

구인(*Lumbricus rubellus*) 추출물의 혈전 분해 및 항혈전 효과

장정순* · 이철규 · 신장식 · 조일환 · 서정진[†]

*인하대학교 의과대학, 신평제약(주) 중앙연구소

(Received September 14, 1995)

Fibrinolytic and Anticoagulant Effects of Earthworm, *Lumbricus rubellus*, Extracts

Chung Soon Chang*, Chul Kyu Lee, Jang Sik Shin, Il Hwan Cho
and Jung Jin Suh

*College of Medicine, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Central Research Institute, Shin Poong Pharm. Co., Ltd., Ansan, Kyunggi-Do 425-100, Korea

Abstract—The plasmin activity of euglobulin fraction treated with earthworm extract(EWE) increased concentration dependently when EWE(0.5, 1.0 and 2.0 mg each) were added to normal plasma. It was shown that lumbrokinase in EWE may be moved to euglobulin fraction and activated plasminogen. Also anticoagulation and fibrinolysis were studied when EWE(7.5, 30 and 120 mg/kg) were added to rat model. Prothrombin time (PT) were 19.7 ± 3.8 , 22.5 ± 2.5 and 24.5 ± 5.0 sec, activated partial thromboplastin time (APTT) were 25.7 ± 5.9 , 28.7 ± 5.2 and 36.5 ± 19.1 sec. After 15 days, the production of D-dimer were 242.3 ± 47.4 , 250.0 ± 11.9 and 205.8 ± 12.2 mg/ml plasma, respectively. These data showed that EWE acted on the coagulation factor of intrinsic and extrinsic system.

Keywords □ Earthworm, Fibrinolysis, Anticoagulation, PT, APTT, D-dimer.

지혈기전의 과민반응 또는 혈관벽 이상등의 원인에 의하여 혈소판들이 활성화 되면서 혈전이 생성, 축적 되면 이에 의하여 혈액의 원활한 흐름이 방해를 받아 각종 질병을 일으키게 된다. 이러한 혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장등 순환기계의 어느 곳에서도 발생할 수 있어 심근 경색증, 뇌졸중, 폐동맥 경색증 등의 심각한 혈전증 질환으로도 진전되며, 또한 미세 혈전들은 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병 등의 성인병 발현에도 관여되고 있다.¹⁾ 이러한 혈전증은 인류 최대의 사망원인의 하나로서 그 요인의 제거는 국내·외 제약 및 의료계에 있어서는 중대한 문제로 대두되어 왔고 국내에서도 뇌졸중, 심근 경색증, 심부정맥 혈전증 등이 급격히 증가되고 있는 것으로 알려지고 있다.²⁾ 옛부

터 동양에서는 혈전성 질환의 하나인 풍증 등의 개선과 치료에 구인을 복용한 것으로 알려져 있으며 가장 오래 과학 서적으로 알려진 중국의 神農本草經에도 열거되어 있을 정도로 그 약효가 오래전부터 알려져 왔다.³⁾ 그러나 이러한 구인의 약리학적 작용에 대하여는 최근까지 자세히 알려져 있지 않았으나 1983년 Mihara에 의하여 구인에서 섬유소용해 작용(fibrinolytic activity)을 가진 단백 분해효소의 일종이 추출되었으며 이 효소가 구인의 주된 약리 작용을 나타낸다고 알려져있다.⁴⁾ 즉, 구인추출물을 복용한 후 혈액 내 섬유소 용해 활성이 현저히 증가함이 관찰되어 구인을 원료로 하는 새로운 형태의 혈전 용해제의 개발 가능성이 시사되었다. 그 후 이러한 혈전용해 작용을 가진 물질이 lumbrikinase 라는 단백 분해효소임이 밝혀졌고, 나아가 이러한 혈전용해 효소들은 plasminogen의 매개 없이도 직접 fibrin을 용해하는 것으로

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0345-491-6191 (팩스) 0345-491-6193

밝혀지게 되었다.⁵⁾ 또한 이러한 혈전 용해작용의 단백질 분해효소는 분자량이 23~34 kD 정도이며 현재 6종류의 활성물질을 분리하는데 성공하여⁶⁾ 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 저자들은 구인 추출물의 직접적인 혈전 분해력 뿐 아니라 plasminogen activation 효과 및 혈전 생성의 내인계와 외인계 경로에 대한 효과를 알아보기 위하여 인위적으로 혈전을 유발시킨 모델을 통해 plasmin activity, D-dimer 및 prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) 변화량을 관찰하여 보았다.

