

식물 추출물로 부터 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme  
A Reductase의 활성저해제 탐색

이 윤 형 · \*\*신 용 목 · \*\*이 재 은 · \*최 용 순 · 이 상 영  
강원대학교 식품공학과, 응용생물공학과\* · 해태제과(주)\*\*

In vitro screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase inhibitor from plant extracts

Yoon-hyung Lee, Yong-mock Shin\*\*, Jae-eun Lee\*\*, Yong-soon Choi\*, Sang-young Lee  
Dept. of Food Science and Technology,  
\*Dept. of Applied Biology and Technology, Kangweon National University,  
\*\*Haitai Confectionary Co.

ABSTRACT

The objective of this in vitro study is to screen a possible inhibitor, originated from some chinese herb medicines, of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) reductase that is the major regulatory enzyme of hepatic cholesterol biosynthesis.

Fourteen kinds of herbal plant were extracted with water and evaporated for prescreening. The methanol extracts of the effective 3 kinds (9 species) were fractionated with chloroform, ethylacetate, butanol and water, and vacuum evaporated. The degree of inhibition of the extracts to HMG-CoA reductase activity was calculated by the spectrophotometric method using microsomal protein of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 42949 as an enzyme source. Among these samples, marked inhibitory effects were observed in the extracts of ethylacetate and chloroform fractions of the *Rosa rugosa* roots, and those of butanol, ethylacetate and water fractions of pine leaves. Also, the inhibitory effects of the extracts obtained from buckwheat shell and the roots of *Rosaceae* were found.

서 론

Cholesterol은 세포막의 구성성분은 물론 Steroid Hormone 및 담즙산의 전구체로서 생체기능 유지의 필수 성분이다(1). Cholesterol은 동맥경화의 원인물질(2-5)로서 알려져왔고 혈중 Cholesterol 농도가 높은 증상(고 Cholesterol 혈증)은 동맥 특히 심장 관상동맥경화의 원인으로서 궁극적으로 고혈압, 협심증, 심근경색 등의

심질환을 야기하게되고 뇌혈관에 있어서는 뇌혈전, 뇌경색등의 생명에 치명적인 질환을 야기하기도 한다.

이러한 순환기 질환의 예방 및 치료를 위해서는 고 Cholesterol 혈증을 개선하여야 하며 그 방법으로는 식사로부터 섭취하는 Cholesterol을 제한하는 영양학적인 방법과(2) 체내에서의 Cholesterol 합성을 조절하는 방법이 있다(6-7). 이 중 체내에서의 Cholesterol 합성 조절방법이 적극적인 조절방법으로 알려져 있다.

혈중 Cholesterol 농도의 조절을 위하여 개발된 약물로서는 Clofibrate, Cholestipol, Cholestyramin 등이 있으며 이들의 혈중 Cholesterol 농도저하 기능은 모두 장에서의 담즙산 분비를 증가 시키는 양식의 약물로서 효과의 미약성과 과량섭취의 불편으로 새로운 약물의 개발이 요구되어져 왔다.

1973년 Brown 등은 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-Co A)로 부터 Mevalonate로 전환시키는 효소인 HMG-Co A reductase가 Cholesterol 합성속도의 율속효소이며 HMG-Co A reductase 활성의 저하는 LDL-receptor의 활성을 증가시켜 혈청 콜레스테롤 농도를 감소시킨다는 기작을 발표하였다(9). 이와 관련하여 일본의 Endo 등은 Cholesterol 합성저해제를 탐색 Penicillium citrinum이 생산하는 Compactin이라는 HMG-Co A reductase의 특이적인 저해제를 발견하여 발표하였고, 그 후 Compactin의 유도체, Compactin의 미생물 전환 및 합성에 관한 연구(13-20)와 HMG-Co A reductase의 Inhibitor에 관한 연구가 계속 이루어져 왔다(21-23).

한편 A. Qureshi는 보리로부터 Cholesterol 생합성 저해제를 분리하여 구조를 결정한 결과 Tocotrienol 계열의 것을 확인 보고한바 있다(24).

여기에 본 연구자들은 부작용이 없는 혈중 Cholesterol 농도 저하 약물의 개발 목적으로 심혈관계 질환과 관련하여 전래되고 있는 한약재, 약용식물들 중에서 HMG-Co A reductase에 대한 저해제의 1차 탐색을 실시하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

약용식물은 경동 한약재 시장에서 구입하였으며 장미과뿌리류는 농촌진흥청 원예시험장에서, 솔잎류는 임목육종 연구소에서 채취하여 사용하였다. 실험에 사용된 재료는 Table. 1과 같다.

