

간염 치료제인 민간제제의 성분 분석 및 생리 활성 검색

김승호* · 이종우 · 이현선¹ · 함경수

한국과학기술연구원 유전공학연구소 단백질화학연구실, ¹미생물공학연구실

Component Analysis and Determination of Bioactivity of Oriental Therapeutic Drug for Hepatitis B

Kim, Seung-Ho*, Jong-Woo Lee, Hyun-Sun Lee¹ and Kyung-Soo Hahm

Lab. of Protein Chemistry and ¹Microbiological Technology,

Genetic Engineering Research Institute,

KIST, P.O. Box 17, Taeduck Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — An oriental drug, named NP-S, traditionally used as a therapeutic agent for hepatitis B was characterized by separating into volatile and non-volatile fractions. The volatile fraction contained ammonia as determined by ammonia kit and eight peaks when it was analyzed by gas chromatography that are not identified yet. The elemental analysis showed that the non-volatile fraction contained 15.5% carbon, 4.8% hydrogen, 11% nitrogen, and 10% sulfur along with a few trace elements such as Cl, Si, Mg and Zn. NP-S contained 6.7% peptide, 0.3% free amino acids such as Lys, Pro, Arg, Ile, Tyr, Phe, His, Thr and Ser and 0.1% inorganic phosphate. The drug showed antimicrobial activity against *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and also had antioxidant activity when thiobarbituric acid reacting substances(TBARS) method was applied.

우리나라에서 높은 빈도로 발생하는 간 질환은 완전한 치료가 힘들고 일단 발병하게 되면 악화 가능성이 높으며 심하면 사망에까지 이르게 되므로, 오래전부터 간 질환 치료제 및 백신의 개발에 많은 관심과 노력이 집중되어 왔다. 특히, 간경변증 및 간암은 hepatitis B virus로 인한 만성 활동성 간염으로부터 시작되는 것이 대부분으로 B형 만성 활동성 간염의 예방 및 조기 치료는 중요하다. 백신은 일반적으로 병원균 바이러스를 배양하여 이것을 약독화하거나 생식 능력을 저하시키는 방법으로 제조되는데, 현재는 이러한 종래의 백신 제조법을 개선하여 바이러스의 표면 항원 단백질을 추출하여 정제하거나, 유전공학을 통하여 표면 항원 단백질을 만들어서 이용하거나(1, 2), 인공 합성하여 백신으로서의 활성을 높이는데 주력하고 있다(3, 4).

최근 많은 보고에서 B형 만성 간염에 대한 치료

제로 adenine arabinoside(5, 6), adenine arabinoside monophosphate(7) 등과 항바이러스 효과와 면역 조절 능력이 있는 것으로 알려진 interferon(8-10)이 이용되고 있다. 특히 interferon은 간염 치료제로서 세계적으로 널리 사용되고 있지만, 고가의 치료비용 등 여러 문제점을 안고 있다. 현재까지 만족할 만한 간염 치료제의 개발이 미비하기 때문에 간염 치료는 충분한 휴식과 식이요법이나 민간요법에 의존하고 있는 실정이다. 최근, 우리나라의 민간요법 중 사람의 모발을 전처리하여 얻은 혼합물(NP-S)이 간 질환 치료제로서 개발 가능성이 있는 것으로 추정되어 본 연구에서는 이 혼합물을 약제로서 개발할 가능성을 탐색하기 위한 기초 자료로서 성분 분석과 항균 활성 및 항산화 활성을 측정하였다(11).

재료 및 방법

실험재료

간염 치료제로서 사용해 온 민간제제인 NP-S는

Key words: Hepatitis, antimicrobial activity, antioxidant

*Corresponding author

사람의 모발을 밀폐된 용기에서 고열로 가열하여 얻은 추출물로서, 부산의 동화의원으로부터 공급받았다. 이 NP-S를 한외여과법(ultrafiltration)에 의하여 1000과 500의 분자량 크기로 분획하여, 각각의 여과물을 NP-S(l)10과 NP-S(l)5로 명명하였고, 1000이상의 분자량 크기를 갖는 상등액을 투석(cut-off 3500)하여 NP-S(h)10으로 명명하였다.

