCM12027)은 Korean Culture Center of Microoganisms (KCCM) (Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 난소화성 말토덱스트린은 대상(주)(한국)에서 구입하였다. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid (HEPES), thrombin 및 fibrinogen은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Prothrombin time (PT)와 activated partial thromboplastin time (aPTT) 분석 진단 kit는 Fisher Diagnostics (Pacific Hematosis, VA, USA)로부터 구입하였고, triglyceride (TG), total cholesterol 및 HDL-cholesterol 분석 kit는 영동제약(Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 그 외 사용 된 시약은 reagent급 이상이었다.

NKF 시료

NKF 시료는 (주)HK바이오텍에서 제조하였다. 탈지대두분 5%와 말토오스 1%를 함유하는 살균된 액체배지(121°C, 1시간)에 *B. subtilis natto*를 5 l 용 배양기(Kobiotech, Co., Inchen, Korea)에서 24시간 배양(30°C)하여 여과한 후 농축하였다. 이 농축물에 신령버섯균사체 액체배양 추출 농축액(Brix 30)을 1% (w/w) 비율로 혼합한 다음. 이들 혼합물에 난소화성 말토덱스트린을 혼합하여 고형분이 35%가 되도록 조정 한 다음 spray dry하였다. 분말의 혈전용해효소 활성을 Astrup과 Mullertz의 fibrin plate 방법[2]으로 분석한 결과 15,000 U/g이었다. Placebo와 NKF 정제 조제를 위한 조성은 Table 1에서 보는 바와 같이, NKF 함량은 133.4 mg으로 1일 섭취기준 인 2,000 U/g 이었고 placebo는 NKF 대신 유당을 205.8 mg을 혼합하였다.

대상자 선정 및 연구 설계

임상 대상자는 20세~31세의 건강한 성인으로 흡연량이 최소 하루 20개피 이상 또는 하지정맥류가 있는 사람으로 고혈압 또는 혈전증으로 복약하지 않는 사람을 선정하여 무작위로 대상자를 분류하여 이중맹검 임상시험으로 실시하였다. 시험시작 1주전 대상자들에게 시험의 내용, 중요성 및 시험 과정에서의 주의점 등을 숙지시켰고 대조군(placebo군)과 실험군(NKF군)으로 구분하여 NKF와 placebo를 대상자들에게 섭취시켰다.

단기시험에는 39명을 대상(placebo군 10명과 NKF군 29)자로 선정하였다(Table 2). 체질량지수인 body mass index (BMI)는 평균 22.9로 정상이었고 하루 평균 흡연량은 placebo군이 35.8개피, NKF군이 34.6개피였다. 하지정맥류를 가진 대상자는 placebo 군에는 포함되어 있지 않았지만, NKF군에 2명(6.9%)이 포함되어 있었다. NKF군 개인은 2 개 정제(NKF 4,000 U)를 섭취하였고, placebo군 개개인은 2개의 placebo를 섭취한 다음, 0, 2, 4시간 후에 혈액을 취하여 NKF의 fibrinolytic activity를 측정하였다.

장기시험에는 25명을 대상으로 placebo군 10명과 NKF군 15명을 선정하여 이들은 NKF 또는 placebo 정제를 매일 1개

Table 1. Ingredient compositions for tablet samples used in clinical trials

Ingredient	Placebo (mg)	NKF (mg)
NKF[1)]	-	133.4[2)]
Lactose	205.8	72.4
Sucrose fatty acid ester	0.7	0.7
Silica (SiO_2)	0.7	0.7
Magnesium stearate	0.7	0.7
Hydroxypropylene methylcellulose	2.1	2.1
Total	210	210

[1)]Nattokinase fibrinol.
[2)]The fibrinolytic activity is 2,000 U as calculated from NKF with 15,000 U/g fibrilolytic activity.

Table 2. General characteristic of subjects for a short-term experimental trial

Characteristics	Placebo group (n=10)	NKF group (n=29)
Age (year)	25.6±0.5[1)]	24.5±0.5
Height (cm)	175.0±1.4	174.9±1.0
Weight (kg)	70.3±2.5	70.1±1.5
BMI[2)] (kg/m^2)	22.9±0.6	22.9±0.4
Smoking (piece/day)	35.8±1.4	34.6±1.1
Varicose vein (%)	0	6.9

[1)]Mean±SE of individuals involved in each treatment group.
[2)]MBI stands for the body mass index.
No significance was seen between means of placebo and NKF groups by Student's *t*-test.

Table 3. General characteristics of subjects for a long-term experimental trial

Characteristics		Placebo group (n=10)	NKF group (n=15)
Age (year)		25.1±0.5[1)]	25.7±0.5
Height (cm)		175.6±1.7	172.6±1.9
Weight (kg)		70.7±1.6	72.7±3.1
BMI[2)] (kg/m^2)		22.9±0.2	24.3±0.8
Smoking	Quantity (piece/day)	34.6±2.0	30.4±2.1
	Starting age (year)	18.6±0.8	19.7±1.0
	Period (year)	6.50±0.9	6.00±0.8
Varicose vein (%)		0	13.3
Hypertension (%)		10	13.3
Regular exercise (%)		13.3	12.0

[1)]Mean±SE of individual involved in each treatment group.
[2)]MBI stands for the body mass index.
No significance was seen between means of placebo and NKF groups by Student's *t*-test.

씩 4주간 식사 1시간 후에 섭취하였다(Table 3). 이들의 BMI는 22.9~24.3으로 두 군 모두 정상 수준이었다. 하루 평균 흡연량은 placebo군이 34.6개피, NKF군이 30.4개피 였으며, 흡연기간은 placebo군이 6.5년, NKF군이 6.0년으로 유사한 수준이었다. 또한 하지정맥류를 가진 대상자는 NKF군이 2명(13.3%), 고혈압을 가진 사람은 placebo군이 1명(10%), NKF군은 2명(13.3%)을 포함하고 있었다. NKF 섭취 전과와 섭취 후 1주, 2주, 4주 후에 신체계측과 혈압 측정, 혈장의 fibrinolytic activity 및 지질수준을 분석하였다.

신체 계측

신체 계측은 Inbody 3.0 (Biospace, Korea)을 사용하여 신장, 체중 및 BMI를 측정하였다. 혈압은 혈압계(Jawon medical Co. Ltd., FT700, Korea)를 사용하여 측정하였다.

