

## 아스파라톤에 의한 사이클로옥시게나제의 저해 - *in Vitro*

서대연 · 한병훈<sup>†</sup>

서울대학교 천연물과학연구소

(Received July 25, 1995)

### *In Vitro* Inhibition of Cyclooxygenase by Aspalatone

Dae-Yeon Suh and Byung Hoon Han<sup>†</sup>

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

**Abstract**—A new antiplatelet agent, aspalatone ([3-(2-methyl-4-pyronyl)]-2-acetyloxybenzoate) was demonstrated to inhibit MDA generation from arachidonic acid catalyzed by partially purified bovine seminal vesicle cyclooxygenase. This inhibition was also observed with acetylsalicylic acid. The results suggest that the mechanism for the antiplatelet effect of aspalatone is, like acetylsalicylic acid, due to its inhibition of cyclooxygenase.

**Keywords** □ Aspalatone, acetylsalicylic acid maltol ester, cyclooxygenase.

Acetylsalicylic acid (ASA)은 prostaglandin 생합성에 관여하는 주요 효소인 cyclooxygenase (COX)의 Ser<sub>530</sub> 잔기를 특이적으로 아세틸화하므로써 효소 활성을 비가역적으로 저해하여 항혈전, 소염, 해열, 진통의 약효를 나타낸다.<sup>1-4)</sup> 특히, 사람의 경우 저용량 (매일 100~300 mg)을 경구 복용하면, thromboxane A<sub>2</sub>의 생성을 선택적으로 저해하며, 이는 ASA가 presystemic (portal) circulation에서 혈소판의 COX를 선택적으로 저해하기 때문으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> ASA가 저용량에서 뛰어난 항혈전 효과를 보임은 여러 임상시험을 통하여 입증되고 있으나<sup>6)</sup> 위출혈 및 위궤양을 일으키는 부작용으로 인하여 임상에서의 보다 넓은 적용에 제한을 받고 있다.<sup>7,8)</sup> 이러한 ASA의 단점을 극복하고자 본 연구실에서 ASA와 고려 홍삼의 항산화 활성 성분인 maltol을 축합하여 aspalatone ([3-(2-methyl-4-pyronyl)]-2-acetyloxybenzoate)을 합성하였으며, aspalatone은 위궤양을 일으키지 않으며, 항혈전 효과는 ASA와 동등함을 동물실험을 통하여 밝힌 바 있다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 aspalatone의 항혈전 약리 기전을 ASA의 기전 (COX 저해)과 비교하기 위하여 소의 정낭으로부터 부분 분리한 COX (COX1)에 대한 *in vitro*에서의 저해활성을 측정하였다.

#### 실험 방법

**시약** - Reduced glutathione (GSH), hemoglobin, arachidonic acid, thiobarbituric acid (TBA) 및 2-deoxyribose는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였으며, 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다. 소 정낭은 도축장에서 얻은 것을 냉장 보관한 후, 2 시간 이내에 사용하였다.

**Cyclooxygenase (COX)의 부분 분리** - Van der Ouderra 등의 방법<sup>10)</sup>에 의거하여 소 정낭 (bovine seminal vesicles)으로 부터 COX (EC 1.4.99.1)를 부분 분리하였다. 지방질과 결합조직을 제거한 후 소 정낭 (65 g)을 150 ml의 50 mM Tris 완충액 (10 mM EDTA, 0.1% Tween-20, pH 8.0) 에서 Sorvall Omnimixer로 매번 30 초 동안 3회 분쇄하였다. 얻어진 분쇄액을 9,000 rpm 에서 15 분간 원심 분리한

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-743-8349 (팩스) 02-744-4243

후 (Sorvall RC-5B, GSA rotor) 상등액을 취하여 cheese cloth를 통한 후, 36,000 rpm 에서 60 분간 원심 분리하였다 (Sorvall OTD65B, T865 rotor). 침전물을 취하여 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.1 M NaClO<sub>4</sub> 용액 50 ml에서 pestle을 이용, 분쇄하고 36,000 rpm 에서 다시 60 분간 원심 분리하였다. 얻어진 침전물 (perchlorate-washed microsomes) 을 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 0.1 mM diethyldithiocarbamate 용액 20 ml에 현탁 시킨 후 pestle를 이용, 분쇄하여 25 ml의 용액을 얻었다. Lowry 방법<sup>11)</sup>에 의하여 이 용액의 단백질을 정량한 후 detergent와 단백질의 비가 2 : 1 (w/w)이 되도록 Tween-20 (400 mg)을 더하고 36,000 rpm 에서 60 분간 원심 분리하였다. 얻어진 상등액을 COX 효소원으로 사용하였다.