시약 및 기기

Egg phosphatidylcholine(PC)과 thiobarbituric acid는 Sigma사에서, 항균 활성을 측정하기 위한 paper disc는 Toyo Seisakusho사에서 구입하였고, 기타 여러 유기 용매들은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. 암모니아의 정량을 위하여 Wako사의 Ammonia 정량 kit를 사용하였다.

사용한 기기는 Beckman사의 DU-70 spectrophotometer와 System 6300 amino acid analyzer, Jasco사의 FP-770 spectrofluorometer, Hewlett-Packard사의 5890 Series II gas chromatograph, Kratos사의 Concept-1S magnet sector type mass spectrometer, Carlo Erba Instrument사의 EA1108 elemental analyzer, Bruker사의 AMX500 nuclear magnetic resonance, Perkin-Elmer사의 AA 3100 atomic absorption spectrophotometry를 사용하였다.

항균 활성 측정

50 μ l의 NP-S를 직경 8 mm의 paper disc에 흡수시킨 후 검정 plate에 올려놓은 다음 37°C (*Candida albicans*의 경우에는 27°C)에서 24시간 배양하여 생성된 생육저지환의 직경을 측정하여 항균력을 조사하였다.

항산화 활성 측정

NP-S의 항산화 활성을 TBARS(thiobarbituric acid reacting substances)법으로 측정하였다(12). 과산화의 기질로는 egg PC로 구성된 리포솜을 사용하였으며, 지질의 과산화를 254 nm의 자외선(57.43 mW/cm²)으로 유발시켰다. 리포솜의 제조는 초음파 법을 사용하였다. 즉, chloroform에 녹아 있는 30 mg의 egg PC를 vial에 담고 질소 가스를 불어넣어 얇은 막을 형성시킨 다음 3 ml의 10 mM Tris buffer(pH 7.2, 0.1 M NaCl)를 첨가하고 vortex한 후 10분간 초음파 처리하여 제조하였다. 리포솜 용액에 5%(v/v)에 해당되는 양의 시료를 첨가한 후, 시간의 경과에 따라

0.2 ml씩을 취하여 TBARS법에 의해 532 nm에서의 흡광도로 항산화 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

NP-S의 성분 분석

NP-S는 pH 9.5~11인 투명한 황갈색 액체로 강한 냄새를 가지고 있으며, 1000배 희석하여 자외선 흡수 스펙트럼을 조사해 보면 230 nm에서 최대 흡광도를 보였고, 이 파장에서 excitation시켜서 형광 스펙트럼을 조사해 보면 312 nm와 325 nm에서 emission peak가 나타났다. NP-S를 간염 치료제로 사용할 경우, 1회에 5 ml NP-S를 10배 희석하여 경구 투여하는데, NP-S의 휘발성 물질이 없어지면 약효가 떨어지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 휘발성 물질이 약효에 직접적이거나 간접적으로 관련되어 있을 것으로 예상되어 휘발성 물질을 분석하였다.

