대한한방소아과학회지 제14권 제2호 (2000년 12월)
J Korean Oriental Med 2000; 14(2)

새로운 人間 胎盤유래의 抗凝固 蛋白質 PP27 (annexin V型 蛋白質)의 精製와 特性

金 璋 顯

東國大學校 韓醫科大學 小兒科學敎室

Purification and Characterization of a new anti-coagulant protein, PP27, of placenta protein (annexin V-like protein)

Jang-Hyun Kim

Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Seoul, Korea

It has long been known that Jahage(紫河車) extracts of Placenta hominis are effective for immunological and vascular diseases in human body and thus, was used a major constituent of traditional oriental medicines. From full-term human placenta, we have purified a new type anticoagulant protein, PP27, using different chromatographic techniques of a phenyl TSK gel 650M column, DEAE, HA and Mono-Q columns. PP27 showed single band on SDS-PAGE with a molecular mass (Mr) of 27 kDa under denaturing conditions and a calibrated Sepharose 4B column chromatography indicated a molecular mass of 23 kDa, indicating that the value is similar to those of other PP4 enzyme reported to date. Isoelectric point of PP27 was pI5.2. The protein was found to inhibit the coagulation time in a concentration-dependent manner. PP27 was acted as a vascular anticoagulant of annexin type, inhibits the blood clotting process by binding of the essential lipids in a reaction which is dependent on $Ca2^{+}$ ions. In the presence of $Ca2^{+}$ ions, PP27 combines with platelet membranes neutralizing their procoagulant effect. Coagulation triggered by the addition of thromboplastin/ lipid- mixtures is extinguished by PP27.

"본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 이루어졌음"

Ⅰ. 서 론

紫河車는 健康한 사람의 胎盤을 烘製하여 乾燥한 것[1]으로 唐代 陳藏器의 〈本草拾遺〉에 "氣血이 羸瘦하거나 婦人의 勞損을 主治한다"고[2] 언급된 후 주로 補氣養血益精하는 效果를 이용하여 氣血大虧, 虛勞骨蒸, 癲癎, 神經衰弱 및 자궁발육부전 등을 치료하는데 사용하여 왔다. 자하거에 대한 최근 연구로는 강장작용, 자궁수축작용, 항결핵, 유선, 여성생식기 및 난소의 발육을 촉진하며 면역력 증가, 항알러지 작용 등이 있다고 보고되고 있고[3], urokinase가 profibrinolysin을 활성화시키는 작용에 대하여 억제하는 효과가 있어 응고인자 XIII 결핍에 의한 출혈 환자에 사용될 수 있고 실험실내에서 억제된 심장의 회복을 촉진할 수 있다고 보고되고 있다[4,5].

紫河車의 여러 가지 추출물 중 하나인 annexin 단백질은 여러 유기체, 기관 및 세포에서도 발견되는 것[6]으로, 현재까지는 6가지 종류가 분리되어 추출되었는데, 이 단백질들은 각각 특징적인 성질을 지니고 있다[7-10]. 이 단백질의 실질적인 생리 기능은 아직 알려지지 않았지만, annexin 단백질은 혈액응고를 억제하는 능력을 지니고 있는 것으로 보고[9,11] 되었다.

Annexin 단백질에 의해 혈전이 형성되는 것을 예방하는 기전은 항염증 작용을 나타내는 특징을 설명하는 것과 유사하다. 혈전의 형성은 fibrin의 형성을 유도하는 과정에 있어서 지질막과 응고인자의 결합이 가장 중요한데, annexin 단백질이 지질막의 표면에 결합함으로써 응고에 관련된 지질막과 응고 인자의 결합 및 그것에 관한 zymogen이나 기능이 촉진된 단백질의 활성을 방해하게 된다. Annexin 단백질의 항응고 활성을 조사하기 위한 실험은 대개 실험실내에서 준비된 장치를 사용하여 연구가 진행되었으며, 다양한 phospholipids의 여러 가지 다른 구성 형태가 사용되었다[11-13].

활성이 이루어지는 동안에 혈소판 막구조는 근본적으로 변화하게 되며 음전하로 바뀌어진 지질들은 응고 인자의 표면에 결합하여 도움을 주는 세포 밖의 매개체에 노출되게 된다[14]. 단핵구가 내독소에 의해 자극될 때 부가적으로 촉진된 응고반응의 표면과 응고 단백이 생성되는 비슷한 변화가 관찰되었다[14].

이에 저자는 紫河車에서 annexin군의 하나인 새로운 단백질 PP27을 추출하였으며, 기존의 인간태반 단백질 PP4와 비슷한 성질을 나타내고 있는 이 단백질의 항응고 특징을 분석하기 위하여 혈소판과 관련된 항응고 반응에서 혈액 thromboelastography와 대식세포에 대한 표시된 단백질의 결합에 대한 영향을 관찰하고 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실 험

1. 재료

PP27(Placenta protein [27])은 사람의 태반을 원재료로 Romisch, J. 등[15]의 방법을 이하에서 설명한데로 약간 방법을 수정하여 추출, 정제하였다. 모든 시약은 분석용 최상급을 사용하였으며 항파상풍 독소 면역글로불린, Zymosan, Petriperm dish와 같은 모든 응고 시약들은 Sigma Co. (St Louis, MO. USA)제품을 사용하였다.

