

한방청열제의 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase에 대한 억제효과

안중수, 최승연, 권용수, 김창민*

강원대학교 약학대학

Inhibitory Activities of Chinese Herbs that Clear Heat on 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase

Jung Su Ahn, Seung Youn Choi, Yong Soo Kwon and Chang Min Kim*

College of Pharmacy, Kang won National University, Chun Cheon, 200-701, Korea

Abstract - 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) is one of the main enzymes involved in the metabolism of the active androgen, dihydrotestosterone. The NAD(P)-linked 3 α -HSD of rat liver cytosol is powerfully inhibited by the non-steroidal anti-inflammatory drugs in rank-order of their therapeutic potency. This observation has now been developed into a rapid screen for predicting the potency of products that show anti-inflammatory effect. 52-Chinese Herbs that clear heat were screened by using this method.

Key words - 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase; Chinese herbs; anti-inflammatory effect.

3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase는 5 β -dihydrocortisone이나 5 α -dihydrotestosterone과 같은 여러 가지 3-ketosteroid에 작용하여 3 α -hydroxysteroid 형태로 변환시킴으로써 androgen이나 cortisone의 대사반응에 중요한 역할을 담당하는 효소이다.¹⁾ 최근 이 효소의 활성은 steroid계 또는 비 steroid계 항염증약에 의해 억제되었고²⁾ 이 효소에 대한 비 steroid계 항염증약의 IC₅₀ value는 그 약물의 daily dose와 상관관계가 높았으며, 이 IC₅₀ value는 약물의 최고 혈장농도보다 낮게 나타나 치료농도와도 밀접한 관계를 나타내었다.³⁾ 또한 이 효소는 arachidonic acid와 prostaglandins에도 친화력이 있다는 것이 보고되었으며 다른 활성측정법에 비해 측정이 빠르고 간단하다는 장점을 가지고 있다.⁴⁾ 이는 이 효소의 억제활성을 측정함으로써 항

염증약물의 역가를 예측할 수 있다는 것을 의미하는 것으로 최근 이 방법을 이용한 연구들이 활발하게 진행되고 있다.⁵⁾ 이에 저자 등은 한방에서의 청열제는 현대약학에서의 소염제와 같은 의미라는데 착안하고 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase의 억제효과를 측정함에 의해 한방의 청열제에 대한 소염 활성을 밝히고자 한방에서 청열제로 이용되는 약물 중 강원도 지역에 자생하는 생약을 위주로 하고 나머지는 시판되고 있는 것을 구입하여 모두 52종에 대하여 억제활성을 측정하였다. 그 결과 약간의 의견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 및 추출 - 본 실험에서 사용된 52종의 청열제 생약중 고삼, 포공영, 하고초, 황백, 은시호, 토복령, 반변련, 현삼, 백선희, 수분초, 마치현, 천화

*교신저자 : Fax 0361-55-7865

분, 진피, 적작약, 압척초, 청상자, 자근, 자화지정, 지골피, 노근, 담죽엽, 금은화 등 20종의 생약은 설악산, 점봉산, 오대산에서 5~6월에 채집, 건조하여 사용하였고 나머지 32종의 생약은 경동시장에서 건조된 생약을 구입하여 사용하였으며 이 생약들의 표본은 강원대학교 약학대학 표본실에 보관중이다. 이들 시료생약 5~10 g을 70% EtOH로 80℃에서 3시간동안 추출하고 하루동안 방치하여 여과하였으며 여액을 감압하에서 완전히 농축하여 건조된 것을 실험에 사용하였다.

시약 및 기기 - Indomethacin, ibuprofen, aspirin, acetaminophen, NADPH, EDTA, dithiothreitol, NaH₂PO₄ 등은 Sigma사에서 구입하였고 그 밖의 시약은 특급시약을 사용하였으며 Hitachi U-2000 Spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

효소(3α-HSD)액의 조제 - SD계 웅성 랫트(체중 180~200 g)의 간장을 취하여 3배량의 100 mM phosphate buffer(pH=5.8, 250 mM sucrose, 1 mM dithiothreitol 및 1 mM EDTA를 첨가하고 이를 PBS라 한다)를 가하고 homogenize시킨후 4℃ 조건하에서 10,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 다시 4℃ 조건하에서 100,000×g로 60분간 원심분리하여 cytosol분획을 얻었다. 이것을 PBS로 2.5배 희석하여 검정용 효소액으로 하였고 -80℃ 이하로 유지하며 사용하였다.