아미노산을 아미노산 분석기로 분석할 때에 아미노산과 함께 암모니아를 검출할 수 있는데, NP-S를 가수분해한 후 아미노산을 분석한 결과 상당히 많은 양의 암모니아를 검출되었다. 따라서, 암모니아의 분석용 kit로 암모니아를 정량한 결과, NP-S에 2.11 M의 암모니아를 존재하였다. 통상적으로 용액은 이렇게 많은 양의 암모니아에 의하여 강 알칼리로 유지되는데 NP-S의 pH는 9.5~11를 유지하므로, NP-S에는 산성을 띠는 다른 물질이 상당량 존재할 것으로 보인다. 또 다른 휘발성 물질을 분석하기 위하여, NP-S를 밀폐된 용기에 넣은 후 기체층을 취하여 암모니아를 검출하지 않는 FID 검출기로 기체 크로마토그램을 조사해본 결과 8개의 peaks가 나타났다(Fig. 1). 본 연구에서는 각 peak에 해당되는 물질을 확인하지는 못했으나, 이 결과는 NP-S가 암모니아 이외에 최소한 8개의 다른 휘발성 물질을 함유하고 있음을 지적한다. 이러한 기체 혼합물을 증류수에 재용해시킨 후 자외선 흡수스펙트럼을 조사한 결과 NP-S의 기체 혼합물은 NP-S의 원액과 마찬가지로 230 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 동일 시료의 FAB-Mass에 의한 질량 분석 결과로부터 기체 혼합물 중 제일 큰 물질의 분자량은 399로 추정되었다(Fig. 2). 한편, 앞에서 얻은 기체 혼합물을 중수(D₂O)에 재용해시킨 후 H¹-NMR로 분석해 본 결과에서 기체 혼합물은 aromatic group을 함유하고 있지 않는 aliphatic 화합물의 혼합물임을 알 수 있었다.

