

시호 Saponin의 혈소판 활성화 작용에 관한 연구

박영현[†] · 송민주 · 김남수*

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과, *한국식품개발연구원

Studies on Platelet Activation of Saikosaponin Isolated from *Bupleuri Radix*

Young-Hyun Park[†], Min-Ju Song and Namsoo Kim*

Department of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

*Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

ABSTRACT—Platelet activation is originated by the intracellular or/and extracellular Ca^{2+} . Agonist-induced Ca^{2+} entry through a plasma-membrane pathway has been reported repeatedly, but the mechanisms has proven harder to elucidate. Recently, a number of natural products have been isolated from medicinal plants and marine organisms and have proved to be useful chemical tools for resolving the mechanism of cellular functions. In an attempt to understand the mechanism of platelet activation in *Bupleuri Radix*, we have studied some aspects of the isolation of active components and their dependence of external Ca^{2+} on platelet activation. Acetone extract of *Bupleuri Radix* has the most activity on platelet activation and it's active components were identified as saikosaponin a and d. Their optimal concentration was respectively 20 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$ and their platelet activation was not dependent on external Ca^{2+} , whereas optimal concentration of each agonist was arachidonic acid (10 μM), collagen (10 $\mu\text{g/ml}$), thrombin (0.1 unit/ml), PAF (5 nM), PMA (5 μM), ionophore A23187 (2 μM) and their dependence of external Ca^{2+} on platelet activation appeared to thrombin > collagen \geq PAF > PMA > arachidonic acid > ionophore A23187. These results suggest that saikosaponin is different from each agonists in the dependence of external Ca^{2+} on platelet activation.

Key words □ *Bupleuri Radix*, Saikosaponin, Platelet activation, External Ca^{2+} , Aggregation

성인병중에서 뇌혈관 및 심장질환은 현대인의 가장 높은 사망원인을 나타내고 있다. 이러한 질환은 혈관내 장애로 혈액과 매우 긴밀한 관계에 있으며 현재 뇌심혈관 질환의 직접적인 원인으로 혈액중에서도 혈소판의 응집력 향진에 기인한다고 한다.^{1,2)} 혈소판은 물리, 화학적 자극에 의해 혈관이 손상되면 활성화되어 방출, 점착, 변형, 응집함으로써 혈액유실을 방지한다. 그러나, 어떤 병적인 증상에 의해 과도하게 활성화될 경우 뇌심혈관에서 협심증, 동맥경화, 혈전 등을 유발한다.^{3,4)} 따라서 혈소판은 뇌심혈관계 질환이나 혈전증을 연구 뿐만아니라 혈소판 세포막 Ca^{2+} 투과도의 정보전달 연구에 생체 모델로서 새롭게 인식되고 있다. 최근, 천연식품에서의 생체 방어, 생체 리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 기능들이 식생활과 관련된 성인병의 가장 좋은 대

처방안으로 인식되고 있다.^{5,6)}

시호(*Bupleurum falcatum*)는 미나리과의 다년생 초본으로 뿌리는 한방에서 해열, 진정, 항염증, 항바이러스, 간보호효능 등이 있다고 알려져 있으며 소시호탕, 시호계지탕으로 사용된다. 시호의 유효성분인 saikosaponin은 세포막 cholesterol과 친화성이 커서 적혈구 막투과성 증가 내지는 막의 파괴를 유발하여 용혈을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{7,8)} 따라서 시호로부터 생체 조절 기능을 갖는 유효성분인 saikosaponin을 분리하여 혈소판에 대한 작용을 통하여 뇌심혈관계 질환 연구에 유효성분으로 이용하고자 연구하였다. 본 연구는 혈소판 작용이 있는 시호 용매분획물에서 분리 및 동정한 saikosaponin을 thrombin, collagen, arachidonic acid 등의 효능제(agonist)와 세포의 Ca^{2+} 의존성과 비교 연구하여 그 결과를 보고하고자 한다.

[†] Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험동물 및 시약

실험에 사용한 토끼는 2.5~3.5 kg되는 수컷을 연암축산 대학에서 구입하였고 국내산 시호를 경동시장 한약건재업사에서 구입하였다. 각 효능제(agonist)로 사용되는 시약 중 arachidonic acid, collagen, thrombin은 Chrono Co.에서 ionophore A23187, PAF, PMA는 Sigma Co.에서 구입하였다. 분석용 시약으로는 HPLC용 methanol(Fisher chemical, HPLC Grade)을 사용하였고, Column chromatography용 silical gel은 kieselgel 60(230-400mesh, Merck 9385)을 사용하였으며 TLC plate는 Kieselgel 60F254(Merck art 5554)를 사용하였다. 본 실험에 사용한 모든 용매는 증류하여 사용하였고, 그외 시약은 특급 시약을 사용하였다.

