

은조롱뿌리의 5-Lipoxygenase활성 억제성분

이동웅* 이원철¹

동국대학교 자연과학대학 생화학과, ¹동국대학교 한의과대학 한의학과

An 5-Lipoxygenase Inhibitor Isolated from the Roots of *Cynanchum wilfordi* Hemsley

Dong-Ung Lee* and Won-Churl Lee¹

Department of Biochemistry, and

¹College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract - The effects of the extract of the root of *Cynanchum wilfordi* (Asclepiadaceae), the alkaloid fraction, and the isolated main constituent (gagaminine) on 5-lipoxygenase(5-LO; EC 1.13.11.34) in bovine PMNL have been studied. The effect of the crude extracts of wild- and cultivated plant was also compared each other. Furthermore, the inhibitory effect of gagaminine on 5-LO was compared with those of the standard drugs. Gagaminine inhibited 5-LO activity with an IC₅₀ value of 26 μM, this result indicates that gagaminine may be useful for *in vivo* experiments as 5-LO inhibitor.

Key words - *Cynanchum wilfordi* Hemsley; Asclepiadaceae; gagaminine; 5-lipoxygenase; antioxidant.

은조롱(百何首烏; *Cynanchum wilfordi* Hemsley)은 박주가리과(Asclepiadaceae)에 속하는 덩굴성 다년생 초본으로서 우리나라 전국산지에 자생하거나 재배되고 있다. 韓方에서는 은조롱의 뿌리를 白何首烏라고 하여 延年不老, 延年益壽, 고혈압, 당뇨병, 건망 등에 사용하고 있는 중요한 국산생약이다.¹⁾ *Cynanchum*속 식물은 전세계에 걸쳐 15여종이 알려져 있으며 대부분 국내에 자생하나 지리적으로 일본, 중국, 유럽에도 분포하고 있다.

지금까지 은조롱의 성분에 관한 연구로는 수종의 glycoside²⁾와 aglycon³⁻⁵⁾ 외에 유기산 및 disaccharide²⁾ 등이 함유되어 있음이 알려져 있으며 저자 등⁶⁾이 처음으로 1종의 steroidal alkaloid를 단리하여 gagaminine(Fig. 1)으로 동정한 바 있다. 한편, 저자 등은 최근, 은조롱의 추출물 및 alka-

loid분획이 항산화활성을 나타냄을 확인하고⁷⁾ alkaloid분획으로부터 gagaminine을 단리하여 항산화활성을 검토한 결과, gagaminine이 free radical 생성계 효소의 하나인 aldehyde oxidase를 강력히 억제하였으며(IC₅₀=0.8 μM) 과산화지질의 생성도 크게 감소시킴을 발견하여 보고하였다.⁶⁾

이에 따라 본보에서는 항산화작용과 관련이 있으며 염증유발에 관여하는 효소인 5-lipoxygenase

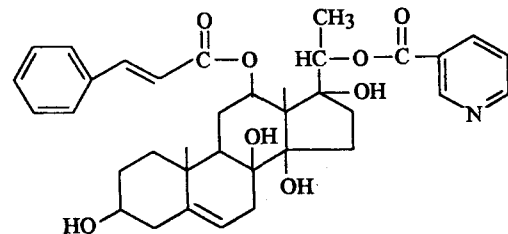


Fig. 1. Chemical structure of gagaminine.

*교신저자 : Fax 0561-770-2224

(5-LO)를 대상으로 activity-guided bioassay법에 따라 은조롱의 조추출물, alkaloid분획 및 alkaloid성분인 gagaminine의 5-LO 억제효과를 검토함으로써 은조롱 및 그 함유성분이 염증억제에 어떠한 활성을 나타내는지를 *in vitro*에서 검토해 보았다.

5-Lipoxygenase(EC 1.13.11.34)는 다형핵백혈구(PMNL: polymorphonuclear leukocytes)에서 처음 보고되었으며⁸⁾ arachidonic acid의 대사과정에서 염증발현에 중요한 역할을 하는 leukotriene B-4(LTB₄)를 생성하는 효소이다.⁹⁾ LTB₄의 생합성과정은 arachidonic acid로부터의 radical-based oxidation이므로 대부분의 5-LO inhibitor는 antioxidant로 간주되고 있으며¹⁰⁾ 따라서 이러한 radical의 생성을 억제하는 화합물은 5-LO inhibitor라고 할 수 있다. 근래 LTB₄수용체에 대한 길항제를 소염제로 개발하려는 노력이 다각적으로 진행되고 있다.

