

Microplate 방법을 이용한 Hyaluronidase 저해 활성 검색

정세준, 김나영, 안년형, 김윤철*

원광대학교 약학대학

Screening of Hyaluronidase Inhibitory Activity Using a Microplate Assay

Sei Joon Jeong, Na Young Kim, Nyeon Hyoung Ahn and Youn Chul Kim*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract - The aqueous and methanolic extracts of 110 crude drugs were screened for hyaluronidase inhibitory activity using a microplate assay. Among them, MeOH extract of 15 crude drugs inhibited more than 80% of hyaluronidase activity at the concentration of 5 mg/ml. The active principles of Anemarrhenae Rhizoma, Rhei Rhizoma, Ephedrae Herba, Pteropi Faeces and Ginseng Radix alba were transferred into organic solvents.

Key words - hyaluronidase inhibitor; screening; crude drugs; microplate assay

알레르기는 항원항체 반응의 결과로 일어나는 생체의 병적 과정을 의미하며 알레르기 반응에 의하여 일어나는 질환을 알레르기성 질환이라고 부른다. 일반적으로 알레르기는 4가지로 분류가 가능하며 즉시형 과민반응에 속하는 제1형 알레르기가 가장 흔하게 발병하고 여기에는 알레르기성 비염, 기관지 천식, 아토피성 피부염 및 화분증 등이 속한다.¹⁾ 제1형 알레르기의 병리학적 작용기전은 비만세포의 탈과립에 따른 histamine 유리반응에 의한 것으로 설명된다. 즉, 비만세포막에서의 항원-IgE 항체 반응에 의한 면역학적 자극에 의하여 세포외액 중에 존재하는 칼슘이온이 calcium channels을 통하여 세포내에 유입되고, 유입된 칼슘이온은 hyaluronidase 등의 효소를 활성화시킴으로써 탈과립을 일으키는 것으로 밝혀져 있다.²⁾ 비만세포의 탈과립에 의하여 비만세포로부터 histamine, serotonin, prostaglandin, leucotrienes 등의 chemical mediators가 방출되어 알레르기 반응이 일어나는 것으로 알려져 있다.³⁻⁶⁾

Hyaluronidase는 mucopolysaccharide-splitting효소 중의 하나로서 혈관계의 투과성과 염증반응에 관여하며,⁷⁾ 그 작용기전에 따라 고환, 리소좀 및 venom에 분포하는 hyaluronate 4-glycanohydrolase(EC 3.2.1.35), 거머리에 존재하는 hyaluronate 3-glycanohydrolase(EC 3.2.1.36)와 세균에 존재하는 hyaluronate lyase(EC 4.2.2.1)로 분류된다.⁸⁻¹⁰⁾ 이 효소는 일반적으로 체내에서 불활성형으로 존재하고 금속이온 및 N-methyl-p-methoxyphenethyl-amine과 formaldehyde의 다중합체인 compound 48/80에 의해 활성화된다.¹¹⁾ Compound 48/80은 비만세포의 탈과립을 유발시켜 histamine 등의 chemical mediators를 방출시키는 염증 유발물질로 알려져 있다.¹²⁾ 한편, 항알레르기 약물로 이용되고 있는 DSCG(disodium cromoglycate), tranilast(N-3',4'-dimethoxycinnamoyl anthranilic acid), baicalein phosphate 및 traxanox와 같은 산성 항알레르기 약물은 항원-IgE 항체 반응에 의한 비만세포로부터의 histamine의 유리를 억제함과 동시에 hyaluronidase 저해활성을 나타내었다.¹³⁾ 이는 산성

*교신저자 : Fax 0653-52-8837

항알레르기 약물이 hyaluronidase 활성을 저해함으로써 비만세포로부터 histamine의 방출을 억제하는 것으로 사료된다. 이와 같은 사실에 입각하여 hyaluronidase 활성 저해물질의 탐색은 항알레르기 약물 개발방법 중의 하나로 이용되고 있다.

