

감꼭지로부터 혈액응고저해물질의 정제와 특성

사유선 · 김경아[§] · 최혜선[†]

울산대학교 생명과학부

Purification and Characterization of Anti-Coagulant Activity Fraction from Persimmon Stem

You-Seon Sa, Kyung A Kim[§] and Hye-Seon Choi[†]

Dept. of Biological Sciences and Immunomodulation Research Center,
University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

Abstract

Persimmon has been considered to have therapeutic values for various diseases in Korea. Dried persimmon has been applied to wounded parts for anti-inflammatory and analgesic activities. Anti-coagulant fraction from Persimmon stem was purified through gel filtration, phenyl Sepharose, DEAE-Sephadex, and additional gel filtration column chromatographies. Its molecular weight was estimated to be 130,000~180,000. By element analysis, its main components were C, H, and O. The anti-coagulant was heat-stable and completely inhibited after periodate oxidation, indicating that it was a complex carbohydrate

Key words: persimmon stem, anticoagulant, carbohydrate

서 론

감은 예전부터 우리나라에서는 제사에 사용할 뿐만 아니라 가을철 풍경속에 등장하는 친근한 과일로 알려져 있다. 일본, 중국 등의 동아시아에서는 감의 용도를 과일뿐만 아니라 민간약으로도 사용해 왔다. 동의보감이나 향약집성방에 의하면 감은 종기나 염증질환, 부스럼, 화상을 치료하고 고혈압을 예방하고 동맥경화에 효능이 있다고 알려져 있다. Uchida 등(1)에 의하면 tannin은 혈압강하에는 직접효과가 없으나 고혈압 쥐의 수명을 연장시키고 뇌졸중이 일어나는 빈도를 낮추었다. Kameda 등(2)은 잎의 flavonoid 성분들도 혈압강하에 작용하는 Angiotensin converting enzyme(ACE) activity에 약간의 저해작용이 있는 것을 시사하고 있다. Okonogi 등(3)은 감의 tannin성분이 뱀의 독과 박테리아의 toxin을 제거한다고 보고되고 Hibasami 등(4)에 의하면 감 추출물은 human lymphoid leukemia Molt 4B cell에 투여시 세포의 성장저해와 세포자살을 유도하는 것을 보여주고 있어 감추출물에 항암 효과를 가진 성분이 있을 것을 예시하고 있다. 감은 과일 중에 오랜 역사를 가지고 있지만 가공 이용 면에서는 뒤떨어졌고 구미에 일찍 소개되지 않은 결과로 최근 들어 기초적 영양학적 지식을 넘어선 생리적 효용성에 대해서는 과학적 연구가 거의 이루어지지 않았다. 단감의 생리적

유효성분이 구체적으로 어떠한 약리적 기능을 발휘하는가를 밝혀냄으로써 감의 소비확대의 전기를 마련할 수 있고 감을 일반기호식품에서 건강식품으로 이용하여 부가가치를 높일 수 있다.

피의 응고는 fibrinogen이 thrombin 가수분해에 의해 일어나고 plasmin에 의해 효율적으로 제거되어진다. 정상적인 상태에서는 응고와 용해의 기작이 정교하게 조절되고있으므로 체내의 항상성을 유지하고 있다. 그러나 노화, 질병에 의해 균형이 깨지면 혈관폐색 등에 의한 심혈관계 질환과 뇌혈관 질환을 초래하게된다. 우리나라에서도 식생활의 서구화에 의해 최근 들어 혈관계질환에 의한 사망이 암에 이어 2위를 차지하면서 이를 예방, 치료하기 위해 다방면의 관심이 쏟아지고 있다. Thrombin은 혈소판활성화(5), fibrin 생성(6), 응고인자의 활성화(7-9) 등에 관여하여 혈액의 응고뿐만 아니라 세포내의 여러가지 조절기능을 담당하고 있다(10-14). 그런 이유로 antithrombotic agent는 심각한 심혈관질환과 뇌혈관 질환치료제 개발에 유망하다고 사료된다 (15-17).

