

수종의 식물의 도파민 베타 수산화효소 저해활성 검색

문형인* · 지옥표 · 신말식¹

성균관대학교 생약학연구소, ¹전남대학교 식품영양학과

서 론

뇌, 말초교감신경과 부신수질에서 norepinephrine 합성의 마지막 단계인 dopamine에서 norepinephrine으로 전환하는 과정을 촉매하는¹⁾ dopamine β-hydroxylase(DBH)는 ascorbic acid를 보조효소로 하고 구리를 함유하는 당단백질로서 구리와 착화합물을 형성하는 많은 물질들이 DBH를 저해한다고 보고되어 있고,²⁾ 이 효소의 저해물질은 고혈압 및 파킨슨병 등의 질환에 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이미 알려진 저해제들로는 fusaric acid,³⁾ hydralazine,⁴⁾ dopastin,⁵⁾ 6-hydroxy dopamine,⁶⁾ benzyloxyamine,⁷⁾ 및 그 유도체들이 있으며 이러한 화합물은 내인성 norepinephrine의 양을 감소시켜 혈압강화작용을 한다고 보고 되어 있다. 이러한 저해제를 국내에서 연구한 예로는 황⁸⁾ 등이 31종의 식물을 대상으로 하여 그 중에서 가장 저해 효과가 크게 나타난 상추에서 저해성분을 분리하여 lettuceic acid(IC₅₀=3.08×10⁻⁶ M)라고 명명하였으며, 그 외 치자 등에서 연구한 것 외는 그 예를 찾아 볼 수가 없으므로 야생식물 206종에 대하여 tyramine을 기질로 하여 DBH의 저해활성을 검색하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 식물은 성균관대학교 약초원에 식재되어 있는 것을 사용하였으며 그종류는 다음과 같다. [(가지과) 가지, 구기자나무, 까마중, 파리, 독말풀, 미치광이풀, 으아리. (고사리과) 고비고사리. (국화과) 가막사리, 개꽃, 개미취, 깃쭉부쟁이, 고들빼기, 구절초, 금계국, 금불초, 금잔화, 까실쭉부쟁이, 까치발, 담배풀, 도꼬마리, 맑은대쭉, 머위, 목향, 미역취, 민들레, 방가지똥, 벌개미취, 삼주, 상추, 솜방망이, 쭉, 쭉자, 썸바귀, 약쭉, 영경취, 왕고들빼기, 우영, 절굿대, 제비쭉, 지느러미영경취, 지칭개, 참취, 치커리, 해바라기, 꼭두갈퀴덩굴, 꿀풀개박하. (꿀풀과) 꿀풀, 꿀풀, 동양박하, 들깨, 박하, 배암차즈기, 배초향, 산들깨, 산박하, 석잠풀, 속단, 오리방풀, 익모초, 자소, 조개나물, 황금. (난초과) 타래난초. (노루발과) 노루발풀. (노린재나무과) 노린재나무. (노박덩굴과) 노박덩굴. (녹나무과) 생강나무. (능소화과) 능소화. (닭의장풀과) 닭의장풀. (대극과) 피마자. (돌