2. 방법

1) PP27(Placenta protein 27)의 정제

완전 성숙한 사람의 태반 1,000 g를 Waring blender 속에서 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 mM EGTA와 0.1 mM phenylmethylsulfonyl

fluoride(PMSF)로 구성된 완충액 2000 mℓ와 균질화하였다. 균등액은 10,000 g에서 30분 동안 원심분리하였다. 2.0 mM CaCl2 (f.c)와 500 mM NaCl (f.c)을 상청액에 첨가하고, 그 용액을 10,000 g에서 30분 동안 다시 원심분리하여 그 상청액을 4℃에서 phenyl TSK Gel M650 (Tosoh) column (50×70 mm)에 걸어, 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM NaCl, 20 mM CaCl2을 첨가하여 안정화시켰다.

Step 1. Phenyl TSK gel 650M column chromatography : 투석된 단백질은 각 분획별로 분리하여, 각 분획을 1 M 황산암모늄, 1 mM EGTA와 5 mM DTT로 구성된 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형 시켜 fast protein liquid chromatography system (Pharmacia)이 장착된 Phenyl TSK gel column (2.3 cm × 25 cm; Tosoh Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 연속적으로 용출시켰다. column은 평형 완충액(3 liters)으로 세척하고, 단백질은 동일한 완충액에서 1에서 0 M의 황산암모늄 용량으로 20 mℓ/hr의 유속에서 2 mℓ의 분율로 용출시켰다. 용출액은 UV 모니터(Pharmacia)로 280 nm에서 단백질농도를 측정하였으며, 이때 PP는 2개의 peak로 용출되었다. 즉, 0.75 M 황산암모늄 (fraction numbers 18-22)의 농도 근처에서 용출되는 첫 번째 작은 peak는 버리고, 0.35 M 황산암모늄 (fraction numbers 27-32)의 농도 근처에서 용출되는 두 번째 큰 peak는 PP로서 확인되어 선별적으로 분획하였다. 활성화된 주된 분획들은 대략 분자량 Mr = 10,000에서 여과되는 강력한 여과기(Amicon PM10; Amicon Co. Ltd., Danvers, MA, USA)에 의해 4℃에서 약 10배로 농축하고, 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)과 교대로 하룻밤동안 투석하였다.

Step 2. DEAE Toyopearl 650M column chromatography : 투석된 단백질들은 각 분획별로 분리하였고, 각 분획은 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형 시켜 fast protein liquid chromatography system (Pharmacia)이 장착된 DEAE Toyopearl 650M gel column (2.3 cm × 25 cm; Tosoh Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 연속적으로 용출시켰다. column은 평형 완충액으로 세척하고, 단백질은 동일한 완충액에서 0에서 0.3 M의 NaCl 용량으로 30 mℓ/hr의 유속에서 5 mℓ 분율로 용출시켰다. 용출액은 UV monitor(Pharmacia)로 280 nm에서 측정하였다. 0.09 M NaCl (fraction numbers 23-28)의 농도 근처에서 용출되는 단백질분획을 선별하여 여과(Amicon PM10; Amicon Co. Ltd.)에 의해 4℃에서 약 10배로 농축되었고, 5 mM HEPES와 5 mM MgCl2 (pH 6.2)를 교대로 하룻밤동안 투석하였다.

Step 3. Hydroxyapatite column chromatography : 앞의 단계로부터 농축된 pool (5 mℓ)은 각각 5 mM HEPES, 1 mM EGTA와 5 mM DTT (pH 6.2)로 평형이 유지된 hydroxyapatite column (1.2 cm × 12 cm; Pharmacia LKB, Upssala, Sweden)위에서 chromatography를 시행하였다. 동일한 완충액(30 mℓ)으로 column을 세척한 후, 단백질은 동일한 완충액에서 0.5 mℓ/min의 유속으로 40분 이상 0 - 1.0 M의 NaCl 용량으로 용출시켰다. 분획의 크기는 0.3 mℓ이었다. 시료를 column에 걸은 후, 0.6 M NaCl 근처에서 용출된 활성분획(tubes nos 36-42)을 모아 여과농축(Amicon PM10)하였으며, 농축액은 동일한 완충액으로 투석하였다. 그러나, 활성의 일부 작은 부분이 흘러 지나가는 분획에서도 발견되었다.

Step 4. Mono-Q column chromatography : 앞의 단계로부터 농축된 pool (5 mℓ)은 각각 50 mM

Tris-HCl 완충액(pH 8.0), 1 mM EGTA 와 5 mM DTT로 평형이 유지된 Mono-Q column (1.2 cm × 12 cm; Pharmacia LKB, Upssala, Sweden)위에서 이온교환 chromatography를 시행하였다. 동일한 완충액(30 mℓ)으로 column을 세척한 후, 단백질은 동일한 완충액에서 0.5 mℓ/min의 유속으로 40분 이상 0.1 ~ 0.45 M의 NaCl 용량으로 용출시켰다. 분획 크기는 0.3 mℓ이었다. 시료를 column에 걸은 후, 0.24 M의 NaCl 농도 근처에서 용출된 활성 분획(tubes nos 31-34)을 모아 여과(Amicon PM10)에 의해 농축하고, 농축액은 동일한 완충액으로 0.15 M의 NaCl 농도에서 투석하였다.

Step 5. Sepharose 4B을 포함한 Gel의 여과: 투석된 시료는 (1 mℓ)은 각각 fast protein liquid chromatography system이 장착된 Sepharose 4B column (FPLC, Pharmacia LKB, Upsala, Sweden)을 사용하여 1 mM EGTA, 5 mM DTT와 0.15 M NaCl을 포함하는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에서 평형을 유지시켰다. 단백질 분획은 농축하고, 5 mM MgCl2, 1 mM EGTA와 5 mM DTT를 포함하는 5 mM HEPES 완충액(pH 6.2)에서 투석하였으며, 이하의 실험에 순수한 단백질로써 사용하였다.

