

Amentoflavone의 아라키돈산 유리효소인 phospholipase A₂에 대한 저해활성 및 비만세포에서 histamine 유리 억제효과

문태철¹ · 이은경¹ · 이승호¹ · 손건호² · 김현표³ · 강삼식⁴ · 장현욱^{1*}

영남대학교 약학대학, ²안동대학교 생활과학대학, ³강원대학교 약학대학, ⁴서울대학교 천연물과학연구소

Inhibitory Activity of Amentoflavone on Arachidonic Acid Releasing Enzyme, Phospholipase A₂ and Inhibition of Histamine Release from Mast Cells

Tae Chul Moon¹, Eunkyung Lee¹, Sung-Ho Lee¹, Kun Ho Son², Hyun Pyo Kim³,
Sam Sik Kang⁴ and Hyeun Wook Chang^{1*}

¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Korea,

²Depart. Food & Nutrition, Andong National University, Korea,

³College of Pharmacy, Kangwon National University, Korea,

⁴Natural Products Res. Institute. Seoul National University, Korea

Abstract – Amentoflavone, naturally occurring biflavonoid, isolated from the leaves of *Ginko biloba*, selectively inhibited human secretory phospholipase A₂. This compound potently and irreversibly inhibited human group IIA in a dose dependent manner with an IC₅₀, about 3 μM. Amentoflavone inhibited phospholipase A₂ by a noncompetitive manner, with the apparent *Ki* value of 1 × 10⁻³M. In addition, the inhibitory activity of amentoflavone is rather specific against group IIA phospholipase A₂ than group IB phospholipase A₂. Furthermore, this compound strong inhibit histamine release from A₂₃₁₈₇ treated rat peritoneal mast cells. These results indicate naturally occurring biflavonoid represents a novel anti-inflammatory agent.

Key words – Amentoflavone, *Ginko biloba*, human secretory phospholipase A₂, arachidonic acid releasing enzyme, mast cells, histamine, A₂₃₁₈₇

Phospholipase A₂ (PLA₂)는 세균에서부터 고등동물에 이르기까지 광범위하게, 세포막, 과립, 분비액중에 존재하는 효소로서, glycerophospholipid의 2번 위치에 ester결합을 가수분해하여 유리지방산과 lysophospholipid를 생성한다. 지금까지 알려진 분비성 PLA₂는 10종류의 isozyme이 존재함이 밝혀져 이들의 생체 내 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁾. 이들 중 특히 분비성 group IIA PLA₂는 실험동물을 이용한 염증 model이나^{2,3)} 사람의 질환등⁴⁻⁶⁾에서 높은 활성이 보고되어 각종 염증반응에 깊이 관여함이 밝혀졌다. 또한 이러한 각종 염증질환에서 높은 세포외성 PLA₂의 활성과 arachidonic acid 대사산물의 축적이 보고되어 염증반응에 있어서 PLA₂가 깊이 관여함이 시사되고있다⁷⁾. 한

편 비만세포(mast cell)에서 탈 과립반응에도 PLA₂의 관여함이 시사되어 PLA₂ 저해제를 이용한 allergy 치료제 개발의 결과가 기대되고 있다⁸⁾.

Flavonoid는 식물에 대량으로 함유된 γ-pyrone 유도체로서 여러 가지 생리 및 약리 작용을 갖는다고 보고되어 있다. 근년, Panthong¹⁰⁾ 및 Gil등¹¹⁾은 *in vivo*에서 수종의 hydroxyl화 및 methyl화된 flavone이나 flavonol 화합물에서 항 염증작용을 보고한 바 있다. 그 후 많은 연구를 통하여 항 염증성 flavonoids에 대한 연구를 통하여 biflavonoid중, ochnaflavone, ginetin, morelloflavone이 강한 항 염증작용이 있음이 보고되었으며, 그 작용기전의 하나가 PLA₂의 저해작용에 기인함이 밝혀졌다^{2,13)}.

최근 저자 등은 이미 일부 biflavonoid의 작용기전 및 *in vivo* 동물모델에서도 항 염증활성 보고한 바 있다^{12,14)}. 본 논

*교신저자(E-mail) : hwchang@yu.ac.kr

문에서는 은행잎에서 분리한 biflavonoid인 amentoflavone이 아라키돈산 대사계의 율속효소인 분비성 PLA₂의 억제작용 및 비만세포에서 histamine 유리억제작용을 구명하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - Amentoflavone은 강 등의 방법¹⁵⁾으로 분리하여 사용하였다.

