

식물성 생약의 도파민 베타 수산화효소에 대한 저해활성

태동년 · 황금희 · 한용남
서울대학교 천연물과학연구소

Dopamine β -Hydroxylase Inhibitory Activity of Medicinal Plants

Dong Nyen Tae, Keum Hee Hwang and Yong Nam Han
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—Dopamine β -hydroxylase (DBH) catalyses the enzymatic reaction of dopamine to norepinephrine. For the purpose of isolating DBH inhibitors from natural resources, thirty one kinds of medicinal plants were screened by tracing the inhibitory activities against bovine adrenal DBH, utilizing tyramine as a substrate. Among the crude drugs tested, leaves of *Lactuca sativa* L., Gardeniae Fructus, Magnoliae Flos and Scutellariae Radix showed potent enzyme inhibitory activities against DBH.

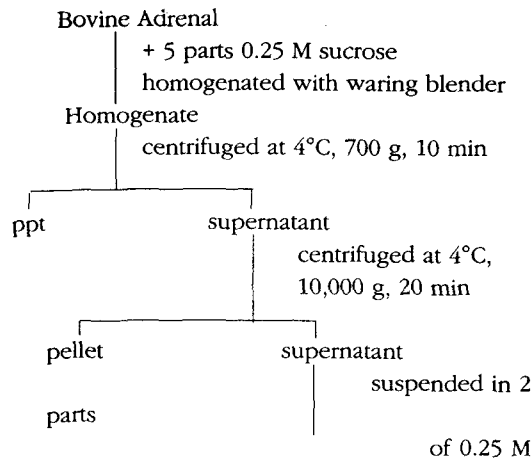
Keywords—Bovine Adrenal Dopamine β -Hydroxylase(DBH) · *Lactuca sativa* · Gardeniae Fructus · Magnoliae Flos · Scutellariae Radix

Dopamine β -hydroxylase (DBH)[3, 4-dihydroxyphenylethylamine, ascorbate : O₂ oxydoreductase (β -hydroxylating), E.C.1.14.17.1]는 뇌, 말초 교감신경과 부신수질에서 norepinephrine 합성의 마지막 단계인 dopamine에서 norepinephrine으로의 전환 과정을 촉매한다.¹⁻⁴⁾ DBH는 dopamine을 비롯한 여러 가지 phenylethylamine 유도체를 기질로 하논 수산화효소로⁵⁾ 생리활성을 갖는 catecholamine류의 생합성에 관여한다. DBH는 ascorbic acid를 보조효소로 하고 구리를 함유하는 당단백질로서⁶⁻¹⁰⁾ fumaric acid 등의 dicarbonic acid류가 활성을 촉진하며¹¹⁾ 구리와 착화합물을 형성하는 많은 물질들이 DBH를 저해한다고 보고되어 있다.¹²⁻¹⁶⁾ 이 효소의 저해물질은 고혈압 및 파킨슨병 등의 치료약물로 하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾

이미 알려진 저해제들로는 fusaric acid¹⁸⁾, hydralazine¹⁹⁾, dopastin²⁰⁾, 6-hydroxydopamine²¹⁾, benzyloxyamine²²⁾ 및 그 유도체들이 있으며 이러한 저해제들이 내인성 norepi-

nephrine의 양을 감소시켜 혈압강하작용을 한다고 보고되어 있다.^{18,19,23)} 교감신경 말단에서 분비되어 혈액 중에 존재하는 것으로 알려져 있는 DBH는 상당량이 불활성형으로 되어 있다²⁴⁾. 각종 장기의 질환에 수반되는 혈청중의 DBH활성의 증감은 각종의 증상과 관계가 있으므로 진단상 중요시 되고 있다.