2) PP27의 항응고 작용에 대한 측정

다양한 양의 PP를 lipid-free Neothromtin (Sigma Co)을 사용하여 지질이 제한-희석된 방법으로 만들어진 여러 가지 지질농도에서 항응고력을 시험하였다. 응고 시간은 다음과 같이 실행되었다: 100 μℓ 표준 인간 혈장(standard human plasma : SHPL)은 시료(완충액; PP) 100 μℓ 와 Neothromtin 100 μℓ로 혼합하고 37℃에서 2분 동안 항온 배양한 후에 25 mM CaCl2-solution 100 μℓ를 추가하였다. 응고시간은 응고계를 사용하여 측정하였다.

3) 혈소판 관련된 응고에 대한 PP27의 영향

혈소판과 결합된 PP와 응고에 미치는 영향을 실험하기 위하여, 인간의 혈소판이 풍부한 혈장을 Chiang, T.M. 등[16]의 방법을 이용하여 구연산이 첨가된 혈액으로부터 준비하였다. 혈소판은 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.15 M NaCl와 0.1% 인간 알부민(완충액 A)이 포함된 용액으로 3회 세척되었고, 이어서 혈소판 (255 cells/μℓ)은 다양한 양의 PP27 (0-0.5 mg/mℓ, final concentration)과 함께 37 ℃에서 5분 동안 1 mM CaCl2가 존재하는 상황과 존재하지 않는 상황에서 항온 배양되었고, CaCl2가 존재하는 상황과 존재하지 않는 상황에서 각각 완충액 A로 3회 세척되었다.

혈소판은 0.5% Triton X-100과 100 mM EDTA를 포함하는 완충액 A에 용해시켰다 : 세포의 파편들은 원심분리에 의해 제거되었다. 혈소판과 결합하는 PP27의 양은 Romisch, J 등[10]이 서술한 바와 같이 PP4에 대한 특이성을 가진 다클론성의 항체들을 사용하는 ELISA에 의해 측정되었다.

4) PP27의 존재유무에 따른 인간 혈액의 Thrombelastography

건강한 공여자로부터 제공받은 신선한 혈액 360 μℓ를 즉시 Thrombelastography (type D)의 cuvette에 피펫으로 옮겨 완충액 A, PP27 (20 μg/mℓ, f.c), tissue-factor solution (Thromborel, dilution 1: 4200) 또는 Thromborel/PP의 혼합물을 cuvette에 넣은 후 시간을 측정하였다.

5) 처리하지 않은 대조군과 자극을 가한 실험군의 대식세포에 대한 막결합된 PP27의 관찰

인간의 단핵구/대식세포를 다음과 같이 분리하여 배양하였다[15]. 요약하면, 해파린화된 신선한 사람 혈액에 혼합된 단핵구는 Ficoll-Hypaque gradient의

원심분리에 의해 다른 세포들과 분리되었다. 단핵구는 유착성과 Petriperm dishes로부터의 용출시켜 정제되었다. 전형적인 단핵 식세포로의 성숙 후에 세포들은 기계적인 교반에 의해 분리되었고 Petri dishes 안으로 옮겨졌다.

실험군의 배양된 대식세포는 Saccharomyces cerevisiae로부터 준비된 세포벽인 zymosan (50 ㎍/㎖) 또는 항파상풍 독소 면역글로불린과 동일한 양의 파상풍 독소로 형성된 면역 복합체 (100 ㎍/㎖)에 의해 자극되었다. 37 ℃에서 24 혹은 48시간 동안 항온 배양한 후 PBS (pH 7.2)로 두 번 세척하였다. 자극된 배양물(실험군) 뿐만 아니라 자극되지 않은 배양물(대조군)들도 37 ℃에서 30분 이상 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl과 5 mM CaCl2 안에서 FITC-labelled PP27 (50 ㎍/㎖)과 함께 항온 배양하였다. 결합되지 않은 단백질은 PP27이 없는 완충액으로 세포들을 세척하여 제거시킨 후에 대식세포는 형광현미경으로 관찰하였다.

6) PP27의 등전점(Isoelectric point) 측정

등전점은 LKB의 AMPHOLINE PAGPLATE, pH3.5-9.5로 측정하였다. Bio-Rad의 IEF standards를 등전점 측정을 위해 사용하였다. Gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색되었다.

7) PP27의 아미노산 결과 분석, 전기영동과 분자량 측정

비연속적인 sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE는 Laemmli의 방법에 의해 실행되었다[17]. 단백질의 band는 Coomassie Blue R250 dye로 염색되었고, 5% 메탄올-7.5% 아세트산 (v/v) 의 용액으로 탈색되었다. 사용된 Molecular mass markers (Bio-Rad)는 phosphorylase B (97,000 Da), serum albumin (66,000 Da), ovalbumin (53,000 Da), carbonic anhydrase (32,000 Da), soybean-trypsin 억제제 (21,500 Da)와 lysozyme (14,400 Da)을 사용하였다. 단백질은 Coomassie blue로 염색하였으며 섬유소 용해성 단백질의 분자 질량은 ovalbumin, BSA, cytochrome C (12.4 kDa), catalase (240 kDa)와 thyroglobulin (669 kDa)를 포함하는 표준 단백질로 된 Sepharose 4B column (1.6 ㎝ × 76 ㎝)을 대상으로 측정되었다. 단백질의 내용물은 Lowry et al. (1951)의 방법에 의해 측정되었다[18].