본 연구에서는 은조롱의 추출물 및 함유성분인 gagaminine이 강력한 항산화작용을 가지고 있다는 저자들의 기존연구 결과⁶⁾에 따라 이와 관련하여 이들이 5-LO의 활성에 대해서도 억제효과를 나타내는지를 검토하였으며 특히, 은조롱 추출물의 경우 자연산과 재배산의 효능차이를 비교하여 보았다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기-은조롱의 자연산과 재배산은 경북 영천의 한약상에서 구입하였다. 효소활성 측정용 시약은 다음과 같이 조제하여 사용하였다. Arachidonic acid(AA) solution(24 mM): 10.00 mg AA(Sigma)+1.37 ml methanol, Ca-Ionophore solution: 10.47 mg Ca-Ionophore(Sigma)+1.0 ml DMSO, Histopaque 1077(Sigma), Lonapalene(University of Regensburg, Germany), Nordihydroguaiaretic acid(NDGA) solution: 1.21 mg NDGA(Sigma)+1.0 ml methanol, Prostaglandin B₂(PGB₂) solution: 0.40 mg PGB₂(Sigma)+10.0 ml methanol, Isotonic PBS(phosphate buffered saline) solution: NaCl 8.00 g+KCl 0.20 g+Na₂HPO₄·2H₂O 1.00 g+NaH₂PO₄·H₂O 0.15 g+KH₂PO₄ 0.20 g

+H₂O bidistilled 1000.00 ml, Hypertonic PBS solution: NaCl 24.00 g+KCl 0.60 g+Na₂HPO₄·2H₂O 3.00 g+NaH₂PO₄·H₂O 0.45 g+KH₂PO₄ 0.60 g+H₂O bidistilled 1000.00 ml, EDTA solution: Na₂-EDTA·2H₂O 2.87 g+NaCl 0.21 g+H₂O bidistilled 1000.00 ml, CaCl₂ solution: CaCl₂·2H₂O 0.147 g+NaCl 0.800 g+H₂O bidistilled 1000.00 ml, Inhibitor solution: methanol 100 ml+acetonitrile 100 ml+NDGA-solution 0.4 ml(1.21 mg/ml MeOH)+PGB₂-solution 0.3 ml

HPLC system은 pump: Kontron 420, detection: Kontron Uvikon735LC/Kontron HPLC detector430, injection system: Rheodyne을, cell counter는 Sysmex microcell-counter CC-130을 사용하였으며 column은 RP 18- extraction column(Baker)을 사용하였다.

추출물조제 및 활성성분의 분리-저자 등이 전보^{6,7)}에서 보고한 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 세절한 은조롱의 뿌리(자연산 1.2 kg 및 재배산 0.6 kg)를 methanol로 가온하에 3회 추출, 농축하고 그 추출물 일부는 활성실험을 위해 남겨두었다. Alkaloid분획의 제조를 위해 자연산 추출물에 소량의 물을 가하고 2N HCl으로 산성으로 한 다음, 여과하고 여액을 ether로 2회 추출하여 비염기성물질을 제거하였다. 수층을 묶은 암모니아수로 약 알칼리성으로 한 다음, 이 용액을 ether로 3회 반복추출하고 분리된 ether층을 모두 합하여 건조, 농축하였다. 이 alkaloid분획을 silica gel column chromatography(CHCl₃/MeOH 9:1)와 preparative TLC를 실시하여 약 0.1 g의 백색 결정을 얻었다. 이 화합물은 은조롱과 동속식물로서 일본, 중국의 고산지대에서 자생하는 *Cynanchum caudatum*에서 보고된 바 있는 gagaminine(Fig. 1)과 동일한 성분으로 동정하였다.⁶⁾

Granulocyte의 분리-도살장에서 구입한 신선한 소 혈액 1 l에 EDTA 100 ml를 가하였다. 200×g에서 20분간 원심분리한 다음, 상층의 platelet-rich plasma를 흡입기를 이용하여 주의깊게 제거하였다. 얻어진 적혈구를 증류수 400 ml로 약하게 진탕하면서 세척하였다. 30초 후에 200 ml의 hypertonic PBS용액을 가하고 혼액을 485×g에서 10분

간 원심분리하였다. 얻어진 pellet을 소량의 isotonic PBS용액으로 다시 현탁시키고 485×g에서 10분간 원심분리하였다. 이 때, 얻어진 cell을 25 ml의 isotonic PBS용액으로 다시 현탁시킨 다음, 10 ml의 Histopaque 1077에 조심스럽게 혼합하였다. 이 혼합물을 675×g에서 45분간 원심분리하여 lymphocyte와 monocyte를 제거하였다. 남아 있는 erythrocyte를 pellet으로부터 제거하고 20 ml의 isotonic PBS용액으로 세척한 다음, 100×g에서 20분간 원심분리하였다. 이상의 전체 과정은 실온에서 수행하였다.