최근 신약개발연구의 일환으로 민간과 한방에서 상용되고있는 생약들에 대한 각종 생리활성검색에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 황 등²⁵⁾이 16종의 생약을 대상으로 메탄올 엑스가 bovine adrenall tyrosine hydroxylase 및 DBH활성(*in vitro*)에 미치는 영향을 보고하였을 뿐 국내에서의 DBH 저해작용에 관한 연구보고는 없는 편이다. 본 연구에서는 혈압강하작용이 있는 것으로 알려진 31종의 생약을 대상으로 tyramine을 기질로 하여 DBH 저해작용을 검색하였으며 그 결과를 유효성분을 규명하는데 기초 자료로 삼고자 하였다.



Scheme 1. Preparation of Bovine Adrenal DBH.

실험재료 및 방법

실험 재료 - DBH를 조제하기 위한 소의 부신은 서울시 마장동 소재 우성농역(주)에서 도축시 제공받아 냉동 보관하였다가 사용하였으며 실험의 재료로 사용한 31종의 생약은 서울시 경동시장 및 시내 한약재상에서 구입하여 미세한 분말로 하여 사용하였다.

Dopamine β-hydroxylase (DBH)의 저해작용 측정 - Crevelling 등의 방법에 준하여 DBH 저해작용을 측정하였다⁵⁾. 소(牛) 副腎 濕重量 1 g 당 0.25 M sucrose 용액 5 ml를 가하여 waring blender로 2분간 homogenation하고 4°C에서 700 g로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 4°C에서 10,000 g로 다시 20분간 원심분리하여 얻은 pellet을 0.25 M sucrose 용액 2 ml에 현탁시키고 -15°C 냉장고에 동결보관하였다. 서울시 실온에서 녹여 0.25 M sucrose 용액으로 30배 희석하여 효소원으로 사용하였다(Scheme 1). Sodium fumarate, N-ethylmaleimide, iproniazid phosphate 및 ascorbic acid를 각각 0.06, 0.06, 0.006, 0.06 M이 되게 하여 증류수에 함께 녹인 액을 반응 보조액으로 사용하였다. 효소원 0.3 ml와 검액 1.0 ml, 0.4% catalase 0.2 ml, 1 M 초산 완충액(pH 5.0) 0.5 ml 및 반응보조액 0.5 ml를 차례로 넣고 37°C에서 15분간 preincubation

sample or distilled water, 1.0 ml
 coenzyme, 0.5 ml
 catalase (24 mg/8 ml H₂O), 0.2 ml
 1 M acetate buffer (pH 5.0), 0.5 ml
 enzyme, 0.3 ml
 preincubated at 37°C for 15 min
 added 0.12 M tyramine HCl, 0.5 ml
 incubated at 37°C for 90 min
 added 3 M trichloroacetic acid, 0.4 ml
 centrifuged at 2,000 rpm for 20 min
Reaction mixture
 3.0 ml to Dowex 50W 8 column(0.8×3 cm)
 washed with water 30 ml
 eluted with 4 N NH₄OH 3 ml
Eluate
 added 0.2 ml 4% NaIO₄
 after 10 min, added 20% Na₂S₂O₅, 0.2 ml
 Optical Density at 330nm

Scheme 2. Assay of DBH Inhibitory Activity.

하였다. 여기에 0.12 M tyramine HCl 0.5 ml를 가하고 90분간 incubation한 후 3 M trichloroacetic acid 0.4 ml를 가하여 효소반응을 중단시켰다. 반응 중단 후 즉시 700 g로 10분간 원심분리하고 상등액 3.0 ml를 Dowex 50W 8(H⁺ form, 200-400 mesh) 컬럼(0.8×3 cm)에 부어넣고 증류수 30 ml로 세척하였다. 4 N NH₄OH 3 ml를 넣어 이 때 용출된 용출액을 따로 시험관에 받아 4% NaIO₄ 용액 0.2 ml를 가하였다. 10분 방치 후 20% Na₂S₂O₅ 용액 0.2 ml를 가하고 이를 330 nm에서 UV흡광도를 측정하였다(Scheme 2). 검액 대신 동량의 증류수를 넣은 대조군과 반응개시점 대신 반응종말점에서 기질용액을 넣은 공시험군, 기질용액 대신 동량의 증류수를 넣은 검액보정군을 함께 실행하였다. 각군은 모두 duplicate로 실행하여 계산하였으며 아래 수식에 따라 검액의 효소저해율을 계산하였다. 한편 검액을 단계적으로 희석하여 그 때의 효소저해율을 계산하고 검액의 농도에 대한 효소저해율을 Logit-log paper에 작도하여 50% 효소저해농도를 구하였다.

