Tabebuia impertiginosa Martius ex DC(Taheebo)의 혈소판 응집 억제활성에 관한 연구

서범석*, 고관영*, 박영현*, 박병수**, 장성근*
*순천향 대학교 자연과학대학, **서울대학교 농생명공학 교실
e-mail: changsk@sch.ac.kr

Studies on antiplatelet activity of *Tabebuia impertiginosa* Martius ex DC(Taheebo)

Beom-seok Seo*, Gwan-Young Go*, Young-Hyun Park*,
Byeoung-Su Park**, Sung-Keun Chang*
*College of Natural Sciences, Soonchunhyang University
**School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University

Abstract

Platelet aggregation is a complex phenomenon that probably involves several intracellular biochemical pathways. When activated, platelets change shape, aggregate and release the contents of their intracellular granules. The interactions between platelets and blood vessel walls are important in the development of thrombosis and cardiovascular diseases. When blood vessels are damaged, platelet aggregation occurs rapidly to form haemostatic plugs or arterial thrombi at the sites of vessel injury or in regions where blood flow is disturbed. These thrombi are the source of thromboembolic complications of atherosclerosis, heart attacks, stroke, and peripheral vascular disease. Therefore, the inhibition of platelet function represents a promising approach for the prevention of thrombosis. Plants constitute a rich source of bioactive chemicals such as phenolics, terpenoids and alkaloids. Plant extracts may be an alternative to currently used medicinal source because they constitute a rich source of bioactive chemicals.

This study was performed to investigate the antiplatelet activity of extract of *Tabebuia impetiginosa Martius* ex DC (Taheebo) and find out which fractions to this activity in rabbit platelet. Taheebo was methanol extracted and solvent fractionated in to five fractions (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water). And each fractions were investigated inhibitory effects on platelet aggregation induced by various agonists using washed rabbit platelets in vitro.

Key words: *Tabebuia impetiginosa Martius* ex DC (Taheebo), Platelet aggregation

1. 서론

급속한 경제 발전과 생활수준의 향상으로 동물성 식품 및 지방의 섭취가 증가함에 따라 과거 영양 결핍성 질환은 감소하는데 반하여 과잉영양과 불균형 섭취로 인한 성인병 질환 발생은 급격히 증가하고 있는 추세이다[1]. 이러한 질환은 혈관 장애로 혈액과 밀접한 연관이 있으며 현재 뇌혈관계 질환의 직접적인 원인으로 혈액 중에서도 혈소판의 응집력 항진에 기인한다고 한다. 혈소판의 주요 기능은 물리적, 화학적 자극에 의해 혈관이 손상되면 활성화되어 방출, 점착, 변형, 응집함으로써 혈액 유실을 방지하는 지혈작용(haemostasis)에 중요한 역할을 담당하는 것이다. 그러나 어떤 병적인 증상에 의해 과도하게 활성화될 경우에도 유발하는 혈전생성의 주요 인자로서 알려져 있다. 따라서 혈소판은 뇌·심혈관계 질환의 예방 및 치료 연구에 있어 매우 중요한 인자로서 인식·이용되고 있다[1~4]. 근래에는 혈소판 활성화를 억제하는 천연물 중에서 생리활성 물질의 효과를 검증 및 연구하여 질병의 예방, 회복, 생체 조절 기능을 갖는 기능성 식품 및 의약품 개발은 식생활과 관련된 성인병의 가장 좋은 대처 방안으로

기대되고 있다.

T. impetiginosa Martius ex DC(Taheebo)는 능소화과(Bignoniaceae), Tabebuia속, impetiginosa종에 속한 식물로 높이는 약 30m, 줄기의 직경 50㎝~1.5m 정도로 성장하며, 아마존 강 유역의 일부 지역에 자생하는 다년생 식물이다[6, 10, 11]. 국내에서 연구된 약리작용으로는 소염진통 및 강심작용이 보고 되었고, Teheebo 수피의 메탄올 추출물이 항종양작용을 하는 것으로 보고 되어 있으며, Taheebo에서 분리된 lapachol은 항균작용을 하는 것으로 보고 되었으며, 현재 국내에서 차(tea)나 화장품 등으로 판매되고 있다.

본 연구에서는 ***T. impetiginosa*** Martius ex DC(Taheebo)가 뇌심혈관계 질환의 중요 발병요인인 혈전형성에 뛰어난 억제활성을 나타낼 수 있는 천연소재임을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물 및 시약

실험에 사용된 토끼(New zealand white)는 2~2.5 kg되는 수컷을 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 생리활성물질 분리 및 활성평가소재는 FRONTIER(IA,USA)사에서 구입한 *T.impetiginosa* Martius ex DC(Taheebo)를 사용하였다.

