

## 자생식물 추출물의 Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub>, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase 저해활성

유하나 · 조경현 · 석대은<sup>1</sup> · 정태숙\*

한국생명공학연구원 지질대사연구실, <sup>1</sup>충남대학교 약학대학

### Inhibitory Effects of Natural Plant Extracts on Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub>, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase

Hana Yu, Kyung-Hyun Cho, Dai-Eun Sok<sup>1</sup>, and Tae-Sook Jeong\*

Lipid Metabolism Research Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333,

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstract** – The regulation of plasma lipid level, particularly LDL cholesterol, represents the focus of current therapy for atherosclerosis. And Lp-PLA<sub>2</sub> is able to hydrolyse oxidized phosphatidylcholine within LDL into lyso-PC and oxidized fatty acids. Lp-PLA<sub>2</sub> is a potential biomarker of coronary heart disease and plays an important proinflammatory role in the progression of atherosclerosis. We investigated the inhibitory effects of methanol extracts of 224 natural plants on Lp-PLA<sub>2</sub> activity. Seven kinds of methanol extracts of tested plants showed above 50% inhibitory effect with the concentration of 100 µg/ml. The concentrated aqueous suspensions of each methanol extract were partitioned with *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, and EtOAc. Among them, EtOAc extracts of *Astilbe chinensis* var. *dauidii* (root) and *Pourthiaea villosa* var. *brunnea* (leaf) significantly inhibited Lp-PLA<sub>2</sub> activity at the same concentration.

**Key words** – Lp-PLA<sub>2</sub>, oxidized LDL, inflammation, atherosclerosis, plant extracts.

최근 관상심장질환 (coronary heart disease: CHD)으로 인 한 사망률이 크게 증가되고 있으며 동맥경화 (Atherosclerosis)는 그 주요 원인 중의 하나이다.<sup>1)</sup> 동맥경화는 동맥 벽에 지질과 섬유질 요소가 축적되어 진행되는 염증성 질환이다.<sup>2,3)</sup> 혈관 벽내에 plaque 형성과 파열이 심근경색 발 병에 주요한 요인이며, 동맥경화는 혈관 벽의 손상에 대한 만성 염증과정이며 손상기작보다는 오히려 방어기작으로 제 시되고 있다.<sup>4)</sup> 최근에는 동맥경화(atherosclerosis)를 inflammatory and sclerosing arterial disease (ISAD)로 명명해야 하는 것이 옳다는 제안도 나오고 있다.<sup>5)</sup> 동맥경화를 유발하 는 위험 인자로는 고혈압, 흡연, 비만, 혈장 저밀도 지질 단백질(low density lipoprotein : LDL)의 증가 등이 있다.<sup>3)</sup> 그러나 환자의 50% 이상은 위에서 언급한 위험 요인과 무관 하게 동맥경화가 발병되었다는 사실로부터, 동맥경화를 일으키는 새로운 요인이 있음을 암시했다. West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)를 통해 관상심장

질환을 가진 환자 580명과 정상인 1,160명을 을 대상으로 조사한 결과, 정상인에 비해 환자들의 lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>)의 수준이 관상심장 질환의 발 병 위험률과 직접적으로 관련이 있다는 보고와 함께, Lp-PLA<sub>2</sub>가 관상심장질환의 독립적인 위험인자임이 밝혀졌다.<sup>7-8)</sup>

혈장 Lp-PLA<sub>2</sub>는 platelet-activating factor acetylhydrolase (plasma PAF-AH)와 같은 효소로 알려져 있으며,<sup>9)</sup> 약 80%가 LDL에 존재하고, 나머지는 high density lipoprotein (HDL)과 very low density lipoprotein (VLDL)에 분포하며, monocytes, macrophages, T-lymphocytes와 mast cell에 의해 주로 생성 되는 phospholipase A<sub>2</sub> superfamily의 secreted calcium-independent member이고, 분자량은 45 kDa이다.<sup>10-12)</sup> 동맥벽 에 LDL 특히 ox-LDL의 축적은 동맥경화의 가장 중요한 초 기 단계로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 동맥경화 병변에서 산화된 LDL이 검출되나, LDL이 생체내에서 어떤 기작에 의해 산화되는지는 잘 알려져 있지 않다. LDL이 산화/변형되기 전까지 Lp-PLA<sub>2</sub>는 LDL에 잠복 상태로 부착되어 있다가 LDL이 산화 되면 활성화되어 빠른 속도로 oxidized-phospholipid를 분해

\*교신저자(E-mail) : tsjeong@kribb.re.kr  
(FAX) : 042-861-2675

하여 많은 양의 lysophosphatidylcholine (lyso-PC)과 free oxidized fatty acids를 생성한다.<sup>13)</sup> LDL은 intima에서 산화되어 Lp-PLA<sub>2</sub>의 기질로 제공되고, 분해산물은 다시 macrophage 축적과 연관된 만성 염증을 촉진하고, 또한 macrophage는 더 많은 Lp-PLA<sub>2</sub>를 생산케하는 positive feedback mechanism이 혈관질환의 진전을 가속화한다.<sup>10)</sup> 또한 이 분해산물들은 monocyte chemoattractant이며 pro-inflammation 작용을 나타낸다. Lp-PLA<sub>2</sub>에 의해 생성된 free oxidized fatty acids의 구조가 분명하게 규명되어 있지 않아 생물 활성을 모두 정의할 수 없으나, ox-LDL로부터 생성된 micromolar 농도의 fatty acid는 생물학적으로 비활성인 반면, 또 다른 분해산물인 lyso-PC의 pro-inflammatory와 pro-atherogenic 역할에 대한 보고가 1990년대에 기하급수적으로 증가하여, endothelium-dependent 이완의 손상, vascular cell과 intracellular adhesion molecules의 유발, monocyte와 T-lymphocytes의 chemoattractant로 작용, endothelium-derived nitric oxide의 생성과 방출 억제, macrophage의 이동 억제, 30-50 micromolar 이상 농도에서의 독성, endothelial cells로부터 arachidonic acid의 방출자극 등이 보고되어 있다.<sup>10)</sup>

