

蟾蜍 추출물의 혈전 용해 활성에 대한 실험적 연구

강민석 · 김 신 · 임치혜 · 초재승 · 김효수 · 김일환 · 박혜선 · 서은희*

동신대학교 한의과대학 사상체질의학과교실

*대구대학교 한의과대학 사상체질의학과교실

Abstract

An Experimental Study on the Thrombolytic Activities of Holotrichia Extracts

Kang Min-Seok, Kim Shin, Yim Chi-hye, Cho Jae-Seung, Kim Hyo-Soo,

Kim Il-Hwan, Park Hye-Sun, Seo Eun Hee*

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-shin Univ

*Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany Univ

1. Objectives

This study was performed to find the activities and characteristics of purified thrombolytic enzymes from Holotrichia extracts.

2. Methods

In the first time, a coarse enzyme fluid was made by using the freedried Holotrichia extracts. After manufacturing total soluble proteins and purifying enzymes, it was evaluated the activities and characteristics of this enzyme's dissolving capability to fibrin and thrombus. This study was taken using azocasein assay, fibrin-plate method, native-PAGE and fibrin zymography.

3. Results

A soluble proteins were efficiently extracted from freeze-dried Holotrichia extracts. And, this purified enzyme had a ten times fibrinolytic capability compared with ustulation Holotrichia sample. In native PAGE and fibrin zymography, Holotrichia extracts showed the respectable fibrinolytic activity. Also, it had higher thrombolytic activities compared with general thrombolytic enzyme 'plasmin'. In experiment of various protease inhibitors of the purified enzyme from Holotrichia extracts on the azocaseinolytic activity, the enzyme was strongly inhibited by EDTA · EGTA, and weakly by APMSF · PMSF · TPCK.

4. Conclusion

Holotrichia extracts has the thrombolytic activities, and it will operate directly to fibrin-clot and thrombus.

Key Words : Holotrichia, Thrombolysis, Fibrin, Thrombus, Enzyme, Taeum-in

I. 緒 論

瘀血은 여러 원인에 의하여 血液의 정상적

인 生理機能이 失調되어 局部的 脈管 또는 臟腑 등에 瘀滯되거나 혈액이 脈外로 離經하여 체내에 留滯된 병리적 산물로써, 기혈운행 및 장부기능에 영향을 미쳐 다양한 질병을 야기하는 병리적 산물이자 주요 病因의 하나로 인식되고 있다¹⁻³.

이러한 어혈로 인한 질환의 치료는 주로 活

• 접수일 2007년 2월 22일 승인일 2007년 3월 30일
• 교신저자 : 임치혜
전남 순천시 조례동 1722-9번지 동신대한방병원 사상체질과
Tel : +82-61-729-7280 Fax : +82-61-725-1717
E-mail : lin9536@lycos.co.kr

血化瘀를 원칙으로 각각의 辨證에 따라 益氣活血·行氣活血·養血活血·止血活血·溫陽活血 등의 治法을 운용하며⁴, 치료약물로는 桃仁·紅花·當歸·川芎·三稜·牛膝·丹蔘 등 각종 活血劑가 사용되고 있으며, 최근에는 破血 作用이 강한 水蛭·蜈蚣·全蝎·蟾蜍·地龍 등의 蟲類 약물도 많이 활용되고 있는 추세이다⁵⁻⁹.

이 중 ‘蟾蜍’는 중국 後漢時代에 著作된 最初의 본초학서인 『神農本草經』에서 “蟾蜍, 味鹹微溫, 主惡血血瘀, 痺氣破折, 血在脇下堅滿痛, 月閉, 目中淫膚青翳白膜, 一名蝥蟾, 生平澤¹⁰”이라고 기재된 이후, 諸 문헌에서 인용되고 있다.

한편, 이제마 선생은 『東武遺稿』에서 “蟾蜍, 鹹溫在桑枯, 瘀閉脇堅不可無, 汁點眼翳開喉痺, 木刺癰瘡碎搗敷¹¹”라 하고, 제조를 太陰人 약물로 인식하였다. 아울러 『東醫壽世保元辛丑本』에서 ‘寒多熱少湯 加 蟾蜍 5-7개 (一名 蟾蜍敗毒散¹²’, 表證寒多者の 腹脹浮腫病에 ‘乾栗蟾蜍湯’, 裏證熱多者の 浮腫에 ‘葛根浮萍湯’, 裏證者の 허약인에 ‘拱辰黑元丹’^{12,13}에서 사용되는 예를 살필 수 있으며, ‘解肌大安湯’과 ‘四時丹’¹² 등에서도 제조를 사용한 예가 있다.

어혈과 관련한 연구로는 田^{14,15} 등의 ‘어혈의 개념에 관한 동의학적 고찰’, ‘鬱證·痰證·瘀證에 관한 문헌적 고찰’을 비롯하여, 活血 및 破血之劑를 혈전증에 이용한 많은 실험 연구 등이 있으며, 이러한 어혈의 특성에 관한 현대적인 방법을 통한 다양한 접근 방법은 의학적으로 중요한 의의를 가진다.

그 중 대표적인 접근 방법의 하나가 바로 혈전에 관한 연구이다¹⁶. 최근 혈전(thrombus)를 제거하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 아울러 기존의 혈전 용해제의 단점을 극복하기 위한 새로운 혈전용해 제제에 대한 연구도 진행되고 있다¹⁷.

