

수종의 생약으로부터 혈소판 활성화인자 길항제 검색

손진호 · 김소희* · 정근영* · 장현욱*
안동대학교 식품영양학과 · *영남대학교 약학대학

Screening of Platelet Activating Factor(PAF) Antagonist from Medicinal Plants

Kun Ho Son, So Hee Kim*, Keun Young Jung* and Hyeun Wook Chang*

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749 and

*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—The platelet activating factor (PAF) is a newly discovered chemical mediator, the chemical structure of which is 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. Since PAF has potent and broad activities, its pathophysiological roles have received much attention. To develop a new PAF antagonist from medicinal plants, extracts of twenty medicinal herb were screened using PAF receptor binding, [¹⁴C] serotonin release and platelet aggregation.

Keywords—PAF · PAF receptor binding · [¹⁴C] serotonin release · platelet aggregation · medicinal herb

혈소판활성화인자(platelet activating factor, PAF)는 IgE로 감작된 토끼의 호염기구를 항원으로 자극했을 때 배양상청액 중에 방출되는 인자로서 1972년 Benveniste 등에 의해 발견된 후¹⁾, 1979년 Benveniste²⁾, Demopoulous³⁾ 등에 의해 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine의 구조를 갖는 에테르형 인지질임이 밝혀졌다. 그 이후, 호염기구 이외에도 호중구, 호산구, macrophage, mast cell, 혈관내피세포 등⁴⁻⁷⁾ 다양한 세포와 조직에서 자극에 의하여 PAF를 생산함이 보고되었다. PAF는 혈소판활성화 이외에도 혈압강화작용, 평활근수축, 혈관투과성항진 등 극히 미량(10^{-9} ~ 10^{-10} M)으로 다양한 생리활성을 나타냄이 밝혀졌다.⁸⁻¹⁰⁾ PAF가 염증이나 기관지 천식, 알러지, anaphylaxy, 혈전 등에 직·간접으로 관여하는 새로운 화학전달물질임이 보고된 후¹¹⁻¹⁵⁾ PAF 수용체에 대한 길항제의 개발은 새로운 의약품이 될 수 있다는 기대감으로 많은 연구가 수행되어왔다.¹⁶⁻²⁰⁾

이에 저자 등은 새로운 PAF 길항제를 개발할 목적으로 20종의 생약으로부터 유기용매법으로 분획한 시료에서 검색한 결과 5종의 생약에서 PAF 저해활성 분획을 찾았기에 보고하고자 한다.

실 험 방 법

실험재료—본 실험에 사용한 생약은 대구 약령시장에서 구입하여 사용하였다.

실험동물—체중 1.5~2.0 kg의 토끼를 사용하였다.

시약—[³H] PAF와 [¹⁴C] serotonin은 Amersham제품을 사용하였으며, 그 이외의 시약은 모두 특급을 사용하였고, 추출용 용매는 1급 시약을 사용하였다.

기기 및 기구—Liquid scintillation counter는 Minaxi Tri-Carb 4000(Packard)를 사용하였고, platelet aggregometer는 Rikadenki Ram-11을, hemocytometer는 EKDS(Tokyo)를 사용하였다.

Ultrasonic cleaner는 Branson 2200을, centrifuge는 Kokusan H-103을 사용하였으며, filter apparatus는 Hoffer Scientific Instruments 제품을 사용하였다.

식물재료의 추출—각 생약을 MeOH로 열추출하고, 그 추출물을 유기용매의 극성에 따라 계통적으로 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH의 순서로 분획하였다.

혈소판의 PAF 수용체에 대한 [³H] PAF 결합저해 측정—토끼의 심장으로 부터 채혈한 후, 1500 rpm, 10분간 원심분리하여 (22°C), PRP (platelet rich plasma)를 얻은 후, 다시 2500 rpm, 10분간 원심분리하여 혈소판을 얻은 다음 1×10⁹ cell/ml로 조제하여 마이크로튜브에 혈소판 50 μl에 [³H] PAF (60,000 cpm, 0.6 nM) 및 시료 2 μl (50 μg/μl)를 가하였다. 한편, 비특이적 결합값을 구하기 위하여 [³H] PAF에 1000배량의 cold PAF를 가하여 각각 실온에서 60분간 반응시킨 후, 여과지 (GF/C, Whatman)에 반응액 (총 250 μl) 200 μl를 가한 후, 0.1% BSA-PBS 용액 15 ml를 가하여 세척한다음 여지에 남은 [³H] PAF의 양을 측정하였다. 대조시료로서는 CV-3988 (1×10⁻⁶M)을 가하여 비교하였다.