한편, NP-S를 동결 건조한 후의 원소 분석에 의

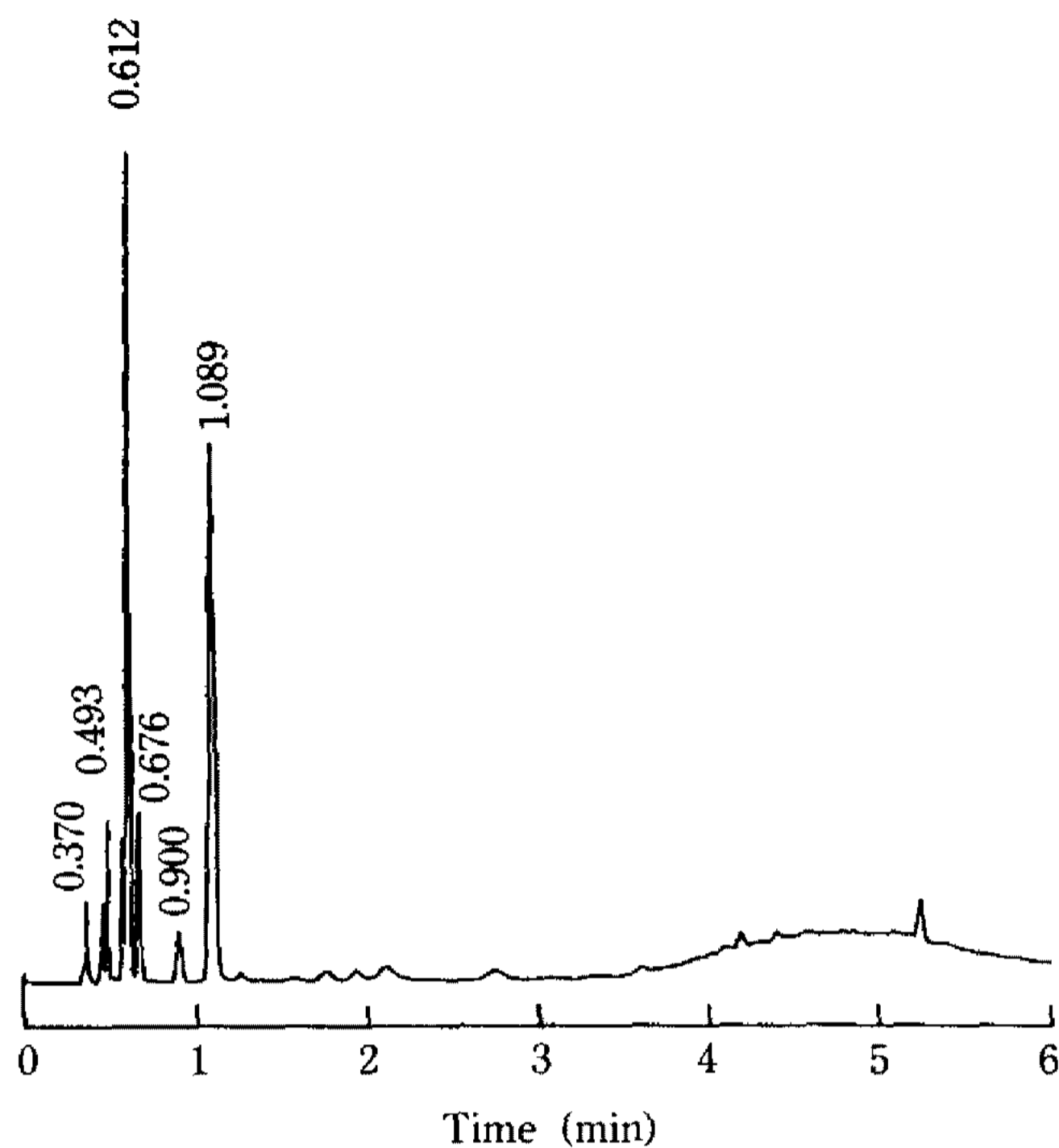


Fig. 1. Gas chromatograph of volatile material in NP-S.

After NP-S was enclosed into sealed bottle, 100 μ l from the gas phase was applied to a HP1 fused silica capillary column (5 m \times 0.35 mm \times 2.65 μ m, flow rate of 20 ml/min). Temperature was programmed from 30 $^{\circ}$ C (3 min) to 130 $^{\circ}$ C at 50 $^{\circ}$ C/min.