이에 저자는 한약재에서 새로운 혈전용해 효소 개발을 위한 기초 연구의 한 방면으로 太陰人에 사용되는 蟾蜍로부터 혈전용해 효소

생산성을 조사하고, 蟾蜍 抽出物에서 혈전용해 활성을 가진 효소단백질을 分離·精製한 후, 정제된 효소단백질로부터 혈전용해 효소의 활성과 부분적인 특성을 확인하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 蟾蜍는 살아있는 흰점박이 꽃무지 애벌레(Larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*)를 충남 공주의 농가에서 구입하여 사용하였다.

2) 시약

실험을 위한 시약은 다음의 APMSF, PMSF, TLCK, TPCK, Aprotinin, EDTA, EGTA, Thrombin, Pepstatin-A, N,N-methylene-bis-arylamide, SDS, TEMED, Acrylamide, BSA, Trizma base, Azocasein, Agarose (이상 Sigma Co. U.S.A)와 Plasmin, Thrombin (이상 Calbiochem. Germany) 등을 사용하였으며, 그 외 사용된 시약들은 특급시약을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 검액 조제

(1) 추출물 조제

구입 즉시 동결시킨 蟾蜍 50g을 200ml의 25mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 넣어 4℃의 cold chamber 내에서 막자사발로 분쇄하여 균질화한 후, 4℃에서 6500rpm으로 30분 간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다.

(2) 조효소 용액의 조제

상층액 중의 이물질을 제거하기 위해 거즈를 이용해 여과한 후, -70℃로 처리된 100%의 에탄올을 조금씩 가하여 최종적으로 50%의 에탄올 농도로 적정하여 다시 1시간 동안 4℃에

서 교반한 후, 4℃에서 6,500rpm으로 30분 간 원심 분리하여 상층액을 채취하였다.

회수된 상층액에 -70℃로 처리된 100%의 에탄올을 조금씩 가하여 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 적정하여 1시간 동안 4℃에서 교반하여 12,000rpm, 4℃에서 20분 간 원심 분리하였다. 그리하여 형성된 침전물을 25mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 용해시킨 후, 불순물을 제거하기 위하여 12,000rpm, 4℃에서 5분 간 원심 분리하고 상층액을 회수하여 조효소용액으로 사용하였다.

2) 효소 활성도의 측정

(1) 단백질 분해 효소 활성

단백질 분해 효소활성은 azocasein이 분해되어 나오는 azo기의 양을 측정하여 단백질 분해 활성을 판정하는 azocasein assay법¹⁸을 변형하여 사용하였다.

즉, 1% azocasein(50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.0) 300μl에 제조 시료 50μl를 넣고 37℃의 항온수조에서 30분 간 반응시킨 후, 미리 차게 한 10%(W/V)의 TCA 용액 600μl을 넣고 즉시 혼합하였다. 이 혼합된 시료를 10분 동안 얼음에 놓아두어 반응을 정지시킨 다음, micro-centrifuge에서 원심 분리하고 상층액을 분리하여 366nm에서 흡광도를 측정하고, azocasein 표준곡선을 이용하여 단백질 분해활성을 환산하였다.

(2) 혈전 용해 효소 활성

혈전용해 효소활성의 측정은 기존의 혈전용해 효소인 plasmin을 표준 시료로 하였으며, fibrin plate 법¹⁹을 약간 변형하여 측정하였다.

즉, 25mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 fibrinogen의 최종 농도가 0.5%가 되도록 완전히 용해한 다음, 그 용액 5ml에 0.1ml의 100 NIH U/ml의 thrombin 용액을 첨가하여 잘 혼합한 후, 동일한 완충용액으로 만든 2% agarose 용액 5ml를 첨가하여 다시 잘 혼합하고 petri-dish에 부어 상온에 30분 간 방치하여 fibrin clot을 형성시켜 fibrin-agarose plate를 제조하였다.

그 후, 구멍을 뚫어 10μl의 제조 시료를 떨어뜨린 후 37℃에서 18시간 동안 반응시키고 난 다음, 형성된 투명환의 직경과 표준시료인 plasmin과 비교하여 측정하였다.

3) 단백질 정량

단백질 정량은 Bradford 방법²⁰에 의해 단백질 정량 Kit(Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하여 OD750에서 흡광도를 측정하였으며, 표준시료로는 Bovine-serum albumin(BSA)를 사용하였다.

4) 전기영동 분석과 Fibrin zymography

(1) 전기영동 분석

단백질의 전기영동 분석은 12% gel을 이용한 Laemmli 방법²¹을 변형하여 수행하였으며, native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)는 10% gel을 이용하여 수행하였다.

혈전용해 효소의 분자량을 표준단백질을 이용하여 상대적 이동도인 Rf 값과 분자량의 semi-logarithmic plot에 의하여 결정하였으며, 단백질은 Coomassie brilliant Blue R-250으로 염색하였고, 5% methanol과 7.5% acetic acid의 용액으로 탈색하였다.

(2) Fibrin zymography

Fibrin zymography는 Kim 등의 방법²²에 의하여 수행하였다. 즉, 0.12% fibrinogen과 100 μl의 thrombin 용액(100 NIH U/ml)을 함유한 12% polyacrylamide gel에 20μg의 시료를 zymogram sample buffer(5×)와 혼합하여 loading한 다음 12 mA로 4℃에서 전기영동을 수행하였다.

전기영동이 끝난 gel은 2.5% Triton X-100을 함유한 50mM Tris-HCl(pH 7.4)에 넣어 상온에서 30분 간 고정한 다음, 증류수로 세척한 후 효소반응 완충용액에 넣어 37℃에서 12시간 반응시킨 후 염색 및 탈색하여 확인하였다.

그리고 혈전용해효소에 해당하는 부분의 단백질을 추출하여 효소의 부분적 특성을 조사하였다.

