

중국 약용식물의 혈소판 활성화인자 수용체 결합 억제활성

강 영 화*†

*경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Inhibitory Effects of Chinese Medicinal Plants on the Platelet-Activating Factor (PAF) Receptor Binding

Young Hwa Kang*†

*Division of Applied Life Science, College of Agricultural and Life Science, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk-dong, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea.

ABSTRACT : Methanolic extracts of fifteen Chinese medicinal plants were screened for platelet-activating factor (PAF) receptor binding inhibitory activity using rabbit platelet. *Campsis grandiflora*, *Dalbergia odorifera*, *Vaccaria segetalis* and *Zanthoxylum nitidum* showed significant inhibitory effects on the platelet-activating factor (PAF) receptor binding. *Campsis grandiflora*, *Dalbergia odorifera*, *Vaccaria segetalis* and *Zanthoxylum nitidum* inhibited 52%, 56%, 70%, and 66% respectively at the concentration of 0.2 mg/ml.

Key words : Platelet-Activating Factor (PAF) receptor binding inhibitory effects, Chinese medicinal plants

서 언

재료 및 방법

혈소판 활성화인자 (platelet activating factor, PAF)는 각종 면역관련 세포에서 과도한 면역반응시 분비되어 혈소판을 활성화시키고 다양한 세포내 생화학 반응을 개시하여 (Snyder *et al.*, 1985; Braquet *et al.*, 1987; Hanahan *et al.*, 1987) 혈소판 응집, 천식, 염증, 알러지, 장기이식에 대한 거부반응, 내독소에 의한 쇼크, 위궤양, 궤장염과 같은 병리적 반응에 깊이 관계하는 것으로 알려져 있다 (Vargaftig *et al.*, 1987; Curtis, 1996; Ito *et al.*, 1984; Hsueh *et al.*, 1986). PAF 길항제는 혈소판 활성화인자 수용체와 결합하여 위와 같은 여러 가지 병리적인 반응을 예방 및 치료할 수 있는 물질 (Koltai *et al.*, 1991)로서 천연물에서 유래한 대표적인 PAF길항제로는 은행잎에서 분리된 ginkgolide (Braquet *et al.*, 1985)가 있다.

새로운 PAF 길항제를 천연물에서 찾고자 하는 계속된 연구 (Han *et al.*, 1995; Jantan *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 2001)의 일환으로 소염, 청혈, 항어혈 등 PAF 관련 질환을 치료하는데 사용 되어온 중국 약용식물 15종에 대하여 PAF 결합 억제효과를 검색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

1. 시약 및 기기

[³H]PAF는 Amersham Co.에서, bovine serum albumin (Fraction V, 이하 BSA라 함)과 PAF (cold form, C16-PAF)는 Boehringer Mannheim Co.에서 구입하였다. 그 외 다른 시약은 특별한 언급이 없는 한 1급 시약 (EP)을 사용하였다. Centrifuge (RT 6000, Sorvall Co.), platelet counter (Chronolog Co., Model PLT-4), cell harvester (Skatron Co.), glass fiber filter (Skatron Co.), liquid scintillation counter (Hewlett Packard Co.) 등의 기기가 본 연구에서 사용되었다.

2. 실험재료

본 실험에 사용한 토끼는 체중 2-3 kg 되는 수컷 (White)을 사용하였다. 중국 연변 의학원에 계신 박호일 박사님께서 제공해 주신 15종의 약용식물의 메탄올 추출액을 약용식물 시료로 사용하였다. 약용식물의 메탄올 추출액은 70% 메탄올로 3시간, 3회 추출한 후 감압 농축하여 얻어진 것이다. 양성 대조군으로 은행잎의 메탄올 추출액이 사용되었다.

