

## 청각으로부터 분리한 다당류의 혈액응고 저해기작 및 *in vivo* 항응고 활성

심윤영 · 안정희<sup>†</sup> · 조원대\* · 전 혁 · 김경임 · 조홍연 · 양한철

고려대학교 생명공학원

\*농협대학

### Inhibitory Mechanism of Blood Coagulation and *in vivo* Anticoagulant Activities of Polysaccharides Isolated from *Codium fragile*

Yun-Yong Shim, Jeung-Hee An<sup>†</sup>, Won-Dai Cho\*, Hyug Chun, Kyung-Im Kim,  
Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

\*Agricultural Cooperative College, Kyongki 412-707, Korea

#### Abstract

Inhibitory mechanism of the anticoagulant polysaccharide purified from *Codium fragile* was investigated. The anticoagulant compounds (Cf-30-IV-4-ii, CF-30-IV) prolonged the clotting time at both activated partial thromboplastin time (aPTT) and thrombin time (TT). The Inhibition factor assay of intrinsic coagulation pathway in the blood showed that the anticoagulant polysaccharide (CF-30-IV-4-ii) inhibited other factors such as VIII, IX, XI and XIII of the coagulation cascade, which did not affect the lupus anticoagulant AB activity. In the thrombin inhibition pattern, the CF-30-IV-4-ii did not directly influence the fibrine formation mediated by thrombin but affected the anticoagulant activity through the activation of antithrombin III. Base on these result, the anticoagulant polysaccharide (CF-30-IV-4-ii) was considered to inhibit serine protease involved in the blood coagulation cascade through the enhancing antithrombin III activity. The residual effects of anticoagulant activity and antithrombosis were tested with ICR mice. The anticoagulant polysaccharide (CF-30-IV) kept its anticoagulant activity for 6 hrs with 100% survival at a dose of 150 mg/kg in the antithrombosis test. The anticoagulant effect of CF-30-IV in *ex vivo* was proportional to the concentration of intravenously injected dose up to 100 mg/kg.

**Key words:** *Codium fragile*, anticoagulant activity, antithrombosis effect

#### 서 론

혈전의 생성은 신체 내에서 상처 치유에 있어 매우 중요한 과정이지만 비정상적인 혈전생성은 혈류부전, 혈관상해, 고혈압, 지질침착 등을 일으킨다. 혈전은 혈관내에서 유발되어 혈장응고계, 혈소판, 혈관내피 세포 하부 결합 조직 및 피브린 용해계 등의 총괄적이고도 복잡한 생화학적 반응을 통해 생성되며 생성된 혈전은 정맥 또는 동맥에서 혈액의 순환을 방해하여 조직으로의 영양분 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화증 등의 병인으로 작용한다(1). 혈관계 질환을 유도하는 혈전의 생성을 방지하는 항응고 물질(anticoagulant)은 유기 합성 제제인 coumarin(2), 거머리에서 분리한 hirudin(3), 소의 심장이나 돼지의 소장에서 추출한 heparin(4) 등이 있다. 이들 중 heparin은 혈액 응고계에서 중요한 기능을 지닌 serine proteases thrombin과 factor Xa의 작용을 억제함으로써 항응고 활성을 나타내는 물질로 알려져

있고(5), 출산 후나, 개복 수술시 나타나는 대퇴부정맥의 혈전증, 관상 동맥의 혈전증에 주로 사용되고 있으나 혈소판 감소, 출혈, 골다공 등의 부작용이 나타나고 있으며 반감기가 1~2 시간으로 매우 짧은 단점이 있다(6).

최근 육상 식물과 해조류에서 추출된 다당류에서 항응고 활성을 가진 물질들이 밝혀지고 있으며, 특히 갈조류인 다시마(7)에서 추출된 fucoidan은 항응고 작용 뿐만 아니라 항암작용 등 다양한 생리활성이 보고된 바 있고, 툃(8)과 홍조류인 참도박으로부터 분리된 다당류도 매우 높은 항응고 활성을 나타내었다(9). 저자들은 70여종의 해조류를 대상으로 고효성 항응고 성분을 검색하던 중 상기의 해조류들 이외 녹조류인 청각의 에탄올 추출획분에서 비교적 높은 활성을 관찰하였다(9). 녹조류인 청각(*Codium fragile*)은 예로부터 식용으로 상용되었고 청각은 탄수화물, 단백질, 비타민 외에 각종 무기염류의 함량이 높아 이들 영양소의 훌륭한 공급원으로, 또한 생리 약리 활성 측면에서는 비만방지, 지방혈증 억제, 콜레스테롤 저하, 중앙

<sup>†</sup>Corresponding author. E mail: anjhee@hanmail.net  
Phone: 82-2-3290-3428

역제 등의 활성을 보임으로써 건강식품의 소재로 주목받고 있다(10).

