

オーゴニン, バイカレインの生体膜に対する検討

金井 成行*, 織田真智子, 中西 由香, 唐 方, 阿部 博子

近畿大学東洋医学研究所・第I研究部門

Effects of wogonin or baicalein on biological membrane

Shigeyuki KANAI*, Machiko ORITA, Yuka NAKANISHI, Fang TANG, Hiroko ABE

*The Research Institute of Oriental Medicine Kinki University**(Received November 19, 1996. Accepted January 10, 1997.)*

Abstract

Effect of wogonin (Wo.) or baicalein (Bl.) extracted from *Scutellaria baicalensis* on hypotonic or hyperthermic hemolysis were investigated. High concentrations of both Bl. and Wo. damaged the membrane of erythrocyte and induced agglutination. On the contrary, low concentrations of Wo. indicated membrane stabilizing effects against both hypotonic and heat-induced hemolysis. Bl. also indicated membrane stabilizing effects against hypotonic hemolysis at low concentrations. However, Bl. showed biphasic effects, that is, lytic effects against heat-induced hemolysis. Low concentrations showed membrane stabilizing. The stabilization of cell membrane by both Wo. and Bl. might be the most feasible common mechanism in protective effects against CCl_4 and D-galactosamine induced liver injury.

Key words wogonin, baicalein, hypotonic hemolysis, heat-induced hemolysis, membrane stabilization.

Abbreviations Wo., wogonin ; Bl., baicalein.

緒 言

漢方生薬である黄芩より抽出精製されたオーゴニン (wogonin 以下 Wo. と略), バイカレイン (baicalein 以下 Bl. と略) は CCl_4 肝障害抑制作用¹⁾をはじめ培養癌細胞の B16 メラノーマ細胞の増殖抑制作用²⁾, 利尿作用および毛細血管透過性の抑制作用^{3, 4)}等が報告されている。このように, Wo., Bl. は生体の種々の臓器に多様な作用を示すことより, 各種臓器における細胞表層に何らかの作用を及ぼすことが推測される。今回我々は, 細胞膜モデルとして赤血球膜を用い, 赤血球膜に対する Wo., Bl. の作用を検討した。

材料および方法

(1) オーゴニン, バイカレインの抽出: オーゴニン (以下 Wo.), バイカレイン (以下 Bl.) は黄芩のメタノールエキスを常法⁵⁾に従い, エーテル抽出したものをヘキサンに溶解し, 更に SiO_2 カラムにて分離精製したものを使用した。

(2) 赤血球浮遊液の調整: 阿部ら⁶⁾の方法に従い, 体重 180-200 g の Wistar 系雄性ラットからヘパリン採血し, 生理食塩水で 2 回洗浄した血液を等張緩衝液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.26 g ; NaHPO_4 , 1.15 g, NaCl , 8.00 g in 1000 ml H_2O) で希釈し 40 % (v/v) の赤血球浮遊液を作製した。

(3) 溶血活性の測定: 等張緩衝液中に Wo., Bl. を各々 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ Mol/ml になるように混和し, 各々の溶液 3 ml 中に 20 μl の赤血球浮遊液を添加し, 室温で 20 分インキュベートした。インキュベート直後, 3000 g, 3 分遠沈して上清の吸光度を 540 nm で測定した。蒸留水 3.0

*〒589 大阪狭山市大野東377-2
377-2 Ohnohigashi, Osakasayama, Osaka 589, Japan

- (i) % hemolysis = $100 \times \frac{\text{O.D. in isotonic sol. containing Wo. or Bl.} - \text{O.D. in isotonic sol.}}{\text{O.D. in H}_2\text{O (as 100 \% hemolysis)} - \text{O.D. in isotonic sol.}}$
- (ii) % hemolysis = $100 - 100 \times \frac{\text{O.D. heatinduced hemolysis containing Wo. or Bl.} - \text{O.D. in isotonic un heat sol.}}{\text{O.D. in heat induced hemolysis not containing Wo. or Bl.} - \text{O.D. in isotonic un heat sol.}}$
- (iii) % hemolysis = $100 \times \frac{\text{O.D. in isotonic sol. containing Wo. or Bl.} - \text{O.D. in isotonic sol.}}{\text{O.D. in H}_2\text{O (as 100 \% hemolysis)} - \text{O.D. in isotonic sol.}}$

ml 中に 20 μ l の赤血球浮遊液を添加したものを 100 % 溶血, Wo. および Bl. を含まない等張緩衝液中に 20 μ l の赤血球浮遊液を添加したものの上清を Blank とし, 式 (i) より溶血率を求めた。

