

한국 독사독으로부터의 혈전 용해제 개발에 관한 연구

I. 살모사(*A. blomhoffi brevicaudus*) 사독 Protease의 정제에 관한 연구

이문한* · 김병재 · 임종섭¹ · 이 항 · 이혜숙 · 김종호 · 채창수
서울대학교 수의과대학, ¹존스홉킨스 의과대학

Studies on the Development of a Thrombolytic Agent from Korean Snake Venom

I. Purification of a Protease from the Venom of *A. blomhoffi brevicaudus*

Mun-Han LEE*, Byoung-Jae KIM, Jong-Seop RIM¹, Hang LEE, Hye-Suk LEE, Jong-Ho KIM and Chang-Su CHAI

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea, ¹Depart. of Physiol., School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA

(Received June 7, 1995; accepted June 20, 1995)

Abstract—Fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of the venoms from the Korean snakes, *Agkistrodon caliginosus*, *Agkistrodon saxatilis* and *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* were compared by fibrin-plate method and polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. The venom from *A. blomhoffi brevicaudus* showed the highest degree of fibrin(ogen)olytic activity, and a protease with the fibrin(ogen)olytic activity was purified by *p*-aminobenzamidine affinity chromatography and DEAE ion-exchange chromatography. The purified enzyme had a molecular weight of 50,800 and a capability to degrade the B β -chain of fibrinogen preferentially to the A α -chain, but not the γ -chain. Fibrinolytic activity of the purified enzyme was approximately 3.8 plasmin unit/mg protein.

Keywords □ Korean snake venom, *A. blomhoffi brevicaudus*, protease, fibrinolysis, fibrinogenolysis, thrombolysis.

식생활과 환경 등의 변화에 따라 심맥관계 질병이 급격히 늘어나는 추세이며 이들 질병의 대부분은 혈전에 의해 발생되기 때문에 혈전의 형성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 세계적으로 많이 사용되고 있는 혈전 치료제로는 streptokinase와 urokinase가 있으며, 유전자 재조합 기술로 개발한 tPA(tissue type-plasminogen activator)도 사용되고 있다. 또한 streptokinase를 개선한 APSAC(anisoylated plasminogen-streptokinase activator complex)와 urokinase에 비하여 혈전에 대한 친화성이 높은 single-chain urokinase의 개발, 그리고

제 2세대 tPA 개발 등 더 나은 혈전 치료제 개발에 대한 연구가 수행되고 있다(Wojta 등, 1989; Collen과 Lijnen, 1990). 흡혈 박쥐의 타액으로부터 분리한 bat-PA는 tPA보다 혈전에 대해 200배 친화력이 더 높은 것으로 알려져 있으며(Gardell 등, 1989), 지렁이에서 추출한 lumbrikinase도 경구용 치료제로 사용되고 있다.

18세기부터 사독에 항응고 작용을 하는 물질이 있음이 보고되었으나 사독으로부터의 혈전 용해제 개발에 관한 연구는 1970년대 이후에 매우 활발히 진행되고 있는데 주로 Crotalidae, Viperidae와 Elapidae과에 속하는 독사들의 독에 단백분해 효과가 높은 효소가 포함되어 있는 것으로 보고되어 있다 (Markland, Jr, 1991). 국내에는 Crotalidae과에 속하는 *A. saxatilis*, *A. blomhoffi brevi-*

* To whom correspondence should be addressed.

*caudus*와 *A. caliginosus* 등 3종이 서식하고 있다(Gloyd, 1972). Yabuki 등(1991)은 *A. caliginosus* 독으로부터 kinninogenase를 정제하였고, Chung과 Kim(1993a, b)은 *Agkistrodon halys*로부터 단백분해효소를 정제하여 효소 특성을 보고하는 등 몇 차례의 보고가 있었으나 이웃하는 중국이나 일본에서의 연구에 비해 매우 드물게 이루어지고 있다. 특히 독사독의 생체내에서의 혈전용해능에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않는 실정이다.