본 연구는 안전성이 확보된 청각의 항응고 활성물질을 소재 화시키기 위한 기초 연구로 청각으로부터 추출 분리된 다당류를 *in vitro*, *ex vivo* 및 *in vivo* 계에서 항응고 활성을 비교 분석함으로써 혈액 응고계에서 활성물질의 작용특성과 기작을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

청각은 서울 가락동 농수산물시장에서 남해안 산으로 가을에 채취된 것을 확인한 후 구입하여 사용하였다. Activated partial thromboplastin time(aPTT) 측정용 activated cephaloplastin reagent, prothrombin time(PT) 측정용 thromboplastin·C Plus 및 thrombin time(TT) 측정용 thrombin reagent는 Dade Behring사(New York, DE), heparin(180 USP unit/mg)과 fibrinogen은 Sigma사(St. Louis, MO) 제품을 사용하였으며 항응고 활성 측정시 이용되는 혈장(platelet pool plasma)은 고려대학교 부속병원 혈액원에서 구입하였다. 그 외의 시약은 시판 일급 혹은 특급시약을 사용하였다.

### 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 대한실험동물센터에서 분양받은 ICR계 마우스(♂, 5 week, 25~30 g)를 1주간 적응시킨 후 사용하였다. 적응기간 중 사료는 실험동물 사료를, 물은 정제수를 자유로이 섭취케 하였으며 항온·항습 조건(온도  $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 0.5\%$ )에서 인공조명으로 빛을 1일 11시간(오전 9시~오후 8시) 조사하였고, 실험동물의 circadian rhythm을 고려하여 사료의 투여와 실험은 오전 9시부터 11시 사이에 행하였다. 실험동물은 실험항목에 따라 각 군당 5~15마리의 대조군과 시료 투여군으로 구분하였다.

### 청각 추출물의 조제

탈염한 건조 청각분말 2 kg을 hand mixer로 분쇄한 후 20배 부피의 ethanol을 가하여  $40^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 2회 교반 추출한 다음 여과하여 ethanol 비가용획분인 CF-E를 조제하였다. Ethanol 비가용 획분에 20배 부피의 0.1 M 염산용액(pH 4)을 가하여  $70^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 3회 교반, 추출 후 중화하고 원심 분리(7,000 rpm, 30분)하여 CF를 얻었다. CF를 적당량의 증류수에 녹인 후 최종 농도 30% ethanol로 침전시킨 획분을 투석, 농축 및 동결건조하였다. 동결건조한 CF-30획분(수율은 61.2%)을 Masterflex와 Prep/Scale-TFF(Millipore Co., USA)를 이용 분자량별로 한외여과하여 항응고 활성이 가장 높은 300 kDa 이상의 획분(CF-30-IV: 수율은 44.4%)을 조제하였으며 이 획분을 *in vivo*와 *ex vivo* 실험의 시료로 사용하였다. CF-30-IV 획분을 음이온결럼인 DEAE-Toyopearl 650C column(Cl<sup>-</sup> form,  $3.5 \times 48$  cm)에 흡착시킨 후 활성획분은 0.75 M NaCl 용액에서 용출된(CF-30-IV-4: 수율은 14.4%)과 이것을 다시

Sepharose CL-6B column( $2.4 \times 92$  cm)에 통과시켜 3개의 획분(CF-30-IV-4-i, CF-30-IV-4-ii, CF-30-IV-4-iii)을 분리하였다. CF-30-IV-4-ii 획분은 Waters 2690에서 TSK-gel G4000PW와 G5000PW(Tosho Co., JP)의 column를 이용하여 0.2 M NaCl(flow rate 0.5 mL/min)의 용매로, refractive index detector로 분자량 측정 결과 1,800 kDa인 획분을 분리 정제하였다. CF-30-IV-4-ii(수율은 0.4%) 획분의 주 구성당은 arabinose를 89%, 황산기를 35.1% 함유한 획분으로 항응고 활성 기작 및 혈액 응고계에서의 작용 특성을 검토하는데 사용하였다.

### 구성당 분석과 황산기 분석

구성당의 분석은 Jones와 Albersheim의 방법(11)에 따라 각각의 당을 2.0 M trifluoroacetic acid(TCA)로  $121^\circ\text{C}$ 에서 1.5시간 동안 시료를 가수분해한 후 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography(GLC)로 분석하였다. GLC의 분석조건은 SP-2380 capillary column( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.2 \mu\text{m}$ )이 장착된 Young Lin MD 600에서 flame ionization detector(FID)사용하였고 column의 온도는  $60^\circ\text{C}$ (1분간 유지)→ $220^\circ\text{C}$ ( $30^\circ\text{C}/\text{분}$ )까지 상승 후 12분간 유지→ $250^\circ\text{C}$ ( $8^\circ\text{C}/\text{분}$ ) 상승시키고 15분간 유지하였다. 표준 구성당들과 retention time을 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였고 구성당의 mol. %는 각 peak들의 면적비와 각각의 유도체의 분자량으로부터 계산하였다(11). 황산기 함량은 Dodgson과 Price의 방법(12)을 이용하여 측정하였고, 항응고 다당류의 sulfation과 desulfation처리는 Park 등의 방법(13)에 의해서 처리후 항응고 활성을 측정하였다. 또한 Kiyohara 등의 방법(14)에 따라 항응고 활성의 본체를 확인하기 위해서 CF-30-IV 획분을 pronase digestion과 periodate 산화처리를 각각 실시하였다.