실험방법

실험재료 - 구인은 기흥의 전문 사육장에서 구입한 한형동물문, 빈모강, 지렁이목, 뉘시지렁이과에 속하는 붉은 지렁이 (*Lumbricus rubellus*) 이며 증류수로 깨끗이 씻은 후 습식분쇄하고 원침시킨 뒤 여과하여 동결건조하였으며, 그 분말을 사용하였다.

시약 및 기기 - collagen, epinephrine, plasmin, plasmin substrate 등은 Sigma Chem. Co. (USA) 에서, D-dimer 정량 시약, APTT, PT 응고시간 측정 시약은 각각 Dimertest kit, Dade Thromboplastin C plus 및 Dade Actin Activated Cephaloplastin reagent로서 Baxter Diagnostics 사 제품을 구입하여 사용하였다. Ginkgo biloba extract는 Schwabe extracta KG, Karlsruhe로 부터 구입하여 사용하였고 APTT, PT 등 응고시간은 Aggrometer (Chronolog사, Aggro/link)로 측정 하였다.

실험동물 - 실험에 사용한 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐는 Charles River Japan 으로부터 구입하여 1주간 사육장에서 순화시킨 후 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취토록 하였고 사육실내의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 50~60%, 조명은 12시간 명/암 주기가 되도록 조절하였다.

Euglobulin의 분리 및 plasmin 활성 측정 - 정상 혈장 0.18 ml에 증류수 또는 구인 추출물 (25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml) 0.02 ml를 첨가한 후 37°C 에서 30 분간 반응시켰다. 반응 후 5 ml의 증류수를 첨가하고 1% AcOH 로 pH 5.8이 되도록 보정하였다. 4°C 에서 1시간 방치시킨 후 4°C 에서 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 침전물은 borate buffer (0.01

M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.16 M H_3BO_3 , 0.04 M NaCl, pH 7.8) 로 현탁한 후 동일량의 PT buffer (0.1 M Na_2HPO_4 , 2% Triton X-100, pH 7.2)를 첨가하였다. Euglobulin 용액 0.05 ml 과 합성된 plasmin 기질 (75 pmoles D-BUT-CHT-Lys-pNA-2AcOH) 0.05 ml 을 microcentrifuge tube에 넣고 37°C 에서 5분간 방치하였다. 반응은 0.05 ml의 acetic acid를 첨가하여 종결하였으며 405 nm 에서의 흡광도를 측정하여 효소 활성을 구하였다.⁷⁾ 효소활성 단위는 plasmin standard curve로부터 환산하여 표기 하였다.

혈전모델, 투약 및 채혈 - 실험 전 하룻밤 동안 절식 시킨 흰쥐 10마리를 1군으로하여 꼬리정맥에 collagen과 epinephrine 혼합액 (0.45 mg collagen + 0.045 mg epinephrine/kg)을 주사하여 혈전을 유발 시켰다. 혈전유발 후 15일 동안 구인추출물 (7.5 mg, 30 mg, 120 mg/kg)과 비교약물인 은행잎 추출물 (30 mg/kg)을 경구로 매일 단회 투여하였고, 투약전, 투약개시 3, 7, 11, 15일에 경추탈구하여 희생시킨 뒤 하대정맥으로부터 채혈하였다. 혈장은 채혈된 혈액에 3.2% sodium citrate를 9 : 1 비율로 첨가하여 혈액 응고를 방지한 후 4°C 에서 2,500 g로 10분간 원심분리하여 상층액으로부터 얻었고, 분석전까지 -20°C 에 보관하였다.

PT, APTT - 혈전유발 후 7일째 혈장의 응고시간을 측정하였다. PT는 혈장 0.15 ml를 37°C 에서 2 분간 방치시킨 뒤 Dade thromboplastin C plus 0.15 ml를 잘 섞은 후 응고시간을 측정하였다. 또한 APTT는 Dade Actin Activated Cephaloplastin reagent 0.15 ml를 37°C 에서 1 분간 방치 후 혈장 0.15 ml를 넣고 잘 섞어 방치하였다. 이후 0.02 M calcium chloride 0.15 ml를 넣어 잘 섞은 후 응고시간을 측정하였다.

D-dimer 정량 - 혈장내의 D-dimer는 Dimertest kit를 사용하여 측정하였다. 즉, 혈장 0.02 ml를 96 microplate well에 넣고 D-dimer 항체가 붙은 Latex 0.02 ml를 첨가한 후 부드럽게 흔들어 주어 응집을 유발하였다. Latex가 응집되어 일어난 혼탁도의 변화는 550 nm에서의 흡광도로 측정하였다. D-dimer의 정량은 이미 그 양이 정량된 양성대조 혈장을 사용하여 표준곡선을 작성하여 시행하였다.

