

생약 물 추출물의 혈소판 활성화 인자결합 억제효과 검색: 무작위로 선정한 국내 유통 생약

한병훈[#] · 양현옥 · 이승룡* · 조순현* · 고현정 · 한용남
서울대학교 천연물과학연구소, *일양약품 중앙연구소

(Received July 25, 1994)

Screening of the Inhibitory Effects of Herbal Medicines on the Platelet Activating Factor(PAF) Binding: Randomly Selected Herbal Medicines

Byung Hoon Han[#], Hyun Ok Yang, Seung Yong Lee*, Soon Hyun Cho*,
Hyun Jung Go and Yong Nam Han

Natural Products Research Institute Seoul National University, 28 Yeunkeun-dong, Jongno-ku, Seoul 110-460
*Central Institute of Ilyang Pharm. Co., Yongin-kun, Kyunggi-do 449-900 Korea

Abstract—As a continuation of the previous study, a second group of sixty two aqueous extracts (freeze dried) from natural products was screened for the inhibitory effect of platelet activating factor(PAF) binding to rabbit platelet using 0.6 nM [³H]PAF as a radioligand. The results demonstrated that three medicinal plants inhibited 40~50% of [³H]PAF equilibrium binding at the concentration of 200 µg/ml.

Keywords □ Platelet activating factor(PAF), *Curcuma zedoaria*, *Ephedra sinica*, *Toreya nucifera*

PAF(Platelet activating factor, 혈소판 활성화인자)는 1-O-alkyl-2-O-acetyl-glycerol-3-phosphorylcholine 으로서 IgE 면역반응시 basophil과 같은 leucocyte에서 분비되어 혈소판 막의 수용체에 결합하면 혈소판 응집을 일으키는 강력한 biomediator이다.¹⁾ PAF가 PAF 수용체에 결합하는 것을 방해하는 PAF-수용체결합 저해제는 염증,²⁾ 천식,³⁾ 심장질환,⁴⁾ 뇌혈전,⁵⁾ 알러지⁶⁾ 등과 관련하여 사용할 수 있는 약물이 될 가능성이 크다. 현재까지 CV-3988⁷⁾ 등과 같은 PAF의 구조 유사체들이 합성화학적 방법으로 다수 창출되었고, 또 천연물로부터 ginkgolide,⁸⁾ kadsurenone⁹⁾ 등이 분리 보고된 바 있다. 지금까지 밝혀진 천연물 유래의 PAF 길항제들은 화학구조상 공통점을 보이지 않음에도 불구하고 PAF 수용체에 대하여 특이적이면서 PAF와 상경적으로 결합한다. 이는 PAF 수용체의 결합부위가 flexible conformation을 가지고 있음을 뜻하고 또 다른 한편 천연물로부터 새로운

골격의 길항제를 발견할 가능성을 시사하고 있다. 따라서 저자 등은 천연물로 부터 강력한 PAF 수용체 결합 저해제를 찾기 위해 민간과 한방에서 각종 말초순환장애(류마티즘, 천식, 혈전증, 알러지성 질환 등)에 사용하고 있는 130가지 국내생약 물 추출물의 저해작용을 검색하여 그 결과를 보고한 바 있다.¹⁰⁾ 본 연구에서는 민간 및 한방에서의 용도와 PAF 결합 억제작용과의 관계에 관한 지견을 얻기 위하여 무작위로 선택한 62종 생약의 PAF 수용체 결합 억제 효과를 검색하였다.

실험방법

시약 및 기기

[³H]HPAF는 Amersham Co.에서, bovine serum albumin(Fraction V, 이하 BSA라 함)은 Boehringer Mannheim Co.에서, PAF(cold form, C₁₆-PAF), 2,2'-p-phenylene-bis(5-phenyloxazole) (이하 POPOP라

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

함), 2,5-diphenyloxazol(이하 PPO라 함)은 Sigma Co.에서 구입하였다. 그의 다른 시약은 특별한 언급이 없는 한 1급 시약(EP)을 사용하였다. 본 연구에 사용한 기기는 pH meter(Analab 88), centrifuge(RT 6000, Sorvall Co.), platelet counter(Chronolog Co., Model PLT-4), cell harvester(Skatron Co.), GF-C filter(Skatron Co., glass fiber), liquid scintillation counter(Hewlett Packard Co.), scintillation vial(Boehringer Mannheim Co., 6 ml) 등이다.