3α-HSD 억제활성의 측정 - 3α-HSD의 억제활성은 Penning법¹⁾을 변형하여 측정하였다. 즉, 검체를 일정량의 PBS에 용해시키고 NADPH 100 μM, progesterone 100 μM를 함유하도록 만든 후 검정용 효소액 0.1 ml를 가하고 25℃, 340 nm에서 10분간의 흡광도 감소치를 관찰하여 IC₅₀ value를 측정하였고 52종 청열제 생약의 IC₅₀ value결과는 3번 실험한 것의 평균값으로 계산하였다.

결과 및 고찰

NSAID's의 효소억제효과 - Indomethacin, ibuprofen, aspirin, acetaminophen 등 4가지 NSAID's를 가지고 3α-HSD에 대한 억제활성을 측정 한 결과 효력이 강한 indomethacin의 경우 흡광도 감소치가 많이 저하됨을 볼 수 있었고 비교적

효력이 약한 aspirin과 acetaminophen 등의 경우는 control과 거의 차이가 나지 않는것으로 보아 NSAID's의 효력에 따른 흡광도 감소치의 현저한 차이를 볼 수 있었다(Fig. 1).

52종 한방청열제의 효소억제효과 - 한방에서 빈용되는 52종의 한방청열제를 사용하여 3α-HSD에 대한 억제율로부터 항염증효과를 측정하고 그 결과를 각 생약에 대한 IC₅₀ value로 Table I에 나타내었다. 이 중 토복령, 패장근, 연교, 반변련, 청대, 용담, 현삼, 백선피, 사간, 마치현, 천화분, 지모, 자근, 지골피, 생지황, 모근, 중루, 백두옹, 고삼, 하고초, 결명자, 누로, 죽엽, 백화사설초, 마발, 산자교, 백미, 청호 등은 IC₅₀ value가 400 μg/ml 이상으로 매우 미약한 활성을 보인 반면 백령, 은시호, 치자 등은 IC₅₀ value가 300 μg/ml 정도로 약한 활성을 나타내었고 산두근, 밀몽화, 청상자, 호황련, 자화지정, 어성초, 금은화, 토복령, 곡정초, 황백 등은 IC₅₀ value가 200 μg/ml 정도를 나타내었으며 황금, 대청엽, 압척초, 적작약, 담죽엽 등은 IC₅₀ value가 200 μg/ml 이하로 단일물질로 정제가 되지 않은 조추출물 상태임에도 불구하고 높은 효소활성 억제효과를 나타냈다. 특히, 권삼(*Polygonum bistorta*), 녹두(*Phaseolus radiatus*)와 목단피(*Paeonia suffruticosa*) 등은 IC₅₀ value가 100 μg/ml 이하로 강한 억제활성과 함께 농도에 따른 높은 상관관계를 나타내었으며(Fig. 2) NADPH의 농도저하에 따른 흡광도감소치를 거의 나타내지 않아 3α-HSD

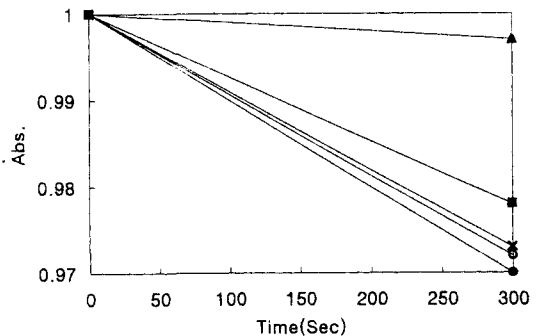


Fig. 1. NADPH-linked 3α-HSD of rat liver cytosol is powerfully inhibited by the NSAID's in rank order of their therapeutic potency. The inhibition by low micromolar concentration of indomethacin is very strong. ●: Indomethacin, ○: Ibuprofen, ×: Aspirin, ■: Acetaminophen, ▲: Control.

