

## Streptozotocin 유도 당뇨병 랫드의 혈소판 Phospholipase A<sub>2</sub> 활성에 미치는 Hydroxybrazilin의 영향

문창현# · 임동순 · 조태순\* · 김지영\*\*

아주대학교 의과대학, \*성균관대학교 약학대학, \*\*서울대학교 약학대학

(Received December 27, 1993)

### Inhibitory Effects of Hydroxybrazilin on the Platelet Phospholipase A<sub>2</sub> Activities in Normal and Streptozotocin Induced Diabetic Rats

Chang-Hyun Moon#, Dong-Soon Lim, Tae-Soon Cho\* and Ji-Young Kim\*\*

College of Medicine, Ajou University, Suwon 440-649, Korea

\*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-649, Korea

\*\*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—Platelets play a very important role in normal hemostasis and their functions are more enhanced in various pathogenic states than in normal state. Especially it has been postulated that abnormal platelet and endothelium function might be major factors of microcirculatory disturbance in diabetes mellitus. Hydroxybrazilin, a phenolic constituent of *Hematoxylon campechianum* has been examined for its inhibitory effect on platelet aggregation. Its antiaggregatory effect might be mediated through the decrease of ATP release from dense granule and those of thromboxane A<sub>2</sub> production in normal and streptozotocin induced diabetic rats. The present study was undertaken to gain insight into the mechanism that hydroxybrazilin inhibited thromboxane A<sub>2</sub> production in platelets. Thus we measured the effect of hydroxybrazilin on phospholipase A<sub>2</sub>, a rate limiting step of thromboxane A<sub>2</sub> production, in normal and streptozotocin induced diabetic rats. Hydroxybrazilin significantly inhibited the platelet phospholipase A<sub>2</sub> activity in normal and streptozotocin induced diabetic rats.

**Keyword** □ Platelet phospholipase A<sub>2</sub>, Streptozotocin-induced diabetic rat, Hydroxybrazilin.

지혈(hemostasis) 및 혈전(thrombus) 그리고 그 발생기전과 연관되어 나타나는 각종 혈관질환의 유발에 있어서 혈소판은 주된 역할을 하고 있으며<sup>1)</sup> 따라서 혈소판 기능의 조절을 통하여 이러한 혈관 질환을 예방 및 치유하려는 시도가 최근 활발히 이루어지고 있다. 혈소판은 혈관 내피세포가 물리적 화학적 자극에 의해 손상 받게 되었을 때 유리된 여러 인자에 의해 활성화 되기 시작하여 혈소판 모양의 변화(shape change), 가역적인 1차 응집(reversible primary aggregation), 비가역적인 2차 응집(irreversible second-

dary aggregation) 과정을 거쳐 그 기능을 수행하게 된다.<sup>2)</sup> 이러한 혈소판 응집의 과정은 여러 생리, 생화학적 경로를 거쳐 일어나며 특히 비가역적인 응집 반응 과정에는 혈소판내의 여러 granule로부터 응집 촉진 물질들의 유리와 일련의 효소계를 통해 생성된 thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)의 작용이 중요한 인자로 받아들여지고 있으며 TXA<sub>2</sub>는 강력한 응집촉진제로 정상상태에서 혈관내의 항상성 유지에도 큰 기여를 하고 있다. 즉, 혈소판으로부터 생성된 TXA<sub>2</sub>와 혈관 내피세포로부터 생성된 PGI<sub>2</sub>가 각각 혈소판 응집을 촉진, 억제하는 작용을 가지므로 정상상태에서는 TXA<sub>2</sub> //PGI<sub>2</sub>의 비율이 일정하게 유지되어 항상성을 유지