실험동물 및 생약 원료

토끼는 체중 2~3 kg 되는 수컷(White)을 사용하였으며, 본 실험에 사용한 모든 생약은 시중 한의원에서 구입한 건조 생약을 원료로 하였다. 검액의 조제는 각각의 건조 생약 100 g씩을 취하여 증류수 500 ml를 가하고 수욕상에서 5시간씩 2회 추출하여 식힌 후 동결 건조하여, 일정농도(200 µg/ml saline)로 실험에 사용하였다. 민간과 한방에서 약재로 사용하고 있는 생약¹¹⁾을 무작위로 62종 선택하여 그 억제효과를 검색하였다.

PAF결합 억제효과 측정

혈소판 현탁액의 조제—ACD 용액(trisodium citrate 2.5%, citric acid 1.37%, glucose 2%) 1 용량을 주사기에 미리 취한 후 토끼(2~3 kg, white, male)의 심장에서 혈액을 5 용량 취하여 섞은 후 1200 rpm에서 10분간 원심 분리하여 platelet rich plasma(이하 PRP라 한다)를 얻었다. PRP를 다시 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈소판 pellet을 모아, tris-tyrode buffer(pH 7.3, 0.01M)를 가하여 섞은 후 다시 원심 분리하여 얻은 혈소판 pellet에 적량의 buffer(0.25% BSA 함유)를 가하여 2×10^8 cell/ml이 되도록 희석하였다.

[³H]PAF 용액의 조제—[³H]PAF 일정량을 취하여 질소 기류로 용매를 제거한 후 완충액(0.01M tris-tyrode buffer, pH 7.3, 0.25% BSA) 일정량(최종농도 1.2 nM이 되도록)을 가하여 약 2분간 sonication 하였다.

[³H]PAF결합 실험 조건—Valone의 방법¹²⁾을 일부 변형하여 측정하였다.¹³⁾ 즉 total binding은 검액 25 µl에 혈소판 현탁액 200 µl를 가한 후 6분간 preincubation 하고, [³H]PAF(60,000 dpm, 최종농도 0.6

nM)를 가하여 60분간 배양한 후 여과하였다. Nonspecific binding은 [³H]PAF 용액 대신 [³H]PAF와 cold-PAF의 혼합(최종농도 [³H]PAF 0.6 nM, cold-PAF 300 nM) 25 µl를 가하였으며, control은 검액 대신 saline 25 µl를 사용하였다. 반응중단은 cell harvester를 사용하여 감압 여과하고, 여지(GF/C glass fiber)는 건조시킨 후 liquid scintillation counter로 방사능(dpm, corrected by external standard method)을 측정하여 혈소판막에 결합된 [³H]PAF의 양을 계산하였다. 모든 실험은 실온(18~22°C)에서 실시하였고, 모든 측정치는 4검체의 평균치로 표시하였다.

PAF 수용체에 결합된 specific binding은 다음 식에 의해 계산하였다.

Specific binding = Total binding - Nonspecific binding

또한 검체에 의한 PAF 수용체결합 저해율은 다음 식에 의하여 산출하였다.

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

* 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

결과 및 고찰

생약의 [³H]PAF 결합 억제효과

한방과 민간에서 사용되고 있는 생약을 무작위로 62종을 선택하여, 끓는 물로 추출하고 동결건조한 후 [³H]PAF(0.6 nM) 결합에 미치는 영향을 조사하여 Table I에 요약하였다.

