

가수분해형 탄닌 1-desgalloylrugosin-F 에 의한 100 kDa 세포질 포스포리파아제 A₂ 활성의 억제효과

진미령 · 신혜숙 · 정광목 · 강미선 · 이민원* · 김대경#

중앙대학교 약학대학, *생약학교실, 위생약학교실

(Received December 16, 1999)

Inhibition of 100 kDa Cytosolic Phospholipase A₂ by Hydrolysable Tannin, 1-desgalloylrugosin-F

Mi-Reyoung Chin, Hye Sook Shin, Kwang Mook Jung, Mi Sun Kang,
Min-Won Lee* and Dae Kyong Kim#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — To examine whether DGRF inhibits cPLA₂ activity *in vitro*, we purified a 100 kDa cPLA₂ enzyme from porcine spleen and performed an inhibition study at two concentrations of 5.0 and 50.0 μM 1-stearoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine as a substrate to rule out an apparent inhibition due to “substrate depletion”. Here we reported that DGRF inhibited cPLA₂ activity with ID₅₀ of 3.2 μM and virtually complete inactivation of the enzyme occurred at 60 μM. Interaction experiment between enzyme protein and inhibitor by ultrafiltration method indicated that 1-desgalloylrugosin-F inactivates cPLA₂ enzyme by an irreversible mechanism.

Keywords □ Cytosolic phospholipase A₂, tannin, 1-desgalloylrugosin-F, inhibitor

탄닌은 식물계에 광범위하게 분포되어 식물자체의 보호물질로 알려져 왔으며 현재 생리 활성의 검색을 위해 많은 종류의 탄닌이 칼럼 크로마토그래피 기술의 발달과 더불어 분리·단리되고 있다. Procyanidin B-5,3,3'-di-O-gallate 및 procyanidin C-1,3,3"-tri-O-gallate 등과 같은 축합형 탄닌(condensed tannin)은 angiotensin converting enzyme 활성을 저하시켜 혈압강하 작용이 있다고 보고된 바 있다.¹⁾ 또한 1,3,4-tri-O-galloylquinic acid와 3,5-di-O-galloyl shikimic acid 등은 reverse transcriptase 활성을 억제하여 HIV (human immuno-deficiency virus) 억제작용이 있음이 보고 되었다.²⁾ 이러한 효소, 바이러스, 세균에 대한 탄닌의 억제작용은 단순히 비특이적 저해작용이

아닌 구조 상관적인 특이적 저해작용임이 알려지고 있다. 한편 커피 탄닌과 그와 관련된 화합물이 A23187에 의해 유도된 leukotriene B₄(LTB₄)의 생성을 억제시켰으며³⁾ 다양한 세포 조절작용, 증식, 분화작용에 관여하는 protein kinase를 특이적으로 억제하는 축합형 탄닌이 분리된 바 있다.⁴⁾ 이와 같이 탄닌의 생리적인 작용을 고려하여 볼 때 아라키돈산(arachidonic acid) 대사체 합성에 관여할 가능성이 시사되었으며, 그중에서도 아라키돈산 합성의 속도결정단계의 효소로 알려져 있는 포스포리파아제 A₂(PLA₂)에 특히 초점을 맞추어 탄닌에 의한 활성 변화를 관찰하고자 하였다. PLA₂효소는 여러 종류의 동종이형 효소(isozymes)가 알려져 있으나, 근래에 그 특성과 구조가 알려진 세포질에 존재하는 cPLA₂는 *sn*-2번 위치에 아라키돈산이 결합되어 있는 glycerophospholipid를 특이적으로 분해하는 특성이 있으며, 염증을 비롯한 각종 병태 생리학