Ⅲ. 결 과

1. 새로운 인간 태반 단백질, PP27의 정제와 특성

완전히 성숙한 사람의 태반 1,000 g을 가지고 다양한 chromatography 기술을 사용하여 PP27을 정제하였다. 태반의 조단백질을 phenyl TSK gel 650M column에서 chromatography 용출시 PP27은 두개의 peak로 용출되었다. 그 중에서 0.35 M 황산암모늄 (fraction numbers 27-32) 근처에서 용출되는 두 번째의 주된 peak를 선택하여, 다음 단계의 정제에 사용하였다. 활성분획으로서 항응고 단백질을 포함하는 phenyl column 분획의 농축액은 계속하여 DEAE, HA, 그리고 Mono-Q column를 사용하였다. 용출된 단백질의 각각 단일 peak에서 용출된 물질을 정제된 PP로 사용하였다. 정제된 PP는 SDS-PAGE에서 단일 band를 나타내었다 (Fig. 1).

섬유소 용해성 단백질의 분자량(Mr)은 대체로 변성 상태에서 27 kDa으로 측정되었고 (Fig. 1), Sepharose 4B column chromatography에서는 23 kDa의 분자량을 나타내었다. 이 수치는 지금까지 보고된 다른 PP4의 수치와 비슷하였다[19]. PP27의 등

전점 (pI) 은5.2로 측정되었다.

PP27를 아미노산자동분석기에 의해 직접 분석한 결과 단백질의 N-말단 서열은 차단되지 않았으며 PP27의 14개 아미노산 서열을 결정할 수 있었다 (Fig. 2). PP27의 아미노산 배열은 사람 S-100P와는 46%, 사람 S-100 β와는 42%가 일치하였다. S-100 단백질군이 종족사이에 매우 잘 보존되어 있다는 사실을 고려할 때 PP27은 S-100 단백질군 중의 기존에 이미 보고된 물질들과는 전혀 일치되지 않았다. 따라서 PP27은 인간 태반에서 추출되는 S-100 단백질군의 새로운 단백질 일원으로 생각되었다.

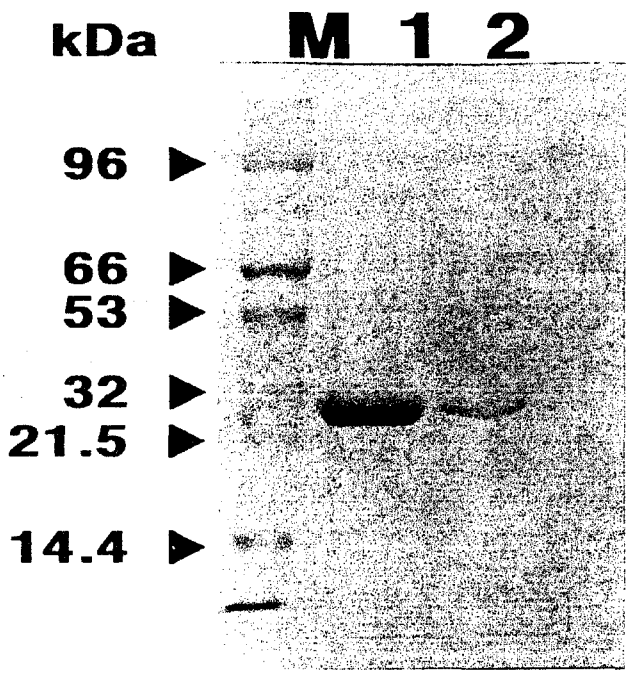

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified PP27 from human placenta

Lanes M, molecular size standard markers of phosphorylase B (97,000 Da), serum albumin (66,000 Da), ovalbumin (53,000 Da), carbonic anhydrase (32,000 Da), soybean-trypsin inhibitor (21,500 Da) and lysozyme (14,400 Da); 1, Phenyl Toyopearl eluates; 2, purified PP27 (10 μg). Proteins were stained with Coomassie blue. Arrowhead denotes the position of PP27. Positions of standard proteins are indicated.

PP27	PSELILAMVSIIDV
human S-100P	MTELEIAMGMIIDV
human S-100beta	SELIKAMVALIDV

Fig. 2. Amino acid sequences of PP27 and some other members of S-100 protein family.

The sequences of peptides are given in single-letter codes. Identical amino acids are underlined.

2. PP27의 유발된 응고 지질에 대한 항응고 효과

농도가 다른 PP27의 항응고 효과는 여러 가지 농도의 지질이 존재하는 상황에서 관찰하였다. Fig. 3과 같이 응고는 지질증가농도에 따라 가속되었으며