### 항응고 활성 측정

항응고 활성 중 내인성 경로(intrinsic pathway)에 기인하는 aPTT의 측정은 시료(CF-30-IV, CF-30-IV-4-ii) 일정농도가 함유된 건전한 성인의 혈장(platelet poor plasma) 100  $\mu\text{L}$ 를 aPTT 측정용 시약 100  $\mu\text{L}$ 와 혼합하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 3분간 예열한 다음  $37^\circ\text{C}$ 에서 미리 예열된 20 mM  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 blood coagulation analyzer (HOSPITEX Diagnostics, Italy)를 이용하여 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 대조구는 시료 무첨가의 혈장 100  $\mu\text{L}$ 를 사용하였다. 외인성 경로(extrinsic pathway)에 기인하는 PT의 측정은 시료를 함유한 혈장 150  $\mu\text{L}$ 를  $37^\circ\text{C}$ 에서 3분간 예열한 다음,  $37^\circ\text{C}$ 에서 예열된 PT 진단시약을 150  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 blood coagulation analyzer로 응고시간을 측정하였고 공통경로(common pathway)에 기인하는 TT의 측정은 시료가 함유된 혈장 150  $\mu\text{L}$ 를  $37^\circ\text{C}$ 에서 3분간 예열한 다음,  $37^\circ\text{C}$ 에서 미리 예열된 TT 측정시약 150  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 동일하게 응고시간을 측정하였다(15).

### 혈액응고 factor assay

혈액응고계에서의 작용단계를 확인하기 위해 시료(CF-30-

IV 4-ii)를 100 µg/mL의 농도로 혈장에 용해한 후, ACL-3000과 Coasuper(현대 의학 연구소)를 이용하여 외인계 인자(factor II, V, VII, X)들은 PT 측정으로 내인계 인자(factor VIII, IX, XI, XIII)들은 aPTT법으로 측정하였다(16).

**청각 추출물의 thrombin에 대한 저해 양식**

시료(CF-30-IV-4-ii)의 thrombin에 대한 저해 양식을 조사하기 위하여 순수 fibrinogen 1.0 mL, thrombin 용액 0.1 mL, 시료(25, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL) 용액 0.1 mL 혼합액을 37°C에서 5분간 반응시킨 후 350 nm에서 흡광도를 측정하여 thrombin에 대한 저해양식을 검토하였다(17).

**Thrombin에 대한 *in vivo* 상에서의 항치사성 효과**

ICR계 마우스(5주령, 1주일 적응)를 2시간 절식시키고 생리 식염수에 용해시킨 CF-30-IV를 농도별(0, 10, 50, 70, 90, 120, 150 mg/kg)로 꼬리 정맥에 주입한 15분 후, veronal buffer로 100 NIH unit/mL의 농도로 희석시킨 thrombin 0.08 mL을 꼬리정맥에 주입한 다음 15분 동안 사망, 움직임이 없는 진신마비 및 활동이 가능한 회복으로 각각 구분하여 관독 후 회복된 개체 수를 생존 백분율로 표시하였다(18). 이때 각 군의 개체 수는 14마리로 하였다.

**꼬리정맥투여에 의한 *ex vivo* 상에서의 항응고 활성**

생리식염수에 CF-30-IV를 농도별(0, 10, 50~100 mg/kg)로 용해시켜 제조된 시료용액을 마우스 8마리를 1군으로 하여 꼬리정맥에 주사하고 15분 후, 마우스로부터 심장채혈법으로 혈액 0.9 mL를 취하여 3.8% sodium citrate 용액 0.1 mL에 혼합한 다음 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 얻은 혈장의 항응고활성을 aPTT와 TT법으로 응고시간을 측정하였다(19).

***Ex vivo* 상에서의 생체 내 잔존 활성**

생리식염수에 용해시킨 CF-30-IV 100 mg/kg을 마우스에 정맥주사한 후 2시간 간격으로 마우스로부터 심장채혈법으로 혈액 0.9 mL를 취하여 3.8% sodium citrate 용액 0.1 mL와 혼합한 다음 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 얻은 혈장의 항응고활성을 aPTT와 TT법으로 응고시간을 측정하였다(20).