### 실험재료의 조제

#### 물 추출물의 조제

실험에 사용된 재료를 먼저 수세, 풍건, 세절하여 증류수 500ml에 재료 100g을 넣어 1시간동안 끓인후 상등액을 감압농축시켜 4℃에 보관하면서 10mg/ml로 용해하여 실험에 사용하였다.

#### 유기용매 추출물의 조제

실험에 사용된 재료를 먼저 수세, 풍건, 세절하여 Methanol로 추출한 다음 분별 분획에 의해 Chloroform,

Table. 1 List of test samples for screening of HMG-Co A reductase inhibitor

Herbal plants	
<i>Artemisia asiatica</i>	쑥
<i>Perilla frutescens</i>	소엽
<i>Plantago major</i>	차전자
<i>Aralia elata</i>	두릅
<i>Crataegus pinnatifida</i>	산사
<i>Fagopyrum rotundatum</i>	메밀
<i>Sanrurus loureiri</i>	삼백초
<i>Pueraria thunbergiana</i>	갈근
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	감초
<i>Morus alba</i>	쌍백(피)
<i>Siegesbeckia glabreseens</i>	회침
<i>Glycine max</i>	검은콩
Rosaceae	
<i>Rosa rugosa</i>	해당화
<i>Rosa multiflora</i>	찔레
<i>Rosa marretti</i>	인가목(장미)
Pinaceae	
<i>Pinus densiflora</i>	적송
<i>Pinus rigida</i>	리기다송
<i>Pinus koraiensis</i>	잣
<i>Pinus strobus</i>	스트로브 잣
<i>Pinus silvestris</i>	유럽송

Ethylacetate, Butanol, Water 층으로 극성의 차이에 의해 4분획으로 조제한 후 감압농축시켜 4℃에 보관하면서 실험 사용전에 10% Ethanol로서 10mg/ml로 용해하여 사용하였다. 분획방법은 Figure. 1에 나타내었다.

### Yeast의 배양

HMG-Co A reductase의 기원으로서는 Yeast의 Microsomal protein을 이용하였고(26) Yeast는 한국중관협회(KFCC)에서 구입한 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 42949를 사용하였다. 먼저 *S. cerevisiae* ATCC 42949를 Glucose 1%, Polypeptone 0.5%, Yeast extract 1% 배지에서 온도 30℃에서 Semianaerobic 상태에서 24시간 전배양한다음, Glucose 3%, Polypeptone 0.5%, Yeast extract 0.5%,  $K_2H_2PO_4$  0.5%에 전배양액 1%를 접종하여 30℃에서 15시간 배양하여 Microsomal protein (Crude HMG-Co A reductase)의 조제를 위하여 사용하였다.

