

생약으로부터 산화적 결합 효소인 갑상선 peroxidase 의 저해제 검색

이현정 · 장미영 · 김미리 * · 배기환 · 석대은 *

충남대학교 약학대학, * 충남대학교 가정대학 식품영양학과

(Received April 8, 1999)

Screening of Inhibitor of Thyroid Peroxidase, an Oxidative Coupling Enzyme from Natural Products

Hyun-Jeong Lee, Mi-Young Jang, Mee Ree Kim*, Kihwan Bae and Dai-Eun Sok[#]

College of Pharmacy and *Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Gungdong, Yuseong-Ku, Taejon 305-764, Korea

Abstract — Thyroid peroxidase is a biochemical target protein for the antithyroid drugs. Ethanol extracts from one hundred and thirty seven natural products were screened for the inhibition of thyroid peroxidase activity. Thyroid peroxidase was purified from porcine thyroids, and the inhibition of peroxidase activity was evaluated using guaiacol oxidation (C-C coupling) assay. Twenty one natural products expressed a remarkable inhibition (>50%) of peroxidase activity at 330 µg solid weight/ml. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 70% ethanol extract from six potent natural products ranged from 3.1 to 31.2 µg solid weight/ml, in contrast to the range (0.33~0.54 µg/ml) of IC₅₀ values for catechin and epigallocatechin gallate as positive controls. Noteworthy, the extract of *Camellia taliensis* showed an irreversible inhibition of the enzyme. It is suggested that extract from some natural products such as *Camellia taliensis*, *Rheum undulatum* or *Euphorbia peginensis*, exhibiting a potent inhibition of peroxidase activity, may be developed as sources of potent antithyroid agents.

Keywords □ Thyroid peroxidase, natural products, inhibition.

서 론

갑상선 호르몬(T₃ or T₄)의 생합성은 thyroglobulin 구조내 tyrosine residue가 갑상선 peroxidase에 의해 H₂O₂와 KI의 존재 하에 일차적으로 diiodotyrosine residue로 전환되고 이어서 diiodotyrosine residue가 O-C coupling 반응에 의해 iodothyronine (T₃ or T₄) residue로 전환되는 과정을 의미한다. 이와 같이 생성된 iodothyronine residue는 단백질 분해효소에 의한 가수분해 과정 중 T₄/T₃로 서서히 유리된다.^{1,4)} 이처럼 갑상선 호르몬 생합성 과정의 초기단계인 산화적 coupling 반응에 갑상선 peroxidase가 직접 관여하

므로^{5,7)} 이 효소 활성의 조절은 매우 중요하다. 한편 갑상선 peroxidase는 다른 peroxidase처럼 oxidative C-C coupling에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

갑상선 peroxidase는 생체막 결합형으로 존재하며 그 분자량은 15 kDa 인 당단백질로서 heme을 소유한 일종의 hemoprotein으로 알려져 있다.^{8,10)} 본 효소는 주로 thyrocyte내 perinuclear membrane이나 endoplasmic reticulum에 결합되어 존재하는 것으로 알려져 있는데 당단백질부분중 N-glycan 부분은 효소의 세포 내 이동에 중요한 것으로 알려져 있고, 이러한 탄수화물이 결여시 세포 내에서의 불활성화가 신속히 일어나는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이 효소는 두 개의 폴리펩티드로 구성되어 있고 apoenzyme은 926개의 아미노산으로 구성되어 있으며 탄수화물은 약 10%를 차지하는 것으로 보고되어 있다. 아울러 trypsin처리시

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5940 (팩스) 042-823-6566

일부 폴리펩티드부분(분자량, 약 20 kDa)이 제거되는 것으로 알려져 있다.

갑상선 peroxidase의 활성부위는 다음 특징을 갖고 있는 바 ferryl group인 [Fe(IV)=O]형태가 two-electron oxidation에 의해 iodide를 산화시키면 효소내부에 결합형 hypoiodite(HOI)가 중간체로서 생성되는 것으로 알려져 있으며 이 효소가 환원되면 [Fe(IV)] 형태로 전환되는 것으로 보고되어 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 이외에 갑상선 peroxidase는 다른 식물 peroxidase와는 달리 조절 부위를 지니고 있어 I-나 SCN-에 의해 효소 활성이 약 2배정도 증가하는 것으로 알려진 반면에,^{15,16)} heme 단백질형의 효소처럼 azide나 cyanide에 의해서 저해된다.