5) 효소의 특성

(1) 최적온도 및 온도안정성

온도에 따른 효소의 활성도 변화를 알아보기 위하여 30℃에서 80℃까지 각각 10℃의 간격으로 1시간 동안 반응시킨 후 azocasein assay와 fibrin plate 방법을 수행하여, 각 온도에서의 단백질분해효소와 혈전용해효소의 활성변화를 측정하여 온도에 대한 효소의 안정성을 조사하였다.

(2) 각종 저해제의 영향

일반적인 protease 저해제로 알려진 APMSF, PMSF, TLCK, TPCK, EDTA, EGTA, Aprotinin, Pepstatin-A 등을 1~5mM의 농도로 50mM Tris-HCl(pH 7.4)용액으로 제조한 다음, 제조 추출물의 효소를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하여 활성을 비교하였다.

III. 실험 성적

1. 효소 활성도의 측정

(1) 단백질 분해 활성

단백질 분해 활성 실험은 4℃에서 수행하였으며, 동결 건조한 제조에서 침전물과 이물질은 제거하고 추출된 전체 수용성 단백질의 양상은 다음과 같다(Fig. 1).

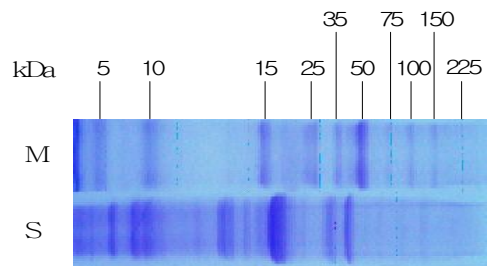


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total soluble proteins concentrated with 50-75% ethanol from *Holotrichia*. M lane, protein molecular weight marker; S, sample of *Holotrichia*.

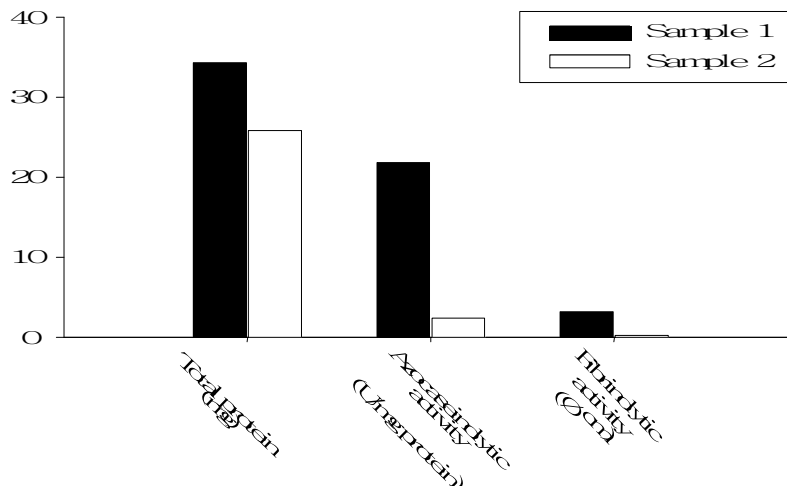


Fig. 2. Protease activities of total soluble proteins concentrated with 50-75% ethanol from *Holotrichia*. Sample 1, freeze-dried sample of live *Holotrichia*; sample 2, ustulation samples. One unit of azocaseinolytic activity is defined as the amount of enzyme which causes a net increase of 0.1 in absorbance at 366 nm in 1 hour.

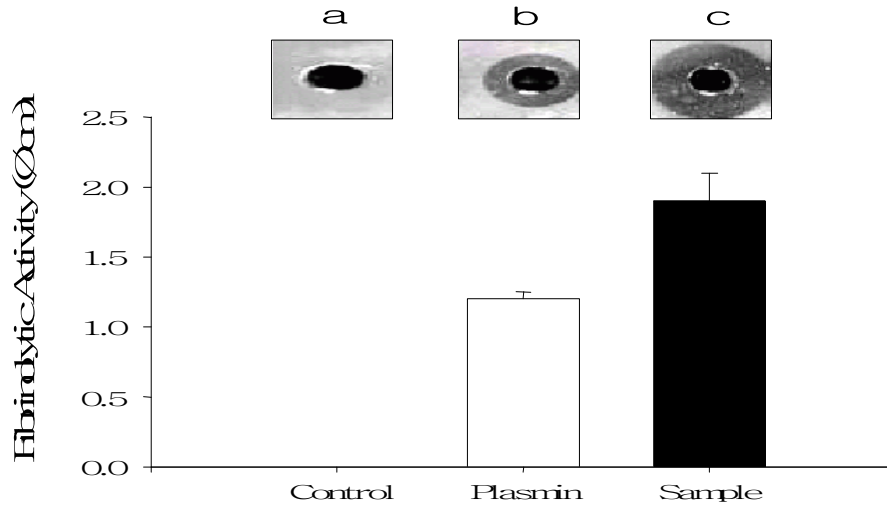


Fig. 3. Fibrinolytic activities on the fibrin agarose plate of *Holotrichia*. Upper figure presents fibrin agarose plate and lower figure presents fibrinolytic activities. a, 25 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) as negative control; b, plasmin as positive control; c, *Holotrichia* sample.

(2) 혈전 분해 효소

Azocasein 법 등을 이용하여 가열건조한 제조에서의 추출물과 동결건조한 제조로부터의 추출물의 수용성 단백질 분해 활성을 비교한 결과는 다음과 같다(Fig. 2).

2. 혈전분해 효소활성

제조 추출물에서의 혈전 용해 효소와 양성 대조군으로 사용한 精製된 혈전용해 효소인 plasmin을 비교하였을 때, 제조 추출물에서 더 높은 혈전 분해 효소 활성을 나타내었다(Fig. 3).