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

하게 된다.<sup>4)</sup> 이러한 TXA<sub>2</sub>는 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), cyclooxygenase, thromboxane A<sub>2</sub> synthase의 효소반응을 통하여 생성되는 물질로 이중 세포막의 인지질로부터 TXA<sub>2</sub>의 전구체인 arachidonic acid를 생성하는 PLA<sub>2</sub>의 활성이 이 과정의 rate limiting step으로 작용하고 있다.<sup>5)</sup> 따라서 PLA<sub>2</sub> 활성의 조절은 혈소판 응집반응의 조절에 매우 중요한 역할을 수행하고 있으며 혈소판 기능이상으로 인하여 유발되는 여러 질환의 치유 및 예방에 있어서도 큰 의의를 갖는다. Nievelstein 등은<sup>6)</sup> 당뇨병 환자에서 혈소판 응집능이 비 정상적으로 항진되어 있는 것을 보고한 바 있으며 이는 당뇨병에서 병발증으로 나타나는 미소순환 장애의 주된 요인이 혈소판 기능이상으로 연유됨을 시사하고 있다. 또한, D'Angelo 등의 보고에 의하면 당뇨병환자의 혈소판 응집능 증가는 TXA<sub>2</sub> 합성의 증가양식과 일치됨을 보여주고 있어<sup>3)</sup> 당뇨병 환자에서 TXA<sub>2</sub> 생성 조절에 의한 혈소판 기능 정상화가 미소순환 장애 개선에 긍정적인 작용을 나타낼 가능성을 시사하고 있다.

Flavonoid계 천연화합물인 hydroxybrazilin은 *Hematoxylon campechianum*의 주 성분으로 혈소판 응집능 억제작용 및 TXA<sub>2</sub> 생성능 억제작용을 갖는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 이러한 hydroxybrazilin의 작용이 PLA<sub>2</sub> 활성 억제에 기인함을 확인하였고 아울러 streptozotocin 유도 당뇨병 랫드의 경우에서도 동일한 결과를 나타내었기에 보고하고자 한다.

### 실험방법

**시약**—Hydroxybrazilin은 Aldrich Chemical Co., U.S.A.로부터 구입하였다. Streptozotocin, propyl gallate, NaCl, KCl, HEPES, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, glucose는 sigma chemical Co., U.S.A.의 것을 사용하였으며 <sup>3</sup>H-arachidonic acid는 Amersham International, Amersham, U.K.에서 구입하였고 기타 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

**실험방법**—수컷 Sprague-Dawley 랫드를 서울대학교 동물 사육장으로부터 공급 받아서 3주 동안 적응 사육시킨 후 200~250 g의 랫드를 실험에 사용하였다. 적응 사육시에 식이와 식수는 제한하지 않았고 사료는 삼양사의 고품사료를 사용하였으며, 그 조성은 단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조셀룰로즈 5.0%, 무기질 8.0%

등이었다. Streptozotocin 유도 당뇨병 랫드의 경우는 위의 조건에서 적용된 랫드를 24시간 굶긴 후 streptozotocin을 체중 1 Kg당 45 mg으로 총주사량이 0.4 ml/정도 되도록 하여 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. Streptozotocin은 중성 pH와 실내 온도하에서는 급속히 불활성화 되기 때문에 citrate buffer (pH 4.0)에 녹여 냉장상태를 유지한 후 10분내에 사용하였다. 주사 7일 후에 굶기지 않은 상태에서 꼬리정맥으로부터 혈액을 취한 후 glucose oxidase method를 사용하여 혈당을 분석하였다. 혈당이 350~550 mg%인 랫드를 당뇨병 랫드로 사용하였다.

**혈소판 분리**—Diethyl ether로 흡입 마취된 각 실험동물의 복대동맥으로부터 미리 3.8%의 sodium citrate가 첨가된 plastic 주사기로 sodium citrate양의 9 배량에 해당되는 혈액을 조심스럽게 취하였다. 채취한 혈액을 150 g로 15분간 원심분리한 후 상층(platelet rich plasma, PRP)을 취하여 1,500 g로 15분간 다시 원심분리하여 platelet pellet을 만들었다. PRP를 취하고 남은 하층은 다시 1,500 g로 15분간 원심분리한 후 그 상층을 platelet poor plasma (PPP)로 사용하였다. 이 platelet pellet에 HEPES tyrode buffer (NaCl 138 mM, KCl 2.9 mM, HEPES 20 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, glucose 1 mM, pH 7.4)를 넣어 혈소판 현탁액을 만들었다.

**<sup>3</sup>H-arachidonic acid 표지 혈소판의 조제**—혈소판 현탁액 2.5 ml를 취하여 25 μCi의 [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H] arachidonic acid와 400 mM의 propyl gallate를 넣은 후 37°C에서 2시간 동안 incubation하였다. 여기에 PPP 5 ml를 넣고 1,500 g에서 15분간 원심분리하여 pellet을 얻은 후 20 mM-EDTA를 함유한 HEPES-tyrode buffer 5 ml를 넣고 1,500 g에서 15분간 원심분리함으로써 유입되지 않은 <sup>3</sup>H-arachidonic acid를 제거하였다. <sup>3</sup>H-arachidonic 표지 혈소판은 이 pellet을 EDTA를 함유하지 않는 HEPES tyrode buffer를 가해서 10<sup>9</sup> platelets/ml가 되도록 현탁했다. Propyl gallate는 cyclooxygenase와 lipoxigenase의 억제제로 알려진 물질로 유리된 arachidonic acid가 더 이상 대사되지 않게 할 목적으로 사용되었다.