나물과) 기린초, 애기기린초. (두릅나무과) 가시오갈피, 섬오갈피. (마과) 도꼬로마, 부채마. (미나리아재비과) 사위질방, 으아리, 참작약, 할미꽃. (마디풀과) 개여뀌, 소리쟁이, 애기수영, 여뀌, 쪽, 토대황, 마디풀. (마편초과) 순비기나무. (매자나무과) 삼지구엽초. (메꽃과) 메꽃, 유흥초. (명아주과) 땀싸리. (미나리아과) 제비모란. (박과) 돌외, 수세미, 왕과. (박주가리과) 박주가리, 큰조롱. (방기과) 땡땡이덩굴. (백합과) 달래, 등굴래, 무릇, 백합, 부추, 비비추, 산마늘, 산부추, 산옥잠화, 옥잠화, 왕원추리, 원추리, 율판나물, 은방울꽃, 죽대, 지모, 황정. (범의귀과) 노루오줌, 바위떡풀, 바위취, 수국. (부처꽃과) 부처꽃. (붓꽃과) 각시붓꽃, 노랑붓꽃, 독일붓꽃, 범부채, 붓꽃. (비름과) 눈비름, 맨드라미, 쇠무릅. (사초과) 향부자. (산형과) 갯방풍, 구릿대, 사상자, 일당귀, 참나물, 참당귀, 토친궁, 회향. (삼백초과) 삼백초, 어성초. (석죽과) 개별꽃, 동자꽃, 패랭이꽃. (속새과) 쇠뜨기. (쇠비름과) 쇠비름. (수선화과) 상사화. (십자화과) 겨자무우, 고추냉이. (아욱과) 아욱, 어저귀, 접시꽃. (앵초과) 까치수영, 좁쌀풀. (양귀비과) 박락회, 피나물. (용담과) 용담, 큰용담. (자리공과) 자리종. (장미과) 개소시랑개비, 뱀딸기, 뱀무, 앵도나무, 양지꽃, 오이풀, 짚신나물. (제비꽃과) 제비꽃, 흰제비꽃. (쥐손이과) 이질풀, 쥐손이풀. (질경이과) 질경이. (천남성과) 반하, 석창포. (초롱꽃과) 더덕, 도라지, 잔대, 초롱꽃. (콩과) 갯완두, 결명자, 고삼, 골담초, 미모사, 벌노랑이, 비수리, 콩, 팥, 편두, 황기. (파리풀과) 파리풀. (팔꽃나무과) 팔꽃나무. (포도과) 담쟁이덩굴. (현삼과) 꼬리풀, 디기탈리스, 털냉초, 현삼, 색금낭화.]

검액의 조제

식물시료 5 g을 물로 포화시킨 ethylacetate 100 ml를 가하여 95°C 수욕상에서 5시간 동안 환류 추출하고 실온에서 방치하여 식힌 후 여지로 여과한 EtOAc 추출액을 완전 농축하였다. 여기에 dimethylsulfoxide 2 ml를 가하여 녹이고 이 중 0.2 ml를 따로 취한 후 증류수를 가하여 10 ml가 되게한 후 현탁시켜 검액을 조제하였다.

Dopamine β-hydroxylase의 저해작용 측정

Creveling 등⁹⁾의 방법에 준하여 DBH 저해작용을 측정하였으며, 효소원 조제는 소(牛) 부신 습중량 1 g 당 0.25 M

찾는말 : 도파민 β-수산화효소

*연락처자

Table 1. Inhibition of various wild plants on dopamine β -hydroxylase

Plants	Used part	Inhibition (%) ¹⁾	Remark ²⁾
<i>Acanthopanax senticosus</i> (가시오갈피)	S ³⁾	89	++
<i>Artemisia asiatica</i> (약쭉)	W	70	+
<i>Artemisia princeps</i> (쑥)	W	72	+
<i>Epimedium koreanum</i> (삼지구엽초)	W	68	+
<i>Houttuynia cordata</i> (어성초)	W	95	+++
<i>Ixeris dentata</i> (썸바귀)	W	89	++
<i>Lactuca sativa</i> (상치)	W	98	+++
<i>Perilla sikokiana</i> (자소)	W	73	+
<i>Pyrola japonica</i> (노루발풀)	W	67	+
<i>Salvia plebeia</i> (배암차즈기)	W	78	++
<i>Scutellaria baicalensis</i> (황금)	W	97	+++
<i>Wasabia koreana</i> (고추냉이)	W	92	+++
<i>Xanthium strumarium</i> (도꼬마리)	W	75	++

¹⁾Ethyl acetate soluble fraction obtained from 5 g of each wild plant dissolved in 2 ml of DMSO and diluted with water 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.

²⁾+++ , > 90%; ++ , 75-90%; + , 60-75%.

³⁾W: whole part; S: stem.

sucrose 용액 5 ml를 가하여 분쇄기(waring blender)로 2분간 균질화하고 4°C에서 10,000×g로 다시 20분간 원심분리하여 얻은 과립을 0.25 M sucrose 용액 2 ml에 현탁시키고 -15°C 냉장고에 보관하면서, 사용 시에는 실온에서 녹여 0.25 M sucrose 용액으로 30배 희석하여 효소원으로 사용하였고, 반응보조액으로는 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 반응보조액으로 사용하였다. DBH 저해작용 검색은 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 예열하였다. 여기에 0.12 M tyramine · HCl 0.5 ml를 가하고 90분간 반응시킨 후 3 M trichloroacetic acid 0.4 ml를 가하여 효소 반응을 중단시켰다. 반응 중단 후 즉시 700×g로 10분간 원심분리하고 상등액 3.0 ml를 Dowex 50W x 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% Na₂O₄ 용액 0.2 ml를 가하였다. 10분 방치 후 20% Na₂S₂O₅ 용액 0.2 ml를 가하고 이를 330 nm에서 UV흡광도를 측정하였다. 검액 대신 동량의 증류수를 넣은 대조군과 반응개시점 대신 반응종말점에서 기질용액을 넣은 공시험군, 기질용액 대신 동량의 증류수를 넣은 검액보정군을 함께 실행하였다. 각 군은 모두 2반복으로 실행하여 계산하였으며 아래 수식에 따라 검액의 효소 저해율을 계산하였다.