Lp-PLA<sub>2</sub>는 고콜레스테롤증 환자에서 관상동맥질환의 독립적인 위험요인으로서, pro-inflammatory agent로 제안되고 있으며, 동맥병변 (atherosclerotic lesion)의 macrophage에서 발견되었고,<sup>14)</sup> 최근 연구에서 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제의 투여로 동맥경화 모델동물인 Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbit의 지방선(fatty streak) 생성이 현저하게 감소된 사실로부터<sup>15)</sup> Lp-PLA<sub>2</sub>의 활성 저해가 동맥경화 예방 및 치료의 target으로 주목받고 있다.<sup>7,16)</sup> 따라서 본 연구는 Lp-PLA<sub>2</sub>의 저해제를 개발할 목적으로 국내 식물자원의 methanol 추출물에 대한 저해활성을 탐색하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 시료로 사용한 식물재료는 자생식물이용기술 개발사업단에서 분양 받은 자생식물 methanol 추출시료를 사용하였고, 용매 분배를 이용하여 n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, H<sub>2</sub>O 분획으로 나누어 조제하였다. 각각의 식물 추출물은 DMSO에 녹여 10 mg/ml의 농도로 stock solution을 제조하였으며, 이를 1 mg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

**시약** - [<sup>3</sup>H] platelet activating factor (PAF 250 μCi, 21.50 Ci/mmmole, NET 910)는 Dupont-New England Nuclear에서 구입하였고, PBS, EDTA, DMSO 등 기타 시약은 Sigma Co.에서 구입하였다.

**LDL의 분리** - 사람의 혈장으로부터 초원심분리기(Beckman LB-70M Ultracentrifuge)를 이용하여 LDL을 분리하였다. 먼

저 대전·충남적십자 혈액원에서 가져온 혈장에 0.04% EDTA, 0.05% NaN<sub>3</sub>, 0.015% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 넣어 혈장에 있는 지단백질의 변성을 막는다. 100,000×g (55.2 Ti, 45,000 rpm), 4°C에서 20 시간 동안 초원심 분리하였다. 상층에 떠있는 chylomicron과 VLDL을 건어내고, 나머지 하층은 다음과 같은 식에 의해 NaBr (heavy density solution)을 이용해서 밀도를 1.063 g/ml로 맞추었다.

$$V_2 = V_1 \times \frac{D - D_1}{D_2 - D}$$

V<sub>2</sub>: volume of heavy density solution

V<sub>1</sub>: initial volume of solution

D: required density (1.063)

D<sub>1</sub>: original density

D<sub>2</sub>: density of heavy solution (1.40)

다시 100,000×g, 4°C에서 24 시간 동안 초원심 분리한 후, 상층에 떠있는 노란색의 LDL을 분리했다. 이 LDL을 PBS (10 mM, pH 7.4)로 투석하여 고농도의 NaBr을 제거하고, 4°C에서 보관하면서 1 개월 이내에 사용하였다.

**Lp-PLA<sub>2</sub> 활성 분석** - 사람의 혈장으로부터 분리한 LDL을 사용하여 자생식물의 methanol 추출 시료를 대상으로 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제를 탐색하였다. Boyd 등의 방법<sup>17)</sup>을 일부 수정하여 사용하였으며, Lp-PLA<sub>2</sub>의 활성 측정 표준 조건은 반응액 200 μl에 2.16 mM EDTA, 8 mM PBS (pH 7.4)와 10 μM PAF ([<sup>3</sup>H]PAF 0.05 μCi/tube)와 LDL 4-5 μg을 포함한다. 유기용매에 녹여있는 10 μl [<sup>3</sup>H]PAF (250 μCi, 21.50 Ci/mmmole)와 12.5 μM Cold-PAF 2.5 μl를 질소가스 하에서 용매를 완전히 제거한 후, 2.7 mM EDTA를 포함하는 10 mM PBS (pH 7.4) 3.2 ml를 첨가하여 micellar 형태의 기질을 준비한다 (A). 시험관에 희석한 LDL 20 μl (약 4-5 μg)와 10 μM PAF를 포함한 (A) 용액 160 μl, DMSO에 녹인 시료 20 μl (최종 농도 100 μg/ml)를 첨가하여 37°C에서 15 분간 반응 시킨 후, chloroform/methanol (2:1) 용액 600 μl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 대조군에는 시료 대신 DMSO 20 μl를 첨가하고, 양성대조군은 GlaxoSmith-Kline으로부터 분양받은 Lp-PLA<sub>2</sub> 활성저해물질인 SB-381320 (IC<sub>50</sub>=55 nM)을 사용하였으며, 공시험은 효소원 대신에 20 μl PBS를 첨가한 것을 사용하였다. Bligh와 Dyer의 방법<sup>18)</sup>에 의해 1.500×g에서 3 분간 원심분리하여 유기용매층과 물층을 분리했다. 상층액(물층) 250 μl를 취하고 250 μl chloroform을 첨가하여 위의 실험을 반복하였다. 최종 상층액 100 μl를 취해서 scintillation vial에 넣고 scintillation cocktail (Lumagel, Lumac Co.) 3 ml를 첨가하여 liquid