시약 - 효소 정제에 사용한 Heparin-Sepharose CL-6B 및 DEAE Sephacel은 Pharmacia사로부터, butyl-Toyopearl 650 M은 Tosoh사로부터, SDS molecular weight marker 및 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, CaCl₂등은 Sigma사로부터, Comassie brilliant blue, 2-mercaptoethanol, TEMED, acrylamide, bis-acrylamide 등은 Bio-Rad사로부터 1.4-bis[2-(phenyloxazolyl)] benzene(POPOP), 2,5-diphenyloxazole (DPO)는 Dojin사로부터 구입하여 사용하였으며, 이 외의 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

Phospholipase A₂ 활성의 측정 - PLA₂ 활성 측정¹²⁾에 사용한 기질인 1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine 은 Amersham사에서 구입하여 사용하였다. PLA₂활성은 100 mM Tris-HCl(pH 9.0), 6 mM CaCl₂, 기질 20 nmol(1,000 cpm/nmol) 및 효소(10 ng) 및 amentoflavone을 함유한 반응액을 37°C로, 지정된 시간 동안 반응시킨 후, 생성된 [¹⁴C]linoleic acid를 추출하여 liquid scintillation counter Minaxi Tri-Carb, Packard, USA)로 측정하여 PLA₂ 활성으로 환산하였다. 사람의 관절액 중의 PLA₂는 Hara등의 방법⁴⁾으로 정제하여 사용하였으며, 돼지 췌장유래의 PLA₂는 Boeringer Mannheim사로부터 구입하여 사용하였다.

Rat 복강 비만세포의 분리 및 활성화 - S.D Rat (300-400 g)의 복강에 HBSS액을 50 cc 주입한 후 복강으로부터 HBSS액을 회수하여 150 × g에서 5분간 원심 분리하여 세포를 수집한 후 5 ml의 35 % (w/v) BSA를 함유한 용액에 넣은 후 450 × g에서 20 분간 원심 분리하여 Murakami등의 방법⁸⁾으로 비만세포를 분리하였다. 비만세포 2 × 10⁵ cell/ml에 10⁻⁵M의 A₂₃₁₈₇을 가하여 활성화 시켰다. 이때 amentoflavone은 15분 전 처리한 후 10⁻⁵M의 A₂₃₁₈₇를 가하여 유리되는 histamine의 량을 측정하였다.

Histamine의 정량 - 세포 상층액, 초음파 처리하여 파괴한 cell lysate 및 검량선 작성 등에 histamine을 사용하여 Murakamiemdeml 방법⁸⁾에 따라 [³H]-s-adenosyl-L-methionine (New England Nuclear)와 적당량의 rat kidney로부터 부분 정제한 histamine methyltransferase, 100 mM phosphate buffer (pH 7.9)를 가하여 30분간 반응시킨 후 [³H]methyl

histamine을 추출하여 액체 scintillation counter로 측정하였다.

결과 및 고찰

Amentoflavone (C-3'-C-8" apigenin-apigenin)의 PLA₂ 저해 - 은행잎 biflavonoid 중 rat의 복강에 주사했을 때 가장 흡수가 잘 되는 amentoflavone을 사용하여¹⁴⁾ 작용기전을 검토하였다. Amentoflavone의 용량을 달리하면서 사람의 분비성 PLA₂에 대한 저해 실험을 한 결과 Fig. 1에서와 같이 용량 의존적인 저해 양식을 나타내었으며, IC₅₀값은 약 3 μM정도임을 알 수 있었다. 은행잎으로부터 얻은 biflavonoid는 모두 apigenin의 dimer이므로 apigenin단독으로 PLA₂ 저해활성을 보았을 때 100 μM정도의 농도에서도 거의 활성이 없었다. 따라서 biflavonoid의 PLA₂저해활성은 구조적인 특징에 기인하는 것으로 생각된다.