Cell counting - 정제된 granulocyte를 30 ml의 isotonic PBS용액으로 현탁시켰다. 이중 0.1 ml를 취하고 isotonic PBS용액을 가하여 전체가 10.0 ml가 되도록 하였다(granulocyte suspension).

이 현탁액으로부터

- (a) 0.1 ml를 취하여 isotonic PBS용액으로 25.00 ml가 되게 한다.
- (b) 0.2 ml를 취하여 isotonic PBS용액으로 25.00 ml가 되게 한다(대조용).

세포배양을 위한 granulocyte suspension의 양은 isotonic PBS용액으로 희석시켜 1 ml에 10⁷개의 세포가 들어있는 농도로 제조하며 다음 공식으로 계산하였다.¹⁰⁾

$$A(\text{ml}) = 30 \times (5Z - 1)$$

- A: 배양할 granulocyte suspension의 양(ml)
- Z: (a)에서 측정된 세포수

세포배양 - 전체 배양 과정을 Table I에 요약하여 나타내었다. 2.4 ml의 granulocyte suspension에 DMSO(대조용) 10 μl나 측정시료 용액(isotonic PBS용액으로 희석) 10 μl를 넣고 37°C에서 15분간 shaking water bath상에서 배양하였다.

Table I. Incubation procedures and sample preparation

Time (min)	Addition
0	10 μl DMSO(control) or 10 μl test samples
15	0.6 ml CaCl ₂ solution
20	3 μl Ca-ionophore solution
25	3.0 ml inhibitor solution

여기에 CaCl₂ 0.6 ml를 가하고 5분후에 Ca-ionophore 용액 3 μl를 가하면서 37°C에서 총 10분간 배양시켰다. 배양이 시작된 시점에서 25분 후에 효소반응을 중지시키기 위하여 NDGA를 함유한 methanol-acetonitrile 1:1 용액 3.0 ml를 가하고 HPLC를 위한 내부표준물질로 prostaglandin B₂(PGB₂) 0.3 μM을 가하였다. 전체 배양혼액을 ice bath에 20분간 넣어 둔 다음, 0°C에서 15분간 (4000×g) 원심분리하였다.

역상 HPLC분석 - RP18-extraction column을 5 ml methanol로 2회 세척하고 다시 물 5 ml로 세척하였다. 배양액을 물 5 ml로 희석하여 위의 column에 통과시킨 다음, column을 물 5 ml로 2회 세척하고 이어서 methanol 1 ml로 3회 전개시켰다. Column을 통과한 용액을 물 3 ml로 희석하고, 이중에서 2 ml를 HPLC에 주입하여 chromatogram을 얻었다.

결과 및 고찰

은조롱 조추출물 및 alkaloid분획의 5-LO 억제효과 - 저자들은 은조롱 재배산의 항산화활성을 activity-guided bioassay법에 따라 조추출물, alkaloid분획 및 단리된 alkaloid성분의 순서로 규명한 바 있어^{6,7)} 은조롱의 5-lipoxygenase(5-LO)억제활성을 확인하고 그 활성성분을 규명하기 위하여 먼저 조추출물 및 alkaloid분획의 활성을 확인한 다음, 단리한 성분의 활성을 검토하였다.

한편, 은조롱의 뿌리는 자연산이 재배산보다 훨씬 크고 비후하나 시중가격이 5배이상 비싸고 구하기가 쉽지 않기 때문에 한방에서는 재배산을 사용하고 있다. 최근의 실험결과에 의하면 자연산 은조롱의 항산화활성 즉, free radical 생성계 효소인 aldehyde oxidase에 대한 억제활성 및 lipid peroxidation억제효과가 재배산 은조롱보다 더 강한 것으로 나타나¹¹⁾ 이들의 5-LO억제활성에도 차이가 있을 것으로 예상되었다. 5-LO는 대사과정에서 arachidonic acid를 leukotrienes로 변화시키는 초기단계를 촉매하는 역할을 한다. 이 5-LO는 염증세포라 불리는 neutrophils, monocytes, eosinophils, macrophages, mast cell등에서 활성을 나타내며 작용기전은 radical-based ox-