특히 이 효소는 과산화수소의 존재 하에 flavonoid 류나 다른 항산화성 페놀류 물질을 H₂O₂ 존재 하에 산화시키는 과정 중에서 서서히 불활성화되는 것으로 알려져 있으며,¹⁷⁾ 또한 야채류에 존재하는 glucosinolate 분해산물인 vinyloxazolidine-2-thione에 의해 저해되는 것으로 보고되어 있다.¹⁸⁾ 최근보고에 의하면 콩류 가공물의 추출물에 함유되어있는 갑상선 peroxidase의 저해성분은 genistein과 daizein등 flavonoids인 것으로 보고되었다.¹⁹⁾ 일찍이 hyperthyroidism의 치료 약물로 propylthiouracil 이나 methimazole등이 사용되어오고 있는데 이들 약물의 기전은 peroxidase의 저해와 불활성화를 초래하기 때문인 것으로 알려져 있다.^{20,21)} 그러나 이들 약물의 미흡한 점이 보고된 바,²²⁾ 보다 우수한 약제의 개발이 요구된다.

본 실험에서는 천연물로부터 갑상선 peroxidase의 우수한 저해제를 탐색하고, 갑상선 기능항진의 새로운 치료제를 개발하기 위해 필요한 기초적 자료를 제공하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기 - Guaiacol, deoxycholate, Triton X-100, trypsin, trypsin inhibitor, catechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, rhein 등은 Sigma 사(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였고, DEAE cellulose (DE52)와 H₂O₂는 Whatmann사 (Fairfield, NJ, U.S.A.)와 Junsei사 (Tokyo, Japan)로부터 각각 구입하였다. 기타 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 효소 활성도는 UV/VIS spectropho-

meter(β Model, UNICAM Co., U.K.)를 이용하여 측정하였다.

천연물 시료용액의 조제 - 실험에 사용된 생약재료는 충남대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어있는 재료를 사용하였다. 건조한 생약 시료를 세절한 후 이중 1 g을 취하여 3 ml의 ethanol(95%)로 하루동안 추출하여 생약추출물로 직접 사용하였고, 별도로 일부 생약 시료의 수침액 및 70% ethanol 추출액을 제조하여 사용하였다.

갑상선 peroxidase의 분리정제 - 기존 보고⁸⁾에서와 같이 돼지 갑상선 조직(200 g)의 절편을 1 mM KI용액을 함유한 500 ml의 50 mM Tris 완충액(pH 7.0) 내에서 균질화 시킨 후 1% deoxycholate와 trypsin (140 mg/l)을 함유시켜 1시간정도 상온에서 교반 후에 trypsin inhibitor(280 mg/l)를 넣고 단백질 분해를 중단시켰다. 이어서 원심분리(25,000 g, 1 hr)후 상정액(80 ml)을 취하여 cold acetone(320 ml)에 넣었다. 약 2분 후에 침전물을 회수 후 0.5 M KCl과 0.5 mM KI를 함유한 25 mM Tris 완충액(pH 7.0)의 100 ml 내에서 균질화 시켰다. 다시 여기에 deoxycholate와 Triton X-100을 각각 넣어 1% 농도가 되게 조절하고 이어서 90분간 상온에서 교반 후 원심분리(12,500 g, 1 hr)하여 얻은 상정액을 ammonium sulfate(32 g/100 ml)로 침전분획 하였다. 이어서 침전물을 상기 KI를 함유한 완충액(50 ml)으로 용해한 후에 0.5 mM KI를 함유한 20 mM Tris 완충용액(pH 7.0)에서 하루동안 투석후 다음과 같이 DEAE cellulose chromatography를 수행했다. 즉 DE 52로 충전된 column(3×30 cm)을 0.5 mM KI를 함유한 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 평형 시킨 후 상기 투석된 효소액을 통과시키고 이어서 동일 인산완충용액(100 ml)을 통과시켰다. 이어서 50 mM KCl을 함유한 동일 완충용액(80 ml)으로 통과시키고 최종적으로 KCl 농도 gradient(50~200 mM)를 함유한 동일 완충용액으로 효소를 용출시켰을 때, 효소활성은 약 0.1 M KCl 부근에서 용출되었다(Sp.A, 5.6 units/mg protein).