본 연구에서는 전 연구(18)에서 발견한 단감꼭지에서 고혈압, 동맥경화를 완화시키는데 관여할 수 있는 혈액응고저해물질을 사람의 혈장을 thrombin으로 응고를 유도시키는 assay에 의해 정제하고 이것이 어떤 물질인지에 대한 특성을 연구했다.

[†]Corresponding author. E-mail: hschoi@mail.ulsan.ac.kr
Phone: 82-52-259-2357, Fax: 82-52-259-1694

[§]This person is supported by BK21 of UOU (2003).

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에 사용한 단감은 시중의 슈퍼마켓에서 구입하여 사용하였다. 사람의 혈장은 건강한 자원자의 것을 사용했고 YM10 membrane은 Amicon에서 thrombin, sodium borate, boric acid, activated partial thromboplastin time kit, CaCl₂, fibrinogen, Sephadex G-100, Sephadex G-150, DEAE-Sephadex A-50은 Sigma Chemical Co(St. Louis, USA)에서 구했다. 원소분석은 울산대학교 공동기기센터에서, 당분석은 대덕의 기초과학지원연구소에서 행해졌다.

혈액응고저해물질의 정제

단감의 유효성분중 물에 녹는 분획을 추출하기 위해 단감의 꼭지부분을 잘게 잘라 10 mM Tris-HCl, pH 7.5에 넣은 후 ice-chilled bead beater(Bio-Spec)를 이용하여 5분간 pulse를 주고 homogenization시켰다. Homogenate는 A-8.24 rotor를 이용한 T-324 refrigerated centrifuge를 이용하여 10,000 × g에서 40분간 원심분리시켜 상등액을 얻어냈다. 혈액응고저해물질을 저해하는 물질을 불활성화시키기 위해 상등액을 60°C에서 15분 열처리했다. 상등액을 분자량 10,000 dalton을 기준으로 가르기 위해 YM-10 membrane을 이용한 ultrafiltration을 시켜 10,000 dalton 이상의 물질을 농축하여 얻어냈다. 농축액을 gel filtration column인 Sephadex G-100에서 분리했다. 혈액응고저해물질이 있는 분획을 농축 후 hydrophobic column인 phenyl Sepharose(PS) column에 실어주었다. 혈액응고저해물질은 PS에 단단히 부착되어 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 용출시에 PS에서 떨어졌다. Ultrafiltration으로 다시 농축시키고 buffer exchange를 통해 염을 제거하고 anion exchanger인 DEAE-Sephadex A-50에 실어준 후 NaCl로 용출시켰다. 농축 후 gel-filtration column인 Sephadex G-150에서 마지막으로 분리했다. 정제시 혈액응고저해는 thrombin time의 저해를 통해 측정했다.

혈액응고저해활성측정

건강한 자원자의 피(54 mL)를 6 mL의 3.8% sodium citrate에 넣어 잘 섞어주었다. Plasma는 초기의 피를 400 × g, 10 min에서 원심분리하고 800 × g, 20 min에서 두 번째 원심분리하여 나머지 혈소판을 제거했다. Activated partial thromboplastin time(APTT)과 thrombin time(TT)은 420 nm에서 흡광도의 증가에 의해 측정되었다. APTT assay는 1 mL에 0.3 mL의 platelet poor plasma, 0.3 mL의 APTT reagent와 다양한 농도의 분획을 포함했다. 반응용액은 37°C에서 2분간 배양하고 반응은 8 μL의 1 M CaCl₂을 첨가하여 시작했다. TT는 APTT 시약과 CaCl₂를 빼고 반응이 thrombin (0.8 μg/mL)을 첨가하면서 시작했다. Clotting time은 흡광도의 증가가 급격히 일어나는 시간을 잡았다(ΔA420 > 0.010). 같은 방법이 snake venom, reptilase activity를 측정하기 위

해 사용되고 4 μg/mL의 reptilase가 thrombin 대신에 사용되었다. Fibrinogen clotting time을 위한 반응용액은 정해진 농도의 fibrinogen을 50 mM NaCl를 포함하는 0.2 M borate buffer, pH 7.8에 넣어주고 반응은 1 μg/mL의 thrombin을 넣어 주었다.