**PLA<sub>2</sub> 활성의 측정**—유리된 arachidonic acid가 더 이상 대사되는 것을 방지하기 위하여 위에서 얻어진 혈소판 현탁액 500 μ에 400 mM propyl gallate 50 μ를 가하고 1분 후 각 농도의 hydroxybrazilin(10<sup>-3</sup>,

$10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  M)을 각각 넣어 일정시간 동안 incubation하였다. Thrombin 1 U를 가하고 다시 5분 후 formic acid와 EDTA가 포함된  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/2) 용액으로 반응을 중지시켰다. 이 반응중지액은 ice bath상에서 4°C 상태를 유지하였으며 반응이 중지된 시료에 1.25 vol.  $\text{CHCl}_3$ 와 1.25 vol.의 2M-KCl을 넣고 vortex 하였다. 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상분리후 하층은 취하고 상층에는 다시  $\text{CHCl}_3$ 를 넣고 vortex하여 하층을 취하여 먼저 취해놓은 하층과 합하였다. 얻어진 하층은 상온에서 질소가스로 evaporation한 후  $\text{CHCl}_3$  1 ml에 용해시켜서 ethyl acetate/isooctane/acetic acid/water (90; 50; 20; 100)의 상층을 전개용매로 사용하여 TLC한 뒤 iodine chamber에서 발색시킨 후 arachidonic acid band를 긁어 liquid scintillation count 하였다.

### 실험결과 및 고찰

**Hydroxybrazilin의 혈소판 PLA<sub>2</sub> 억제 활성의 시간 의존성**—[3H]-arachidonic acid로 미리 표지된 혈소판에 hydroxybrazilin을 가한 후 시료마다 incubation time을 30초, 1분, 2분, 3분, 5분으로 상이하게 설정하여 thrombin 자극에 의해 유리되는 arachidonic acid의 양을 측정함으로써 PLA<sub>2</sub>에 대한 hydroxybrazilin의 시간 의존성을 측정하였다. Thrombin은 대조군에 비하여 약 2배 이상의 PLA<sub>2</sub> 활성증가를 나타내었으며 이는 기존의 다른 보고<sup>7)</sup>에서와 일치하였다 (Fig. 1). 또한 hydroxybrazilin의 경우 incubation time 30초부터 5분에 이르기까지 그 억제 작용에 큰 차이가 없어 30초 incubation으로도 그 작용이 충분히 일어날 수 있음을 알수있었다.

**정상랫드의 혈소판 PLA<sub>2</sub> 활성화에 미치는 hydroxybrazilin의 효과**—정상랫드의 혈소판을 분리하여 [3H]-arachidonic acid로 표지한 뒤 각 농도의 hydroxybrazilin을 5분간 preincubation하여 thrombin에 의한 PLA<sub>2</sub>활성 증가에 미치는 hydroxybrazilin의 작용을 측정하였다(Fig. 2). Thrombin에 의해 증가된 PLA<sub>2</sub>활성은 hydroxybrazilin 전 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었으며 특히  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  M 농도에서 각각 75%, 29%의 유의적인 억제효과를 나타내었다. 이는 hydroxybrazilin의 TXA<sub>2</sub> 억제작용과도 그 패턴이 일치하는 것으로 혈소판 응집작용의 major metabolite인 TXA<sub>2</sub>

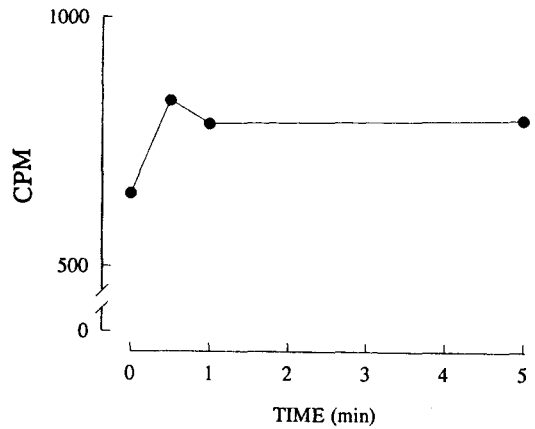


Fig. 1—Time course of effect of hydroxybrazilin on platelet phospholipase A<sub>2</sub> activities in normal rats.