Collagen, thrombin, arachidonic acid는 Chrono Co.(PA, USA)에서 PAF는 Sigma. Co.(St, Louis, Mo, USA)에서 구입하였다.

Column chromatograghy용 silica gel은 kiesegel 60(70~240, 240~400 mesh, Merck)을 사용하였으며, TLC plate는 kiesegel 60(Merck)을 사용하였다.

본 실험에 사용한 모든 용매는 증류하여 사용하였고, 그 외 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2.2. 혈소판 현탁액의 조제

토끼 혈액을 ACD용액(65mM citric acid, 85mM trisodium citrate, 2% glucose)에 채혈한 후(혈액량의 1/6), 1,600×g로 10분간 원심 분리한다. 상등액(platelet rich plasma, PRPP)을 분리하여 1,400×g로 10분간 원심 분리한다. 침전물을 제거한 후 PRPP를 37℃에서 15분간 인큐베이션하고 3,000×g로 10분간 원심 분리한다. 상등액을 버리고 침전물을 1차 HEPES buffer로 부유시킨 후 15분간 인큐베이션하고 3,000×g로 10분간 원심분리한 후, 2차 HEPES buffer로 부유시킨 후 15분간 인큐베이션 시키고 3,000×g로 원심 분리한다. 3차 HEPES buffer로 혈소판수가 4×10^8cells/ml가 되도록 3차 buffer를 첨가하고 희석하여 세정 혈소판 부유액을 조제하여 사용하였다.

Table 1. Compositions of Buffers

	1st	2nd	3rd
Buffer	10	10	10
NaH_2PO_4	2.5	2.5	2.5
Glucose	2.5	2.5	2.5
HEPES	2.5	2.5	2.5
BSA	2.5	2.5	2.5
EGTA	5	-	-
H_2O	-	5	5
pH	6.5	6.5	7.35

Buffer solution : NaCl 40g, KCl 1g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1g/2L
Glucose solution : 5g/500ml
BSA(Bovine Serum Albumin) solution : 0.35g/10ml
NaH_2PO_4 solution : 2.25g/500ml
HEPES solution : 4.5g/500ml
EGTA solution : 0.152g/200ml

2.3. 혈소판 활성화 작용 측정

혈소판 형태의 변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 흡광도 측정장치(Aggregometer 470-VS, Chrono-Log Co., USA)를 사용하였다. 토끼 세정 혈소판 부유액 250㎕를 취하여 $CaCl_2$ 1mM을 첨가하고 1,000rpm에서 교반하면서 37℃로 incubation시킨 후 3분이 경과한 후에 collagen(10㎍/ml)을 투과하여 혈소판 응집을 유도하였다. 혈소판 활성화 억제 작용은 collagen으로 유도된 aggregation(%)을 대조군(A)으로, Taheebo 분획물을 전처리한 후 유도된 aggegation(%)을 시료군(B)으로 하여 다음 계산식에 따라 inhibition(%)으로 나타내었다.

$$\text{inhibition 억제율}(\%) = [\frac{A-B}{A}] \times 100$$

A: control aggregation (%)
B: sample aggregation (%)

2.4. Taheebo의 혈소판 활성화에 작용하는 생리활성 물질의 분리

T. impetiginosa *Martius* ex DC(5kg)를 methanol (MeOH)로 실온에서 45L로 추출하였다. 얻어진 364.2g의 추출물을 hexane, chloroform, ethyl- acetate, butanol을 각각 1.5L씩 3회에 걸쳐 분획하였다. 얻어진 용매 분획물을 혈소판 응집억제

활성도를 측정하여 가장 활성이 뛰어난 chloroform 층을 silica gel chromatography를 이용하여 분획하였다.(Fig. 1.)

Chloroform추출물을 TLC(CH_3Cl:MeOH=9:1, 8:2, 7:3)로 확인하고 HPLC(LC-10AD, Shimadzu, Japan)로 Cosmosil ODS 컬럼(4.6×250mm), 이동상(MeOH-ACN-0.1%, H_3PO_4(25:20:55,v/v/v), 검출파장 254nm, 유속 1.3ml/min의 조건에서 유효성분을 분리 정제하였다.(Table 2, 3.)