혈전은 주로 응집된 혈소판에 fibrin이 결합하여 생성되기 때문에 fibrin 분해 능력과 응집된 혈소판을 분해시키는 능력은 혈전 용해제가 갖추어야 할 주된 능력으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 국내에 서식하는 3종의 독사로부터 사독을 채취하여 fibrin과 fibrinogen에 대한 분해 능력을 비교하고 그 활성이 가장 큰 것으로 나타난 살모사(*A. blomhoffi brevicaudus*)의 독으로부터 단백분해효소를 정제하고 그 특성을 조사하였다.

실험방법

사독

경기도의 용문산에서 구입한 3종의 독사 즉, *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*(살모사, 평지 살모사), *Agkistrodon caliginosus*(독사, 한국 살모사)와 *Agkistrodon saxatilis*(칠점사, 산악 살모사)로부터 사독을 채취하여 -20°C 에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

시약 및 재료

본 실험에는 DEAE-Sephacel(Pharmacia사), Centriprep-10 (Amicon사), *p*-aminobenzamidine, fibrinogen 및 plasmin(Sigma사)를 사용하였으며 그외의 시약은 특급 이상을 사용하였다.

Fibrin 분해능 측정

Fibrin 분해능이 가장 좋은 사독을 선택하기 위하여 국내에 서식하는 3종의 독사로부터 얻은 사독을 대상으로 fibrin 분해능을 비교 측정하였다. Fibrin에 대한 분해능은 Astrup과 Mullertz의 방법(1952)을 변형하여 조사하였다. 즉, 지름 9 cm인 Petri dish에 2% fibrinogen 4 ml, 0.05 M barbital buffer(pH 7.8) 2 ml, 20 mM CaCl_2 2 ml을 25 U thrombin 1 ml과 신속히 섞어 주고 실온에서 30분간 정치시켜 fibrin plate를 만들었다. 각 사독의 단백질 농도를 1 mg/ml 되게 희석하여 각각 10 μl 씩 plate에 점적한 후 37°C 에서 24시간 incubation하여 용해되어 나타나는 원의 면적을 측정하였다. 양성 대조군으로는 plasmin 0.1 U/ml, 0.5 U/ml과 1.0 U/ml 용액을 동량 점적하여 사독의 역가와 비교하였다. 정제효소의 fibrin 분해능은 다음과 같이 측정하였다. 즉, plate위에 양성 대조로 plasmin 0.1 U/ml, 0.5 U/ml과 1.0 U/ml 용액 10 μl 씩을, 음성 대조군으로 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)를, 그리고 정제효소(단백질 농도 360 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 266 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각 10 μl 씩 점적한 후 37°C 에서 18시간

incubation한 다음 fibrin이 분해되어 생기는 원의 면적을 측정하였다. 본 실험에 standard로 사용된 plasmin은 ml당 Sigma unit으로 나타내었으며, 1 Sigma unit은 3 WHO unit에 해당한다.

Fibrinogen 분해능 측정

Fibrinogen의 각 polypeptide에 대한 사독 및 정제효소의 특이적 분해능은 Ware 등의 방법(1942)과 Chaoh와 Teng의 방법(1976)을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.2% fibrinogen 0.3 ml을 사독 또는 정제효소(63 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.3 ml과 섞어 37°C 에서 incubation 하면서 incubation 시작 후 0, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120분과 180분에 각각 50 μl 씩 떼내어 50 μl 의 treatment buffer와 섞어 5분간 끓인 후 10% running gel에서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다.

Para-aminobenzamidine affinity chromatography

단백분해효소 억제제인 *p*-aminobenzamidine을 epoxy-activated Sepharose 6B에 immobilization시켜 column(1.5 \times 6 cm)에 충전시켰다. 이어서 0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 100 ml과 0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.5) 100 ml을 사용하여 60 ml/h의 유속으로 씻어준 후, 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 100 ml을 같은 유속으로 통과시켜 평형시켰다. Fibrin 분해능이 좋은 *A. blomhoffi brevicaudus*의 독(단백질 농도 280 mg/ml) 0.5 ml을 20 ml/h의 유속으로 loading한 후, 1 M NaCl을 함유하는 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하여 60 ml/h의 유속으로 세척하였다. 이어서 0.1 M Glycine-HCl buffer (pH 3.4)를 40 ml/h의 유속으로 통과시켜 단백분해효소를 용출시켜 280 nm에서 흡광도를 측정하여 elution profile을 얻었다. 각 분획당 용량은 3 ml이 되게 하였으며, 용출시에는 분취용 시험관에 Tris 20 mg을 미리 넣어 용출액의 pH를 8.0이 되도록 하여 단백질의 변성을 막았다. 위에서 얻은 각 단백질 분획에 대하여 fibrinogen과 fibrin 분해능 시험을 실시하여 단백분해효소를 확인하였으며 SDS-PAGE에 의하여 분자량을 측정하였다.