†Corresponding author: (Phone) +053-950-7752 (E-mail) youngh@knu.ac.kr
Received May 3, 2005 / Accepted July 31, 2005

3. 약용식물 검액 조제

실험 검액은 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹인 후 최종 용매의 농도가 0.2% DMSO 용액이 되도록 saline으로 희석하였다. 실험 검액의 농도는 최종 농도가 2 mg/10 ml 되도록 조절한 다음 실험에 사용하였다. 0.2% DMSO 용액을 대조군으로 사용하였고 예비 실험에 의해 수용체 결합 억제활성이 없음을 확인하였다.

4. PAF 수용체 결합 억제활성 측정

Valone의 방법 (Valone *et al.*, 1982)을 일부 변형하여 측정하였다. 실험절차를 간단하게 설명하면 다음과 같다. 토끼 심장으로부터 채혈한 후 1200 rpm에서 10분간 원심 분리하여 Platelet Rich Plasma (PRP)를 얻었다. PRP를 다시 10분간 3000 rpm에서 원심 분리하여 혈소판 pellet을 얻고, Tris-tyrode 완충액 (pH 7.3, 0.01M)을 가하여 섞은 후 다시 원심 분리하여 얻은 혈소판 pellet에 적당량의 완충액 (0.25% BSA 함유)을 가하여 platelet counter 기기를 이용하여 혈소판 농도를 측정하였다. 혈소판 농도를 2×10^8 cell/ml 이 되도록 Tris-tyrode 완충액으로 희석한 후 혈소판 현탁액으로 사용하였다. 실험 검액 25 μ l에 혈소판 현탁액 200 μ l 를 가한 후 6분간 preincubation 하고, ³H-PAF (60,000 dpm, 최종농도 0.6 nM)을 가하여 60분간 배양한 후 여과한 것을 total binding이라 하고, ³H-PAF 용액 대신 ³H-PAF 와 cold-PAF의 혼합용액 (최종농도 ³H-PAF 0.6 nM, cold-PAF 300 nM) 25 ml 를 가한 것을 nonspecific binding으로 하였다. Tris-tyrode 완충액 (pH 7.3, 0.01M)으로 여지 (GF/C glass fiber, Whatman)를 미리 적신 후 cell harvest (Skatron Co.)를 사용하여 감압 여과하고, ice-cold 완충액으로 여지를 세척하여 반응을 종료하였다. 사용한 여지는 상온에서 하룻밤 동안 방치하여 건조시킨 후 톨루엔계 카테일 용액 (PPO 4g, POPOP 0.1g in 1 L toluene)을 1 바이알 당 2 ml 씩 가하여 Liquid Scintillation Counter로 방사능을 측정하여 혈소판 막에 결합된 ³H-PAF의 양을 계산하였다. 모든 실험은 실온 (18-22 °C)에서 실시하였다. 검액에 의한 PAF 수용체 결합 억제율은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{Sc - Ss}{Sc} \times 100 = \frac{(Tc - Nc) - (Ts - Ns)}{Tc - Nc} \times 100$$

Sc = Specific binding of control

Ss = Specific binding of sample

Tc = Total binding of control

Ts = Total binding of sample

Nc = Nonspecific binding of control

Ns = Nonspecific binding of sample

Table 1. The list of Chinese medicinal plants used in this study

Scientific name	Chinese name	Family name	Part of use
<i>Achyranthes bidentata</i>	懷牛膝	Amaranthaceae	Root
<i>Arca granosa</i>	瓦楞子	Arcidae	Shell
<i>Artemisia anomala</i>	劉寄奴	Scrophulariaceae	Aerial part
<i>Campsis grandiflora</i>	金藤花	Bignoniaceae	Flower
<i>Dalbergia odorifera</i>	降真香	Leguminosae	Root
<i>Datura metel</i>	洋金花	Solanaceae	Leaf
<i>Drynaria fortunei</i>	骨碎補	Polypodiaceae	Rhizome
<i>Ginkgo biloba</i>	銀杏	Ginkgoaceae	Leaf
<i>Impatiens balsamina</i>	急性子	Balsaminaceae	Seed
<i>Leonurus heterophyllus</i>	充蔚子	Labiatae	Fruit
<i>Rosa chinensis</i>	月季花	Rosaceae	Flower
<i>Rhus verniciflua</i>	干漆	Anacardiaceae	Leaf
<i>Spatholobus suberectus</i>	鷄血藤	Leguminosae	Stem
<i>Stellera chamaejasme</i>	瑞香狼毒	Thymelaeaceae	Leaf
<i>Vaccaria segetalis</i>	王不留行	Caryophyllaceae	Seed
<i>Zanthoxylum nitidum</i>	兩面針	Rutaceae	Root

