

곤충 생약으로부터 항응고 및 항혈전 물질의 탐색

한범수, 우송지, 김성환¹, 김영식*

서울대학교 천연물과학 연구소, ¹중부대학교 식품영양학과

Evaluation of Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from Crude Extracts of Insects

Bum-Soo Hahn, Songji Wu, Sung-Whan Kim¹ and Yeong Shik Kim*

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

¹Department of Food Science and Nutrition, Joongbu University, Choongnam 312-940, Korea

Abstract – The *in vitro* anticoagulant and fibrinolytic activities of crude extract from insects which have been used as traditional medicines. The extracts of Formica, Huechys and Eupolyphaga/Steleophaga prolonged activated partial thromboplastin time and thrombin time compared to the value of the control. The fibrinolytic activity of insect extracts was also tested by fibrin plate method. We found that the extracts of Cicadae Periostracum, Eupolyphaga/Steleophaga, Mantidis Oötheca and Huechys directly could hydrolyze the fibrin clot without the activation of plasminogen by plasminogen activators.

Key words – Traditional medicine; insects; aPTT; TT; fibrinolytic activity; Formica; Huechys; Eupolyphaga/Steleophaga; Cicadae periostracum; Mantidis oötheca

최근에 들어와서 구미 선진국에서만 아니라 국내에서도 성인병이라 불리는 고혈압, 심장병 및 뇌졸중 등의 순환기 질환에 의한 사망률이 점차적으로 증가되고 있는 실정이다. 혈액 순환 질환의 일종인 심혈관 질환 (cardiovascular disease)은 현대인에서 가장 흔한 질환 중 하나인 것으로 보고되고 있는데, 구체적으로는 심근 경색을 일으키는 관상동맥 질환 (coronary artery thrombosis)과 뇌졸중과 같은 발작 유발성 뇌혈관 질환 (cerebrovascular thrombosis)을 포함하는 질환의 일군이다. 그리고 폐색전 (pulmonary embolism)을 야기시키는 정맥혈전증 (venous thrombosis) 등이 있다.

혈전을 제거하는 약물로서 스트렙토키나제 (streptokinase)와 유로키나제 (urokinase) 같은 플라스미노겐 활성화자가 유용한 것으로 알려져 있으며, 이들을 정맥 주사하여 혈전 용해계 (fibrinolytic system)를 활성화하는 치료법이 지난 30 여년간 사용되어 왔다.¹⁾ 상기 두 가지 약제는 실제로 혈전 용해에 상당히 효과가 있음이 많은 임상 예에서 이미 입증되었으나, 한편으로는 혈전에 대한 특이성이 없어 치료기간 동안

에 전신출혈 (systemic hemorrhage)이 일어나는 등의 부작용이 보고되어 있다. 이외에도 tPA (tissue-type plasminogen activator)는 생체 내(혈장 또는 기관)에 미량으로 존재하는 단백질로서 플라스미노겐을 플라스민 (plasmin)으로 활성화시켜 플라스민으로 하여금 피브린을 분해시켜 혈액의 흐름을 용이하게 한다. 특히, 혈전과 특이적으로 결합할 수 있어 혈전에 대한 선택성이 높으므로 처음에는 이상적인 혈전 용해제로 인식되었으며, 심근 경색증은 물론이고 뇌졸중에도 효과가 있다는 임상 보고가 계속 발표되고 있다. 그러나 임상에서 실제로 사용한 결과, 혈액내 반감기가 2-4분 정도로 매우 짧아 사용하기가 불편하고 스트렙토키나제 또는 유로키나제를 투여한 경우에서와 같은 부작용이 여전히 나타나는 문제점이 있었다. 또한, 전술한 스트렙토키나제 (streptokinase), 유로키나제 (urokinase) 및 tPA (tissue-type plasminogen activator) 등은 임상적으로 사용하기에 몇 가지의 문제점이 있었다. 구체적으로 상기 의약품은 우선 부작용의 위험이 크고, 가격이 매우 비쌌 뿐만 아니라, 유로키나제를 제외하고 경구 투여가 불가능하다.