Table 1. IC₅₀ values of 52-Chinese herbs by 3 α -HSD inhibition

No.	Plants	IC ₅₀ value (μ g/ml)	
1.	황금(黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	173.03
2.	대청엽(大靑犀)	<i>Isatis indigotica</i>	153.24
3.	백렴(白蘘)	<i>Ampelopsis japonica</i>	321.89
4.	아담자(鴉胆子)	<i>Brucea japonica</i>	243.62
5.	은시호(銀柴胡)	<i>Gypsophila oldhamiana</i>	301.23
6.	토복령(土茯苓)	<i>Smilax china</i>	-
7.	패장근(敗醬根)	<i>Patrinia villosa</i>	-
8.	산두근(山豆根)	<i>Sophora tonkinensis</i>	220.84
9.	녹두(綠豆)	<i>Phaseolus radiatus</i>	81.75
10.	연교(蓮翹)	<i>Forsythia suspensa</i>	-
11.	목단피(牡丹皮)	<i>Paeonia suffruticosa</i>	82.86
12.	반련(半蓮)	<i>Lobelia chinensis</i>	-
13.	청대(靑黛)	<i>Polygonum tinctorium</i>	-
14.	용담(龍膽)	<i>Gentiana scabra</i>	-
15.	밀몽화(密蒙花)	<i>Buddleia officinalis</i>	238.36
16.	현삼(玄參)	<i>Scrophularia buergeriana</i>	-
17.	백선피(白鮮皮)	<i>Dictamnus albus</i>	-
18.	사간(射干)	<i>Belamcanda chinensis</i>	-
19.	수분초(垂盆草)	<i>Sedum erythrostichum</i>	172.71
20.	마치현(馬齒莧)	<i>Portulaca oleracea</i>	-
21.	천화분(天花粉)	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	-
22.	진피(秦皮)	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	92.09
23.	압적초(鴨跖草)	<i>Commelina communis</i>	102.95
24.	지모(知母)	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	-
25.	청상자(靑葙子)	<i>Celosia argentea</i>	229.62
26.	자근(紫根)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	-
27.	지골피(地骨皮)	<i>Lycium chinense</i>	-
28.	호황련(胡黃連)	<i>Picrorrhiza scrophulariiflora</i>	254.36
29.	적작약(赤芍藥)	<i>Paeonia obovata</i>	136.16
30.	자화지정(紫花地丁)	<i>Viola mandshurica</i>	209.38
31.	생지황(生地黃)	<i>Rehmannia glutinosa</i>	-
32.	노근(蘆根)	<i>Phragmites communis</i>	-
33.	중루(重樓)	<i>Paris polyphylla</i>	-
34.	어성초(魚腥草)	<i>Houttuynia cordata</i>	277.32
35.	담죽엽(淡竹犀)	<i>Lophatherum gracile</i>	188.97
36.	금은화(金銀花)	<i>Lonicera japonica</i>	204.34
37.	백두옹(白頭翁)	<i>Pulsatilla chinensis</i>	-
38.	고삼(苦參)	<i>Sophora flavescens</i>	-
39.	포공영(蒲公英)	<i>Taraxacum platycarpa</i>	233.65
40.	하고초(夏枯草)	<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	-
41.	결명자(決明子)	<i>Cassia obtusifolia</i>	-
42.	누로(漏蘆)	<i>Echinops latifolius</i>	-
43.	죽엽(竹犀)	<i>Bambusa tuldoidea</i>	-
44.	곡정초(穀精草)	<i>Eriocaulon buergerianum</i>	231.03
45.	백화사설초(白花蛇舌草)	<i>Oldenlandia diffusa</i>	-
46.	치자(梔子)	<i>Gardenia jasminoides</i>	307.23
47.	마발(馬勃)	<i>Lashiosphaera fenlzii</i>	-
48.	산자고(山慈姑)	<i>Cremastra appendiculata</i>	-
49.	백미(白薇)	<i>Cynanchum atratum</i>	-
50.	청호(靑蒿)	<i>Artemisia annua</i>	-
51.	황백(黃柏)	<i>Phellodendron amurense</i>	228.91
52.	권삼(拳參)	<i>Polygonum bisstorta</i>	<50

* - means that substance has no significant effect

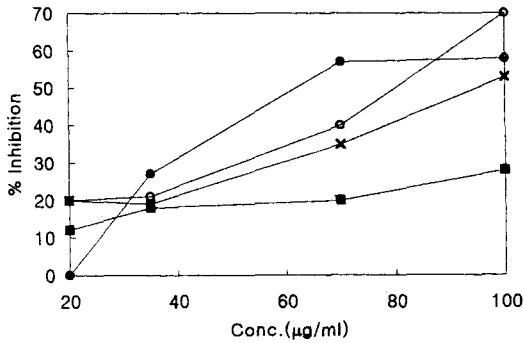


Fig. 2. Phaseoli radiati Semen and Moutan Cortex Radicis show the strong inhibition of 3α-HSD with high r value. these oriental herbal drugs are thought to have anti-inflammatory compounds: Phaseoli radiati Semen (r=0.96), Moutan Cortex Radicis (r=0.99). ●: *Phaseolus radiatus*, ○: *Paeonia suffruticosa*, ×: *Isatis indigotica*, ■: *Lonicera japonica*.