$$\text{효소저해율(\%)} = \frac{\text{대조군} - (\text{A검액군} - \text{A검액보정군})}{\text{대조군} - \text{공시험군}} \times 100$$

Table I. Inhibition of ethylacetate-soluble fractions of several medicinal plants on dopamine β -hydroxylase

Plants/Crude drug name	Inhibition(%)	Remark*
<i>Lactuca sativa</i> (와거, 상추)	100	+++
Gardeniae Fructus (치자)	100	+++
Magnoliae Flos (신이)	95**	+++
Cimicifugae Rhizoma (승마)	85	+++
Mori Cortex Radicis (상백피)	80	+++
Scutellariae Radix (황금)	97	+++
Artemisiae Capillaris Herba (인진호)	69	++
Nepetae Spica (헹개)	78	++
Tribuli Fructus (질려자)	71	++
Erycibae Caulis (정공등)	67	++
Asiasari Radix (새신)	66	++
Epimedii Herba (음양곽)	64	+
Bupleuri Radix (시호)	52	+
Eucommiae Cortex (두충)	56	+
Corni Fructus (산수유)	51	+
Angelicae Gigantis Radix (당귀)	52	+
<i>Lycotinum pseudolaeve</i> (진범)	56	+
Polygalae Radix (원지)	56	+
Meliae Cortex (고련피)	0	-
Smilacis Rhizoma (토복령)	0	-
Myristicae Semen (육두구)	0	-
Polygoni Multiflori Radix (하수오)	0	-
Polygonati Rhizoma (황정)	0	-
Angelicae Koreanae Radix (강활)	15	-
Magnoliae Cortex (후박)	43	-
Lycii Radicis Cortex (지골피)	1	-
Cnidii Rhizoma (천궁)	24	-
Rhei Rhizoma (대황)	10	-
Gastrodiae Rhizoma (천마)	32	-
Uncariae Ramulus et Uncus (조구등)	34	-
Pulsatillae Radix (백두옹)	31	-

*+++ , >80% ; ++ , 65-79% ; + , 50-64% ; - , <50%

**Ethylacetate-soluble fraction obtained from 5 g of medicinal plants was dissolved in 2 ml of DMSO and diluted with H₂O to make 100 ml of a test solution. One ml of it was taken and assayed for examining DBH inhibitory activity as described in the experimental method.

생약의 DBH 저해작용 검색 - 시판 건조생약 5 g에 물로 포화시킨 ethylacetate 100 ml를 가하여 95°C 수욕상에서 5시간동안 환류추출하고 실온에서 방치하여 식힌 후 여지로 여과한 EtOAc 추출액을 완전농축하였다. 여기에 dimethylsulfoxide (DMSO) 2ml를 가하여 녹이고 이 중 0.2 ml를 따로 취한 후 증류수를 가하여 10 ml로 한 후 현탁시켜 검액을 조제하였다. 각 생약 검액을

사용하여 Scheme 2의 방법에 따라 측정하였으며 이때 공시험군, 대조군은 검액 대신 2% DMSO 용액을 사용하였다.

결과 및 고찰

생약의 DBH 저해작용 검색 - 한방과 민간에서 혈압강하의 목적으로 빈용되고 있는 생약들을

중심으로 31종의 생약을 선별하여 이들 생약을 대상으로 tyramine을 기질로하여 DBH 저해작용을 검색하였으며 그 결과를 Table I에 나타내었다. 각 생약들의 DBH 저해활성은 편의상 80% 이상의 저해율을 나타낸 경우는 (+++)로, 65-79% 저해율을 나타낸 경우는 (++)로, 50-64% 저해율을 나타낸 경우는 (+)로, 50% 미만의 저해율은 (-)로 판정하였다. 상추, 치자, 신이, 황금은 95% 이상의 현저한 DBH 저해활성을 나타내었으며 승마, 상백피는 80% 이상, 인진호, 형개, 질려자, 정공등, 세신, 음양곽은 65% 이상의 저해활성을 나타내었으나 그 외의 생약에서는 DBH 저해활성이 약하거나 없었다.