3. SDS-PAGE 및 fibrin zymography

전체 수용성 단백질에서 혈전용해 효소를 확인하고, 이를 분리하기 위하여 제조 추출물로부터 native PAGE를 시행하고, fibrin zymography를 수행한 결과로 다음과 같은 활성을 나타내었다(Fig. 4).

4. 각종 protease 저해제에 의한 영향

APMSF, PMSF, TPCK, TLCK, EDTA, EGTA, aprotinin, 그리고 pepstatin-A 등 protease 저해제

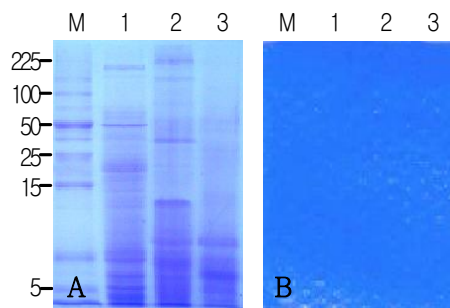


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and fibrin zymography of *Holotrichia*. M, lane of protein molecular weight markers; 1, 5 μ g; 2, 10 μ g; 3, 20 μ g. Zymogen analysis of purified protease for activity staining. Electrophoresis was performed with 8% native gel containing 0.8% fibrinogen and 100 NIH U/ml thrombin. Activities were detected by incubation at 37°C for 12 hours.

를 첨가하여 단백질 분해활성을 비교한 결과는 다음과 같다(Table 1 & Fig. 5).

특히 금속 이온의 chelate 제인 5mM의 EDTA와 EGTA에서는 활성이 비교적 강하게 나타났고, APMSF · PMSF 및 TPCK에서는 비교적 낮

Table 1. Effect of Various Inhibitors on the Azocaseinolytic Activities of the Protease of *Holotrichia*

Various Inhibitors of Protease	Relative Activity(%)	Remarks
APMSF	28.4±0.9 %	↓
PMSF	23.7±0.6 %	↓
TPCK	27.3±1.2 %	↓
TLCK	54.6±3.1 %	
EDTA	84.5±7.5 %	↑
EGTA	87.4±12.8 %	↑
aprotinin	46.8±1.2 %	
pepstatin-A	54.6±1.1 %	

은 저해효과를 보이는 특성을 나타냈다.

IV. 考 察

瘀血이란 瘀積不行하여 停滯되고, 汚穢不潔하여 血毒으로 작용하며, 혈관으로부터 離脫된 停留性 變性 혈액을 말하는 것으로, 병리적 상태에서서의 어혈과 순환장애의 병리적 상태변화인 血瘀로 구분할 수 있다²³.

즉, 어혈은 혈액이 여러 가지 원인에 의해 정상적인 生理機能을 상실하여, 체내 일정 부위에 혈액이 瘀滯되어 있는 病症으로, 국부의 혈관 또는 장부 등에 어체되거나 혈액이 脈外로 離經하여 체내에 유체된 병리적 산물로써, 기혈의 운행에 영향을 미치고 장부기능을 실조시켜 다양한 질병을 야기하는 병리적 산물인 동시에 중요한 병인의 하나로 인식되고 있다¹⁻³.

일반적으로 어혈의 발생 원인은 氣滯·氣虛·寒凝·熱毒·外傷·情志失調 등이 있으며, 이런 여러 가지 원인들이 상호 결합하여 어혈의 병증을 더욱 복잡하고 다양하게 할 뿐만 아니라, 어혈의 발생부위·병정 그리고 인체의 氣血運行 상태에 따라 임상증상도 다양하게 나타난다. 어혈로 나타나는 주요한 임상 증상으로는 固定性 刺痛·胸脇滿痛·小腹硬滿·發熱·咳喘·心悸·怔忡·健忘·癲狂·肢體麻木·黃疸·癰瘡·癰疽·積聚·皮膚甲錯

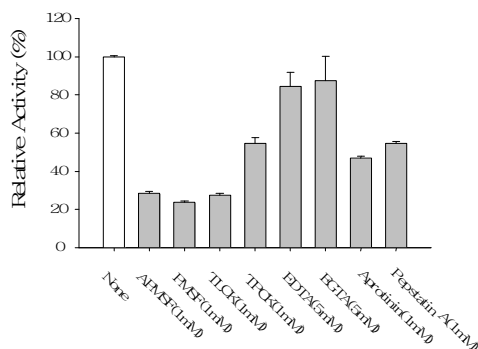


Fig. 5. Effect of various inhibitors on the fibrinolytic activities of the protease of *Holotrichia*. The protease was incubated in 25 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) at 37°C for 1 hour with various protease inhibitors. Azocaseinolytic activities were determined as described in the materials and methods section. One unit of azocaseinolytic activity is defined as the amount of enzyme which causes a net increase of 0.1 in absorbance at 366 nm in 1 hour.

· 瘀斑·脈弦澀 등이 있다^{4,24}.

이러한 어혈과 관련한 연구로는 혈액 순환계의 이상과 관련한 혈액응고성 증가, 혈소판 응집성증가 혹은 혈소판 유리기능의 항진 등이 있으며, 나아가 대사이상, 면역기능 이상, 염증반응 조직의 이상증식 등이 있다^{25,26}.

이 같은 연구의 대표적인 접근법 중의 하나가 혈전에 관한 연구이다.

혈전증(Thrombosis)이란 生體의 혈관 또는 심장 내에서 응고된 혈액의 덩어리, 즉 혈전(thrombus)을 만드는 현상을 말하는 것으로 폐색성 혈전증, 벽제성 혈전증 및 부패성 혹은 진균성혈전증이 있다²⁷.