**경구 투여에 의한 급성독성 실험**

ICR계 마우스(♂, 5주령을 1주간 적응) 24마리를 각 군당 6마리씩 4군으로 구분하여 생리 식염수에 용해시킨 CF-30-IV를 100 mg/kg, 500 mg/kg, 1,000 mg/kg씩 1일 1회 경구로 투여한 후 1, 4, 7, 14일째 각 군의 체중 변화를 측정하고 최종일 14일째의 생존한 마리 수를 백분율로 표시하였다(21).

**결과 및 고찰**

**청각에서 추출된 항응고 활성 물질의 특성**

청각의 산 추출물로부터 조제한 CF-30-IV 획분의 내인성, 외인성 및 공통 경로별 활성을 알아보기 위해 항응고 활성을

측정한 결과 Table 1과 같이 aPTT와 TT는 농도 의존적으로 높은 활성을 나타낸 반면 PT는 활성이 낮았다. 정제도가 높은 CF-30-IV-4-ii 획분은 CF-30-IV에 비해 aPTT와 TT활성이 2배 높았으며 PT 활성도 농도 의존적으로 증가함으로써 *in vitro*상에서 세 종류의 경로에 모두 작용함을 알 수 있었다. 한편 CF-30-IV획분의 항응고 활성 본체를 파악하기 위하여 pronase digestion과 periodate oxidation를 행하여 얻은 획분의 활성을 측정한 결과 pronase digestion시에는 CF-30-IV에 비해 100 µg/mL의 농도에서 aPTT가 56%증가를 보인 반면, periodate digestion시에는 약 45%의 활성이 감소함으로써 청각으로부터 추출한 물질의 항응고 활성 본체는 다당 부분에 존재함을 알 수 있었다. 한편 PT와 TT 활성도 pronase digestion에 의해 증가함으로써 CF-30-IV획분 중의 항응고 활성 다당은 단백질과 결합한 형태로 존재하고 단백질 부분이 제거될 때 높은 항응고 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 조제한 CF-30-IV와 CF-30-IV-4-ii 획분의 황산기 함량은 각각 32.5%와 35.1%이었고 당함량은 각각 43.4%와 89.6%로 5탄당인 arabinose가 주 구성당이었다. 이 결과들은 청각의 항응고 활성 물질이 heparin(4)이나 fucoidan 등과 유사한 다당류성 항응고 물질로 밝혀졌다(8).

항응고 활성과 황산기 함량의 상관 관계를 알아보기 위해 청각으로부터 조제한 CF-30-IV를 sulfation과 desulfation시킨 후 시료의 황산기 함량을 측정한 결과 무처리 획분이 32.5%인데 sulfation과 desulfation시 각각 45.8%와 17.2%를 나타내었다. 각 시료에 대해 항응고 활성을 측정한 결과 무처리에 비해 sulfation에 의한 활성 증가는 크지 않았으나 desulfation에 의한 활성 감소는 aPTT 88%, PT 35%, TT 87%로 항응고 활성과 황산기 함량과의 높은 상관성을 나타내었다(Table 2). 한편 항응고 활성에 요구되는 황산기 함량은 PT와 TT의 경우 황산기의 함량 증가에 따라 활성이 높아지는 경향을 보인 반면 aPTT는 영향을 나타내지 않음으로써 청각에 함유된 황산기의 함량만으로도 내인성경로에서 기인하는 항응고활성은 최대치에 도달함을 알 수 있었다. 따라서 청각에서 추출한 다당류는 다른 해조류에서 추출된 fucoidan, 함황 다당류들과 마찬

**Table 1. Anticoagulant activities of CF-30-IV, CF-30-IV-4-ii and modified CF-30-IV**

Fraction	Concentration (µg/mL)	aPTT (sec)	PT (sec)	TT (sec)
CF-30-IV	100	600	18.6	325.8
	50	425	17	156
	25	100	17	56
CF-30-IV-4-ii	100	600	189	489
	50	600	100	325
	25	325	50	150
CF-30-IV	50	189	17	150
periodate oxidized				
CF-30-IV	50	600	89	589
pronase digested				

Control clotting time of aPTT, PT and TT were 29, 15 and 11 sec, respectively.