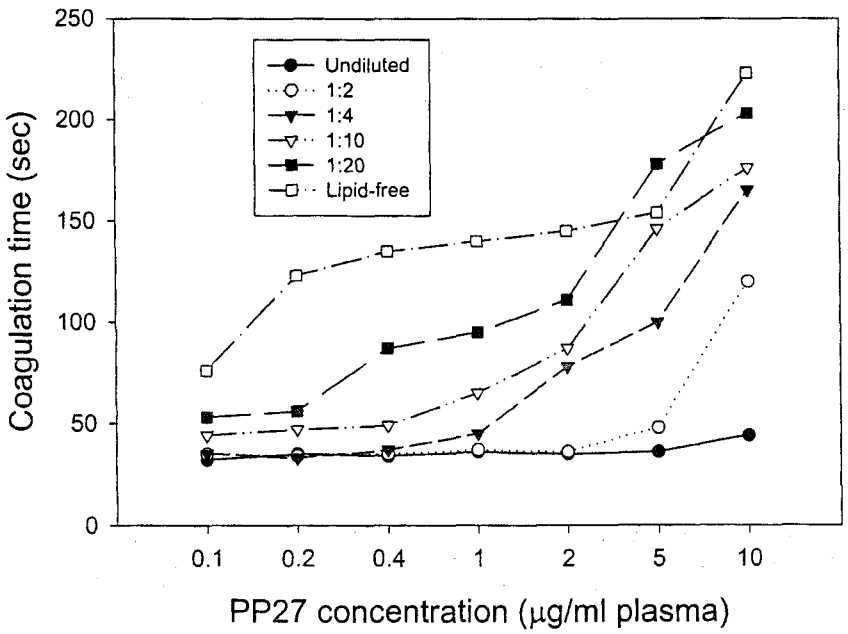

Fig. 3. Influence of lipids on the anticoagulant effect of PP27

Coagulation of SHPL without/with increasing amounts of PP27 was tested. Influence of elagic acid and different concentrations of lipids on coagulation were examined using Neothromtin (Boehringher).

Table 1. Influence of the lipid-concentration on coagulation time in the presence of PP27

Lipid added (dilution of lipid-containing Neothromtin)	PP27 amount needed to double coagulation time (μg/test)
1:1	15.32
1:2	7.52
1:10	3.51
1:20	0.87
1:40	0.56
Lipid-free	0.43

또한 응고시간(초)은 농도 의존적으로 PP27에 의해 지연되었다. 그러나, 낮은 지질농도가 추가될 때에는 PP27의 좀더 높은 항응고 효과가 관찰되었다 (Table 1). 만약 응고가 지질로부터 유리된 순수한 elagic acid에 의해 시작되었다면 아마도 적은 양을 필요로 했을 것이다.

3. 혈액응고에 대한 혈소판과 결합된 PP27의 영향

혈소판과의 결합을 관찰하기 위하여 농도가 다른 PP27을 $Ca2^{+}$이 존재하는 상황과 존재하지 않은 상황에서 세척된 사람의 혈소판과 함께 항온 배양된 후에 결합되지 않은 분자들을 혈소판을 세척함으로써 제거하였다. 결합된 PP27 분자들은 ELISA에 의해 측정하였다. Table 2는 상당한 양의 PP27이 $Ca2^{+}$이 존재하지 않는 상황에서 높은 농도에서 결합한다는 것을 나타낸다. 대조적으로 $Ca2^{+}$이 존재하는 상황에서 PP27은 효과적으로 혈소판과 결합하였다. 혈소판과 결합한 막과의 $Ca2^{+}$ 의존 결합은 고농도의 PP27이 존재하는 상황에서 포화시킬 수 있었고 점점 감소되었다.

신선한 사람 혈액으로부터 조제한 혈소판은 세포마다 7-8 × 10-4 pg PP27을 포함하였다[15]. 이러한 값들은 혈액의 응고를 막기 위하여 사용되어 왔던 heparin, hirudin 혹은 citrate과는 비의존적이었다. 단지 2가의 금속이온을 착화합시키는 EDTA는 PP27이 존재하는 상황에서 작은 감소를 유발하였다.

응고에 대한 PP27이 혈소판과 결합하는 효과를 관찰하기 위하여, PP27의 농도에 따른 혈소판과 대응하는 대조군 혈소판을 SHPL에 첨가하여 응고되는 시간을 응고계를 이용하여 측정하였다. 혈소판은 $Ca2^{+}$이 존재하는 상황에서 최대한의 세포 결합을 하게 하는 적당한 PP4의 농도로 항온배양되었다. 혈소판이 응고(90초)의 가속을 유발하는 SHPL에 추가되는 동안에, Plasma recalcification time (PRT)은 185초까지 증가되었다.(Fig. 4)

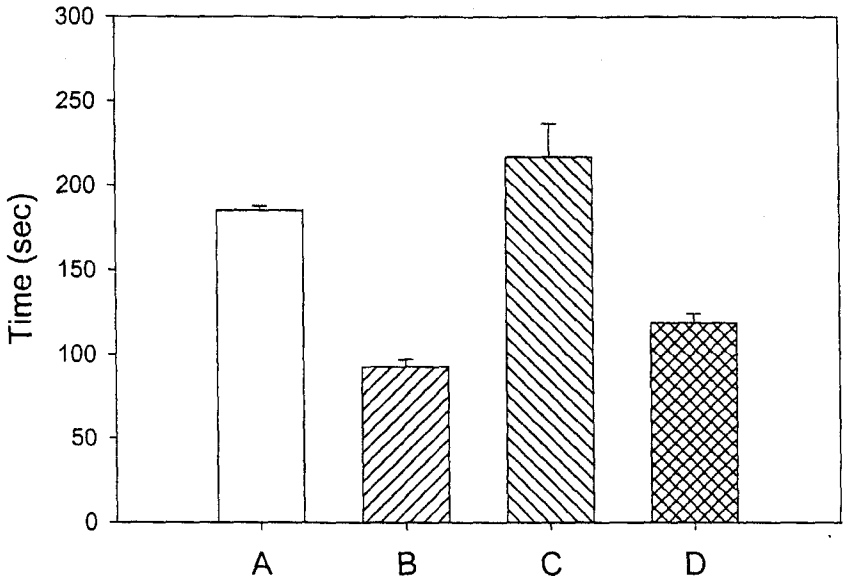

Fig. 4. Effect of PP27 platelet-binding on coagulation

Washed PP27-loaded and control platelets were added to SHPL and recalcification-time was measured in a coagulometer: (A) SHPL, (B) SHPL+ control platelets, (C) SHPL+PP27-loaded platelets and (D) SHPL + PP27-loaded platelets, but subsequently incubated with EDTA and washed as described under Materials and Methods.