**Table I.** Inhibitory effects of methanol extracts of natural plants on Lp-PLA<sub>2</sub>

Natural plant samples	Parts	Family	Inhibition (%)*
<i>Rhamnus davurica</i> (갈매나무)	stem	Rhamnaceae	34
<i>Lindera glauca</i> (감태나무)	stem	Lauraceae	49
<i>Euphorbia sieboldiana</i> (개감수)	whole plant	Euphorbiaceae	38
<i>Semiaquilegia adoxides</i> (개나리발톱)	whole plant	Ranunculaceae	44
<i>Forsythia koreana</i> (개나리)	leaf, stem, flower	Oleaceae	36
<i>Asarum maculatum</i> (개죽도리)	whole plant	Aristolochiaceae	16
<i>Staphylea bumalda</i> (고추나무)	stem	Staphyleaceae	24
<i>Pinus thunbergii</i> (곰솔)	flower	Pinaceae	28
<i>Lamium album</i> var. <i>barbatum</i> (광대수염)	whole plant	Labiatae	40
<i>Abies koreana</i> (구상나무)	leaf	Pinaceae	18
<i>Spiraea salicifolia</i> (꼬리조팝나무)	stem	Rosaceae	16
<i>Catalpa bignonioides</i> (꽃개오동)	stem	Bignoniaceae	42
<i>Kadsura japonica</i> (남오미자)	leaf	Magnoliaceae	54
<i>Thuja koraiensis</i> (눈쭉백)	leaf	Cupressaceae	36
<i>Abelia mosanensis</i> (댕강나무)	stem	Caprifoliaceae	22
<i>Viburnum erosum</i> (덜꿩나무)	stem	Caprifoliaceae	42
<i>Sambucus sieboldiana</i> (덜나무)	stem-wood	Caprifoliaceae	44
<i>Cyrtomium falcatum</i> (도깨비고비)	leaf	Aspidaceae	30
<i>Pittosporum tobira</i> (돈나무)	stem	Pittosporaceae	24
<i>Aralia elata</i> (두릅나무)	stem	Araliaceae	49
<i>Acer truncatum</i> (만주고로쇠)	stem	Aceraceae	46
<i>Berberis koreana</i> (매자나무)	leaf, stem	Berberidaceae	42
<i>Chaenomeles lagenaria</i> (명자꽃)	stem	Rosaceae	46
<i>Ficus nipponica</i> (모람)	stem	Moraceae	24
<i>Rhodotypos scandens</i> (병아리꽃나무)	stem	Rosaceae	46
<i>Acer triflorum</i> (복자기)	stem	Aceraceae	16
<i>Viburnum carlesii</i> (분꽃나무)	stem	Caprifoliaceae	48
<i>Lindera erythrocarpa</i> (비목나무)	stem	Lauraceae	34
<i>Cleyera japonica</i> (비쭈기나무)	leaf	Theaceae	0
<i>Acer tegmentosum</i> (산겨릅나무)	stem	Aceraceae	24
<i>Allium grayi</i> (산달래)	whole plant	Liliaceae	6
<i>Prunus sargentii</i> (산벚나무)	stem	Rosaceae	40
<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetalis</i> (살갈퀴)	whole plant	Leguminosae	0
<i>Lycoris squamigera</i> (상사화)	root	Amaryllidaceae	12
<i>Lycoris radiata</i> (석산)	leaf	Amaryllidaceae	20
<i>Styrax obassia</i> (쪽동백나무)	stem	Styracaceae	0
<i>Rosa multiflora</i> (찹레꽃)	leaf, stem	Rosaceae	42
<i>Thea sinensis</i> (차나무)	leaf	Theaceae	36
<i>Potentilla kleiniana</i> (가락지나무)	aerial part	Rosaceae	6
<i>Actinidia polygama</i> (개다래)	leaf, stem	Actinidiaceae	46
<i>Carpinus tshonoskii</i> (개서어나무)	stem-wood	Betulaceae	0
<i>Cinnamomum japonicum</i> (생달나무)	stem	Lauraceae	0
<i>Ostericum koreanum</i> (강활)	whole plant	Umbelliferae	2
<i>Cephalotaxus koreana</i> (개비자나무)	leaf	Taxaceae	4
<i>Lathyrus japonica</i> (갯완두)	whole plant	Leguminosae	24