따라서, 최근에는 이들 기존의 혈전 용해제의 문제

*교신저자 : Fax-82-2-765-4768

점을 극복하는 더 나은 혈전 용해제를 제공하기 위한 시도가 매우 활발히 진행되고 있으며, 혈관 주사로만 투여할 수 있는 혈전 용해제 이외에 직접 경구 투여하거나 혈관 주사와 병용하여 혈액내의 혈전 용해능을 증가시킬 수 있는 제재에 관심이 모아지고 있다. 그 대표적인 것으로 첫 번째는 혈전 용해 활성이 강한 새로운 변이형 활성인자를 개발하는 것이며, 두 번째는 자연 물질로부터 보다 우수한 혈전 용해능을 가지는 동물, 식물, 또는 미생물 유래의 새로운 혈전 용해제를 개발하는 것이다. 유사한 예로서 지렁이 등의 연체동물,²⁾ 뱀독³⁾ 또는 미생물⁴⁾ 등에서 분리된 단백질 분해효소의 생화학적 성질이 규명되고 있으며, 이 중 일부는 유전자들의 클로닝이 이루어지고 있다. 또한, 이 밖에도 거머리,⁵⁾ 박쥐,⁶⁾ 흡혈빈대⁷⁾ 및 십이지장균⁸⁾ 등의 대부분 혐오성 동물류로부터 항응고 또는 혈전 분해성 효소 단백질이 분리 및 정제되어 상품화를 위한 임상 실험 또는 전 임상 단계에 있다. 그러나, 현재까지 곤충을 이용한 혈전용해제의 개발은 아직 세계적으로 연구가 되어지지 않고 있다.

본 연구는 전통 생약으로 사용된 동물 시료 중 혈전용해 물질과 항응고 물질들을 탐색하기 위해 피브린 평판법으로 피브린 분해능을 조사하고 TT (thrombin time)과 aPTT (activated partial thromboplastin time)를 실시하여 항응고제나 혈전 용해제로서 개발이 가능한 곤충류를 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - Thrombin (T-9135), aPTT 측정용 시약 (A-1926)과 fibrinogen (F-8630)는 미국 Sigma 제품을 사용하였고 Fibrosystem은 BRL (USA) 제품을 사용하였다. 혈장은 서울대학병원 혈액은행에서 구입하였다. 곤충 시료 9종류 (전갈, 홍의, 제조, 자충, 선대, 홍랑자, 상표초, 반묘, 망충)들은 중국 북경의 상설 시장에서 구입하였고 소금쟁이는 성남시 대왕저수지에서 채집하였다. Table I의 곤충 시료들을 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)인 완충용액에 넣고 homogenizer를 이용해 분쇄한 후, 추출물을 가지고 다음과 같은 방법으로 항혈전 및 항응고에 관한 실험을 실시하였다.

Activated partial thromboplastin time (aPTT) - 0.1 ml plasma, 50 μ l (1, 5, 10, 20 μ g)의 시료와 0.1 ml의 aPTT reagent를 미리 37°C에서 6분간 배양하였다. 다음 0.1 ml의 35 mM CaCl₂를 넣고 응고될 때까

Table I. Insect crude drugs for the activities on blood coagulation and fibrinolysis system

Insect	Scientific name	Insect crude drug name
Scorpion	<i>Buthus martensii</i>	전갈 (全蝎)
Holotrichia	<i>Holotrichia diomphalia</i> 및 동속 근연곤충	제조 (蠮螋)
Eupolyphaga Steleophaga	<i>Eupolyphaga sinensis</i> 및 <i>Steleophaga plancyi</i>	자충 (土鳖虫)
Cicadae periostracum	<i>Cryptotympana pustulata</i> 및 동속 근연곤충	선대 (蟬退)
Huechys	<i>Huechys sanguinea</i>	홍랑자 (紅娘子)
Formica	<i>Formica rufa</i> 및 동속 근연곤충	홍의 (紅蟻)
Mantidis Oötheca	<i>Paratenodera sinensis</i>	상표초 (桑螵蛸)
Cantharides	<i>Mylabris phalerata</i> 및 <i>Epicauta gorhami</i>	반묘 (斑猫)
Tabanus	<i>Tabanus bivittatus</i> 및 동속 근연곤충	망충 (虻蟲)
Gerridae	<i>Aquarius paludum</i> 및 동속 근연곤충	소금쟁이

지의 시간을 Fibrosystem (BBL, USA)을 사용해서 측정하였다.

Thrombin time (TT) - 0.7 U thrombin (100 μ l)를 미리 37°C에서 3분간 배양하였다. 150 μ l의 혈장과 각각의 농도 (1, 5, 10, 20 μ g)의 시료 또는 열처리된 시료 50 μ l (1, 5, 10, 20 μ g)를 혼합한 후 37°C에서 2분간 미리 배양하였다. 그런 후 미리 배양된 100 μ l의 thrombin을 혼합하였다. 응고될 때까지의 시간을 Fibrosystem (BBL, USA)을 사용해서 측정하였다.