Table 2. PP27-binding to human platelets

PP27 added final concentration(㎍/㎖)	n	PP27 bound (× 10-15 g PP27/Platelet)	
		$-Ca2^{+}$	$+Ca2^{+}$
0	5	0.54	0.7
1	5	0.76	7.5
4	5	1.10	43.1
10	5	1.16	212.7
40	5	1.34	435.8
100	5	1.65	454.3
200	5	2.76	432.6

Increasing amounts of PP27 were added to a platelet suspension (255,000 cells/㎕) in the presence and absence of calcium-ions (final concentration: 1mM). After removal of unbound proteins, platelet-bound PP27 was determined by ELISA as described in "Materials and Methods."

4. Thrombelastography 실험에서 사람 혈액에 대한 PP27의 효과

보다 생리학적인 실험장치에서 PP27의 항응고력의 측정을 위하여 신선한 사람 혈액의 thrombelastography를 실행하였다. 그 결과, 최종의 농도인 20 ㎍/㎖의 PP27이 추가되었을 때 응고시간을 상당히 연장시키는 활성을 나타내었다 (Fig. 5). 두 번째 실험에서 희석된 tissue-factor 용액을 혈액에 첨가하였는데, 대조군 혈액과 비교하여 볼 때 응고 시간이 대략 반정도 감소되었다. 추가된 tissue-factor의 응고촉진 효과는 PP27 (20 ㎍/㎖)에 의해 중화될 뿐만 아니라 그것에 과잉하게 억제하였다.

Ⅳ. 고 찰

紫河車는 健康한 사람의 胎盤을 烘製하여 乾燥한 것으로 甘味에 鹹味를 兼하고, 性이 溫하되 燥하지 않아 肺肝腎 三經에 들어가 氣血을 크게 補하고 腎精을 補益시켜 久病으로 인한 身體虛弱이나 혹은 體質虛弱과 氣血不足 및 腎虛精虧 등 證을 治療하는데 單味 보다 復方에 配伍하여 應用하면 좋은 효과가 있다고 기록되어있다[1]. 唐代 陳藏器의 〈本草拾遺〉에 氣血이 羸瘦하거나 婦人의 勞損을 主治한다"고[2] 最初로 記載된 이후 크게 多用되지는 않다가 明代에 와서 자주 응용되기 시작했는데, 주로 補氣養血益精하는 效果를 이용하여 氣血大虧, 虛勞骨蒸, 癲癎, 神

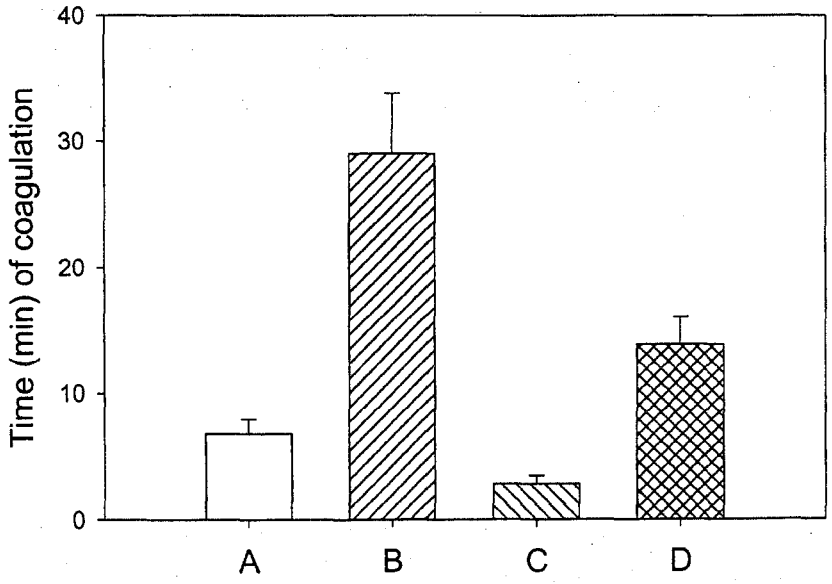

Fig. 5. Effect of PP27 on thrombelastography with human blood

Thromboblastography of freshly-drawn blood (A), in the presence of PP27 (20 ㎍/㎖), final concentration) (B), tissue-factor solution (Thromborel; diluted 1: 6400; Behringer Mannheim) (C) or tissue-factor solution (as in C) together with PP27 (as in B) (D); Time was recorded during coagulation.

經衰弱 및 자궁발육부전 등을 치료해 왔으며 최근 연구에는 estradiol, progesteron, acetyl glucosamine, d-galactose, mannose 및 다종의 아미노산 등이 포함되어 있어 강장작용, 자궁수축작용, 항결핵, 유선, 여성생식기 및 난소의 발육을 촉진하며 면역력 증가, 항알러지 작용 등이 있다고 보고되고 있고[3], 추출물의 주사시 Interferon 및 Lysozyme을 함유한 γ-구단백에 의한 항감염작용이 있고 저항력 증가작용에 의하여 실험적 구강투여시 항결핵작용이 있으며, urokinase가 profibrinolysin을 활성화시키는 작용에 대하여 억제효과가 있어 응고인자 XIII 결핍에 의한 출혈환자에 사용될 수 있고 실험실내에서 억제된 심장의 회복을 촉진할 수 있다고 보고되고 있다[4,5].

