

가죽나무 에타놀 추출물 및 luteolin-7-O-glucoside의 phospholipase A₂ 저해활성

김미화¹ · 황남경¹ · 홍태균¹ · 김윤경¹ · 정환기¹ · 양주혜¹ · 전철구¹ · 배기환²
Pham Ngoc Thanh² · 손건호³ · 김현표⁴ · 강삼식⁵ · 장현욱^{1*}

¹영남대학교 약학대학, ²충남대학교 약학대학, ³안동대학교 식품영양학과, ⁴강원대학 약학대학, ⁵서울대학교 약학대학

Inhibitory Activity of Ethanol Extracts of *Ailanthus altissima* and Luteolin-7-glucoside on Phospholipase A₂ activity

Jin Mei Hua¹, Nam Kyong Hwang¹, Tae Gyun Hong¹, Youn Kyung Kim¹,
Hwan Ki Chung¹, Ju Hae Yang¹, Zhejiu Quan¹, Ki-Hwan Bae², Pham Ngoc Thanh²,
Kun Ho Son³, Hyun Pyo Kim⁴, Sam Sik Kang⁵ and Hyeun Wook Chang^{1*}

¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

²College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong, 760-749, Korea

⁴College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

⁵Natural Products Res. Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract – In our continuing effort to investigate compounds having anti-inflammatory activity from natural products, *Ailanthus altissima* was examined. Among six compounds isolated from *Ailanthus altissima*, Luteolin-7-O-glucoside (L7G) along with ethanol extract of *Ailanthus altissima* (EAA) were chosen to determine their inhibitory activity on secretory recombinant phospholipase A₂s enzyme activity *in vitro*. As a results, EAA inhibited human recombinant sPLA₂-V (IC₅₀ of about 100 µg/ml) and cPLA₂, (IC₅₀ of about 59 µg/ml), while L7G showed strong inhibitory effect on sPLA₂-A, V and cPLA₂ with an IC₅₀ value of approximately 40 µM, respectively.

Key words – *Ailanthus altissima*, Luteolin-7-O-glucoside, Phospholipase A₂, inflammation

세포가 자극을 받게되면 phospholipase A₂(PLA₂)에 의한 세포막 인지질로부터 arachidonic acid(AA) 및 lysophospholipid가 생성된다. PLA₂에 의해 생성된 AA는 cyclooxygenase(COX)와 lipoxygenase(LOX)에 의해 염증의 강력한 매개체인 prostaglandins(PGs), thromboxanes(TXs) 및 leukotrienes(LTs)로 각각 합성된다. 이때 생성된 lysophospholipid는 극히 미량으로 혈소판을 활성화하며 다양한 염증성질화에 관여하는 platelet activating factor(PAF, 혈소판 활성화인자)로 합성되므로 PLA₂는 각종의 염증성질화에 관여하는 매개체 생성의 유효 효소로 알려져 있다. 최근 PLA₂도 많은 연구가 진행되어 현재는 10종의 isozyme이 존재함이 알려졌다.^{1,2)} 이들 중 특히 사람 및 동물모델에서 염증

반응이나 allergy 반응, 조직 손상에 type A sPLA₂가 직. 간접적으로 관여하고 있음이 밝혀졌으며,³⁻⁶⁾ 급, 만성 염증질병의 치료제 개발에 PLase A₂ 저해제가 유력한 후보 물질이라는 기대감으로 연구가 활발히 진행되고 있다.

가죽나무는 갈잎 큰키나무, 높이 20 m 가량, 꽃은 암수딴그루로 지름 7~8 mm이며 녹색을 띠는 백색이다. 꽃받침은 5개로 갈라지며, 5개의 꽃잎은 끝이 안으로 꼬부라진다. 수술은 10개이며 5심피로 된 자방의 암술대가 5개로 갈라진다. 열매는 시과로 연한 적갈색이고 얇은 바늘 모양이며 길이 3~4 cm, 너비 1 cm로 1개의 종자가 들어있다. 뿌리껍질 또는 줄기껍질을 저근백피(樗根白皮)라 하며 청열, 조습, 지혈, 살충의 효능이 있고, 만성하리, 혈변, 대하, 유정을 치료한다. 잎을(樗葉)이라 하며, 옴이 수포진(水疱疹)을 치료하고, 열매를 봉안초(鳳眼草)라 하며 이질, 장풍에 의한 혈변,