혈액의 응고체계에서 혈전은 혈관의 수축과 함께 과도한 출혈을 방지할 수 있는 중요한 생체 기능의 하나이지만, 심장이나 맥관 내의 항응고체계와의 균형이 어긋나는 병적인 상태가 되면 혈액의 응고를 유발할 수 있게 된다^{17,28}.

혈전 형성 기전은 일반적으로 2 가지 기전으로 나눌 수 있다. 먼저, 수동기전은 내피세포

가 가지는 혈전형성에 대한 저항성과 내피세포 손상이나 탈락으로 인해 혈전형성 능력을 나타내는 내피하결합조직과 순환혈액을 격리시키는 작용에 의해 일어난다. 반면에 능동기전은 내피의 표면에 존재하거나 또는 활발하게 분비되는 항혈전성 인자 및 혈전촉진성 인자들에 의해 주로 일어난다¹⁷.

일반적으로 응고인자들은 불활성형으로 존재하지만, 어떤 요인으로 인하여 이들 중 한 가지 인자가 활성화되면 폭포와 같이 연속적으로 활성화하여 결국 최종산물로 불용성의 섬유소가 침착하게 된다. 그러나 정상 상태에서는 항혈전인자와 혈전촉진인자들이 평형을 유지하여 비혈전형성 표면을 유지하고 있다.

그러나 여러 자극에 의하여 와류가 생기면 혈액응고 및 혈전증을 일으키고, 항혈전기능이 항진되면 지혈이 안 되어 심한 출혈이 일어나기도 한다¹⁷.

즉, 혈관내피세포에서는 prostacyclin이 형성되어 혈소판 응집을 억제하고, thrombomodulin을 생산하여 thrombin과 결합하여 C-protein을 활성화시켜, plasminogen 활성물질을 생산하여 혈관 내 혈액응고를 방지한다.

그러나 어떠한 요인에 의해 혈관이 손상되어 출혈이 일어나면 혈관 내에서 생리적 방어 기작으로 지혈 반응이 일어나 혈액의 손실을 방지하게 된다. 혈관을 수축하여 출혈통로를 좁혀 지혈을 촉진하고, 노출된 혈관벽에 혈소판이 달라붙어 혈소판괴(platelet clot)를 만들어 지혈하도록 한다. 혈소판은 혈관벽의 collagen 섬유 등에 달라붙어 혈소판괴를 형성할 뿐만 아니라, 혈소판끼리 응집되는 과정에서 혈소판이 가진 여러 가지 물질을 유출시켜 더 많은 혈소판이 응집되도록 유도하고, 혈장 응고 과정에 직접 관여하여 혈괴(blood clot)를 형성한다. 혈액응고인자는 혈장을 응고시키고, 응고 억제인자는 이들 응고인자를 억제하여 혈액 내 응고를 조절한다^{17,29}.

이러한 혈장 응고계에 관한 연구로는 streptokinase와 urokinase 같은 plasminogen 활성 인자

가 매우 유용함이 알려져 있으며, 이들을 정맥 주사하여 혈전 용해제(fibrinolytic system)를 활성화하는 치료법이 지난 30여 년간 보편적으로 사용되어 왔다. 그러나 이들 약제를 실제로 사용하였을 때 혈전 용해에 상당한 효과가 있음이 이미 수많은 임상 예에서 입증되었으나, 혈전에 대한 특이성이 없으며, 치료 동안에 전신 출혈(systemic hemorrhage) 등의 부작용이 있다고 보고되었다^{17,29}.

이에 따라 최근 혈전을 제거하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있으며, 기존의 혈전용해제의 단점을 극복하기 위한 새로운 혈전용해제에 대한 연구도 함께 진행되고 있다¹⁷. 그러나, 현재까지의 연구에 의하면 미생물이나 동물에 비해 식물, 특히 한약재에 대해서는 혈전 용해 효소에 대한 연구가 아직 부족한 실정이다.

한의학에서의 최근 연구에 의하면 康³⁰은 혈전증을 어혈의 범주에 포함시켰는데, 주로 氣虛 · 氣滯 · 血毒 및 外傷 등의 병인에 의하여 지속적 刺痛 · 出血 · 腫塊 · 瘀斑 등이 나타나는 것으로 알려져 있고³¹, 어혈로 인하여 나타나는 諸 증상들은 혈전증과 유사한 점이 많으므로, 이런 측면에서 국내에서도 혈전증을 어혈과 연관시킨 많은 실험 연구들이 행해져 왔으며, 최근에는 어혈 치료제가 혈전증 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다³³⁻³⁸.

한편 제조(蟾蜍 : Holotrichia)는 풍뎅이과(Scarabacidae)에 속한 곤충인 검은 풍뎅이 및 同屬 近緣 곤충의 幼蟲인 굼벵이를 끓은 물에 담가 燙死시켜 햇볕에 말린 약재이다^{39,40}. 제조는 蟬 · 蟬蟻 · 應條 · 地蠶 · 蜚齊 등으로 불리어지며⁴⁰, 性은 微溫 無毒하며 味鹹하며 足厥陰肝經에 入한다. 또한, 破血行瘀 · 散結消腫 등의 효능이 있어 折損瘀痛 · 痛風 · 丹毒 · 癰疽 · 痔漏 등의 병증에 사용된다. 한편, 민간에서는 이 약을 單方으로 肝癌에 응용하고 있다³⁹.