갑상선 peroxidase 활성(C-C coupling) 측정 - Peroxidase 활성도 측정은 C-C coupling을 이용하는 guaiacol 산화법²³⁾에 따라서 수행되었다. 즉 1.9 ml의 0.1 M 인산 완충액(pH 8.0)내에 guaiacol 원액(0.1 M)과 H₂O₂ 원액(80 mM)의 80 μl과 20 μl를 각각 넣고 최종적으로 효소 용액(10~30 μl)을 투입한 후

Table I - Screening of thyroid peroxidase inhibitors from extracts of natural products

생 약	학 명	사용부위	저해도
갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i>	Radix	+++
감국	<i>Chrysanthemum morifolia</i>	Flos	++
감초	<i>Glycyrrhiza flabra</i>	Radix	++
강활	<i>Angelica koreana</i>	Radix	++
개병풍	<i>Podgersia tabularis</i>	Radix	++++
갯질경이	<i>Limonium tetragonum</i>	Herba	+++
결명자	<i>Cassia obtusifolia</i> or <i>C. tora</i>	Semen	++
고본	<i>Angelica tenuissima</i>	Radix	+
고비	<i>Osmunda japonica</i>	Herba	++
곽향	<i>Agastache rugosa</i>	Herba	-
괘루인	<i>Trichosanthes kirilowi</i>	Semen	+
구기자	<i>Lycium chinense</i>	Fructus	+
금은화	<i>Lonicera japonica</i>	Flos	+
길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	Radix	-
꽃향유	<i>Elsholtzia splendens</i>	Herba	++
녹용	<i>Cervus Sp.</i>	어린뿔	-
단삼	<i>Salvia militiorrhiza</i>	Radix	+
단풍뎨지풀	<i>Ambrosia trifida</i>	Radix	-
당귀	<i>Angelica gigas</i>	Radix	++
대극	<i>Euphorbia pekinensis</i>	Radix	++++
대청	<i>Isatis tinctoria</i>	Folium	+
대황	<i>Rheum undulatum</i>	Rhizoma	++++
댕댕이덩굴	<i>Cocculus trilobus</i>	Caulis	++
도깨비부채	<i>Rodgersia podophylla</i>	Radix	-*
독활	<i>Aralia cordata</i>	Radix	-
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	Cortex	+
둥글레	<i>Polygonatum odoratum</i>	Rhizoma	+
마황	<i>Ephedra sinica</i>	Herba	++++
만삼	<i>Codonopsis pilosula</i>	Radix	-
만형자	<i>Vitex rotundifolia</i>	Fructus	++
모과	<i>Chaenomeles sinensis</i>	Fructus	+
모근	<i>Imperata cylindrica</i>	Rhizoma	-
목통	<i>Akebia quinata</i>	Caulis	+
복향	<i>Saussurea lappa</i>	Radix	-
몰약	<i>Commiphora molmol</i>	Resin	-
뿔미나리	<i>Ostericum siebodii</i>	Radix	+
문주란	<i>Crinum asiaticum</i> var.	Rhizoma	-
바디나물	<i>Angelica decursiva</i>	Radix	+
박새	<i>Veratrum patulum</i>	Radix	++
박하	<i>Mentha arvensis</i>	Herba	++
반하	<i>Pinellia ternata</i>	Tuber	-
방기	<i>Sinomenium acutum</i>	Rhizoma	-
방풍	<i>Ledebouriella seseloides</i>	Radix	+++
백모근	<i>Imperata cylindrica</i>	Radix	+
백복령	<i>Poria cocos</i>	Hoelen	-
백자인	<i>Thuja orientalis</i>	Semen	+
백지	<i>Angelica dahurica</i>	Radix	+++
백하수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	Radix	+
백합	<i>Lilium lancifolium</i>	Bulbus	-
복분자	<i>Rubus coreanus</i>	Fructus	++++
부자	<i>Aconitum carmichaeli</i>	Tuber	-
사상자	<i>Torilis japonica</i>	Fructus	+
사인	<i>Amomum xanthoides</i>	Semen	+++
산두근	<i>Sophora subprostrata</i>	Radix	-
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	Fructus	-*