*교신저자 (E-mail): hwchang@yu.ac.kr
(FAX): 053-810-4654

혈뇨, 백대하를 치료함이 알려져 있다.⁷⁾ 또한 가죽나무는 일반적으로 “tree of heaven”이라는 이름으로 알려졌으며, 중국을 포함한 아시아 국가에서는 과거부터 장관관 질환의 치료제 사용하였다. 그리고 가죽나무 추출물은 증식억제작용,⁸⁾ 중추신경계 억제작용 및 항 천식작용이 보고되었다.^{9,10)} 그리고 가죽나무에서 분리한 quassinoids는 항 종양, 항 바이러스 및 항염증 작용이 보고된바 있다.¹¹⁻¹⁴⁾

각종의 식물에서 분리된 L7G의 생리활성으로는 항보체 효능,¹⁵⁾ 위궤양 및 식도염 치료효능,¹⁶⁾ 당뇨병환자의 혈당조절효과,¹⁷⁾ 항산화작용 및 항염증 및 항알러지 효능 등이 보고된바 있으나,¹⁸⁻²¹⁾ PLA₂ 활성에 실험결과가 보고된 바 없었다. 이에 저자 등은 새로운 항염증제 개발을 위해 각종의 식물로부터 PLA₂에 대한 억제 활성을 검색하던 중 가죽나무 추출물 및 이로부터 분리한 luteolin-7-O-glucoside에서 강한 억제 활성을 보여 새로운 항염증제 개발에 필요한 기초 자료를 제공하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 가죽나무 추출물 및 luteolin-7-glucoiside는 충남대학교 배기환교수 및 안동대학교 손건호 교수로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

사람유래 재조합 Phospholipase A₂ (rhPLA₂)의 제조 - 각종의 human sPLA₂는, 일본 Showa 대학의 Kudo Ichiro 교수로부터 제공받은 sPLA₂ 유전자에 대한 각각의 cDNA를 HEK-293 cell에 도입한 transfectant를 10% fetal bovine serum을 포함한 RPMI 1640 medium으로 배양하여 그 배양 상층액으로 유리되는 효소를 실험에 사용하였다.^{22,23)}

Phospholipase A₂ (PLA₂) 활성 측정 - 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl-phosphatidylethanolamine 적당량을 시험관에 분취한 후, 질소가스로 용매를 휘발시켜 얻은 lipid film에 적당량의 증류수를 가하여 초음파(Branson 2200, USA) 처리하여 기질로 사용한다. 4 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 기질 (0.3 nmol), 효소 및 검체를 일정농도 함유한 반응액을 37°C에서 일정한 시간동안 반응시킨뒤, Dole's reagent²⁴⁾ 로 반응을 정지시키고 원심분리한다. 상층에 혼입된 lyso체를 silica gel로 제거한후, liquid scintillation counter로 유리된 [¹⁴C] arachidonic acid를 측정하여 PLA₂ 활성으로 환산하였다. 모든 검체는 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여서 최종 2% 농도로 사용하였다.

결과 및 고찰

L7G는 서론에 기술하였 듯 항산화, 항염증 등 다양한 생리활성을 가지고 있음 알려져 있다. 그러나 아라키돈산 대사계의 율속 효소인 PLA₂의 저해활성에 대한 보고가 없었

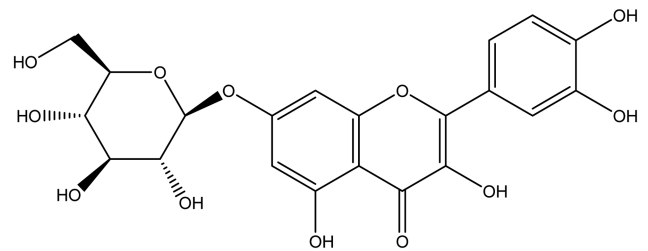


Fig. 1. Chemical structure of luteolin-7-O-glucoside (L7G).