에 대해 강한 억제율을 지닌 성분을 함유하고 있으리라 생각된다. 실험에 사용한 52종의 한방청열제 생약은 과거로부터 소염, 해독작용의 목적으로 빈용되었으며 실제로 많은 성분들이 분리, 보고되고 있다. 따라서 이들 생약으로부터 항염증 성분의 개발에 관한 연구가 더욱 폭 넓게 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

3α-HSD는 steroid hormones, polycyclic aromatic hydrocarbons, prostaglandins 등을 분해하는 기능을 하는 중요한 효소이다. 특히 NADPH를 중간물질로 하는 3α-HSD는 NSAID's에 의해 약효력에 따라 강하게 억제되었으며 이러한 효소의 특성은 항염증효과를 예측하는 빠른 방법이 되었다. 3α-HSD의 이러한 특성을 이용하여 항염증작용이 있는 화합물을 분리하고자 한방에서 빈용되는 한방청열제중 강원도의 주요 산에서 일반적으로 자생하고 있는 52종을 실험재료로 사용하여 70% EtOH로 추출, 농축하여 3α-HSD억제율을 측정할 결과 황금, 대청엽, 아단자, 녹두, 목단피, 수분초, 진피, 압척초, 적작약, 담죽엽, 권삼 등이 IC₅₀ value 200 μg/ml이하로 높은 억제효과를 나타냈다. 현재 억제활성이 높게 나타난 생약의 활성성분을 계속 연구중에 있다.

사사

이 연구는 한국학술진흥재단의 학술연구조성비의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드린다.

인용문헌

1. Penning, T. M. (1985) Inhibition of 5 beta-dihydrocortisone reduction in rat liver cytosol: a rapid spectrophotometric screen for nonsteroidal anti-inflammatory drug potency. *J. Pharm. Sci.* 74: 651-654.
2. Penning, T. M. and Talalay, P. (1983) Inhibition of a major NAD(P)-linked oxidoreductase from rat liver cytosol by steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents and by prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 80: 4504-4508.
3. Penning, T. M., Smithgall, T. E., Askonas, L. J. and Sharp, R. B. (1986) Rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 47: 221-247.
4. Penning, T. M. and Sharp, R. B. (1987) Prostaglandin dehydrogenase activity of purified rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 646-652
5. Daidone, G., Plescia, S., Bajardi, M. L. and Schillaci, D. (1995) Synthesis of new 2-(((phenoxy or phenyl)acetyl)amino)benzoic acid derivatives as 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors and potential antiinflammatory agents. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 328: 705-708.
6. Usui, E., Okuda, K., Kato, Y., and Noshiro, M. (1994) Rat hepatic 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: expression of cDNA and physiological function in bile acid biosynthetic pathway. *J. Biochem. (Tokyo)* 115: 230-237.
7. Penning, T. M., Mukharji, I., Barrows, S., and Talalay, P. (1984) Purification and properties of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver cytosol and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *Biochem. J.* 222: 601-611.
8. Penning, T. M., Schlegel, B. P., Pawlowski, J. E., Yuefei Hu, Scolnick, D. M., and Covery, D. F. (1994) Secosteroid mechanism-based inactivators and site-directed mutagenesis as probes for steroid hormone recognition by 3α-

- hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry* 33: 10367-10374.
9. Penning, T. M., Isaacson, K., and Lyttle, C. R. (1992) Hormonal regulation of 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase in rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1148-1151.
10. Penning, T. M., Bennett, M. J., Smith-Hoog, S., Schlegel, B. P., Jez, J. M., and Lewis, M. (1997) Structure and function of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 62: 101-111.
11. Hara, A., Inoue, Y., Nakagawa, M., Nagane, F., and Sawada, H. (1988) Purification and characterization of NADP+-dependent 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from mouse liver cytosol. *J. Biochem. (Tokyo)* 103: 1027-1034.
12. Penning, T. M. (1986) Indomethacin and glucocorticoid metabolism in rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4203-4209

(1998년 2월 5일 접수)