

황금의 Bradykinin 길항작용

정성현 · 최진재 · 유경숙* · 윤혜숙*
경희대학교 약학대학 · 서울대학교 생약연구소

Bradykinin Antagonistic Activities of Scutellariae Radix

Sung Hyun Chung, Jin Jae Choi, Kyung Sook Yoo* and Hye Sook Yun-Choi*
College of Pharmacy, Kyunghee University, Seoul 130-701 and
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460*, Korea

Abstract—Ether-soluble flavonoid and neutral fraction (Fr. C) prepared from EtOAc extract of Scutellariae Radix showed inhibitory activities against bradykinin (BK); inhibited BK-induced ileum or uterus contractions, antagonized BK-induced plasma extravasation and protected mice from endotoxic shock, reduced acetic acid-induced writhing in mice.

Keywords—Bradykinin · antagonistic effects · Scutellariae Radix

Bradykinin(BK)은 혈관확장, 동통유발, 모세혈관 투과성 항진작용 등의 강력한 생체작용을 갖는 autacoid로서, 따라서 여러가지 shock 증상, 여러가지 염증성 질환, allergy 반응, 류마치스성 질환 및 여러가지 동통유발 현상의 발현에 관여한다.^{1,2)}

BK는 활성화된 kallikrein이 혈액 및 조직에 널리 분포되어 있는 kininogen에 작용함으로 유리되는 nonapeptide로서 그 아미노산의 순서는 1960년 이미 밝혀졌으며³⁾ BK에 대하여 길항작용을 갖는 물질의 탐색이 계속되어 왔다.

근래 Vevrek와 Stewart⁴⁾에 의하여 BK에 대하여 선택적인 길항작용을 갖는 BK의 유도체들이 처음으로 합성됨으로서 BK의 작용기전에 관한 연구 등이 활발히 진행되고 있다. 또한 BK 길항작용 물질들이 새로운 작용기전을 갖는 항염제, 진통제, 항 allergy성 비염 치료제 또는 감기의 증상상 치료제 등으로 개발될 가능성이 높음이 강력히 제시되고 있다.⁵⁻⁷⁾

이제까지 알려진 BK 길항작용 물질로서는 BK

의 유도체들인 peptide들이 대부분이며^{2,4,5)} 비peptide성 BK 길항작용 물질로서는 imipramine,⁸⁾ Vit. K 등이⁹⁾ 미약하며 비 선택적인 억제작용을 갖음이 보고되었고 최근 브라질산 식물로부터 BK 억제작용을 갖는 terpenoid성 물질이¹⁰⁾ 분리되었다는 보고가 있을 뿐이다. 그러나 peptide성 길항작용 유도체들은 생체내에서 쉽게 분해됨으로서 BK의 작용기전 연구에 이용하거나 새로운 치료약물로서 개발함에 여러가지 제약점이 되고 있어 비peptide성 BK 길항작용 물질이 절실이 요구되고 있다.

본 연구자 등은 한방 및 민간에서 자주 사용되어 온 생약 25종에 대하여 BK, angiotensin, 또는 acetylcholine 등의 autacoid에 대하여 길항작용을 갖는가를 검색하여 보고한 바 있으며¹¹⁾ 이들중 BK에 대하여 선택적인 억제작용을 보인 황금으로부터 작용성분 분획을 분리하고 몇 가지 실험동물 모델에서 작용을 검색하여 보고하는 바이다.

실험 방법

실험재료—본 연구에 사용한 황금(*Scutellariae Radix*)은 국내 재배품을 한약재료상으로 부터 구입하였으며 서울대학교 생약연구소 지형준 교수로부터 *Scutellariae baicalensis* Georgi의 근경으로서 감정받아 사용하였다.

실험동물 및 시약—체중 20~30 g의 dd계 웅성 마우스와 체중 180~220 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 실험동물로서 사용하였다. Bradykinin acetate salt와 lipopolysaccharide는 미국 Sigma Chem. Co., Evan's blue는 스위스의 Fluka Chemie AG 제품을 구입하여 사용하였으며 captopril은 보령제약으로 부터 기증받아 사용하였다.

황금의 추출 및 분획—황금 200 g을 EtOAc로 6시간씩 3회 환류시키면서 추출, 여과한 후 감압증류하여 EtOAc 추출물을 얻고 이를 적출회장에서의 BK 길항작용을 추적하면서 분획하였으며 분획과정을 Scheme 1에 정리하였다.

적출회장 수축작용—체중 150~250 g의 수컷 흰쥐로부터 상법에 따라 회장을 적출하여 $36 \pm 1^\circ$ 의 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스를 통한 modified Krebs' solution (10 ml)에 suspend 시키고 kymograph에 연결하였으며 30분~1시간 휴식시켜 안정시킨 후 실험하였다. 검체시료를 가한후 1분후에 BK (50 ng/ml)를 가하여 검체시료가 BK에 의한 장관수축에 길항작용을 갖는가를 관찰하였다.