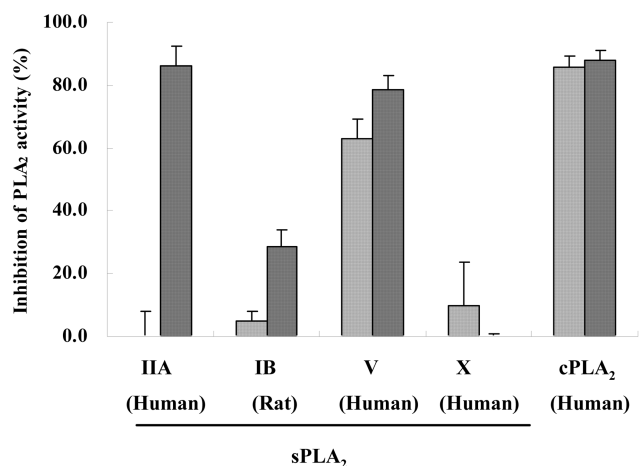


Fig. 2. Effect of ethanol extract of *A. altissima* (EaA) and luteolin-7-glucoiside (L7G) on recombinant phospholipase A₂ activity

The standard reaction mixture (200 μ l) contained 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 6 mM CaCl₂, 1% bovine serum albumin, 2.5 M of radiolabeled 1-acyl-2-[1-¹⁴C] arachidonyl-*sn*-glycerol phosphoethanolamine (48 mCi/m mole, NEN, Boston, MA, USA), and indicated concentration of EaA and L7G. The reaction was started by the addition of an aliquot of the culture medium as an enzyme source and incubated out at 37°C for 20 min. [¹⁴C]arachidonic acid released was extracted by the method described previously.

기 때문에, 본 연구자들은 가죽나무 추출물 및 이로부터 분리한 L7G의 PLA₂활성에 대한 영향을 검토하였다. 즉, 100 μ g/ml농도의 가죽나무 추출물과 100 μ M의 L7G를 사용하여 4종류의 분비성 효소와 (sPLA₂-IIA, IB, V 및 X) 한 종류의 세포질 효소(cPLA₂)에 대한 저해활성을 검토한 결과 Fig. 1에서 처럼 추출물의 경우는 cPLA₂효소에 대하여는 약 85%의 강한 저해활성을 나타내었으며, sPLA₂-V에 대하여서 약 60% 정도로 중정도의 억제활성을 나타내었으나, sPLA₂-IIA, IB 및 X에 대하여서 상대적으로 약한 저해활성을 나타내었다. 그러나 본 식물에서 분리한 L7G는 sPLA₂-IIA에 대하여서는 86%, sPLA₂-V에 대하여서 78%를 그리고 cPLA₂에는 약 90%정도의 강한 저해활성을 나타내었다. 다음 추출물 및 L7G의 50% 저해활성(IC₅₀)을 구하기 위하여 용량의존성을 실험한 결과를 Fig. 2A 및 B에 나타내었다. 그

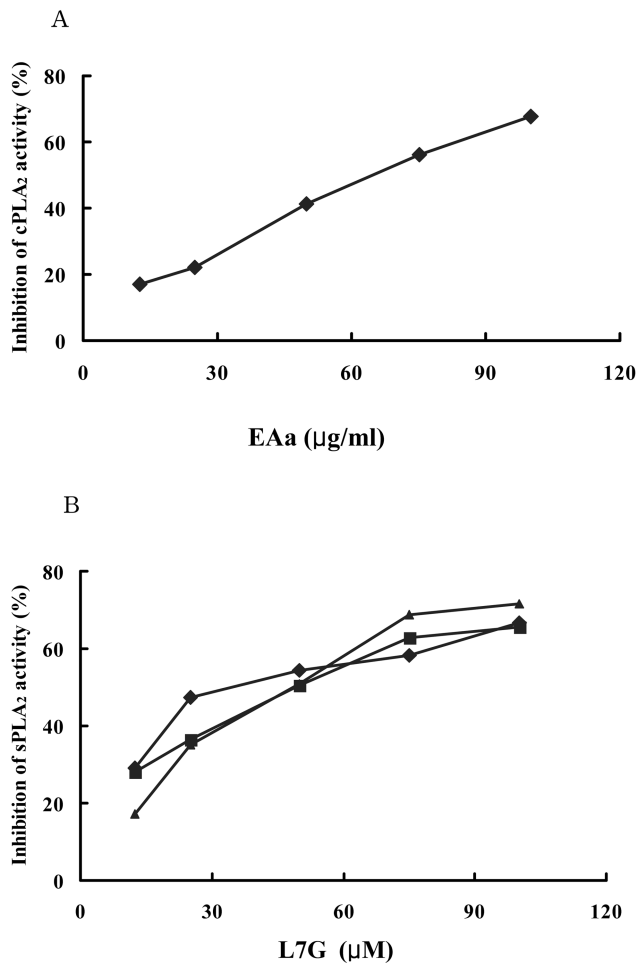


Fig. 3. Inhibitory activity of EAa (A) and L7G (B) on various human recombinant sPLA₂s *in vitro*.