혈액 채취

혈액은 sodium citrate가 처리된 혈액채취 tube에 채취하여 원심분리(750× *g*, 15분)한 후 혈장을 취하였다. 혈장은 fibrinolytic activity 및 지질개선 효과분석 시료로 사용하였다.

Fibrin clot lysis assay

Fibrin clot lysis는 Zhang 등의 방법[39]을 수정하여 측정하였다. 즉, 50 µl HEPES-buffered saline (HBS; 0.01 M HEPES, 0.13 M NaCl, pH 7.4)과 10 µl NIH 6U thrombin/ml, 20 µl의 100 mM $CaCl_2$를 혼합한 후 20 µl의 10 mg fibrinogen/ml 을 넣어 clot을 제조하였다. 15분 실온에서 fibrin clot이 완전히 굳어지면, 여기에 시료 혈장 50 µl와 동일한 부피의 HBS를 혼합하여 fibrin clot에 첨가하고 12시간 동안 실온에서 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Euglobulin clot lysis time (ECLT)

시료의 ECLT는 Smith 등의 방법[25]을 이용하여 측정하였다. 즉, 50 µl 혈장을 0.9 ml의 0.017% acetic acid와 혼합하여 20분 동안 ice에서 incubation하였다. 이것을 4°C에서 원심분리(2,000× *g*, 15분)하여 얻은 침전물(euglobulin fraction)을 55 µl의 resuspension buffer (pH 9.0. 154 mM NaCl, 2.6 mM sodium borate)로 재 부유하였다. 이 부유물 전체를 96 microtiter assay plate에 pipetting 한 후 50 µl의 25 mM $CaCl_2$와 혼합하여 euglobulin clot을 제조하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 5분 간격으로 12시간 측정하였다.

항 응고활성 측정

외인성 경로에 기인하는 항 응고활성은 PT로, 내인성 혈액응고 과정의 항 응고활성은 aPTT로 측정하였다[17]. PT는 혈장 100 µl를 37°C에서 3분간 예열한 다음, 37°C에서 미리 예열된 PT 진단시약 200 µl를 가한 후 blood coagulation analyzer (BehNKF Elektronik Coagulator, Germany)로 3회 반복 실시하여 평균 응고시간을 측정하였다. aPTT는 혈장 100 µl에 aPTT 진단시약 100 µl를 혼합하여 37°C에서 3분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20 mM $CaCl_2$ 100 µl를 가한 후 blood coagulation analyzer (BehNKF Elektronik Coagulator, Germany)로 3회 반복 실시하여 평균 응고시간을 측정하였다.

지질 수준

혈장의 TG, total cholesterol 및 HDL-cholesterol은 각각의 영동제약 분석 kit를 사용하여 분석하였다.

식이섭취 및 설문조사

식이섭취조사는 각 대상자들의 평상시 영양소 섭취 수준을

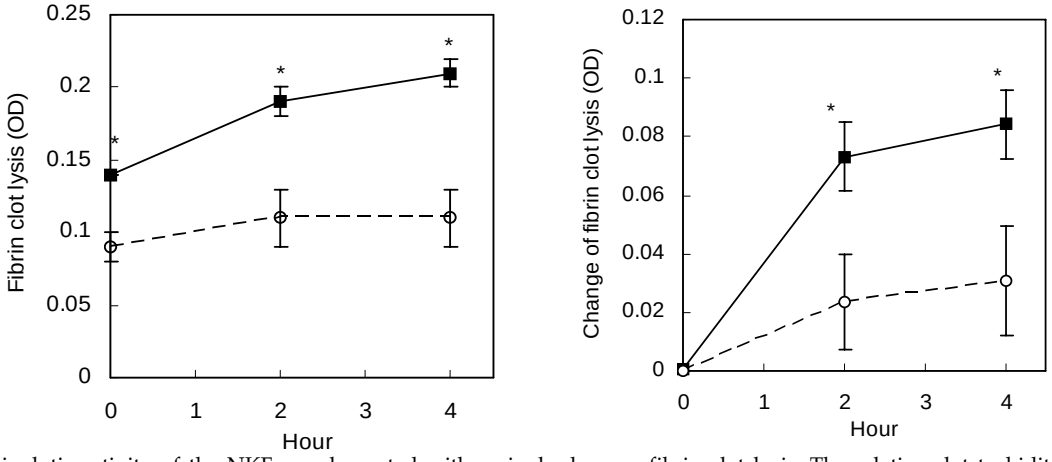

Fig. 1. Fibrinolytic activity of the NKF supplemented with a single dose on fibrin clot lysis. The relative clot turbidity was calculated by measuring the decrease of the absorbance at 405 nm for 12 hr. Bar represents standard error of mean value. Line identification: -○-, placebo group; and -■-, NKF group. * represents a significance at $p<0.05$ between placebo and NKF groups at the same period of time.

확인하기 위하여 대상자들에게 3일간의 식사 기록법을 작성하도록 하였으며 영양소 섭취 수준은 Can pro 3.0 (한국영양학회)을 사용하여 총 에너지 섭취량, 탄수화물과 단백질 및 지방의 총 에너지에 대한 섭취 비율, Na와 cholesterol 섭취 수준을 분석하여 1일 평균 섭취량으로 제시하였다. 대상자들의 흡연에 관련된 일상적인 질문은 설문지를 통하여 실시하였다.

통계 분석

통계 처리는 SPSS PC$^+$ program (Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용하여 분석하였으며 모든 실험결과는 Mean±SE로 표시하였고 두 군 간에 유의성은 $p<0.05$ 수준에서 Student *t*-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

단기 시험

Fibrin clot lysis에 미치는 영향

NKF 4,000 U를 1회 섭취한 대상자 혈장의 fibrin clot lysis 정도는 placebo를 섭취한 대상자 혈장보다 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1). NKF군에서는 placebo군에 비해 fibrin clot 용해능이 유의성 있게 증가하였다. Fibrin clot 용해는 NKF 섭취 후 4시간까지 그 활성이 증가하였지만 placebo는 섭취 전 후에 현저한 차이가 없었다. Sumi 등[28]은 개를 이용한 전임상시험에서 대퇴정맥에 혈전을 유도한 후 NK 1,000 mg을 함유한 capsule을 4개씩 경구 투여했을 때 NK를 섭취 군에서는 투여 5시간 내에 혈전이 완전히 용해되어 정상적인 혈액 순환으로 회복되었으나, placebo군에서는 혈전용해 효과가 투여 18시간 후에도 관찰되지 않아 NK가 효과적으로 혈전을 용해시키는 것으로 보고하였다. 본 연구의 결과는 Sumi 등[28]의 연구결과와 일치하는 것으로 NKF의 섭취가 fibrin clot을 용해시켜 혈전을 분해하여 혈액순환을 도와 줄 것으로 사료된다.