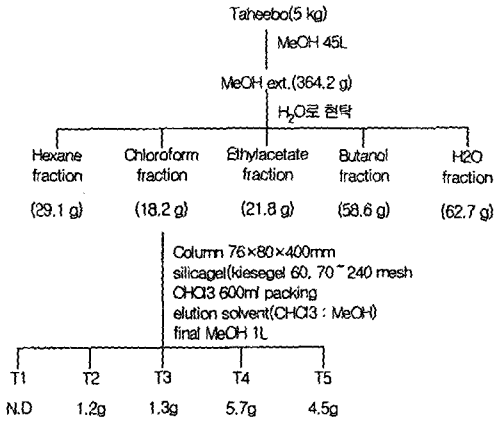

Fig. 1. Isolation of subfractions from chloroform of *T. impetiginosa* Martius ex DC.

Table 2. Operating conditions of analytical HPLC

Instrument	Shimadzu LC-10AD
column	Cosmosil $_5C_{18}$-MS(4.6×250 mm)
Detector	Shimadzu SPD-10A
Mobil, phase	gradient elution starting with MeOH-ACN-01.% (vol%) H_3PO_4(25:20:55 v/v/v) for 5min, then in 20min with linear increase to MeOH-ACN-01.% (vol%) H_3PO_4(25:45:20 v/v/v)
Flow rate	1.3 ml/min
UV Range	254nm

Table 3. Operating conditions of preparative HPLC

Instrument	Shimadzu LC-10AD
column	Shim-pack PREP-SIL(20.0 mm ID × 25 cm)
Detector	Shimadzu SPD-10A
Mobil, phase	gradient elution starting with MeOH-ACN-01.% (vol%) H_3PO_4(25:20:55 v/v/v) for 5min, then in 20min with linear increase to MeOH-ACN-01.% (vol%) H_3PO_4(25:45:20 v/v/v)
Flow rate	1.3 ml/min
UV Range	254nm

3. 결과 및 고찰

T. impetiginosa Martius ex DC(5 kg)를 45 L의 메탄올로 실온에서 추출하여 얻어진 메탄올 추출물액을 40℃ 이하에서 감압·농축하여 조추출물 364.2g을 얻었으며, 다양한 혈소판 응집유발인자로 유도된 혈소판 응집에 대한 억제활성을 측정한 결과, collagen과 arachidonic acid로 유도된 혈소판 응집에 대해 뛰어난 응집 억제활성을 확인하였다.

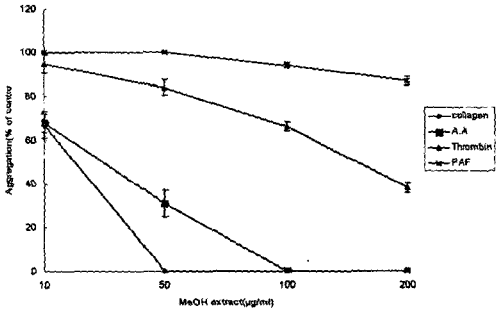

Fig. 2. Effect of methanol extract from *T. impetiginosa* Martius ex DC on platelet aggregation induced by various agonist.

따라서, 조추출물을 column chromatography법을 이용하여 Fig. 1.에서와 같은 방법으로 다섯 개의 1차 소분획(T1~T5)을 얻어 혈소판 응집억제활성을 측정하였으며, 그중 가장 뛰어난 억제효과를 나타내는 T2 분획을 HPLC를 이용하여 4개의 2차 소분획(T2-1~T2-4)으로 분리하였다.(Fig. 3~4.)

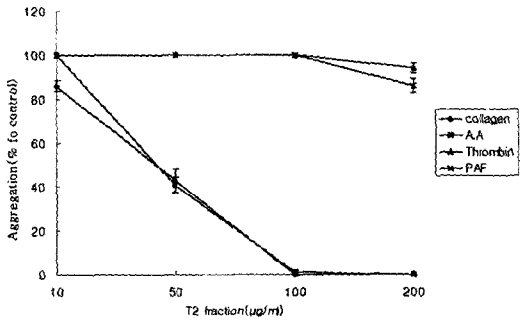

Fig. 3. Effect of T2 subfraction from *T. impetiginosa* Martius ex DC on platelet aggregation induced by various agonist.

4개의 2차 소분획을 다양한 응집유발인자로 유도된 혈소판 응집에 대한 응집억제활성을 측정한 결과, collagen과 arachidonic acid로 유도한 혈소판 응집에 대하여 뛰어난 활성을 나타내었으며, thrombin과 PAF

로 유도한 혈소판 응집에 대하여서는 응집억제활성을 나타내지 않음을 확인하였다.(Fig. 5~8.)