DEAE ion-exchange chromatography

음이온 교환수지인 DEAE Sephacel column(0.9 \times 11.5 cm)을 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 3시간 동안 씻어 평형시켰다. 위에서 기술한 affinity chromatography에 의하여 얻은 용출 분획중 단백질량이 큰 분획을 모아 Centriprep-10으로 농축시켜 1 ml을 loading하였다. 이어서 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)를 사용하여 30 ml/h의 유속으로 NaCl 농도를 0 M에서 0.25 M까지 0.05 M씩 단계적으로 높이며 용출하였다. 용출하여 얻은 분획들을 280 nm에서 흡광도를 측정하여 elution profile을 얻었다. 위에서 얻은 각 단백질 분획에 대하여 fibrinogen과 fibrin 분해능 시험을 실시하여 단백분해효소를 확인하였으며 SDS-PAGE에 의하여 분자량을 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

알의 두 정제 과정을 거쳐 얻은 단백질의 단일성을 확인하고, fibrinogen에 대한 분해능을 측정하기 위해 10% separating gel과 5% stacking gel상에서 25 mA로 전류를 고정시켜 SDS-PAGE를 실시하였고 Coomassie brilliant blue staining으로 단백질을 확인하였다.

실험결과

사독의 fibrinogen과 fibrin에 대한 분해능 조사

국내에 서식하는 독사인 *A. blomhoffi brevicaudus*, *A. caliginosus*와 *A. saxatilis*의 독으로 fibrinogen과 fibrin에 대한 분해능을 조사하였다. 세가지 사독중 *A. saxatilis*를 제외한 두가지 사독은 fibrinogen의 α -chain을 β -chain보다 빠르게 분해하였으며 γ -chain에 대해서는 작용하지 않았다(Fig. 1). 또한 각 사독의 단백질농도를 1 mg/ml로 하여 10 μ l를 fibrin plate에 점적하여 생긴 용해면적을 측정한 결과(Fig. 2) *A. blomhoffi brevicau-*

*du*s의 독이 132.7 mm²로써 *A. caliginosus*(113.0 mm²)나 *A. saxatilis*(50.2 mm²)보다 fibrin 분해능이 좋았으며 plasmin standard와 비교한 역가는 약 1.4 plasmin unit/mg protein에 해당하였다. 이후 *A. blomhoffi brevicaudus*의 사독으로부터 단백분해효소를 정제하여 fibrin과 fibrino-

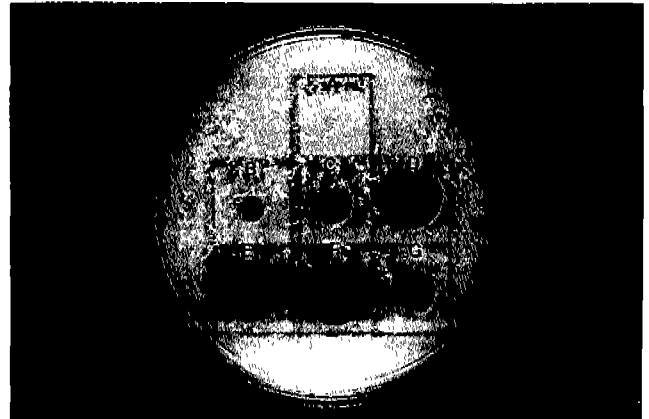


Fig. 2. Fibrinolytic activity of three different Korean snake venoms. Ten milliliters of barbital buffer as a negative control (A), plasmin standards (0.1 U/ml, B; 0.5 U/ml, C; 1.0 U/ml, D), and diluted venoms (1.0 mg protein/ml) from *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* (E), *Agkistrodon caliginosus* (F) and *Agkistrodon saxatilis* (G) were applied to a fibrin plate and incubated for 24 hr at 37°C.