지금까지 널리 이용되고 있는 hyaluronidase 검정법으로는 기질인 hyaluronic acid의 분해산물인 N-acetylglucosamine을 p-dimethylamino benzaldehyde(DMAB)와 반응시켜 착색 복합체를 생성시키고 이를 비색 정량하는 방법이 있으며,¹⁴⁾ 이 방법을 이용한 많은 hyaluronidase의 저해제에 대한 연구가 보고되어져 있다.¹⁵⁻¹⁹⁾ 한편, Tung 등은²⁰⁾ microplate를 이용하여 hyaluronic acid의 β -1,4결합을 가수분해하여 tetrasaccharide를 생성시키는 소의 고환 유래 hyaluronidase에 의하여 분해되지 않고 잔존하는 hyaluronic acid를 cetylpyridinium chloride로 침전시킨 다음 흡광도를 측정하여 정량하는 microplate 방법을 보고하였다. 이 방법은 간단하고 재현성이 높으며 다량의 검체를 동시에 검색할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

이에 저자 등은 천연물로부터 hyaluronidase 활성 저해제를 탐색할 목적으로 microplate 방법을 이용하여 110종의 생약에 대한 검색을 실시하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기기 - Hyaluronidase (Type VI-S: from bovine testis), compound 48/80, hyaluronic acid potassium salt (from human umbilical cord), cetylpyridinium chloride, agarose (Type I-A: low EEO), DSCG는 Sigma사의 제품을 사용하였다. 기타 시약은 특급시약을 사용하였다. 흡광도 측정을 위하여 ELISA Reader (Molecular Devices)를 사용하였다.

생약 및 시료의 조제 - 본 실험에서 사용한 생약은 익산시 원광제약(주)에서 구입하여 감별한 후 세절하여 사용하였으며, 증거표본은 원광대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다 (Table I). 세절한 시료 80 g을 증류수로 80°C에서 3시간 추출한 다음 여과후 감압농축하고 이를 동결건조하여 물 추출물

Table I. Inhibitory effects of hyaluronidase by aqueous and methanolic extracts of crude drugs

| Samples | Voucher specimen | Inhibition (%) ^{a,b} | |
|-----------------------------------|------------------|-------------------------------|-------|
| | | H ₂ O | MeOH |
| Acanthopanax Cotex (오가피) | WP 290 | - | 81.73 |
| Acori graminei Rhizoma (석창포) | WP 233 | - | 58.04 |
| Akebiae Caulis (목통) | WP 136 | - | - |
| Alismatis Rhizoma (택사) | WP 434 | - | - |
| Alpiniae Fructus (익지인) | WP 341 | 11.68 | - |
| Alpiniae officinari Rhizoma (고량강) | WP 027 | - | - |
| Amomi Semen (사인) | WP 197 | 3.65 | 23.73 |
| Ampelopsis Radix (백랍) | WP 157 | - | - |
| Anemarrhenae Rhizoma (지모) | WP 391 | - | 83.06 |
| Angelicae gigantis Radix (당귀) | WP 089 | - | - |
| Angelicae koreanae Radix (강활) | WP 009 | - | - |
| Arctii Semen (우방자) | WP 312 | 45.24 | 62.46 |
| Arecae Semen (빈랑자) | WP 188 | - | - |
| Arisaematis Tuber (천남성) | WP 406 | 43.07 | 25.80 |
| Armeniacae Semen (행인) | WP 473 | 13.56 | 9.30 |
| Artemisiae asiaticae Herba (애엽) | WP 270 | - | - |
| Artemisiae capillaris Herba (인진호) | WP 344 | 1.46 | 3.29 |
| Asiasari Radix (세신) | WP 240 | 82.42 | - |
| Astragali Radix (황기) | WP 499 | - | - |
| Atractylodis Rhizoma (창출) | WP 403 | - | - |
| Atractylodis Rhizoma alba (백출) | WP 170 | 36.26 | 25.50 |
| Aurantii immatri Pericarpium (청피) | WP 417 | - | - |

Table I. Continued.