**Cyclooxygenase 활성 측정** - Boopathy와 Balasubramanian의 방법에 의하여 측정하였다.<sup>12)</sup> 적당량의 효소용액을 포함하는 0.1 M Tris/HCl (pH 8.0), 5 mM GSH (reduced glutathione), 5 mM hemoglobin 용액을 반응액으로 하고 arachidonic acid (최종농도 0.5 mM)를 기질로 하였다. Aspalatone과 ASA를 각각 EtOH에 녹인 후 Tris 완충액으로 희석하여 반응액에서의 EtOH 최종 농도가 0.2%로 일정하게 하였다. Aspalatone 또는 ASA으로 4 분간 전처리한 효소 용액과 처리하지 않은 효소 용액의 COX 활성을 비교하였다. 효소 반응을 27°C 에서 4 분간 진행시키고 100% (w/v) trichloroacetic acid (in 1 M HCl) 0.2 ml를 더하여 종료시켰다. 잘 섞은 후, 1% (w/v) thiobarbituric acid (TBA) 0.2 ml와 함께 섞은 후, 100°C 에서 20 분간 가열하였다. 상온으로 냉각시킨 후, 탁상용 원심분리기에서 원심 분리하고 (2,500 rpm×5 분) 상등액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 반응시 보조인자인 hemoglobin을 제외시킨 용액을 대조군으로 하였다. 효소 반응으로 생성

된 malonaldehyde (MDA)는 2-deoxyribose의 periodate에 의한 산화 반응으로 생성된 MDA의 표준 곡선에서 구하였다.

**Malonaldehyde의 검량선<sup>13)</sup>** - 2-Deoxyribose (0.2~12.5 µg)의 수용액 3.5 ml에 25 mM periodic acid (HIO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)를 0.125 N 황산에 녹인 용액 0.5 ml을 더한 후 잘 섞었다. 상온에서 20 분간 방치한 후, 1 ml의 NaAsO<sub>2</sub> 용액 (50 ml 0.5 N HCl에 1.0 g NaAsO<sub>2</sub>를 녹인 것)을 더하여 잘 흔들고 약 2 분이 경과한 후, 1 ml를 취하여 0.6% TBA 수용액 2.0 ml에 더한 후 끓는 물 속에서 20 분간 방치하였다. TBA 수용액은 사용 전 1.0 N NaOH를 이용, pH 2.0으로 적정하였다. 상온으로 냉각하고, 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 2-Deoxyribose 용액 대신 증류수를 더한 것을 대조군으로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

Arachidonic acid로 부터 생성된 PGG<sub>2</sub>와 PGH<sub>2</sub>는 haem과 reduced glutathione의 존재하에서 MDA를 생성한다고 알려져 있으며<sup>14)</sup> MDA의 TBA 착색 반응을 이용하여 COX 활성을 측정하였다. Aspalatone의 *in vitro* COX 활성에 미치는 영향을 측정기 위해 소의 정낭으로 부터 부분 분리한 (Table I) solubilized microsomal 효소 용액을 aspalatone 또는 ASA으로 전처리한 후 효소 활성을 측정한 결과를 Table II에 나타내었다. ASA이 혈소판의 COX를 선택적으로 저해하여 항혈전 작용을 나타낸다는 것은 잘 알려진 사실이다. 본 실험 조건하에서 aspalatone은 100 µM의 농도에서 COX 반응에 의한 arachidonate로 부터의 MDA 생성을 33% 억제 (IC<sub>50</sub>=2.2 mM) 하였으며, ASA의 억제 효과는 같은 농도에서 37%였다 (IC<sub>50</sub>=0.41 mM). 이는 aspalatone도 ASA과 마찬가지로 COX를 특이적으로 억제함으로써 항혈전 효과를 가짐을 나타낸다.

**Table I**— Partial Purification of Cyclooxygenase from Bovine Seminal Vesicles

Step	Total vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)
Homogenate	210	6000	800	0.13
Centrifugation & filtration	170	3200	650	0.20
NaClO <sub>4</sub> washing	30	310	340	1.1
Solubilized microsome	25	200	270	1.4

\* One unit of enzyme activity is defined as 1 nmol of malonaldehyde formed per min.

**Table II** — *In vitro* Inhibition of Cyclooxygenase by Aspalatone and ASA

Sample	Drug conc. (μM)	ΔA <sub>532</sub>	MDA formed
Untreated	-	0.45	3.0
Aspalatone	1	0.42	2.8
	10	0.37	2.5
	100	0.30	2.0
	400	0.26	1.8
ASA	1	0.38	2.6
	10	0.26	1.7
	100	0.28	1.9

The enzyme reaction was carried out at 27°C for 4 min. Enzyme solution was preincubated at 27°C for 4 min with drugs. Absorbance at 532 nm was measured against the blank in which hemoglobin was omitted. Data are the means of two separate experiments.

Aspalatone은 여러가지 동물 실험에서 ASA와 일치하는 약리 작용의 특성을 가짐이 밝혀진 바 있다.