제 1보의 결과¹⁰⁾와 Table I의 결과에서 보면, 전통적으로 PAF와 관련된 질환으로 보이는 증상들에 쓰여온 생약들 중에서, 실제로 PAF 수용체 결합 저해 작용이 높게 관찰 되었으며(130종 중 40% 이상 저해율을 보인 생약 39종, 30%),¹⁰⁾ 무작위로 선택한 생약 62종 중 40% 이상 저해율을 보인 생약 3종, 5%), 이는 PAF와 관련되어 나타나는 질환들과 이러한 질

Table I—Inhibition of receptor binding of [³H]PAF(0.6 nM) to rabbit platelet by the hot water extracts(freeze dried) of randomly selected Korean traditional medicines(62 species)

Sample	Part of plants used ^{a)}	% Inhibition ^{b), c)}
<i>Achyranthes japonica</i>	ra	—
<i>Acorus gramineus</i>	rh	—
<i>Alisma orientale</i>	rh	—
<i>Alpinia katsumadai</i>	sm	—
<i>Amomum kravanh</i>	sm	—
<i>Amomum tsaoko</i>	sm	10
<i>Ampelopsis japonica</i>	ra	—
<i>Angelica daurica</i>	rb	—
<i>Angelica gigas</i>	ra	—
<i>Angelica koreana</i>	rh	—
<i>Aralia cordata</i>	ra	—
<i>Bletilla striata</i>	ra	—
<i>Caragana sinica</i>	ra	—
<i>Celosia argentea</i>	sm	37
<i>Codonopsis pilosula</i>	ra	—
<i>Corydalis remota</i>	tu	—
<i>Curcuma zedoaria</i>	rh	41
<i>Cynanchum atratum</i>	ra	—
<i>Cynanchum wilfordii</i>	ra	—
<i>Dendrobium monile</i>	ap	—
<i>Dictamnus albus</i>	rb	13
<i>Dioscorea japonica</i>	rh	—
<i>Ephedra sinica</i>	ap	45
<i>Epimedium koreanum</i>	ap	—
<i>Equisetum hiemale</i>	ap	—
<i>Eriobotrya japonica</i>	lf	—
<i>Eucommia ulmoides</i>	sb	—
<i>Eugenia caryophyllata</i>	fl	—
<i>Gastrodia elata</i>	tu	—
<i>Houttuynia cordata</i>	ap	—
<i>Hydnocarpus anthelmintica</i>	sm	—
<i>Imperata cylindrica</i>	rh	—
<i>Inula helenium</i>	ra	—
<i>Kalopanax pictus</i>	sb	—
<i>Kochia scoparia</i>	fr	—
<i>Liriope platyphylla</i>	tu	—
<i>Melia azedarach</i>	sb, rb	10
<i>Mentha arvensis var piperascens</i>	lf	35
<i>Nardostachys chinensis</i>	rh	—
<i>Nelumbo nucifera</i>	sm	29
<i>Panax notoginseng</i>	ra	—
<i>Peucedanum japonicum</i>	ra	—
<i>Pinus densiflora</i>	rn	—
<i>Pinus koreaniensis</i>	rn	—
<i>Piper nigrum</i>	fr	—

Table I—Continued

Sample	Part of plants used ^{a)}	% Inhibition ^{b), c)}
<i>Piper officinarum</i>	fr	31
<i>Punica granatum</i>	sb, rb	—
<i>Pyrrosia lingua</i>	ap	—
<i>Quisqualis indica</i>	fr	—
<i>Raphanus sativus var acanthiformis</i>	sm	21
<i>Rubus coreanus</i>	fr	—
<i>Sanguisorba officinalis</i>	ra	—
<i>Schizandra chinensis</i>	fr	31
<i>Sophora japonica</i>	fl	—
<i>Sorbus commixta</i>	fr	15
<i>Tetrapanax papyriferus</i>	rh	—
<i>Toreya nucifera</i>	sm	49
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	ra	26
<i>Tussilago forfora</i>	fl	—
<i>Ulmus davidiana var japonica</i>	sb	—
<i>Veronicastrum sibiricum</i>	ra	—
<i>Vitex rotundifolia</i>	fr	—

a) ap, aerial parts; ba, bark; fl, flower; fr, fruit; lf, leaves; ra, radix; rb, root bark; rh, rhizome; rn, resin; sc, sclerotium; sm, seeds; tu, tuber; sb, stem bark

b) Concentrations: 200 µg/ml

c) —: less than 10%

환들에 쓰여온 전통약물의 치료효과와의 연관성을 잘 나타내주며, 이로써 PAF 길항제를 찾는 데 있어서 한방 및 민간에서의 정보가 매우 유효하므로 PAF 길항제 연구는 천연물에서 출발하는 것이 바람직함을 뒷받침해 준다.