ECLT에 미치는 영향

Fig. 2.는 NKF 섭취 대상자로부터 얻은 혈청시료의 euglobulin clot lysis 과정을 12시간 405 nm에서 흡광도 감소를 추적한 결과를 보여준다. 이 그림에서 405 nm에서 흡광도가 더 이상 감소하지 않는 시간을 임계시간(critical time)으로 계산하여 혈청의 ECLT를 계산하였다. NKF를 섭취한 대상자들의 ECLT를 측정한 결과 ECLT는 placebo를 섭취한 대상자보다 유의성 있게 짧았다(Fig. 3). 이 효과는 섭취 후 4시간까지 유지되었다. ECLT는 fibrinolytic activity를 검색할 때 사용하는 방법으로 혈장에서 α^2-plasmin inhibitor와 같은 주

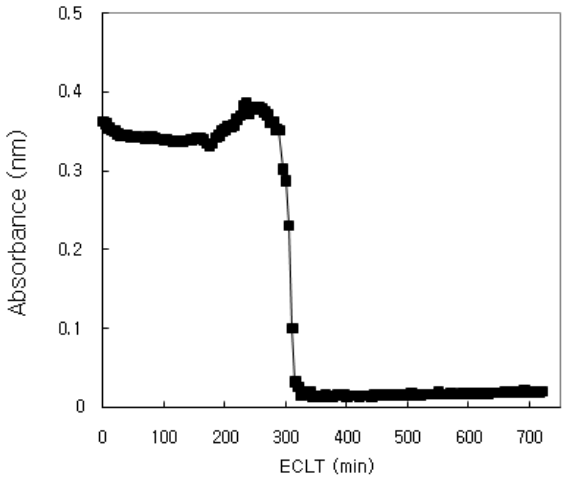

Fig. 2. Spectrophotometric tracing of euglobulin clot formation and lysis. Lysis time was defined as the time at which the curve, corrected for the individual blank, reached at 0.05 or less of absorbance at 405 nm.

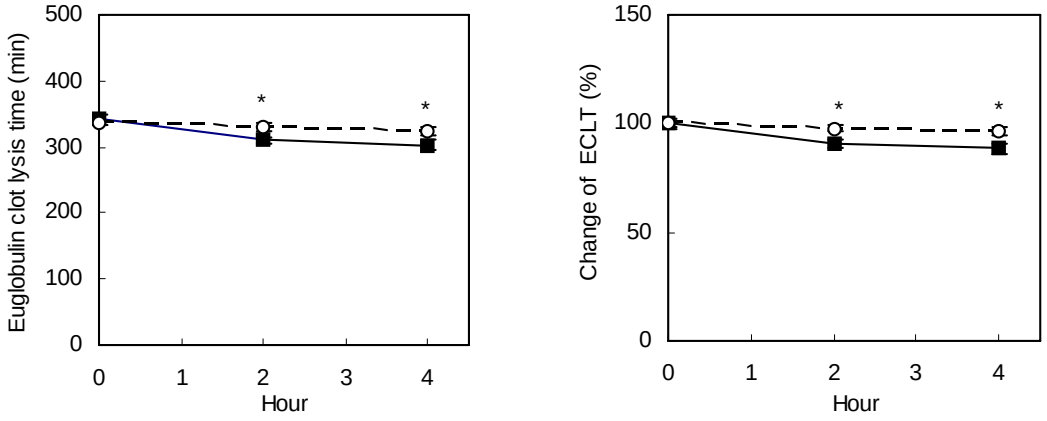

Fig. 3. Fibrinolytic activity of the NKF supplemented with a single dose on euglobulin clot lysis time. Lysis time was defined as the time at which the curve, corrected for the individual blank, reached an absorbance of 0.05 or less. Bar represents standard error of mean value. Line identification: -○-, placebo group; and -■-, NKF group. * represents a significance at $p<0.05$ between placebo and NKF groups at the same period of time.

요 항 혈전용해물질을 제거하여 euglobulin 분획을 추출하고 이것을 응고시켜 처리시료가 이 응고를 용해시키는데 소요되는 시간을 측정하는 방법이다[17,25]. Euglobulin 분획에는 plasminogen이나 plasmin, fibrinogen, PA 및 기타 응혈인자가 있으나, anti-plasmin은 함유되어있지 않으며, euglobulin 분획에 Ca^{2+}을 첨가하여 fibrin clot을 형성시키고 incubation 하면 PA가 plasminogen으로부터 plasmin 전환을 촉진하여 fibrin clot을 용해시키는 원리이다[17]. 따라서 NKF의 섭취가 PA를 활성화시켜 ECLT를 감소시킴으로써 fibrinolytic activity 증가시키는 것으로 보인다.

PT와 aPTT에 미치는 영향

NKF와 placebo 섭취에 의한 PT와 aPTT를 측정한 결과는 Table 4서 보는 바와 같다. 섭취 후 시간 경과에 따른 PT 변화는 두 처리에 볼 수 없었으며, 두 처리군 간에서도 볼 수 없었다. aPTT는 placebo군에서는 시간 경과에 따른 혈액응고 시간이 단축되어 섭취 후 4시에는 31.0초로 섭취 전에 비해 10.7% 감소되었으나 NKF군에서는 36.0초로 섭취 전에 비해 12.5% 증가하여 placebo군에 비해 유의성 있게 혈액응고 시간을 지연시켰다. 따라서 NKF 섭취는 혈액응고 시간을 지연시켜 혈전형성을 저해하였다.

장기 시험

식이섭취 수준

대상자들의 3일 간의 식사 기록으로 분석한 1일 총 에너지섭취량, 탄수화물과 단백질 및 지질의 에너지 섭취비율과 Na, cholesterol 및 식이섬유 섭취 수준은 Table 5에서 보는 바와 같다. 총 섭취 에너지에 대한 탄수화물의 섭취 비와 식이섬유의 섭취량은 placebo군에서 57.7%와 23.6 g으로 NKF군의 54.3%와 21.3 g 보다 다소 높은 수준이었으나 두 군간 유의성은 없었다. 총 에너지섭취량, 총에너지 섭취에 대한 단백질과 지방 섭취 비율 및 Na과 cholesterol 섭취량은 placebo군에 비해 NKF군에서 다소 높았으나 유의차는 없었다.