Inhibition of thyroid peroxidase by the extract (330 µg solid weight/ml) was expressed as follows: -, <5 % inhibition; +, 5~20% inhibition; ++, 20~50% inhibition; +++, 50~70% inhibition; +++++, >70% inhibition; *, activation.

Table I - Continued

생약	학명	사용부위	저해도
산약	<i>Dioscora japonica</i>	Radix	-
산자고	<i>Tulipa edulis</i>	Bulbus	+
산조인	<i>Zizyphus jujuba</i>	Semen	++
산초	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Fructus	+++
삼릉	<i>Scirpus flaviatilis</i>	Rhizoma	-
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	Herba	++
상백피	<i>Morus alba</i>	Cortex	++
생이가래	<i>Salvinia natans</i>	Herba	-
석곡	<i>Dendrobium nobile</i>	Herba	-
세신	<i>Asiasarum sieboldii</i>	Radix	-
소리쟁이	<i>Rumex crispus</i>	Radix	++
소엽	<i>Perilla frutescens</i>	Herba	++
속단	<i>Phlomis umbrosa</i>	Radix	++
송악	<i>Hadera rhombea</i>	Herba	+++
속지황	<i>Rehmannia flutinosia</i>	Radix	+
승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	Rhizoma	+++
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	Radix	+
애기똥풀	<i>Chelidonium majus var.</i>	Radix	-
어성초	<i>Houttuynia cordata</i>	Herba	++
연교	<i>Forsythia viridissima</i>	Fructus	+++
연근	<i>Nelumbo nucifera</i>	Rhizoma	-
영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderma lucidum	-
오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	Cortex	++
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	Fructus	++
오수유	<i>Evodia officinalis</i>	Fructus	-
오약	<i>Lindera strychnifolia</i>	Radix	-
용담	<i>Gentiana scabra var. buergeri</i>	Rhizoma	-
우슬	<i>Achyranthes japonica</i>	Radix	-
울금	<i>Curcuma longa</i>	Rhizoma	-
원지	<i>Polygala tenuifolia</i>	Radix	-
유백피	<i>Ulmus macrocarpa</i>	Cortex	++++
읍양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	Herba	-
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i>	Herba	-
인진호	<i>Artemisia capillaris</i>	Herba	++++
자근	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Radix	+
자라풀	<i>Hydrocaris dubia</i>	Herba	-
작약	<i>Paeonia albiflora</i>	Radix	-
적하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	Radix	+++
정향	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Flos	++
죽여	<i>Phyllostachys nigra var. henonis</i>	Caulis in Teanium	-
죽엽	<i>Phyllostachys nigra var. henonis</i>	Folium	-
지골피	<i>Lycium chinense</i>	Rhizoma	+
지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	Rhizoma	+
진교	<i>Gentiana axillariflora var. coreana</i>	Radix	+
진피	<i>Citrus unshiu</i>	Pericarpium	+
대리차	<i>Camellia taliensis</i>	Herba	++++
차전자	<i>Plantago asiatica</i>	Semen	-
참마	<i>Dioscorea japonica</i>	Fructus	++
창이자	<i>Xanthium strumarium</i>	Fructus	+
창출	<i>Atractylodes japonica</i>	Rhizoma	-
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	Rhizoma	+++
천남성	<i>Arisaema amurense</i>	Rhizoma	-
천련근	<i>Melia azedarach</i>	Rhizoma	-
천마	<i>Gastrodia elata</i>	Rhizoma	-
천오	<i>Aconitum carmichaeli</i>	Tuber	-
천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Radix	-
청피	<i>Citrus unshiu</i>	Pericarpium	++
치자	<i>Gardenia jasminoides</i>	Fructus	+++