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5610 (팩스) 02-816-7338

적인 세포반응에 따라 활성화됨이 보고 되었다. 세포막 인지질로부터 유리된 아라키돈산은 산화효소인 cyclooxygenase, thromboxane A₂ synthase, lipoygenase 효소들에 의해 prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes과 같은 eicosanoids로 대사되며, 특히 PLA₂의 기질이 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine인 경우에는 강력한 염증 유도물질인 platelet-activating factor(PAF)의 전구물질이 된다.^{5,6)} 이러한 대사물은 membrane channel activation, signal transduction, haemodynamics등과 염증반응, 조직손상 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{7,8)}

본 연구에서는 오리나무류인 *Alnus hirsuta var. microphylla*의 잎에서 추출한 가수분해형 탄닌인 1-desgalloylrugosin-F가 돼지 비장으로부터 정제된 cPLA₂의 활성을 억제함을 *in vitro* 실험을 통하여 관찰하였다.

실험방법

재료 및 시약

1-desgalloylrugosin-F(DGRF)의 구조식은 Fig. 1에 서와 같으며, dimethylsulfoxide(DMSO)으로 용해하여 실험에 사용하였다. 1-Stearoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonoyl-GPC(Amersham, U.K.), Centricon 10(Amicon, Inc., USA), 및 기타 시약은 실험에 적합한 높은 순도를 지닌 제품을 사용하였다.

Group IV cPLA₂의 분리정제

Group IV cytosolic 100 kDa PLA₂(cPLA₂)는 Kim 등의⁹⁾ 논문에 따라 분리정제하였다. 간단히 서술하면

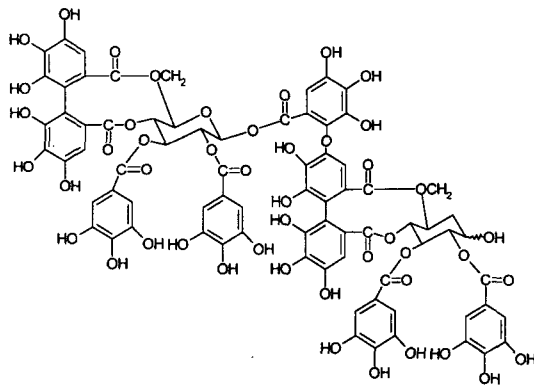


Fig. 1 - Structure of 1-desgalloylrugosin-F.

돼지비장을 완충액 A(50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM EDTA, 0.12 M NaCl)로 균질화시킨 후 40분간 4°C에서 10,000×g로 원심분리하였다. 얻어진 상등액은 초산을 이용하여 pH 6.0으로 맞추고 다시 원심분리한 후 얻어진 침전을 완충액 A를 넣어 현탁시켰다. 이 액을 완충액 A로 평형화시킨 DEAE-Cellulose (DE52; Whatman, Maidstone, England)과 함께 혼합하고 겔을 완충액 B(50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM EDTA, 0.3 M NaCl)를 가해 겔에 결합한 단백질을 용출시켰다. PLA₂ 효소활성을 가진 분획에 4.0 M NaCl용액을 넣어 염의 농도가 0.5 M NaCl이 되도록 하고 이 활성용액을 완충액 C(50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM EDTA, 0.5M NaCl)으로 평형