Periodate oxidation

혈액응고저해물질을 50 mM acetate buffer, pH 4.5에 용해시킨후 50 mM NaIO₄를 5 mL 가해 4°C의 암실에서 3일간 산화시켰다. 반응용액에 ethylene glycol을 5 mL 가해 1시간 동안 실온에서 방치후 증류수에 투석하였다. 투석액을 농축하여 20 mL로 만들고 20 mg의 NaBH₄를 첨가하여 실온에서 1시간 섞어주고 0.1 M acetic acid로 중화후 또 다시 투석했다. 동결건조후 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

감꼭지에서 혈액응고저해활성 분획의 정제

감꼭지를 파쇄 후 60°C, 15분 열처리하여 감꼭지의 혈액응고저해를 억제시키는 물질을 불활성화시킨 후 YM10 membrane filter를 사용하여 ultrafiltration으로 저분자분획을 확실하게 제거했다. 감꼭지는 분자량에 의한 분획을 나눈 후 anti-coagulant activity가 현저하게 증가되었는데 이는 저분자분획에 coagulation을 촉진시키는 물질이 존재하기 때문으로 사료되었다. 저분자분획에 의한 방해효과를 없애기 위해 10 mM Tris-HCl, pH 7.5를 넣어 다시 씻어준 후 농축액을 gel filtration column인 Sephadex G-100에서 분리했다. 혈액응고저해분획은 PS에 단단히 부착되어 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 용출시에 PS에서 떨어졌다. Sephadex G-150에서 마지막으로 분리된 정제된 분획을 dextran을 standard로 사용했을 때 분자량이 130,000~180,000 dalton 상태로 측정되었다. 정제시에 분자량의 변화를 보이는 것으로 미루어 감꼭지의 혈액응고저해물질은 heterogenōus carbohydrate로 존재하는 것으로 보인다.

감꼭지에서 혈액응고저해물질의 특성

정제된 분획의 분자적 특성을 규명하기 위해 urea와 iodoacetamide를 처리하고 trypsin, subtilisin을 처리하여 anti-coagulant의 활성의 변화를 보았을 때 거의 활성의 손실을 보이지 않았다(Fig. 1). Trypsin의 경우에는 특정부위를 잘라주지만 subtilisin의 경우는 비특정부위를 가수분해하기 때문에 이 결과는 혈액응고저해물질이 단백질은 아니라는 것을 시사하고 있다. 혈액응고저해물질이 당성분인지를 확인하기 위해 periodate oxidation 후의 활성의 변화를 측정시 99% 활성의 소실을 가져와 carbohydrate가 혈액응고저해물질로 작용하는 것으로 추정된다(Fig. 2). 구성분에 대한 정보를 얻기 위해 원소분석을 한 결과 Table 1과 같다. 감꼭지의 혈액응고저해물질은 C : H : O가 62 : 10 : 29이고 거의 N과 S

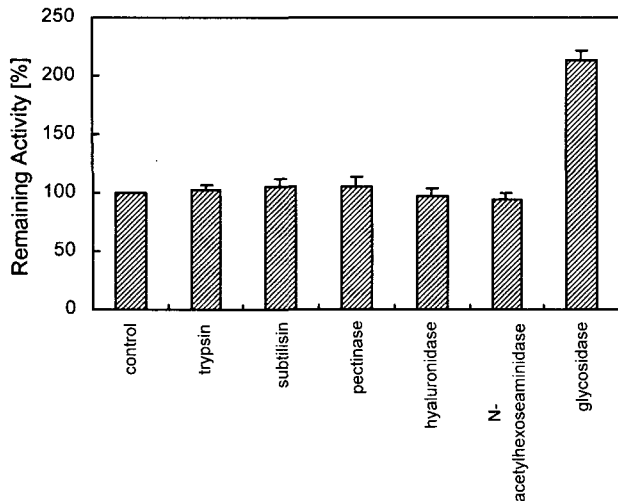


Fig. 1. Effects of various enzymes on anti-coagulative activity of persimmon stem.