Table I - Continued

생 약	학 명	사용부위	저해도
택사	<i>Alisma orientale</i>	Rhizoma	-
도복령	<i>Smilax china</i>	Rhizoma	-
토사자	<i>Cuscuta chinensis</i>	Semen	+
파두	<i>Croton tiglium</i>	Semen	++
행인	<i>Prunus armeniaca</i>	Semen	++
향부자	<i>Cyperus rotundus</i>	Rhizoma	-
현삼	<i>Scrophularia oldhami</i>	Radix	+
현호색	<i>Corydalis ternata</i>	Tuber	-
호황련	<i>Picrorrhiza kurroa</i>	Rhizoma	++++
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	Flos	+
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Radix	-
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	Radix	+
황련	<i>Coptis japonica</i>	Rhizoma	-
황백	<i>Phellodendron amurense</i>	Cortex	+
황약자	<i>Discorea bulbifera</i>	Rhizoma	-
황정	<i>Polygonatum sibiricum</i>	Rhizoma	-
회향목	<i>Buxus microphylla</i> var. <i>koreana</i>	Caulis	++
후박	<i>Magnolia officinalis</i>	Cortex	++

464 nm에서 흡광도의 증가를 측정하였다.

갑상선 peroxidase 저해도 측정 - 상기 활성도 측정 조건에서 각 천연물 고형물시료를 일정농도(330 µg solid weight/ml)로 넣고서 30 초간 효소 활성도 변화를 측정하고, 시료 추출물이 첨가되지 않은 대조군의 활성과 비교하여 상대 활성도(%)로 표시하였다. 이때 IC₅₀값은 대조군 활성을 50%로 감소시키는 시료 고형물의 농도(µg solid weight/ml) 또는 단일성분의 농도(µg/ml)로 표시하였다. 별도로 epigallocatechin gallate의 존재하에 guaiacol의 산화속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot에 의한 Ki 값을 구하였다.

갑상선 peroxidase의 불활성화 측정 - 효소 불활성화 측정을 위해 70% 에탄올 추출물의 일정량(IC₅₀의 4 배량)을 함유한 0.1 M 인산 완충액(pH 8.0)의 170 ml에 효소액 30 µl를 넣은 후 10분간 상온에서 정치 후 일정량을 취하여 잔여 활성을 1분간 측정하였고, 대조군의 효소 활성과 비교하여 상대 활성도(%)로 표시하였다. 별도로 강한 불활성화를 표시하는 대리차 추출물에 의한 불활성화를 경시별(0~7분)로 분석하였다.

실험결과

Peroxidase활성의 저해제 검색 - Guaiacol 산화 분석법을 이용하여 갑상선 peroxidase에 대한 저해제를 무작위로 선택한 생약 추출물로부터 탐색한 결과 Table I

Table II - IC₅₀ values of the extracts from potent natural products

생약명	95% ethanol	70% ethanol	증류수
대리차	31.9	3.08	8.57
대황	10.1	7.40	15.5
대극	21.0	11.8	17.4
유백피	21.1	13.6	22.1
개명풍	29.5	22.0	56.3
복분자	101	31.2	22.7

Values, µg solid weight/ml

에 나타난 바처럼 총 137 종의 생약 추출물(95% 에탄올)중 21 종이 330 µg solid weight(생약 고형물무게)/ml에서 50% 이상의 저해를 표시함으로써 뚜렷한 저해력을 지닌 것으로 파악되었고, 산수유등 두 가지 생약 추출물의 경우 동일 농도수준에서 오히려 100%이상의 상승효과를 나타냈다. 상기결과에서 갑상선 peroxidase에 대해 70% 이상 저해하는 것으로 파악된 9 가지 생약중 대리차, 대황, 대극, 유백피, 갯방풍, 복분자의 95% 에탄올추출물의 저해활성을 측정하여 50% 저해농도(IC₅₀)를 산출했을 때 10~101 µg solid weight/ml 범위의 IC₅₀값을 지닌 것으로 나타났다(Table II). 이와 관련 이들 생약의 추출용매를 달리하여 얻은 추출물의 갑상선 peroxidase에 대한 저해력을 측정한 결과 추출용매에 따라서 저해도 차이가 크게 다르게 나타났는데, 대황이나 개명풍의 경우 95% 에탄올과 75% 에탄올 추출물사이 저해효과의 차이가 근소한 반면에, 대리차와 복분자의 경우 70% 에탄올 추출액이 더 효과적이었고, 복분자의 경우 수침액이 더 우수하였다. 대