Aspalatone은 collagen에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하였으나 COX pathway와 무관하게 작용하는 ADP에 의한 혈소판 응집에는 영향을 미치지 아니하였다.<sup>9)</sup> ASA도 동일한 응집억제 특이성을 나타냄은 잘 알려져 있다.<sup>15)</sup> 저용량에서 경구 투여 하였을 때, aspalatone과 ASA 모두 유의적인 출혈시간 연장 효과를 나타내기 위하여는 최소 8일 간의 연속 투여가 필요하였다. 또한 마우스를 이용한 항혈전 실험에서 10일 간 투여 시 ED<sub>50</sub> 값이 1회 투여시 보다 약 3 배 이상 감소하였을 뿐 만 아니라, 장기 투여후의 약효는 투여 중단 4일 후에 까지 유지되었다.<sup>9)</sup> 이러한 약리 효과는 ASA의 경우 저용량, 장기 투여시 말초 혈관벽의 COX는 저해하지 않고 간문맥 (presystemic portal circulation)에서 혈소판의 COX를 선택적으로 저해하기 때문으로 밝혀진 바 있다.<sup>16)</sup> Ex vivo에서 혈소판 응집 억제 효과를 나타낸<sup>9)</sup> 경구 투여 1 시간 후, 혈액내에서의 약물의 잔여 농도를 측정 한 실험에서 aspalatone은 검출되지 않았으며 aspalatone의 탈아세틸화 반응산물인 salicylic acid maltol ester와 이것의 가수분해 산물인 salicylic acid 만 검출되었다.<sup>17)</sup> 이는 aspalatone이 흡수된 후, 혈소판의 COX를 transacetylation하여 불활성화시키고 대사되었음을 시사한다. 또한, aspalatone과 ASA이 흰쥐의 출혈시간을 연장함에 비하여 aspalatone에서 아세틸기가 없는 salicylic acid maltol ester는 출혈시간에 유의적인 영향을 미치지 아니하였다.<sup>9)</sup> 이는 aspalatone의 아세틸기가 항혈전 작용에 필요하며 aspalatone의 약리

기전과 일치하는 결과이다.

결론적으로, 이러한 실험 결과들은 본 연구에서 얻어진 결과와 더불어 aspalatone도 ASA와 같이 transacetylation에 의하여 cyclooxygenase를 저해함으로써 항혈전 작용을 나타내는 것으로 평가된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 보사부 신약개발 연구비 (천연물로부터 성인병 치료 및 예방약물의 개발에 관한 연구, 과제 번호 91-01)의 지원으로 진행되었기에 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Roth, G. J. and Majerus, P. W.: The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. *J. Clin. Invest.* **56**, 624 (1975).
- 2) Livio, M., Benigni, A., Zoja, C., Begnis, R., Morelli, C., Rossini, M., Garattini S. and Remuzzi, G.: Differential inhibition by aspirin of platelet thromboxane and renal prostaglandins in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**, 334 (1989).
- 3) Pedersen, A. K. and Fitzgerald, G. A.: Dose-related kinetics of aspirin: presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *New Engl. J. Med.* **311**, 1206 (1985).
- 4) Patrono, C.: Aspirin and human platelets: from clinical trials to acetylation of cyclooxygenase and back. *TIPS* **10**, 453 (1989).
- 5) de Gaetano, G., Cerletti, C., Dejana, E. and Latini, R.: Pharmacology of platelet inhibition in humans: implications of the salicylate-aspirin interaction. *Circulation* **72**, 1185 (1985).
- 6) Underwood, M. J. and More, R. S.: The aspirin papers. *BMJ* **308**, 71 (1994).
- 7) Kauffman, G.: Aspirin-induced gastric mucosal injury: Lessons learned from animal models. *Gastroenterology* **96**, 606 (1989).
- 8) O'Grady, J. and Moncada, S.: Aspirin: a paradoxical effect on bleeding-time (Letter) *Lancet* **ii**, 780 (1978).
- 9) Han, B. H., Suh, D. -Y., Yang, H. O., Park, Y. -H., Kang, Y. H. and Kim, Y. C.: Synthesis and

- antiplatelet effects of the new antithrombotic agent Aspalatone with low ulcerogenicity. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **44(II)**, 1122 (1994).
- 10) Van der Ouderra, F. A., Buytenhek, M., Nugteren, D. H. and Van Dorp, D. A.: Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta* **487**, 315 (1977).
- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 264 (1951).
- 12) Boopathy, R. and Balasubramanian, A. S.: Purification and characterization of sheep platelet cyclooxygenase. Acetylation by aspirin prevents hemin binding to the enzyme. *Biochem. J.* **239**, 371 (1986).
- 13) Waravdekar, V. S. and Saslaw, L. D.: A method of estimation of 2-deoxyribose. *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 439 (1957).
- 14) Van der Ouderaa, F. J., Buytenhek, M., Nugteren, D. H. and Van Dorp, D. A.: Acetylation of prostaglandin endoperoxide synthetase with acetylsalicylic acid. *Eur. J. Biochem.* **109**, 1 (1980).
- 15) Kimura, Y., Tani, T., Kanbe, T. and Watanabe, K.: Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **35(II)**, 1144 (1985).
- 16) Burch, J. W., Stanford, N. and Majerus, P. W.: Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J. Clin. Invest.* **61**, 314 (1978).
- 17) Suh, D. -Y., Yang, H. O., Kim, Y. C. and Han, B. H.: Metabolic Fate of the New Antithrombotic Agent Aspalatone in Rats : *In Vivo* and *In Vitro* Study. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* in press.