### Microsomal protein의 제조

Yeast 배양액을 4,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후

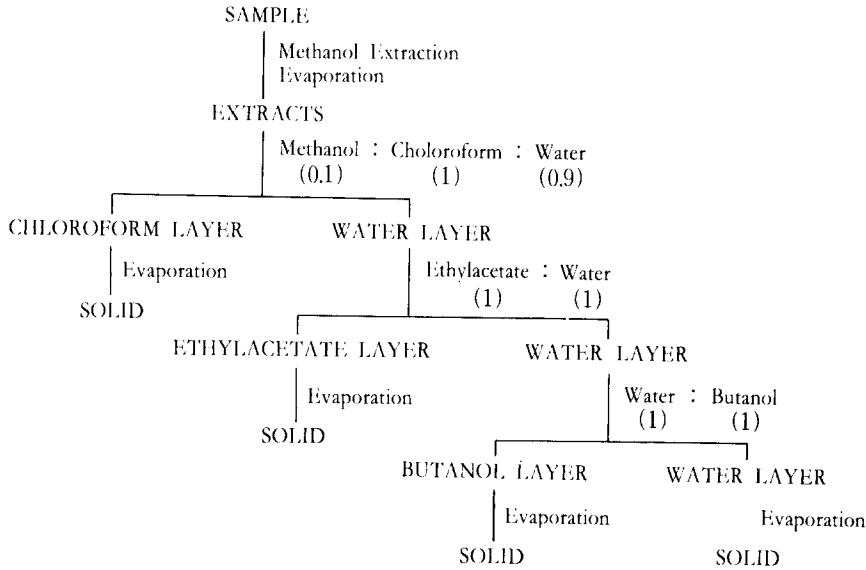


Fig. 1. Scheme of extraction and fractionation from plant samples

증류수(4℃)로 2회 세척하여 세포를 수집하여 20mM EDTA를 함유한 0.1M Triethanolamine buffer (pH 7.4)에 5-15% (w/v)되게 희석하였다. 이것을 Cell homogenizer로 10,000 psi에서 5분간 균질화 한후 mitochondria를 제거하기 위해 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 이 상등액을 34,000 rpm에서 90분간 초원심분리하여 Microsome을 얻었다. 분리한 Microsome은 2mM DTT를 첨가한 상기 Buffer로 세척한 후 -70℃에서 보관하면서 사용 전 Lowry 법(25)에 의해 protein을 정량하여 농도를 10mg/ml로 희석 조제하여 사용하였다.

**HMG-Co A reductase에 대한 저해활성 측정**

HMG-Co A reductase에 대한 저해활성은 Hulcher 및 Oleson 등의 분광분석 측정법(26)을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 반응액은 Microsomal protein 1mg, HMG-Co A 150 nmole, NADP 2μ moles, Glucose-6-phosphate 3μ moles, Glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 units로 조제하고 Test sample (10mg/ml) 100μl를 첨가하여 최종부피를 1ml가 되게 하였다. 반응은 Microsomal protein을 첨가하여 37℃에서 30분간 반응후 10mM sodium arsenite 용액을 20μl 첨가한 다음 1분후 3% sodium tungstate를 함유한 2M citrate buffer (pH 3.5)를 0.1 ml 첨가하여 37℃에서 10분간 정지하여 반응을 정지시킨 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 단백질을 제거하였다. 상등액 1ml를 취하여 2M Tris buffer(pH 10.6) 0.2ml과 2M Tris buffer (pH 8.0) 0.1ml를 첨가하여

반응액의 pH를 8.0으로 조절하였다. 여기에 0.4M sodium arsenite 50μl를 첨가하여 5분간 반응시켜 생성되는 Co A-SH를 Dithiol-arsenite complex를 형성시킨 다음 이 반응액 1ml를 취하여 1ml용 Cuvette에 옮기고 3mM DTNB 20μl 가한 후 412nm에서 흡광도를 측정하여 얻은 Absorbance/Time curve에서 직선부분을 외삽하여 절편값을 구하였다. 이렇게 해서 얻은 절편값을 아래식에 대입하여 Co A-SH의 생성량을 결정하였다.

$$\text{nmoles / min} = \frac{\Lambda(\text{reaction}) - \Lambda(\text{control})}{0.136 \times \text{time}} \times 1.43$$

여기에서 1.43은 희석배수이며 0.136은 Co A-SH의 Extinction Coefficient이다. 반응액 중에서 Glucose-6-phosphate 와 Glucose-6-phosphate dehydrogenase의 사용은 반응 system 중 NADPH를 공급하기 위한 것이며 이의 substrate로서 NADP를 첨가하였다. control은 NADP가 빠진 것을 사용하여 microsome내의 타 효소에 의한 영향을 배제하였다.

저해율은 시료를 넣지 않은 것의 Co A-SH 생성량에 대한 저해의 정도를 백분율로 환산하여 나타내었다. 저해 활성 측정 기본 양식은 Fig. 2와 같다.

**결과 및 고찰**

**물 Extracts의 HMG-Co A reductase에 대한 저해 활성**

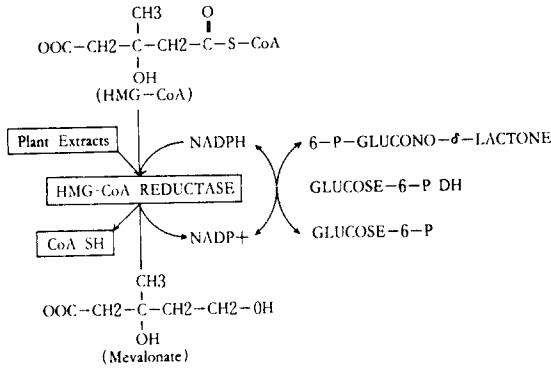


Fig. 2. Principles of HMG-CoA reductase inhibitor screening from plant extracts.