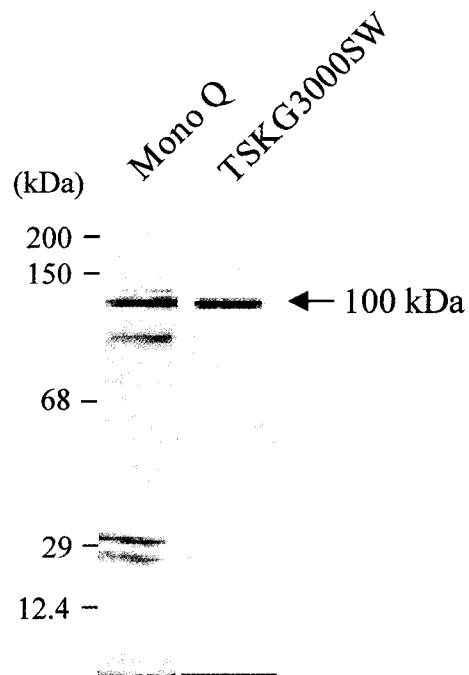


Fig. 2 - Purification of porcine spleen 100 kDa form of cPLA₂. The 100 kDa cPLA₂ was purified from porcine spleen tissues according to Kim *et al.*⁹⁾ as described briefly in "Materials & Methods". Each of aliquots of the highest active fractions of Mono Q anion exchange FPLC column and TSKG3000SW gel filtration HPLC column was subjected to a 10% SDS-polyacrylamide electrophoresis gel, which was visualized by silver stain. The standard protein markers for the gel filtration chromatography were as follows: β -amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome c (12.4 kDa).

화시킨 Butyl-Toyopearl Column(Tosoh Co., Japan)에 적용시켰다. 같은 완충액으로 세척한 후 완충액 D (50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM EDTA)를 이용하여 단백질을 용출시켰다. PLA₂효소활성을 가진 분획을 다시 완충액 A로 평형화시킨 DEAE-5PW HPLC Column(Tosoh Co., Japan)에 적용시키고 0.12~0.5 M NaCl의 염농도 일차구배를 이용하여 단백질을 용출시켰다. 가장 높은 활성 분획 5 ml를 300 μl 정도로 농축하고, 0.12 M NaCl, 1 mM EDTA를 함유하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액으로 평형화시킨 Superose 12 gel filtration FPLC column (Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden)에 적용하고 0.5 ml/min의 유속으로 용출시켰다. 얻어진 활성 분획 중 가장 활성이 높은 3개의 분획을 모으고 곧바로 Mono Q anion exchange FPLC를 행하여 얻은 가장 높은 활성은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 100 kDa의 단백질이 보였으며, 이를 다시 centricon으로 농축한 후 TSKG3000SW gel filtration HPLC column (Tosoh Co. Tokyo, Japan)에 의해 더욱 정제한 결과 SDS-PAGE gel상에서 단일 밴드로 나타났으며, 이렇게 정제한 cPLA₂은 탄닌에 대한 저해실험에 사용되었다.

PLA₂ 효소의 활성 측정 방법

PLA₂활성을 측정하기 위하여 75 mM Tris-HCl, pH 7.0, 5 mM CaCl₂, 0.5 nmol 2-[¹⁴C]AA-GPC(약 65,000 cpm), 돼지비장에서 분리정제한 cPLA₂(~2.0 ng protein)을 첨가하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 고농도의 기질을 사용하는 활성 측정법에서는 1.0 nmol의 2-[¹⁴C]AA-GPC(약 130,000 cpm)에 방사성 물질이 아닌 4.0 nmol 2-AA-GPC를 클로로포름 중에서 혼합한 후 질소가스로 용매를 완전히 제거하고 얻어진 지질 필름에 100% EtOH를 가해 vesicle을 만들어 기질로 사용하였다. DGRF에 의한 cPLA₂활성억제효과를 측정하기 위하여 반응액에 기질을 넣기 전에 3 분간 효소와 DGRF을 반응시킨 후 기질을 첨가하고 그 후 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 반응액에 560 μl의 Dole's reagent(n-heptane : isopropyl alcohol : 1 N-H₂SO₄=400 : 390 : 10)과 110 μl의 물을 넣어 반응을 정지시켰다. 혼합 후 원심분리하고 얻어진 상층액 150 μl을 새 튜브에 넣고 여기에 800 μl n-heptane 과 적당량의 실리카겔을 넣었다. 혼합 후 원심분리하고 얻어진 상층액 800 μl를 β-scintillation용액 2.5

ml이 들어있는 튜브에 옮기고 Packard Tri-Carb Liquid β-Scintillation Counter를 이용하여 방사선 활성을 측정하였다.