**Table 2. Effect of sulfate content on anticoagulant activity**

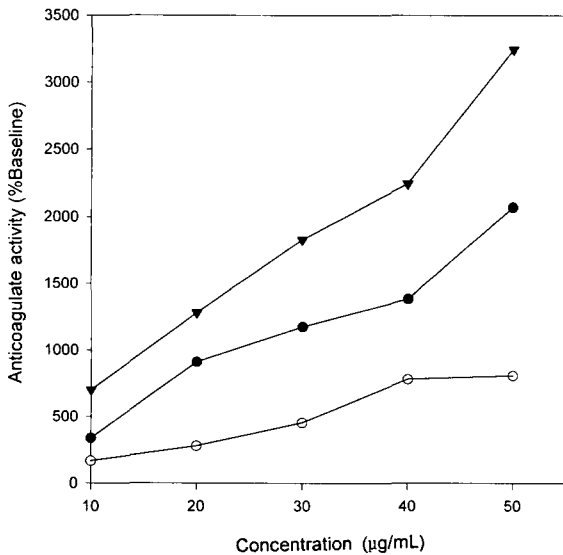
Anticoagulant activity	CF-30-IV*	Sulfated CF-30-IV*	Desulfated CF-30-IV*
aPTT (sec)	425	425	50
PT (sec)	17	20	11
TT (sec)	156	207	20.1
Sulfate content (%)	32.5	45.8	17.2

\*The concentration of each sample was 50 µg/mL.

가지로 항응고 활성에 황산기가 관여하는 것으로 사료되었다 (13).

**혈액응고계에서의 활성 경로 해석**

혈액응고계에서 coumarin류는 주로 외인성 경로(2), heparin은 내인성 경로에 관여하며(4) 일반적으로 외인성 경로에 관련 약물 또는 혈액응고인자의 결핍 등은 PT를, 내인성 경로는 aPTT를 측정하고 있다(22). *In vitro* 상에서 청각으로부터 추출한 항응고성 정제다당 CF-30-IV-4-ii의 aPTT, PT, TT는 Fig. 1과 같았다. aPTT와 TT는 농도에 따라 증가하나 PT는 증가하지 않음으로써 외인성 경로가 아닌 내인성 경로와 공통 경로에 작용하여 항응고 활성을 나타내는 다당이었다. 항응고 활성은 10 µg/mL의 농도에서 모두 활성이 낮았으나 TT의 경우 10 µg/mL, aPTT는 40 µg/mL 이상의 농도에서 급격히 증가함으로써 heparin과 유사한 경향을 나타내었으며, 상대적으로 TT에서 높은 활성을 보임으로써 thrombin에 의해 fibrinogen으로부터 fibrin이 형성되는 응고과정에서 강력한 저해 활성을 나타내는 것으로 추정되었다(23). 또한 내인성 경로에 관여하는 응고인자 중 어느 인자의 기여도가 큰지를 알아보기 위해 *in vitro* 상에서 lupus anticoagulant(LA)의 factor assay



**Fig. 1. Dose activity of CF-30-IV under aPTT, PT and TT assay.**

Control clotting time of aPTT, PT and TT was 29 sec, 15 sec and 11 sec, respectively. ●: Activated partial thromboplastine (aPTT), ○: Prothrombine time (PT), ▼: Thrombine time (TT).

를 이용하여 phospholipid 의존성 응고 활성을 측정하였다(24). 그 결과 Table 3에서와 같이 항응고 활성 정제 다당 CF-30-IV-4-ii는 lupus anticoagulant 항체의 활성에는 영향을 주지 않았으나 응고과정 중 factor VIII, IX, XI, XII의 활성이 저해됨을 나타내었다. 따라서 이들 factor에 대한 억제제는 항응고 활성 측정에 aPTT의 활성이 높게 나타나는 결과와 함께 내인성 경로를 주로 저해하는 것으로 추정되었다(25).

**Thrombin에 대한 저해 양식**

인체 혈액내에 존재하는 thrombin에 대한 저해인자인 anti-thrombin III(AT III)와 heparin cofactor II(HC II)는 분자량이 각각 62,000 Da, 65,000 Da인 당단백질이며 비슷한 아미노산 조성을 가지고 있으나 저해 양식에 있어 AT III는 혈액응고 내인계 인자인 Xa, IXa, XIa, XIIa, kallikrein 및 thrombin의 활성을 저해하고 HC II는 단지 thrombin의 활성을 저해한다(22). Heparin은 AT III와 결합하여 factor Xa 및 thrombin의 작용을 저해하는 강력한 항응고제이지만 AP III가 없는 상태에서는 thrombin에 대하여 항응고 활성을 나타내지는 못한다(26). 또한 heparin의 AP III에 의한 thrombin 저해는 5,000 Da 이상의 분자량에서 가능하며 분자량이 증가할수록 증가하는 것으로 보고되어 있다(6). Table 4는 항응고성 정제다당 CF-30-IV-4-ii의 thrombin에 대한 저해양식을 알아보기 위해 fibrinogen을 기질로 하여 thrombin에 대한 저해 양식을 검토하였다. CF-30-IV-4-ii는 농도와 흡광도 변화에 있어 상관성을 보이지 않음으로써 heparin과 유사하게 AT III가 없는 상태에서 직접적으로 thrombin에 작용하지 못함을 알 수 있었다. 따라서 청각의 항응고 활성은 factor assay와 thrombin의 저해

**Table 3. Factor assay of CF-30-IV-4-ii fraction purified from *Codium fragile***

Test factors	Anticoagulant activity (%)	Standard range (%)
Factor I (fibrinogen)	50.8	33 ~ 66
Factor II (prothrombin)	105	60 ~ 140
Factor V	54.6	60 ~ 140
Factor VII	147	60 ~ 140
Factor VIII	12.2	60 ~ 140
Factor IX	9.71	60 ~ 140
Factor X	126	60 ~ 140
Factor XI	9.84	60 ~ 140
Factor XII	14.8	60 ~ 140
Lupus anticoagulant Ab	36.5	35 ~ 45

Sample was concentration of 100 µg/mL.