| Samples | Voucher specimen | Inhibition(%) ^{a,b} | |
|--|------------------|------------------------------|-------|
| | | H ₂ O | MeOH |
| <i>Aurantii nobilis</i> Pericarpium (진피) | WP 398 | 69.23 | 23.58 |
| <i>Bombycis</i> Corpus (백강잠) | WP 150 | - | - |
| <i>Bupleuri</i> Radix (시호) | WP 261 | 35.16 | - |
| <i>Caesalpiniae</i> Lignum (소목) | WP 244 | - | 31.45 |
| <i>Carthami</i> Flos (홍화) | WP 495 | - | - |
| <i>Caryophylli</i> Flos (정향) | WP 376 | 6.01 | - |
| <i>Chaenomelis</i> Fructus (모과) | WP 129 | 60.44 | 82.35 |
| <i>Cimicifugae</i> Rhizoma (승마) | WP 258 | - | - |
| <i>Cinnamomi Cortex spissus</i> (육계) | WP 331 | 98.53 | 100 |
| <i>Cinnamomi Ramulus</i> (계지) | WP 023 | 98.30 | 93.42 |
| <i>Cnidii</i> Rhizoma (천궁) | WP 404 | - | - |
| <i>Coicis</i> Semen (의이인) | WP 339 | - | - |
| <i>Coptis</i> Rhizoma (황련) | WP 500 | - | - |
| <i>Corni</i> Fructus (산수유) | WP 203 | - | - |
| <i>Corydallis</i> Tuber (현호색) | WP 479 | - | 26.32 |
| <i>Cyperi</i> Rhizoma (향부자) | WP 474 | - | - |
| <i>Dioscoreae</i> Rhizoma (산약) | WP 204 | - | - |
| <i>Ephedrae</i> Herba (마황) | WP 119 | - | 100 |
| <i>Epimedii</i> Herba (음양곽) | WP 338 | 65.91 | 100 |
| <i>Eucommiae</i> Cortex (두충) | WP 109 | 16.20 | 30.50 |
| <i>Evodiae</i> Fructus (오수유) | WP 297 | - | - |
| <i>Farfarae</i> Flos (판동화) | WP 040 | 22.22 | - |
| <i>Forsythiae</i> Fructus (연교) | WP 278 | - | 47.76 |
| <i>Fraxini</i> Cortex (진피) | WP 399 | - | - |
| <i>Fritillariae</i> Bulbus (패모) | WP 443 | 40.15 | - |
| <i>Galla Rhois</i> (오배자) | WP 296 | 30.66 | 100 |
| <i>Gardeniae</i> Fructus (치자) | WP 427 | - | - |
| <i>Gastrodiae</i> Rhizoma (천마) | WP 408 | - | - |
| <i>Gentianae macrophyllae</i> Radix (진교) | WP 396 | 38.46 | - |
| <i>Gentianae Scabrae</i> Radix (용담) | WP 307 | - | 16.94 |
| <i>Ginseng</i> Radix alba (백삼) | WP 163 | - | 85.24 |
| <i>Gleditsiae</i> Spina (조각자) | WP 379 | - | - |
| <i>Glycine Semen Germinatum</i> (대두황권) | WP 093 | - | - |
| <i>Glycyrrhizae</i> Radix (감초) | WP 007 | - | 17.76 |
| <i>Hoelen</i> (복령) | WP 178 | - | - |
| <i>Hordei Fructus Germinatus</i> (맥아) | WP 124 | - | - |
| <i>Lemnae</i> Herba (부평) | WP 184 | - | - |
| <i>Liriopsis</i> Tuber (백문동) | WP 123 | - | - |
| <i>Lithospermi</i> Radix (자근) | WP 346 | - | - |
| <i>Lonicerae</i> Flos (금은화) | WP 062 | - | - |
| <i>Lycii</i> Fructus (구기자) | WP 048 | - | - |
| <i>Lycii Radicis</i> Cortex (지골피) | WP 389 | - | - |
| <i>Machili</i> Cortex (후박) | WP 507 | 86.83 | - |
| <i>Magnoliae</i> Flos (신이) | WP 264 | - | - |
| <i>Menthae</i> Herba (박하) | WP 144 | - | - |
| <i>Moutan Cortex Radicis</i> (목단피) | WP 131 | 100 | 63.16 |
| <i>Myristicae</i> Semen (육두구) | WP 332 | 26.75 | - |
| <i>Nelumbinis</i> Semen (연자육) | WP 280 | - | 100 |
| <i>Nepetae</i> Spica (헹개) | WP 481 | - | - |
| <i>Paeoniae</i> Radix (작약) | WP 357 | - | - |