cPLA₂효소와 1-desgalloyljugosin-F의 비가역적인 결합

1-desgalloyljugosin-F와 cPLA₂효소의 혼합액을 37°C에서 40분간 배양하고 혼합액을 Centricon-10 (Amicon Co., USA; 10,000 MW Cutoff)에 넣고 4°C에서 5분간 2,000×g로 원심 분리한다. 잔류액과 여과액의 일부분을 취해 PLA₂효소 활성을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

1-desgalloyljugosin-F 에 의한 cPLA₂ 효소 활성 억제에 대한 pH 의존성

Porcine spleen에서 분리 정제한 cPLA₂가 기준에 알려진 100 kDa cPLA₂의 특성과 같은지를 알아보았다. cPLA₂의 특이적인 억제제인 AACOCF₃에 의해 그 활성이 완전히 억제되었으나, Dithiothreitol(DTT)

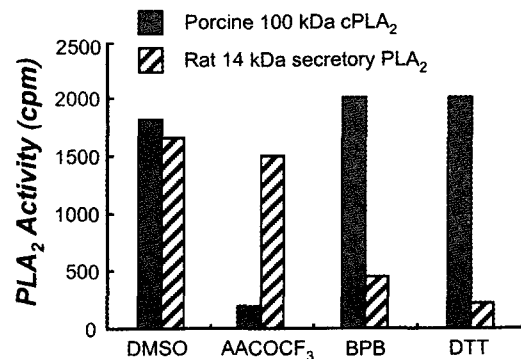


Fig. 3 – Characterization of 100 kDa cPLA₂ purified from porcine spleen. Inhibitors AACOCF₃ and BPB were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and dithiothreitol (DTT) was dissolved in distilled water. The purified cPLA₂ enzyme was pre-incubated with the inhibitors, 10 μM AACOCF₃, 25 μM BPB and 4 mM DTT, respectively, for 5 min at 37°C. After that, the substrate 2-[¹⁴C]AA-GPC was added to the assay system and further incubated as described under “Materials and Method”. For comparison with secretory 14 kDa PLA₂, the secretory PLA₂ was partially purified from rat platelets according to Kim *et al.*¹⁰⁾ Shown are values from one experiment representative of three independent experiments producing similar results.

에 대해서는 활성 변화는 관찰되지 않았다. 한편, Kim 등에⁹⁾ 의해 흰쥐의 혈소판으로부터 부분적으로 분리 정제한 분비성 14 kDa PLA₂의 활성은 reducing agent인 DTT와 그 저해제인 bromophenacyl bromide (BPB)에 의해 저해되었다. 따라서 Porcine spleen에서 분리 정제한 cPLA₂가 기존에 알려진 100 kDa cPLA₂와 특성이 같음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

우선 cPLA₂ 효소활성에 대해 50 μM DGRF의 억제효과를 Tris-HCl 완충액을 이용하여 각 pH에 대한 의존성을 측정해 보았다. pH 7.0~8.0의 중성 pH에서 최대의 억제효과를 나타내었으며 이후 효소활성 측정 을 pH 7.0에서 실시하였다(Fig. 4).

cPLA₂ 활성에 대한 1-desgalloylrugosin-F의 억제 효과

DGRF의 농도에 따른 cPLA₂ 효소활성 억제효과를 알아보기 위하여 DGRF 농도를 증가시키기에 따라 cPLA₂ 효소활성변화를 알아보았다. 농도 의존적으로 cPLA₂ 효소활성이 감소하였으며 IC₅₀=3.2 μM이었고 60 μM DGRF에 의해 효소활성이 완전히 억제되었다(Fig. 4). 대개의 경우 인지질 대사 효소에 대한 저해제 탐색은 저해제가 직접 효소에 특이적으로 결합하는 것이 아니라 소수성이 강한 기질에 결합함으로써 결과