Human sPLA₂-IIA (◆), sPLA₂-V (■) and cPLA₂ (▲) were preincubated for 15 min with the presence of EAa (A) or L7G (B) with various concentration, then the mixture was subjected to PLA₂ assay. Inhibition is expressed as a percent activity remained compared with the activity without samples. All determinations were duplicated and the 50% inhibitory concentration was obtained by linear regression analysis at 10-100 μg/ml (EAa) or 10-100 μM (L7G).

결과 IC₅₀ 값은 sPLA₂-IIA에 대하여서 100 μg/ml 이상을, sPLA₂-IIA에 대하여서는 약 100 μg/ml 정도를, cPLA₂ 효소에 대해서는 용량 의존적으로 저해하여 그 값은 60 μg/ml 정도였다. 한편 L7G의 IC₅₀ 값은 sPLA₂-IIA는 약 38 μM, sPLA₂-V에 대하여서 43 μM, 그리고 cPLA₂에 대해서도 약 42 μM의 값을 나타내었다.

한편 여러 검증성 동물모델 뿐만 아니라 각종 사람의 췌장염이나 류마티스 관절염환자의 관절액 중에 높은 sPLA₂-IIA 활성이 보고되어 본 효소의 저해제는 새로운 염증 치료제서의 가능성이 시사된바 있다.²⁵⁻²⁷⁾ 포유 동물 유래의 14KDa PLA₂는 크게 그들의 일차 아미노산 배열에 입각하

여 'pancreatic PLA₂'로 알려진 group I형과 'non-pancreatic PLA₂'로 알려진 group II형으로 분류된다. group I 효소는 지질의 소화와 주로 관계하며, group II 효소는 주로 류마티스성 관절염의 활액과 같은 염증 조직과 염증이 진행되는 기관 등에서 주로 분포하여 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 포유 동물의 group II형 효소로 type IIA, IIC, IID, V, X 등의 isozymes이 밝혀져 있다. 특히 이들 PLA₂는 염증, 세균으로부터의 생체 방어, 종양 억제와 exocytosis 등에서 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응은 세포막 인지질로부터 유리된 아라키돈산으로 생성된 각종 eicosanoids의 생성으로 비롯된다고 보고되었다.^{28,29)} 가죽나무 추출물에서 분리한 L7G는 sPLA₂ 중 특히, type IIA와 V에 대한 비교적 강한 저해 작용을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 따라서 가죽나무 추출물이나 이로부터 분리한 L7G는 각종의 염증질환치료에 유용하게 사용될 수 있음이 시사되고 있다.

사 사

본 연구는 BK21 과제 의해 수행되었으며, 김미화, 황남경, 홍태균, 김윤경, 정환기, 양주혜는 BK21 장학금 수혜자임.

인용문헌

- Ishizaki, J., Suzuki, N., Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., Kawamoto, K., Fujii, N., Arita, H. and Hanasaki, K. (1999) Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A₂s. *J. Biol. Chem.*, **274**: 24973-24979.
- Valentin E., Koduri R.S., Scimeca J.C., Carle G., Gelb M.H., Lazdunski M. and Lambeau G. (1999) Cloning and recombinant expression of a novel mouse-secreted phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **274**: 19152-19160.
- Vadas, P., Pruzanski, P. (1986) Biology of diseases. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of diseases. *Lab. Invest.*, **55**: 391-404.
- 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.
- 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.
- Forster, S., Ilderton, E., Norris, JFB. 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.
- 배기환 (2000) 한국의 약용식물, 293. 교학사, 서울