결 론

총 62가지 생약을 물로 추출한 후 동결건조하여 [³H]PAF(0.6 nM) 결합 억제 작용을 검색한 결과 200 µg/ml에서 40% 이상 활성을 나타내는 생약은 *Curcuma zedoria*, *Ephedra sinica*, *Toreya nucifera* 였으며 이들 생약들에 대하여 PAF 결합 저해 성분연구가 필요하리라 생각된다.

감사의 말씀

본 실험에 사용한 모든 생약을 검정해 주신 서울대학교 천연물과학연구소 지형준 교수님께 감사드립니다. 또한, 본 연구는 포항공대 생리분자 과학연구센터(CBM 92-17)의 연구비에 의하여 진행되었기에

이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) Benveniste, J., Henson, P. M. and Cochrane, C. G.: Leucocyte dependent histamine release from rabbit platelets: The role of IgE, basophils and a platelet activating factor. *J. Exp. Med.* **136**, 1356 (1972).
- 2) Braquet, P., Tougui, L., Shen, T. Y. and Vargaftig B. B.: Perspectives in Platelet-activating Factor Research. *Pharmacol. Rev.* **39**, 97 (1987).
- 3) Vargaftig, B. B. and Braquet, P.: PAF-acether today: relevance for acute experimental anaphylaxis. *Br. Med. Bull.* **43**, 312 (1987).
- 4) Barnes, J., Hellegouarch, A., Le Hegarat, M., Vioissat, I., Auguet, M., Chabrier, P. E., Clostre, F. and Braquet P.: The effects of PAF-acether on the cardiovascular system and their inhibition by a new highly specific PAF-acether receptor antagonist BN 52021. *Pharmacol. Res. Commun.* **18**, 717 (1986).

- 5) Klopogge, E., De Haas, G. H., Gorter, G., and Akkerman, J. W. N.: Stimulus-response coupling in human platelets. Evidence against a role of PAF-acether in the "Third Pathway." *Thrombo. Res.* **30**, 107 (1983).
- 6) Maller, A. T. and Cunningham, F. M.: Structural identification of platelet activating factor in psoriatic scale. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 192 (1985).
- 7) Terashita, Z., Tsushima, S., Yoshioka, Y., Nomura, H., Inada, Y. and Nishikawa, K.: CV3988-a specific antagonist of platelet activating factor(PAF). *Life Sci.* **32**, 1975 (1983).
- 8) Braquet, P., Spinnewyn, B., Braquet, M., Bourgain, R. H., Taylor, J. E., Etienne, A. and Drieu, K.: BN 52021 and related compounds; a new series of highly specific PAF-acether receptor antagonists isolated from *Ginkgo biloba*. *Blood Vessel* **16**, 559 (1985).
- 9) Shen, T. Y., Hwang, S. B., Chang, M. N., Doebber, T. W., Lam, M. H., Wu, M. S., Wang, X., Han, G. Q. and Li, R. Z.: Characterization of a platelet activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng(Piper futokadsura): specific inhibition on *in vitro* and *in vivo* platelet-activating factor-induced effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 672 (1985).
- 10) 한병훈, 양현옥, 김용철, 한용남: 생약의 물추출물에 대한 혈소판 활성화인자 수용체결합 저해활성 검색, 약학회지, **38**, 462 (1994).
- 11) 육창수: 한국 약품식물 자원도감, 진명출판사, 서울, p. 19 (1988).
- 12) Valone, F. H., Coles, E., Reinhold, V. R. and Goetzel, E. J.: Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets. *J. Immunol.* **129**, 1637 (1982).
- 13) Klopogge, E. and Akkerman, N.: Binding kinetics of PAF-acether(1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) to intact human platelets. *Biochem. J.* **223**, 901 (1984).