HMG-CoA reductase의 활성저해제를 탐색하기 위해 우선 Table. 1과 같이 고혈압과 관련하여 치료효능이 구전되어 오는 콩과 3종, 장미과 2종의 뿌리, 국화과 2종, 뽕나무과, 질경이과, 오갈피나무과, 마디풀과, 꿀풀과, 삼백초과, 소나무과 각 1종을 선정하여 물로 추출한 후 HMG-CoA reductase의 저해활성을 측정하여 예비실험을 하였다. 결과는 Table. 2와 같이 솔잎과 매밀 껍질에서 HMG-CoA reductase에 대하여 65.5%의 높은 저해활성을 나타내었으며 다음으로 회침이 47.1%, 갈근이 44.5% 정도의 비교적 높은 저해활성을 나타내었다. 그의

상백피, 차전자, 두릅, 쑥, 해당화 뿌리 등에서도 약간의 저해 활성이 관찰되었다.

한편 검정콩, 소엽등은 저해활성이 음의 값을 보이고 있어 이들은 HMG-CoA reductase를 오히려 활성화시키는 물질이라고 생각되어진다.

**장미과류 뿌리의 HMG-CoA reductase에 대한 저해 활성**

장미과류의 경우 해당화의 뿌리가 혈청 Cholesterol치를 낮춘다는 양 등의 연구결과(27)가 보고되고 있고 물 Extracts를 통한 예비실험에서도 약간의 저해활성을 나타내어 장미과 뿌리 (*R. rugosa*, *R. marretti*, *R. multiflora*)를 선정하여 Chloroform, Ethylacetate, Butanol, Water의 4분획으로 조제 각 분획별로 HMG-CoA reductase의 저해활성을 측정하였다. 측정결과는 Table. 3과 같이 해당화 뿌리의 경우 Chloroform 분획에서 가장 높은 71.8%의 저해 활성을 보였고 Ethylacetate 분획에서도 61.1%의 비교적 높은 저해활성을 나타내었다. 한편 양등의 연구결과(27)에서 해당화 뿌리의 혈청 Cholesterol치 저하작용의 주성분인 (+)-Catechin의 경우 HMG-CoA reductase의 활성에는 전혀 영향을 미치지 않았다. 양 등의 연구 결과와 비교해 볼 때 (+)-Catechin은 HMG-CoA reductase와는 관계없이 혈중 Cholesterol 농도를 조절하는 것으로 생각되어진다.

*R. marretti*의 경우 물분획에서는 82.8%의 저해활성을 나타내었으며 나머지 분획에서는 저해활성이 관찰되지

Table. 2 Inhibition rate against HMG-CoA reductase activity by plant water extracts

Samples	Specific activity (Co-A SH pmoles / min / mg protein)	Degree of inhibition (%)
<i>Artemisia asiatica</i>	88.7	6.7
<i>Perilla frutescens</i>	101.7	-5.9
<i>Plantago major</i>	65.5	31.8
<i>Aralia elata</i>	92.2	4.0
<i>Crataegus pinnatifida</i>	104.5	-8.9
<i>Fagopyrum rotundatum</i>	33.1	65.5
<i>Sanrurus loureiri</i>	109.3	-13.9
<i>Pueraria thunbergiana</i>	53.5	44.5
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	109.3	-13.9
<i>Morus alba</i>	81.3	15.3
<i>Siegesbeckia glabreseens</i>	50.8	47.2
<i>Glycine max</i>	104.8	-9.2
<i>Rosa rugosa</i>	76.8	20.0
<i>Pinus strobus</i>	33.1	65.5
Control	96.0	0.0

Table. 3 Inhibition rate against HMG-Co A reductase activity by Rosa root extracts

Samples	Fractions	Specific activity (CoA-SH pmoles / min / mg protein)	Degree of inhibition (%)
<i>R. rugosa</i>	Water	54.7	20.0
	Butanol	23.3	66.0
	Ethylacetate	26.6	61.1
	Chloroform	19.3	71.8
<i>R. marretti</i>	Water	11.8	82.8
	Butanol	74.2	-8.5
	Ethylacetate	76.9	-12.5
	Chloroform	74.4	-8.7
<i>R. multiflora</i>	Water	1.0	98.5
	Butanol	1.7	97.5
	Ethylacetate	0.9	98.6
	Chloroform	62.3	9.1
(+) - Catechin		68.4	0.0
Control		68.4	0.0

Table. 4 Inhibition rate against HMG-Co A reductase activity by Pinus leaf extracts