‘蟾蜍’는 중국 後漢時代에 저작된 최초의 본초학서 『神農本草經』에서 “蟾蜍, 味鹹微溫, 主惡血血瘀, 痺氣破折, 血在脇下堅滿痛, 月閉,

目中淫膚青翳白膜, 一名蟬蟠, 生平澤¹⁰”이라고 최초로 기재되었으며, 『名醫別錄』에서는 “寒, 有毒, 療吐血在胸腹 不去及破骨踠折血結, 金瘡內塞, 產後中寒, 下乳汁, 一名 蜚齊 一名 敦齊. 生河內及人家積糞草中, 取無時, 反行者良. 蜚亡爲之使, 惡附子”라 한 이후 諸 문헌에서 인용되었다⁴¹.

한편, 四象醫學 분야에서 蟬蟠은 이제마 선생에 의하여 太陰人 약물로 간주되어, 『東武遺稿』 「藥性歌」에 “蟬蟠, 鹹溫在桑枯, 癢閉脇堅不可無, 汁點眼翳開喉痺, 木刺癰瘡碎搗敷¹¹”라고 기재되어 있다. 한편, 『東醫壽世保元』 중에는 ‘寒多熱少湯 加 蟬蟠 5-7개’ (一名 蟬蟠敗毒散)¹², 表證寒多者의 腹脹浮腫病에 ‘乾栗蟬蟠湯’, 裏證熱多者의 부중에 ‘葛根浮萍湯’, 裏證者의 허약인에 ‘拱辰黑元丹’에서 제조를 이용한 경우가 볼 수 있으며, 또한 ‘解肌大安湯’과 ‘四時丹’ 등에서도 제조를 사용한 예가 있다.^{12,13}

기존의 제조를 이용한 어혈 및 혈전증과 관련하여 최근 여러 실험적 연구에서 제조가 혈전증 치료에 효과가 있다는 보고^{8,9,35,42-46} 외에, 한^{47,48} 등의 간과 관련한 연구 및 문⁴⁹의 신장과 관련한 실험 연구, 김⁵⁰의 항암 치료에 관한 연구와 제조의 기원에 대한 연구^{41,51} 등이 있다.

위의 CCl₄나 Bromobenzene, Oxidant 등에 의한 간장 및 신장 손상의 회복에 관한 실험에서 제조가 어느 정도 유효한 효과가 있을 것으로 보고되었으며, 홍^{35,42-45} 등은 혈전 연구와 관련하여 제조 추출물에서 혈전 용해 활성을 갖는 효소 단백질이 각각 30000 · 40000 및 75000 dalton의 분자량을 갖고 있는 것으로 보고하였으며, 이에 따라 제조나 蚯蚓 · 全蝎 등을 이용하여 경구 투여가 가능한 새로운 혈전 용해제의 개발 가능성을 제시하였다.

本 연구에서는 한약재에서 새로운 혈전용해 효소 개발을 위한 기초 연구의 한 방면으로 태음인에 사용되는 제조로부터 추출한 시료를 대상으로 혈전 용해 활성을 가진 효소단백질을 분리 · 정제한 후, 혈전 용해제인 plasmin과

비교하여 혈전 용해 효소의 활성과 부분적인 특성을 확인하기로 하였다.

먼저, 蟬蟠의 粗酵素溶液을 제조하기 위하여 동결 건조한 蟬蟠를 분쇄 · 균질화한 상층액을 50%의 에탄올 농도로 적정하여 1 시간 동안 4℃에서 교반한 다음 원심 분리하여 상층액을 회수하는 방법으로 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 적정하여 1시간 동안 원심 분리하였다. 형성된 침전물을 25mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 용해하고, 다시 원심 분리하여 불순물을 제거하고 상층액을 회수하여 조효소용액을 제조하였다.

우선, 조효소용액을 azocasein 용액 및 TCA 용액에서 반응시킨 후 원심 분리하여 흡광도를 측정된 결과 <Fig. 1>에서와 같이 동결 건조로부터 추출된 수용성 단백질이 효과적으로 추출되어 농축되었음을 알 수 있다.

혈전 분해 효소는 단백질 분해 효소의 일종으로 주로 serine-protease나 metallo-protease로 알려져 있어 혈전 분해 활성을 검증하기 위해서는 단백질 분해 활성 검증이 선행되어야 한다. 따라서, 동결 건조된 제조로부터 추출한 수용성 단백질로부터 azocasein 법 등을 이용하여 가열 건조된 제조 추출물과 비교하여 단백질 분해 활성을 검증한 결과는 <Fig. 2>에서 보는 바와 같다.

즉, 蟬蟠 추출물의 분해 활성 정도는 농축된 전체 단백질의 양에 비하여 azocasein 용해 활성의 경우에서 동결 건조 제조의 경우는 21.8 units/mg, 가열 건조 제조는 2.4units/mg으로 나타났다. fibrin 용해 활성의 경우에서 동결 건조 제조의 경우 3.2cm, 가열 건조 제조는 0.2cm로 나타났다. 따라서, 제조를 동결시킨 후 보관하였다가 실험에 사용한 경우에서 가열 건조하여 실험에 사용한 경우보다 10배 이상 강한 활성도를 나타낸 것으로 보인다. 홍^{35,42-5} 등의 실험에서는 건조 제조의 용해 활성도가 plasmin에 비하여 약 5배 정도 강한 혈전 용해능을 갖고 있다고 보고하였으며, 본 실험 결과와 비교하여 볼 때 동결 건조한 경우와 가열 건조한

경우에서의 혈전 용해능에 대한 보다 다양한 연구가 필요하리라 사료된다.

그리고, 제조의 혈전분해 활성은 fibrin agarose plate를 이용하여 각각의 추출물에 의하여 형성되는 투명환을 비교하여 확인할 수 있으며, 기존의 혈전용해제인 plasmin을 양성 대조군으로 하여 그 활성을 비교하였다.