적출자궁 수축작용—체중 150~200 g의 암컷 흰쥐에 diethylstilbesterol (DES, 0.1 mg/ml EtOH/kg)을 피하주사하고 24시간 후 상법에 따라 회생시켜 자궁을 적출하고 95% O₂와 5% CO₂ 혼합가스를 통한 $31 \pm 1^\circ$ 의 De Jalon's soln.에 suspend 시키고 앞의 적출회장을 이용한 실험에서와 같이 실험하였다.

모세혈관 투과성 검색—마우스에 검체시료를 1일 1회 2일간 경구투여하고 Miles and Miles의 방법에 준하여 실험하였다.^{12,13)} 즉 검체의 2회 투여 60분후 Evan's blue (10 mg/10 ml/kg)을 꼬리정맥에 주사하고 5분후 BK (2 mg/10 ml) 100 μ l를 등피에 내피주사하여 혈관투과성을 증가시켰

다. 60분후 등피를 제거하여 청색으로 착색된 부분의 직경을 측정하였다.

초산에 의한 Writhing 증상—마우스에 검체를 1일 1회 2일간 경구투여한후 Koster 등의 방법에 준하여 0.7% 초산-생리식염수액 10 ml/kg을 복강내에 주사하고 10분후 부터 10분간 writhing 증상의 발생수를 계수하였다.¹⁴⁾

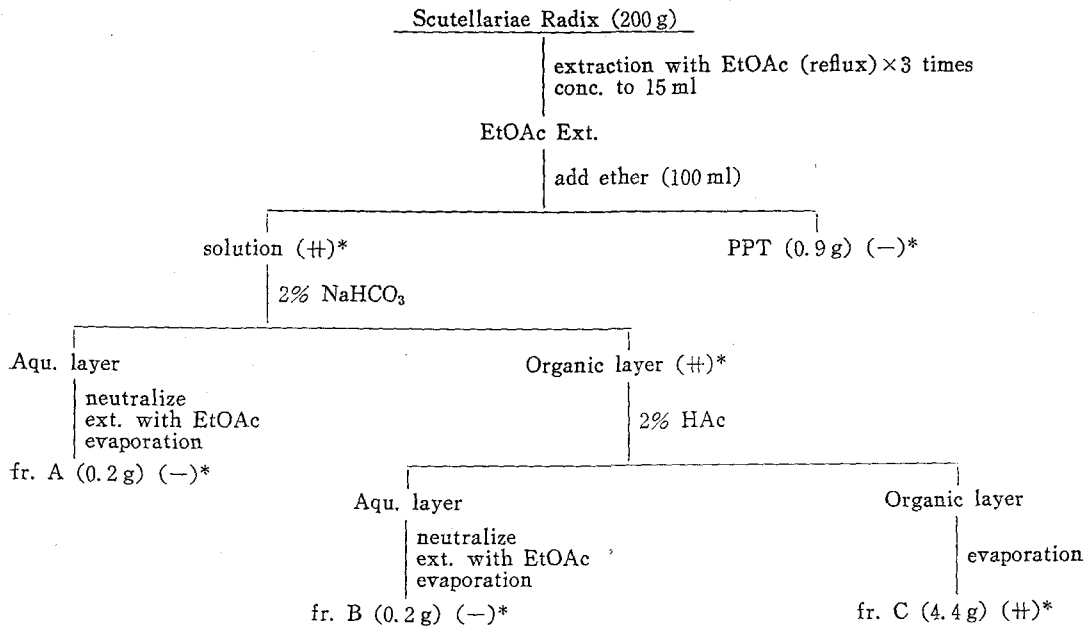
Endotoxic Shock에 의한 사망—마우스에 검체를 1일 1회 2일간 경구투여하고 2회 투여 60분후 lipopolysaccharide (endotoxin, 25 mg/10 ml/kg)을 꼬리정맥에 주사한 후 마우스의 생존시간을 관찰하였다.¹⁵⁾

실험결과 및 고찰

황금의 MeOH 추출물중 CHCl₃ 가용성분획 및 hexane 가용성 분획이 bradykinin (BK)에 대하여 길항작용을 보이며 MeOH에기스중 대부분을 차지하는 H₂O 가용성 분획이 BK에 대하여 길항작용을 갖지 않음이 이미 보고된 바 있기에¹¹⁾ 추출 및 분획의 효율성을 높이기 위하여 본 연구에서는 황금을 EtOAc로 추출하였으며 적출회장을 이용하여 BK에 대한 길항작용을 추적하면서 EtOAc 에기스를 Scheme 1에서와 같이 분획하였다. 적출회장에서의 BK 길항작용은 EtOAc 에기스중 ether 가용성분에서 검출되었으며 ether 가용성분 중 약산 또는 약알칼리로 추출되지 않는 성분 분획인 fr. C가 작용분획으로서 확인되었다. 황금은 wagonin, oroxylin A, baicalein 등의 여러 종류의 flavonoid들을 함유하고 있음이 보고되어 있어¹⁶⁻¹⁹⁾ fr. C는 이들 flavonoid들을 주성분으로, 이의 ether 가용성 중성성분을 함유한 것으로 사료된다.