혈압개선에 미치는 효과

Table 6에서는 4주간 NKF의 협압개선 효과를 나타내고

Table 4. Anticoagulant effects of NKF supplemented with a single dose on prothrombin time and activated partial thromboplastin time

Anti-coagulant type	Treatment time (hr)	Placebo group (n=10)		NKF group (n=29)	
		Time (sec)	%[2)]	Time (sec)	%
PT	0	11.5±0.3[3)]	100	11.8±0.2	100
	2	11.5±0.2	99.6±1.8	11.9±0.3	100.5±1.6
	4	11.5±0.2	99.8±2.3	11.9±0.2	100.6±1.3
aPTT	0	34.7±2.2	(100)	32.0±1.5	100
	2	34.0±2.4	97.9±4.7	32.1±1.6	100.4±1.7
	4	31.0±1.7	89.3±4.7	36.0±1.9	112.5±2.0*

[1)]PT and aPTT represent prothrombin time and activated partial thromboplastin time, respectively.
[2)]% against 0 measurement time. [3)]Mean±SE.
* represents a significance at $p<0.05$ between placebo and NKF groups at same treatment time y Student's *t*-test.

Table 5. Daily nutrient intakes of subjects involved in the long-term study

Daily intake		Placebo group (n=10)	NKF group (n=15)
Total calorie (kcal)		2,608.4±87.4[1)]	2,641.5±63.8
Percentage against total calorie	Carbohydrate	57.7±2.7	54.3±3.1
	Protein	14.9±0.9	16.9±1.1
	Fat	26.7±1.4	29.1±1.0
Na (mg)		5,660.0±429.9	6,316.6±427.3
Cholesterol (mg)		522.6±80.3	558.6±39.2
Dietary fiber (g)		23.6±3.0	21.3±1.5

[1)]Mean±SE.
No significance was seen between means of placebo and NKF groups by Student's *t*-test.

Table 6. Effect of NKF supplementation on systolic and diastolic blood pressures

Blood pressure	Week	Placebo group (n=10)		NKF group (n=15)	
		mmHg	%	mmHg	%
Systolic	0	127.0±2.50[1)]	100[2)]	133.2±2.5	100
	1	127.8±1.4	100.6±2.4	132.7±2.4	99.6±1.2
	2	127.2±2.3	100.2±2.3	128.5±3.1	96.5±2.7
	4	130.6±2.5	102.8±3.3	131.5±2.9	98.7±1.9
Diastolic	0	75.1±2.5	100	78.5±1.2	100
	1	75.3±1.3	100.3±1.9	78.2±1.3	99.6±1.9
	2	76.2±2.5	101.5±3.6	77.4±2.2	98.6±2.5
	4	77.7±2.5	103.5±4.4	77.7±1.9	99.0±2.7

[1)]Mean±SE.
[2)]% against 0 measurement time.
No significance was seen between means of placebo and NKF groups by Student's *t*-test.

있다. 4주간의 수축기 혈압변화는 placebo 섭취 후 2주에 127.2 mmHg로 섭취 전 127.0 mmHg과 유사하였으나 NKF는 섭취 전 133.2 mmHg에서 섭취 후 2주에 128.5 mmHg로 3.5% 감소되었으나 두 군 간 유의차는 보이지 않았다. 섭취 후 4주에는 placebo군에서 130.6 mmHg로 섭취 전인 127.0 mmHg에 비해 2.8% 증가한 반면 NKF군에서는 131.5 mmHg로 1.3%로 섭취 전에 비해 다소 증가하였으나 두 군 간 유의차는 없었다. 이완기 혈압은 두 군 모두에서 큰 변화는 없었으나 placebo군이 75.1 mmHg에서 섭취 후 4주에 77.7 mmHg으로 3.5% 증가 한 반면 NKF군에서는 78.5 mmHg에서 섭취 후 4주에 77.7 mmHg로 다소 감소하였지만 유의차는 없어 NKF는 다소의 혈압개선효과 있었지만, 유의성은 없었다.

Kim 등[13]은 20~80세의 수축기 혈압이 130~159 mmHg인 성인 86명을 대상으로 8주간 NK 2,000 FU/capsule을 섭취시켰을 때 수축기와 이완기 혈압이 저하되어 섭취 8주에는 placebo군에 비해 유의적으로 감소되었다고 보고하였다. 또한 Maruyama 등[21]도 전임상과 임상시험에서 NK를 경구투여 하였을 때 수축기와 이완기 혈압을 각각 10.9%와 9.7%를 감소시켰다고 보고하였다. Natto 200 g과 동일한 양인 natto 추출물 30 g을 고혈압 대상자에게 4일간 연속적으로 섭취시킨 후 혈압은 대상자 6명 중 5명의 수축기 혈압이 평균 173.8 mmHg에서 154.8 mmHg으로, 이완기 혈압은 평균 101.0 mmHg에서 91.2 mmHg로 감소되어 평균 수축추기 혈압은 10.9%, 이완기 혈압은 9.7% 저하되었다[21]. NK는 같은 심혈관질환의 위험인자인 fibrin이 높은 조건에서 종종 증가된 혈압을 유의적으로 감소시키는 유익한 효과가 있었다는 보고가 있다[17]. 이와 같은 NK의 혈압개선효과는 여러 가지 요인이 작용하겠지만 전임상과 임상시험을 통해 연구한 결과에 의하면 혈관을 수축시켜 혈압을 상승시키는 인자인 angiotensin converting enzyme (ACE)를 저해하여 혈압을 저하시키는 것으로 밝혀졌다[21]. NK의 혈압 강하와 관련된 여러 연구들은 고혈압 사람을 대상자로 선정하였으나 본 연구의 대상자들은 대부분 정상 수준의 혈압을 유지하는 사람들로 NKF의 혈압개선 효과에 대한 유의적인 차이는 없었으나 이들이 NK를 장기 섭취하거나 고혈압 대상자에 투여할 경우 수축기와 이완기 혈압을 저하시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Fibrin clot lysis에 미치는 영향