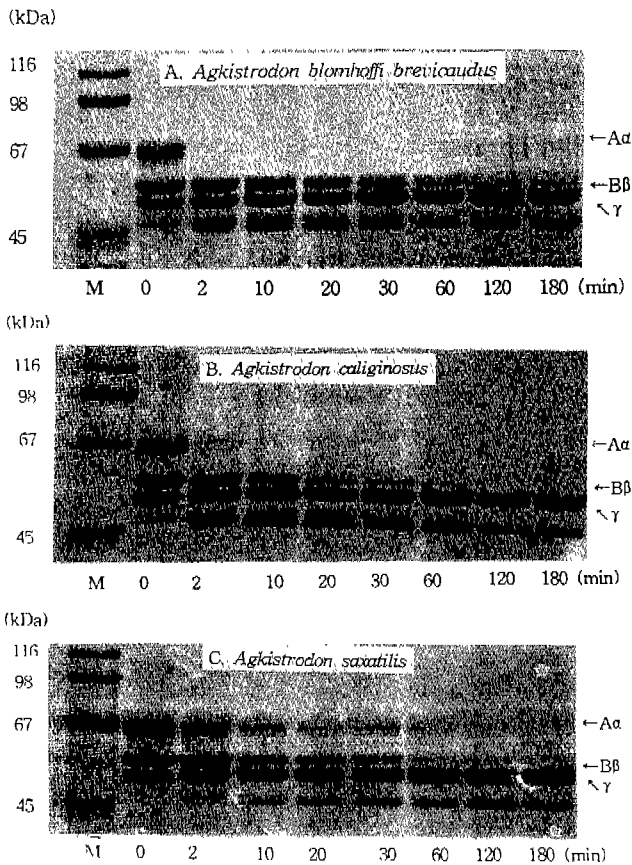


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of human fibrinogen degradation by three different Korean snake venoms. Crude venom (0.3 ml) was mixed with 0.3 ml of 0.2% fibrinogen solution and then incubated at 37°C. After the designated time indicated under the gel, 50 μ l of the incubated solution was removed sequentially and subjected to SDS-PAGE analysis as described in Materials and Methods. M, molecular weight marker.

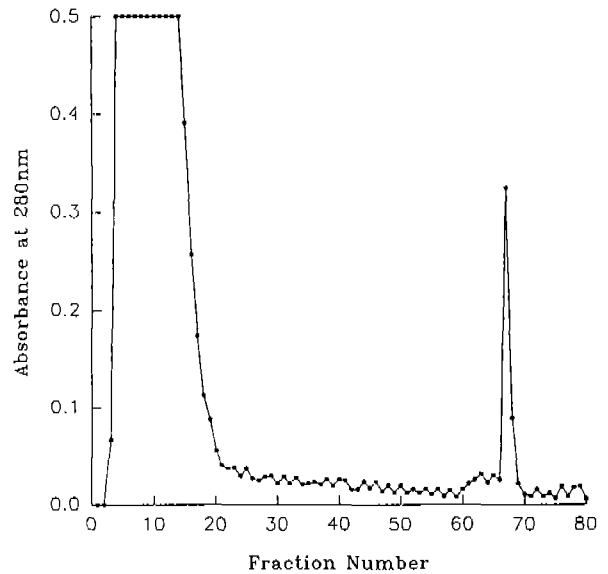


Fig. 3. Elution profile of the proteins in the venom from *A. blomhoffi brevicaudus* obtained by *p*-aminobenzamidine affinity chromatography. After loading of protein (140 mg) of crude venom onto *p*-aminobenzamidine-Sepharose column, unadsorbed proteins (fraction No. 1-60) were washed with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 60 ml per hour. Adsorbed proteins (fraction No. 61-80) were eluted with 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.4) at a flow rate of 40 ml per hour.