Bradykinin (BK)는 여러가지 장관이나 혈관 등의 평활근에서 수축 또는 이완을 일으키며 BK 길항작용 물질들에 의한 억제작용의 관찰이 용이하다. 따라서 BK의 receptor interaction, specificity 등에 관한 연구, 또는 BK 길항작용 물질의 검색 등에 적출장관 또는 적출혈관 평활근 등이 많이 이용된다.^{4,5)}

본 실험에서는 흰쥐의 적출회장을 이용 BK 억제작용을 추적함으로써 fr. C를 얻었으며 fr.



Scheme I. Extraction and fractionation of *Scutellariae Radix*.

*BK antagonistic effect (†) and no effect (-) at the conc. of 10 µg/ml in isolated rat ileum.

Table I. Antagonistic effects of fr. C against BK in isolated rat uterus

Conc. (µg/ml)	% inhibition
40	53.1
20	32.3
10	17.4

* BK: 50 ng/ml.

Table II. Antagonistic effects of fr. C against BK-induced plasma extravasation

Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Diameter of extravasation (mm)	Inhibition (%)
Control	7	12.6 ± 1.2	—
Aspirin (200)	6	11.1 ± 0.8	13.4
Fr. C (100)	6	9.3 ± 1.0	26.5
Fr. C (200)	6	7.8 ± 0.5	38.1

C는 Table I에 정리한 바와 같이 적출자궁에서 BK에 대하여 농도의존적으로 수축 억제작용을 갖임을 관찰하였고 acetylcholine 또는 angiotensin I 또는 II에 의한 수축에는 영향을 미치지 않았다.

BK는 혈관투과성을 증대시킴으로서 혈장일혈을 초래하며 이는 BK 길항작용 물질에 의하여

억제됨이^{6,13,21,22} 보고되고 있다. 마우스에 색소 (Evan's blue, 10 mg/kg)을 정맥주사한 후 BK (100 µl of 2 mg/10 ml soln.)를 내피주사 하였을 때 혈장과 함께 색소가 투과됨으로서 피부가 착색됨을 관찰할 수 있었으며 fr. C를 투여한 마우스에서 피부의 착색부위가 축소됨을 관찰할 수 있었다. Table II에서와 같이 aspirin 200 mg/kg 투여시 13.4%의 억제를 보인 반면 fr. C는 100 mg/kg 또는 200 mg/kg 투여로서 각각 26.5% 및 38.1%의 억제작용을 보여 fr. C가 aspirin 보다 혈장일혈 억제작용이 강력함을 보였다.

BK는 강력한 동통유발 물질로서 여러가지 동통유발에 관여하고 있으며^{6,22,24} lipopolysaccharide (endotoxin)에 의한 shock에 또한 관여함이 밝혀지고 있고 BK antagonist들이 endotoxichock에 의한 사망을 현저히 감소시킴이 보고되었다.¹⁵ Table III에서 보는바와 같이 fr. C는 100 mg/kg, 200 mg/kg 및 300 mg/kg 투여시 초산에 의한 writhing을 각각 41.9, 58.2 및 65.2% 억제하였으며 300 mg/kg 투여시 aspirin 200 mg/kg 투여시와 유사한 동통억제 효과를 보였다. 또한 마우스에 있어서 endotoxic shock에 의한 사망을 현저히 감소시킴을 관찰하였다. 즉 마우

Table III. The effects of fr. C on the acetic acid induced writhing in mice

Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	No. of writhing	Inhibition (%)
Control	15	43±3.3	—
Aspirin (200)	10	15±1.7	65.2
Fr. C (100)	5	25±1.6	41.9
Fr. C (200)	10	18±1.1	58.2
Fr. C (300)	10	5±1.41	65.2

Table IV. The effects of fr. C on endotoxic shock

Dose (mg/kg, p.o.)	No. of dead* / No. of total	Mortality (%)
Control	15/18	83.3
Fr. C (25)	5/ 9	55.6
Fr. C (50)	2/ 9	22.2
Fr. C (100)	2/ 9	22.2
Fr. C (200)	2/18	11.1

* Counted at 30 hour after endotoxin injection.