Table I. Continued

Natural plant samples	Parts	Family	Inhibition (%)*
<i>Philadelphus schrenckii</i> (고광나무)	leaf, stem	Saxifragaceae	8
<i>Platycarya strobilacea</i> (굴피나무)	Stem -cortex	Juglandaceae	0
<i>Prunus padus</i> (귀룽나무)	flower	Rosaceae	22
<i>Rhododendron micranthum</i> (꼬라진달래)	leaf, stem	Ericaceae	22
<i>Cardamine amaraeformis</i> (꽃황새냉이)	whole plant	Cruciferae	18
<i>Luzula capitata</i> (평의밥)	whole plant	Juncaceae	0
<i>Kirengeshoma koreana</i> (나도승마)	aerial part	Saxifragaceae	49
<i>Kirengeshoma koreana</i> (나도승마)	root	Saxifragaceae	20
<i>Viola dissecta</i> var. <i>chaerophylloides</i> (남산제비꽃)	whole plant	Violaceae	49
<i>Sambucus sieboldiana</i> (덧나무)	leaf	Caprifoliaceae	6
<i>Euphorbia helioscopia</i> (등대풀)	whole plant	Euphorbiaceae	20
<i>Sedum oryzifolium</i> (땅채송화)	whole plant	Crassulaceae	8
<i>Megaleranthis saniculifolia</i> (모데미풀)	whole plant	Ranunculaceae	30
<i>Abeliophyllum distichum</i> (미선나무)	whole plant	Oleaceae	26
<i>Taraxacum mongolicum</i> (민들레)	whole plant	Compositae	14
<i>Saxifraga stolonifera</i> (바위취)	whole plant	Saxifragaceae	22
<i>Tetragonia tetragonoides</i> (변행초)	whole plant	Aizoaceae	30
<i>Meehania urticifolia</i> (별깨덩굴)	whole plant	Labiatae	16
<i>Weigela subsessilis</i> (병꽃나무)	leaf, Stem	Caprifoliaceae	34
<i>Elaeagnus umbellata</i> (보리수나무)	leaf, Stem	Elaeagnaceae	40
<i>Adonis amurensis</i> (복수초)	whole plant	Ranunculaceae	10
<i>Hosta longipes</i> (비비추)	whole plant	Liliaceae	8
<i>Youngia japonica</i> (뿌리뱅이)	whole plant	Compositae	0
<i>Carpinus laxiflora</i> (서어나무)	leaf	Betulaceae	24
<i>Prunus buergeriana</i> (섬개벚나무)	leaf	Rosaceae	36
<i>Sedum takesimense</i> (섬기린초)	whole plant	Crassulaceae	0
<i>Acer takesimense</i> (섬단풍나무)	leaf, Stem	Aceraceae	24
<i>Equisetum hyemale</i> (속새)	whole plant	Equisetaceae	0
<i>Tsuga sieboldii</i> (솔송나무)	leaf	Pinaceae	30
<i>Hedera rhombea</i> (송악)	Stem	Araliaceae	34
<i>Rumex acetosa</i> (수영)	whole plant	Polygonaceae	30
<i>Alnus japonica</i> (오리나무)	leaf	Betulaceae	18
<i>Prunus yedoensis</i> (왕벚나무)	flower	Rosaceae	14
<i>Ardisia japonica</i> (자금우)	aerial part	Myrsinaceae	4
<i>Corydalis incisa</i> (자주괴물주머니)	whole plant	Fumariaceae	34
<i>Acanthopanax senticosus</i> (가시오갈피)	leaf, Stem	Araliaceae	10
<i>Erigeron annuus</i> (개망초)	whole plant	Compositae	20
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> (관중)	root	Aspidaceae	6
<i>Thalictrum rochebrunianum</i> (금평의다리)	aerial part	Ranunculaceae	8
<i>Glechoma hederacea</i> var. <i>longituba</i> (긴병꽃풀)	whole plant	Labiatae	20
<i>Pleuropterus cilinervis</i> (나도하수오)	whole plant	Polygonaceae	12
<i>Lonicera maackii</i> (괴불나무)	leaf	Caprifoliaceae	14
<i>Waldsteinia ternata</i> (나도양지꽃)	whole plant	Rosaceae	22
<i>Astilbe chinensis</i> var. <i>davidii</i> (노루오줌)	root	Saxifragaceae	60
<i>Acer palmatum</i> (단풍나무)	Stem -wood	Aceraceae	36