황 등²⁴⁾은 16종의 생약에 대해 DBH 저해활성을 검색하여 황금, 작약, 반하, 오수유 등이 DBH에 강한 억제작용을 나타내고 길경, 오미자, 방풍, 계지, 황기는 약한 억제작용을 하는 것으로 보고하였다. 본 연구결과와 황 등의 연구결과에서 황금, 하수오, 강활이 중복되었는데 그 결과는 동일하였다.

〈1995년 1월 24일 접수〉

참고문헌

- Schanberg, S.M., Stone, R.A., Kirshner, N., Gunnells, J.C. and Robinson, R.R.: *Science* **183**, 523 (1974).
- Foldes, A., Jeffrey, P.L., Preston, B.N. and Austin, L.: *Biochem. J.* **126**, 1209 (1972).
- Craine, J.E., Daniels, G.H. and Kaufman, S.: *J. Biol. Chem.* **248**, 7838 (1973).
- Ljones, T. and Skotland, T.: *Copper Proteins and Copper Enzymes* (R. Lontie, ed.). 2 CRC Press (1984).
- Creveling, C.R., Daly, J.W., Witkop, B. and Udenfriend, S.: *Biochim. Biophys. Acta.* **64**, 125 (1962).
- Spodine, E and Manzur, J.: *Coord. Chem. Rew.* **119**, 171 (1992).
- Skotland, T., Ljones, T., Flatmark, T. and Sletten, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 1483 (1977).
- Park, D.H., Kashimoto, T., Ebstein, R.P. and Goldstein, M.: *Mole. Pharm.* **12**, 73 (1975).
- Wallace, E.F., Krantz M.J. and Lovenberg, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2253 (1973).
- Kaufman, S.: *Biological and Chemical Aspects of Oxygenases*. Maruzen Co., Ltd., Tokyo (1966).
- Levin, E. and Kaufman, S.: *J. Biol. Chem.* **236**, 2043 (1961).
- Ljones, T.: *Methods Enzymol.* **142**, 596 (1987).
- Tottmar, O., Hellström, E., Holmberg, K. and Lindros, K.O.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **51**, 198 (1982).
- Rosenberg, R.C., Gimble, J.M. and Lovenberg, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **613**, 62 (1980).
- Fuller, R.W., Ho, P.P.K., Matsumoto, C. and Clemens, J.A.: *Adv. Enz. Regulation* **15**, 267 (1976).
- Johnson, G.A., Boukma, S.J. and Kim, E.G.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **168**, 229 (1969).
- Aoyanagi, T. 酵素阻害物質. 公立全書. (1978).
- Umezawa, H., Takeuchi, T. and Suda, H.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 35 (1970).
- Liu, T.Z., Sen, Z.T. and Loken, H.F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**, 294 (1974).
- Iinuma, H., Kondo, S., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *Agr. Biol. Chem.* **38**, 2093 (1974).
- Aunis, D., Miras, P.M.T. and Mandel, P.: *Biochem. Pharmacol.* **22**, 2581 (1973).
- Van Der Schoot, J.B., Creveling, C.R., Nagatsu, T. and Udenfriend, S.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **141**, 74 (1963).
- Iinuma, H., Matsuzaki, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *Agr. Biol. Chem.* **38**, 2107 (1974).
- Rush, R.A., Nagatsu, T., Geffen, L.B. and Udenfriend, S.: *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* **32**, 707 (1973).
- 황윤정, 이승호, 김학성, 이경순, 노재섭, 이명구: *한국생약학회지*, **25**, 194 (1994).