혈소판 활성화 작용 측정

혈소판 현탁액의 조제는 토끼 혈액을 citrate-dextrose-용액(혈액량의 1/6:65 mM citric acid, 85 mM trisodium citrate, 2% dextrose, pH 4.5)에 채혈한 후, 250×g로 10분간 원심 분리한다. 상등액(platelet rich plasma)을 분리한 후 침전물(platelet rich pellet)을 Tyrode HEPES buffer pH 6.35용액으로 두 번 세척한 후, 마지막으로 Tyrode HEPES buffer pH 7.35 용액으로 부유하여 세정 혈소판(washed platelet)을 조제하였다. 혈소판 수를 광학 현미경으로 계측하여, 혈소판 수가 $5 \times 10^8/m^3$ 가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. Tyrode HEPES용액의 조성은 138.3 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.048 mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 4.0 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0.35% Albumin(BAS), 0.1% glucose이다.

혈소판 활성화 작용은 혈소판 형태 변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 흡광도 측정장치(Whole-Blood Aggregometer, Chrono-log Co.)를 사용하였다. 혈소판 부유액(platelet rich plasma) 250 μ l를 취하여 37°C로 1,200 rpm에서 교반하면서 3분이 경과된 후 $CaCl_2$ 1 mM을 첨가하고 다시 3분이 경과된 후에 시호 분획 또는 효능제를 농도별로 투여하여 혈소판 응집을 유도하였다. 최적 응집 농도를 찾아 $CaCl_2$ 를 농도 별로 투여하여 의존성을 측정하였다.

시호에서의 유효성분 분리 및 동정

시판되고 있는 국내산 시호(600 g)를 세절한 후 methanol (MeOH) 용매로 실온에서 추출하였다. MeOH 추출액을 40°C 이하에서 감압 농축하여 n-hexane, ethylacetate(EtOAc), buthanol(n-BuOH), acetone 등의 용매 순으로 추출하였다 (Fig. 2). 용매 추출물중에 혈소판 작용이 강하고, saponin 함량이 많은 acetone 추출물을 silica gel(70~230 mesh)

column으로 용출용매에 따라 Fraction I, II, III, VI, V의 분획물을 얻었다. 각 분획의 유효성분을 정제하기 위하여 High Performance Liquid Chromatography(SCL-10A, SHIMADZU)로 분리 조건은 Intersil ODS prep-column(10×250 mm), 이동상(MeOH:H₂O=90:10), 검출과장 205 nm, 유속 3 ml/min에서 사용하였다.

결과 및 고찰

시호 용매별 추출물의 혈소판 활성화 작용은 추출물 100 μ g/ml에서 혈소판 응집율이 methanol(55%), hexane(0%), ethylacetate(60%)로 나타났고 60 μ g/ml에서 methanol(13%), ethylacetate(43%), acetone(55%)로 나타났다(Table 1). 시호 용매추출물 중에 응집작용이 강한 acetone 추출물을 silica gel column으로 분리한 II~V 분획물의 혈소판 활성을 비교해 보면, II, III, IV, V 분획물은 50 μ g/ml에서 각각 61%, 67%, 33%, 46%가 나타났다(Table 2). Acetone 추출물의 II, III, IV, V 분획물에서 HPLC으로 분리·정제한 유효성분의 retention time에 있어서 8.1분과 11.6분 peak가 표준품 saikosaponin a와 d로 확인하였다(Fig. 1). Saikosaponin a는 triterpenoid 비배당체의 C11 위치에 carbinol 구조, C3 위치에 fructose와 glucose를 가지고 있으며 C16 위치에 α 형 OH기로, saikosaponin d는 saikosaponin a와 이성질체로서 C16 위치에 β 형 OH기가 있다. 그외 peak에 대한 화학구조는 규명중에 있다.