Table I. Continued

Natural plant samples	Parts	Family	Inhibition (%)*
<i>Caltha palustris</i> var. <i>membranacea</i> (동이나물)	whole plant	Ranunculaceae	12
<i>Styrax japonica</i> (때죽나무)	leaf	Styracaceae	4
<i>Cornus walteri</i> (말채나무)	leaf	Cornaceae	52
<i>Veratrum patulum</i> (박새)	aerial part	Liliaceae	0
<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetalis</i> (살갈퀴)	whole plant	Leguminosae	18
<i>Vitis flexuosa</i> (새머루)	Stem	Vitaceae	28
<i>Asperula odorata</i> (선갈퀴)	whole plant	Rubiaceae	20
<i>Prunus buergeriana</i> (섬개벚나무)	Stem -wood	Rosaceae	18
<i>Sorbaria sorbifolia</i> var. <i>stellipila</i> (쉬땅나무)	leaf	Rosaceae	28
<i>Caesalpinia japonica</i> (살거리나무)	leaf, Stem	Leguminosae	30
<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>ussuriense</i> (영정퀴)	root	Compositae	28
<i>Mallotus japonicus</i> (예덕나무)	leaf	Euphorbiaceae	32
<i>Idesia polycarpa</i> (이나무)	leaf	Flacourtiaceae	40
<i>Lonicera japonica</i> (인동)	whole plant	Caprifoliaceae	28
<i>Spiraea prunifolia</i> var. <i>simpliciflora</i> (조팝나무)	flower	Rosaceae	48
<i>Ixeris stolonifera</i> (좁쌀바귀)	whole plant	Compositae	8
<i>Styrax obassia</i> (쪽동백나무)	Stem -cortex	Styracaceae	18
<i>Angelica gigas</i> (참당귀)	whole cortex	Umbelliferae	26
<i>Euonymus oxyphyllus</i> (참회나무)	leaf	Celastraceae	41
<i>Arisaema amurense</i> var. <i>serratum</i> (천남성)	whole plant	Araceae	38
<i>Smilax china</i> (청미래덩굴)	Stem	Liliaceae	34
<i>Acer barbinerve</i> (청시닥나무)	leaf	Aceraceae	28
<i>Zanthoxylum piperitum</i> (초피나무)	Stem, leaf	Rutaceae	49
<i>Viola verecunda</i> (콩재비꽃)	whole plant	Violaceae	36
<i>Arisaema ringens</i> (큰천남성)	whole plant	Araceae	32
<i>Filipendula glaberrima</i> (터리풀)	root	Rosaceae	40
<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)	whole plant	Leguminosae	44
<i>Aconitum jaluense</i> (투구꽃)	whole plant	Ranunculaceae	10
<i>Chamaecyparis obtusa</i> (편백)	leaf	Cupressaceae	46
<i>Smilacina japonica</i> (풀썬대)	whole plant	Liliaceae	4
<i>Anemone koraiensis</i> (홀아비바람꽃)	whole plant	Ranunculaceae	0
<i>Galium spurium</i> (갈퀴덩굴)	whole plant	Rubiaceae	6
<i>Corydalis grandicalyx</i> (갈퀴현호색)	whole plant	Fumariaceae	2
<i>Matteuccia orientalis</i> (개면마)	whole plant	Aspidaceae	0
<i>Oxalis articulata</i> (덩이팽의밥)	whole plant	Oxalidaceae	22
<i>Hylomecon hylomeconoides</i> (매미꽃)	whole plant	Papaveraceae	0
<i>Magnolia kobus</i> (목련)	leaf	Magnoliaceae	32
<i>Euonymus trapococcus</i> (버들회나무)	leaf	Celastraceae	8
<i>Bistorta manshuriensis</i> (범꼬리)	whole plant	Polygonaceae	0
<i>Dryopteris lacera</i> (비늘고사리)	whole plant	Aspidaceae	24
<i>Epimedium koreanum</i> (삼지구엽초)	whole plant	Berberidaceae	0
<i>Cinnamomum japonicum</i> (상달나무)	leaf	Lauraceae	20
<i>Ophiopogon japonicus</i> (소엽맥문동)	whole plant	Liliaceae	16
<i>Maackia fauriei</i> (솔비나무)	stem -cortex	Leguminosae	42
<i>Evodia daniellii</i> (쉬나무)	Stem	Rutaceae	0

Table I. Continued

Natural plant samples	Parts	Family	Inhibition (%)*
<i>Schisandra chinensis</i> (오미자)	leaf, flower	Magnoliaceae	38
<i>Prunus pendula</i> for. <i>Ascendens</i> (올벚나무)	stem -cortex	Rosaceae	41
<i>Lonicera vidalii</i> (왕괴불나무)	leaf	Caprifoliaceae	4
<i>Akebia quinata</i> (으름)	leaf, Stem	Lardizabalaceae	24
<i>Convallaria keiskei</i> (은방울꽃)	whole plant	Liliaceae	18
<i>Kalopanax pictum</i> (음나무)	leaf	Araliaceae	4
<i>Campanula glomerata</i> var. <i>dahurica</i> (자주꽃방망이)	whole plant	Campanulaceae	0
<i>Vaccinium oldhami</i> (정금나무)	stem	Ericaceae	30
<i>Lespedeza maximowiczii</i> (조록싸리)	leaf, Stem	Leguminosae	36
<i>Lophatherum gracile</i> (조릿대풀)	whole plant	Gramineae	6
<i>Hosta minor</i> (좀비비추)	whole plant	Liliaceae	10
<i>Abelia tyaihyoni</i> (줄대강나무)	leaf, Stem	Caprifoliaceae	4
<i>Matteuccia struthiopteris</i> (청나래고사리)	whole plant	Aspidaceae	2
<i>Cornus controversa</i> (층층나무)	leaf	Cornaceae	16
<i>Veronica rotunda</i> var. <i>coreana</i> (큰산꼬리풀)	whole plant	Scrophulariaceae	0
<i>Disporum viridescens</i> (큰애기나리)	whole plant	Liliaceae	4
<i>Cryptotaenia japonica</i> (파드득나무)	whole plant	Umbelliferae	0
<i>Gleichenia japonica</i> (풀고사리)	aerial part	Gleicheniaceae	0
<i>Magnolia sieboldii</i> (함박꽃나무)	leaf	Magnoliaceae	34
<i>Meliosma oldhamii</i> (함다리나무)	stem -cortex	Sabiaceae	38
<i>Aconitum longecassidatum</i> (흰진범)	whole plant	Ranunculaceae	0
<i>Actinidia arguta</i> var. <i>platyphylla</i> (털다래)	Stem	Actinidiaceae	11
<i>Actaea asiatica</i> (노루삼)	whole plant	Ranunculaceae	12
<i>Clematis chiisanensis</i> (누른종덩굴)	aerial plant	Ranunculaceae	0
<i>Rhus succedanea</i> (검양옥나무)	leaf, Stem	Anacardiaceae	10
<i>Osmunda japonica</i> (고비)	whole plant	Osmundaceae	10
<i>Scutellaria indica</i> (글무꽃)	whole plant	Osmundaceae	36
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> (관중)	aerial plant	Aspidaceae	0
<i>Osmorhiza aristata</i> (긴사상자)	wholeplant	Umbelliferae	0
<i>Rhamnella franguloides</i> (까마귀베개)	steam	Rhamnaceae	4
<i>Stewartia koreana</i> (노각나무)	stem	Theaceae	22
<i>Pyrola japonica</i> (노루발풀)	whole plant	Pyrolaceae	0
<i>Symplocos chinensis</i> for. <i>Pilosa</i> (노린재나무)	stem	Symplocaceae	6
<i>Raphiolepis umbellata</i> (다정큼나무)	stem	Rosaceae	58
<i>Ilex macropoda</i> (대팻집나무)	leaf	Aquifoliaceae	8
<i>Camellia japonica</i> (동백나무)	fruit	Theaceae	40
<i>Sambucus williamsii</i> var. <i>coreana</i> (딱총나무)	stem	Caprifoliaceae	2
<i>Pourthiaea villosa</i> var. <i>brunnea</i> (떡윤노리)	leaf	Rosaceae	56
<i>Pourthiaea villosa</i> var. <i>brunnea</i> (떡윤노리)	stem	Rosaceae	44
<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i> (떡구슬나무)	stem -wood	Meliaceae	0
<i>Rubus idaeus</i> var. <i>microphullus</i> (떡덩말기)	whole plant	Rosaceae	4
<i>Ranunculus japonicus</i> (미나리아재비)	whole plant	Ranunculaceae	0
<i>Lepidium ruderae</i> (미륵냉이)	whole plant	Cruciferae	0
<i>Rubus coreanus</i> (복분자말기)	leaf, stem	Rosaceae	0
<i>Rhus chinensis</i> (붉나무)	stem	Anacardiaceae	6