The effect of each enzyme on anticoagulating activity was measured after treating purified anticoagulant with each enzyme for 16 h at 37°C. Thrombin time was measured by adding the extract to 0.3 mL of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25 ± 2.0 seconds. Each set of assay was performed in a single subject.

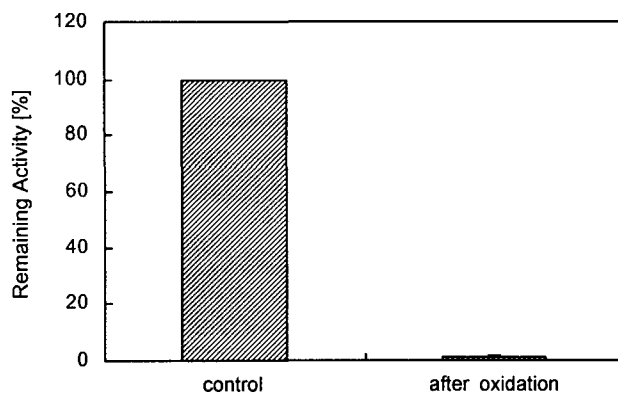


Fig. 2. Effects of periodate oxidation on anti-coagulative activity of persimmon stem.

Periodate oxidation was performed as described in Materials and Methods. Thrombin time was measured by adding the extract to 0.3 mL of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25 ± 2.0 seconds. Each set of assay was performed in a single subject.

Table 1. Element analysis of anticoagulant from persimmon stem

Element	C	H	N	S	O
Anti-coagulant from persimmon stem	61.8	10.0	0.2	0	28.8
Heparin	17.9	3.1	1.5	10.0	45.5

Element analysis was done by Ulsan University Analysis center.

를 보유하고 있지 않다. 대표적 혈액응고저해물질인 heparin 과 비교시 N, S가 거의 검출되지 않은 것으로 보아 positive control로 사용한 heparin과는 전혀 다른 구성분으로 이루어진 당성분으로 추정된다. 혈액응고저해물질의 당의 구성분에 대한 정보를 얻기 위해 중성당, amino당, 산성당을 위한 조건에서 acid hydrolysis 후 cellulase TLC에서 당의 존재를 확인하고 Bio-LC로 당분석시 Table 2와 같은 결과를 얻었다. 주로 glucose와 galactose로 이루어져 있고 약간의 amino당을 보유한 것으로 보인다. Heparin에서도 산성당이 낮은 비율로 검출되어 산성당의 존재가 저평가되어 검출되지 않았을 가능성도 배재할 수 없다. 감쪽지의 혈액응고저해물질이 다당류로 보여지므로 결합과 구성분에 대한 정보를 얻기 위해 감쪽지에서 정제된 혈액응고저해물질을 여러 가지 종류의 당과 반응하는 효소들과 반응시킨 후 활성을 측정시 Fig. 1에서 보는 것과 같이 처리한 효소들은 활성에 큰 영향을 주지 않았지만 glycosidase F 처리시에는 활성이 증가되어 활성이 있는 다당류에 부착된 단백질이 떨어져 나가면서 활성이 증가되는 것으로 보인다.

건조시의 감쪽지의 혈액응고저해물질 활성의 변화를 측정하기 위해 정제된 혈액응고저해물질을 40°C에서 evaporation시키거나 동결건조 후 활성의 변화를 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 evaporation시 103%, 동결건조시는 95%의 활성보유로 활성은 건조시 큰 변화를 보이지 않았다.