효소저해율 (%) =

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

결과 및 고찰

야생식물 206종에 대하여 tyramine을 기질로 하여 DBH의 저해활성을 검색한 결과 90% 이상의 저해율을 갖는 식물은 고추냉이(*Wasabia koreana*), 어성초(*Houttuynia cordata*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 상추(*Lactuca sativa*)였고, 그 외 가시오갈피(*Acanthopanax senticosus*), 도꼬마리(*Xanthium strumarium*), 배암차즈기(*Salvia plebeia*), 썸바귀(*Ixeris dentata*)가 효소에 대한 저해 작용을 나타내었으며, 노루발풀(*Pyrola japonica*), 삼지구엽초(*Epimedium koreanum*), 쑥(*Artemisia princeps*), 약쭉(*Artemisia asiatica*)은 저해작용의 유무를 판단하기가 곤란한 수치를 나타내었으며, 과(family)별로 활성 경향을 비교해 본 결과 국화과에서 비교적 많은 활성이 나타났으나 이러한 결과는 다른 과에 비하여 국화과 활성 검색 식물체가 상대적으로 많은 이유에서 기인된 것으로 판단된다. 그러므로 활성이 강하게 나타난 식물 중 상추와 황금은 황⁹⁾ 등이 유효성분분리를 시도하여 수층에서 lettuce acid, asparagine, potassium nitrate를 유효성분으로 분리 보고하였으므로 본 연구자들은 고추냉이와 어성초에서 유효성분을 분리, 구조결정중에 있다.

참고문헌

- Schanberg, S. M., Stone, R. A., Kirshner, N., Gunnells, J. C. and Robinson, R. R. (1974) Plasma dopamine β -hydroxylase: A possible aid in the study and evaluation of hypertension. *Science* **183**: 523.
- Rosenberg, R. C., Gimble, J. M. and Lovenberg, W. (1980) Inhibition of dopamine β -hydroxylase by alternative electron donors. *Biochem. Biophys. Acta* **613**: 62.
- Umezawa, H., Takeuchi, T. and Suda, H. (1970) Inhibition of dopamine β -hydroxylase by fusaric acid *in vitro* and *vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **19**: 35.
- Liu, T. Z., Sen, Z. T. and Loken, H. F. (1974) Inhibition of dopamine β -hydroxylase by hydralazine. *Pro. Soc. Exptl. Biol. Med.* **145**: 294.
- Linuma, H., Mastuzaki, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1974) Biochemical and biological studies on dopastin, an inhibition of dopamine β -hydroxylase. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 2107.
- Anuis, D., Miras, P. M. T. and Mandel, P. (1973) Inhibition of adrenal Dopamine β -hydroxylase by 6-hydroxy dopamine. *Biochem. Pharmacol.* **22**: 2581.
- Van der Schoot, J. B., Creveling, C. R., Nagatsu, T. and Udenfriend, S. (1963) On the mechanism of inhibition of dopamine β -oxidase by benzyloxyamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **141**: 741
- Hwang, K. H. (1994) A novel dopamine β -hydroxylase inhibitor isolated from *Lactuca sativa*. Duksung Women's University, Ph.D Thesis, Seoul
- Creveling, C. R., Daly, J. W., Witkop, B. and Udenfriend, S. (1962) Substrates and inhibitors of dopamine β -hydroxylase. *Biochem. Biophys. Acta* **64**: 125.

Screening of dopamine β -hydroxylase inhibitory activity from various wild plants

Moon Hyung-In*, Ok-Pyo Zee and Mal-Shick Shin¹(*Pharmacognocny Lab, Department of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon; ¹Department of Food and Nutrient, Chonnam National University, Kwangju, Korea*)

Key words : dopamine β -hydroxylase(DBH), bovine adrenal DBH, tyramine, Wasabia koreana, Houttuynia cordata

*Corresponding author