

牛皮消根의 알칼로이드 분획이 과산화지질 생성에 미치는 영향

이동웅* · 신억섭 · 이수진 · 허 근*

영남대학교 약학대학, *동국대학교 생화학과

(Received September 23, 1994)

Effect of Alkaloidal Fraction from *Cynanchi Radix* on Lipid Peroxidation

Dong-Ung Lee*, Uk-Seob Shin, Su-Jin Yi and Keun Huh*

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan, 712-749

*Department of Biochemistry, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk, 780-714, Korea

Abstract—The crude alkaloidal fraction of the root of *Cynanchum caudatum* Max.(Asclepiadaceae) was tested for the effects on the activities of free radical generating enzymes and the formation of lipid peroxide. Aldehyde oxidase was strongly inhibited to about 90% of the activity by treating 1.0 mg/ml of alkaloidal fraction, corresponding to competitive inhibition. Moreover, the formation of lipid peroxide which causes damage of cell membrane was reduced in proportion to the increasing alkaloid concentration. However, xanthine oxidase of which structure and function are similar to those of aldehyde oxidase was not inhibited by the alkaloidal fraction.

Keywords □ *Cynanchum caudatum* Max., Free radical, aldehyde oxidase, xanthine oxidase, lipid peroxide.

牛皮消(*Cynanchum caudatum* Max.)는 박주가리科(Asclepiaceae)에 속하는 다년생초본으로서 주로 일본의 北海道, 新州 등의 고산지대와 중국등지에 분포하고 있다. 이 식물은 뿌리가 특히 크고 비후하여 牛皮消根(*Cynanchi Radix*)이라 부르며 7~8월에 6~9 cm 길이의 花柄이 나온다. 同屬식물은 전세계에 걸쳐 12여종이 알려져 있으며 대부분은 국내에서 자생하나 중국, 일본, 유럽등지에서도 일부 자생하거나 재배되고 있다.¹⁾

이 중에서 牛皮消根은 일본의 원주민인 아이노족에게서 최고의 중요 민간약으로 옛부터 노인성질환의 치료와 각기병 등에도 사용되어 왔으며²⁾ 그의 강심, 이노 및 부종제거 등의 목적으로 지금도 널리 이용되고 있다.^{3,4)}

牛皮消根의 성분에 관한 연구는 Mitsuhashi 등^{5,6)}이 수종의 배당체와 aglycone을 분리, 구조를 규명한 바 있으며 그 생리활성에 대해서는 粗추출물이 중추신경

흥분작용이 있음이 보고된 것이 유일하다.^{7,8)} 한편 牛皮消의 alkaloid 성분 및 약효에 대해서는 아직 상세히 보고된 바 없다. 그리고 지금까지 국내에 자생하는 *cynanchum*속 식물에서도 alkaloid성분이 분리된 바 없으며 단지 배당체, sterol 등이 존재함이 알려져 있다.¹⁾

저자들은 우피소의 약리작용에 관한 연구의 일환으로 우선 우피소로부터 미지의 粗alkaloid성 물질을 추출한 다음, 항산화작용을 검색해 보았다. 우피소가 성인병을 포함한 노인성질환 등에 사용되어온 점을 고려하여 이들 질환의 중요한 발발인자로 지목되고 있는 free radical의 생성과정에 참여하는 효소들의 활성과 과산화지질의 생성에 미치는 영향을 조사한 바, 유의성있는 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료

우피소는 1993년 9월 일본의 新州지방에서 채집

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

하여 그 뿌리부분을 건조하여 사용하였다. 한편, bovine serum albumin, nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺), malon dialdehyde, sodium dodesyl sulfate, xanthine sodium salt, N-methylnicotinamide(NMN) 및 thiobarbituric acid는 Sigma사의 것을 사용하였으며 기타 실험에 사용한 모든시약은 특급품을 사용하였다.

동물

본 대학 동물사에서 일정한 조건으로 사육한 외관상 건강한 250 g 내외의 수컷 SD계 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 실험전 16시간 동안 물만주고 절식시켰다.

Alkaloid의 추출

세절한 뿌리 20 kg을 methanol 5l로 熱時, 4회 반복추출하여 농축하였다. 농축액에 소량의 물을 가하고 2N-HCl 100 ml로 산성으로 한 다음, 一夜방치하였다. 상등액을 ether 200 ml로 2회 추출하여 비염기성물질을 제거한 후, 수층을 10% 암모니아수로 처리하여 약 알칼리성으로 하였다. 이 용액을 ether 200 ml로 3회 반복추출하고 분리된 ether추출물 소량을 취하여 2N-HCl에 용해시킨 후 Meyer test를 실시한 바, 양성반응(백색침전)을 나타내었으므로 alkaloid 성분임을 확인할 수 있었다.