혈소판 활성화작용에 대한 효능제로 arachidonic acid,

Table 1. Effect of solvent extracts of *Bupleuri Radix* on rabbit platelets

Concentration (μ g/ml)	Platelet aggregation (%)			
	MeOH	Hexane	EtOAc	Acetone
100	55	0		
80	36		50	
60	13		43	55
40	3		8	46
20	0		0	0

Table 2. Effect of acetone fractions of *Bupleuri Radix* on rabbit platelets

Concentration of fraction (μ g/ml)	Platelet aggregation (%)			
	II	III	IV	V
50	61	67	33	46
20	60	62		3
10	43	57		
1	8	50		

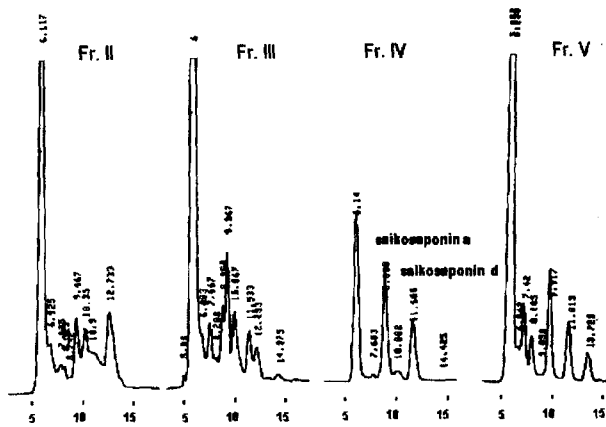


Fig. 1. HPLC pattern of acetone fractions from *Bupleurum falcatum*.

collagen, thrombin, PAF(Platelet Activation Factor) 등이 있다. 이러한 효능제들은 생체 내에서 뇌·심혈관벽과 모세혈관에 손상이 있을 때 유리되어 혈소판을 활성화시킴으로써 혈전 및 지혈효과를 나타낸다. 본 실험에서 혈소판 활성화에 대한 각 효능제의 최적 농도의 설정은 각 농도별로 그 작용을 살펴 본 결과 Table 3에서 arachidonic acid는 10 μ M, collagen은 10 μ g/ml, thrombin은 0.1 unit/ml, PAF는 10 nM, PMA는 5 μ M, ionophore A23187 2 μ M에서 각각 최적의 활성을 나타내었다. 일반적으로 사용되는 효능제의 최적 농도로 thrombin(0.1 unit/ml), arachidonic acid(100 μ M), collagen(10 μ g/ml), PAF(2 nM)로 보고되고 있지만, 실험동물, 혈소판 분리 조건에 따라 각 효능제의 최대응집점에 대한 농도는 다르게 보고되고 있다.^{9,11)} 따라서 혈소판 활성화 작용은 혈소판의 생리적 상태에 따라 매우 민감한 것으로 사료된다. 혈소판 응집작용은 세포막을 통한 세포의 Ca^{2+} 유입 및 세포내 Ca^{2+} 증가가 중요한 역할을 한다. 각 효능제의 세포의 Ca^{2+} 의존성을 보고자, 최적농도를 대조군으로 하여 Ca^{2+} 을 농도별로 투여하였고 EGTA(Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-Tetraacetic acid)를 사

용하여 혈소판 부유액에 남아있는 Ca^{2+} 을 제거한 후 그 작용을 살펴보았다. Ca^{2+} 1 mM에서 모든 효능제는 최대 응집점을 나타내었고, EGTA 전처치시에는 혈소판 응집이 나타나지 않고 혈소판 변형(shape change)만 나타났다. Ca^{2+} 0.1 mM에서 혈소판 응집은 thrombin이 0%, collagen과 PAF는 11%, PMA 45%, arachidonic acid는 55%, ionophore A23187은 64%로 순으로 나타났다. Ca^{2+} 0.01 mM에서 혈소판 응집은 thrombin 0%, collagen 2%, PAF 7%, ionophore A23187 15%, arachidonic acid 21%, PMA 35% 순으로 나타났다(Fig. 4). 각 효능제에 따라서 혈소판 활성화에 대한 세포의 Ca^{2+} 의존성은 thrombin > collagen \geq PAF > PMA > arachidonic acid \geq Ionophore A23187 순으로 나타났다(Fig. 2).