Samples	Fractions	Specific activity (CoA-SH pmoles / min / mg protein)	Degree of inhibition (%)
<i>P. rigida</i>	Water	63.9	49.8
	Butanol	29.9	76.5
	Ethylacetate	12.6	91.1
	Chloroform	140.8	-10.7
<i>P. densiflora</i>	Water	139.5	-9.7
	Butanol	135.3	-6.4
	Ethylacetate	55.7	56.2
	Chloroform	135.1	-6.2
<i>P. silvestris</i>	Water	133.1	-4.6
	Butanol	56.4	55.7
	Ethylacetate	37.9	70.2
	Chloroform	134.3	5.6
<i>P. strobus</i>	Water	109.4	14.0
	Butanol	7.0	95.5
	Ethylacetate	18.0	98.6
	Chloroform	107.3	15.6
<i>P. koraiensis</i>	Water	43.9	65.5
	Butanol	29.8	76.6
	Ethylacetate	29.0	77.2
	Chloroform	136.7	-7.5
Control		127.2	0.0

않았다. 짙레인 *R. multiflora*의 경우는 모든 분획에서 저해활성을 나타내었으며 Water, Ethylacetate 분획에서는 98%내외의 저해활성을 나타내었으며 Chloroform의 경우는 9.1%의 비교적 낮은 저해활성을 나타내고 있어 장미과류의 뿌리는 대부분 HMG-CoA reductase 저해활성이 있는 것으로 보인다.

#### 소나무과류 잎의 HMG-Co A reductase에 대한 저해활성

물 extracts를 통한 예비 실험에서 가장 좋은 저해활성을 보인 소나무과류중 국내에서 가장 많이 조립되어 있는 *P. densiflora*(적송) *P. koraiensis*(갯) *P. rigida*(리기다 송) *P. strobus*(갯의 일종) 및 유럽송인 *P. silvestris* 5종을 선정하여 극성별로 분획한 후 각 분획별로 HMG-Co A reductase의 저해 활성을 측정하였다.

측정결과는 Table. 4와 같이 적송(*P. koraiensis*), 리기다송(*P. rigida*)의 잎의 경우 chloroform 분획을 제외한 모든 분획에서 비교적 높은 저해 활성을 나타내었으며 이중 리기다송의 Ethylacetate 분획에서 가장 높은 91.1%의 저해활성을 나타내었다. 잣나무의 일종인 *P. strobus* 도 모든 분획에서 저해 활성이 나타났으며 특히 Butanol, Ethylacetate 분획에서는 95% 이상의 높은 저해활성이 관찰되었다.

한편 2엽송인 적송 (*P. densiflora*)과 유럽산인 *P. silvestris*의 잎은 Butanol 분획에서만 56% 정도의 저해활성을 보일 뿐 나머지 분획에서는 저해 활성이 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 재래종인 2엽송 보다는 5엽송인 잣나무류의 잎이 저해활성이 더 높은 것으로 생각되어진다.

#### 메밀껍질의 HMG-Co A reductase에 대한 저해활성

물추출물에서 가장 높은 활성을 나타낸 메밀껍질을 Water, Butanol, Ethylacetate, Chloroform 4분획으로 조제하여 HMG-Co A reductase에 대한 저해활성을 측정한 결과는 Table. 5와 같이 물분획에서는 활성이 관찰되지 않고 Butanol, Ethylacetate 분획에서 50% 정도의 저해활성이

관찰 되었으며 Chloroform 분획에서는 저해활성이 관찰되지 않았다.

이상과 같이 체내의 Cholesterol 생합성에 있어서 중요한 효소인 HMG Co-A reductase의 활성 저해제를 탐색하기 위해 한약재 및 민간 요법제 중에서 1, 2차 Screening 한 결과 HMG Co-A reductase의 저해활성이 장미과 중에서는 해당화 및 짙레의 뿌리, 솔잎류, 메밀껍질등에서 관찰되고 있다. 한편 Fraction 별로 보면 물분획이나 Chloroform 분획보다는 Ethylacetate, Butanol 분획분의 저해활성이 높은 것으로 관찰되고 있다. 이는 저해활성물질이 어느 정도의 극성을 갖는 물질이 아닌가 생각되어진다. 이러한 결과들은 단지 in vitro 상에서의 결과이므로 앞으로 in vivo test 즉 동물실험 및 주성분의 분리, 정제, 구조결정등 많은 연구를 통하여 작용기작등을 규명해나가야 할 것으로 생각된다.