효소원의 조제

흰쥐를 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후, 복부대동맥으로 부터 혈액을 채취하고 0.9% 생리식염수로 관류시킨 간장을 적출하여 생리식염수에 씻은 다음 여지로 압박, 간에 남아있는 생리식염수를 제거한 후, 간조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer로 약함)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상등액을 얻고 이것을 다시 1시간동안 초원심분리하여 cytosolic fraction을 분리하였다. 이 fraction을 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 활성측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0~4℃에서 행하였다.

효소활성의 측정

Xanthine oxidase 활성 측정—Xanthine oxidase (type O)활성측정은 Stirpe 등⁹⁾의 방법에 준해 K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60 μM 및 효소원을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음, 20% trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 단백질을 제거시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 한편 xanthine dehydrogenase(type D)의 활성은 type O의 활성 측정반응액에 coenzyme인 NAD⁺ 100 mM을 첨가해 동일하게 반응시킨 다음, 측정하여 나온 활성도(total type: type D+O)에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid양을 nmol로 나타내었다. 한편 xanthine oxidase의 형전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase(type O)로의 형전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

Aldehyde oxidase 활성측정—Aldehyde oxidase 활성측정은 Rajagopalan 등¹⁰⁾의 방법에 의해 K.P. buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 N-methylnicotinamide 1.5 mM과 효소액을 첨가해 37℃에서 20분간 반응시킨 다음, 20% TCA를 가해 반응을 종료시켰다. 반응 종료 후 생성된 pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등¹¹⁾의 방법에 준해 간조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95℃에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음, 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol:pyridine(15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1g당 malon dialdehyde(MDA)의 양을 nmole로 나타내었다.

단백질의 정량

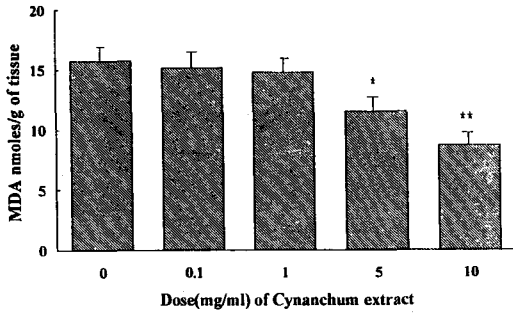


Fig. 1—Effect of Cynanchum extract on the lipid peroxidation.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 3 separated experiments. Significantly different from control (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

단백질의 정량은 Lowry 등¹²⁾의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다. 한편, 실험결과의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 이용하여 상호 비교하였다.

실험결과

시험관내에서 과산화지질의 생성에 미치는 우피소 추출물의 영향—간조직 마쇄액과 xanthine-xanthine oxidase system이 존재하는 과산화지질생성 실험조건의 시험관내에 우피소 추출물을 용량을 달리하면서 첨가시켜 과산화지질의 생성정도를 관찰하였다(Fig. 1).

우피소 추출물의 첨가농도에 비례하여 과산화지질의 생성을 억제시켰으며, 특히 첨가량이 10 mg/ml 되게 하였을 때는 과산화지질의 함량이 8.68 nmole/g으로 대조치 15.79 nmole/g에 비해 약 절반 수준으로 과산화지질의 생성이 억제됨을 볼 수 있었다.

우피소 추출물이 간 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향—흰쥐 간조직의 cytosol을 효소원으로 하고 xanthine을 기질로 하는 xanthine oxidase활성을 측정하는 반응액에 우피소 추출물을 농도를 달리하면서 첨가시킨 다음, xanthine oxidase 활성을 관찰하여 Fig. 2에 나타내었다.

우피소 추출물의 첨가농도를 증가시켜 가면서 xanthine oxidase 활성변화를 관찰하였을 때, 효소활성에 별다른 변화를 관찰할 수 없었을 뿐만 아니라 xa-

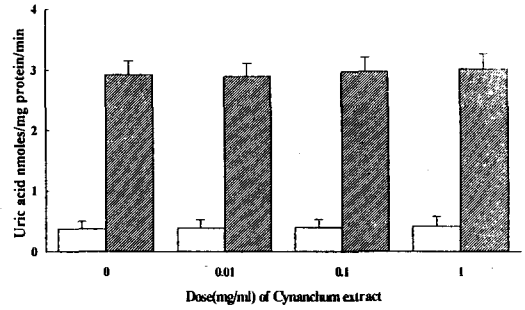


Fig. 2—Effect of Cynanchum extract on the hepatic xanthine oxidase activity.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 3 separated experiments. □: type O, ▨: type D+O