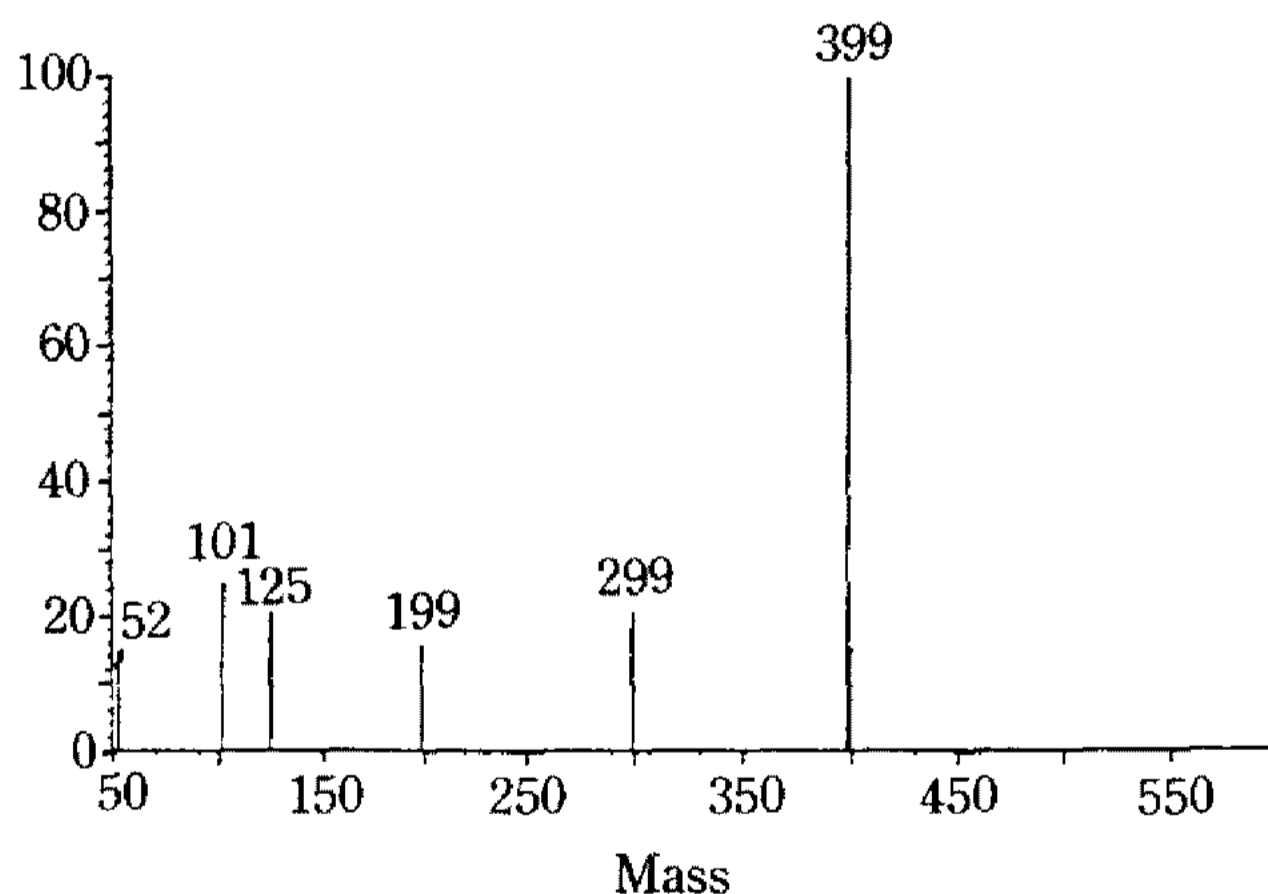


Fig. 2. FAB mass spectrum of volatile materials in NP-S.

하면, 탄소(C)가 15.5%, 수소(H)가 4.8%, 질소(N)가 11%, 황(S)이 10% 존재하였다. 한외여과법으로 분자량에 따라 NP-S를 분획하여 원소 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. NP-S, NP-S(l)10, NP-S(l)5에서는 황(S)의 함량이 높은 반면, NP-S(h)10에서는 황(S)이 전혀 검출되지 않았다. 또한, NP-S에 존재하는 미량 원소를 분석한 결과, Cl, Si, Mg, Zn 등이 검출되었다.

Table 1. Elemental analysis of NP-S, NP-S(h)10, NP-S(l)10 and NP-S(l)5

	C %	H %	N %	S %
NP-S	15.5	4.8	11.0	10.0
NP-S(h)10	45.8	5.7	13.3	0.0
NP-S(l)10	13.3	4.3	9.3	8.8
NP-S(l)5	8.1	3.7	9.0	11.4

Table 2. Summary of NP-S composition

Dry weight:	37.2 mg/ml
Elemental analysis:	C/H/N/S=15.5/4.8/11/10
Polypeptides and peptides:	2.51 mg/ml
Free amino acids	: 0.097 mg/ml
Lysine	: 0.039 mg/ml
Proline	: 0.021 mg/ml
Arginine	: 0.011 mg/ml
Isoleucine	: 0.010 mg/ml
Tyrosine	: 0.006 mg/ml
Phenylalanine	: 0.005 mg/ml
Histidine	: 0.002 mg/ml
Threonine	: 0.001 mg/ml
Serine	: 0.001 mg/ml
Inorganic phosphate	: 0.03 mg/ml
Ammonia	: 2.11 M
Trace elements	: Si, Mg, Cl, Zn
Unknown materials	: dry weight 34.56 mg/ml
	8 volatile materials

NP-S에 존재하는 생체 고분자의 존재 여부를 조사한 결과, 펩타이드가 6.7%, 유리 아미노산이 0.3%, 무기 인산염이 0.1% 존재하였고, 지질과 탄수화물은 검출되지 않았다. NP-S의 재료로서 모발을 사용하였다는 사실로부터 예측할 수 있듯이 NP-S에 존재하는 생체 고분자 물질은 주로 펩타이드성 물질이었다.

NP-S의 성분 분석을 정리한 Table 2로부터 두가지 특이한 결과를 볼 수 있는데, 하나는 유리 아미노산의 적은 양에 비해 상당히 많은 양의 암모니아가 존재한다는 것이고, 다른 하나는 원소 분석의 결과에서 보여 주는 바와 같이 황(S)의 함량이 일반적인 단백질의 경우에 비해 상당히 많은 양 존재한다는 것이다. 사람의 모발은 단백질인 α -keratin으로 구성되어 있으므로 많은 양의 암모니아는 NP-S의 제조 과정중 고열 처리 과정에서 아미노산의 아민기가 해리되어 생성될 가능성이 많은 것으로 보인다.