Table I. Continued.

| Samples | Voucher specimen | Inhibition(%) ^{a,b} | |
|---------------------------------|------------------|------------------------------|-------|
| | | H ₂ O | MeOH |
| Patriniae Radix (패장) | WP 444 | - | - |
| Perilliae Herba (소엽) | WP 246 | - | - |
| Perilliae Semen (소자) | WP 245 | - | - |
| Persicae Semen (도인) | WP 101 | 12.24 | 11.63 |
| Phellodendri Cortex (황백) | WP 502 | - | - |
| Pinelliae Tuber (반하) | WP 147 | - | - |
| Piperis longi Fructus (필발) | WP 449 | - | - |
| Platycodi Radix (길경) | WP 064 | 30.77 | - |
| Polygalae Radix (원지) | WP 323 | - | - |
| Polygoni multiflori Radix (하수오) | WP 452 | - | - |
| Polyporus (저령) | WP 362 | - | - |
| Ponciri Fructus (지실) | WP 393 | - | - |
| Prunellae Spica (하고초) | WP 451 | 8.84 | 51.92 |
| Pteropi Faeces (오령지) | WP 293 | - | 100 |
| Puerariae Radix (갈근) | WP 002 | - | - |
| Rehmanniae Radix (건지황) | WP 395 | 28.57 | - |
| Rhei Rhizoma (대황) | WP 100 | - | 100 |
| Rubi Fructus (복분자) | WP 179 | 55.64 | 17.21 |
| Salviae Radix (단삼) | WP 087 | 63.74 | 18.03 |
| Sanguisorbae Radix (지유) | WP 394 | 100 | 10.58 |
| Santalini Lignum rubrum (자단향) | WP 347 | 9.04 | - |
| Saussureae Radix (목향) | WP 137 | 53.26 | 39.42 |
| Scrophulariae Radix (현삼) | WP 476 | 8.84 | 32.20 |
| Scutellariae Radix (황금) | WP 498 | - | - |
| Shizandrae Fructus (오미자) | WP 295 | - | - |
| Sophorae Flos (피화) | WP 046 | 20.30 | - |
| Sophorae Radix (고삼) | WP 030 | 85.71 | - |
| Torilidis Fructus (사상자) | WP 194 | 34.69 | 12.30 |
| Trichosanthis Radix (팔루근) | WP 042 | - | - |
| Typhae Pollen (포황) | WP 447 | - | - |
| Uncariae Ramulus et Uncus (조구등) | WP 380 | 92.27 | 100 |
| Vitidis Fructus (만형자) | WP 120 | - | - |
| Xanthii Fructus (창이자) | WP 402 | - | 25.97 |
| Zanthoxyli Fructus (산초) | WP 207 | 100 | 100 |
| Zedoariae Rhizoma (봉출) | WP 181 | - | 51.67 |
| Zingiberis Rhizoma (건강) | WP 013 | - | 100 |
| Zizyphi Fructus (대조) | WP 099 | 53.85 | 44.68 |
| Zyzyphi Spinosi Semen (산조인) | WP 206 | - | - |

^aFinal concentrations: 5 mg/ml. ^b-: No inhibition.