스에 endotoxin 25 mg/kg을 정맥주사 하였을 때 30시간 이내에 18마리 중 15마리가 사망하여 83.3%의 치사율을 보였으나(Table IV) fr. C 25 mg/kg 투여로서 치사율이 55.6%로서 상당히 저하되었으며 200 mg/kg 투여하였을 때는 치사율 11.1%로서 fr. C가 endotoxin에 의한 shock에 대하여 상당한 방어작용을 갖임을 알 수 있었다.

결 론

황금의 EtOAc 에기스를 BK 억제작용을 추적하면서 분획하여 flavonoid들을 주성분으로 하는 fr. C를 작용분획으로 얻었다. Fr. C는 흰쥐 적출회장 또는 적출자궁에서 BK에 의한 수축을 억제하였으며 마우스에서 BK에 의한 혈장일혈을 억제하였고, 동통억제작용 및 endotoxic shock 방어작용이 있음을 확인하여 보고하는 바이며 fr. C로부터 BK 억제작용 물질의 분리가 기대된다 하겠다.

감사의 말씀—실험재료인 황금을 감정하여 주신 지형준 교수에게 감사드리며 본 연구를 수행

함에 재정지원(과제번호 : 901-0302-002-2)을 하여 주신 한국과학재단에 감사드립니다.

〈1991년 7월 10일 접수 : 7월 31일 수리〉

문 헌

- Douglas, W.W.: The Pharmacological Basis of Therapeutics, A.G. Gilman et al. ed., 7th ed., p. 653, MacMillan Publishing Comp. (1985).
- Burch, R.M., Farmer, S.C. and Steranka, L.R.: *Med. Res. Rev.* 10, 237 (1990).
- Boissonnas, R.A., Guttman, S., Jaquenoud, P.A., Konzett, H. and Sturmer, E.: *Experientia*, 16, 326 (1960).
- Vavrek, J.R. and Stewart, J.M.: *Peptides*, 6, 161 (1985).
- Schachter, M., Uchida, Y., Longridge, D.J., Labeledz, T., Whalley, E.T., Vavrek, R.J. and Stewart, J.M.: *Br. J. Pharmacol.* 92, 851 (1987).
- Griesbacher, T. and Lembeck, F.: *Br. J. Pharmacol.* 92, 333 (1987).
- Enna, S.J. and Steranka, L.R.: *Tips*, 10, 387 (1989).
- Rochaes Silva, M. and Leme, J.G.: *Med. Exp.* 8, 287 (1963).
- Altinkurt, O. and Kanzik, I.: *Drug Res.* 30, 41 and 286 (1980).
- Calixto, J.B., Pizzolatti, M.G. and Yunes, R.A.: *Br. J. Pharmacol.* 94, 1133, (1988).
- Yun-Choi, H.S., Kim, Y.S., Kim, S.O. and Chung, S.H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 14, 145 (1983).
- Miles, A.A. and Miles, E.M.: *J. Physiol.* 118, 228 (1952).
- Schachter, M., Uchida, Y., Longridge, D.J., Labeledz, T., Whalley, E.T., Vavrek, R.J. and Stewart, J.M.: *Br. J. Pharmacol.* 92, 851 (1987).
- Koster, R., Anderson, M. and de Beer, E.J.: *Fed. Proc.* 18, 412 (1959).
- Wilson, D.D., de Garavilla, L., Kuhn, W., Togo, J., Burch, R.M. and Steranka, L.R.: *Cir. Shock* 27, 93 (1989).
- Takido, M., Aimi, M., Takahashi, S., Yamanouchi, S., Torir, H. and Dohi, S.: *Yakugaku Zasshi* 95, 108 (1975).

17. Kimura, Y., Okuda, H., Taira, Z., Shoji, N., Takemoto, T. and Arichi, S.: *Planta Medica* **46**, 290 (1984).
18. Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H. and Suzuki, C.: *Yakugaku Zasshi* **104**, 529 (1984).
19. Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H. and Tanabe, Y.: *Yakugaku Zasshi* **104**, 524 (1984).
20. Holdstock, D.J., Mathtas, and A.P. Schachter, M.: *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 149 (1957).
21. Whalley, E.T., Nwator, I.A., Stewart, J.M. and Vavrek, R.J. *Naunyn-Sch. Arch. Pharmacol.* **336**, 430 (1987).
22. Steranka, L.R., DeHaas, C.J., Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Enna, S.J. and Snyder, S.H.: *Eur. J. Pharmacol.* **136**, 261 (1987).
23. Whalley, E.T., Clegg, S., Stewart, J.M. and Vavrek, R.J. *Naunyn-Sch. Arch. Pharmacol.* **336**, 652 (1987).
24. Steranka, L.R., Manning, D.C., DeHaas, C.J., Ferkany, J.W., Borosky, S.A., Connor, J.R., Vavrek, R.J., Stewart, J.M. and Snyder, S.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3245 (1988).