Table III - IC_{50} values of some phenolic compounds

시료명	IC_{50} 농도	K_i 값
Epigallocatechin Gallate	0.329 (0.72)	(0.89)
Epigallocatechin	0.544	-
Catechin	0.537 (1.85)	-
Rhein	>200	-

Values, $\mu\text{g}/\text{ml}$; values in parenthesis, μM

체로 70% 에탄올 추출물의 저해활성이 더 크게 나타
난바 IC_{50} 값은 3.1~31 μg solid weight/ml 범위로 나
타났다. 별도로 갑상선 peroxidase의 저해제로 보고된
catechin을 양성 대조군으로 사용 다른 flavonoid류 즉
epigallocatechin, epigallocatechin gallate 그리고 an-
thraquinone류인 rhein의 저해효과와 비교 평가한 결과
(Table III), epigallocatechin gallate(IC_{50} , 0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
가 catechin(IC_{50} , 0.54 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 더 우수한 저해제인
것으로 관찰된 반면에 rhein의 저해효과는 거의 없었
다. 이때 epigallocatechin gallate는 경쟁적 저해(K_i ,
0.89 μM)를 나타내는 것으로 파악되었다(Fig. 1). 별도
의 실험에서 이들 천연물 추출액의 저해기전에 대해 파
악하기 위해 상기 6 가지의 70% 에탄올 추출물의 일
정량($4 \times IC_{50}$)을 peroxidase와 함께 10분간 preincuba-
tion을 했을 때 대리차 추출물만이 peroxidase 활성을
감소 시켰고 동일농도의 대리차 추출물에 의한 불활성
화 정도를 경시별로 측정했을 때 Fig. 2에서와 같이 비
교적 낮은 농도(12 μg solid weight/ml) 수준에서 효소
불활성화를 나타냈다.

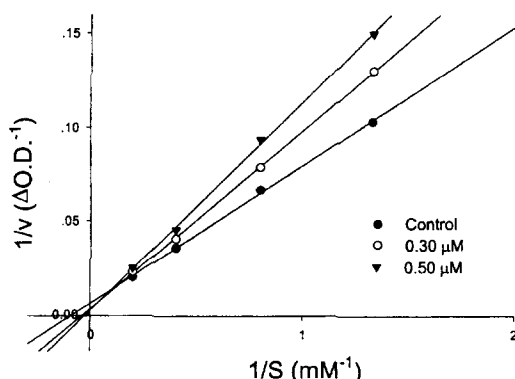


Fig. 1 - Inhibition of thyroid peroxidase by epigallocatechin gal-
late. Thyroid peroxidase was incubated with guaiacol
(0.75~5 mM) and H_2O_2 (0.2 mM) in the presence or
absence of epigallocatechin gallate in 2 ml of 0.1 M
phosphate buffer, pH 8.0, and the activity was deter-
mined as described in Experimental Methods. (n=2 or 3).