각종 PLA₂효소원에 대한 amentoflavone의 영향 - Amentoflavone을 이용하여 group I PLA₂ (돼지 췌장 유래) 및 group II PLA₂ (관절염환자 관절액 유래)에 대한 저해작용을 비교하였다. Fig. 2에서와 같이 amentoflavone의 농도를 달리하면서 저해활성을 비교하여 보았을 때 group I PLA₂에 비하여 group II PLA₂에 보다 더 특이적으로 저해함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과에서 amentoflavone의 *in vivo*에서 항 염증 작용¹⁴⁾이 일부는 PLA₂ 저해활성에 기인함이 시사되었다.

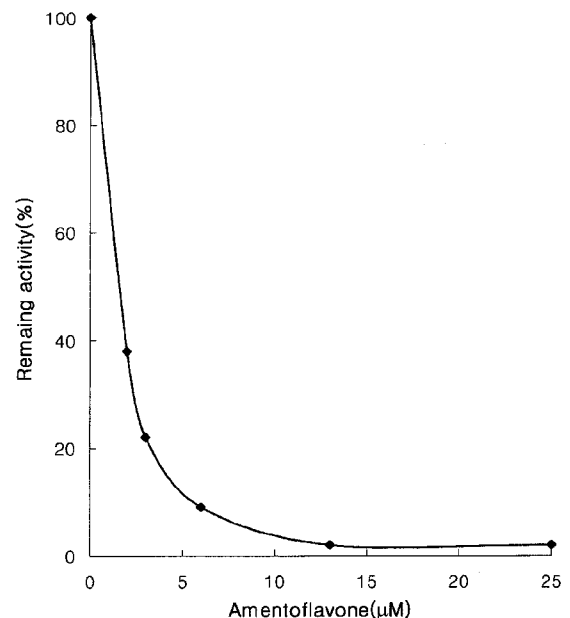


Fig. 1. Concentration-dependent inhibition of human synovial phospholipase A₂ by amentoflavone. Phospholipase A₂ was incubated in the presence of indicated concentration of amentoflavone.

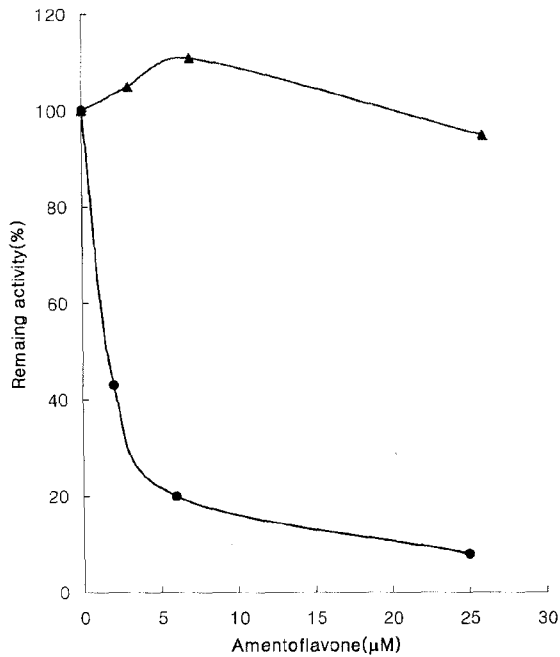


Fig. 2. Inhibition of 14 KDa group II A phospholipase A₂ and group I phospholipase A₂ by amentoflavone. Standard reaction mixture contained 10 ng of each phospholipase A₂ and indicated concentration of amentoflavone. Inhibition is expressed as a percent activity remaining of that obtained in control. Porcine pancreatic phospholipase A₂ (▲), human synovial fluid phospholipase A₂ (●) were used as a group II phospholipase A₂ enzyme source, and porcine pancreatic phospholipase A₂ was used as a group I enzyme source.

Kinetics – Fig. 3에서와 같이 기질의 농도를 달리하여 5 μM amentoflavone을 사용하여 PLA₂에 대한 저해활성을 double-reciprocal plot으로 나타낸 결과 amentoflavone은 비경쟁적인 양식으로 저해하였으며 이때 K_i값은 약 10 μM이었다. 또한 가역성 실험에서도 amentoflavone은 PLA₂를 비가역적으로 억제하였다 (data not shown). 따라서 amentoflavone의 PLA₂ 저해활성은 기질의 결합에 의한 간접적인 억제 효과보다는 효소에 직접 작용하여 억제함이 시사되어 저자 등이 이미 보고한 ochnaflavone (C-3'-O-C-4" apigenin-apigenin)의 작용기전과 유사한 결과를 나타내었다¹²⁾. 이러한 결과는 biflavonoid가 가지는 독특한 구조적인 특징에 의한다고 사료된다.