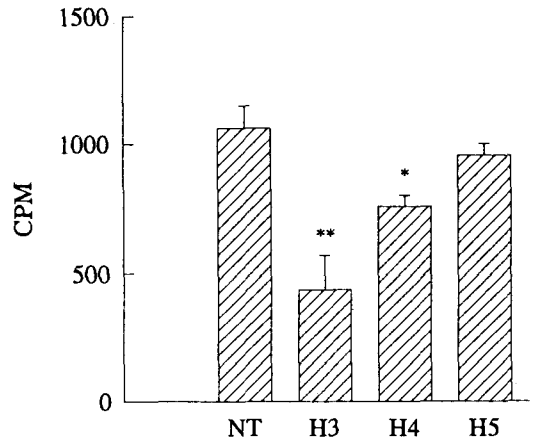


Fig. 2—Effect of hydroxybrazilin on platelet phospholipase A<sub>2</sub> activities in normal rats.

NT: Platelets stimulated with thrombin without preincubation

H3: Platelets preincubated with hydroxybrazilin  $10^{-3}$  M before thrombin stimulation

H4: Platelets preincubated with hydroxybrazilin  $10^{-4}$  M before thrombin stimulation

H5: Platelets preincubated with hydroxybrazilin  $10^{-5}$  M before thrombin stimulation (\*\*;  $p < 0.05$ , \*;  $p < 0.1$ )

에 대한 hydroxybrazilin의 억제작용은 PLA<sub>2</sub>의 억제작용에 의해 일부 매개됨을 알 수 있었다.

**Streptozotocin 유도 당뇨병 랫드의 혈소판 PLA<sub>2</sub> 활성화에 미치는 hydroxybrazilin의 효과**—Streptozoto-

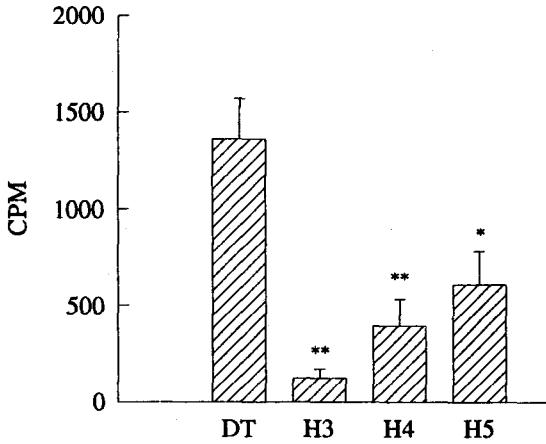


Fig. 3—Effect of hydroxybrazilin on platelet phospholipase A<sub>2</sub> activities in streptozotocin-induced diabetic rats.

DT: Platelets stimulated with thrombin without preincubation  
 H3: Platelets preincubated with hydroxybrazilin 10<sup>-3</sup> M before thrombin stimulation  
 H4: Platelets preincubated with hydroxybrazilin 10<sup>-4</sup> M before thrombin stimulation  
 H5: Platelets preincubated with hydroxybrazilin 10<sup>-5</sup> M before thrombin stimulation (\*\*; p<0.05, \*; p<0.1)

cin(45 mg/kg) 정맥주사에 의해 유발된 당뇨병 랫드의 경우 기존의 보고에서와 마찬가지로 3다현상(다뇨, 다식)을 나타내었으며 당뇨병 유도율은(혈당 300~550 mg%) 약 80%에 달하였다. 당뇨병 랫드의 경우 thrombin에 의한 PLA<sub>2</sub> 활성증가는 정상 랫드의 경우에 비하여 2배 이상을 나타내었으며<sup>8)</sup> 이는 당뇨병 상태에서 agonist에 대한 혈소판의 감도(sensitivity)가 증가된다는 보고와 일치하는 것으로<sup>9)</sup> 특히 당뇨병의 경우 정상에 비하여 TXA<sub>2</sub> 생성량이 증가되어 있는 원인이 PLA<sub>2</sub> 활성의 증가가 그 주된 요인이 될 수 있음을 뒷받침해주고 있다(Fig. 3). Hydroxybrazilin은 정상 랫드의 경우에서와 마찬가지로 농도 의존적인 억제효과를 나타내었으며 특히 정상 랫드의 경우 그 억제효과를 나타내지 않았던 10<sup>-5</sup> M에서도 유의적인 억제작용을 나타내었다. 즉, hydroxybrazilin은 정상 랫드의 경우에서와 마찬가지로 당뇨병 랫드에서도 혈소판 활성증가로 인한 PLA<sub>2</sub> 활성을 억제함으로써 arachidonic acid유리를 억제하여 결과적으로