을 얻었다. 생약 80 g을 취하여 MeOH로 실온에서 3일간 2회 추출한 후 여과하고 여액을 40°C이하에서 감압농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 물 추출물과 MeOH 추출물은 DMSO와 0.3 M 인산완충액 (pH 7.0)에 용해시켜 검색시액으로 사용하였으며, DMSO의 농도는 최종농도를 1%로 하였다. 각 추출물의 5 mg/ml 용액을 이용하여 1차 활성검색을

실시하였으며, 강한 활성을 나타낸 시료의 MeOH 추출물에 대해서는 80% 수성 MeOH에 용해시킨 후 Hexane으로 추출하여 Hexane 가용부를 얻었다. 80% 수성 MeOH 분획은 증류수를 가하여 60% 수성 MeOH로 하고 여기에 CHCl₃을 가하여 용매분획을 행하여 CHCl₃과 60% 수성 MeOH 분획을 얻었다. 얻어진 Hexane, CHCl₃ 및 60% 수성 MeOH

용매분획을 이용하여 2.5 mg/ml의 시료용액을 조제하여 2차 활성검색에 적용하였다.

Hyaluronidase 저해활성 측정²⁰⁾ - hyaluronidase 저해활성은 이 효소에 의해서 분해되지 않고 잔존하는 hyaluronic acid를 cetylpyridinium chloride로 침전시킨 후 ELISA Reader로 595 nm에서 정량하였다. 간단히 설명하면 다음과 같다. hyaluronic acid를 8 mg/ml이 되도록 물에 녹인 후 -20℃에 보관하고 agarose는 인산 완충액(0.3 M, pH 7.0)에 녹인 후 상온에서 보관한다. hyaluronic acid를 먼저 약 55℃로 가열한 후 agarose와 혼합하여 최종 농도가 hyaluronic acid는 0.8 mg/ml, agarose는 0.8%(w/v)가 되도록 한다. 이를 dry bath incubator에서 55℃를 유지 시키면서 96-microplate에 100 µl/well씩 분주하고 gel 상태가 되면 인산완충액에 녹인 hyaluronidase를 20 µl(in 4 units)씩 넣고 동일 용량의 시료용액을 넣어 37℃에서 20분간 배양한다. 배양한 후에 1.2 mg/ml의 compound 48/80용액 20 µl를 well에 넣고 5시간 동안 배양한다. 배양이 끝나면 상층액을 제거한 후 ELISA Reader로 595 nm에서 흡광도를 측정하고 10% cetylpyridinium Cl를 넣어 상온에서 30분간 방치한 후 다시 ELISA Reader로 595 nm에서 흡광도를 측정한다. 효소만의 분해능력을 확인하기 위해 compound 48/80을 빼고 실험하였

으며, 각 실험은 3회 실행하여 평균치를 구하였다.

$$\% \text{ of Inhibition} = \frac{\text{Sample OD} - \text{Control OD}}{\text{Normal OD} - \text{Control OD}} \times 100$$

Control OD: compound 48/80과 효소를 함께 넣은 것

Normal OD: compound 48/80을 빼고 효소만 넣은 것

Sample OD: compound 48/80, 효소 및 시료 용액을 함께 넣은 것

결과 및 고찰

110종 생약의 물 추출물과 MeOH 추출물에 대하여 microplate 방법을 이용하여 hyaluronidase 저해활성을 검색하였다(Table I). 세신, 육계, 계지, 후박, 목단피, 지유, 고삼, 조구등, 산초 등 9종 생약의 물 추출물 시료에서 80% 이상의 저해활성을 나타냈다. MeOH 추출물에 대한 hyaluronidase 저해활성 검색에서는 물 추출물에서 저해활성을 나타낸 육계, 계지, 조구등, 산초 등의 4종을 포함한 15종의 생약이 80% 이상의 효소 저해활성을 나타내었다. 강한 hyaluronidase 저해활성을 나타낸 MeOH 추출물 중 육계와 계지는 그 활성성분이 유사하다고 생각되어져 육계를 제외한 14종의 생약에