4주간 NKF 섭취에 따른 fibrin clot 용해능은 Fig. 4에서 보는 바와 같다. NKF의 fibrin clot 용해능은 섭취기간 중 placebo군에 비해 유의성 있게 증가하였다. NKF군의 fibrin clot 용해능은 섭취 후 1주에 증가하여 4주까지 거의 동일한 수준으로 혈전용해 활성이 유지됨을 알 수 있었으나 placebo 섭취는 그러하지 못하여 NKF의 효과를 볼 수 있었다. Sumi 등[28]은 임상연구에서 21~55세의 남녀 각각 6명씩 건강한 12명의 일본인에게 공복 시 200 g의 natto cheese를 섭취도록 한 후, 혈장의 혈전용해 능이 2~8시간까지 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다. Natto 첨가 식이는 쥐 대퇴부 동맥 상피조직의 손상 후에 혈관내막이 두꺼워지는 것을 억제하고, 혈관벽의 혈전분해를 조정할 수 있었다[32]. Fujita 등[6]은 초산으로 쥐의 경동맥에 상처를 낸 혈관 벽의 상피세포 혈전에 대한 혈전용해 효과에 관한 연구에서 NK는 동맥의 혈액 흐름을 62%, plasmin은 15.8% 회복시켰으나, elastase는 회복시키지 않아 *in vivo*에서 NK의 혈전 용해능이 plasmin이나 elastase보다 더 강하였다고 보고하였다. NK 투여는 혈전용해 능력이 향상시키는 것으로 확인되었으며 이러한 연구들은 본 연구의 결과와 일치하였다.

NK의 섬유소용해능 증진은 내막 비대를 억제하여 혈관 내 혈전을 급속히 제거하는 데 중요한 역할[31]을 하기 때문에, NKF는 혈관 내 혈전을 제거하여 탄력적인 혈관으로 되돌릴 수 있을 것으로 보이며 동맥경화 등을 예방 및 치료 효과를 가질 수 있을 것으로 사료된다. NK는 혈액 단백질인 fibrin을 분해하는 매우 강력한 혈전용해효소이며, 여러 다른

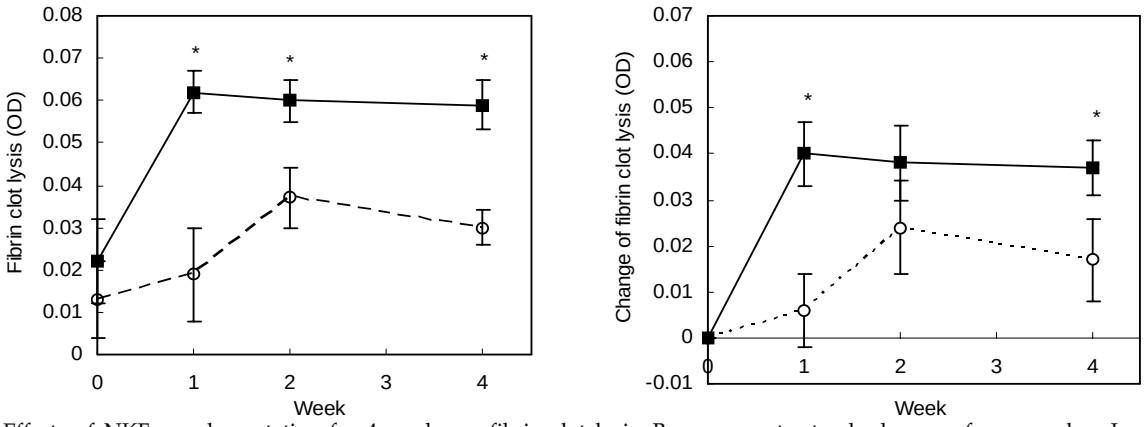

Fig. 4. Effects of NKF supplementation for 4 weeks on fibrin clot lysis. Bar represents standard error of mean value. Lysis time is defined as the time at which the curve, corrected for the individual blank, reached an absorbance of 0.05 or less. Line identification: -○-, placebo group; and -■-, NKF group. * represents a significance at $p<0.05$ between placebo and NKF groups at the same period of time.

대사효소를 활성화하고 조절 가능성과 혈전형성에 영향을 미치는 뚜렷한 작용을 나타낸다. 또한 NK는 경구섭취가 효과적이고 효과가 오랜 시간 지속되며 기준 섭취량은 250~1,000 mg으로 다양하며 긍정적인 효과는 50 mg 정도라는 보고도 있다[30]. 따라서, 본 연구에서 사용한 NKF 2,000 U는 혈전용해 개선효과를 나타내기에 충분할 것으로 사료된다.

ECLT에 미치는 영향

NKF 4주간의 섭취는 euglobulin clot을 용해하는 효과가 있었다(Fig. 5). NKF군에서의 ECLT의 변화량은 섭취 후 1주, 2주, 4주에 placebo군에 비해 유의적으로 낮은 수준이었다. Placebo군은 섭취 후 4주간 유사한 수준인 반면 NKF군에서는 섭취 후 1주에 ECLT가 섭취 전에 비해 감소하여 섭취 후 4주까지 낮은 수준으로 유지되었다. Suzuki 등[31]은 쥐 상피조직에 상처를 만들어 3주간 NK 100,0000 CU를 함유한 natto 추출물을 투여한 natto군의 ECLT은 366분으로 대조군 639분보다 현저히 감소되었다고 보고하였다. 본 연구의 결과도 이러한 보고와 유사하였다.

경구 투여한 NK는 상피세포 및 간으로부터 tPA의 수준을 증가시켰으며 NF는 내인성 pro-UK를 활성화시킬 뿐 아니라 직접 fibrin을 분해할 수 있다. 따라서 본연구의 NKF도 tPA를 활성화시켜 plasminogen을 plasmin으로 전환하여 fibrin clot을 용해시켜 ECLT을 감소시킴으로써 혈전 용해능을 증가시키는 것으로 사료된다.

PT와 aPTT에 미치는 영향

Thromboplastin은 혈액응고 인자 Xa와 Va의 존재 하에서 prothrombin을 thrombin으로 전환시키며 thrombin은 fibrin clot을 형성시킬 뿐 아니라 혈소판응집 촉진물질인 thromboxane A_2의 생성을 촉진시킨다[16]. 따라서 시료의 혈액응고 시간인 PT와 aPTT를 측정하여 항 혈전 효과를 추정할 수 있다. 본 연구에서는 4주간의 NKF 보충이 PT와 aPTT에 미