**Table 4. Effects of CF-30-IV-4-ii and heparin on fibrin formation**

Concentration (µg/mL)	Turbidity (350 nm)	
	CF-30-IV-4-ii	Heparin
25	0.16	0.13
50	0.19	0.17
100	0.18	0.12
500	0.21	0.14
1,000	0.17	0.15

양식을 고려해 볼 때 AT III의 활성을 증대시켜 혈액응고 인자 중 serine proteinase의 활성을 저해함으로써 항응고활성을 나타내는 물질로 추정할 수 있었다.

또한 thrombin에 대한 *in vivo* 상에서의 항치사성 효과를 측정 한 결과, 150 mg/kg를 투여한 군에서 100%의 thrombin에 대한 항치사성을 나타내었고 시료량이 감소함에 따라 생존율도 감소하였다(Table 5). 이 결과는 홍조류인 참도박(9)과 갈조류인 톱(8)에서 100% thrombin 항치사성 효과 투여량인 250 mg/kg보다 낮은 농도를 나타냄으로써 항응고 활성 신소재의 청각추출물의 실용화 가능성을 시사하였다

고리정맥투여에 의한 *ex vivo* 상에서의 항응고 효과

청각의 약산성 추출물 CF-30-IV의 생체 내 항응고 효과를 측정 한 결과(Fig. 2), 시료를 투여하지 않은 대조군 마우스의

Table 5. Survival effect of CF-30-IV fraction against thrombin in mice

Group <sup>1)</sup> (mg/kg)	No. of mice	Time of death or paralysis (hr)						Survival rate (%) <sup>2)</sup>
		1	4	8	12	20	24	
Control	14	10	2	0	0	0	0	14.3
10	14	3	4	1	1	0	0	35.7
50	14	2	2	1	0	1	0	57.1
70	14	2	1	1	1	0	0	64.3
90	14	0	1	1	1	0	1	71.4
120	14	0	0	0	1	1	0	85.7
150	14	0	0	0	0	0	0	100

<sup>1)</sup>Sample was injected intravenously into mice.  
<sup>2)</sup>Survival ratio expressed as the percentage of No. of alive mice to No. of all tested mice.

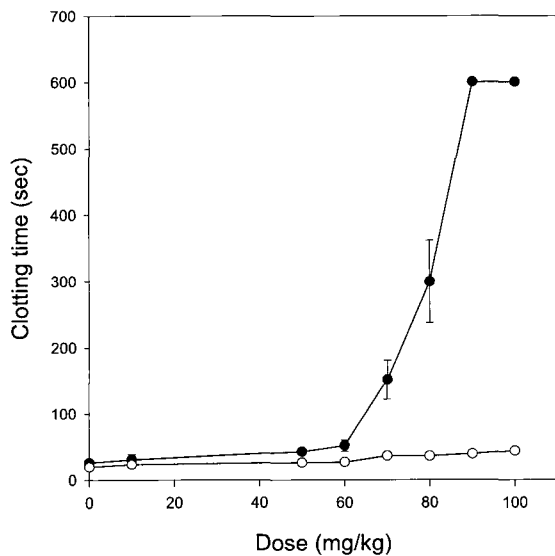


Fig. 2. *Ex vivo* effect of CF-30-IV on anticoagulant activity in mice injected intravenously. CF-30-IV was administered intravenously into the tail veins at different dose. Values represent the mean  $\pm$  SD (n = 8). Control clotting time of aPTT, TT was 29 sec and 11 sec. ●: Activated partial thromboplastine time (aPTT), ○: Thrombine time (TT).

혈액응고 시간은 aPTT 29 sec, TT 11 sec인 반면 시료를 투여 한 실험구 중 aPTT는 60 mg/kg 이상의 농도에서 비례적으로 급격히 혈액응고 시간을 지연시켰으며 TT의 영향은 미미하였다. 임상적으로 혈액 응고 이상이 있다고 판정되는 환자의 혈액 응고 시간은 정상인의 응고 시간의 30% 이상임을 고려할 경우 청각의 약산성 추출물인 CF-30-IV는 70 mg/kg 농도에서도 유의적인 항응고효과를 나타냄을 알 수 있었다.