% Inhibition=100-

$$\frac{\text{Sample binding (cpm)} - \text{nonspecific binding (cpm)}}{\text{Total binding (cpm)} - \text{nonspecific binding (cpm)}} \times 100$$

[¹⁴C] Serotonin 유리억제 측정—상기의 방법으로 조제한 PRP에 [¹⁴C] serotonin (60,000 cpm)을 가하여 22°C에서 20분간 배양 후, 세척하여 [¹⁴C] labeled washed platelet를 만들어 5×10⁸ cell/ml의 농도로 세포를 조제하였다. 방사능 표시 혈소판 100 μl에 시료 2 μl (50 μg/μl)를 가한 후, 2분간 반응시킨다음 PAF (1×10⁻⁸ M)로 2분간 자극하고 1.5 M formaldehyde로 반응을 정지시킨 후 12,000 rpm, 2분간 (4°C) 원심분리하여 100 μl를 취하여 [¹⁴C] serotonin량을 측정하였다.

% [¹⁴C] Serotonin release=100×

$$\frac{\text{Sample treatment (cpm)} - 0\% \text{ release (cpm)}}{\text{PAF stimulation (cpm)} - 0\% \text{ release (cpm)}}$$

혈소판 응집 저해작용 측정—상기의 방법으로 조제한 washed platelet (1×10⁹ cell/ml) 50 μl를

완충액 (Tyrode-gelatin/CaCl₂) 200 μl에 가하여 2분간 반응시킨 후 시료 2 μl (50 μg/μl)를 가하여 2분간 반응시켰다. 그 다음, PAF (1×10⁻⁸ M)를 가한 후 응집저해능을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

20종의 생약을 MeOH로 추출한 후, 혈소판의 PAF 수용체에 대한 길항작용을 검토하였다. 우선, MeOH 엑스 중 (400 μg/ml) 팔루근, 측백, 방풍, 황금, 연교, 은행, 우방자, 합환피 등에서 길항작용을 나타내었으며, 특히, 연교, 우방

Table I. Antagonistic effects of some medicinal plants against [³H] PAF receptor in washed rabbit platelets

Plant name	% Inhibition ^{a, b)}
진 피 <i>Fraxinus rhynchophylla</i>	0
팔루근 <i>Trichosanthes kirilowii</i>	23.2
마치현 <i>Portulaca oleracea</i>	3.1
측 백 <i>Thuja orientalis</i>	70.4
선복화 <i>Inula britannica</i> subsp. <i>japonica</i>	0
대 계 <i>Cirsium japonicum</i> var. <i>ussuriens</i>	0
괴 화 <i>Sophora japonica</i>	10
방 풍 <i>Ledebouriella seseloides</i>	12.7
황 금 <i>Scutellaria baicalensis</i>	5.1
황 기 <i>Astragalus membranaceus</i>	0
길 경 <i>Platycodon grandiflorum</i>	0
소 염 <i>Perilla frutescens</i>	1.7
자 완 <i>Aster tataricus</i>	0
연 교 <i>Forsythia koreana</i>	90.9
은 행 <i>Ginkgo biloba</i>	33.6
작 약 <i>Paeonia lactiflora</i> var. <i>hortensis</i>	0
우방자 <i>Arctium lappa</i>	91.8
포공영 <i>Tarvacum platycarpum</i>	0
금은화 <i>Lonicera japonica</i>	0
합환피 <i>Albizia julibrissin</i>	5.2
CV-3988 ^{c)}	70

^{a)}Data were means of duplicate determinations of methanol extracts (400 μg/ml).

^{b)}The degree of inhibitory activities were estimated as described in Materials and Methods section.

^{c)}CV-3988 concentration 1×10⁻⁶ M.