† : Positive control

결과 및 고찰

중국에서 류마티즘, 천식, 알러지 등 PAF 관련 질환을 치료하기 위해 전통적으로 사용 되어온 중국 약용식물 중 PAF 관련 연구가 되어있지 않은 15종의 약용식물을 선정하여 PAF 수용체 결합 억제 활성을 조사하였다 (Table 1). 최종농도 0.2 mg/ml에서 약용식물 시료의 활성을 검색한 결과 4종의 약용식물, *Campsis grandiflora*, *Dalbergia odorifera*, *Zanthoxylum nitidum*, *Vaccaria segetalis*이 50% 이상의 PAF 수용체 결합 억제 활성을 보여주었다 (Table 2). 특히 *Zanthoxylum nitidum*, *Vaccaria segetalis*이 66%, 70%의 강한 PAF 수용체 결합 저해활성을 보였다. *Spatholobus suberectus*을 포함하여 5종의 식물들이 40% 이상의 약한 PAF 수용체 결합 억제 활성을 보여주었다. 50% 이상의 PAF 수용체 결합 저해 활성을 보여주는 4종의 식물들에 대하여 10배 희석농도, 0.02 mg/ml에서 PAF 수용체 결합 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 4종의 식물, 모두 용량의존적인 저해활성을 보여주었다 (Fig. 1). 특히 *Vaccaria segetalis* 은 0.02 mg/ml의 농도에서도 51%의 강한 저해활성을 보여주었다.

Vaccaria segetalis (왕불류행)은 석죽과 (Caryophyllaceae)식물로 한방에서 청열해독, 제습이뇨, 활혈통경, 중이염, 인후통증, 진통, 자상, 피부염, 자궁출혈, 유방의 악성종기, 월경불순 등에 사용되고 있다. 다양한 질환에 사용되고 있음에도 불구하고 왕불류행의 활성에 대한 현대 과학적 규명은 미비한 실정이다. 왕불류행 추출물의 PAF 수용체 결합 저해활성은 왕불류행의 소염, 항어혈 등의 약리효과가 PAF의 불활성화와 관

Table 2. Inhibitory effects of the methanol extract of Chinese medicinal plants on the PAF receptor binding

Sample	% Inhibition [†]
<i>Achyranthes bidentata</i>	13
<i>Arca granosa</i>	45
<i>Artemisia anomala</i>	23
<i>Campsis grandiflora</i>	52
<i>Dalbergia odorifera</i>	56
<i>Datura metel</i>	33
<i>Drynaria fortunei</i>	35
<i>Ginkgo biloba</i> [‡]	85
<i>Impatiens balsamina</i>	41
<i>Leonurus heterophyllus</i>	44
<i>Rosa chinensis</i>	24
<i>Rhus vesiciflora</i>	45
<i>Spatholobus suberectus</i>	47
<i>Stellera chamaejasme</i>	34
<i>Vaccaria segetalis</i>	70
<i>Zanthoxylum nitidum</i>	66

† : Positive control, ‡ : Concentration: 0.2 mg/ml

련이 있음을 시사한다. 왕불류행의 주성분으로 melandrigenin, gypsogenin, quillaic acid, melandrioidside, gypsogenic acid, 20-hydroxyecdysone, segetoside C, vaccaroid A, dianoside G 등의 화합물이 분리 보고되었다 (Sang *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001).