정제된 감쪽지의 혈액응고저해물질의 열에 대한 성질을 조사하기 위해 각 온도에서 15분간 처리 후 혈액응고저해 assay로 측정시 Fig. 4에서와 같이 50°C까지 거의 변화가 없었고 100°C에서도 15% 정도만 활성이 소실되었다. 이것으로 미루어도 감쪽지의 혈액응고저해물질은 열에 안정한 다당류로 보이고 열에 대한 안정성은 감을 이용한 기능성 가공식품을 만들 때보다 다양한 방법을 시도할 수 있는 유리한 점을

Table 2. Analysis of carbohydrate composition of anticoagulant from persimmon stem using Bio-LC

	Fuc	GalN	GluN	Gal	Glu	Man	NACNeu	GluC	Neu	IduC
6 N HCl/heparin			5.42							
6 N HCl/PSA			0.11	0.07	0.68					
TFA/heparin			0.59	0.06	0.04	0.04				
TFA/PSA			0.04	0.3	1.12	0.15				
0.1 N HCl/heparin										0.16
0.1 N HCl/PSA										

Analysis of carbohydrate was done by Basic Science and Research Center in Daeduk.

PSA, anticoagulant from persimmon stem; Fuc, fucose; GalN, galactoseamine; GluN, glucoseamine; Man, mannose; NACNeu, N-acetylneuramic acid; GluC, glucuronic acid; Neu, Neuramic acid; IduC, iduronic acid.

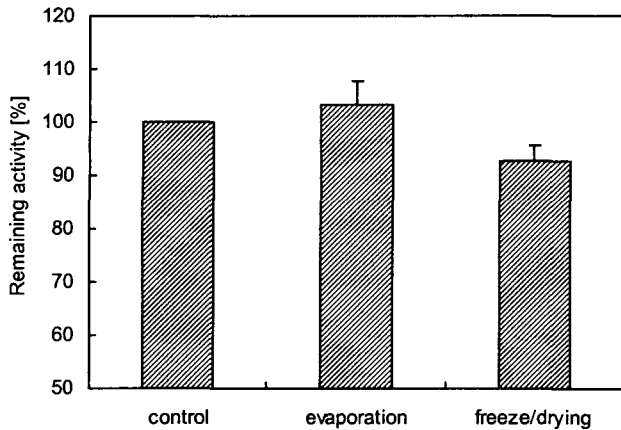


Fig. 3. Effects of drying on anti-coagulative activity. Drying of anticoagulant was done by evaporation by heat or freeze-drying. Thrombin time was measured by adding the extract to 0.3 mL of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25±2.0 seconds. Each set of assay was performed in a single subject.

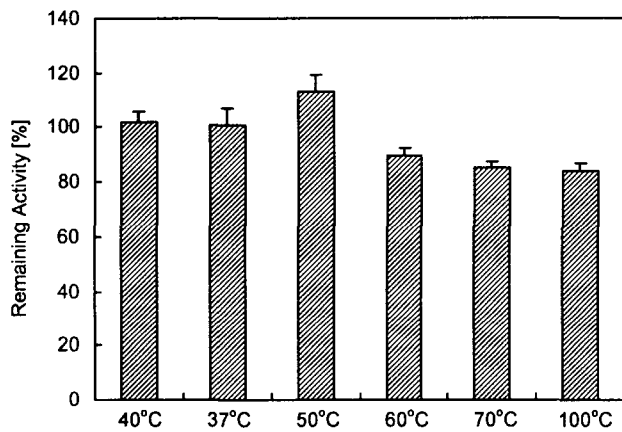


Fig. 4. Effects of temperature on anti-coagulative activity. Anticoagulant was incubated at each indicated temperature for 15 min. Thrombin time was measured by adding the extract to 0.3 mL of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25±2.0 seconds. Each set of assay was performed in a single subject.

제공한다. 혈액응고저해물질의 생물학적 특성은 현재 본 연구실에서 연구 중이다.

요 약

감은 예전부터 민간약으로 증기나 염증질환, 치질에 곱감을 이겨 붙였고 부스럼이나 화상에는 불에 말린 감을 바르면 통증을 멎게 하고 새살을 돋게 하는 효능이 있고 고혈압을 예방하고 동맥경화에 효과가 있는 성분이 있다고 알려져 있다. 사람의 plasma에서 thrombin time(TT)를 사용한 혈액응고저해 assay를 이용하여 감꼭지에서 혈액응고저해물질을 겔여과크로마토그래피, 소수성크로마토그래피, 음이온교

환크로마토그래피, 또 한번의 겔여과크로마토그래피를 통해 정제했다. 감꼭지의 혈액응고저해물질은 분자량이 130,000~180,000으로 거대분자이고 구성분은 C, H, O로 구성되어 있고 periodate oxidation시 거의 활성이 소멸되고 열에 안정하며 주로 glucose와 galactose로 구성된 다당류로 추정된다.