1. T2-1(rt : 5.71min) : 124.4mg
2. T2-2(rt : 10.522min) : 364.2mg
3. T2-3(rt : 14.117min) : 392.7mg
4. T2-4(rt : 20.165min) : 232.4mg

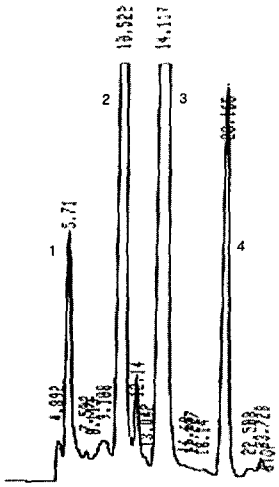

Fig. 4. HPLC profile of isolated T2 fraction from *T. impetiginosa* Martius ex DC.

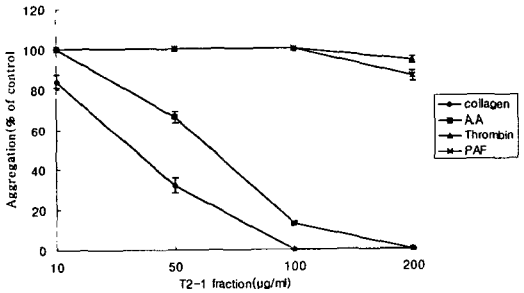

Fig. 5. Effect of T2-1 subfraction from *T. impetiginosa* Martius ex DC on platelet aggregation induced by various agonist.

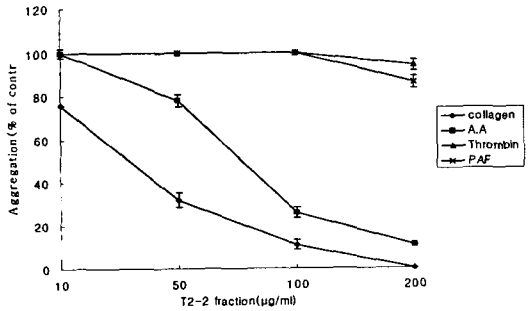

Fig. 6. Effect of T2-2 subfraction from *T. impetiginosa* Martius ex DC on platelet aggregation induced by various agonist.

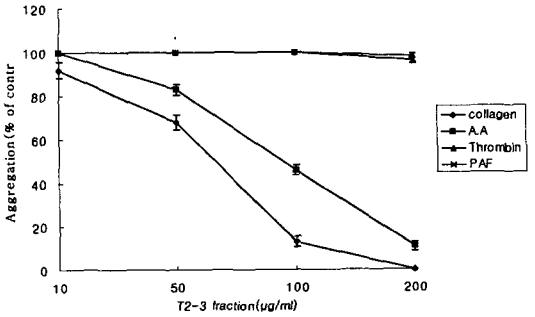

Fig. 7. Effect of T2-3 subfraction from *T. impetiginosa* Martius ex DC on platelet aggregation induced by various agonist.

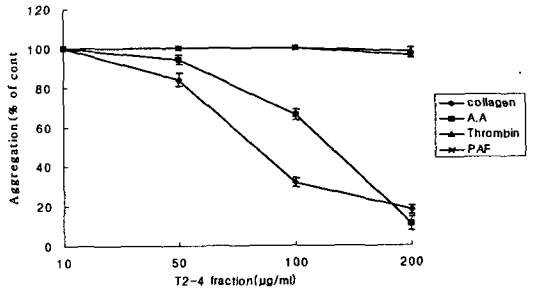

Fig. 8. Effect of T2-4 subfraction from *T. impetiginosa* Martius ex DC on platelet aggregation induced by various agonist.

3. 결론

본 연구에서는, 소염진통, 강심작용, 항종양작용 및 항균작용을 하는 것으로 보고된 ***T. impetiginosa*** Martius ex DC(Taheebo)를 대상으로 현대사회의 주요사망원인으로 나타나는 뇌심혈관계 질환의 중요한 관련 유발인자인 혈소판응집에 대한 응집억제활성물질을 분리하였으며, 분리한 천연물질에 대하여 혈소판 응집억제활성에 대해 연구하였다.

본 연구를 통하여 얻어진 결과를 토대로 ***T. impetiginosa*** Martius ex DC(Taheebo)가 뇌심혈관계 질환의 중요 발병요인인 혈전형성에 뛰어난 억제활성을 나타낼 수 있는 천연소재임을 확인하였다.