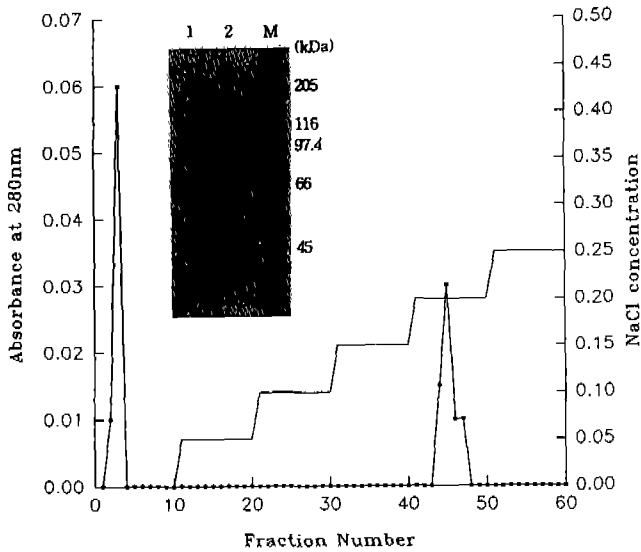


Fig. 4. Elution profile of the proteolytic enzyme obtained by DEAE ion-exchange chromatography. Concentrated protein samples eluted from *p*-aminobenzamidine affinity column was applied onto the DEAE ion-exchange column. Proteolytic enzyme was eluted with 10 mM phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.2 M NaCl at a flow rate of 30 ml per hour. Inlet: SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the purified enzyme. Lane 1, protein obtained at 0 M NaCl concentration. Lane 2, purified enzyme obtained at 0.2 M NaCl concentration. M, molecular weight marker.

gen에 대한 분해능이 있는지를 조사하였다.

사독의 정제

*A. blomhoffi brevicaudus*의 독으로부터 단백분해효소를 정제하기 위해 *p*-aminobenzamidine affinity chromatography를 실시하였다 (Fig. 3). 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 씻어낸 분획들과 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.4)로 용출시킨 분획을 fibrin-plate method를 이용하여 fibrin 분해능을 조사하였던 바 0.1 M glycine-HCl buffer로 용출한 분획이 fibrin 분해능이 월등히 높음을 확인하였다(결과 제시하지 않음). 이 분획에 대하여 SDS-PAGE를 실시한 결과 2개의 band를 확인할 수 있었다.

위에서와 같이 affinity chromatography를 통해 1차 정제한 단백 분획을 모아 농축시켜 DEAE ion-exchange chromatography를 실시하였다. NaCl의 농도를 0 M에서 0.25 M까지 단계적으로 높이면서 단백질을 용출하였을 때 0 M과 0.20 M 농도에서 단백질 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이들 분획을 SDS-PAGE로 분석하여 단백질 조성을 조사하였던 바 0 M NaCl 농도에서는 2개, 그리고 0.2 M NaCl 농도에서는 약 50,800의 분자량을 갖는 단일 band의 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 4, Inlet). 이 분획들에 대하여 fibrinogen과 fibrin 분해능을 조사하였다.

정제효소의 fibrinogen과 fibrin에 대한 분해능

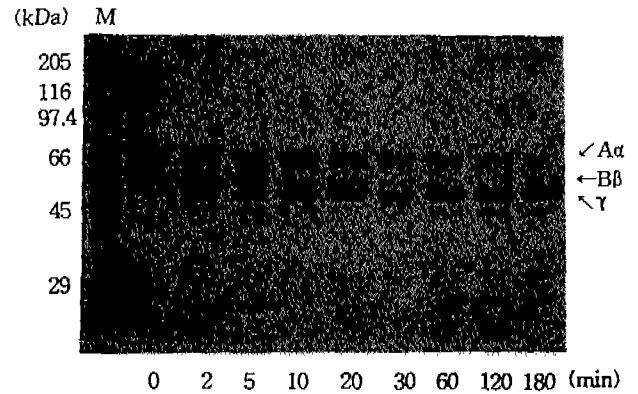


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of fibrinogen degradation by the purified enzyme from the venom of *A. blomhoffi brevicaudus*. M, molecular weight marker. Purified fibrinolytic enzyme (18.9 μ g) was incubated in 0.6 ml of 0.1% human fibrinogen solution at 37°C. After designated time indicated under the gel, 50 μ l of the incubated solution was removed and subjected to SDS-PAGE.