통계처리 - 실험결과는 Student's t-test로 통계처리 하였다.

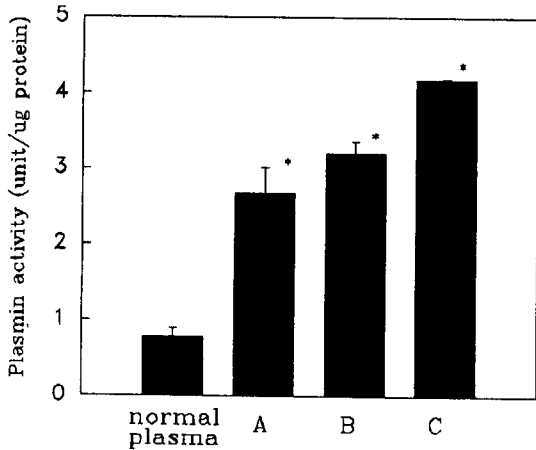


Fig. 1— Effect of earthworm extract(EWE) added into normal pooled plasma on the euglobulin fibrinolytic activity. Each value represents the average of three experiments.

*PA : EWE 0.5 mg, B : EWE 1.0 mg, C : EWE 2.0 mg.

결과 및 고찰

구인 추출물의 섬유소용해 효과

혈액계내의 섬유소 용해능을 평가하기 위해서는 먼저 혈장을 회석하고 산성화시켜 혈액내에 포함된 섬유소 용해계의 억제인자들을 제거한 euglobulin fraction을 만든 후 t-PA 활성, plasmin활성, fibrin 용해능등을 측정하여야 한다. 구인 추출물의 경구투여에 의해 혈액내의 섬유소 용해능 증가를 측정하기에 앞서 구인 추출물이 섬유소 용해계에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보았다. 정상혈장에 구인 추출물을 첨가하여 euglobulin의 plasmin activity의 변화를 관찰하여 Fig. 1의 결과를 얻을 수 있었다. Euglobulin의 plasmin activity는 농도 의존적으로 증가하였으며 또한 정상혈장에 구인 추출물을 첨가한 후 반응시간 없이 바로 euglobulin을 fractionation할 경우에도 추출물 농도에 의존적으로 euglobulin의 plasmin activity가 증가하였는데 그 활성은 반응시간이 주어졌을 때 보다 낮았다 (data 보이지 않음). Park^등은 혈장 ml당 1ug에서 100 ug의 구인추출물을 가한 후 euglobulin을 분리하여 fibrin plate의 용해면적을 계산한 뒤 섬유소 용해능을 알아보았으나, 구인 추출물 첨가에 의한 섬유소 용해능의 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 차이는 투여된 구인 추출물의 농도와 용해능을 평가하는 방법의 민감도 차이에 기인한 것으로 사료된다. 결론적으로 혈장과 구

인추출물과의 반응시간을 주지않았을 때 나타나는 plasmin activity의 증가는 구인 추출물에 함유된 lum-brokinase자체가 euglobulin fraction으로 이동한 것으로 사료되며, 또한 반응시간을 주었을 때 나타나는 더 많은 plasmin activity의 증가는 구인 추출물이 plasminogen을 직·간접적으로 증가시키는 것과 lum-brokinase가 이동되어 나타나는 상승효과로 추론된다.