Table I. Continued

Natural plant samples	Parts	Family	Inhibition (%)*
<i>Torilis japonica</i> (사상자)	whole plant	Umbelliferae	0
<i>Pyrus ussuriensis</i> (산돌배)	leaf	Rosaceae	52
<i>Paris verticillata</i> (삿갓나물)	whole plant	Liliaceae	0
<i>Sageretia theezans</i> (상동나무)	leaf, stem	Rhamnaceae	10
<i>Vitis flexuosa</i> (새머루)	leaf	Vitaceae	24
<i>Callicarpa mollis</i> (새비나무)	Stem	Verbenaceae	2
<i>Carpinus laxiflora</i> (서어나무)	stem -wood	Betulaceae	20
<i>Carpinus coreana</i> (소사나무)	leaf	Betulaceae	52
<i>Cytomium fortunei</i> (쇠고비)	root	Aspidaceae	48
<i>Lonicera coreana</i> (숫명다래나무)	leaf	Caprifoliaceae	14
<i>Ixeris dentata</i> (씀바귀)	whole plant	Compositae	8
<i>Acer micro-sieboldianum</i> (아기단풍)	stem	Aceraceae	24
<i>Pourthiaea villosa</i> (윤노리나무)	leaf, flower	Rosaceae	32
<i>Pseudosasa japonica</i> (이대)	leaf	Gramineae	34
<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)	stem	Leguminosae	24

\*Test samples were treated at final concentration of 100 µg/ml and the values were expressed as mean of duplication.

scintillation counter (1450 Microbeta Trilux, Wallac Oy, Turku, Finland)를 이용하여 1-*O*-hexadecyl-[acetyl-<sup>3</sup>H(N)]-phosphatidylcholine으로부터 생성된 [<sup>3</sup>H]acetate를 측정하였으며, 활성 저해도는 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

활성 저해도(%) =

$$100 \times \left[ 1 - \frac{\text{Sample (cpm)} - \text{Background (cpm)}}{\text{Control (cpm)} - \text{Background (cpm)}} \right]$$

### 결과 및 고찰

Lp-PLA<sub>2</sub>는 oxidized phospholipid를 가수분해하여 lyso-PC와 산화된 fatty acids를 생성하고, Lp-PLA<sub>2</sub>에 의해 생성된 lyso-PC는 단핵구를 intima 안으로 유입시켜 염증반응을 일으킴으로써 동맥경화의 초기단계를 진전시킨다. 따라서

본 실험에서는 동맥경화 예방 및 치료용 선도물질을 탐색하기 위하여 *in vitro* 상에서 사람 혈장으로부터 분리한 LDL을 효소원으로 사용하여 자생식물 224종의 methanol 추출물 (최종농도 100 µg/ml)에 대한 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해 활성을 검색하여 그 결과를 Table I에 요약하였다.

