

## 갈근에서 분리된 leukotriene D4 길항작용의 항천식제 후보물질

박관하<sup>1</sup> · 고동수<sup>2</sup> · 임용호\*

건국대학교 응용생물화학과, <sup>1</sup>군산대학교 해양생명의학과,  
<sup>2</sup>동덕여자대학교 응용화학과

(2000년 12월 3일 접수, 2001년 1월 19일 수리)

**Key words:** 갈근, LTD4, 항천식, diadzein

과도한 항원-항체반응의 결과 발생하는 천식은 기관지 수축과 염증반응이 중요한 증상이다.<sup>1)</sup> 1997년 3400만 명의 천식환자가 있는 것으로 보고되었고 천식치료제 시장은 36억 달러에 달하는 것으로 알려져 있다. 산업화에 의한 각종 공해로 인해 천식이 증가하고 있고, 유전적 요소에 의해서도 알려지성 천식이 나타나기 때문에 매년 12%의 천식치료제 시장이 증가하고 있어서 2007년에는 4000만 명의 천식환자와 89억 달러의 치료제 시장이 예측되고 있다. 기존에 알려진 천식치료제로는 phosphodiesterase inhibitors, muscarinic receptor antagonists, beta2 adrenoceptor agonists, corticosteroids 등이 널리 사용되는데 이들은 부분적인 질환에만 작용할 뿐만 아니라 부작용도 있어서 새로운 천식치료제의 대두가 필요하였다. 그 결과 mast cell로부터 유리되는 매개물질 중 하나인 leukotriene D4 (LTD4) antagonists가 후보로 관심을 받게되었다.<sup>2,4)</sup> 이와 같은 화합물 중 하나인 Zeneca사의 알클레이트가 개발되어 1996년부터 발매가 되었는데 이 약품은 기존의 천식치료제로 효과가 없던 천식 환자에게도 효과가 있을 뿐만 아니라, 천식의 발작을 일으키는 LTD4의 활동을 저해하기 때문에 25년 만에 새로운 천식치료의 장을 열 것으로 기대되고 있다.<sup>5)</sup>

본 연구에서는 천식치료제 개발을 위한 LTD4 antagonists를 찾기 위하여 고등식물로부터 활성물질을 탐색하던 중, 한방에서 갈근으로 불리는 칩(*Puerariae radix*) 뿌리로부터 항천식물질을 찾게되었다. 갈근은 해열, 발한, 진경약으로 사용되고 있을 뿐으로 천식에 대한 효과는 알려진 바 없다.<sup>6)</sup> 본 연구자들은 갈근의 methanol 추출물로부터 항천식 효과를 발견하였고, 약효에 따른 분리를 더 진행하여 갈근이 함유하고 있는 약효물질을 규명하였다. 이 물질은 isoflavonoid의 일종으로 기존에 알려진 화합물이기는 하나 항천식 효과를 갖고 있음이 보고된 바 없기 때문에 여기에 그 결과를 보고하고자 한다.

추출, 분리 및 정제에 사용한 methanol, ether, ethylacetate는 Aldrich사(Sheboygan, USA)의 시약급으로 구입한 그대로 사용하였으며, column chromatography에 사용한 Silica Gel은 Merck사(Whitehouse Station, USA)의 230-400 mesh, 60Å를

사용하였다. Prep-HPLC는 Gilson 118UV/VIS detector, Gilson 306 dual piston pump system, Gilson FC 205 Fraction collector, Rheodyne 500  $\mu$ l loop injector이었고, column은 Vydac protein & peptide C18(22 mm $\times$ 25 cm)을 사용하였다. Prep-HPLC에 사용한 이동상 용매는 Burdick & Jackson사(Muskegon, USA)의 HPLC용 용매였다. 약효물질의 구조규명을 위해 사용한 핵자기공명분광기는 Bruker DPX 400(9.4T)였고, 5 mm dual probe를 사용하였다. 핵자기공명분광법을 위해 사용한 용매는 Merck사의 99.9% 순도를 가진 DMSO-d<sub>6</sub>였다. 자외선분광기는 Shimadzu사(Yokohama, Japan)의 UV-1601PC였고, centrifuge는 Megafuge Heraeus사(Duluth, USA) 기기였다. 실험에 사용된 guinea pig은 군산대학교 해양생명의학과에서 사육하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 갈근은 1997년 서울소재 경동시장에서 한국산을 구입하여 사용하였다. 시료 600 g을 ether로 추출한 후 methanol로 재추출하였다. 추출액을 polyamide column chromatography(Celite 545)를 통과시킨 후 통과액을 ethylacetate로 층분리하였다. 상층액을 감압증류하였다. 건조된 분획을 methanol-water(40:60) 용매에서 prep-HPLC로 분리하였다. 이 때 분리된 분획 중 약효물질로 판명된 PR2를 동결건조하여 3 mg 얻었다. 동결건조되어 분말형태인 시료를 수용액층은 생리식염수에, 그 외의 추출분획은 DMSO에 현탁하여 사용하였다. Guinea pig 암컷을 희생시킨 후 기관지를 분리하였다. 분리된 기관지를 작은 개환 ring으로 잘라서 2개를 surgical thread로 일렬로 연결하고 Krebs-Henseleit buffer(pH 7.4)가 든 organ bath에 현수하였다. Bath 내는 37°C로 유지하고, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>를 연속적으로 공급하여 포화시킨 상태에서 시험하였다. Organ bath에 LTD4를 5 nM의 농도로 가해 수축시키고, 안정화된 수축작용이 안정화된 후, 이를 시험물질이 이완시키는 정도를 구하였다. 수축의 변화는 isometric transducer로 측정하여 physiography로 기록하였다. Krebs-Henseleit 완충용액에 cyclooxygenase 저해제인 indomethacin을 5  $\mu$ M의 농도로 가해 cyclooxygenase 대사반응물의 영향을 배제하였다. 또한 시험 중 LTD4의 organ bath 내에서의 파괴를 방지하기 위해 L-cysteine을 3 mM의 농도로 bath 내에 함유시켰다. PR2의 구조 결정을 위해서 수소핵자기공명분광법(<sup>1</sup>H-NMR), 탄소핵자기공명분광법(<sup>13</sup>C-NMR), COSY (COrelation Spectroscopy),<sup>7)</sup> HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence),<sup>8)</sup> DEPT (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)<sup>9)</sup>의 5가지 실험을 수행하였다.