PT, APTT의 변화

혈액의 응고계는 다단계의 혈액응고 cascade를 갖음으로 미세한 혈액응고 유발에도 이를 증폭하여 민감하게 반응할 수 있다. 혈관벽 손상과 같은 혈액응고 유발은 내인계 경로를 통하여 혈액을 응고시키며, 또한 외상 등에 의한 유발은 외인계 경로를 통하여 혈액을 응고시킨다. 내인계 유발에 의한 혈액응고 시간은 APTT로 측정하며, 외인계 유발에 의한 혈액응고 시간은 PT로 측정한다. 또한 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 되는 과정은 common pathway로, 이는 thrombin time (TT)으로 측정한다. 구인 추출물의 투여에 의해 혈액응고의 어느 인자가 억제되는지를 알아보기 위해 혈액응고 시간의 변화를 측정하였다. 흰쥐에 혈전제 (collagen+epinephrine, *iv*)를 투여하여 혈전을 유발시킨 후 7일간 구인추출물 (7.5, 30, or 120 mg/kg) 과 비교약물인 은행잎 추출물 (30 mg/kg)을 단회 경구투여하였으며, Normal control로는 정상적인 흰쥐의 PT와 APTT를 측정하였다. 각각에 대한 결과는 Table I에 나타내었다. Negative control 즉 혈전유발 물질로 처리한 흰쥐에서의 PT 및 APTT는 각각 18.4 ± 0.7 sec, 24.4 ± 4.3 sec로 Normal control에 비해 APTT는 변화가 없었으며 PT의 경우는 감소되었다. 비교약물로 쓰인 은행잎 추출물의 경우 PT보다는 APTT가 증가 되었고 구인 추출물의 경우 PT, APTT 모두 효과적으로 증가하였으며 비교약물인 은행잎 추출물과 같은 농도 (30 mg/kg) 로 투여하였을 경우 약 110%정도의 증가를 보였다. 이 결과로부터 구인 추출물이 외인계와 내인계 인자 모두에 대해 효과를 보이는 것으로 추측되나 구인 추출물의 주요 성분인 lum-brokinase는 fibrin에 직접 작용해 용해하거나 plasminogen을 plasmin으로 활성화시켜 fibrin을 용해시키므로 구인 추출물의 투여에 의해 혈액응고계의 common pathway에 작용할 가능성을 배제할 수 없으며 이는 앞으로 더 연구해야 할 것으로 사료된다.

Table I— Clotting time of Rat Plasma from Thrombotic Challenge (collagen plus epinephrine) with Oral Administration of Earthworm Extract

Group	PT(sec)	APTT(sec)
Normal control	21.6±1.3	24.0±4.2
Negative control	18.4±0.7	24.4±4.3
Ginkoglycoside (30 mg/kg)	18.2±0.6	25.9±4.5
Earthworm extract (7.5 mg/kg)	19.7±3.8	25.7±5.9
Earthworm extract (30.0 mg/kg)	22.5±2.5**	28.7±5.2*
Earthworm extract (120.0 mg/kg)	24.0±5.0	36.5±19.1

Mean±S.D.

*: Significantly different from negative control value at P<0.05

**: Significantly different from negative control value at P<0.01

D-dimer 양의 변화

Plasmin은 혈액응고의 최종단계에서 활성화되어 fibrin에 작용하여 분해산물을 생성하지만 fibrinogen에도 작용하여 여러가지 절편을 만든다 (1차선용). 이들은 FDP (fibrinogen and fibrin degradation products)라 불린다. Plasmin이 fibrinogen에 작용하면 여러가지 분해산물을 생성하는데, 이들은 X분획, Y분획, D분획, E분획으로 명명되어 있다. Fibrin으로 부터는 X분획 polymer, D분획 polymer가 생성된다.⁹⁾ FDP만의 측정으로 그것이 fibrinogen 유래인지 또는 fibrin 유래인지를 식별할 수 없으므로 2차선용 즉, fibrin clot의 용해에 의해 생성되는 D-dimer의 측정이 요구된다. 정상혈액 내 D-dimer의 양은 200 ng/ml 이하이다. 그러므로 혈액 내 D-dimer를 정량하여 혈액계내에 존재하는 혈전의 분해정도를 산정하므로써 혈전용해제의 기능 및 혈전증의 개선등을 파악할 수 있다.¹⁰⁾ 본 실험에서는 먼저 혈전 모델을 만든 후 제란 약제를 투여하여 혈전을 분해하도록 한후 채혈하여 혈액내 D-dimer를 정량하였는데, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 음성대조군과 ginkoglycoside를 투여한 군의 D-dimer는 정상수준인 150 ng/ml 수준에서 plateau를 형성하는 양상이었으나 구인 투여군 (7.5, 30, 120 mg/kg/day)의 경우에는 계속 증가하며 15일차에 각각 242.3±47.4, 250±11.9, 205.8±12.1ng/ml plasma에 달하여 비투여군이나 비교약물보다 생성된 혈전의 용해능이 촉진됨을 알 수 있었다.

