

수종의 천연물이 Monoamine Oxidase 활성에 미치는 영향 (제3보)^{1,2)}: 황련, 계피, 지실의 활성 저해작용

이상선 · 김영호^a · 이명구
충북대학교 약학대학, ^a충남대학교 약학대학

Effects of Herbal Medicines on Monoamine Oxidase Activity (III)^{1,2)}

Sang Seon Lee, Young Ho Kim^a, and Myung Koo Lee
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763 and
^aCollege of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764,
Republic of Korea

The effects of MeOH extracts from 28 herbal medicines on monoamine oxidase (MAO) activity were investigated. MAO was purified from mouse brain and its activity was determined by fluorophotometry using kynuramine as a substrate. Three MeOH extracts, *Coptis japonica*, *Cinnamomum cassia* and *Poncirus trifoliata* from the herbal medicines showed a strong inhibitory effect with less than 100 µg/ml in their inhibitory amounts of 50% (IC₅₀ values) on MAO activity. Four MeOH extracts including *Evodia officinalis* exhibited a mild inhibition of MAO activity with 100-200 µg/ml in their IC₅₀ values. (Kor. J. Clin. Pharm. 1998; 8(2): 139-142)

□ Keywords - *Coptis japonica*, *Cinnamomum cassia*, *Poncirus trifoliata*, *Evodia officinalis*, Monoamine oxidase, Mouse brain, Kynuramine

Monoamine oxidase (EC, 1.4.3.4; MAO)는 세포내의 미토콘드리아 외막에 존재하여, 신경전달물질인 활성 monoamine류 catecholamines (dopamine, norepinephrine, epinephrine) 및 serotonin 등을 불활성화시키는 FAD 함유효소이다.³⁾ 중추성 MAO의 활성은 우울증등의 정신질환과 말초에서는 고혈압 등의 질환과 관련이 되어 있다.

MAO는 기질 및 저해제의 특이성에 따라 MAO-A 및 MAO-B로 분류된다. MAO (A 및 B)는 tyramine, dopamine, kynuramine 등을 기질로 하며, iproniazid, nialamide, phenelzine 등에 의하여 저해한다.⁴⁾ MAO-A의 기질은 norepinephrine, serotonin 등이며, 이의 저해제로는 clorgyline, harmine, harmaline 등이 알려져 있다.⁵⁾ MAO-B는 β-phenylethylamine, benzylamine 등을 기질로 하며, deprenyl, pargyline 등에 의하여 비가역적으로, imipramine, amitriptyline 등에 의하여 가역

적으로 저해된다.⁶⁾

본 연구는 전보^{1,2)}에 이어 MAO 활성 저해제의 개발 및 생리활성을 재조명하기 위하여, 수종의 천연물이 MAO 활성에 미치는 영향에 대하여 활성검색을 진행하였다. 효소 MAO는 mouse의 뇌로부터 부분정제하여 사용하였으며,⁷⁾ MAO 활성은 기질 kynuramine을 사용하여 측정하였다.^{7,8)} 활성검색에 사용한 천연물은 동의보감의 처방에 준하여 중추신경계 질환에 주로 사용되고 있는 생약 28종을 선택하고, 각각의 생약 MeOH 엑스를 제조하여 사용하였으며, 이중 MAO 활성 저해작용을 나타낸 천연물은 황련(*Coptis japonica*) 외 9 종이었다.

실험재료 및 방법

실험재료

Kynuramine, 4-hydroxyquinoline은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, 미국)로부터 구입하였으며, 그 이외의 시약은 특급을 사용하였다. 천연물 시료는 시중

교신저자: 이 명 구
361-763 청주시 흥덕구 개신동 산48
충북대학교 약학대학
TEL. 0431-261-2822, FAX. 0431-268-2732

에서 구입, 또는 채집하고 감정후 사용하였으며 표품은 충남대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

천연물 엑스의 제조

천연물시료는 세절한 후 상법에 따라 95% MeOH을 가한 후 상온에서 냉침과정을 2회 반복하였다. 추출액은 감압농축하여 건조시킨 다음 시료엑스(MeOH 엑스)로 하였으며 4-7°C에서 보관하였다.