4. 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 순천향대학교 차세대 BIT무선부품연구센터(R12-2002-007-0100-0)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

[1] 박관혁 : 작약의 혈소판 응집억제에 관한 연구, 석사학위 논문, 순천향대학교 대학원, 2001

[2] 손동주 : Studies on Platelet Activation of Bioactive Constituents Isolated from Several Plants, 석사학위 논문, 순천향대학교 대학원, 2000

[3] 박병수 : Studies on the Biological active Components of Piper retrofractum Vahl. Fruits, 박사학위 논문, 순천향대학교 대학원, 1999

[4] 송민주 : Effect of Extracellular Ca^{2+}, Bupleuri radix and Lithospermi radix on Platelet Activation in the Rabbit, 석사학위 논문, 순천향대학교 대학원, 1997

[5] 서광희 : 타히보 추출물의 흰쥐 위액 분비 및 위 손상에 미치는 영향, Korean J. Food & Nutr., 10(3), 394-400, 1997

[6] Sharee L. OttenS and John P. Rosazzag : Oxidative Ring Fission of the Naph thoquinones Lapachol and Dichloroallyl Lawsone by Penicillium notatum, Journal of Biological chemistry, 258(3), pp. 1610-1613, 1983

[7] 정춘식, 한혜경, 정기화 : Streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐의 태자간 발생 및 호흡에 미치는 Taheebo의 영향, Journal of Applied Pharmacology, 4, 443-448, 1996

[8] 정춘식, 정기화 : Taheebo 분획물의 위염 및 위궤양에 대한 효과, Journal of Applied Pharmacology, 5, 331-335, 1997

[9] Jurgen Steinert, Hosni Khalaf, Manfred Rimpler : HPLC separation and determination of naphtho[2,3,-b]furan-4,9-diones and related compound in extracts of *Tabebuia avellanedae*(Bignoniaceae), *J.O.C.*, **693**, 281-287, 1995

[10] J. Steinert, H. Khalaf, M. Rimpler : High-performance liquid chromatographic separation some naturally occurring naphthoquinones and antraquinones, *J.O.C.*, 723, 206-209, 1996

[11] Byeoung-Soo Park, Kwang-Geun Lee, Takayuki Shibamoto, Sung-Eun Lee, And Gary R. Takeoka : Antioxidant Activity and Characterization of Volatile Constituents of Taheebo(T. impetiginosa Martius ex DC), *J. Agric. Food Chem*, 51, 295-300, 2003

[12] Junko Koyama, Izumi Morita, Kiyoshi Tagahara, Kei-Ichi Hirai : Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*

[13] Otto R. Gottlieb and Walter B. Mors : Petential Utilization of Brazilian Wood Extract ives, *J. Argic. Food. Chem*, **28**, 196-215, 1980

[14] Reen-Yen Kuo, Fang-Rong Chang, Chung-Yi Chen, Che-ming Teng Hsin-Fu Yen, Yang Chang Wu : A ntiplatelet activity of *N*-methoxycarbonyl aporphines from Rollinia mucosa, *Phytochemistry*, **57**, 421-425, 2001

[15] Fredyc Diaz and Jose F. Medina : Foranonaphtaho-quinones from *Tabebuia ochracea ssp.* neochrysanta, J. N at. Prod., 59, 423-424, 1996

[16] Aida Potille, Roser Vila, Blanca Freixa, Tomas Aszet, Salvador Canigueral : Antifungal activity of Paraguyan plants used in traditional medicine, Journal of Ethnopharmacology, 76, 93-98, 2001

[17] M. Madhusudana Rao and David G. I. Kingston : Plant anticancer agents. XII. Isolation and Structure Elucidation of New Cytotoxic Quinones fro *Tabebuia Cassinoides, J.* Nat. Prod., 45(5), 600-604, 1982

[18] Jufith Wurzburger and Ya'acov Leshen : Abscisic acid in Aegilops Kotschyi Caryopses, *Phytochemistry*, 15, 225, 1976

[19] Pavan K. Sharama, Rajinder N. Khanna, Bal K. Rohatgi and Ronald H. Thomson : Tecomaquinoni-III : A New Quinone From *Tabebuia Pentaphylla, Phytochemistry*, 27(2), 632-633, 1988

[20] Cecilia T. T. Baltt, Antonio Salatino and Maria L. F. Salatino : Flavonoids of *Tabebuia carraiba* (Bignoniaceae), *Biochemical Systematics* and Ecology, 24(1), 89, 1996

[21] Ueda Shinichi, Dojuda Harukunoi : Cancer Preventive Activity of *Tabebuia avellanedae* Extracts and its Constituents, P:51, *34th Annual Meeting of the American Society of Pharmacology*, 1993