Dalbergia odorifera (강진향)은 콩과 (Leguminosae)에 속하는 식물로 한방에서는 진통, 지혈, 소염 등의 목적으로 사용되고 있다. 주성분은 formononetin, medicarpin, butin, dalbergin 등의 flavonoids로 지금까지 23종 이상이 보고되었다 (Liu *et al.*, 2005). 강진향의 에탄올 추출물의 항산화 활성이 보고되었고 (Choi *et al.*, 2003) 항산화 성분으로 mucronulatol이 분리, 보고되었다 (Choi *et al.*, 2002). 또한 항암, 신생 (angiogenesis), 소염, 항알러지 등의 효능이 보고되었다 (Wang *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 1998).

Campsis grandiflora (금등화)는 건조한 꽃을 약재로 사용하며 양혈거풍 (涼血祛風), 자궁출혈, 무월경에 효능이 있다. 아직까지 약리작용 및 활성성분에 대한 연구가 미비한 상태로 Protein Kinase C 저해 활성성분으로 verbascoside가 분리 보고되었고 (Lee *et al.*, 1993), pentacyclic triterpenoids 화합물들이 혈소판 응집억제 성분으로 최근에 분리 보고되었다 (Yun-Choi *et al.*, 2004).

Zanthoxylum nitidu (양면침)은 운향과 (Rutaceae)식물로 천식, 어혈에 사용되고 있으나 활성 연구를 비롯하여 식물 성분 연구도 아직 미비한 실정이다. PAF 수용체 결합 억제 활성은 0.2 mg/ml의 농도에서는 66%로 강한 활성을 보여주었으나 0.02 mg/ml의 희박한 농도에서는 저해활성이 24%로 다른 식물과 비교할 때 활성이 급격히 저하되었다.

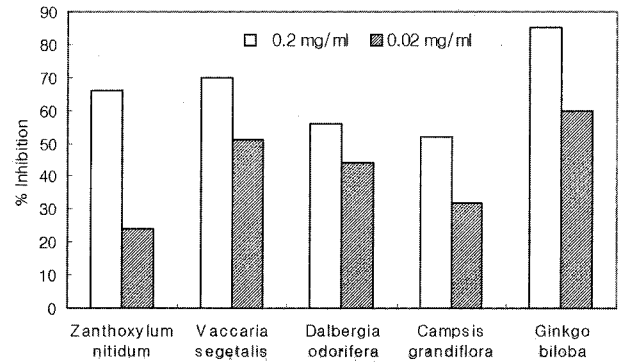


Fig. 1. Dose dependent inhibitory effects of four active plants. *Ginkgo biloba* was used as positive control.

저해활성을 보여주는 4종의 식물들 특히 강력한 저해 활성을 보여주는 왕불류행의 경우 활성성분 및 작용기전에 대한 연구가 필요하리라 사료된다. 금후 이들 식물유래 PAF 저해 활성 성분들에 대한 연구는 전통적으로 사용되어온 약용식물의 약리효과에 대한 과학적 근거를 제시할 수 있을 뿐만 아니라 새로운 혈액 순환 개선제, 항염증제 개발의 기초적인 자료를 제공할 수 있으리라 기대된다.

적 요

15종의 항어혈성 중국 약용식물의 추출물에 대하여 PAF 수용체 결합 억제활성을 검색한 결과 4종의 약용식물, *Campsis grandiflora*, *Dalbergia odorifera*, *Zanthoxylum nitidum*, *Vaccaria segetalis*에서 50% 이상의 강한 PAF 결합 저해 활성이 나타났다.

사 사

본 실험에 사용한 중국 약용식물의 추출물을 제공해 주신 중국 연변의학원 박호일 박사님께 감사드립니다. 본 연구 동안 많은 고언을 해주신 서울대학교 천연물과학연구소 한병훈 교수님께 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Braquet P, Spinnewyn B, Braquet, M Bourgain RH, Taylor JE, Etienne A, Drieu K (1985) BN 52021 and related compounds ; a new series of highly specific PAF-acether receptor antagonists isolated from *Ginkgo biloba*. Blood Vessel. 70:559-564.
- Braquet P, Tougui L, Shen TY, Vargaftig BB (1987) Perspectives in Platelet-activating Factor Research. Pharmacol. Rev. 39:97-145.
- Curtis LM (1996) Lexipafant (BB-882), a potent PAF antagonist in acute pancreatitis. Adv Exp Med Biol. 416:361-363.
- Fan GJ, Han BH, Kang YH, Park MK (2001) Evaluation of inhibitory potentials of Chinese medicinal plants on platelet-

