

종대황 스틸벤 유도체의 Cyclooxygenase 저해작용

고성권* · 이충렬 · 이학성 · 김 현 · 백구현 · 토쿠오카 키요시¹ · 정성현²
중앙대학교 인삼산업연구센터, ¹대일본제약, ²경희대학교 약학대학

Inhibitory Effects of Stilbene Derivatives from *Rheum undulatum* on Cyclooxygenase Activity

Sung Kwon Ko*, Chung Ryul Lee, Hak Sung Lee, Hyun Kim, Koo Hyun Baek,
Kiyoshi Tokuoka¹, and Sung Hyun Chung²

Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

¹Dainippon Pharmaceutical CO., LTD., Osaka 541-0045, Japan

²School of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract – In order to clarify the anti-thrombosis activity of rhubarb, we investigated the effect of stilbene derivatives from rhizomes of *Rheum undulatum* on cyclooxygenase activity. Stilbene derivatives (desoxyrhapontigenin, rhapontigenin, piceatannol) exhibited the inhibitory effects on COX-1, and desoxyrhapontigenin showed inhibitory effect on COX-2. These inhibitory effect may partially contributed to anti-thrombosis activity of rhubarb.

Key words – Cyclooxygenase, *Rheum undulatum*, stilbene derivatives, desoxyrhapontigenin, rhapontigenin, piceatannol

대황은 동양의 대표적인 본초서인 『神農本草經』, 『名醫別錄』, 『本草綱目』, 『東醫寶鑑』에 어혈, 혈폐, 황달, 복통, 실열, 변폐 등이 효능으로 기술되어 있고 서양에도 고대 그리스의 의학자인 Dioscorides의 『De Materia Medica』에도 신경통, 천식, 변비 등이 효능으로 기록되어 있다. 동양과 서양의 의서에 명시된 효능을 현대의약학적으로 해석하면, 소염, 해열, 혈전, 진정, 변비, 하리 등에 사용하였던 한약으로 사료된다.¹⁾

한편, 대황의 주요한 한방처방으로, 大黃牡丹皮湯, 桃核承氣湯은 어혈, 염증에, 三黃瀉心湯, 大柴胡湯은 해열, 진정, 진통, 염증에, 大承氣湯은 변비에, 通導散은 어혈, 아토피성 피부염 등에, 현대임상에도 응용되어지고 있다. 따라서 대황은 오래 전부터 사하제 뿐만 아니라, 혈조어혈에 쓰던 중요한 한약임을 알 수 있다.²⁾

대황에 대한 지금까지의 약리학적인 연구로는 금문계 대황으로서 사하활성³⁾을 중심으로 질소대사 개선에 관한 연구,⁴⁾ 신 질환 개선에 관한 연구,⁵⁾ 항진통작용에 관한 연구⁶⁾ 등이

보고되어 있다. 또대황계 대황은 진경작용에 관한 연구,⁷⁾ 항종양작용에 관한 연구,⁸⁾ 항알러지, 항염증에 관한 연구,⁹⁾ 항보체활성에 관한 연구¹⁰⁾ 등이 보고되어 있다.

한편, 대황의 구어혈작용에 대한 연구로서 종대황 엑스와 대황 stilbene 유도체가 대조약물인 aspirin보다 저 농도에서 arachidonic acid 유발 혈소판응집을 강력히 억제¹¹⁾ 하였고, 항알러지 작용¹²⁾도 나타낸다고 보고하였다. 혈소판 응집을 유발한 arachidonic acid는 cyclooxygenase (COX)에 의해서 생체내 염증전달 반응에 중요한 역할을 하는 각종 프로스타글란딘과 혈소판 응집에 관여하는 thromboxane을 생성하는데, COX는 염증과정에서 일시적으로 발현이 증가하는 유도성 효소인 COX-2외에 정상조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하는 COX-1으로 나누어진다.

이상과 같이 대황 및 stilbene 유도체에 대한 여러 약리활성 연구가 실시되었으나, 구어혈작용에 대한 arachidonic acid 대사계에 대한 기전연구가 없음에 착안하여 대황의 구어혈작용에 대한 체계적인 약효 해명과 이를 통한 항혈전 신약개발을 위하여 COX 활성화에 대한 억제 활성 유무를 검토하고자 한다.

