

천연물로부터의 세포내 효소 활성 조절물질의 탐색 및 기능 연구 : 갈근의 알코올 탈수소효소 저해 활성 성분

이현주 · 오민아 · 최영희 · 이강만[#]

이화여자대학교 약학대학 · 약학연구소

(Received June 18, 2001; Revised July 20, 2001)

Studies on the Screening of Bioactive Compound Acting on Intracellular Enzymes from Natural Products and Its Mode of Action : Inhibitory Component of Puerariae Radix on Alcohol Dehydrogenase Activity

Hyun Joo Lee, Min Ah Oh, Young Hui Choi and Kang Man Lee[#]

The Research Institute of Pharmaceutical Sciences and College of Pharmacy,
Ewha Womans University Seoul 120-750, Korea

Abstract — Puerariae Radix is one of the medicinal plants used in oriental medicine for hangover. It has been claimed for several pharmacological effects including anti-alcohol abuse, antidipsotropic activity and anti-alcohol intoxication. In connection with Puerariae Radix effects, an activity-guided purification of active substance on alcohol dehydrogenase (ADH) was carried-out. The most active compound was isolated as puerarin ($C_{21}H_{20}O_9$), molecular weight 416. Puerarin inhibited ADH noncompetitively against ethanol or NAD^+ .

Keywords □ Puerariae radix, alcohol dehydrogenase, noncompetitive inhibition

최근 알코올에 의한 간세포 손상을 예방, 치료할 수 있는 목적으로 전통적으로 사용되어 온 한방 방제나 천연물로부터 간장 보호제 또는 치료제를 개발하기 위한 연구에 관심을 가지게 되었다. 이러한 목적으로 동물의 알코올 분해 대사계 중 대사 일차 효소인 알코올 탈수소효소에 대한 활성을 가지는 여러 가지 천연물을 선별하는 실험과정 중 전통적으로 한방과 민간에서 숙취해소 용도로 자주 사용되어온 갈근에서 알코올 탈수소효소에 대한 현저한 저해활성을 확인하게 되었다.¹⁾

갈근은 많은 약리학적 활성 중 알코올 중독의 치료, 알코올 해독, 간보호 작용 등에 안전하고 효과적으로 사용되어왔다.^{2,6,7,9)} 실제 그 활성성분과 약리작용 관계에 대한 여러 연구 보고가 있다. 갈근의 사포닌 성

분은 간에 면역학적 손상을 주었을 때 간보호 작용 (hepatoprotective action)을 나타내고³⁾ alanine amino-transferase 활성을 저하시키며⁴⁾ daidzin은 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase-2: ALDH-2)의 저해에 의한 알코올 흡수의 선택적 저해를 보인다.⁵⁾ 또한 갈근 성분은 구조적으로 두뇌의 benzodiazepin 수용체에 대한 친화성을 가지고 있어 알코올의 GABA/benzodiazepin-chloride channel complex를 통한 약리학적 작용을 조절한다는 보고도 있다.⁶⁾ 갈근의 알코올에 대한 효과는 특히 isoflavone에서 기인한다고 알려져 있다.⁸⁾ 지금까지 밝혀진 isoflavone은 daidzin, daidzein, genistin, genistein, formononetin, puerarin 등이다. 특히 daidzin은 음주효과에 대한 주 활성 성분이고, 이외의 성분들은 daidzin의 흡수를 도와주는 역할을 한다고 알려져 있다.⁸⁾ 또한 갈근의 성분인 daidzein, puerarin은 항염증효과가 있다는 보고도 받

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-3277-3041 (팩스) 02-3277-3041

표된 바 있다.¹¹⁾

본 연구에서는 알코올 탈수소효소에 강한 저해활성을 보이는 갈근의 활성성분을 분리정제(activity-guided purification)하고, 저해 활성성분으로 puerarin을 확인한 후 말 간 알코올 탈수소효소(horse liver alcohol dehydrogenase; HLADH)와 쥐 간 세포질 분획(Rat liver cytosolic fraction)에 존재하는 alcohol dehydrogenase 활성에 대한 영향을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

생약 - 본 연구에 사용한 갈근은 국내(경기도 양평군)에 자생하는 칩뿌리를 채집하여 사용하였다. 채집 식물은 이화여자대학교 도정에 명예교수의 식물학적 감정을 받아 실험재료로 사용하였다.

효소 및 조효소 - 말 간 알코올 탈수소효소(horse liver alcohol dehydrogenase:HLADH)는 Boehringer Mannheim(GmbH·Germany)제품을 투석하여 사용하였고, 효소 활성 측정연구에 사용한 조효소는 NAD^+ free acid(Grade III, Sigma Chemical Co.)이었다.