이러한 紫河車의 여러 가지 추출물 중에 annexin 단백질이 존재하는데 이 단백질은 여러 유기체, 기관, 세포에서도 발견된다[6]. 이 단백질은 6가지의 종류가 현재까지 분리되어 추출되고 있고 각각 특징적인 성질을 지니고 있다[7-10]. 비록 이 단백질들의 실질적인 생리 기능은 아직 알려지지 않았지만, annexin 단백질은 혈액응고를 억제하는 능력을 가지고 있다고 보고[9,11]된 바 있다.

fibrin의 형성을 유도하는 효소가 야기하는 일련의 과정에 있어서 지질막과 응고인자의 결합은 첫번째 핵심단계가 된다. annexin 단백질에 의해 혈전이 형성되는 것을 예방하는 기전은 항염증 작용을 나타내는 특징을 설명하는 것과 유사하다. annexin 단백질은 지질막의 표면에 결합함으로써 응고에 관련된 지질막에 결합하고 zymogen이나 기능이 촉진된 단백질 활성을 저해하게 된다. 대부분 annexin 단백질의 항응고 활성을 조사하기 위하여 실험실내에서 여러 장치를 사용한 연구가 진행중이며, 다양한 phospholipids의 여러가지 형태가 사용되었다[11-13]. 사실상 자유 지질이나 소포들은 응고 결과에 중요하지만 응고 결과에 중요한 역할을 하는 지질막, 혈소판 혹은 단핵구와 관련된 경우의 응고에 대한 영향은 연구되지 않았다.

활성이 이루어지는 동안에 혈소판 막구조는 근본적으로 변화하게 되며 음전하로 바뀌어진 지질들은 응고 인자의 표면에 결합하여 도움을 주는 세포 밖의 매개체에 노출되게 된다[14]. 단핵구가 내독소에 의해 자극될 때 부가적으로 촉진된 응고반응의 표면과 응고 단백이 생성되는 비슷한 변화가 관찰되었다[14].

이러한 annexin 단백질 중 Placenta protein PP4 (PP4)는 Bohn 등 (1979)에 의해 처음으로 분리되었다[20]. PAP-1, VAC-α 혹은 IBC는 역시 annexin군 (Annexin V)으로 여겨졌다[8,11,19]. $Ca2^{+}$과 관련된 phospholipid 결합특징을 연구한 결과 PP4는 음성으로 바뀌어진 막에 가장 높은 친화성을 가진다는 것을 밝혔다[8,13]. 이러한 결과들을 근거로 볼 때 PP27이 실험실내에서 막-지질로부터 arachidonic acid 분자의 phospholipid A2와 관련된 방출을 방해하는 것으로 현재까지 알려진 가장 유력한 annexin이라고 생각되었다; phospholipids와 PP27의 결합은 기질의 지방분해성 효소의 상호작용을 저해하는 것처럼 보인다.

같은 원리로 볼 때 annexin은 항응고 특성을 가진 것으로 생각되며 응고 실험 장치에서 PP27은 가장 유력한 annexin이다[16]. 지질 특히 음전하로 바뀌어진 phospholipids와의 결합은 PP27이 응고인자의 활성과 응고의 시작에 필요한 반응 표면을 차단할 수 있게 한다. PP27의 항응고 효과는 농도에 의존적이며 지질의 유효성에 영향을 받는다. 응고에 대한 반응 표면으로서 역할을 할 수 있는 지질이 좀더 많이 존재할수록 혈전 형성을 막기 위해 더 많은 양의 PP27이 필요하였다.

유리 지질 외에 혈액 세포들도 역시 표면의 형성에 중요한데 혈소판은 응고에서 응고 인자들의 공급뿐

만 아니라 자극 후 표면 위에 음전하로 바뀌어진 phospholipids의 노출에 의해 강하게 얽혀있게 된다. 활성화된 혈소판의 응고 촉진력은 막에서 PP27의 결합에 의해 중화될 수 있다. 대략 7-8 × 10-16 g의 PP27이 대조군 혈소판에 결합되었다. $Ca2^{+}$이 존재하는 상황에서 PP27과 같이 항온 배양하다 혈소판은 700 배의 양으로 결합하게 된다. 중화를 할 뿐만 아니라 심지어 지질과 관련된 응고촉진 효과를 과잉하게 억제하게 된다.

annexin이 대체로 세포내에 존재하기 때문에 혈액응고의 과정에 어떠한 생리학적인 역할을 하는지의 여부는 여전히 알려져 있지 않다[21]. 그러나, 저자는 치료되지 않은 혈소판의 바깥쪽 막에 대한 annexin의 작용에 관심을 가졌으며 annexin 단백질이 파괴된 세포로부터 유래되었을 것이라는 설명이 가능하다. 지금까지 6가지의 annexin은 특성이 잘 나타내졌음에도 불구하고 그 수는 여전히 확대되고 있다[22,23]. 아울러, 이 단백질들은 응고를 조절하는 역할을 할 수 있을 것이다. 더불어 만약 annexin이 세포외로 제공된다 할지라도 응고 즉 thromboxanes와 같은 혈소판응집에 관여하는 인자의 형성은 annexin에 의해 억제될 수 있다[24].

이에 저자는 annexin이 응고 조절에 어떻게 관여하는지 항응고제로서 가치가 있는지에 대한 실질적인 생리기능의 규명이 필요하리라 사료되며 이에 따른 연구를 진행 중이다.