MAO 효소원의 부분정제

MAO 시료는 NaOI의 방법에 준하여 부분정제하였다.⁷⁾ Mouse의 뇌(8.8 g)를 세절한 후 10 mM potassium phosphate buffer를 함유한 0.25 M sucrose 용액(pH 7.4) 가하여 균질화시켰다. Homogenate를 1,200 × g로 원심분리하고 상등액을 다시 16,000 × g로 원심분리하여 얻은 pellet에 대하여 농도가 100-300 mg/ml가 되도록 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)을 가하여 현탁시킨 다음 MAO 효소원으로 하였다. MAO 효소원은 -20°C에 보관하였다. 단백질 함량은 표품 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 등의 방법으로 측정하였다.⁹⁾

MAO 활성 측정

MAO의 활성은 Krajl의 방법에 준하여 측정하였다.^{7,8)} 효소반응액은 0.2 M K · PO₄ buffer (pH 7.4) 720 μl, 효소원 30 μl, 시료 MeOH 엑스 50 μl, kynuramine (500 M) 200 μl이다. 효소반응 (30분) 후 10% ZnSO₄ 250 μl와 1 N NaOH 50 μl를 가한다음, 반응액을 원심분리하고 상등액 700 μl에 1 N NaOH 1.4 ml를 가한다. 최종 반응생성물 4-hydroxyquinoline의 농도를 형광광도계(Model F-3000, Hitachi, Tokyo, 일본) (λ_{ex}/λ_{em}: 315 nm/380 nm)로 측정하고, 이를 표준곡선을 사용, 정량하여 MAO 활성을 측정하였다. Km 및 Vmax 값은 Lineweaver-Burk 법으로 계산하였다.

통계처리

실험결과는 means ± SEM으로 나타내었으며(n=4), 대조군에 대한 유의성 검정은 Student' t-test를 사용하였다.

실험결과 및 고찰

MAO는 mouse brain을 사용하여 부분정제하였으며, 실험에 사용된 대조군 MAO의 활성은 0.309 ± 0.018

nmol/min/mg protein이 되도록 조정하여 사용하였다. 또한, 효소 MAO에 대한 K_m 및 V_{max} 값(n=4)은 각각 78.2 ± 4.0 μM 및 0.65 ± 0.05 nmol/min/mg protein이었다.

28 종의 천연물 MeOH 엑스가 MAO 활성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 1에 나타내었다. 반응액 중 MeOH 엑스의 농도를 250 μg/ml로 처리하였을 경우, MAO 활성은 대조군에 대하여 황련 13%, 계피나무 14%, 지실(탱자나무) 33%, 오수유 36%, 황금 37%, 정향나무 40%, 천궁 42%, 참당귀 51%, 방풍 53%, 원지 57%, 후박나무 58% 등으로 나타났으며, 유의성 있는 MAO 활성 저해작용을 나타내었다(Table 1).

현재, MAO 저해제로 알려져 있는 clorgyline 및 iproniazid는 활성검색에 사용한 MAO 효소원에 대하여, 50% 저해용량(inhibitory amount: IC₅₀ 값)이 각각 1.4 및 12.9 μM이었다. 본 연구는 생약 MeOH 엑스에서의 결과이기 때문에 이들 저해제와의 IC₅₀ 값의 비교에는 어려움이 있으나, IC₅₀ 값이 100 μg/ml 이하인 경우를 강한 MAO 활성 저해작용이 있는 것으로 분류하였으며, 이 농도 범위에서 활성검색을 진행하였다.

따라서, MAO 활성 저해작용을 나타낸 천연물에 대하여 IC₅₀ 값을 비교 검토한 결과, 황련의 IC₅₀ 값은 20 μg/ml, 계피나무 36 μg/ml, 탱자나무 83 μg/ml 등으로 나타나 강한 MAO 활성 저해작용을 나타내었으며(Table 2), 오수유의 IC₅₀ 값은 102 μg/ml, 황금 112 μg/ml, 천궁 120 μg/ml, 정향나무 123 μg/ml 등으로 나타나 비교적 유의적인 MAO 활성 저해작용을 나타내었다(Table 2). 또한, 참당귀(뿌리) 및 방풍(뿌리)의 IC₅₀ 값은 200-300 μg/ml 이었으며, 약한 MAO 활성 저해작용을 나타내었다(Table 1). 그외의 천연물에서는 MAO 활성 저해작용이 미약하거나 유의성이 인정되지 않았다. 상기의 IC₅₀ 값(Table 1, 2)은 MeOH 엑스 수준에서의 용량이며 생리활성을 나타낸 MeOH 엑스에서 단일성분을 분리하여 검색하면 다르게 나타날 가능성은 있다. 그러나, 일반적으로 생리활성을 나타낸 MeOH 엑스를 우선적으로 선택하여 활성단일성분의 분리를 진행하며, 현재 이에 대한 연구를 진행 중에 있다.