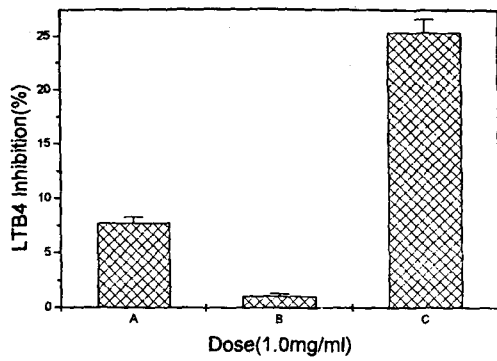


Fig. 2. Inhibition on 5-lipoxygenase activity in bovine PMNL of wild -(A) and cultivated roots(B) of *Cynanchum wilfordi*, and the alkaloid fraction(C). Significantly different from the control, $p < 0.01$ (A, C) and $p < 0.001$ (B).

idation에 의해 leukotrienes를 생성시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 대부분의 5-LO inhibitor는 radical의 생성을 억제하는 antioxidant로 간주되고 있다.¹⁰⁾

5-LO에 의한 arachidonic acid의 대사산물중에서 염증발현에 가장 중요한 LTB₄(leukotriene B₄)의 억제효과를 대조군과 비교했을 때, 은조롱의 자연산은 1.0 mg/ml투여시, $7.75 \pm 0.56\%$ 의 억제효과를 나타내는데 비해, 재배산은 같은 용량에서 $1.08 \pm 0.24\%$ 를 보임으로써 자연산이 재배산보다 7배 이상 효과가 강한 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 은조롱은 재배산보다는 자연산을 사용하는 것이 보다 효과적일 수 있다는 사실을 암시하며 앞으로 in vivo test를 통하여 활성차이를 보다 확실히 비교해 볼 필요가 있다고 하겠다. 한편, 자연산에서 제조된 alkaloid분획은 같은 용량에서 $25.4 \pm 1.24\%$ 의 억제활성을 보여 추출물의 5-LO 억제활성이 alkaloid분획에서 나온 것임을 알 수 있었다.

함유성분의 5-lipoxygenase 억제활성 - 은조롱의 조추출물 및 alkaloid분획이 5-LO억제효과를 보임에 따라 alkaloid분획의 주성분인 gagaminine(Fig. 1)을 분리하여 활성을 검토하였다. 저자들은 은조롱에서 분리된 steroidal alkaloid인 gagaminine이 활성산소종 생성계 효소인 aldehyde oxidase(AO)를 강력히 저해하며($IC_{50} = 0.8 \mu M$) 과산화지질의 생성도 크게 억제하여 그 억제효과는 잘 알려진 천연 항산화제인 ascorbic

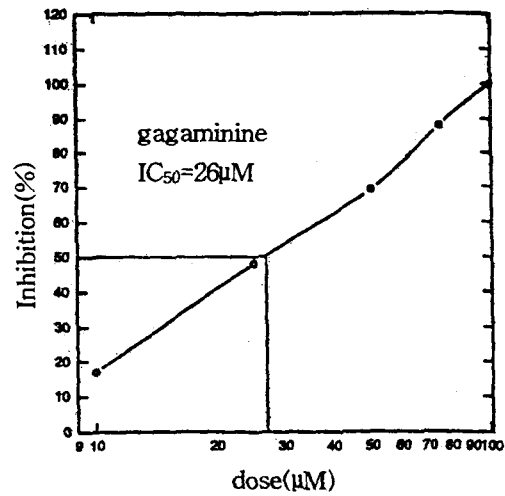


Fig. 3. The dose-dependent inhibitory activities of gagaminine on 5-lipoxygenase in bovine PMNL. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

acid나 α -tocopherol과 활성이 비슷함을 보고한 바 있다.^{6,12)} 또한 gagaminine의 이러한 항산화작용에 대한 구조-활성 상관관계를 검토한 결과, 구조중의 cinnamoyl기가 AO활성 저해효과를 나타내는데 반드시 필요하며 nicotinoyl기는 지질과산화 억제에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.¹²⁾

따라서 은조롱의 alkaloid분획의 5-LO억제효과는 함유성분인 gagaminine에 기인한 것으로 예측하고 gagaminine의 5-LO억제활성을 대조물질과 비교, 검토하였다. 실험결과, gagaminine의 IC_{50} 은 $26 \mu M$ 이었으며(Fig. 3) 이 억제효과는 강력한 5-LO inhibitor이며 천연항산화제로 사용하고 있는 NDGA(nordihydroguaiaretic acid)($IC_{50} = 0.4 \mu M$) 보다는 약하였으나 항산화활성을 가진 berberine¹³⁾의 5-LO억제활성($IC_{50} > 100 \mu M$)보다는 강하게 나타났다(Table II). Fig. 4는 gagaminine의

Table II. 5-Lipoxygenase inhibition in bovine PMNL by gagaminine and standard drugs

	$IC_{50}(\mu M)^*$
gagaminine	26
berberine	>100
NDGA	0.4

*Significantly different from the control, $p < 0.01$. n=3.