- activating factor (PAF) receptor binding. Nat. Prod. Sci. 7:33-37.
- Han BH, Yang HO, Kang YH, Han YN** (1995) Screening of the inhibitory effect of herbal medicines on the platelet activating factor (PAF) binding: 35 selected herbal medicines based on folk medicinal informations. Kor. J. Pharmacogn. 39:10-13.
- Hanahan DJ** (1987) Platelet activating factor : A biologically active phosphoglyceride. Annu. Rev. Biochem. 55:483-509.
- Kim HK, Lee HW, Hwang SW, Ko BS** (2002) Quantitative Analysis of 20-Hydroxyecdysonein Melandrii Herba. Kor. J. Pharmacogn. 33:96-99.
- Hsueh W, Gonzalez CF, Arrovave JL** (1986) Platelet activating factor-induced ischemic bowel necrosis. Am. J. Pathol. 122: 231-239.
- Ito O, Camussi G, Tetta C, Milgrom F, Andres G** (1984) Hyperacute renalallograft rejection in the rabbit : the role of platelet-activating factor and of cationic proteins derived from polymorphonuclear leucocytes and from platelets. Lab. Invest. 51:148-161.
- Jantan IB, Kang YH, Suh DY, Han BH** (1996) Inhibitory effect of Malaysian medicinal plants on the platelet activating factor (PAF) binding. Nat. Prod. Sci. 2:86-89.
- Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P** (1991) Platelet activating factor (PAF). A review of its effects, antagonists, and possible future clinical implications (Part I). Drugs. 42:9-29.
- Lee HS, Park MS, Oh WK, Ahn SC, Kim BY, Kim HM, Oh GT, Mheen TI** (1993) Isolation and Biological Activity of Verbascoside, A Potent Inhibitor of Protein Kinase C from the Calyx of *Campsis grandiflora*. YAKHAK HOEJI 37:598-604.
- Liu R, Ye M, Guo H, Bi K, Guo A** (2005) Liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. Rapid Commun Mass Spectrum. 19:1557-1565.
- Sang S, Lao A, Wang H, Chen Z, Uzawa J, Fujimoto Y** (1999) Triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. Asian Nat Prod Res. 1:199-205.
- Snyder F** (1985) Chemical and biochemical aspects of platelet activating factor : a novel class of acetylated ether-linked choline phospholipids. Med. Res. Rev. 5 107-115.
- Choi U, Kim IW, Baek NI, Shin DH** (2002) Identification of Antioxidative Components from Ethanol Extracts of *Dalbergia odorifera* T, CHEN. Korean J. Food Sci. Technol. 34:893-897.
- Choi U, Kim IW, Shin DH** (2003) Antioxidative and Synergistic Effect of Ethanol Extracts from *Dalbergia odorifera* T. CHEN. Food Sci. Biotechnol. 12:72-78.
- Valone FH, Coles E, Reinhold VR, Goetzl EJ** (1982) Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets. J. Immunol. 129:1637-1641.
- Vargaftig BB, Braquet P** (1987) PAF-acether today : relevance for acute experimental anaphylaxis. Br. Med. Bull. 43:312-319.
- Wang S, Zheng Z, Weng Y, Yu Y, Zhang D, Fan W, Dai R, Hu Z** (2004) Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. Life Sci. 74:2467-2478
- Jin JL, Lee YY, Heo JE, Lee S, Kim JM, Yun-Choi HS** (2004) Anti-platelet pentacyclic triterpenoids from leaves of *Campsis grandiflora*. Arch Pharm Res. 27(4):376-380.