(4) 熱溶血保護作用の測定: $10^{-7} \sim 10^{-3}$ Mol 各種濃度の Wo. および Bl. を含んだ等張緩衝液 3 ml に 20 μ l の赤血球浮遊液を添加し, 54.5°C 20 分インキュベートした。インキュベート直後, 氷水中で冷却し 3000 g, 3 分遠沈して上清の吸光度を 540 nm で測定した。Wo., Bl. を含まない等張緩衝液中での溶血率を 100 とした時の各々の溶液中での溶血率を式 (ii) で算出した。

(5) 低張溶血保護作用の測定: $10^{-7} \sim 10^{-3}$ Mol/ml の各種濃度の Wo. および Bl. を含んだ低張緩衝液 (56 mM NaCl in 10 mM sodium phosphate buffer) 3 ml に 20 μ l の赤血球浮遊液を添加し, 室温で 20 分間インキュベートした。インキュベート後, 3000 g, 3 分遠沈して上清の吸光度を測定した。Wo., Bl. を含まない低張緩衝液中での溶血率を 100 とした時の各々の溶液中での溶血率は式 (iii) で計算した。

結 果

1. Wo. および Bl. の溶血活性

Wo. および Bl. 共に 10^{-4} Mol/ml より高濃度になると赤血球に対する障害性が現れ, 溶血を引き起こした。溶血率は Wo. および Bl. 共に小さいが, 赤血球自体が茶褐色に変色し, 凝集したような状態になった (Table I)。

2. 熱溶血保護作用

Wo. は $10^{-6} \sim 10^{-4}$ Mol/ml の濃度で, 熱溶血保護作用が認められた。Bl. は, $10^{-7} \sim 10^{-5}$ Mol/ml の濃度で保護作用を示したが, 10^{-5} Mol/ml より高濃度では逆に溶血促進作用を示した。

3. 低張溶血保護作用

Wo., Bl. 共に $10^{-6} \sim 10^{-4}$ Mol/ml の濃度で, 低張溶血保護作用が認められた (Fig. 1)。

Table I Measurement of hemolytic activity

(Mol)	5×10^{-3}	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}
Bl. (%)	8.3	4.2	0.5	0
Wo. (%)	4.8	2.3	0.3	0

(% hemolysis)

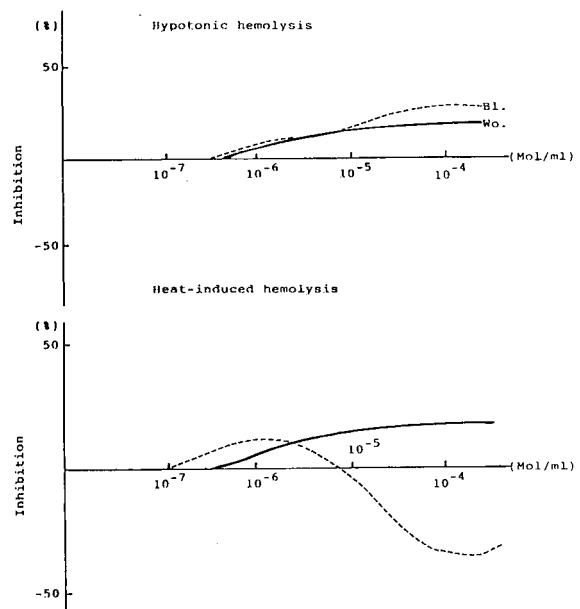


Fig 1 The stabilizing and lytic effects of Bl. or Wo. Points below 0.0 indicate the hemolysis and points above 0.0 the stabilization.