자생식물 추출물 시료 중 *Kadsura japonica* (잎), *Astilbe chinensis* var. *dauidii* (뿌리), *Cornus walteri* (잎), *Raphiolepis umbellata* (줄기), *Pourthiaea villosa* var. *brunnea* (잎), *Pyrus ussuriensis* (잎), *Cytomium fortunei* (뿌리) 등이 Lp-PLA<sub>2</sub>의 활성을 50% 이상 저해하였으며, 이 시료들에 대하여 활성물질의 용매 이행성을 조사하였다. 각각 선별된 자생식물의 methanol 추출물 소량(시료마다 무게 다름)을 *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc을 이용하여 순차적으로 분획하여 최종농도 100 µg/ml에서 *n*-hexane층, CHCl<sub>3</sub>층, EtOAc층, H<sub>2</sub>O층의 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해활성을 측정하여 Table II에 표시하

Table II. Inhibitory effects of solvent fractions on Lp-PLA<sub>2</sub>\*

Natural plant samples	Parts	Inhibition (%)			
		<i>n</i> -Hexane	CHCl <sub>3</sub>	EtOAc	H <sub>2</sub> O
<i>Kadsura japonica</i>	leaf	23	42	13	0
<i>Astilbe chinensis</i> var. <i>dauidii</i>	root	37	3	77	0
<i>Cornus walteri</i>	leaf	11	10	54	0
<i>Raphiolepis umbellata</i>	stem	6	32	59	0
<i>Pourthiaea villosa</i> var. <i>brunnea</i>	leaf	54	42	68	0
<i>Pyrus ussuriensis</i>	leaf	23	53	42	0
<i>Cytomium fortunei</i>	root	44	12	43	0

\*Test samples were treated at final concentration of 100 µg/ml and the values were expressed as mean of duplication.

**Table III.** Dry weights of solvent fractions of 7 natural plants

Natural plant samples	Parts	Dry weights of fraction (mg)			
		<i>n</i> -Hexane	CHCl <sub>3</sub>	EtOAc	H <sub>2</sub> O
<i>Kadsura japonica</i>	leaf	150	87	90	NM*
<i>Astilbe chinensis</i> var. <i> davidii</i>	root	55	5	242	NM
<i>Cornus walteri</i>	leaf	120	36	140	NM
<i>Raphiolepis umbellata</i>	stem	23	83	71	NM
<i>Pourthiaea villosa</i> var. <i> brunnea</i>	leaf	36	152	146	NM
<i>Pyrus ussuriensis</i>	leaf	28	14	53	NM
<i>Cytomium fortunei</i>	root	25	60	81	NM

\*NM; Not measured.

였고, 각 분획의 건조 무게를 측정하여 Table III에 표시하였다. *Kadsura japonica* (잎)는 CHCl<sub>3</sub> 분획으로 활성저해물질이 이행하였으며, *Astilbe chinensis* var.  *davidii* (뿌리), *Cornus walteri* (잎), *Raphiolepis umbellata* (줄기)는 EtOAc 분획으로 이행하였다. 이중 *Astilbe chinensis* var.  *davidii* (뿌리)은 물분획을 제외한 전체 건조 무게의 80%가 EtOAc 분획이었다. *Pourthiaea villosa* var.  *brunnea* (잎)는 *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc의 모든 분획이 각각 54%, 42%, 68%씩 저해활성을 나타냈고, *Pyrus ussuriensis* (잎)는 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc 분획으로, *Cytomium fortunei* (뿌리)는 *n*-hexane, EtOAc 분획으로 양분되어 이행하였다. 또한 선별된 7개의 자생식물 중 *Raphiolepis umbellata* (줄기), *Pourthiaea villosa* var.  *brunnea* (잎), *Pyrus ussuriensis* (잎)은 같은 장미과 식물에 속한다.

최근 Lp-PLA<sub>2</sub>가 관상심장질환의 발병에 있어서 독립적인 위험 요인임이 증명되었으며, 혈장 Lp-PLA<sub>2</sub>의 감소는 동맥벽의 지방산의 생성을 감소시킨다는 보고와 함께 Lp-PLA<sub>2</sub>는 동맥경화 예방 및 치료의 새로운 목표 단백질로 주목 받고 있다.<sup>16,19)</sup> SmithKline Beecham Pharmaceuticals이 *Pseudomonas fluorescens* DSM11579의 발효액으로부터 Lp-PLA<sub>2</sub>에 대해 강한 저해 활성을 나타내는 물질인 SB-253514와 그 analogues를 보고한 이후,<sup>20-22)</sup> GlaxoSmithKline에서 집중적으로 quantitative structure activity relationship (QSAR)을 통해 여러가지 유도체를 합성하여 *in vivo* 활성을 나타내는 물질인 SB-435495와 SB-408848을 개발하였으며,<sup>23)</sup> 현재 전임상을 거쳐 임상 1/2상이 진행 중이다. 따라서 천연자원으로부터 Lp-PLA<sub>2</sub> 활성 저해물질의 탐색 연구는 동맥경화를 억제하는 새로운 형태의 선도물질을 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 현재 앞에서 언급한 연구 결과를 바탕으로 Lp-PLA<sub>2</sub> 활성저해물질을 함유하는 자생식물로부터 활성 성분의 분리 및 구조규명 연구를 진행하고 있다.

## 결 론

동맥경화는 만성염증 질환의 일종으로, LDL 특히 ox-LDL은 동맥경화 초기 단계의 진전에 관여하며, LDL의 산화로 활성화된 Lp-PLA<sub>2</sub>에 의해 생성된 lyso-PC는 macrophage 축적과 연관된 만성 염증을 촉진하여 혈관질환의 진전을 가속화한다. 본 연구는 동맥경화의 예방, 치료제를 개발할 목적으로 224종의 자생식물을 이용하여 Lp-PLA<sub>2</sub>의 저해활성을 검색하였다. 그 결과 시료의 최종농도 100 µg/ml에서 7종의 식물자원을 선별하였으며, 이들에 대한 활성물질의 용매 이행성을 조사한 결과, *Astilbe chinensis*와 *Pourthiaea villosa* var.  *brunnea*의 EtOAc 분획이 최종농도 100 µg/ml에서 각각 77% 및 68%의 강한 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해 활성을 나타내어, 현재 활성성분의 분리 및 구조규명 연구가 진행되고 있다.