Fibrinolytic activity 측정 - 0.2 M borate 완충액 (pH 7.8)-0.15 M NaCl에 녹여진 0.8%의 fibrinogen용액 15 ml에 0.5 ml의 트롬빈(10 NIH U/ml)을 넣고 혼합한 후, fibrin clot이 형성되도록 상온에서 30분간 방치하였다. 이렇게 만들어진 fibrin plate에 5-20 μ l (1, 5, 10, 20 μ g)의 시료를 점적하였다. 시료가 점적된 fibrin plate를 습기가 있는 37°C의 배양기에서 40시간 방치한 후 lysis zone의 직경을 측정하였다.

단백질 정량 - 단백질의 양은 Bradford의 방법에 의해서 측정하였다.⁹⁾

결과 및 고찰

Activated partial thromboplastin time (aPTT) – 항응고에 작용할 수 있는 물질을 찾기 위해 aPTT를 측정하여 대조군 보다 지연된 시간을 갖는 시료는 항응고제로의 가능성이 있기 때문에 aPTT를 지연 할 수 있는 시료를 알아보기 위해서 다양한 농도의 시료를 가지고 aPTT를 하여본 결과 시료 10 µg에서 홍의 (84.3 초), 홍랑자 (500 초), 자충 (550.4 초)에서 대조군보다 더 긴 aPTT가 측정되었다 (Fig. 1A). 대조군은 33.8 초였다.

Thrombin time (TT) – 혈액응고 작용의 인자 중 섬유소원을 섬유소로 변환시키는 작용을 하는 트롬빈을 억제할 수 있으면 항응고제로서의 가능성이 있다. 다양한 농도의 시료를 가지고 TT를 하여본 결과, 시료 10 µg에서 홍의 (23.9 초), 홍랑자 (125.2 초) 자충

(90.4 초)에서 대조군보다 더 긴 TT가 측정되었다 (Fig. 1B). 대조군은 트롬빈 0.7 U에서 17.8초였다. TT에 영향을 주는 물질이 열에 대한 안정성을 알아보기 위해 시료를 100°C에서 10분간 가열한 후 TT를 측정한 결과 홍랑자와 자충이 64.3 초 및 63.8 초로 시료가 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다 (Fig. 2).

Fibrinolytic activity 측정 – 생약으로 사용되어 온 곤충 시료 중 비교적 구하기 쉬운 9 종류의 곤충과 한국의 수생곤충인 소금쟁이를 가지고 피브린 평판법을 사용하여 섬유소 클롯을 직접 분해 할 수 있는지를 알아보기 위해 섬유소 용해 활성을 측정하여 본 결과, 선대, 상표초, 홍랑자와 자충에서 3.0, 11.5, 4.0, 2.0 mm의 lysis zone이 측정되었다 (Fig. 3). 그 중 상표초에서 가장 강한 11.5 mm의 활성을 볼 수 있었다.

결론

항혈전과 항응고에 작용하는 물질들이 여러 천연물에서 탐색되어 지고 있다 그 중 항 혈전의 치료제의 연구는 뱀독의 serine protease 및 metalloprotease에서 많은 연구와 박쥐의 bat-PA의 연구, 지렁이의 여러 serine protease의 연구들이 보고되어었다. 또한 항응고 반응에 작용하는 물질의 탐색은 거머리, 회충, 뱀독의 혈소판 응집억제제의 연구가 선행되고 있다.

이에 본 실험자는 아직 연구가 미흡한 전통 약물로 사용된 곤충의 시료에서 항응고와 항혈전에 작용하는

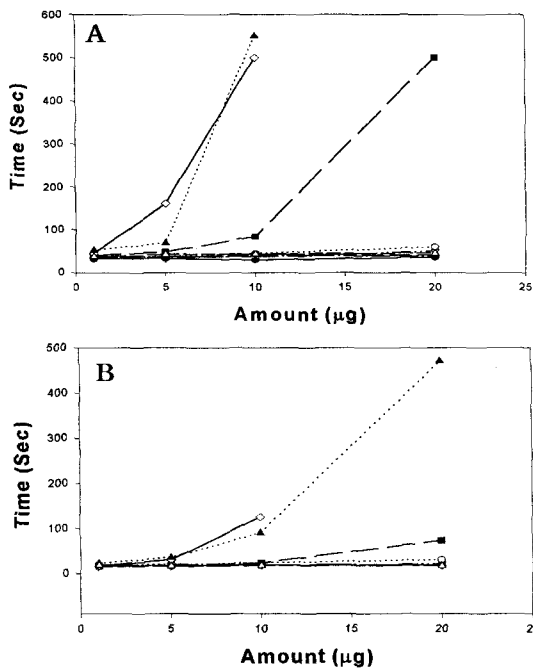


Fig. 1. Effects of crude extracts on aPTT (A) or TT (B).