위에서 기술한 ion-exchange chromatography에 의하여 얻은 단백 분획들에 대하여 SDS-PAGE를 이용하여 정제효소의 fibrinogen 분해능을 조사하였다. 단백 분획중 0.20 M NaCl 농도에서 분리된 약 50,800 Da의 단백질이 fibrinogen의 A α -, B β -와 γ -chain중 B β -chain을 60분안에 빠르게 잘라내었으며 A α -chain은 서서히 잘라내어 180분까지도 완전히 분해하지 못하였고, γ -chain에는 전혀 영향을 미치지 못하였다(Fig. 5). DEAE-column에서 0 M NaCl에 의하여 washing된 분획에 대하여도 fibrinogen 분해능을 SDS-PAGE를 이용하여 조사하였던 바 B β -chain보다는 주로 A α -chain을 분해함을 관찰할 수 있었으나(결과 제시않음), 이 분획은 SDS-PAGE 상에서 두 개 이상의 band를 보여 단백질 조성이 순수하지 않음을 나타내었다(Fig. 4, Inlet). 또한 fibrin-plate method를 이용하여 측정한 정제효소의 fibrin 분해능의 specific activity는 약 3.8 plasmin unit/mg protein이었다.

고 찰

혈전은 혈소판에 있는 fibrinogen 수용체가 Ca²⁺ 존재하에 ADP에 의해 활성화되어 대칭 모양인 fibrinogen이 이 수용체에 결합하여 혈소판을 응집시켜 만들어지게 되며(Ernst와 Susanne, 1993), 이 응집된 혈소판에 fibrin이 혼합되어 혈전을 형성한다. 일단 형성된 혈전을 용해시키기 위해서 streptokinase나 urokinase와 같은 간접적인 혈전용해제를 사용하여 왔으나 항원성, 출혈, 조직 손상, 발열, 재발 등의 부작용이 문제시될 수 있다. 또한 급성 심근 경색과 같은 경우에는 지금까지 개발되어 사용되고 있는 약제들보다 혈전에 더 특이적

으로 작용하는 용해제의 개발이 요구됨에 따라 천연약제나 유전공학 기법을 응용한 동물 유래 혈전용해제 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Collen과 Lijnen, 1990; Moake와 Levine, 1985).

본 연구에서는 국내에 서식하는 세 종의 독사의 독에 대해 fibrin 분해능을 조사하여 가장 활성이 높은 *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*의 독으로 부터 peptidase inhibitor로서 serine proteases에 특이적 친화성이 있는 *p*-aminobenzamidine을 사용한 affinity chromatography로 fibrin 분해능을 보이는 분획을 분리하였다. 이 분획의 단백질을 전기영동한 결과 2개의 band를 나타내었기 때문에 ion-exchange chromatography로 2차 정제하였던 바 SDS-PAGE상에서 분자량이 약 50,800인 단일 band를 얻을 수 있었다.

정제효소의 분해능을 fibrin plate를 사용하여 조사한 결과 약 3.8 plasmin unit/mg protein의 활성을 가졌다. 이 fibrin plate에 사용된 fibrinogen에는 plasminogen이 존재하지 않으므로 이것은 plasminogen activator를 통하여 작용하는 plasminogen activator나 urokinase와는 달리 정제효소가 직접 주된 혈전 형성인자인 fibrin에 작용한다는 사실을 나타내어 주고 있어서 새로운 작용기전을 가진 혈전용해제로써의 개발가능성을 보여주고 있다. 또한 정제효소의 fibrinogen 분해성을 조사하였던 바 fibrinogen의 B β -chain을 선택적으로 분해하는 작용이 있음을 확인하였다. 이와 같은 사실은 정제된 효소가 응집된 혈소판을 분해시킬 수 있으며 혈중 fibrinogen 수준을 낮추어 혈전이 계속 커지는 것을 막아 재발의 위험을 덜어 줄 수 있음을 의미한다(Cerek 등, 1986; 1987). 결과는 제시되지 않았지만 *p*-aminobenzamidine affinity chromatography의 fraction들과 DEAE ion-exchange chromatography에서 0 M NaCl로 washing된 fraction의 fibrinogenolytic 활성들은 모두 B β -chain 보다는 A α -chain에 더 특이적인 것으로 나타나 A α -chain에 특이적인 대부분의 fibrinogenolytic activity들이 정제과정 중 다른 분획들에 유출된 것으로 짐작된다.