감사의 글

본 연구의 수행은 2003년 울산대학교 특성화연구비에 의해 행해졌다.

문 헌

1. Uchida S, Ozaki M, Akashi T, Yamashita K, Niwa M, Taniyama K. 1995. Effects of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (green tea tannin) on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 302-323.
2. Kameda K, Takaku T, Okuda H, Kimura Y, Okuda T, Haitian T, Agata I, Arichi S. 1987. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J Natl Prod* 50: 680-683.
3. Okonogi T, Hattori Z, Ogiso A, Mitsui S. 1979. Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon* 17: 524-527.
4. Hibasami H, Achiwa Y, Fujikawa T, Komiya T. 1996. Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Res* 16: 1943-1946.
5. Stubbs MT, Oschkinat H, Mayr I, Huber R, Angliker H, Stone SR, Bode W. 1992. The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity. *Eur J Biochem* 206: 187-195.
6. Tsiang M, Lentz SR, Sadler JE. 1992. Functional domains of membrane-bound human thrombomodulin. EGF-like domains four to six and the serine/threonine-rich domain are required for cofactor activity. *J Biol Chem* 267: 6164-6170.
7. Dahlback B. 2000. Blood coagulation. *Lancet* 355: 1627-1632.
8. Yao SK, McNatt J, Anderson HV, Eidt J, Cui KX, Golino P, Glas-Greenwalt P, Maraganore J, Buja LM, Willerson JT. 1992. Thrombin inhibition enhances tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis and delays reocclusion. *Am J Physiol* 262: H374-379.
9. Weksler BB, Ley CW, Jaffe EA. 1978. Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *J Clin Invest* 62: 923-930.
10. Cunningham DD, Wagner SL, Farrell DH. 1992. Regulation of protease nexin-1 activity by heparin and heparan sulfate. *Adv Exp Med Biol* 313: 297-306.
11. Olson STI, Bjork R, Sheffer PA, Craig J, Shore D, Choay J. 1992. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J Biol Chem* 267: 12528-12538.
12. Orbe J, Montes R, Zabalegui N, Peruz-Ruiz A, Paramo JA. 1999. Evidence that heparin but not hirudin reduces PAI-1 expression in cultured human endothelial cells. *Thromb Res*

- 94: 137-142.
13. Trunen P, Mikkola T, Ylikorkala O, Viinikka L. 1996. Hirudin stimulates prostacyclin but not endothelin-1 production in cultured human vascular endothelial cells. *Thromb Res* 81: 635-639.
 14. Markwardt F. 2002. Hirudin as alternative anticoagulant—a historical review. *Semin Thromb Hemost* 28: 405-414.
 15. McClanahan TB, Ignasiak DP, Juneau P, Finkle C, Winocour PD, Gallagher KP. 1999. Antithrombotic effects of BCH 2763, a new direct thrombin inhibitor, in a canine model of venous thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 7: 301-306.
 16. Giardino EC, Costanzo MJ, Kauffman JA, Li QS, Maryanoff BE, Andrade-Gordon P. 2000. Antithrombotic properties of RWJ-50353, a potent and novel thrombin inhibitor. *Thromb Res* 98: 83-93.
 17. McClanahan TB, Hicks GW, Morrison AL, Peng YW, Janiczek-Dolphin N, Mertz TE, Sullivan ME, Morser J, Juneau PL, Leadley R. 2001. The antithrombotic effects of CI-1031 (ZK-807834) and enoxaparin in a canine electrolytic injury model of arterial and venous thrombosis. *Eur J Pharmacol* 432:187-194.
 18. Lee YC, Sa YS, Jeong C, Suh KG, Choi HS. 2001. Anti-coagulating activity of persimmon and its processed foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 949-953.

(2003년 6월 12일 접수; 2003년 10월 10일 채택)