*교신저자(E-mail) : sungkwon@cau.ac.kr
(FAX) : 031-670-4683

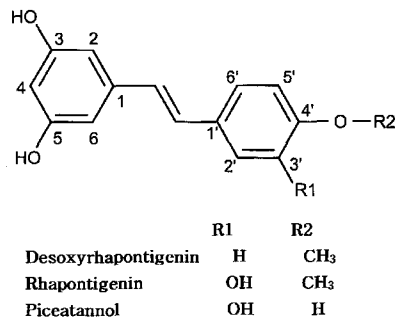


Fig. 1. Structures of stilbene derivatives from *Rheum undulatum*.

실험방법

실험재료 및 기기 - 종대황(*Rheum undulatum*)은 2001년 5월 경상북도 경산지방에서 재배하는 생대황 근경(표본번호 RU-1)을 채취하였고, 표본은 중앙대학교 인삼산업연구센터에 보관하였다. 시약은 Tris-HCl, EDTA, phenol, reduced glutathione, arachidonic acid를 사용하였고, 기기는 IR (Bruker IFS48 FT-IR), UV(Varian Cary-3 spectrophotometer), NMR(Varian, Gemini 2000, 300 MHz, Bruker AMX-500, 500 MHz spectrometer), Mass spectrometer(GC-MS/MS-DS, TSQ 700, Autospec Micromass mass spectrometer)를 사용하여 측정하였다.

엑스의 조제 및 성분분리 - 종대황의 건조 근경 500 g을 열수에 2시간씩 2회 반복 추출하고, 감압 농축후 동결 건조하여 수엑스 197 g을 얻었고(수율 39.4%), 수엑스를 Sephadex LH-20 column으로 chromatography를 실시, 용매 MeOH을 증량시키며 100% H₂O로부터 100% MeOH 순으로 용출시켜 fraction 1(82.5 g), 2(30. g), 3(8.0 g), 4(8.3 g)를 분획하였다. 얻어진 Fraction 4를 Silicagel column을 사용(전개용매, hexane : ethylacetate = 1 : 1)하여 스틸벤 유도체(desoxyrhapontigenin-0.22 g, rhapontigenin-1.48 g, piceatannol-0.12 g)를 분리하였고, 그 구조를 분광학적 방법(¹H-NMR, ¹³C-NMR, Mass, IR, UV)으로 확인 동정하였으며,¹³⁾ 그 화학구조는 Fig. 1에 표시하였다.

Cyclooxygenase 저해활성의 측정 - 효소원으로서, COX 발현세포(CHO/pKREX-19, CHO/pKREX-18)로부터 조제한 microsome 분획을 사용하였다. 효소반응은 assay buffer(100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5 mM phenol, 1 mM reduced glutathione)에 피검화합물을 가해 실온에서 5분간 preincubation 한 후 기질인 arachidonic acid (최종농도 10 μM)을 첨가하여 10분간 반응시켰다. 반응 종료 후 생성된 PGE₂량을 EIA(Enzyme Immuno Assay)의 방법으로 측정하였다.

Table I. Effects of stilbene derivatives from *Rheum undulatum* on cyclooxygenase activity

Samples	Conc. (μM)	Inhibition(%)	
		COX-1	COX-2
Desoxyrhapontigenin	10	83.2	31.0
Rhapontigenin	10	72.8	21.6
Piceatannol	10	62.3	19.9
Indomethacin	10	93.4	95.5
	1	87.3	74.2
	0.1	71.8	15.3
	0.01	30.8	-2.2

결과 및 고찰

대황의 구어혈작용에 대한 약효해명을 위하여 종대황 스틸벤 유도체의 건조 근경을 열수로 2시간씩 2회 반복 추출하고, 감압 농축 후 동결 건조하여 수엑스를 얻었고, 수엑스를 Sephadex LH-20 column으로 chromatography를 실시하여 분획하였다. 얻어진 분획중 스틸벤 비당체를 다량 함유한 분획을 Silicagel Column을 이용해서 스틸벤 유도체(desoxyrhapontigenin-0.22 g, rhapontigenin-1.48 g, piceatannol-0.12 g)를 분리하였다.

종대황으로부터 분리한 3종의 스틸벤 유도체를 대상으로 arachidonic acid 대사계에서 혈전을 유발하는 인자인 thromboxane을 산생시키는데, 관여하는 COX 활성에 미치는 영향을 효소원으로 사람 COX 발현세포(CHO/pKREX-19, CHO/pKREX-18)로부터 조제한 microsome 분획을 사용하여 검토하였다.