시호 saponin의 혈소판 활성화에 대한 세포의 Ca^{2+} 의 작용을 보면, acetone II와 III 분획물에서 Ca^{2+} 1.0 mM과 0.1 mM에서 최대 활성이 나타났고, Ca^{2+} 0.01 mM에서 각각 50%, 56%의 혈소판 활성이 나타났으며, EGTA 전처치 시에는 혈소판 활성이 각각 10%, 8%로 나타났다(Table 4). 시

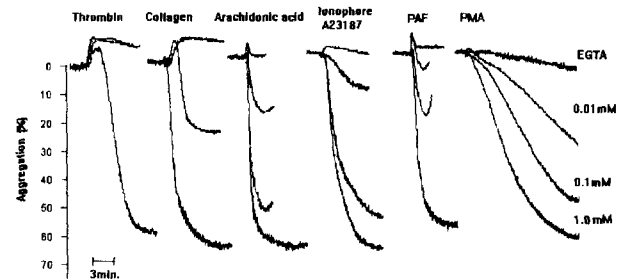


Fig. 2. Effect of external Ca^{2+} on platelet activation induced by agonists. Recording of shape change and aggregation of rabbit platelets in response to agonists (thrombin, collagen, arachidonic acid, ionophore A23187, PAF, PMA). Platelet shape change was expressed as a decrease direction below basal level of aggregation (0%). Agonist was added 3 min after addition of $CaCl_2$ (0.01~1.0 mM).

Table 3. Effect of each agonists on rabbit platelets

Thrombin		Collagen		Arachidonic acid		Ionophore A23187		PAF		PMA	
Con. (unit/ml)	Agg. (%)	Con. (μ g/ml)	Agg. (%)	Con. (μ M)	Agg. (%)	Con. (μ M)	Agg. (%)	Con. (nM)	Agg. (%)	Con. (μ M)	Agg. (%)
0.10	61	10.0	66	100	75	10	88	10	71	50	76
0.08	59	6.0	62	10	74	5	80	5	69	20	75
0.06	46	2.0	59	5	63	2	80	2	60	10	70
0.04	30	1.0	59	1	39	1	25	1	60	5	67
0.02	6	0.6	36	0.5	23	0.5	0	0.5	36		
0.01	0	0.2	7	0.1	12			0.2	24		
		0.1	0								

Table 4. Effect of external Ca²⁺ on platelet activation induced by acetone fractions of *Bupleuri Radix* and saikosaponins

Ca ²⁺ (mM)	Platelet aggregation (%)			
	II (20 µg/ml)	III (20 µg/ml)	Saikosaponin a (20 µg/ml)	Saikosaponin d (5 µg/ml)
1.0	63	60	69	71
0.1	61	60	50	66
0.01	50	56	39	54
EGTA	10	8	24	35

호 acetone III 분획물에서 분리·정제한 saikosaponin a와 d의 혈소판 활성화작용은 Ca²⁺ 전처치시 각각 20 µg/ml과 5 µg/ml에서 69% 최적 응집율로 나타내지만 그 이상의 고농도 투여시 세포의 Ca²⁺을 전처치하지 않더라도 혈소판의 투과도 증가는 적혈구의 용혈작용처럼 혈소판이 용해되어 나타낸다. β형 OH의 saikosaponin d는 saikosaponin a보다 강한 응집작용을 갖는 구조상관계를 나타내고 있다. Saikosaponin a와 d에 대한 혈소판 활성화에 대한 세포의 Ca²⁺ 의존성은 Ca²⁺ 1.0 mM과 0.1 mM에서 최대 활성이 나타났고, Ca²⁺ 0.01 mM에서 각각 39%, 54%의 혈소판 활성이 나타났으며, EGTA 전처치 시에는 혈소판 활성이 각각 24%, 35%로 나타났다(Fig. 3, Table 4). Saikosaponin a와 d에 대한 세포의 Ca²⁺의 의존성은 각 효능제와는 다른 세포의 Ca²⁺ 의존성을 나타내는 것으로 사료된다. 일반적으로 혈소판 활성화에 대한 세포내 Ca²⁺ 의존성 증가는 세포의 Ca²⁺ 유입 또는 세포내 저장고에서 유리되어 calmodulin과의 결합을 통해 각종 효소나 기질을 인산화함으로써 혈소판 응집을 유도한다고 한다.¹²⁻¹⁶⁾ 예를 들면 ionophore A 23187는 세포막에 결합하여 세포외액에서 세포내로 2가 양이온 Ca²⁺을 통과시키고 arachidonic acid는 prostaglandin 및 inositol을 생성하여 세포내 저장고에서 Ca²⁺을 방출시킨다. 따라서 이 두 물질의 Ca²⁺ 유입에 있어 그 반응시간은 서로 다르지만 세포의 Ca²⁺이 어떤 경로로 세포막을 통과하여 유입되는지는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 최근 해양생물에서 분리한 천연물에서도 혈소판 활성화에 대한