비만세포에서 histamine 유리억제효과 - 실험방법에 따라 조제한 비만세포에 A₂₃₁₈₇를 처리했을 때 농도 의존적으로 histamine이 유리 되었다. 한편 지적된 농도의 amentoflavone을 비만세포에 15분전 처리한 후 10⁻⁵M의 A₂₃₁₈₇를 자극시키면 amentoflavone은 10⁻⁶M에서도 강력하게 histamine 유리 억제활성을 나타내었다.

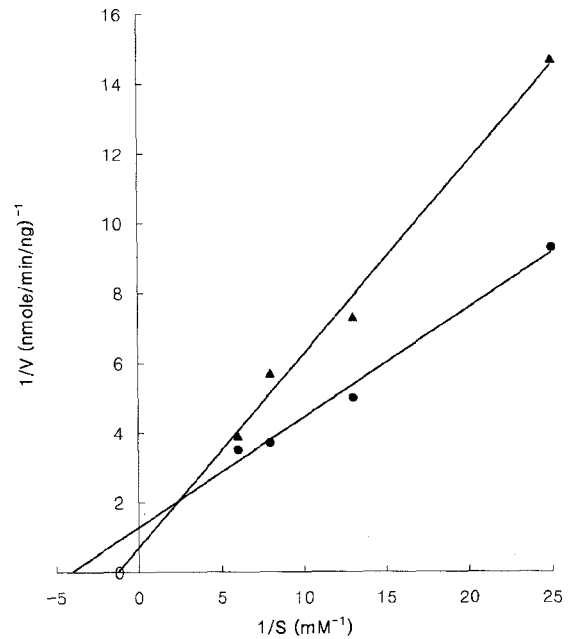


Fig. 3. Effect of substrate concentration on the inhibition of human synovial fluid phospholipase A₂ by amentoflavone. Double-reciprocal plot of phospholipase A₂ activity toward 1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine. The data were made according to Lineweaver and Burk to obtain K_i value. Symbols indicate with (▲) and without (●) amentoflavone.

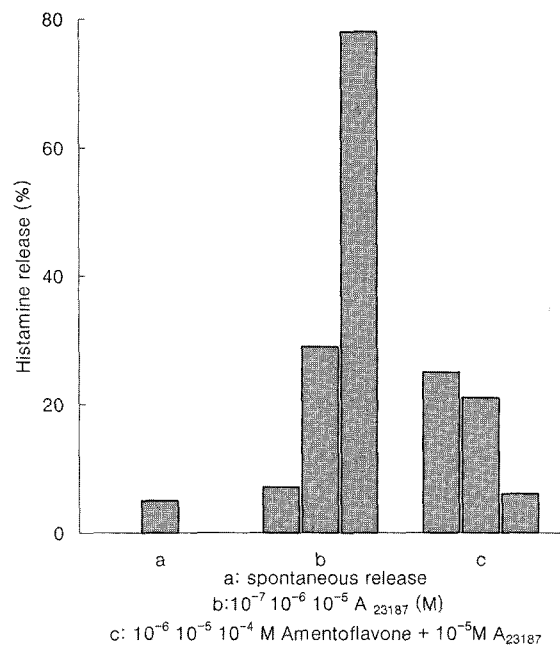


Fig. 4. Effect of amentoflavone on histamine release from A₂₃₁₈₇ treated rat peritoneal mast cells. Mast cells obtained from rat peritoneal (2 × 10⁵ cell/ml) were incubated indicated concentration of A₂₃₁₈₇ in the presence or absence of amentoflavone. Histamine release is expressed as a percent. The procedure is described in MATERIALS and METHODS in detail.