결 론

섬유소 용해작용을 가진 구인 추출물에 대한 혈전용해 및 항 응고 효과를 알아본 결과, 정상 혈장에 구인 추출물을 농도에 따라 첨가한 뒤 혈장으로부터 eu-globulin fraction을 분리하여 plasmin activity를 측

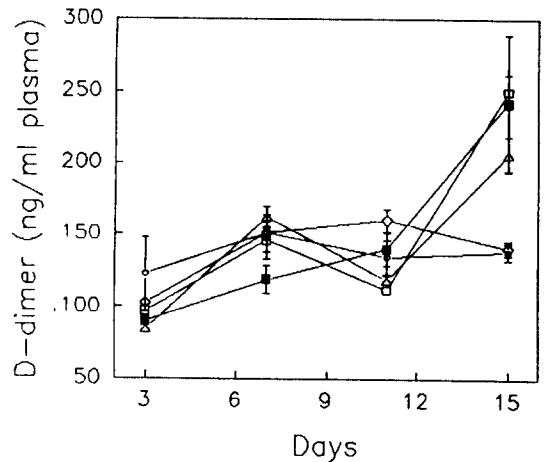


Fig. 2—Changes of the plasma D-dimer concentrations after oral administration of earthworm extract (EWE) in thrombogenic rats given intravenous administration of collagen plus epinephrine. ◇: negative control, ○: ginkoglycoside 30 mg/kg, ■: EWE 7.5 mg/kg, □: EWE 30 mg/kg, △: EWE 120 mg/kg

정하였을때 구인 추출물 0.5, 1.0, 2.0 mg에 대해 각각 2.67, 3.19, 4.16 unit/ug protein으로 농도 의존적인 증가를 보였으며, 혈전과 구인 추출물간의 반응시간 없이 euglobulin을 분리하여 plasmin activity를 측정하였을때 역시 증가하였으므로, 이러한 결과는 구인 추출물내의 lumbrokinase가 euglobulin fraction으로 전이 되었거나 plasminogen에 대한 활성화효과가 있는 것으로 여겨진다. 인위적으로 혈전을 유발시킨 흰쥐에 비교약물과 구인 추출물을 투여하여 응고억제 효과 및 혈전분해 효과를 보는 PT, APTT 및 D-dimer을 측정하였을때 구인 추출물 7.5, 30, 120 mg/kg 투여군에서 PT의 경우 19.7±3.8, 22.5±2.5, 24.0±5.0 sec, APTT의 경우 25.7±5.9, 28.7±5.2, 36.5±19.1 sec

로 유의적으로 증가하는 것으로 보아 내인계 및 외인계 응고인자에 대해 모두작용하며 D-dimer 생성량 역시 PT, APTT와 동일 투여군에서 15일째에 각각 242.3 ± 47.4 , 250 ± 11.9 , 205.8 ± 12.1 ng/ml plasma로 증가하는 것으로 부터 혈전용해 효과 뿐 아니라 항응고 효과도 있는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업 연구비에 의하여 수행되었다.

문 헌

- 1) Hladovec, J.: Antithrombic drugs in thrombosis models. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1989).
- 2) 의약신문사, 의학정보, **235**호 (1995).
- 3) 안덕균: 한국산 약용 균류. 한국균학회지. **20**, 154-166 (1992).
- 4) Mihara, H., Sumi, H., Akazawa, K., Yoneds, T., Mizumodo, H.: Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm. *Thromb. Haemostas.* **50**, 258 (1983).
- 5) 박선양, 계경채, 이문호: 적토룡(*Lumbricus rubellus*)에서 추출한 새로운 단백분해효소인 Lumbrokinase의 섬유소용해 작용기전 규명에 관한 연구: Plasminogen 비의존성 및 분획간 교차 항원성. 대한 의학협회지. **34**, 403 (1991).
- 6) Mihara, H., Sumi, H.: Novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jap. J. Physiol.* **41**, 461 (1991).
- 7) 백승훈, 이홍복, 변중훈, 계경채, 박선양: 혈장섬유소 용해능 측정법의 평가. 대한혈액학회지. **25** (1990).
- 8) Dimino, G. and Silver, M. J.: Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity of ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **225**, 57 (1983)
- 9) Yun, H. S., Kang, S. S., Kim, M. H. and Jung, K. H.: Anti-thrombotic effects of analogs of protocatechuic acid and Gallic acid. *J. Pharm. Soc. Korea* **37**, 453 (1993)
- 10) 박선양, 홍세용, 양동호, 오도연: *Lumbricus rubellus*가 인체의 섬유소 용해력에 미치는 영향. 대한내과학회지. **40**, 77 (1990)
- 11) Whitaker, A. N., Elms, M. J., Masci, P. P., Bundesen, P. G., Rylatt, D. B., Webber, A. J., Bunce, I. H.: Measurement of cross linked fibrin derivatives in plasma: an immunoassay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Pathol.* **37**, 882 (1984)
- 12) Declerck, P. J., Mombaerts, P., Holvoet, P., Mol, M. De. and Collen, D.: Fibrinolytic Response and Fibrin Fragment D-Dimer Levels in Patients with Deep Vein Thrombosis. *Thromb. Haemost.* **58**, 1024 (1987).