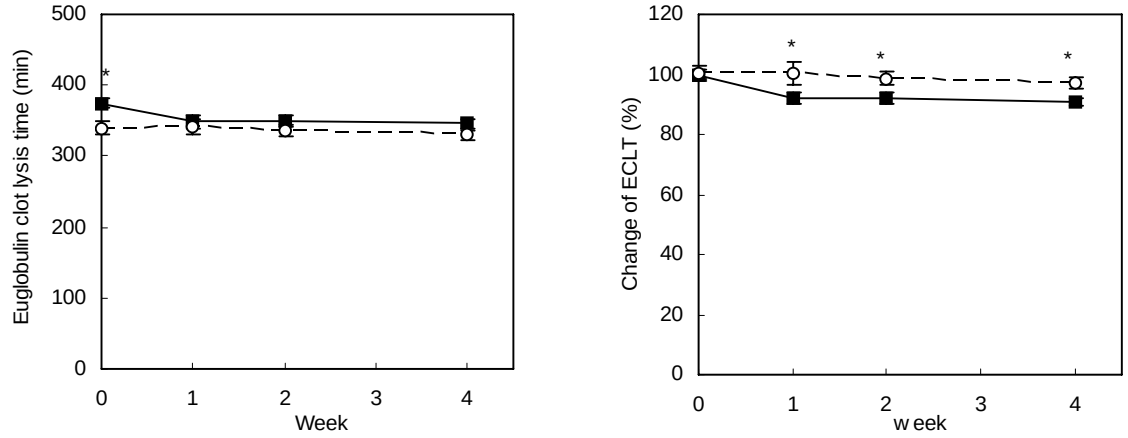

Fig. 5. Fibrinolytic activity of NKF supplementation for 4 weeks on euglobulin clot lysis time. Lysis time was defined as the time at which the curve, corrected for the individual blank, reached an absorbance of 0.05 or less. Bar represents standard error of mean value. Line identification: -○-, placebo group; and -■-, NKF group. * represents a significance at $p<0.05$ between placebo and NKF groups at same treatment time.

Table 7. Anticoagulant activity of NKF supplementation on prothrombin time and activated partial thromboplastin time

Parameter[1]	Week	Placebo group (n=10)		NKF group (n=15)	
		Time (sec)	%	Time (sec)	%
PT	0	11.2±0.2[2]	100[3]	10.6±0.1*	100
	1	11.1±0.2	99.1±1.3	10.7±0.1*	100.9±1.0
	2	11.0±0.2	98.2±1.7	10.9±0.1	102.8±1.1
	4	10.6±0.1	94.3±2.3	10.6±0.1	100.1±2.4*
aPTT	0	33.9±1.3	100	28.8±1.0*	100
	1	33.6±1.4	99.2±1.8	29.3±0.9*	101.2±4.0
	2	31.2±2.7	92.0±5.6	29.9±1.5	103.8±7.1
	4	29.5±0.7	87.0±1.6	29.2±0.4	101.7±4.3*

[1]PT and aPTT represent prothrombin time and activated partial thromboplastin time, respectively.
[2]Mean±SE.
[3]% against 0 measurement time.
*represents a significance at $p<0.05$ between placebo and NKF groups at same treatment time by Student's *t*-test.

치는 효과를 측정하였다(Table 7). Placebo군에서의 PT는 섭취 전 11.2초이었으나 섭취 후 4주에는 10.6초로 나타났다. NKF군에서는 섭취 전 10.6초였으며 섭취 후 4주에도 10.6초로 나타나 큰 변화는 없었으나, 섭취 후 4주에 placebo군이 섭취 전에 비해 94.3%로 감소되었고, NKF군은 100.1%로 다소 증가하여 두 처리 간에는 유의차가 있었다. aPTT는 placebo 섭취 전 33.9초에서 섭취 후 4주에 29.5초로 13% 감소하였다. 그러나 NKF는 섭취 전에는 28.8초이었으나 섭취 후 4주에는 29.2초로 1.7% 증가하여 4주 변화량은 두 처리군 간에 유의차가 있었다. 따라서, 본 연구 결과는 NKF가 PT와 aPTT를 지연시켜 fibrin clot의 형성을 억제하였다.

혈장 지질 수준에 미치는 영향

NKF 섭취가 대상자들의 혈장 지질 수준에 미치는 영향은 Table 8에서 보는 바와 같다. TG 수준은 placebo처리는 4주까지 TG를 증가시키는 반면 NKF는 감소시키는 경향이었다. TG의 변화량은 2주와 4주에 두 군 간에 유의차를 보였으며 NKF가 TG 수준을 감소시켰다. 혈장 total cholesterol 수준은 두 처리 모두 유사한 수준으로 증가하였으며 변화량은 섭취 후 4주에 NKF처리가 다소 높았으나 큰 차이는 없어 NKF가 혈장의 total cholesterol 수준에는 크게 영향을 미치지 않다. Placebo 섭취는 혈장 HDL-cholesterol을 섭취 후 2주까지는 섭취 전에 비해 다소 감소시킨 후 4주에는 증가하는 경향을 보였으며 NKF 섭취에 의해 1주까지는 섭취 전과 유사한 수준이었으나 2주 후부터는 증가하는 경향이었다. HDL-cholesterol 변화량은 섭취 후 2주와 4주에 placebo 섭취에 비해 NKF 섭취에 의해 현저하게 증가하는 것으로 나타나 NKF가

Table 8. Effects of NKF supplementation on lipid constituents and anti-atherogenic index

Lipid constituent in plasma	Week	Placebo group (n=10)		NKF group (n=15)	
		Value	%	Value	%
Total glyceride (mg/dl)	0	102.6±5.4[1]	0[2]	110.3±5.3	0
	1	104.3±6.5	1.67±3.1	107.0±4.0	-3.40±4.2
	2	108.0±6.3	5.35±3.2	105.3±5.1	-5.02±1.6*
	4	110.1±4.4	7.53±2.3	104.8±6.2	-5.54±2.3*
Total cholesterol (mg/dl)	0	130.1±10.8	0	130.1±7.0	0
	1	130.6±8.1	0.58±0.1	130.76±4.7	1.73±1.1
	2	136.5±4.5	6.44±2.6	136.3±3.4	7.33±3.8
	4	136.1±6.4	6.01±3.7	137.1±7.3	8.11±3.6
HDL-cholesterol (mg/dl)	0	52.7±1.7	0	50.4±2.5	0
	1	50.1±1.8	-2.58±1.4	50.7±1.6	0.29±1.2
	2	50.4±2.1	-2.29±0.3	53.4±2.7	2.50±0.9*
	4	57.6±1.7	4.87±0.9	60.0±2.1	9.60±1.1*
Total glyceride/HDL-cholesterol	0	1.96±0.10	0	2.32±0.16	0
	1	2.07±0.15	0.09±0.04	2.11±0.07	-0.08±0.11
	2	2.03±0.12	0.10±0.11	2.06±0.14	-0.25±0.11*
	4	2.24±0.10	0.27±0.08	2.20±0.07	-0.07±0.23
Anti-atherogenic index[3]	0	0.42±0.03	0	0.39±0.02	0
	1	0.40±0.02	-0.01±0.02	0.38±0.01	-0.00±0.01
	2	0.39±0.02	-0.02±0.036	0.38±0.02	0.01±0.03
	4	0.39±0.02	-0.02±0.01	0.40±0.11	0.04±0.01*

[1]Mean±SE. [2]% against 0 measurement time. [3]HDL-cholesterol/total cholesterol.
*represents a significance at $p<0.05$ between placebo and NKF groups at same treatment time by Student's *t*-test.