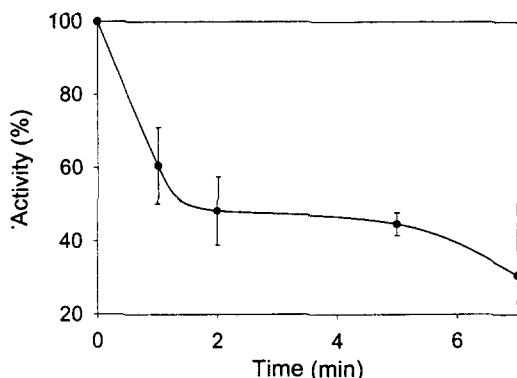


Fig. 2 - Time-dependent inhibition of thyroid peroxidase by the
extract of *Camellia taliensis*. Thyroid peroxidase was
preincubated with 70% ethanol extract of *Camellia
taliensis* (12 μg solid weight/ml) at room temperature,
and at each time intervals, an aliquot was taken for the
assay of peroxidase activity. Points were expressed as
the mean \pm S.D. of triplicate sets.

고 찰

본 실험에서 수종의 천연물 추출물이 갑상선 per-
oxidase에 의한 guaiacol의 산화적 coupling반응에 대해
서 강한 저해작용을 나타냈다. 추출용매를 달리한 대
황등 일부 생약의 경우 에탄올 추출물이 물 추출물보
다 더 우수하였는바 이들 생약에 함유된 저해제성분은
소수성이 더 큰 것으로 사료되나, 복분자 추출물의 경
우 수침액의 저해효과가 더 큰 것으로 보아 친수성이
더 큰 성분에 의한 것으로 사료된다. 이와 같이 추출
용매에 따라 활성이 다르게 나타난 것은 효소 활성 저
해 성분의 극성이 다르기 때문이라고 사료된다. 일찍
이 flavonoid류에 의한 갑상선 peroxidase의 저해에
대해 보고된 바가 있다.¹⁹⁾ 본 실험에서도 강한 저해를
표시한 천연물 추출물들은 flavonoid류 성분을 함유하
고 있는 것으로 알려진 바, 이들 phenol성 물질들이
peroxidase 활성의 주요 저해인자로 사료되지만, 대리
차 및 대황 추출물의 경우 생약고형물 무게 농도(μg
solid weight/ml)로 산출한 IC_{50} 값이 catechin의 IC_{50}
값에 비해 6~14배 정도 저해력 차이가 나타나므로
이들 생약류에 함유된 유효 저해성분은 catechin 보다
더 강력한 저해제 성분일 것으로 사료되어 구조규명이
진행중이다. 더욱이 대리차 추출물은 preincubation 과
정중 서서히 갑상선 peroxidase를 불활성화 시키는 것
으로 관찰되었는데 이러한 결과는 resorcinol등 일부
phenol류가 H_2O_2 의 존재 하에 thyroid peroxidase를

불활성화 시킨다는 기존 보고¹⁷⁾와 유사한 것이나, 대리차 추출물의 경우 H_2O_2 의 존재와 상관없이 단독으로 불활성화를 표시하였는 고로 대리차 추출물에 함유된 불활성화 성분은 기존 보고¹⁹⁾된 불활성화 성분과는 다른 구조를 지닌 것으로 사료된다. 한편, 이러한 불활성화는 효소 활성 측정시 추출물 성분과 H_2O_2 간의 반응으로부터 생성된 불활성화 성분에 기인 될 수도 있다. 이상의 결과로서 우수한 저해효과를 지닌 몇 가지 생약 성분들의 저해현상은 기존 antithyroid 약물들의 생화학적 기전²⁰⁾과 같은 것으로 차후 유효성분의 분리 및 동정을 통해 신규 갑상선 기능 항진 개선제 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다. 아울러 상기에서 강한 저해력을 표시한 생약 추출물들은 상용량에서 갑상선 peroxidase 활성을 저해하여 갑상선 호르몬 생성을 방해할 것으로 사료되므로 이에 대한 구체적 연구가 요구된다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 한국과학재단 연구비(981-0704-034-1)에 의하여 수행되었기에 이에 감사의 말씀을 드립니다