갈근 분획의 약효 시험 결과는 Table 1과 같으며, prep-HPLC 분획 중 PR2가 약효를 보이는 단일물질로 판명되었다.

PR2의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 15개의 peaks을 보여주는데 DEPT 실험으로부터 methine group이 8개, quaternary group이 7개로 밝혀졌다. 또한 <sup>13</sup>C-NMR 15개의 peaks이 모두 100 ppm에서 190 ppm 사이에 위치한다는 사실과, <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 proton peaks이 6.5 ppm에서 8.5 ppm 사이에 위치한다는 사실로부터 flavone의 일종임을 예측할 수 있었다. 이 사실은 COSY 및 HMQC 실험 결과와도 잘 일치하였다.

\*연락처

Phone : 82-2-450-3760, Fax : 82-2-453-3761

E-mail : yoongho@konkuk.ac.kr

**Table 1. Anti-LTD4 effects of fractions separated from *Puerariae radix* in isolated guinea pig trachea**

Fractions	n	% relaxation with 1 mg/ml conc., mean±SE	Remarks	
methanol extract	5	6.8±0.3	effective	
2nd separation of column chromatography	1	1.7±0.2	effective	
	2	6.7±1.0		
3rd separation of ethylacetate	upper fraction	5	7.7±0.2	effective
	lower fraction	5	2.8±0.6	
4th separation of prep-LC	PR1	5	5.7±2.0	effective
	PR2	5	10.5±2.4	
	PR3	5	2.2±0.4	
	PR4	5	3.1±1.9	

Data expressed in mean±sem of n determinations.

Agrawal과 Markham의 저서<sup>10)</sup>에 나타난 flavone의 NMR data와 비교한 결과 isoflavone의 일종이라고 판단되었고, Dictionary of Natural Products(Chapman & Hall)<sup>11)</sup>로부터 본 실험에서 얻은 자료와 일치하는 화합물을 검색한 결과 diadzein으로 밝혀졌다.

따라서 본 저자들은 갈근으로부터 분리한 물질은 이미 알려진 화합물일 뿐만 아니라 Table 1에서 보여준 바와 같이 그 약효가 뛰어난 것도 아니어서 항천식 치료를 위한 신약 후보물질로서는 부적합하다고 판단하였다. 그러나 diadzein이 LTD4 antagonist로서 항천식 효과가 있다고 알려진 사례는 없기 때문에 본 연구결과를 보고하는 바이다.

### 참고문헌

- Thomson, N. (1998) Asthma therapy: Theophylline. *Can. Respir. J.* **5** (Suppl A), 60A-63A.
- Simon, M., Houser, W., Smith, K. and Long, P. (1997) Esophageal candidiasis as a complication of inhaled corticosteroids. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **79**, 333-338.
- Goldberg, S., Algur, N., Levi, M., Brukheimer, E., Hirsch, H., Branski, D. and Kerem, E. (1996) Adrenal suppression among asthmatic children receiving chronic therapy with inhaled corticosteroid with and without spacer device. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **76**, 234-238.
- Akkoca, O., Mungan, D., Karabiyikoglu, G. and Misirligil, Z. (1999) Inhaled and systemic corticosteroid therapies: Do they contribute to inspiratory muscle weakness in asthma? *Respiration* **66**, 332-337.
- Shaw, A. and Krell, R. D. (1991) Peptide leukotrienes: Current status of research. *J. Med. Chem.* **34**, 1236-1242.
- Han, D. (1995) In *Pharmacognogy*, 7th ed., DongMyungSa, Seoul.
- Bax, A. and Freeman, R. (1981) A simple method for suppressing dispersion-mode contributions in nmr spectra: the "pseudo echo". *J. Magn. Reson.* **43**, 333-338.
- Bax, A., Griffey, R. and Hawkins, B. (1983) Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum nmr. *J. Magn. Reson.* **55**, 301-315.
- Dodrell, D. M., Pegg, D. and Bendall, M. (1982) Distortionless enhancement of nmr signals by polarization transfer. *J. Magn. Reson.* **48**, 323-327.
- Agrawal, P. K. and Markham, K. R. (1989) In *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, edited by P. K. Agrawal, Ch.1. Elsevier, Amsterdam.
- Dictionary of Natural Products on CD-ROM. (1997) Chapman & Hall. London. U.K.

#### Anti-asthmatic Compound with Leukotriene D4 Antagonism Isolated from *Puerariae radix*

Kwanha Park<sup>1</sup>, Dongsoo Koh<sup>2</sup> and Yoongho Lim\*(*Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea; <sup>1</sup>Department of Marine Biomedical Sciences, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea; <sup>2</sup>Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea*)

Key words : *Puerariae radix*, LTD4, anti-asthma, diadzein

\*Corresponding author