혈 중 HDL-cholesterol을 증가시키는 것으로 사료된다.

혈청의 TG는 동맥경화 발생의 주요 원인이 되며 TG/HDL-cholesterol이 증가하면 할수록 동맥경화의 위험이 증가한다[16]. 따라서 본 연구에서는 NKF 섭취 기간이 경과 할수록 TG/HDL-cholesterol이 감소되었고, placebo 섭취는 오히려 다소 증가하였다. TG/HDL-cholesterol의 변화는 NKF 섭취 후 2주에 placebo 섭취에 비해 유의적으로 감소되었으나 4주에는 유의차를 보이지 않았다. 항동맥경화 지수에서는 placebo군에서는 섭취 기간이 경과할수록 다소 감소하는 반면 NKF를 섭취한 군에서는 증가하여 섭취 후 4주에는 NKF군에서 유의성 있게 높은 수준으로 나타났다. 우리나라에서도 natto와 같이 콩을 원료로 하여 발효시킨 전통식품인 청국장, 된장, 젓갈, 김치 등에서 혈전용해작용이 우수함이 보고[11,14,18]되어, 본태성 고혈압 대상자에게 청국장 분말을 단백질원으로 48.7% 첨가한 청국장, 콩 단백질 55.4%를 첨가한 콩, 카세인 20%를 첨가한 대조를 7주 섭취 시켰을 때 혈장의 TG 농도는 청국장 처리가 콩 처리에 비해 유의적인 차이는 없었으나 가장 낮은 수준을 유지하였고, total cholesterol 함량은 각 처리 간에 유의차는 없었다. 또한 카세인 처리에 비해 콩과 청국장 처리가 HDL-cholesterol을 유의적으로 높였으며, LDL-cholesterol은 유의적으로 낮추어 동맥경화지수가 청국장 1.58 < 콩 2.02 < 카제인 2.41로 청국장 처리에서 가장 낮았다는 보고가 있다[37]. 따라서 본 연구결과는 이러한 보고와 유사한 것으로 NKF가 혈장의 HDL-cholesterol 수준을 증가시키고 TG/HDL-cholesterol을 감소시켜 항동맥경화 지수를 개선하여 동맥경화를 예방하는데 유익하게 작용할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 성인 흡연자를 대상으로 NKF 정제를 단기(4,000 U를 1회 투여)와 장기(2,000 U를 매일 1회 4주 투여) 실험을 통하여 NKF의 혈전용해 개선 및 항 동맥경화효과를 검증하였다. 임상대상자는 20세~31세의 건강한 성인으로 하루 흡연량이 하루 1갑 이상인 고혈압 또는 항 혈전증 약을 섭취하지 않는 사람을 선정하여 무작위로 placebo군과 NKF군으로 분류하여 이중맹검법으로 실험을 하였다. NKF와 placebo 정제는 (주)HK바이오텍에서 제공하였다. 단기시험은 placebo군(10명)과 NKF군(29명)을 대상으로 NKF 섭취 전과 섭취 1, 2, 4시간에 혈전용해효과를 검토하였고, 장기시험은 placebo군 10명과 NKF군 15명에게 NKF 섭취 전과 섭취 후 매주 혈전용해효과 및 혈압개서효과를 검토하였다.

단기시험에서 fibrin clot 용해능은 placebo군에 비해 NKF군에서는 섭취 후 2시간에 유의적으로 증가하여 4시까지 그 활성이 유지되었다. ECLT도 NKF 섭취 후 시간이 경과함에 따라 placebo군에 비해 현저하게 감소되었으며 aPTT는 섭취 후 4시에 섭취 전에 비해 12.5% 지연시키는 것으로 나타났다. 장기시험에서는 수축기와 이완기 혈압이 placebo군에서는 섭취 4주에 섭취 전에 비해 2.8%와 3.5%로 증가하였고 NKF군에서는 각각 1.3%와 1.0% 감소하여 두 군 모두에서 유의차는 없었다. Fibrin clot 용해능은 NKF군에서 1주에 증가하여 4주에도 높은 수준으로 유지되었고, ECLT는 NKF군은 섭취 전에 비해 1주에 현저하게 감소되어 4주 후까지 유사한 수준으로 유지하여 NKF의 효과를 볼 수 있었지만, placebo군에서는 효과가 없었다. 따라서 NKF는 PT와 aPTT를 개선하여 전 처리 기간 placebo군에 비해 혈액응고시간을 유의적으로 지연시켰다. 또한 NKF 섭취는 TG/HDL-cholesterol을 감소시켜 항 동맥경화 지수를 상승시키는 효과가 있었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 단기와 장기 임상시험에서 NKF는 fibrin clot 용해능을 증가시키고 ECLT를 감소시키며 PT와 aPTT를 지연시켜 혈전 용해능을 상승시키며, TG/HDL-cholesterol을 낮추어 혈중 지질수준을 개선하고 동맥경화를 예방하는데 유익하게 작용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 (재)바이오21센터 바이오벤처플라자 건립사업의 기술지원사업과 (주)HK바이오텍의 연구지원사업으로 수행되었습니다.

References

1. Arbige, M. and W. H. Pitcher. 1989. Industrial enzymology. a look towards the future. *Trends Biotechnol.* **7**, 330-335.
2. Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin platemethod for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
3. Astrup, T. and I. Sterndorff. 1956. The plasminogen activator in animal tissue. *Acta. Physiol. Scand.* **36**, 250-255.
4. Chang, Y. Y., J. S. Liu, S. L. Lai, H. S. Wu, and M. Y. Lan. 2008. Cerebellar hemorrhage provoked by combined use of nattokinase and aspirin in a patient with cerebral microbleeds. *Inter. Med.* **47**, 467-469.
5. Fletcher, A. P. and A. J. Johnson. 1957. Methods employed for purification of streptokinase. *Por. Soc. Exp. Boal. Med.* **94**, 223-236.
6. Fujita, M., K. Hong, Y. Ito, S. Misawa, N. Takeuchi, K. Kariya, and S. Nishimuro. 1995. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1194-1196.
7. Fujita, M., K. Hong, and Y. Ito. 1995. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1387-1391.
8. Fujita, M., Y. Ito, K. Hong, and S. Nishimuro. 1995. Characterization of nattokinase -degraded products from human fibrinogen or cross-liNKFed fibrin. *Fibrinolysis* **9**, 157-164.