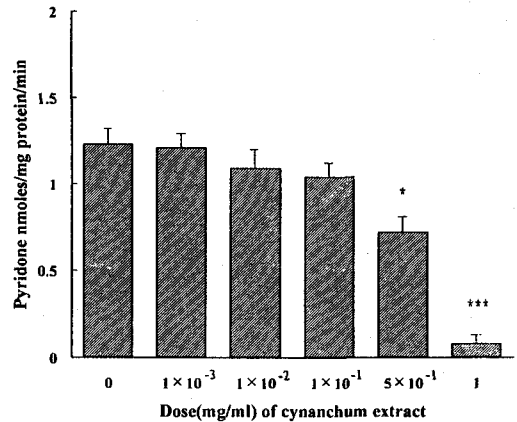


Fig. 3—Effect of Cynanchum extract on the hepatic aldehyde oxidase activity.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 3 separated experiments. Significantly different from control (*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$)

nthine oxidase형전환 속도에도 별다른 영향을 주지 않았다.

우피소 추출물이 간 aldehyde oxidase활성에 미치는 영향—생체내의 조효소로서 다양한 생화학적 산화반응에 참여하며 여러종류의 생리기능을 조절, 보존하여 항상성유지에 중요한 역할을 하는 NAD의 대사산물인 N-methylnicotinamide를 기질로 하고 흰쥐의 간 cytosol분획을 효소원으로 하는 반응액중에 우피소 추출물을 용량별로 첨가하고 aldehyde oxi-

고찰

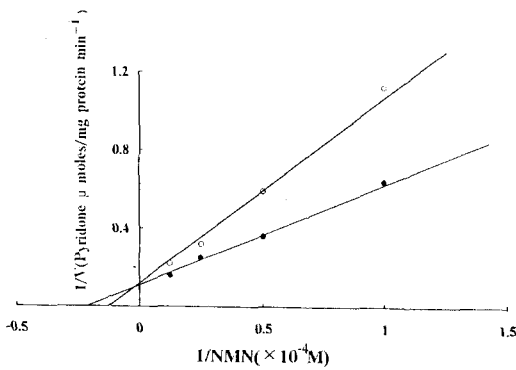


Fig. 4—Lineweaver-Burk plots of the partial purified aldehyde oxidase activity with *Cynanchum* extract

The reaction mixture contained 0.1M K.P. buffer (pH 7.5), various concentration of N-methylnicotinamide, enzyme solution and *Cynanchum* extract (5×10^{-4} g/ml). The values are means for 3 separated experiments.

dase 활성변화를 관찰하였다(Fig. 3).

우피소 추출물의 첨가용량이 증가될 수록 aldehyde oxidase 활성이 억제됨을 관찰할 수 있었는데, 추출물의 첨가량이 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 되게 하였을 때 효소활성이 0.72 nmole/mg protein/min, 0.08 nmole/mg protein/min 으로서 대조치 1.23 nmole/mg protein/min에 비해 각각 40%, 90% 정도의 효소 활성 억제작용을 나타내었다.

시험관내에서 우피소 추출물이 aldehyde oxidase의 반응속도에 미치는 영향—우피소 추출물에 의한 간 aldehyde oxidase 활성 억제작용의 기전을 추구하고 위해 rat 간의 aldehyde oxidase를 일반적으로 많이 이용되고 있는 방법¹³ 즉 열처리, $(NH_4)_2SO_4$ 염석 및 acetone 침전 등의 조작과정을 거쳐 specific activity 가 48.33 nmole/mg protein/min 되게 약 40배 정도 부분정제한 다음, 이것을 효소원으로 하여 우피소 추출물이 기질과 효소간의 반응속도에 어떤 영향을 미치는지를 검토하였다.

Fig. 4에서 나타난 것처럼 정제한 효소원에 기질인 NMN의 첨가농도를 각각 달리하면서 aldehyde oxidase 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot으로 나타내었을 때, 우피소 성분의 첨가(5×10^{-4} g/ml)에 의해 Vmax는 별다른 변화가 없었으나 Km치가 control에 비해서 약 1.4배 정도 증가되는 경쟁적 저해작용을 나타내었다.