考 察

抗炎症作用を持つ薬物は、赤血球の低張溶血および熱溶血保護作用のある⁷⁾ことが報告されている。哺乳動物の細胞膜構造は基本的には同一と考えられており、この赤血球膜安定化作用はライソゾームやミトコンドリア膜に対しても同様の作用を示すと推測され、これが抗炎症作用のメカニズムの一つとして考えられている⁸⁾。

漢方薬及びその成分には合成薬品とは異なり、生体に対し多様な作用のある⁹⁾ことが報告されている。これらの生理活性を特定の作用にしばりこむことができないので、その薬理作用の解明が難しい。漢方薬の成分には、抗炎症作用のあるものが多いことより、生体膜モデルとして赤血球を用いて、溶血変化を見ることにより生薬成分の細胞膜に対する作用を検討した。その結果、合成抗炎症薬と同様に、種々の漢方薬成分に赤血球膜安定化作用が認められた。しかし生薬成分と化学薬品では、高濃度域における反応が異なり、化学薬品では濃度依存的に赤血球膜安定化作用が増強するが、漢方成分では低濃度域では溶血保護作用を示すものの、高濃度域では溶血亢進という二相性の反応を示した。

今回、Wo., Bl. のデータのみ示したが、この他に多数の漢方生薬成分について同様の検討を行っている。これら漢方成分の溶血活性及び熱・低張溶血保護作用は、様々なパターンを示し、各々の生薬成分の構造式と活性の相関は得られていない。しかし今回用いた Wo., Bl. の構造式が類似しているにも関わらず、その作用は明らかに異なっている。即ち Bl. において溶血活性が高く Wo. と等 Mol 濃度域において細胞膜障害が認められた。この赤血球膜に対する Wo., Bl. の作用と類似の作用は培養

癌細胞においても認められている²⁾。即ち Wo. に比べ Bl. では培養細胞の細胞増殖抑制作用が強く、高濃度では、細胞障害性が発現する。In vitro で赤血球膜に対する漢方生薬成分の作用を検討することにより、in vivo における生薬成分の生理作用の解明につながると考え、今後さらに多種多様な生薬成分の細胞膜に対する作用について比較検討が必要である。

References

- 1) Tsuchiya, S., Orita, M., Tani, T., Iinuma, M., Mizuno, M. and Abe, H. : Action mechanism of protective effects of crude drugs against CCl₄-hepatic injury. *Kampo & the Newest Therapy* **1**, 51-55, 1992.
- 2) Watanabe, K. : Inhibitory effects of baicalin and wogonin on the growth of B16 melanoma cells. *Acta Medica Kinki University* **21**, 377-385, 1996.
- 3) Koda, A., Nagai, H. and Wada, H. : Effect of Baicalin and Baicalin. *Nihon Yakugaku Zasshi* **194**, 57-75, 1970.
- 4) Lin, S.J., Tseng, H.H., Wen, K.C. and Suen, T.T. : Determination of gentiopicroside, mangiferin, palmitate, berberin, baicalin, wogonin and glycyrrhizin in the traditional Chinese medicinal preparation sann-joong-kuey-jian-tang by high-performance liquid. *J. Chromatogr. A* **730**, 17-23, 1996.
- 5) Kubo, M., Kimura, Y., Odani, T., Tani, T. and Namba, K. : Studies on scutellariae radix. Part : II. The antibacterial substance. *Planta Medica* **43**, 194-201, 1981.
- 6) Abe, H., Sakaguchi, M., Anno, M. and Arichi, S. : Erythrocyte Membrane Stabilization by plant Saponins and Sapogenins. *Arch Pharmacol* **316**, 262-265, 1981.
- 7) Abe, H., Arichi, S. and Odashima, S. : Effective Compounds of Crude Drugs and Membrane. *Proc. symp. WAKAN-YAKU* **15**, 216-220, 1982.
- 8) Abe, H., Konishi, H., Komiya, H., and Arichi, S. : Effects of Saikosaponins on Biological Membranes. *Planta Medica* **42**, 273-287, 1981.
- 9) Kanai, S. and Abe, H. : A significance of Kampo therapy for rheumatoid arthritis. *J. Joint Surgery* **10**, 1260-1264, 1995.