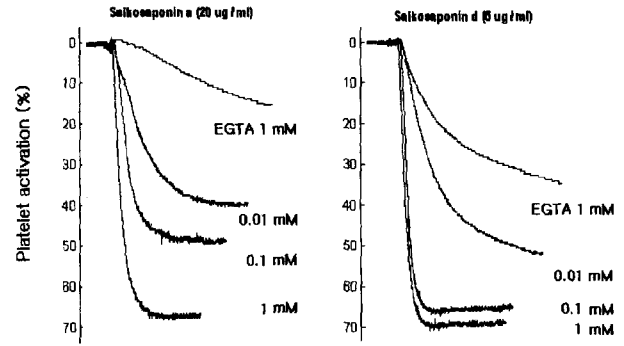


Fig. 3. Effect of external Ca²⁺ on platelet activation induced by saikosaponin a and d. Recording of shape change and aggregation of rabbit platelets in response to saikosaponin. Platelet shape change was expressed as a decrease direction below basal level of platelet activation (0%) and aggregation was expressed as an increase direction. Agonist was added 3 min after addition of CaCl₂ (1 mM).

세포의 Ca²⁺ 의존성이 다르게 나타난다고 보고하였고,¹⁷⁻¹⁹⁾ 해면에서 분리한 theonezolid A는 EGTA 전처리한 혈소판의 활성화에 세포의 Ca²⁺보다 막결합성 tyrosine kinase의 관련성을 시사하였다.^{20,21)} 시호 saponin의 적혈구 용혈작용은 유효성분인 saikosaponin a, b₁, b₂, c, d의 구조에 따라 세포막 흡착으로 인한 cholesterol의 유동성 변화로 용혈작용도 다르게 작용한다고 한다. 따라서, 시호 saponin의 혈소판 활성화 작용은 각종 효능제와는 다른 세포의 Ca²⁺ 의존성 뿐만아니라 막결합 효소에도 영향을 줄수 있다고 사료된다. 시호 saponin에 대한 세포내 Ca²⁺ 의존성과 막결합성 효소와 관련하여 계속 연구하고자 한다.

감사의 말씀

이 연구는 1998년도 순천향대학교 학술연구조성비(98-10024)와 1996년도 농림수산기술개발사업비의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

식물중에서 배당체 일종인 saponins을 다량 함유한 시호(*Bupleurum falcatum*)로부터 생체 조절 기능을 갖는 유효성분을 분리하여 혈소판 활성화 작용을 통하여 뇌심혈관계 질환 연구에 이용하고자 시호 용매분획물에서 분리 및 동정한 saikosaponin을 thrombin, collagen, arachidonic acid 등의 효능제(agonist)와 세포의 Ca²⁺ 의존성을 비교 연구하였다. 시호 용매추출물 중에 acetone 추출물이 혈소판 응집작용이 강하며, 그 유효성분을 분리