Table II. Inhibitory effects of hyaluronidase by hexane, chloroform and 60% aqueous methanolic fractions of some crude drugs

| Samples | Inhibition(%) ^{a,b} | | |
|---------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------|
| | Hexane fr. | CHCl ₃ fr. | 60% aq. MeOH fr. |
| Acanthopanax Cortex | 18.87 | 65.09 | 57.55 |
| Anemarrhenae Rhizoma | 19.61 | 41.78 | - |
| Chaenomelis Fructus | - | - | 98.03 |
| Cinnamomi Ramulus | - | 35.45 | 100 |
| Ephedrae Herba | 100 | 20.00 | - |
| Epimedii Herba | 67.92 | 23.58 | 100 |
| Galla Rhois | - | 100 | 100 |
| Ginseng Radix alba | 41.50 | 39.62 | 10.38 |
| Nelumbinis Semen | 77.19 | 61.40 | 54.38 |
| Pteropi Faeces | 48.11 | 100 | - |
| Rhei Rhizoma | 52.83 | 100 | - |
| Uncariae Ramulus et Uncus | 43.39 | 25.47 | 100 |
| Zanthoxyli Fructus | - | 28.07 | 100 |
| Zingiberis Rhizoma | 29.25 | 26.42 | 37.74 |

^aFinal concentrations: 2.5 mg/ml. ^b-: No inhibition.

대하여 용매분획을 실시하였다.

각각의 MeOH 추출물에 대한 용매분획을 행하여 Hexane, CHCl₃ 및 60% 수성 MeOH 분획을 얻었으며, 이들 분획의 2.5 mg/ml 농도에서의 hyaluronidase 저해활성 실험결과는 Table II와 같다. 지모, 마황, 백삼, 오령지, 대황 등 5종의 생약에 있어서는 활성성분이 유기용매층으로 이행하였고, 모과, 계지, 산초의 경우에는 수용성 용매층으로 이행하였다. 오가피, 음양곽, 오배자, 연자육, 조구등, 건강 등 6종은 그 활성성분이 모든 용매분획에 분산되는 것을 알 수 있었다. 양성 대조약물로 사용한 DSCG는 0.35 mg/ml에서 50%의 효소저해를 나타내었다. 이상의 결과를 검토하여 우선 유기용매층으로 그 활성이 이행되는 생약과 모든 용매층에 분산되는 생약들에 대하여 활성성분의 분리를 실시하고 있다. 이들 생약 중 오배자는 다량의 tannin을 함유하고 있어 hyaluronidase 저해활성이 오배자 tannin과 단백질의 비특이적 결합에 의한 false-positive reaction의 가능성이 추정되었다. 마황, 조구등,²¹⁾ 연자육²²⁾ 등 3종의 생약에는 alkaloids의 함유가 보고되어져 있어 먼저 이들의 alkaloids 분획에 대한 hyaluronidase 저해활성을 검토하고 있다.

한편 임상에서 항알레르기 약물로 이용되고 있는 DSCG와 tranilast는 각각 천연물인 암미실(Ammi Fructus)의 성분인 khellin과 남천(Nandinae Fructus)의 성분인 cinnamic acid유도체를 기본으로 해서 개발되었으며,²³⁾ hyaluronidase는 혈관계의 투과성과 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 따라서 본 검색의 결과를 토대로 각종 생약으로부터 활성성분을 탐색한다면 항알레르기약물 또는 항염증약물의 선도물질 개발을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

총 110종 생약의 물 및 MeOH 추출물에 대하여 hyaluronidase 저해활성을 측정하여 5 mg/ml의 농도에서 80% 이상의 저해활성을 나타내는 15종의 생약을 1차적으로 선별하였다. 이들에 대한 용매분획을 시행하여 유기용매층으로 활성물질이 이행되는 지모, 마황, 백삼, 오령지, 대황의 5종과 활성성