Table 3. Antimicrobial activities of NP-S

Test organisms	Activity ¹⁾ (50 μ l)
<i>Escherichia coli</i> AB 1157	— ²⁾
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA-209P	15
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	18
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13
<i>Aspergillus niger</i>	—
<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 5293	—
<i>Pyricularia oryzae</i> IFO 577	—
<i>Alternaria mali</i>	—
<i>Phytophthora capsici</i>	—
<i>Penicillium chrysogenum</i> KTCC 1262	—

¹⁾Diameter of inhibition zone size (mm)

²⁾No inhibition of growth

NP-S의 항균 활성 분석

Table 3에서 보여 주는 바와 같이 12가지의 시험 균주 중 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*와 그람 음성균인 *Salmonella typhimurium* 그리고 진균인 *Candida albicans*에 항균 활성을 보여주었다.

NP-S의 항산화 활성 분석

NP-S를 동결 건조시킨 후 50% 메탄올로 용해시키고 불용성 물질을 제거한 용액이 항산화 활성을 가지고 있음이 보고되어졌다(11). 이 보고에서는 항산화 활성이 TLC상에서 molybdophosphoric acid에 의해 검출되었고 *o*-phenylenediamine과 과산화수소에 의한 발색 반응으로 검색되었다. 본 연구에서는 NP-S 원액의 항산화 활성을 TBARS법으로 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, NP-S는 약 2시간의 lag time을 갖는 항산화 활성을 보여 주었다. NP-S(1)10과 NP-S(1)5는 NP-S보다는 약간 활성도가 떨어지지만 아직도 항산화 활성을 가지고 있었으나, NP-S(h)10은 항산화 활성을 가지고 있지 않았다. 이러한 결과로부터, 항산화 활성을 가지고 있는 물질은 분자량이 500 이하인 작은 물질일 것으로 여겨진다. 山中들의 보고에 의하면 xanthine oxidase-neotetrazolium법으로 총 superoxide dismutase(SOD) 활성과 malondialdehyde(MDA) 치를 측정된 결과 SOD와 MDA가 간염 환자의 지방간에서 35% 정도 증가하고, 만성 간염 질환자의 혈청에서는 28~43%, 알콜성 간염에서는 22%의 SOD 활성이 증가하고 있는 것을