문 헌

- 1) Klebanoff, S. J., Yip, C. and Kessler, D.: The iodination of thyrosine by beef thyroid preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 563 (1962).
- 2) Ogawara, H., Bistad, J. M. and Cahnmann, H. J.: Iodoamino acid distribution in thyroglobulin iodinated in vivo and in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **257**, 339 (1972).
- 3) Devlin, T. M.: In the Biochemistry: biochemistry of hormones 3rd ed., Wiley-Liss, Inc., New York, p. 865 (1992).
- 4) Gavaret, J.-M., Cahnmann, H. T. and Nunez, J.: Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* **256**, 9167 (1981).
- 5) Taurog, A.: Mechanism of simultaneous loading and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **330**, 324 (1996).
- 6) Marriq, C., Lejeune, P. -J., Venot, N., and Vinet, L.: Hormone formation in the isolated fragment 1-171 of human thyroglobulin involves the couple between tyrosine 5 and tyrosine 130. *Mol. Cell. Endocrinol.* **81**, 155 (1991).
- 7) Ohmiya, Y., Hayashi, H, Kondo, T. and Kondo, Y.: Location of dehydroalanine residue in the amino acid sequence of bovine thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* **265**, 9066 (1990)
- 8) Rawitch, A. B., Taurog, A., Chernoff, S. B. and Dorris, M. L.: Hog thyroid peroxidase: physical, chemical, and catalytic properties of the highly purified enzyme. *Arch. Biochim. Biophys.* **194**, 244 (1979).
- 9) Yokoyama, N. and Taurog, A.: Porcine thyroid peroxidase: relation between the native enzyme and an active, highly purified tryptic fragment. *Mol. Endocrinol.* **2**, 838 (1988).
- 10) Ohtaki, S., Nakagawa, H. and Yamazaki, I.: Reaction of detergent- solubilized thyroid peroxidase with hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* **109**, 71 (1980).
- 11) Fayadat, L., Niccoli-Sire, D., Lanet, J. and Franc, J. L.: Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology* **139**, 4277 (1998).
- 12) Ohrhki, S., Nakagawa, H., Nakamura, M. and Yamazaki, I.: One- and two-electron oxidation of tyrosine, moniodotyrosine, and diiodotyrosine catalyzed by hog thyroid peroxidase. *J. Biol. Chem.* **257**, 13398 (1982).
- 13) Nakamura, M., Yamazaki, Isao., Kotani, T. and Ohtaki, S.: Thyroglobulin-mediated one- and two-electron oxidations of glutathione and ascorbate in thyroid peroxidase systems. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12909 (1989).
- 14) Doerge, D. R., Taurog, A. and Dorris, M. L.: Evidence for a radical mechanism in peroxidase-catalyzed coupling. *Arch. Biochim. Biophys.* **315**, 90 (1994).
- 15) Michot, J. L., Osty, J. and Nunez, J., Regulatory effects of iodide and thiocyanate on tyrosine oxidation catalyzed by thyroid peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **107**, 297 (1980).
- 16) Virion, A., Deme, D., Pommier, J. and Nunez, J.: Opposite effects of thiocyanate on tyrosine iodination and thyroid hormone synthesis. *Eur. J. Biochem.*

- 112, (1980).
- 17) Divi, R. L. and Doerge, D. R. : Mechanism-based inactivation of lactoperoxidase and thyroid peroxidase by resorcinol derivatives. *Biochemistry* **33**, 9668 (1994).
- 18) McMillan, M., Spinks, E. A. and Fenwick, G. R. : Preliminary observations on the effect of dietary brussels sprouts on thyroid function. *Human Toxicol.* **5**, 15 (1986).
- 19) Divi, P. L., Chang, H. C. and Doerge, D. R. : Anti-thyroid isoflavanones from soybean, isolation, characterization, and mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1087 (1997).
- 20) Taurog, A. : The mechanism of action of the thioureylene antithyroid drug. *Endocrinology* **98**, 1031 (1975).
- 21) Doerge, D. R. and Takazawa, R. S. : Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 98 (1990).
- 22) Bergman, U. and Brittebo, E. B. : Methimazole toxicity in rodents: covalent binding in the olfactory mucosa and detection of glial fibrillary acidic protein in the olfactory bulb. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **155**, 190 (1999).
- 23) Taurog, A., Dorris, M. L. and Guziec, Jr., F. S. : An unexpected side reaction in the guaiacol assay for peroxidase. *Anal. Biochem.* **205**, 271 (1992).