Fibrin 혹은 fibrinogen 분해능을 갖는 사독의 효소들은 Markland(1991)에 의하면 대개 2 종류로 나눌 수 있는데 첫째는 α -chain에 특이적인 metalloendoproteinase 종류로써 arginine esterase 활성이 없고 분자량이 20,000에서 34,000 정도이며 disulfide bond를 포함하는 것으로 알려져 있다. 두번째는 β -chain에 특이적으로 작용하는 효소로써 분자량 23,000에서 33,500 정도의 serine proteinase에 속하며 arginine esterase 활성을 보이고 PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)나 DFP(diisopropyl-fluorophosphate)에 의하여 저해된다. 분자량 46,000에서 58,000 사이의 α -chain 특이적인 metalloendoproteinase가 보고된 적이 있으나 본 실험에서의 50,800 정도 크기의 β -chain 특이적인 효소가 보고된 적은 없다(Pan-

dya와 Budzynski, 1984; Evans, 1981; Evans, 1984; Evans와 Barrett, 1988).

Chung과 Kim(1993a, b)은 *Agkistrodon halys*의 venom에서 51,000 Da 크기의 fibrin 분해능을 지닌 효소를 분리하였다고 보고하였다. 이 효소는 glycoprotein이며 부분적인 아미노산 서열분석에 의하여 amino terminal 부분의 순서가 *Agkistrodon contortrix*에서 분리한 protein C activator와 일치하는 것으로 보고되었다. 비록 이 51,000 Da 크기의 효소와 본 실험에서의 50,800 Da의 효소는 아주 근사한 분자량을 가졌지만 그 특성은 전혀 달라서 Chung과 Kim의 51,000 Da 효소는 fibrinogen의 α -chain을 우선적으로 분해 하였으나 본 실험에서의 50,800 Da 효소는 β -chain을 특이적으로 분해하였다. 그러므로 본 실험에서 분리된 효소는 지금까지 알려져 있는 fibrinolytic 효소와는 다른 새로운 성상의 효소로 생각된다.

이상의 실험 결과를 요약하면, fibrin과 fibrinogen에 대한 분해능이 있는 단백분해효소를 *p*-aminobenzamidine affinity chromatography와 DEAE ion-exchange chromatography를 통해 정제할 수 있었고, 이 정제효소는 60분 안에 B β -chain을 선택적으로 분해함으로써 fibrinogen에 대한 강한 분해능이 있음을 확인하였다. 추후 이 효소의 생화학적 특성을 조사하고 생체 내에서 혈전용해능이 있는지에 대하여 검토할 것이다.

결 론

국내에 서식하는 독사인 *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*(살모사, 평지 살모사), *Agkistrodon caliginosus*(독사, 한국 살모사)와 *Agkistrodon saxatilis*(칠점사, 산악 살모사)로부터 사독을 채취하여 fibrinogen과 fibrin 용해능을 조사하여 비교하였던 바 *A. blomhoffi brevicaudus*로부터 채취한 사독이 fibrinogen과 fibrin 용해능이 우수함을 확인하였다. 이 독사독으로부터 *p*-aminobenzamidine affinity chromatography와 DEAE ion-exchange chromatography를 이용하여 SDS-PAGE 상에서 단일 band를 나타내는 분자량 약 50,800인 효소를 정제하였다. 정제효소는 약 3.8 plasmin unit/mg protein의 fibrin 분해능을 나타내었으며, fibrinogen의 A α -, B β -와 γ -chain 중 B β -chain을 보다 선택적으로 분해하였다. 그러므로 본 실험에서 분리·정제된 단백분해효소는 fibrin과 fibrinogen을 분해하는 능력이 있으며 생체 내에서 혈전용해물질로써 개발될 가능성이 있을 것으로 여겨진다.