및 동정한 saikosaponin **a**와 **d**는 C16 위치에 각각 α 와 β 형의 OH기를 갖는 이성체로, saikosaponin **d**가 **a**보다 강한 응집작용을 갖는 구조활성관계를 나타내고 있다. 각 효능제에 따라서 혈소판 활성화에 대한 세포의 Ca^{2+} 의존성은 thrombin > collagen \geq PAF > PMA > arachidonic acid \geq Ionophore A23187 순으로 나타났다. 시호 추출물 및 saikosaponin의 혈소판 활성화 작용은 기존 효능제와 다른 세포의 Ca^{2+} 의존성을 나타내는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1995년도 국민 영양 조사 보고서. 국민영양 **97-10**, 48-51 (1997).
- 차영주: Platelet-Endothelium interactions. 한국지혈혈전학회지, **2**, 111-116 (1995).
- Ishii, H., Umeda, F., Kunisaki, M., Tamauchi, T. and Nawata, H.: Modification of prostagrandin synthesis in washed human platelets and cultured bovine aortic endothelial cells by glycosylated low density lipoprotein. *Diabetes Res.*, **12**, 177-180 (1989).
- Gomez, C.C., Simon, C.R., Coma, A.C., Sanchez de, L. T., Montero, D.E. and Rodriguez, P.R.: The relationship between lipid peroxidation and latelet aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia.*, **43**, 241-146 (1991).
- Matano, Y., Okuyama, T., Shibata, S., Hoson, M., Osada, H. and Noguchi, T.: Studies on Coumarins of a Chinese drug "Qian-Hu"; VII. Structures of New Coumarin-Glycosides of Zi-Hua Qian-Hu and Effect of Coumarin-Glycosides on Human Platelet Aggregation. *Planta Med.*, **50**, 135-138 (1996).
- Tuominen, M., Bohlin, L. and Rolfsen, W.: Effects of Calaguala and an Active Principle, Adenosine, on Platelet Activating Factor. *Planta Med.*, **58**, 306-310 (1991).
- Abe, H., Konishi, H., Komiya, H. and Archi, S.: Effects of Saikosaponins on Biological membrane. *Planta Med.*, **42**, 356-363 (1981).
- Lse, M., Amagaya, S. and Ogihara, Y.: Effects of Saikosaponin Metabolites on the Hemolysis of Red Blood Cells and their Adsorbability on the Cell Membrane. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3306-3310 (1989).
- Chen, I.: New p-Quinoid apomorphine alkaloids and antiplatelet aggregation constituents of Hrnandia sonora. *Planta Med.*, **61**, 537-539 (1995).
- 류근호, 이주영, 저연숙, 김미정, 정진호: Assay for screening antiplatelet aggregating capacity of natural food. *J. Fd. Hyg. Safety*, **9**, 23-30 (1994).
- 김선옥: 생약의 혈소판 응집 억제 작용 검색 및 오가피의 작용성분 분리. 석사 학위논문 서울대학교 대학원, (1983).
- Alonso, M.T., Alvarez, J., Montero, M., Sanchez, A. and Garcia-Sancho, J.: Agonist-induced Ca^{2+} influx into human platelets is secondary to the emptying of intracellular Ca^{2+} stores, *Biochem. J.*, **280**, 783-789 (1991).
- Berridge, M.J. and Irvine, R.F.: Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular transduction. *Nature*, **312**, 315-321 (1984).
- Franklin, R.A.: Platelet activating factor activates mapk and increases in intracellular calcium via independent pathways in B lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **209**, 1111-1118 (1995).
- Faika, A.G., Invo, M.B., Fracischetti, M., Emilia, C.G. and Celia, R.C.: Stimulation of calcium influx and platelet activation by Canatoxin: Methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **339**, 362-367 (1997).
- Alonso, M.T., Alvarez, J., Montero, M., Sanchez, A. and Garcia-Sancho, J.: Agonist-induced Ca^{2+} influx into human platelets is secondary to the emptying of intracellular stores. *Biochem. J.*, **280**, 783-789 (1991).
- Watanabe, A., Ishida, Y., Honda, H., Kobayashi, M. and Ohizumi, Y.: Ca^{2+} -dependent aggregation of rabbit platelets induced by maitotoxin, a potent marine toxin, isolated from a dinoflagellate. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 29-36 (1993).
- Rho, M.C., Nakahata, N., Nakamura, M., Murai, A. and Ohizumi, Y.: Activation of rabbit platelets by Ca^{2+} influx and thromboxane A_2 release in an external Ca^{2+} -dependent manner by zooxanthellatoxin-A, a novel polyol. *Br. J. Pharmacol*, **115**, 433-440 (1995).
- Park, Y.H.: Effect of marine toxins on the rabbit platelets. *J. Fd. Hyg. Safety.*, **10**, 73-79 (1995).
- Nakamura, S. and Yamamura, H.: Thrombin and collagen induce rapid phosphorylation of a common set of cellular proteins on tyrosine in human platelets. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7089-7091 (1989).
- Rho, M.C., Park, Y.H., Sasaki, S., Ishibashi, M., Kondo, K., Kobayashi, J. and Ohizumi, Y.: The mode of rabbit platelet shape change and aggregation induced by theonezolid-A, a novel polyketide macrolide, isolated from the Okinawa. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 193-199 (1996).
- Mason, M.J., Garcia-Rodriguez, C. and Grinstein, S.: Coupling between intracellular Ca^{2+} stores and the Ca^{2+} permeability of the plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **266**, 20856-20862 (1991).