MAO 활성 저해작용을 나타낸 화합물중에서 salsolinol,¹⁰⁾ N-methylsalsolinol,¹¹⁾ N-methylisoquinolinium ion,¹²⁾ 3,4-dihydroxyphenylserine,¹³⁾ tetrahydropapaveroline¹⁴⁾ 등이 알려져 있으며, 화학구조면에서 고찰하면 quinoline 및 catechol 계열 화합물¹⁵⁾과 indole 및 isatin 유도체¹⁶⁾ 등이 보고되었다. 본 연구에서 강한 MAO 활성 저해작용을 나타낸 황련은 주성분이 protober-

Table 1. Effects of MeOH extracts from herbal medicines on mouse brain monoamine oxidase (MAO)

Plant name	Scientific name	Family	Used part ^{a)}	MAO activity (nmol/min/mg protein) ^{b)} (% of control)	
				Concentration (µg/ml)	
				100	250
Control				0.309±0.018 (100)	
강활	<i>Ostericum koreanum</i>	Umbelliferae	R	0.240±0.003 (77)	0.201±0.001 (65)*
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	Lauraceae	Sb	0.094±0.002 (30)**	0.042±0.002 (14)**
귀무릇	<i>Pinellia ternata</i>	Araceae	T	0.253±0.001 (82)	0.241±0.005 (78)
당목향	<i>Saussurea lappa</i>	Compositae	R	0.260±0.001 (84)	0.232±0.011 (75)
대추나무	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	Rhamnaceae	Fr	0.309±0.001 (100)	0.311±0.001 (100)
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	Campanulaceae	R	0.317±0.004 (102)	0.324±0.002 (104)
땃두릅	<i>Aralia cordata</i>	Araliaceae	R	0.288±0.002 (93)	0.275±0.002 (89)
핏대추나무	<i>Zizyphus zuzuba</i>	Rhamnaceae	Fr	0.292±0.008 (94)	0.278±0.005 (90)
방풍	<i>Saposhnikovia seseloides</i>	Umbelliferae	R	0.195±0.002 (63)*	0.165±0.003 (53)*
삼주	<i>Atractylodes japonica</i>	Compositae	R	0.274±0.001 (88)	0.237±0.008 (77)
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	Umbelliferae	R	0.252±0.001 (81)	0.218±0.002 (71)*
오두	<i>Aconitum carmichaeli</i>	Ranunculaceae	T	0.316±0.003 (102)	0.317±0.007 (102)
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	Schizandraceae	Fr	0.286±0.006 (92)	0.263±0.003 (85)
원지	<i>Polygala tenuifolia</i>	Polygalaceae	R	0.222±0.001 (72)*	0.175±0.001 (57)*
인삼	<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	R	0.266±0.002 (86)	0.248±0.001 (80)
자귀나무	<i>Albizia julibrissin</i>	Leguminosae	Sb	0.271±0.003 (87)	0.256±0.006 (83)
정향	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Myrtaceae	Fl	0.162±0.003 (53)**	0.123±0.004 (40)**
지실(탱자나무)	<i>Poncirus trifoliata</i>	Rutaceae	Fr	0.141±0.002 (46)**	0.102±0.001 (33)**
지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> var. <i>purpurea</i>	Scrophulariaceae	R	0.295±0.008 (95)	0.285±0.007 (92)
참당귀	<i>Angelica gigas</i>	Umbelliferae	R	0.181±0.002 (59)*	0.158±0.004 (51)*
참작약	<i>Paeonia albiflora</i> var. <i>trichocarpa</i>	Ranunculaceae	R	0.300±0.001 (97)	0.289±0.004 (93)
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	Umbelliferae	Rh	0.172±0.001 (56)**	0.129±0.001 (42)**
하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	Polygonaceae	R	0.306±0.001 (99)	0.287±0.003 (93)
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Labiatae	R	0.161±0.001 (52)**	0.114±0.001 (37)**
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	Leguminosae	R	0.265±0.002 (86)	0.238±0.001 (77)
황련	<i>Coptis japonica</i>	Ranunculaceae	R	0.061±0.001 (20)**	0.039±0.001 (13)**
후박	<i>Machilus thunbergii</i>	Lauraceae	Sb	0.230±0.002 (75)*	0.179±0.004 (58)*

^{a)}R: root, Sb: stem bark, T: tuber, Fr: fructus, Fl: flower, Rh: rhizoma. ^{b)}The control of MAO activity was taken as 0.309 nmol/min/mg protein. The percent of control activity was shown in parenthesis. The data were expressed as means±SEM for 4 experiments. Significantly different from the control value: *, p<0.05; **, p<0.01 (Student's t-test).