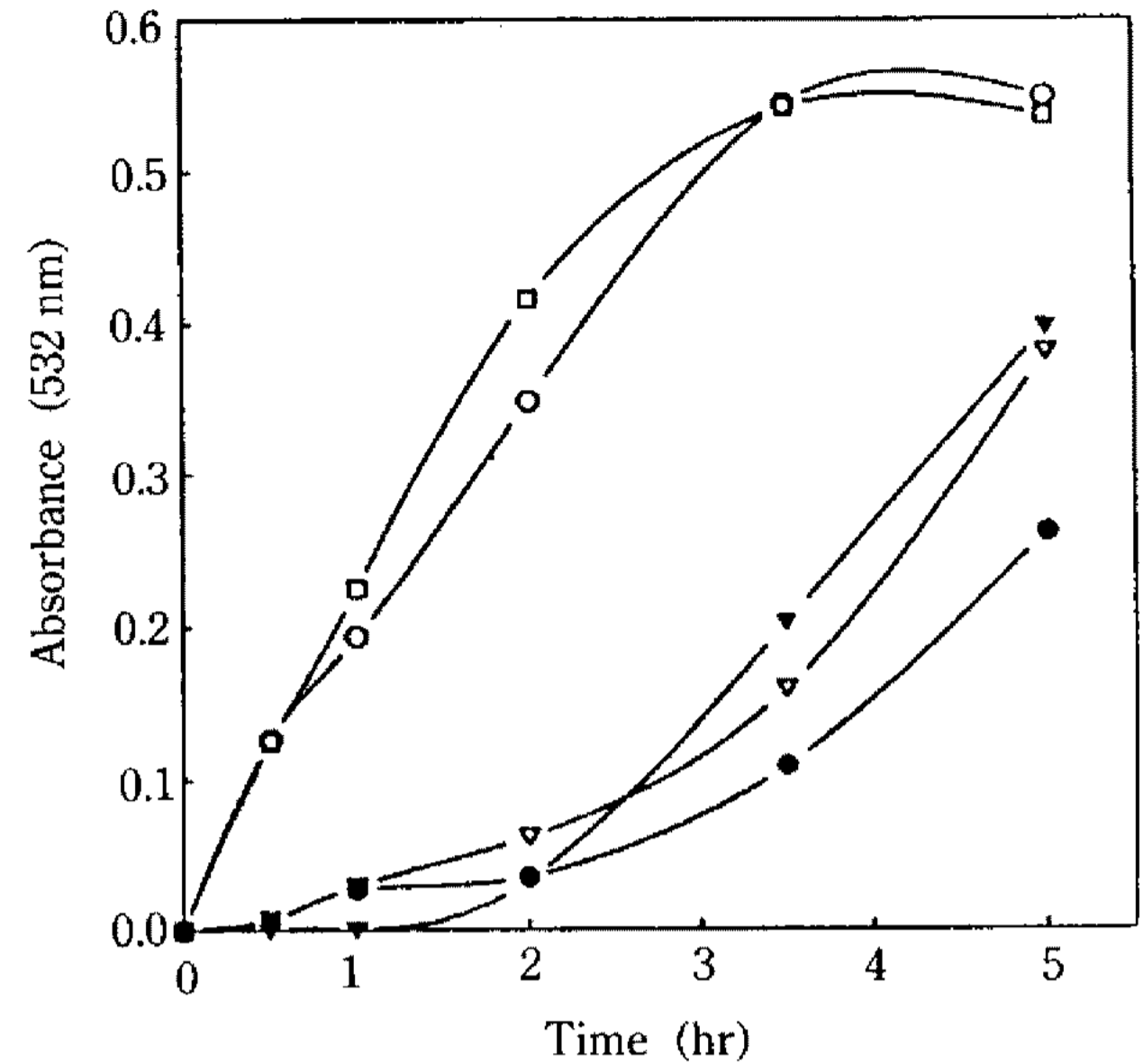


Fig. 3. Antioxidant activity against lipid peroxidation of PC liposome.

—○—: only PC liposome, —●—: NP-S, —□—: NP-S(h)10, —▽—: NP-S(1)10, —▼—: NP-S(1)5

확인하였으며(13), 沢木들은 효소 항체분석법(EIA)과 cytochrome c법으로 측정된 결과 간염 환자의 혈청에서 SOD의 증가를 확인하였다(14). 이러한 결과들로부터, 간염이 생체내에서 활성 산소의 생성을 촉진하기 때문에 이러한 활성 산소에 의한 세포 손상을 보호하기 위해 SOD가 증가되어지는 것으로 보여진다. 따라서, 항산화 활성을 가지고 있는 NP-S는 간염 치료제로서의 효과와 상관관계가 있을 것으로 보여지며, NP-S로부터 항산화 활성을 나타내는 물질의 확인이나 또다른 활성 물질을 찾는 것은 간염 치료제의 고안에 중요한 기초가 될 것으로 기대한다.

요 약

본 연구에서는 간염 치료제로 효과가 있는 민간제제(NP-S)의 성분 분석 및 항균 활성과 항산화 활성을 연구하였다. 이 NP-S는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*와 그람 음성균인 *Salmonella typhimurium* 그리고 진균인 *Candida albicans*에 항균 활성을 보여주었을 뿐만 아니라, 지질의 과산화를 억제하는 항산화 활성을 나타냈다. 이러한 NP-S는 C/H/N/S의 원소비가 15.5/4.8/11/10으로 황(S)이 상당히 많이 존재하고 있으며, 휘발성 물질인 암모니아를 2.11 M 함유하고 있었다. 이 외에도 6.7%의 펩타이드, 0.3%의 유리 아미노산, 0.1%의 무기 인산염을 함유하고 있

으며, 미량 원소로서 Cl, Si, Mg, Zn도 함유하고 있다.