#### 요 약

체내의 Cholesterol 생합성에 있어서 가장 중요한 효소인 HMG-Co A reductase의 활성저해제를 탐색하기 위해서 심혈관질환 치료제로 사용되는 한약재 및 민간요법제중 우선 14종을 선정하여 물추출물(Extracts)를 조제하여 HMG-Co A reductase에 대한 저해활성을 1차 Screening 한 결과 솔잎, 메밀껍질, 해당화 지하부 등에서 높은 저해활성이 관찰되었다.

2차 Screening에서는 1차 Screening에서 좋은 결과를 보인 솔잎류, 장미과류, 메밀껍질에 대해 극성의 차이에 따라 Chloroform, Ethylacetate, Butanol, Water 순으로 분획시켜 각 분획별로 HMG-Co A reductase에 대한 저해활성을 측정한 결과 소나무과류 잎의 경우 모든 종에서 Ethylacetate 및 Butanol 분획이 높은 저해활성을 보였으며 이중 *P. strobus*의 Ethylacetate 분획에서 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 장미과류 지하부의 경우 *R. multiflora*에서는 chloroform 분획을 제외한 타 분획에서 높은

Table. 5 Inhibition rate against HMG-Co A reductase activity by *F. rotundatum* (buckwheat) shell extracts

Samples	Fractions	Specific activity (CoA-SH pmoles / min / mg protein)	Degree of inhibition (%)
<i>F. rotundatum</i>	Water	106.9	63.4
	Butanol	47.0	54.5
	Ethylacetate	49.1	52.5
	Chloroform	121.6	-17.6
Control		103.4	0.0

저해활성을 보였다.

### 참 고 문 헌

1. 이상영, 최용순 (1990), 콜레스테롤, 신광출판사, 서울
2. 菅野道廣(1990), 食品工業, 33(2), 26
3. P. Cotton(1988), Medical world news, November 14, 40
4. D. Krichevsky(1978), Cereal feeds World, 23(5), 245
5. D. H. Blankenhorn, S. A. Nessim, R. L. Johnson, M. E. Sanmarco, S. P. Azen, L. Cashin-Hemphill(1987), JAMA, 257(23), 3233
6. A. Endo(1985), J. medical chemistry, 28(4), 401
7. A. Endo(1985), 油化學, 34(5), 335
8. A. Endo(1979), 化學と生物, 17(10), 672
9. M. S. Brown, S. E. Dana, J. M. Dietschy, M. D. Siperstein(1973), J. biol. chem. 248(13) 4731
10. M. S. Brown, P. T. Kovanen, J. L. Goldstein(1981), Science, 212(8), 628
11. A. Endo, M. Kuroda, K. Tanjawa(1976), FEBS Letters, 72(2), 323
12. A. Endo, M. Kuroda, Y. Tsujita(1976), J. antibiotics, 29(12), 1346
13. A. Endo(1980), J. antibiotics, 33(3), 334
14. G. Alberts-Schonberg, H. Joshur, M. B. Lopez, O. D. Hensens, J. P. Springer, (1981), J. antibiotics, 34(5), 507
15. N. Serizawa, K. Nakagawa, K. Hamano, Y. Tsujita, A. Terahara, H. Kawano(1983) J. antibiotics, 34(5), 604
16. H. Yamashita, S. Tsubokaya, A. Endo(1985), J. antibiotics, 38(5), 605
17. A. Endo, H. Yamashita(1985), J. antibiotics, 38(3), 328
18. A. Endo, K. Hasumi, A. Yamada, R. Shimoda, H. Takeshita(1986), J. antibiotics, 39(11), 1609
19. D. Komagata, H. Yamashita, A. Endo(1986), J. antibiotics, 39(11), 1574
20. N. Serizawa, K. Nakagawa, Y. Tsujita, A. Terahata (1984), Agric. Biol. Chem., 48(10), 2581
21. M. Kuroda, A. Endo(1977), Biochimica et Biophysica Acta., 486, 7017(12), 956
22. F. Ishida, A. Sato, Y. Iizuka, Y. Sawasaki, A. Aiawa, T. Kamei(1988), Biochimica et Biophysica Acta., 963, 35
23. A. A. Qureshi, W. A. Burger, D. M. Peterson, C. E. Elson(1986), J. Biol. Chem., 261(23), 10544
24. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall(1951), J. Biol. Chem., 193, 265
25. F. H. Hulcher, W. H. Oleson(1973), J. Lipid res., 14, 625
26. 양한석, 박종철, 최재수, 정해영(1987), 약학회지, 31(6), 394.

(Received; March 14, 1991, Accepted; April 30, 1991)