Table 2. IC₅₀ values of MeOH extracts from herbal medicines on monoamine oxidase activity

Plant name	Scientific name	Used part	IC ₅₀ values (µg/ml)
황련	<i>Coptis japonica</i>	root	20
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	stem bark	36
지실	<i>Poncirus trifoliata</i>	fruit	83
오수유	<i>Evodia officinalis</i>	fruit	102
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	root	112
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	rhizoma	120
정향	<i>Eugenia caryophyllata</i>	flower	123

berine isoquinoline 화합물임은 잘 알려져 있다. 저자들의 연구에 의하면 황련의 protoberberine 함유 활성 분획 및 그의 주성분인 berberine, palmatine, coptisine 은 강한 MAO 활성 저해작용을 나타내고 있다(berberine의 IC₅₀ 값, 98.2 μM; 투고 준비중).

따라서, 생리활성을 나타낸 황련 외 9 종에 대하여 생리활성 성분을 분리하고, 이들 활성성분을 이용한 효소화학적 작용기전의 연구 및 *in vivo* 동물모델에 적용한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 보건의료기술연구개발사업(HMP-97-D-4-0022: 보건복지부)의 연구비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

문헌

1. 이상선, 김영호, 배기환, 김학성, 이명구. 수종의 생약추출물이 monoamine oxidase 활성에 미치는 영향(제1보). 생약학회지 1988; 인쇄중.
2. 이상선, 김영호, 배기환, 김학성, 이명구. 수종의 천연물이 monoamine oxidase 활성에 미치는 영향(제2보). 약학회지 1998; 인쇄중.
3. Nagatsu T, Yamamoto T, Harada M. Purification and properties of human brain mitochondrial monoamine oxidase. *Enzymologia* 1970; 39: 15-25.
4. Houslay M.D., Tipton K.F. Multiple forms of monoamine oxidase: fact and artefact. *Life Sci* 1976; 19: 467-8.
5. Donnelly C.H., Murphy D.L. Substrate- and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 853-8.
6. Yang H.Y.T., Neff N.H. The monoamine oxidases of brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines. *J Pharm Exp Ther* 1974; 189: 733-40.
7. Naoi M., Nomura Y., Ishiki R., Suzuki H., Nagatsu

- T. 4-(O-Benzylphenoxy)-N-methylbutylamine (bifemelane) and other 4-(O-benzylphenoxy)-N-methylalkylamines as new inhibitors of type and B monoamine oxidase. *J Neurochem* 1988; 50: 243-7.
8. Krajl M. A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1965; 14: 1683-5.
9. Lowry O.H., Rosebough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-7.
10. Minami M., Maruyama W., Dostert P., Nagatsu T., Naoi M. Inhibition of type A and B monoamine oxidase by 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and their N-methylated derivatives. *J Neural Transm* 1993; 92: 125-35.
11. Moser A., Scholz J., Bamberg H., Böhme V. The effect of N-methyl-norsalsolinol on monoamine oxidase of the rat caudate nucleus in vitro. *Neurochem Int* 1995; 28: 109-12.
12. Naoi M., Matsuura S., Parvez H., Takahashi T., Hirata Y., Minami M., Nagatsu T. Oxidation of N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into the N-methyl-isoquinolinium ion by monoamine oxidase. *J Neurochem* 1989; 52: 653-5.
13. Naoi M., Nagatsu T. Inhibition of monoamine oxidase by 3,4-dihydroxyphenylserine. *J Neurochem* 1986; 47: 604-7.
14. Giovine A., Renis M., Bertolino A. In vivo and in vitro studies on the effect of tetrahydropapaveroline and salsolinol on COMT and MAO activity in rat brain. *Pharmacol* 1976; 14: 86-94.
15. Bembenek M.E., Abell C.W., Chrisey L.A., Rozwadowska M.D., Gessner W., Brossi A. Inhibition of monoamine oxidase A and B by simple isoquinoline alkaloids: racemic and optically active 1, 2,3,4-tetrahydro-, 3,4-dihydro-, and fully aromatic isoquinolines. *J Med Chem* 1990; 33: 147-52.
16. Medvedev A.E., Ivanov A.S., Kamyshanskaya N. S., Kirkel A.Z., Moskvitina T.A., Gorkin V.Z., Li N.Y., Marshakov V. Interaction of indole derivatives with monoamine oxidase A and B. Studies on the structure-inhibitory activity relationship. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36: 113-22.