사 사

본 연구는 특정연구개발사업(G70490)에 의해 수행되었으며, 본 실험에 도움을 주신 김환묵 박사와 기기분석에 도움을 주신 문성환, 박규환, 정동호씨에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Offensperger, W., S. Wahl, A.R. Neurath, P. Price, N. Strick, S.B.H. Kent, J.K. Christman and G. Acs. 1985. Expression in *E. coli* of a cloned DNA sequence encoding the pre-S2 region of hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7540-7544.
2. Schödel, F., D.R. Milich and H. Will. 1990. Hepatitis B virus nucleocapsid/pre-S2 fusion proteins expressed in attenuated *Salmonella* for oral vaccination. *J. Immunol.* **145**: 4317-4321.
3. Lerner, R.A. 1983. Synthetic vaccines. *Sci. Am.* **248**: 48-56.
4. Tam, J.P. and Y.A. Lu. 1989. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 9084-9088.
5. Pollard, R.P., E.A. Smith, E.A. Neal, P.B. Gregory, T.C. Merigan and W.S. Robinson. 1978. Effect of vidarabine on chronic hepatitis B virus infection. *JAMA.* **239**: 1648-1650.
6. Bassendine, M.F., R.G. Chadwick, J. Salmerson, U. Shipton, H.C. Thomas and S. Sherlock. 1981. Adenine arabinoside therapy in HBsAg-positive chronic liver disease: A controlled study. *Gastroenterology* **80**: 1016-1022.
7. Perrillo, R.P., F.G. Regenstein, C.J. Bodicky, C.R. Campbell, G.E. Sanders and Y.C. Sunwoo. 1985. Comparative efficacy of adenine arabinoside 5'-monophosphate and prednisone withdrawal followed by adenine arabinoside 5'-monophosphate in the treatment of chronic active hepatitis type B. *Gastroenterology* **88**: 780-786.
8. Greenberg, H.B., R.B. Pollard, L.I. Butwick, P.B. Gregory, W.S. Robinson and T.R.C. Merigan. 1976. Effects of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **293**: 517-522.
9. Alexander, G.J.M., J. Braha, E.A. Fagan, H.M. Smith, H.M. Daniels, A.L.W.F. Eddleston and R. Willams. 1987. Loss of HBsAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* **1**: 66-69.
10. Carreno, V., J.C. Porres, I. Mora, J. Bartolome, C. Bas, J. Gutiez, J. Cortes and C.H. Guio. 1987. Prolonged (6 months) treatment of chronic hepatitis B virus infection with recombinant leukocyte interferon. *Liver* **7**: 325-332.
11. Kim, S.H., H.J. Yeom, H.M. Kim, H.S. Lee and K.S. Hahm. 1992. Isolation of antioxidant compound from therapeutic agent for hepatitis B viral infection. *Kor. J. Biochem.* (in press).
12. Pelle, E., D. Maes, G.A. Padulo, E.K. Kim and W.P. Smith. 1990. An *in vitro* model to test relative antioxidant potential: ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 234-240.
13. 山中恒夫, 井戸健一, 木村 健, 樓林郁之介, 河合 忠. 1981. 各種肝疾患における過酸化脂質および superoxide dismutase 活性의動態. *肝臟* **22**: 123.
14. 沢木俣二, 稻垣孝雄, 加藤勝久, 伊藤良一, 小池正人, 瀧谷 敏, 松浦 衛, 伊藤吉將, 平野和行. 1982. 種々の肝疾患における血清 superoxide dismutase의生物學的活性値と免疫學的活性値. *醫學のおゆみ* **122**: 1136-1137.

(Received November 24, 1992)