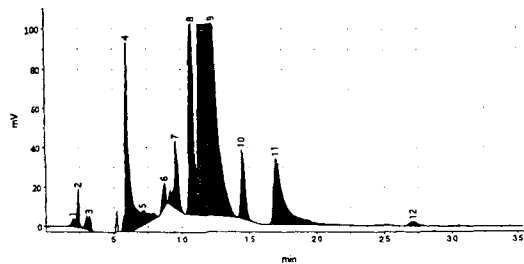


Fig. 4. RP-HPLC chromatogram of all lipoxygenase products in the denatured incubation media containing gagaminine. Peak 10 ($R_t=14.5$ min): PGB_2 . Peak 11($R_t=17.0$ min): NDGA. Peak 12($R_t=27.1$ min): LTB_4 . Stationary phase: LiChrospher 100 RP-18(5 μ m) 250 \times 4 mm. Mobile phase: THF/MeOH/H₂O/acetic acid(25/30/45/0.1, with conc. NH₃ adjusted to pH 5.5).

5-LO억제활성을 HPLC로 3회 측정된 chromatogram중 하나를 나타낸 그림이다.

결론

은조롱(백하수오)의 활성성분인 gagaminine은 항산화작용과 관련이 있는 5-lipoxygenase의 활성을 강하게 억제하였으며($IC_{50}=26 \mu$ M) 이는 gagaminine의 강력한 항산화작용에서 기인되는 것으로 추정된다. 한편, 지금까지 은조롱에 대한 연구들은 재배산을 대상으로 하였으나 본 연구에서 자연산이 재배산보다 훨씬 강한 효과를 나타냄에 따라 앞으로 자연산에 대해서도 활성 및 성분에 관한 체계적인 연구가 요망된다.

사사

본 연구과정에서 HPLC측정을 도와준 독일 Regensburg대학의 K. Ziereis씨에게 감사드립니다.

인용문헌

1. 허준(1613). 東醫寶鑑.
2. Mitsuhashi, H., Sakurai, K., and Nomura, T. (1966) Constituents of Asclepiadaceae plants. XVII. Components of *Cynanchum wilfordi* Hem-

- sley. *Chem. Pharm. Bull.* 14: 712-717.
3. Mitsuhashi, H. and Hayashi, K.(1972) On the tentative structure of wilforine. *Chem. Pharm. Bull.* 20: 2065-2067.
4. Mitsuhashi, H. and Hayashi, K.(1975) Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. XXXII. Aglycones from *Cynanchum wilfordi* Hemsley. *Chem. Pharm. Bull.* 23: 139-143.
5. Tsukamoto, S., Hayashi, K., and Mitsuhashi, H.(1985) Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LX. Further studies on glycosides with a novel sugar chain containing a pair of optically isomeric sugars, D- and L-cymarose, from *Cynanchum wilfordi*. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 2294-2304.
6. Lee, D. U., Shin, U. S., and Huh, Keun (1996) Inhibitory effects of gagaminine, a steroidal alkaloid from *Cynanchum wilfordi* on lipid peroxidation and aldehyde oxidase activity. *Planta Med.* 62: 485-487.
7. 이동용(1995) 은조롱의 조알칼로이드 분획의 항산화효과. 동국논집 14: 83-92.
8. Borgeat, P., Hamberg, M., and Samuelson, B. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 7816-7820.
9. Müller, K.(1994) 5-Lipoxygenase and 12-Lipoxygenase: Attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs. *Arch. Pharm.* 327: 3-19.
10. Fitzsimmons, B. J. and Rokach, J. (1989) Leukotrienes and Lipoxygenases, Rokach, J. ed. 427-502. Elsevier, New York.
11. 한기준 (1996) 백하수오의 항산화활성과 amino acid의 분포에 관한 실험적 연구. 동국대학교 대학원 한의학과 석사학위 논문.
12. Lee, D. U., Shin, U. S., and Huh, K. (1997) Structure -activity relationships in gagaminine, an alkaloid from *Cynanchum wilfordi* with antioxidative activities. *J. Biochem. Mol. Biol.* submitted.
13. Müller, K. and Ziereis, K. (1994) The antipsoriatic *Mahonia aquifolium* and its active constituents: I. Pro- and antioxidant properties and inhibition of 5-lipoxygenase. *Planta Med.* 60: 421-424.

(1997년 10월 6일 접수)