## 사 사

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 협동연구지원(KRF-2002-042-C00050)에 의하여 연구되었습니다.

## 인용문헌

1. Glass, C. K. and Witztum, J. L. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* **104**: 503-516.
2. Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**: 233-241.
3. Ross, R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**: 233-241.
4. Hurt-Camejo, E., Camejo, G., Peilot, H., Oorni, K. and Kovanen, P. Phospholipase A<sub>2</sub> in vascular disease. (2001) *Circ. Res.* **89**: 298-304.
5. Paramo, J. A., Beloqui, O. and Diez, J. (2001) Atherosclerosis: Is it time for a new name? *Circulation* **104**: e38.
6. James, S., Stuart, M. C., Ian, F., Christopher, G. I., Peter, W.



- M. and James, H. M. (1995) Prevention of coronary heart disease with prevention in men with hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **333**: 1301-1307.
7. Packard, C. J., O'Reilly, S. J., Caslake, M. J., McMahon, A. D., Ford, I., Cooney, J., Macphee, C. H., Suckling, K. E., Krishna, M., Wilkinson, F. E., Rumley, A. and Lowe, G. D. O. (2000) Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> as independent predictor of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1148-1155.
  8. Dada, N., Kim, N. W. and Wolfert, R. L. (2002) Lp-PLA<sub>2</sub>: an emerging biomarker of coronary heart disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2**: 17-22.
  9. Tew, D. G., Southan, C., Rice, S. Q., Lawrence, M. P., Li, H., Boyd, H. F., Moores, K., Gloger, I. S. and Macphee, C. H. (1996) Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 591-599.
  10. Macphee, C. H. (2001) Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>: a potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**: 121-125.
  11. Asano, K., Okamoto, S., Fukunaga, K., Shiomi, T., Mori, T., Iwata, M., Ikeda, Y. and Yamaguchi, K. (1999) Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**: 511-514.
  12. Prescott S. M., Zimmerman G. A., Stafforini D. M. and McIntyre T. M. (2000) Platelet activating factor and related lipid mediators. *Ann. Rev. Biochem.* **69**: 419-445.
  13. Macphee, C. H., Moores, K. E., Boyd, H. F., Dhanak, D., Ife, R. J., Leach, C. A., Leake, D. S., Milliner, K. J., Patterson, R. A., Suckling, K. E., Tew, D. G. and Hickey, D. M. (1999) Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem. J.* **338**: 479-487.
  14. Hakkinen, T., Luoma, J. S., Hiltunen, M. O., Macphee, C. H., Milliner, K. J., Patel, L., Rice, S. Q., Tew, D. G., Karkola, K. and Yla-Herttuala, S. (1999) Lipoprotein-associated PLA<sub>2</sub>, platelet-activating factor acetylhydrolase is expressed by macrophage in human and atherosclerotic lesion. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 2909-2917.
  15. Benson, G. M., Grimsditch, D., Milliner, K., Moores, K., Body, H., Tew, D., Hickey, D., Ife, R., Suckling, K., Macphee, C. (2000) Anti-atherosclerotic effect of SB-244323, a lipoprotein associated phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor, in WHHL rabbits. *Atherosclerosis* **151**: 166.
  16. Suckling, E. S. and Macphee, C. H. (2002) Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>: a target directed at the atherosclerotic plaque. *Expert Opin. Ther. Targets* **6**: 309-413.
  17. Boyd, H. F., Fell, S. C. M., Flynn, S. T., Hickey, D. M. B., Ife, R. J., Leach, C. A., Macphee, C. H., Milliner, K. J., Moores, K. E., Pinto, I. L., *et al.* (2000) N-1 substituted pyrimidine-4-ones: novel, orally active inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**: 2557-2561.
  18. Bligh E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 912-917.
  19. Caslake, M. J., Parkard, C. J., Suckling, K. E., Holmes, S. D., Chamberlain, R. and Macphee, C. H. (2000) Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>, platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* **150**: 413-419.
  20. Thirkettle, J., Alvarez, E., Boyd, H., Brown, M., Diez, E., Hueso, J., Elson, S., Fulston, M., Gershater, C., Morata, M. L., *et al.* (2000) SB-253514 and analogues; novel inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> produced by *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579. I. Fermentation of producing strain, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* **53**: 664-669.
  21. Busby, D. J., Copley, R. C., Hueso, J. A., Readshaw, S. A. and Rivera, A. (2000) SB-253514 and analogues: novel inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> produced by *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.* **53**: 670-676.
  22. Thirkettle, J. (2000) SB-253514 and analogues; novel inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> produced by *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579. III. Biotransformation using naringinase. *J. Antibiot.* **53**: 733-735.
  23. Blackie, J. A., Bloomer, J. C., Brown, M. J., Cheng, H. Y., Elliott, R. L., Hammond, B., Hickey, D. M., Ife, R. J., Leach, C. A., Lewis, V. A., *et al.* (2002) The discovery of SB-435495. A potent, orally active inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> for evaluation in man. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 2603-2606.

(2003년 2월 20일 접수)