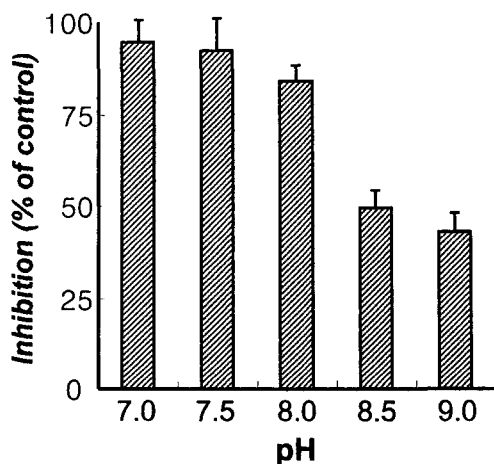


Fig. 4 – Optimal pH for the inhibition of cPLA₂ by DGRF. 25 mM DGRF was pre-incubated with the purified cPLA₂ in Tris-HCl buffers of the indicated pH for 3 min at 37°C. The activity was measured after adding 5.0 mM 2-[1-¹⁴C]AA-GPC as described under “Materials and Method”. Each data point represents the mean ± SEM of three independent experiments.

기 저해가 관찰되는 경우가 많으므로 특별한 주의를 요한다. 이러한 가능성을 검토하기 위한 실험으로 간편하면서도 가장 효율적인 방법은 기질의 농도를 10 배 정도 증가시켰을 때에도 그 효소 활성이 저해되는지의 여부를 관찰하는 것이다. 따라서, 기질의 농도를 10배 증가 시킨 활성 측정계에서도 IC₅₀=6.4 μM로 관찰되었다(Fig. 5). 한편, DGRF는 같은 농도의 범위에서 흰쥐로부터 부분 정제한 분비성 14 kDa PLA₂의 활성에는 아무런 저해 활성을 보이지 않았다(data not shown). 이는 DGRF가 cPLA₂에만 특이적으로 저해하는 것을 의미할 뿐만 아니라, 기질에 비특이적으로 결합함으로써 저해활성을 나타내지 않음을 더욱 입증하는 결과로 해석된다.

1-desgalloylrugosin-F와 cPLA₂의 비가역적인 결합

Fig. 5에서 관찰한 바와 같이 DGRF는 기질과의 결합에 의한 기질 고갈(substrate depletion)에 의한 겉보기 저해(apparent inhibition)가 아닐 것으로 판단되어 1-desgalloylrugosin-F의 cPLA₂ 효소활성 억제가 비가역적 또는 가역적 인지를 알아보기 위하여 DGRF와 cPLA₂ 효소를 37°C에서 5분간 반응시킨 후 혼합액을 Centricon-10으로 농축하였다. 5분간 10,000 ×g에서 원심분리를 하여 Centricon-10 Membrane을 기점으로 하여 잔류액과 여과액의 일부를 각각 취하고 cPLA₂ 효소활성 억제효과를 측정하여 보았다. 잔류액과 여과액의 일부분을 취해 cPLA₂ 효소활성 억제효과를

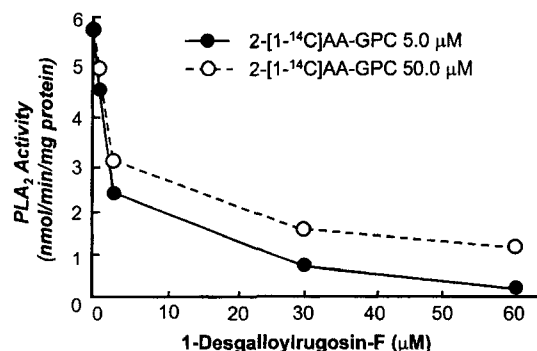


Fig. 5 – Dose-dependent inhibition of cPLA₂ by DGRF. The purified cPLA₂ activity was assayed in the presence of the indicated concentrations of DGRF with 5.0 μM and 50.0 μM 2-[1-¹⁴C]AA-GPC, respectively, as described in “Materials & Methods”. Shown are values from one experiment representative of three independent experiments producing similar results.