그 결과 COX-1에 대해서 desoxyrhapontigenin은 10 μM의 농도에서 83.2%의 저해율을 보여주었고, rhapontigenin은 동일 농도에서 72.8%, piceatannol은 동일 농도에서 62.3%의 저해율을 나타냈다. 또한, COX-2에 대해서는 desoxyrhapontigenin이 31%의 저해율을 나타내었다. 그러나 양성 대조약물인 indomethacin은 COX-1에 대해서 10 μM의 농도에서 93.4%, 1 μM의 농도에서 87.3%, 0.1 μM의 농도에서 71.8%, 0.01 μM의 농도에서 30.8%의 저해율을 나타내었고, COX-2에 대해서는 10 μM의 농도에서 95.5%, 1 μM의 농도에서 74.2%의 저해율을 나타내었다.

이와 같은 결과는 종대황 스틸벤 유도체가 cyclooxygenase를 저해하므로서 prostaglandin류와 thromboxane의 생성을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었으며, 특히, 혈전에 관여하는 COX-1을 강력하게 저해하므로서 항혈전작용에 깊이 관여하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 향후 *in vivo* 실험으로 endotoxin 유발 DIC(Disseminated Intravascular Coagulation) 실험 등의 항혈전실험을 실시하여 종대황 스

틸벤 유도체의 항혈전 작용을 체계적으로 확인할 필요가 있다고 사료되고, prostagrandin 류 및 thromboxane과 관련된 추가적인 연구를 통해서 항혈전, 항염증 신약개발의 기초 자료로 하고자 한다.

결 론

대황 스틸벤 유도체(desoxyrhapontigenin, rhapontigenin, piceatannol)는 COX-1을 효과적으로 억제한다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 대황의 구어혈작용의 약효 해명과 종대황 스틸벤 유도체의 항혈전작용의 일부분 기여하는 결과라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(과제고유번호 : 01-PJ2-PG3-21601-0012)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. 難波恒雄(1993) 和漢藥百科圖鑑(I), 16: 保育社 大阪.
2. 谿 忠人(1992) 漢方藥의藥能と藥理, 143: 南山堂 東京.
3. Miyamoto, M., Imai, S., Shinohara, M. and Fusioka, S. (1967) Studies on the purgative substance I, isolation of sennoside A, one of the most active principles from rhubarbs. *Yakugaku Zasshi* 87: 1040-1043.
4. Shibutani, S., Nagasawa, T. and Oura, H. (1980) Effect of rhubarb (*Rhei Rhizoma*) extract on urea nitrogen and amino acid metabolism after the administration. *Yakugaku Zasshi* 100: 434-442.
5. Yokozawa, T., Zheng, P. D. and Oura, H. (1983) Effect of extract from *Rhei Rhizoma* on adenine-induced renal failure in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 2762-2768.
6. Darias, V. (1987) Analgesic activity of some phenolic components in rhubarb. II *Farmaco* (Ed. Sci.) 33: 460-465.
7. Chandhari, M., Jain, G. K., Sarin, J. P. and Khanna, N. M. (1983) Spasmolytic principle from *Rheum webbianum*. *Indian Journal of Chemistry* 22: 1163-1164.
8. Ryu, S. Y., Choi, S. U., Lee, C. O., Lee, S. H., Ahn, J. W. and Zee, O. P. (1994) Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch. Pharm. Res.* 17: 42-44.
9. Kubo, M., Ko, S. K., Harima, S., Matsuda, H. and Kim, I. H. (1997) Study on anti-Oketsu activity of rhubarb I. Pharmacological efficacy of rhubarb (*Rheum undulatum* L.) cultivated in Korea. *Journal of Traditional Medicines* 14: 237-244.
10. Oh, S. R., Rhu, S. Y., Park, S. H., Jung, K. Y., Lee, I. S., An, K. S., Lee, J. J. and Lee, H. K. (1998) Anticomplementary activity of stilbenes from medicinal plants. *Arch. Pharm. Res.* 21: 703-706.
11. Ko, S. K., Lee, S. M. and Whang, W. K. Anti-platelet aggregation activity of stilbene derivatives from *Rheum undulatum*. *Arch. Pharm. Res.* 22: 401-403.
12. Matsuda, H., Tomohiro, N., Hiraba, K., Harima, S., Ko, S. K., Matsuo, K., Yoshikawa, M. and Kubo, M. Study on anti-Oketsu activity of Rhubarb II. Anti-allergic effects of stilbene components from *Rhei undulati Rhizoma*. (dried Rhizome of *Rheum undulatum* cultivated in Korea) *Biol. Pharm. Bull.* 24: 264-267.
13. Ko, S. K., Whang, W. K. and Kim, I. H. Stilbene compounds from cultivated Korean Rhubarb Rhizomes. *Yakhak Hoeji* 42: 1-4.

(2003년 1월 22일 접수)