8. De, Feo, V., Martino, L. D., Santoro, A., Leone, A., Pizza, C., Franceschelli, S. and Pascale, M. (2005) Antiproliferative effects of tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle. *Phytother. Res.*, **19**: 226-230.
9. Crespi, Perellino, N., Guicciardi, A., Minghetti, A. and Speroni E. (1998) Comparison of biological activity induced by *Ailanthus altissima* plant or cell cultures extracts *Pharmacol. Res. Commun.*, **20**: 45-48.
10. Jin, M.H., Yook, J. M., Lee, E. K., Lin, C. X., Quan, Z., Son, K. H., Bae, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. (2006) Anti-inflammatory activity of *Ailanthus altissima* in ovalbumin-induced lung inflammation. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**: 884-888.
11. Kubota, K., Fukamiya, N., Hamada, T., Okano, M., Tagahara, K. and Lee, K. H. (1996) Two new quassinoids, ailantinols A and B, and related compounds from *Ailanthus altissima*. *J. Nat. Prod.*, **59**: 683-686.
12. O'Neill, M. J., Bray, D. H., Boardman, P., Phillipson, J. D., Warhurst, D. C., Peters, W. and Suffness M. (1986) Plants as sources of antimalarial drugs: in vitro antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**: 101-104.
13. Rahman, S., Fukamiya, N., Okano, M., Tagahara, K. and Lee K. H. (1997) Anti-tuberculosis activity of quassinoids. *Chem. Pharm. Bull., (Tokyo)*. **45**: 1527-1529.
14. Tamura, S., Fukamiya, N., Okano, M., Koyama, J., Koike, K., Tokuda, H., Aoi, W., Takayasu, J., Kuchide, M. and Nishino H. (2003) Three new quassinoids, ailantinol E, F, and G, from *Ailanthus altissima*. *Chem. Pharm. Bull., (Tokyo)*. **51**: 385-389.
15. Pieroni, A., Heimler, D., Pieters, L., van Poel, B. and Vlietinck, A. J. (1996) In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Pharmazie.*, **51**: 765-768.
16. Min, Y. S., Bai, K. L., Yim, S. H., Lee Y. J., Song, H. J., Kim, J. H., Ham, I., Whang, W. K. and Son, U. D. (2005) The Effect of Luteolin-7-O- β -D-Glucuronopyranoside on Gastritis and Esophagitis in Rats. *Arch. Pharm. Res.*, **29**: 484-489.
17. Kim, J. S., Kwon, C. S. and Son, K. H. (2000) Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **64**: 2458-2461.
18. Hawas, U. W. (2007) Antioxidant activity of brocchlin carboxylic acid and its methyl ester from *Chrozophora brocchiana*. *Nat. Prod. Res.*, **21**: 632-640.
19. Miceli, N., Taviano, M. F., Giuffrida, D., Trovato, A., Tzakou, O. and Galati, E. M. (2005) Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *J. Ethnopharmacol.*, **97**: 261-266.
20. Hu, C. and Kitt, D. D. (2004) Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **265**: 107-113.
21. Imoue, T., Sugimoto, Y., Masuda, H. and Kamei C. (2002) Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**: 256-259.
22. Murakami, M., Shimbara, T., Kambe, S., Kuwata H., Winstead, M. V., Tischfield, J. A. and Kudo, I. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**: 14411-14423.
23. Murakami, M., Kambe, S., Shimbara, T. and Kudo, I. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**: 31435-31444.
24. Dole, V.P. and Meinertz, H. (1960) Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissue. *J. Biol. Chem.*, **235**: 2595-2599.
25. Chang, H. W., Kudo I., Tomita M. and Inoue, K. (1987) Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from peritoneal cavity of caseinate-treated rat. *J. Biochem.*, **102**: 147-154.
26. Vadas, P., Pruzanski, W., Kim, J. and Fornasier, V. (1989) The proinflammatory effect of intra-articular injection of soluble human and venom phospholipase A₂. *Am. J. Pathol.* **134**: 807-811.
27. Vadas, P. and Pruzanski, W. (1986) Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* **55**: 391-404.
28. Nakatani, Y., Murakami, M., Kudo, I. and Inoue, K. (1994) Dual regulation of cytosolic phospholipase A₂ in mast cells after cross-linking of FC epsilon-receptor. *J Immunol.* **153**: 796-803.
29. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K. and Kudo, I. (1997) Regulatory functions of phospholipase A₂. *Crit. Rev. Immunol.* **17**: 225-283.

(2007년 7월 12일 접수)