Dilutions of several crude extracts were added to normal plasma and thrombin solution. After adding the samples, anticoagulant activity was assayed as described in Materials and Methods. -◇-, Huechys; -▲-, Eupolyphaga; -■-, Formica; -●-, Cantharides; -○-, Scorpion; -▼-, Cicadae Periostracum; -▽-, Mantidis Oötheca; -□-, Gerridae; -◆-, Tabanus; -△-, Holotrichia

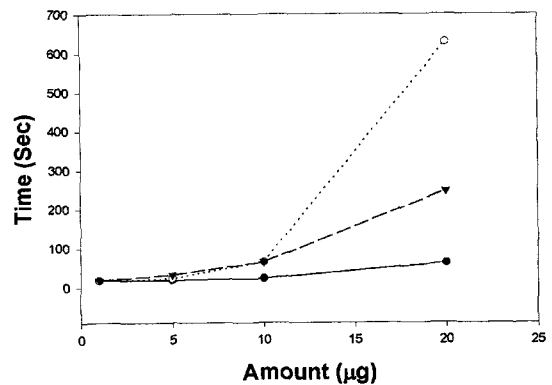


Fig. 2. Effect of heated crude extracts on TT. Dilutions of heated crude extracts were added to thrombin solution and TT was determined as described in Materials and Methods. -○-, Huechys; -▼-, Eupolyphaga; -●-, Formica.

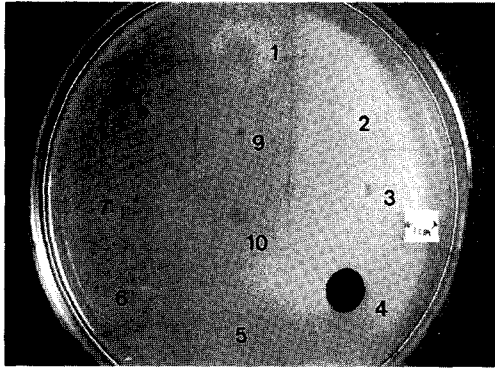


Fig. 3. Assay of fibrinolytic activity of crude extracts by using fibrin-plate method.

1. Cantharides, 2. Scorpion, 3. Cicadae Periostracum, 4. Mantidis Oötheca, 5. Formica, 6. Gerridae, 7. Tabanus, 8. Huechys, 9. Eupolyphaga, 10. Holotrichia.

물질을 탐색하고자 피브린 플레이트법과 aPTT 또는 TT를 이용해 천연물로부터의 작용물질들을 탐색하고자 했다. 본 실험의 결과에서 항혈전에 영향을 주는 물질은 선대, 홍랑자, 상표초와 자충의 시료에서 활성을 관찰할 수 있었고 항응고에 작용하는 물질은 홍의, 홍랑자와 자충의 시료에서 활성을 관찰할 수 있었다. 그리고 항응고 반응에 관여하는 물질이 열에 대한 특성을 알아보기 위해서 열 처리를 하여 본 결과 열에 강한 물질임을 알 수 있었다.

인용문헌

1. Verstraeta, M., Lijnen, H. R. and Collen, D. (1995) Thrombolytic agents in development. *Drugs* 50: 29-42.

2. Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. (1993) Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 1074: 347-356.

3. Bajwa, S. S., Kiakossian, H., Reddy, K. N. N. and Markland, F. S. (1982) Thrombin-like and fibrinolytic enzymes in the venoms from the gaboon viper (*Bitis gabonica*), eastern cottonmouth moccasin (*Agkistrodon p. piscivorus*) and southern copperhead (*Agkistrodon c. contortrix*) snakes. *Toxicon* 20: 427-432.

4. Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I. and 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.

5. Markward, F. (1955) Untersuchungen über hirudin. *Naturwissenschaften* 42: 537-538.

6. Cartwright, T. (1974) The plasminogen activator of vampire bat saliva, *Blood* 43: 317-326.

7. Noeske-Jungblut, C., Kratzschmar, J., Haendler, B., Alagon, A., Possani, L., Verhalen, P., Donner, P. and Schleuning, W. -D. (1994) An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J. Biol. Chem.* 269: 5050-5053.

8. Friedly, J. (1996) New anticoagulant prompts bad blood between partners. *Science* 271: 1800-1801.

9. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

(1999년 6월 28일 접수)