Table I – Irreversible inhibition of porcine spleen cPLA₂ by DGRF

DGRF (μM)	cPLA ₂	BSA	% of inhibition	
			residue	filtrate
0	+	-	-	1.2±0.2
50	+	-	98.0±10.5	1.7±0.4
50	-	+	25.0±4.2	87.0±15.7

The control cPLA₂ activity used for the inhibition test was 3,400 nmol/min/mg protein for 2-[1-¹⁴C]AA-GPC as the substrate. Assay of the cPLA₂ activity for the inhibition by DGRF was described in "Materials & Methods". Each data represents the mean±SEM of three independent experiments.

비교해 보았을 때 각각 98%, 1.7%로 나타나, 여과액에는 cPLA₂의 활성을 저해하는 DGRF가 관찰되지 않았으며, 같은 방법으로 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)으로 대조실험을 한 경우에는 그 억제 효과는 잔류액과 여과액에 대해 각각 25%, 87%로 나타났다(Table 1). 따라서 이상의 결과로 1-desgalloylrugosin-F와 cPLA₂와의 결합이 비가역적임을 알 수 있었다.

탄닌은 다른 물질과 결합하기 쉬운 특성 때문에 여러 생물학적 활성을 나타낸다. 이러한 특성을 이용하여 현재 이러한 세포생물학적인 반응을 변화시켜 여러 질병들을 개선할 수 있는 화합물로 많은 연구가 되고 있다. 본 연구에서는 자작나무과에서 분리·정제한 DGRF를 최근 신호전달이나 염증반응의 매개물로 많은 연구가 이루어지고 있는 cPLA₂에 대한 억제효과를 실험하였다. DGRF는 cPLA₂효소 활성을 비교적 낮은 농도에서 비가역적으로 억제하였고 따라서 염증반응이나 세포손상에 관련된 세포내 일련의 현상에 관련된 cPLA₂효소활성을 억제함으로써 염증반응 등을 억제할 수 있을 것으로 예상된다.

결 론

*Alnus hirsuta var. microphylla*의 잎에서 추출한 1-desgalloylrugosin-F화합물은 *in vitro*실험에서 돼지 비장으로부터 정제한 cPLA₂의 활성을 ID₅₀=3.2 μM으로 억제하였으며, 효소 활성을 억제하는 최적 pH는 7.0~8.0으로 중성이었다. 한편, 그 억제는 이 화합물과 효소의 비가역적인 결합에 기인할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 논문은 중앙대학교의 연구기자재 구입 지원 프로그램의 도움을 받은 결과임

문 헌

- 1) Uchida, S., Ikari, N., Ohta, H., Niwa, M., Nishioka, I. and Ozaki, M. : Inhibitory effects of condensed tannins on angiotensin converting enzyme. *Jpn. J. Pharmacol.* **43**, 242 (1987).
- 2) Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C. and Lee, K. H. : Anti-AIDS agents, 2 : Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* **53**, 587 (1990).
- 3) Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T. and Arichi, S. : Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Nat. Prod.* **50**, 392 (1987).
- 4) Wang, B. H., Foo, L. Y. and Polya, G. M. : Differential inhibition of eukaryote protein kinases by condensed tannins. *Phytochemistry*, **43**, 359 (1996).
- 5) Van den Bosch, H. : Intracellular phospholipases A. *Biochim. Biophys. Acta.* **604**, 191 (1980).
- 6) Hanahan, D. J. : Platelet-activating factor : A biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 483 (1986).
- 7) Bonventre, J. V. : Phospholipase A₂ and signal transduction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 128 (1992).
- 8) Dennis, E. A. : Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **269**, 3057 (1994).
- 9) Kim, D. K. and Bonventre, J. V. : Purification of a 100 kDa phospholipase A₂ from spleen, lung and kidney : antiserum raised to pig spleen phospholipase A₂ recognizes a similar form in bovine lung, kidney and platelets, and immunoprecipitates phospholipase A₂ activity. *Biochem. J.* **294**, 261 (1993).
- 10) Kim, D. K., Kudo, I. and Inoue, K. Purification and characterization of rabbit platelets cytosolic phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta.* **1083**, 80 (1991).