Table II. Antagonistic effects of several extracts against [³H] PAF to PAF receptor in washed rabbit platelets

Plant name	% Inhibition ^{a, b)}			
	<i>n</i> -Hexane Ext.	CHCl ₃ Ext.	EtOAc Ext.	<i>n</i> -BuOH Ext.
측 백	59.7	70.1	93.6	92.4
연 교	66.1	100	100	86
방 풍	37.4	0	0	0
팔루근	95.4	55.2	95.6	81.1
우방자	0	74.1	100	100
괴 화	0	0	0	22.5
선복화	32.7	63.8	0	61.7
황 금	0	34.4	100	78

^{a)}Data were expressed as means of duplicate determinations of each extracts(400 µg/ml).

^{b)}The degree of inhibitory activities were estimated as described in Materials and Method.

Table III. Inhibitory effects of medicinal plants on PAF-induced [¹⁴C] serotonin release of rabbit platelets

Plant name	Inhibition rate(%) ^{a, b)}
진 피	-
팔 루 근	+
측 백	+
선 복 화	+3
대 계	+2
괴 화	+2
방 풍	+2
황 금	-
황 기	-
길 경	-
소 엽	-
자 완	-
연 교	+
은 행	+2
총 백	+3
작 약	-
금 은 화	+1
포 풍 영	-

^{a)}Data were means of duplicate determinations of methanol extracts(500 µg/ml).

^{b)}Above 90% : +4, 89~80% : +3, 79~70% : +2, 69~60% : +1, below 60% : -

Table IV. Inhibitory effects of several extracts on PAF-induced [¹⁴C] serotonin release of rabbit platelets

Plant name	% Inhibition rate ^{a, b)}			
	<i>n</i> -Hexane Ext.	CHCl ₃ Ext.	EtOAc Ext.	<i>n</i> -BuOH Ext.
팔루근	+2	+3	+4	+3
괴 화	+4	-	-	+3
선복화	-	-	+4	+4
대 계	-	+2	+2	+3
방 풍	+4	-	+	+
총 백	+	+3	+4	+4

^{a)}Data were expressed as means of duplicate determinations of each extract(500 µg/ml).

^{b)}Above 90% : +4, 89~80% : +3, 79~70% : +2, 69~60% : +1, below 60% : -

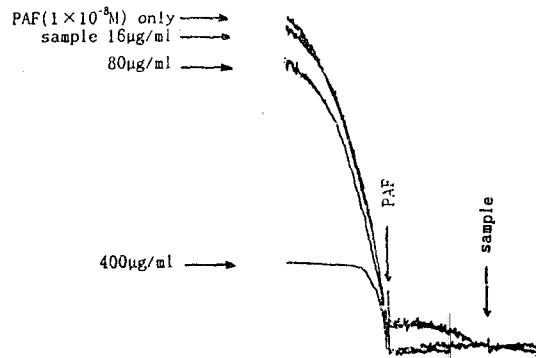


Fig. 1. Inhibitory effects of *Scutellaria baicalensis* (MeOH Extract) on PAF-induced aggregation of rabbit platelets

자에서 90% 이상 강력한 길항작용을 나타내었다(Table I). 다음 위의 시료를 다시 분획하여 각 분획을 동일조건으로 길항작용을 검색한 결과(Table II), 측백의 EtOAc, *n*-BuOH Ext.에서, 팔루근의 *n*-hexane, EtOAc Ext., 연교의 CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH Ext., 우방자의 EtOAc, *n*-BuOH Ext., 황금의 EtOAc Ext. 등에서 90% 이상 강력한 PAF 수용체 길항작용을 나타내었다. 또한, PAF에 의한 유리되는 [¹⁴C] serotonin의 양을 측정해 보았을 때(Table III), 팔루근, 선복화, 총백 등에서 80% 이상의 억제작용을 나타내었다. 이들을 다시 분획한 후, [¹⁴C] serotonin 유리 억제활성을 검토하였을 때(Table IV), 팔루근의 EtOAc Ext., 괴화의 *n*-hexane

Ext., 선복화의 EtOAc 및 *n*-BuOH Ext., 방풍의 *n*-hexane Ext., 총백의 EtOAc 및 *n*-BuOH Ext. 에서 90% 이상의 저해활성을 나타내었다. PAF 수용체 길항실험에서 저해활성을 나타내는 황금의 MeOH 분획을 이용하여 PAF에 의해 유도되는 혈소판 응집을 저해하는 실험을 한 결과(Fig. 1), 용량의존적으로 응집저해활성을 나타내었다.