<Fig. 3>에서 보는 바와 같이 동결 건조한 제조 추출물에서 혈전 용해 활성이 나타났으며, 기존의 혈전용해제인 plasmin에 비하여 더 높은 활성을 나타내었다. 또한, 제조 추출물로부터 native PAGE를 시행하고, fibrin zymography를 수행한 결과 <Fig. 4>에서 보는 바와 같이 활성이 나타났으며, 이를 통한 제조의 혈전용해 효소는 fibrin clot에 직접적으로 작용하는 혈전 용해 효소임을 확인할 수 있다.

마지막으로, 제조로부터 추출한 효소 단백질의 혈전용해효소 활성에 대한 저해 활성도 분석은 azocaseinolytic activity를 이용하였으며, APMSF · PMSF · TPCK · TLCK · EDTA · EGTA · Aprotinin · Pepstatin-A 등 각종 protease 저해제를 첨가하여 단백질 분해활성을 비교하였다.

이 중 APMSF · PMSF · TPCK 및 TLCK는 serine protease inhibitor이며, TLCK는 trypsin-like serine protease inhibitor, 그리고 TPCK는 chemotrypsin-like serine protease inhibitor로 알려져 있으며, aprotinin은 trypsin-like serine protease inhibitor에 해당하고, EDTA와 EGTA는 metallo-protease inhibitor이며, pepstatin-A는 acid protease inhibitor로 알려져 있다.

本 실험의 결과 APMSF · PMSF · TPCK · TLCK · EDTA · EGTA · aprotinin 그리고 pepstatin-A 등에 대한 저해활성도는 각각 $28.4 \pm 0.9\%$, $23.7 \pm 0.6\%$, $27.3 \pm 1.2\%$, $54.6 \pm 3.1\%$, $84.5 \pm 5.5\%$, $87.4 \pm 12.8\%$, $46.8 \pm 1.2\%$ 및 $54.6 \pm 1.1\%$ 로 나타났다. 이는 제조로부터 추출한 효소의 혈전분해활성이 비교적 높게 나타나는 것을 의미하며, 특히 serine protease 계통에 대하여 높은 혈전 용해 활성을 갖고 있을 것으로

여겨진다.

이와 같은 연구 결과를 통하여, 제조 추출물에서 분리 · 정제한 혈전 용해 효소 단백질은 비교적 높은 혈전 용해성을 갖고 있는 것으로 판단된다. 또한, 蟾蜍는 太陰人의 대표적인 破血行瘀하는 약재로서 태음인의 表裏 病證을 불문하고 어혈 또는 혈전으로 유발되는 여러 병증에 응용할 수 있을 것으로 생각되어지며, 이에 대한 보다 구체적인 연구 및 실험이 필요하리라 사료된다.

V. 結 論

四象醫學에서 태음인 약물로 사용되는 蟾蜍의 추출물에서 혈전 용해 활성을 가진 효소단백질을 分離 · 精製하고, 정제된 효소 단백질의 혈전 용해 활성 및 부분적인 특성을 확인하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 제조 추출물을 azocasein 용액 및 TCA 용액에서 반응시킨 후 원심분리하여 흡광도를 측정된 결과, 제조로부터 수용성 단백질이 효과적으로 추출되었음을 확인할 수 있었다.
2. 제조 추출물의 분해 활성 정도를 농축된 전체 단백질의 양에 비교하고, azocasein 용해 활성과 fibrin 용해 활성을 살펴볼 때, 동결건조한 제조 추출물이 가열건조한 경우에 비하여 10배 이상 강한 활성도를 나타내었다.
3. Fibrin agarose plate를 이용한 제조의 혈전 용해 활성은 기존의 혈전용해제인 plasmin에 비하여 더 높은 활성을 나타내었으며, native PAGE 및 fibrin zymography를 수행한 결과 역시 높은 혈전 용해 활성이 나타났다. 이에 따라 제조의 혈전 용해 효소는 fibrin clot에 직접적으로 작용할 것으로 추정된다.
4. 각종 단백질 분해 저해제에 대한 저해 활성도를 살펴볼 때, 제조에 비교적 강한 혈전 용해 활성이 있는 것으로 사료된다. 특히 serine-protease inhibitor 係에서는 비교적 낮은 저해 효과를 나타냈으며, metallo-protease inhibitor

係에서는 높은 저해효과를 나타내는 특이성을 보였다.