감사의 말씀

본 연구를 수행하는데 소요된 경비의 일부는 1993년도 학술진흥재단(자유 공모과제)의 연구비 지원에 의하여 수행하였기에 감사드립니다.

참고문헌

- Astrup, T. and Mullertz, S. (1952). The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
- Cercek, B., Allan, S. L., F. R. A. C. P., Hod, H., Yano, J., Reddy, K. N. N. and Ganz, W. (1986). Enhancement of thrombolysis with tissue-type plasminogen activator by pretreatment with heparin. *Circulation* **74**, 583-587.
- Cercek, B., Lew, A. S., Hod, H., Yano, J., Lewis, B., Reddy, K. N. N. and Ganz, W. (1987). Ancrod enhances the thrombolytic effect of streptokinase and urokinase. *Thrombosis Reserch* **47**, 417-426.
- Chaoho, O. and Teng, C. M. (1976). Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* **420**, 298-308.
- Chaoho, O. and Huang, T. F. (1977). The properties of the purified fibrinolytic principle from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Toxicon* **15**, 161-167.
- Chaoho, O., Teng, C. M. and Chen, Y. C. (1976). Physicochemical properties of α - and β -fibrinogenases of *Trimeresurus mucroquamatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* **481**, 622-630.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. (1993a). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from Korean snake (*Agkistrodon halys*) venom. *Korean Biochem. J.* **26**, 363-369.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. (1993b). Biochemical and biological properties of a fibrinolytic enzyme from Korean snake (*Agkistrodon halys*) venom. *Korean Biochem. J.* **26**, 363-369.
- Collen, D. and Lijnen, H. R. (1990). Molecular mechanisms of thrombolysis: Implications for therapy. *Biochemical Pharmacology* **40**, 177-186.
- Ernst, F. L. and Susanne, W. (1993). The formation of the haemostatic plug-A special case of platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis* **70**, 234-237.
- Evans, H. J. (1981). Cleavage of the A α -chain of fibrinogen and the a-polymer of fibrin by the venom of spitting cobra (*Naja nigricollis*). *Biochim. Biophys. Acta.* **660**, 219-226.
- Evans, H. J. (1984). Purification and properties of a fibrinogenase from the venom of *Naja nigricollis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **802**, 49-54.
- Evans, J. H. and Barrett, A. J. (1988). The action of proteinase F1 from *Naja nigricollis* venom on the A α -chain of human fibrinogen. In *Hemostasis and Animal Venoms* (Pirkle, H. and Markland, F.S., Eds.), pp. 213-222. Marcel Dekker, New York.
- Gardell, S. J., Duong, L. T., Diehl, R. E., York, J. D., Hare, T. R., Register, R. B., Jacobs, J. W., Dixon, R. A. F. and Friedman, P. A. (1989). Isolation, characterization, and cDNA cloning of a Vampire Bat salivary plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **264**, 17947-17952.
- Gloyd, H. K. (1972). The Korean snakes of the Genus *Agkistrodon* (Crotalidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* **85**, 557-578.
- Holleman, W. H. and Coen, L. J. (1970). Characterization of peptides released from human fibrinogen by arvin. *Biochim. Biophys. Acta.* **200**, 587-589.
- Markland, Jr., F. S. (1991). Inventory of α - and β -fibrinogenases from snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis* **65**, 438-443.
- Moake, J. L. and Levine, J. D. (1985). Thrombotic disorders. *Ciba Clinical Symposia* **37**, 17-18.
- Pandya, B. V. and Budzynski, A. Z. (1984). Anticoagulant proteases from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochemistry* **23**, 460-467.
- Ware, A. G., Guest, M. M. and Seegers, W. H. (1947). Fibrinogen: With special reference to its preparation and certain properties of the product. *Arch. Biochem. Biophys.* **13**, 231-236.
- Wojta, J., Hoover, R. L. and Daniel, T. O. (1989). Vascular origin determines plasminogen activator expression in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 2846-2852.
- Yabuki, Y., Oguchi, Y. and Takahashi, H. (1991). Purification of a kininogenase (kininogenase-2) from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-mamushi). *Toxicon* **29**, 73-84.