우피소의 뿌리에서 alkaloid분획을 추출하고 그 추출물을 대상으로 불포화지방산의 과산화반응에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 용량의존적으로 과산화지질의 생성이 억제되어짐을 관찰할 수 있었다. 과산화지질의 생성은 병태생리현상이나 조직손상정도를 나타내는 지표¹⁴로 활용되고 있음을 고려할 때, 우피소가 나타내는 난치성 성인병 치료효과는 과산화지질의 생성을 억제하는 항산화작용에 기인된 약리작용이라고 생각할 수 있으며 매우 흥미있는 결과라고 생각된다. 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성산소종과 같은 free radical에 의해 과산화반응이 개시되며 또한 연쇄적으로 진행된다.¹⁵ 그러므로 free radical에 의한 지질의 과산화반응은 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라, 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러가지 질환의 병리현상을 유도하며 발암과정에도 관여할 것으로 생각되고 있다. 이러한 점으로 미루어 볼때, 우피소의 항산화작용은 민간에서 활용하는 약리효과의 배경을 뒷받침하는 실험결과라고 생각된다. 또한 free radical생성계에 관여하는 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase¹⁶활성에 대한 우피소 알칼로이드 추출액의 영향을 관찰하였을 때, 이 천연 알칼로이드 성분들은 xanthine oxidase 활성이나 이 효소의 형질전환에 아무런 영향을 주지 못한 점으로 보아 우피소 알칼로이드 성분이 나타내는 항산화작용에는 xanthine oxidase가 관여하지 않을 것으로 예상된다. 한편 aldehyde oxidase는 xanthine oxidase와 더불어 cytosol 분획에 존재하는 molybdenum 함유 산화효소¹⁷로서 생화학적 반응을 촉매하는 과정에서 반응액중의 산소분자를 전자수용체로 활용하고 있으므로 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 최종적으로 hydroxyl radical을 생성하는데¹⁸ 우피소 알칼로이드 성분이 aldehyde oxidase의 활성에 미치는 영향을 관찰한 실험에서 xanthine oxidase와는 달리 aldehyde oxidase에 있어서는 반응액중에 존재하는 우피소 알칼로이드 첨가농도에 비례하여 현저하게 효소활성이 억제되는 것으로 나타났다.

이상과 같은 실험결과를 종합하여 볼때, 우피소의 알칼로이드 성분은 aldehyde oxidase 활성을 억제하여 free radical의 생성을 저해함으로써 지질의 과산

화반응속도를 저해하기 때문에 과산화지질의 생성이 억제되는 것으로 생각된다. 현재 우피소의 알칼로이드 성분의 구조를 규명중에 있으며 지금까지의 연구결과로 보아 steroid 골격을 지니고 있는 물질임이 확인되었다. 이런점을 고려하면 성 hormone이 지질의 과산화반응에 영향을 주고 있다는 연구보고¹⁹⁾와 연관지어 볼때 매우 흥미있는 실험결과라고 생각된다.

감사의 말씀

이 논문은 1993년도 교육부 학술진흥재단의 국제협력연구과제 연구비지원에 의한 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 약품식물학각론, 약품식물학연구회, 진명출판사 (1980).
- 2) 國友保民, 藥學雜誌, 8, 653 (1898).
- 3) Mitsuhashi, H. and Shimizu, Y.: Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants, II. On the structure of cynachogenin from *Cynanchum caudatum* Max., *Chem. Pharm. Bull.*, 8, 318 (1960).
- 4) Kariyone, T.: 和漢生藥, 廣川書店, pp. 70-71 (1974).
- 5) Sasaki, T., Hayashi, K. and Mitsuhashi, H.: On the structure of kidjolanin and the position of the esterlinkage of penupogenin, *Chem. Pharm. Bull.*, 20, 628 (1972).
- 6) Mitsuhashi, H., Nomura, T. and Hirano, M.: Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants, XIX. Components of *Metaplexis japonica* Makino. IV, *Chem. Pharm. Bull.*, 14, 717 (1960).
- 7) Iwakawa, K., *Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 67, 118 (1912).
- 8) Iwakawa, K., *Tokyo J. Med.*, 26, 359 (1912).
- 9) Stirpe, F. and Della Corte, E.: The regulation of rat liver xanthine oxidase: Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase(type D) to oxidase(type O), *J. Biol. Chem.*, 244, 3855 (1969).
- 10) Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P.: Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 237, 922 (1962).
- 11) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K.: Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351 (1979).
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 13) Huff, S. D. and Chaykin, S.: Kinetics of testosterone action, *in vivo*, on liver N-methylnicotinamide oxidase activity in mice. *Endocrinology*, 83, 1259 (1968).
- 14) Tappel, A.: Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. in Pathology of Cell Membranes. (B. F. Trump and A. Arstila eds), Vol. 1, p. 145, Academic Press, N. Y. (1975).
- 15) Fridovich, I.: The biology of oxygen radicals, *Science*, 201, 875 (1978).
- 16) Granger, D. N., Hollwarth, M. E. and Parks, D. A.: Ischemia-reperfusion injury.: Role of oxygen-derived free radicals, *Acta. Physiol. Scand. (Suppl.)*, 548, 47 (1986).
- 17) Rajagopalan, K. V. and Handler, P.: Metalloflavoproteins in biological oxidations. (T. P. Singer, ed.), p. 301, Wiley, N. Y. (1965).
- 18) Periannan, K. and Jay, L. Z.: Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, 264, 9880 (1989).
- 19) Huh, K., Shin, U. S. and Park, J. M.: Effect of testosterone on free radical generating enzyme and lipid peroxidation, *Yakhak Hoeji*, 38, 166 (1994).