*Ex vivo* 상에서의 생체 내 잔존 활성

CF-30-IV의 시간 경과에 따른 생체내 잔존 항응고 활성을 aPTT와 TT로 측정 한 결과(Fig. 3), CF-30-IV는 마우스 생체 내에서 시료투여 2시간 후 항응고 활성이 최고로 증가한 후 급격히 감소하여 6시간 이후로는 낮게 유지됨으로써 CF-30-IV는 생체내 체류시간이 6시간이내로 쉽게 배설되는 물질임을 나타내었다.

경구투여에 의한 급성독성 효과

청각 추출물 CF-30-IV를 100, 500, 1,000 mg/kg 농도로 1일

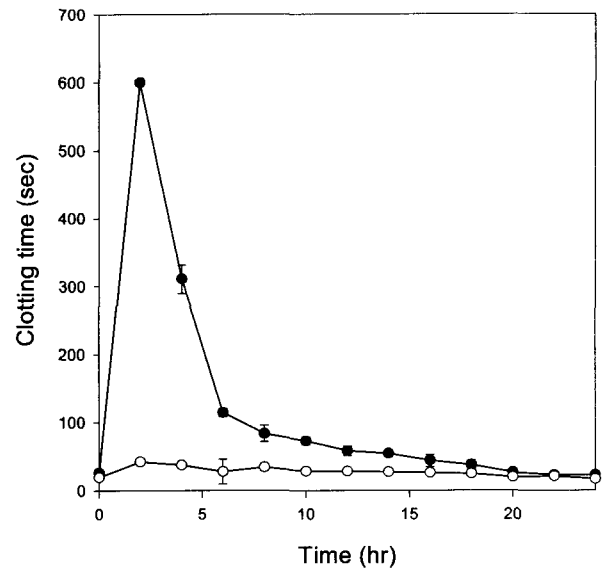


Fig. 3. Residual anticoagulant activity of CF-30-IV intravenously injected to mice. The two fractions were assayed for anticoagulant activity as aPTT (●) and TT (○). CF-30-IV was administered intravenously in the tail veins of mice at 100 mg/kg. Each control clotting time was 29 sec and 11 sec. Values represent the mean  $\pm$  SD (n = 5).

Table 6. Acute toxicity of CF-30-IV fraction by oral administration in mice

Group <sup>1)</sup>	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No. of survival	Survival ratio (%) <sup>2)</sup>
Control	6	30.2 $\pm$ 1.2	36.6 $\pm$ 1.45	6	100
100 mg/kg	6	29.8 $\pm$ 1.1	35.4 $\pm$ 1.3	6	100
500 mg/kg	6	29.5 $\pm$ 0.9	36.5 $\pm$ 1.0	6	100
1000 mg/kg	6	29.9 $\pm$ 1.3	34.8 $\pm$ 1.4	6	100

<sup>1)</sup>Sample was administered orally into mice.  
<sup>2)</sup>Survival ratio (%) expressed as the percentage of No. of live mice to No. of all tested mice.

1회 13일 동안 경구 투여하면서 관찰한 결과 Table 6과 같이 모든 군에서 체중이 증가하였고 생존율도 100%를 나타내었다. 외관 관찰시에도 모든 군에서 control과 같이 이상 증상을 보이지 않음으로써 청각추출물의 높은 안전성을 보였다.

## 요 약

청각에서 분리된 항응고 다당류의 혈액응고 저해기작을 검토하였다. 항응고성 다당 획분(CF-30-IV-ii, CF-30-IV)은 내인성 경로와 공통 경로에서 농도 의존적으로 작용한다. 항응고 획분(CF-30-IV-ii)은 내인성 경로의 factor assay시 lupus anticoagulant 항체의 활성에 영향을 주지 않았으나 응고과정 중 factor VIII, IX, XI, XII의 활성을 저해하였다. CF-30-IV-4-ii는 농도 의존적으로 fibrin을 생성시키지 않음으로써 thrombin에 직접 작용하지 않는 antithrombin III 의존적 항응고 활성 기작을 보였다. 청각의 항응고 활성은 factor assay와 thrombin의 저해 양식을 고려해볼 때 antithrombin III의 활성을 증대시켜 혈액응고 인자 중 serine proteinase의 활성을 저해함으로써 항응고 활성을 나타내는 물질로 판명되었다. CF-30-IV획분의 *in vivo* 활성을 측정된 결과 꼬리정맥주사에 의해 150 mg/kg의 농도로 마우스에 투여시 thrombin에 대한 100%의 항치사성 효과를 나타내었다. 또한 CF-30-IV를 마우스의 꼬리정맥에 주입하고 혈액을 채취 *ex vivo* 상에서 항응고 활성을 측정된 결과, 생체내에서 100 mg/kg의 농도까지도 시료량에 의존하는 항응고 활성을 보였다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발과의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과와 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