결 론

PAF의 다양한 생리활성 및 여러 질병에 직·간접적으로 관여함이 밝혀진 이래, PAF의 길항제 개발이 활발히 진행되어 천연물에서 ginkgolide¹⁷⁾와 kadsurenone¹⁸⁾ 등이 보고되었으나, 주로 지금까지 개발되어 온 것은 PAF 구조 유사체 등 합성품이었다. 본 논문에서는 새로운 PAF 길항제를 개발하기 위하여 수종의 생약으로부터 유기용매법으로 추출한 엑스를 사용하여 일차적으로 검색한 결과, 5종류의 생약에서 길항작용을 나타내는 성분을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 이들의 PAF 수용체 길항작용과 [¹⁴C] serotonin 유리 억제작용은 주로 EtOAc 분획과 *n*-BuOH 분획에 함유되어 있음을 알 수 있었다. 금후, 이들 대상 생약을 더욱 분리, 정제하여 구조를 결정하게 되면, 새로운 PAF 길항제가 개발될 수 있으리라 기대된다.

감사의 말씀—이 논문은 1992년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제(지방대학육성) 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드린다.

〈1994년 3월 8일 접수 : 3월 15일 수리〉

참 고 문 헌

- Benveniste, J., Hensen, P.M. and Cochrane, C.G.: *J. Exp. Med.* 136, 1356 (1972).
- Benveniste, J., Tence, M., Varenne, P., Bidault, J., Bouillet, C. and Polonsky, J.: *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D* 289, 1037 (1979).
- Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N. and Hanahan, D.J.: *J. Biol. Chem.* 254, 9355 (1979).
- Oda, M., Satouchi, K., Yasunaga, K. and Saito, K.: *J. Immunol.* 134, 1090 (1984).
- Lee, T.C., Leihan, D.J., Malone, B. and Roddy, L.L.: *J. Biol. Chem.* 259, 5526 (1984).
- Menicia-Huetta, J.M. and Benveniste, J.: *Eur. J. Immunol.* 9, 409 (1979).
- Cammusi, G., Menicia-Huetta, J.M. and Benveniste, J.: *J. Immunol.* 33, 523 (1977).
- Snyder, F.: *Medical Res. Review* 5, 1070 (1985).
- McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Satoh, K. and Prescott, S.M.: *J. Clin. Inv.* 76, 271 (1985).
- Hayashi, H., Kudo, I., Inoue, K., Onozaki, K., Tsushima, S., Nomura, H. and Nojima, H. and Nojima, S.: *J. Biochem.* 97, 1737 (1985).
- McMamus, L.M., Hanahan, D.J. and Demopoulos, C.A.: *J. Immunol.* 124, 2919 (1980).
- Doebber, T.W., Wu, M.S., Robins, J.C., Choy, B.M., Chang, M.N. and Shen, T.Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 799 (1985).
- Morley, J., Page, C.P., Mazzoni, L. and Sanjar, S.: *Annals of Allergy* 56, 335 (1986).
- Hwang, S.B., Lam, M.H., Li, C.L. and Shen, T.Y.: *Eur. J. Pharmacol.* 120, 33 (1986).
- Nigam, S. and Shipka, S.: *New Horizons in Platelet Activating Factor Res.* 363 (1987).
- Terashita, Z., Tsushima, S., Yoshioka, Y., Nomura, H., Inada, Y. and Nishikawa, K.: *Life Sci.* 32, 1975 (1983).
- Braquet, P.G., Spinnewyn, B., Braquet, M., Bourgain, R.H., Taylor, J.E., Etienne, A. and Drieu, K.: *Blood and Vessel* 16, 558 (1985).
- Shen, T.Y., Hwang, S.D., Chang, M.N., Doebber, T.W., Lam, M.H., Wu, M.S., Wang, X., Han, G.Q. and Li, R.Z.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 672 (1985).
- Weissman, D., Poli, G., Bousseau, A. and Fauci, A.S.: *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2537 (1993).
- Yamada, T., Tommioka, K., Horie, M., Sakurai, Y., Nagaoka, H. and Mase, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 781 (1991).