결 론

은행잎으로부터 분리한 5종의 biflavonoid (amentoflavone, bilobetin, ginetin, isoginetin, sciadoptisin) 중 비교적 생체 내 흡수가 좋은 amentoflavone의 PLA₂저해 활성 및 항 알러지 활성을 검토한 결과, amentoflavone은 염증성 PLA₂ 즉 group II형의 분비성 PLA₂에 대해서 용량 의존적으로 저해 활성을 나타내었다. 또한 group I PLA₂ 보다 group II PLA₂를 더 특이적으로 저해활성이 나타나 *in vivo*에서 항 염증 작용은 일부 염증성 PLA₂의 저해작용에 기인함이 시사되었다. Amentoflavone은 비 경쟁적인 양식으로 PLA₂를 저해하였으며, 가역성실험에서 비가역적 저해양식을 나타내었다 (data not shown). 한편 비만세포에 대한 탈 과립반응도 강력하게 억제하였다.

이상의 실험결과에서 은행잎에서 분리한 biflavonoid 중 amentoflavone의 PLA₂ 저해기전에 관한 특성을 연구, 검토함으로써 염증반응과 비만세포의 탈 과립반응에 있어서의 PLA₂역할과 관련하여 새로운 항 염증 및 항 알러지 효과를 기대할 수 있으리라 사료된다.

사 사

본 연구는 1998년도 영남대학교 교비 연구비에 의해 연구되었으며 이에 감사 드립니다

인용문헌

1. Suzuki, N., Ishizaka, J., Yokoda, Y., Higashino, T., Ono, T., Ikeda, M., Fujii, N., Kawamoto, K., and Hanasaki, K. (2000) Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A₂s. *J. Biol. Chem.* 275: 5785-5793.
2. Vadas P., and Pruzanski, P (1986) Biology of diseases. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of diseases. *Lab. Invest.* 55: 391-404.
3. Chang, H. W., Kudo, I., Hara, S., and Inoue, K. (1986) Extracellular phospholipase A₂ activity in peritoneal cavity of casein-treated rats. *J. Biochem.* 100: 1099-1101.
4. Hara, S., Kudo, I., Chang, H. W., and Inoue, K (1989) Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Biochem.* 105: 395-399.
5. Baek, S. H., Takayama, K., Kudo, I., Inoue, K., and Chang, H. W. (1991) Detection and characterization of extracellular phospholipase A₂ in pleural effusion of patients with tuberculosis. *Life Sci.* 49: 1095-1102.
6. Forster, S., Ilderton, E., Norris, J. F. B., and Yardley, H. J. (1985), Characterization and activity of phospholipase A₂ in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema. *Br. J. Dermatol.*, 112: 135-147.
7. Kudo, I., Chang, H. W., Hara, S., and Inoue, I. (1989) Characterization and pathophysiological roles of extracellular phospholipase A₂ in inflamed sites. *Dermatologica.* 179 (suppl.1): 72-76.
8. Murakami, M., Kudo, I., Suga, Y., and Inoue, K. (1991), Group II phospholipase A₂ inhibitors suppressed lysophosphatidylserine-dependent degranulation of rat peritoneal mast cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 714-721.
9. Havsteen, B. (1982) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141-1148.
10. Panthong, A., Kanjanapothi, D., Tuntiwachwuttikul, P., Pancharoen, O., and Reutraukul, V. (1994) Antiinflammatory activity of flavonoids. *Phytomedicine.* 1: 141-144.
11. Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Ferandiz, M. L., M. Paya, Gunasegaran, R., and Alcaraz, M. J. (1994) Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipase A₂ and inflammatory responses in mice. *Life sci.* 54: PL333-338.
12. Chang, H. W., Baek, S. H., Chung, K. W., Son, K. H., Kim, H. P., and Kang, S. S. (1994) Inactivation of phospholipase A₂ by naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 843-849.
13. Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Gunasegaran, R., Paya, M., M. and Alcaraz, J. (1997) Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A₂ with anti-inflammatory activity. *Biochem. Pharmacol.* 53: 733-740.
14. Kim, H. K., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., and Kim H. P. (1998) Amentoflavone, a plant biflavonoid: A new potential anti-inflammatory agent. *Arch. Pharm. Res.* 21: 406-410.
15. Kang, S. S., Kim, J. S., Kaw, W. J., and Kim. K. H. (1990) Flavonoids from Ginkgo biloba leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* 21: 111-120.

(2002년 1월 31일 접수)