- Richard L, Mueller MD. 1994. History of drugs for thrombotic disease. *Circulation* 89: 432-450.
- Chen YL, Wang TC, Liang SC, Teng CM, Tzeng CC. 1996. Synthesis and evaluation of coumarin alpha-methylene-gamma-butyrolactones: a new class of platelet aggregation inhibitors. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 44: 1591-1595.
- Jappe U, Reinhold D, Bonnekoh B. 2002. Arthus reaction to lepirudin, a new recombinant hirudin, and delayed-type hypersensitivity to several heparins and heparinoids, with tolerance to its intravenous administration. *Contact Dermatitis* 46: 29-32.
- Hook M, Bjork I, Hopwood J, Lingahl U. 1976. Anticoagulant activity of heparin: Separation of high activity and low activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin. *FEBS Letter* 66: 90-93.
- Kenneth AB. 1995. Natural anticoagulants and prothrombotic state. In *Blood*. Lippincott JB Company, Philadelphia. p 125.
- Jaques LB. 1979. Heparins: Anionic polyelectrolyte drugs. *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 31: 99-166.
- Koo JG, Jo KS, Do JR, Woo SJ. 1995. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria* in Korea. *J Korea Fish Soc* 28: 227-236.
- Kim JG, Seo HS, Cho HY, Yang HC. 1998. Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1204-1210.
- Yoon JA, Yu KW, Jun WJ, Cho HY, Son YS, Yang HC. 2000. Screening of anticoagulant activity in the extracts of edible seaweeds and optimization of extraction condition. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1098-1106.
- Arasaki S, Arasaki T. 1983. *Vegetables from the sea*. Japan Pub., Tokyo. p 169-189.
- Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatographic method for determination of aldose and uronic acid constituent of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol* 49: 926-936.
- Dodgson KS, Price RG. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 84: 106-110.
- Park MK, Kweon MH, Cho HY, Yang HC. 1999. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Codium fragile*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 140-146.
- Kiyohara H, Cyong JC, Yamada H. 1989. Relationship between structure and activity of anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydr Res* 193: 193-200.
- Fox I, Dawson A, Loynds P, Eisner J, Findlen K, Levin E, Hanson D, Mant T, Wagner J, Maragaonre J. 1993. Anticoagulant activity of Hirulog<sup>TM</sup>, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Thromb Haemost* 69: 157-163.
- Takahashi O. 2000. Characteristics of rat platelets and relative contributions of platelets and blood coagulation to haemostasis. *Food Chem Toxicol* 38: 203-218.
- Chi CW, Liu HZ, Liu CY, Chibber BA, Castellion FJ. 1989. The inhibition of the enzymatic activity of blood coagulation and fibrinolytic serine proteases by a new leupeptin-like inhibitor, and its structural analogues, isolated from *streptomyces griseus*. *J Antibiotics* 42: 1506-1512.
- Metzig C, Grabowska E, Eckert K, Rehse K, Maurer HR. 1999. Bromelain proteases reduce human platelet aggregation *in vitro*, adhesion to bovine endothelial cells and thrombus formation in rat vessels *in vivo*. *In vivo* 13: 7-12.
- Broersma RJ, Kutcher LW, Heminger EF, Krstenansky JL, Marshall FN. 1991. Antithrombotic activity of a novel C-terminal hirudin analog in experimental animals. *Thromb Haemost* 65: 377-81.
- Suzki N, Kitazoto K, Takamatsu J, Saito H. 1991. Antithrombotic and anticoagulant activity of depolymerized fragment of the glycosaminoglycan extracts from *Stcrops japonicus* Sienka. *Thrombosis and Haemostasis* 65: 369-373.
- Lee JI, Lee HS, Jun WJ, Yu KW, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. 2000. Anticoagulation activity pattern and *in vivo* test of extract from *Eugenia caryophyllata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 543-548.
- Guglielmone HA, Agnese AM, Nunez Montoya SC, Cabrera JL. 2002. Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaveria bidentis*. *Thrombosis Res* 105: 183-188.
- Hotchkiss KA, Chesterman CN, Hogg PJ. 1994. Inhibition of heparin activity in plasma by soluble fibrin: evidence for ternary thrombin-fibrin-heparin complex formation. *Blood* 84: 498-503.
- Permpikul P, Rao LV, Rapaport SI, Sammel IR. 1994. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and

- $\beta$  2 glycoprotein in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 83: 2878-2892.
25. Laurence AH. 1995. Principles and practice of hematology, antiplatelet and anticoagulant therapy. In *Blood*. JB Lippincott Company, Philadelphia. p 56.
26. Rogalski J, Dawidowicz AL, Wiater A, Gibula K, Winiarczyk S. 1998. The preparation of specific sorbents with polyclonal antibodies as a ligand for purification of human, antithrombin III. *Acta Microbiol Pol* 47: 153-65.

(2002년 7월 19일 접수; 2002년 10월 10일 채택)