9. Grande, P., A. M. Grauholt, and J. K. Madsen. 1990. Unstable angina pectoris. Platelet behavior and prognosis in progressive angina and intermediate coronary syndrome. *Circulation* **81**, 116-119.
10. Gwak, H. S. and I. K. Chun. 2000. Performulation study of aspalatone, a new antithrombotic agent. *J. Appl. Pharmacol*. **8**, 332-337.
11. Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. Kang. 1997. Purification abd characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp.* KA38 originated from fermenter fish. *J. Ferment. Bioengin*. **84**, 307-312
12. Kim, J. K. 2002. Biologically Active Components of Soy-Fermented Foods. *Korea Soybean Digest* **19**, 1-7.
13. Kim, J. Y., S. N. Gum, J. K. Paik, H. H. Lim, K. C. Kim, K. Ogasawara., K. Ainoue, S. Park, Y. S. Jang, and J. H. Lee. 2008. Effects of nattokinase on blood pressure: A randomized, controlled trial. *Hypertens. Res*. **31**, 1583-1588.
14. Kim, S. H. 1998. New trends of studying on potential activities of Doen-jang. Korea *Soybean Digest*. **15**, 8-15.
15. Kumada, K., T. Onga, and H. Hoshino. 1994. The effect of natto possessing a high fibrinolytic activity in human plasma. *Igaku Seibutsugaku* **128**, 117-119.
16. Lee, J. H. and H. J. Park. 1998. Effects of intaking of red ginseng products on human platelet aggregation and blood lipids. *J. Ginseng Res*. **22**, 173-180.
17. Lee, S. S., S. M. Kim, U. K. Park, H. Y. Kim, and I. S. Shin. 2002. Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce. Korean *J. Food Sci. Technol*. **34**, 283-289.
18. 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 Sci*. **15**, 513-521.
19. Lee, Y. H., S. H. Lee, K. H. Park, Y. J. Choi, S. W. Lee, C. H. Kim, S. J. Cho, and S. W. Gal. 2006. *In vivo* biological function of a fibrinolytic enzyme after oral adminstration. Korean *J. Biotechnol. Bioeng*. **21**, 433-438.
20. Lijnen, H. R., B. van Hoef, O. Matsuo, and D. Collen. 1992. On the molecular interactions between plasminogen-staphylokinase, alpha 2-antiplasmin and fibrin. *Biochim. Biophys. Acta*. **1118**, 144-148.
21. Maruyama, M. and H. Sumi. 1995. Effect of natto diet on blood pressure. *JTTAS* **22**, 312-318.
22. Ruggeri, J. R. and T. S. Zimmerman. 1985. Platelets and Willebrands disease. *Semin. Hematol*. **22**, 203-206.
23. Sherman, D. G. and R. G. Hart. 1986. Thromboembolism and antithrombotic therapy in cerebrovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol*. **8**, 88B-97B.
24. Shin, K. S., J. J. Lee, Y. R. Jin, J. Y. Yu, E. S. Park, J. H. Im, S. H. You, K. W. Oh, M. K. Lee, J. J. Wee, Y. S. Kim, and Y. P. Yun. 2007. Effect of Korean red ginseng extract on blood circulation in healthy volunteers. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Ginseng Res*. **31**, 109-116.
25. Smith, A. A., L. J. Jacobson, B. I. Miller, W. E. Hathaway, and M. J. Manco-Johnson. 2003. A new euglobulin clot lysis assay for global fibrinolysis. *Thromb. Res*. **112**, 329-337.
26. Sohn, H. Y., H. Y. Ryu, Y. S. Kwon, E. J. Kum, C. S. Kwon, G. S. Kwon, K. W. Kim, and K. H. Son. 2005. Screening of thrombin inhibitor from medicinal and wild plants(II). *Kor. J. Pharmacogn*. **36**, 263-272.
27. Sumi, H., H. Hamada, H. Mihara, K. Nakanishi, and H. Hiratani. 1989. Fibrinolytic effect of the Japanese traditional food natto (natto kinase). *Thromb. Haemost*. **62**, 549-554.
28. Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanashi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of NKF. *Acta Haematol*. **84**, 139-143.
29. 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. *Experimentia* **43**, 1110-1111.
30. Sumi, H. 1987. Development of nattokinase and healthy natto (in Japanese). *Bioindustry* **7,** 725-731.
31. Suzuki, Y., K. Kondo, H. Ichise, Y. Tsukamoto, T. Urano, and K. Umemura. 2003. Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening. *Nutrition*. **19**, 261-264.
32. Suzuki, Y., K. Kondo, Y. Matsumoto, B. Q. Zhao, K. Otsuguro, T. Maeda, Y. Tsukamoto, T. Urano, and K. Umemura. 2003. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sci* **73**, 1289-1298.
33. Tai, M. W. and B. V. Sweet 2006. Nattokinase for prevention of thrombosis. *Am J. Health Syst. Pharm*. **63**, 1121-1123.
34. Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha, and Robbins K. C. 1985. Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest*. **75**, 1212-1222.
35. Urano, T., H. Ihara H, K. Umemura, Y. Suzuki, M. Oike, S. Akita, Y. Tsukamoto, I. Suzuki, and A. Takada. 2001. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 24690-24696.
36. Weitz, J. I. and M. Crowther. 2002. Direct thrombin inhibitors. *Thrombosis Res.* **106**, 275-284.
37. Yang, J. R. 2000. Doctoral thesis, Antiatherogenic effect of *chongkukjang*. *Busan National University.*
38. Yong, P., X. J. Yang, and Y. Zhang. 2005. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity i*n vivo*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 126-132.
39. Zhang, L., J. Wang, M. Yu, and B. Ru. 2004. Functional properties of a recombinant chimeric plasminogen activator with platelet-targeted fibrinolytic and anticoagulant potential. *Mol. Genet. Metab*. **82**, 304-311.