VI. 참고문헌

1. 周鷺永 編註. 中醫病因病機學. 일증사, 서울, 1987:238.
2. 문용준, 안규석, 최승훈. 東醫病理學. 고문사, 서울, 1990:74-76.
3. 김완희, 최달영. 臟腑辨證論治. 정보사, 서울, 1985:59, 371-375.
4. 俞芝江 編著. 瘀血證의診斷和治療. 상해과기, 상해, 1989:1-21.
5. 박창국. 熊膽 및 水蛭이 어혈병태모형에 미치는 영향. 동서의학. 1994;19(2):5-42.
6. 홍석, 변일. 水蛭에 대한 문헌적 고찰. 惠和醫學(대전대부속한방병원). 1993;1(1):55-66.
7. 김영안. 중풍 치료에 응용되는 竹瀝과 地龍의 효능에 대한 문헌적 고찰. 대전대학교논문집. 1993;2(1):91-104.
8. 문성환. 혈전증에 미치는 蟻蛭의 효능에 관한 실험적 연구. 서울. 경희대학교 대학원 석사학위 논문. 1992.
9. 안규석. 蚯蚓·水蛭·蟻蛭 및 蜈蚣이 혈전증에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999;11(2):92-101.
10. 吳普. 神農本草經. 의성당, 서울, 2003:215-216.
11. 권건혁. 國譯 東醫壽世保元 - 附錄 동무유고. 반룡출판사, 서울, 1999:280-328.
12. 元持常 原著, 김정렬, 양재원, 정준민, 한동윤 共譯. 東醫四象新編. 도서출판 정담, 서울, 2002:201-202, 219, 226.
13. 전국한의대 사상의학교실. 四象醫學. 집문당, 서울, 2004:414-37, 705-720.
14. 전병훈, 우원홍, 정우열. 瘀血의 개념에 관한 동의학적 고찰. 동의병리학회지. 1989;4:93-102.
15. 전병훈, 우원홍, 정우열. 鬱證·痰證·瘀證에 관한 문헌적 고찰. 동의병리학회지. 1989;4:103-112.
16. 陳奇主 編. 中藥藥理研究方法學. 인민위생출판사, 북경, 1993:494-5, 569-631.
17. 대한병리학회 편. 病理學. 고문사, 서울, 1995:112-124.
18. Patton, L.M., D. Pretzer, B. S. Schulteis, K. D. Saggart, K. D. Tennant and N. K. Ahmed. J. Biochem Biophys. Met. 1993;27(1):11-23.
19. Astrup, T. and S. Mullertz. The fibrin agarose plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 1952;40:346-351.
20. Bradford, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72:248-254.
21. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature. 1970:227, 680-685.
22. Kim, S. H. New trends of studying on potential activities of Doen-jang. Korea Soybean Digest. 1998;15(1):8-15.
23. 謝觀 編. 東洋醫學大辭典. 고문사, 서울, 1970:887, 961.
24. 宋鷺冰. 中醫病因病機學. 인민위생출판사, 북경, 1987:116-121.
25. 송경순. 관상동맥질환과 혈액응고 및 용해 억제인자와 관련된 환경 및 유전인자에 관한 연구. 보건복지부 보건의료기술개발사업. 보건복지부, 서울, 2001:6-17.
26. 허지희. 급성뇌경색에서 혈전용해 치료의 한계를 극복하기 위한 치료전략. 보건복지부 보건의료기술개발사업. 보건복지부, 서울, 2004:7-11.
27. 김춘원. 病理學. 신광출판사, 서울, 1983:66.
28. 신태양사 편집국 백과사전부. 原色 最新醫療大百科辭典. 신태양사, 서울, 1996:20:66-68.
29. Wyngaarden, J.B.. et al. Cecil Textbook of Medicine, 19th ed. WB Saunders ; Philadelphia. 1992:999, 1012.

30. 강순수. 한의학에서의 瘀血에 대한 개념. 한의학회지. 1984;5(1):138-140.
31. 대한동의생리학회 편. 東醫生理學. 경희대출판국, 서울, 1983:100-101.
32. 전병훈, 정우열. 실험적 血栓症이 미치는 한약재의 抗血栓效果에 관한 연구. 병리학회지. 1996;10(1):72-78.
33. 안종석, 황치원. 紅花의 抗血栓作用에 대한 실험적 연구. 대한한의학회지. 2000;21(4):47-54.
34. 백명현, 황영근, 정지천, 강정준, 김성훈. 쏜뱀 추출물이 혈전증·진저허혈 및 뇌세포독성에 미치는 영향. 동국대논문집. 동국대 한의학연구소. 1999;8(1):171-190.
35. 홍시내. 蟾蜍의 혈전 용해 효소 분리 및 그 특성에 관한 연구. 동국대대학원 석사학위논문. 1997.
36. 박민중, 이보라, 신용완, 이정은, 유동열. 牧丹散의 抗血栓 작용에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2004;17(3):1-13.
37. 임민철, 김동희. 玄胡索散의 抗血栓 작용에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(4):930-938.
38. 류동훈, 신용완, 김의일, 김수민, 이정은, 유동열. 紅花當歸散의 항혈전효과에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2006.
39. 신민교 編. 臨床本草學. 영림사, 서울, 1997:550.
40. 신길구. 申氏本草學-各論. 수문사, 서울, 1988:568-569.
41. 권승만. 『東醫壽世保元』에서 이용된 蟾蜍의 起源에 대한 문헌적 고찰. 동신대 대학원 석사학위논문. 2006:1-3.
42. 박현준. 蟾蜍로부터 혈전분해효소 45000 dalton의 精製와 그 특성에 관한 연구. 동국대 대학원 석사학위논문. 1998.
43. 강동희. 蟾蜍로부터 精製된 혈전용해효소의 효능에 대한 연구. 동국대 대학원 석사학위논문. 1998.
44. 반재완. 蟾蜍로부터 精製된 혈전용해효소의 효능에 관한 연구 - 분자량 30000dalton 을 중심으로. 동국대 대학원 석사학위논문. 1999.
45. 박태훈. 蟾蜍가 허혈·재관류에 의한 뇌손상에 미치는 영향. 동국대 대학원 석사학위논문. 1999.
46. 김용익. 蟾蜍가 CCl₄로 유발된 白鼠의 간손상 회복에 미치는 영향. 상지대 대학원 석사학위논문. 1995.
47. 한정훈. 蟾蜍가 Bromobenzene에 의한 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 동국대 대학원 석사학위논문. 1998.
48. 문상원, 정지천. 蟾蜍가 Oxidant에 의한 신장조직손상에 미치는 효과. 성인병학회지. 1997;12.
49. 김기열. 蟾蜍가 마우스 Natural Killer 세포 활성화에 미치는 영향. 동국대 대학원 석사학위논문. 1998.
50. 안태규. 蟾蜍에 대한 문헌적 고찰. 惠和醫學(대전대부속한방병원). 2001;10(1):95-102.