V. 결 론

완전 성숙한 인간 태반(紫河車)으로부터 phenyl TSK gel 650M column, DEAE, HA 와 Mono-Q columns와 여러 가지 크로마토그래피 기술을 이용하여 새로운 형태의 항응고 단백질, PP27을 정제하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PP27은 변성조건에서 분자량 27 kDa으로 SDS-PAGE에 단일band를 보였고, Sepharose 4B column 크로마토그래피 결과와 비교한 결과 최근까지 보고된 PP4의 수치와 비슷한23 kDa의 분자량으로 측정되었다.

2. PP27의 등전점은 pI 5.2이었다.

3. PP27은 농도 의존적으로 응고시간을 억제한다.

4. PP27은 annexin 타입의 혈관 항응고제로서 역할을 하고, 반작용으로 필수적인 지질과 결합으로써 $Ca2^{+}$ 의존 혈액응고를 억제한다.

5. PP27은 $Ca2^{+}$이 존재할 때 혈소판의 막과 결합하여 응집을 촉진시키는 효과를 중화시킨다.

6. PP27은 thromboplastin/lipid의 혼합물에 의해 유발된 응고를 소실시킨다.

참고문헌

1. 全國韓醫科大學本草學教室, 本草學, 서울, 永林社, 567-568, (1991)
2. 申佶求, 申氏本草學,서울, 壽文社, 41-43, (1998).
3. 李尙仁 등, 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, 349-350, (1990).
4. 江蘇新醫學院, 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, 2362-2363, (1982).
5. 高學敏, 中藥學, 서울, 醫聖堂, 334-335, (1994)
6. Klee, C.B. $Ca2^{+}$-dependent phospholipid-(and membrane-) binding proteins. Biochemistry

27, 6645-6653 (1988).

7. Hayashi, H., Sonobe, S., Owada, M. K. and Kakunaga, T. Isolation and characterization of tree forms of 36-kDa ca2^{+}-dependent actin-and phospholipid-binding proteins from human placenta membrane. Biochem. Biophys. Res. Comm. 146, 912-919 (1987).
8. Tait, J.F., Sakata,M., McMullen, B.A., Miao,C.H., Funakoshi, T., Hendrickson, L. E. and Fujikawa, K. Placental anticoagulant proteins: isolation and comparative characterization of four members of the lipoprotein family. Biochemistry 27, 6268-6276 (1988).
9. Pepkinsky, R. B., Tizard, R., Mattaliano, R. J., Sinclair, L. K., Miller, G.T., Browning, J.L., Chow, E.P., Burne, C., Huang, K.S., Pratt,D., Wachter, L., Hession, C., Frey, A. Z. and Wallner, B.P. Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. J. Biol. Chem. 263, 10799-10811 (1988).
10. Romisch, J. and Heimburger, N. Purification and characterization of six annexins from human placenta. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 5, 383-388 (1990).
11. Reutelingsperger, C.P.M., Hornstra, G. and Hemker, H.C. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. Eur. J. Biochem. 151, 625-629 (1985).
12. Kondo, S., Noguchi, M., Funakoshi, T., Fujikawa, K. and Kisiel, W. Inhibition of human factor VII a-tissue factor activity by placental anticoagulant protein. Throm. Res. 48, 449-459 (1987).
13. Tait, J. F., Gibson, D. and Fujikawa, K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of this lipocortin family. J. Biol. Chem. 264, 7944-7949 (1989).
14. Bevers, E.M., Compurius, P. and Zwaal, R.F.A. Changes in membrane phospholipids during platelet activation. Biochim. Biophys. Acta 57, 57-66 (1983).
15. Romisch, J., Schorlemmer, U., Fickenscher, K., Paques, E-P and Heimberger, N Anticoagulant properties of placenta protein 4 (Annexin V). Thrombosis Res. 60, 355-366 (1990).
16. Chiang, T.M., Wojcikiewicz, R.J.H., Kang, A. H. and Fain, J.N. Phosphorylation of the outer surface of platelets enhances the effects of collagen on aggregation, ATP release, calcium translocation and phosphoinositide hydrolysis. Thromb. Res. 50, 719-731 (1988).
17. Laemmli, U. K. (1970). Nature 227, 680-685.
18. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. H., Farr, A. L. and Randall, H. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
19. Iwasaki, A., Suda, M., Nakakao, H., Nagota, T., Saino, Y., Arai, K., Mizoguchi, T. Sato, F., Yoshizaki, H. Hirata, M., Murata, M. and Maki, M. Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation fron human placenta: a new lipocortin-like protein. J. Biochem. 102, 1261-1273 (1987)
20. Bohn, H. Placental and pregnancy proteins. In

Carcino Embryonic Proteins. Lehmann, F. G. (ed.) Elsevier, Amsterdam, Vol. 1, pp289-299 (1979).

21. Flaherty, M. J., West, S., Heima가, R. L., Fujikawa, K. and Tait, J. F. Placental anticoagulant protein-IL measurement in extracellular fluids and cells of the hemostatic system. J. Lab. Clin. Med. 115, 174-181 (1990).
22. Hayashi, H., Owada, M., Sonobe, S. and T. Kakunaga. Characterizations of two distinct $Ca2^{+}$-dependent phospholipid-binding proteins of 68-kDa isolated from human placenta. J. Biol. Chem. 264, 17222-17230 (1989).
23. Burns,A. Magendzo, K., Shirvan, A. Srivastava, M., Rojas, E., Alijani, M.R. and Pollard, H. B. Calcium channel activity of purified human synexin and structure of the human synexin gene. Proc. Natl. Acad. Sci 86, 3798-3802 (1989).
24. Flower, R. J. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. Br. J. Pharmacol. 94, 987-1015 (1988).