분이 모든 용매분획에 분산되는 오가피, 음양곽, 오배자, 연자육, 조구등, 건강 등 6종을 선정하여 hyaluronidase 저해활성을 갖는 물질의 분리를 수행 중에 있다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 지정 의약자원연구센터 1997년도 연구비에 의해 지원되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Coombs, R. R. A. and Gell, P. G. H. (1975) *Clinical Aspects of Immunology*, 761-779. Blackwell Sci. Pub., Oxford.
2. Ishizaka, T. (1981) Analysis of triggering events in mast cells for immunoglobulin E-mediated histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67: 90-96.
3. Ishizaka, T. and Ishizaka, K. (1975) Biology of immunoglobulin E. Molecular basis of reaginic hypersensitivity. *Prog. Allergy.* 19: 60-121.
4. Ishizaka, T., Chang, T. H., Taggart, M. and Ishizaka, K. (1977) Histamine release from rat mast cells by antibodies against rat basophilic leukemia cell membrane. *J. Immunol.* 119: 1589-1596.
5. Ishizaka, T. and Ishizaka, K. (1978) Triggering of histamine release from rat mast cell by divalent antibodies against IgE-receptors. *J. Immunol.* 120: 800-805.
6. Ishizaka, T., Foreman, J. C., Sterk, A. R. and Ishizaka, K. (1979) Induction of calcium flux across the rat mast cell membrane by bridging IgE receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5858-5862.
7. Meyer, K. (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* 27: 335-359.
8. 阿武喜美子, 瀬野信子 (1983) 糖化學の基礎, 152. 講談社, 東京.
9. Watson, D. (1993) Hyaluronidase. *Br. J. Anaesth.* 71: 422-425.
10. Verduyck, K. P., Lauwers, A. R. and Demester, J. M. (1995) Kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using the Morgan-Elson and neocuproine assays.

- Biochem. J.* 310: 55-59.
11. Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Satoh, T. (1985) Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 642-646.
 12. Baltzly, R., Buck, J. S., de Beer, E. J. and Webb, F. J. (1949) A family of long acting depressors. *J. Am. Chem. Soc.* 71: 1301-1305.
 13. Kakegawa, H., Masumoto, H. and Satoh, T. (1992) Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 1439-1442.
 14. Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217: 959-966.
 15. Kakegawa, H., Mitsuo, N., Masumoto, H., Satoh, T., Akagi, M. and Tasaka, K. (1985) Hyaluronidase-inhibitory and anti-allergic activities of the photo-irradiated products of tranilast. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3738-3744.
 16. Kakegawa, H., Masumoto, H., Endo, K., Satoh, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1985) Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 5079-5082.
 17. Sawabe, Y., Nakagomi, K., Iwagami, S., Suzuki, S. and Nakazawa, H. (1992) Inhibitory effects of peptic substances on activated hyaluronidase and histamine release from mast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1137: 274-278.
 18. Lee, J., Lee, S. H., Min, K. R., Lee, K. S., Ro, J. S., Ryu, J. C. and Kim, Y. (1993) Inhibitory effects of hydrolyzable tannins on Ca²⁺-activated hyaluronidase. *Planta Med.* 59: 381-382.
 19. Kim, Y., Noh, Y. K., Lee, G. I., Kim, Y. K., Lee, K. S. and Min, K. R. (1995) Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* 26: 265-272.
 20. Tung, J. S., Mark, G. E. and Hollis, G. F. (1994) A microplate assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Anal. Biochem.* 223: 149-152.
 21. Haginiwa, J., Sakai, S., Takahashi, K., Taguchi, M. and Seo, S. (1971) Studies of plants containing indole alkaloids. I. Alkaloids in *Uncaria* genus. *Yakugaku Zasshi* 91: 575-578.
 22. Koshiyama, H., Ohkuma, H., Kawaguchi, H., Hsu, H. Y. and Chen, Y. P. (1970) Isolation of 1-(p-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an active alkaloid from *Nelumbo nucifera*. *Chem. Pharm. Bull.* 18: 2564-2568.
 23. 三川 潮 (1989) インビトロバイオアッセイを用いた研究. 原田正敏 (編集) 醫薬品の開発 第2巻 薬理活性物質, 307-310. 廣川書店, 東京.

(1997년 6월 30일 접수)