arachidonic acid를 전구체로 하여 생성되는 강력한 혈소판 응집 촉진제인 TXA<sub>2</sub> 생성을 억제함으로써 혈소판 응집억제는 물론 더 나아가 혈소판 기능의 과도한 항진으로 인해 발생하는 미소순환 장애를 개선할 수 있다는 가능성을 보여 주고 있다.

결 론

Hydroxybrazilin은 *Hematoxylon campechianum*의 주 성분인 flavonoid계 천연화합물로 혈소판 aggregation 억제작용 및 TXA<sub>2</sub> 생성 억제 등의 작용이 있다. 본 연구에서는 이러한 hydroxybrazilin의 작용이 PLA<sub>2</sub> 활성을 억제하여 일어나는 지의 여부를 확인하고 아울러 당뇨병 등의 대사성 질환에서 빈번하게 일어나는 혈소판 기능항진으로 인한 미소순환 장애의 개선에 유의적인 작용을 할 수 있는지의 가능성을 확인하고자 하였다. 본 연구의 결과 당뇨병 랫드의 혈소판에서는 정상 랫드에 비하여 thrombin에 의해 증가된 PLA<sub>2</sub> 활성이 hydroxybrazilin에 의해 정상 및 당뇨병 랫드 모두에서 농도 의존적으로 억제되었으며 따라서 hydroxybrazilin에 의한 TXA<sub>2</sub> 생성억제 및 혈소판 응집감소는 PLA<sub>2</sub> 활성의 억제가 그 주된 요인 중의 하나임을 알 수 있었다. 이는 hydroxybrazilin이 혈소판 기능 변화로 인해 유발되는 여러 질환에서 긍정적인 작용을 나타낼 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

문 헌

- 1) Mustard, J. F. and Packham, M. A. Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation, *Pharmacol. Rev.* **22**, 97 (1979).
- 2) Frojmovic, M. M. and Milton, J. G.: Human platelet size, shape and related functions in health and disease, *Physiol. Rev.* **62**, 185 (1982).
- 3) D'Angelo A., Micossi P., Mannucci PM., Garimberti B., Franchi F. and Pozza G.: Increased production of platelet thromboxane B<sub>2</sub> in non insulin dependent diabetes, relationship to vascular complications, *Eur. J. Clin. Invest.* **14**, 83 (1984).
- 4) Somo va L., Dashev G., Kamenov V., Kirilov G., Kirjakov A., Doncheva M. and Vassileva M.: Streptozotocin induced diabetes in rat, I. Influence of hypertension and myocardial infarction on the de-

- velopment of vascular complications. *Methods. Find Exp. Clin. Pharmacol.* **10**, 677 (1988).
- 5) Billah M. M., Lapetina E. G. and Cuatrecasas: Phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C activities of platelets, differential substrate specificity, calcium requirement, pH dependence and cellular localization, *J. Biol. Chem.* **255**, 10227 (1980).
- 6) Nievelstein P. F., Sixma J. J., Ottenhof R. M., Wynne H. T., Degroot and Banga J. D.: Platelet adhesion and aggregate formation in type I diabetes under flow conditions, *Diabetes*, **40**, 1410 (1991).
- 7) Harlam J. M. and Haker L. A.: Haemostasis thrombosis and thromboembolic disorders, *Med. Clin. North Am.*, **65**, 855 (1981).
- 8) Derubertis F. R. and Cravien P. A.: Contribution of platelet thromboxane production to enhanced urinary excretion and glomerular production of thromboxane and to the pathogenesis of albuminuria in the streptozotocin-diabetic rats, *Metabolism*, **41**, 90 (1992).
- 9) Peter D. W., Perry V. H. and John A. C.: *The Platelets physiology and pharmacology*, Academic press INC., Florida, p.343 (1985).