쥐 간 알코올 탈수소 효소액의 조제 - 실험 동물로는 체중 약 250 g 전후의 Sprague-Dawley계의 쥐(rat) 수컷을 이화여자대학교 약학대학 약물학연구실로부터 공급받아 사용하였다. 쥐를 단두한 후 복부를 절개하여 간을 적출하였다. 적출된 간에 적출장기 중량(7.5 g)의 10배에 해당하는 10 mM Tris-HCl(pH 7.4)를 첨가하고, 균질화 하여 700×g에서 10분간 원심분리하여 핵분획을 제거한 뒤, 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 다시 상등액을 105,000×g에서 60분간 초원심분리하였다. 초원심분리의 상등액인 세포질 분획을 쥐 간 alcohol dehydrogenase 효소액으로 사용하였다.¹⁰⁾

기기 및 시약 - Rotary vacuum evaporator는 BUCHI Rotavapor RE 121/A를, pH meter는 Jenco Electronics의 Microcomputer pH-VISION 6071을, Magnetic stirrer는 태원과학의 IKAMAG RH를, 원심분리기는 한일과학주식회사의 Micro 17R을 사용하였다. 효소 활성 측정을 위해서는 Shimadzu UV 160A Spectrophotometer를 사용하였다. 물질의 구조 확인을 위한 NMR 실험은 Bruker DPX 400(9.4T) Spectrometer에서 5 mm dual probe를 사용하였으며, probe의 온도는 300K로 유지하였다. 분자량 측정에는 Jeol

JMS-AX505WA FAB-MS(서울대학교 기초과학교육연구 공동기기원)를 이용하였다. 시약의 조제에는 Milli-Q Reagent Water System(Millipore®)을 통과시킨 증류수를 사용하였다. 기질로는 95% 에탄올(Ducksan Pharmaceutical Co.)을 사용 시에 증류하여 사용하였다. 기타 실험에 사용한 모든 시약은 특급 또는 1급 제품을 사용하였다.

추출물의 조제 - 갈근 200 g에 99.5% methanol 2L을 가하여 3시간 이상 환류 냉각법으로 추출하고, 감압 농축 건조하여 추출물로 사용하였다.

Alcohol dehydrogenase(ADH) 활성의 측정 - 1.0 mM NAD^+ , 5.0 mM ethanol을 함유하는 33 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)를 cuvette에 넣은 뒤 UV spectrophotometer속에서 add mixer를 사용하여 말 간 알코올 탈수소효소 10 μl 를 가하여(반응액 총 부피 : 1 ml) 생성되는 NADH에 의한 340 nm의 흡광도 변화를 측정하여 대조시험으로 하였다. 갈근 성분의 저해 활성을 보기 위하여 시료액 10 μl 를 효소 반응용액에 가하여 효소 활성을 측정하여 대조시험에서의 효소 활성에 대한 상대활성 백분율 비를 구하였다.

갈근의 활성 성분의 분리 및 구조 결정 - 갈근의 methanol 추출물 3 g을 증류수 50 ml에 현탁하고 chloroform 20 ml, ethylacetate 20 ml, 1-butanol 20 ml로 각각 4회씩 순차적으로 추출한 후 수층 농축액 2.7 g을 취하여 전개용매 chloroform : methanol : water = 6:4:0.1을 이용하여 silica gel column chromatography(230~400 mesh, 10×400 mm)를 실시하여 alcohol dehydrogenase 저해 활성분획을 얻었다. 활성분획을 감압 건조하고 소량의 methanol에 녹여 preparative TLC(silica gel plate, 20×20 cm, 전개용매 chloroform : methanol : water = 6:4:0.1)를 실시하였다. 활성밴드로부터 얻은 물질 0.3 g 대하여 Sephadex LH-20 column chromatography(10×350 mm), Prep TLC(silica gel plate, 20×20 cm), Sephadex LH-20 column chromatography(10×350 mm)를 순차적으로 실시하여 활성물질을 분리하였다. 분리된 활성물질은 FAB-MS, ^1H , ^{13}C -NMR을 실시하여 화학구조를 결정하였다.

갈근 활성성분에 의한 ADH저해 - 반응은 25°C에서 온도 평형시켜 둔 0.25 mM EDTA를 포함하는 pH 8.0의 33 mM sodium phosphate 완충액에 조효소, 기질, 갈근의 활성성분으로 분리된 puerarin용액을 혼

합하고, 거기에 효소 용액을 가하여 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 얻은 초기 반응속도를 COMP, NONCOMP, UNCOMP program을 이용한 computer fitting을 실시함으로써 저해형태와 저해상수(K_{ii} 또는 K_{is})를 구하였다.

Isoflavonoid에 의한 저해 - 대조 물질로 갈근의 성분으로 알려진 daidzein, genistein을 Sigma사로부터 구입하여 puerarin에 의한 저해 연구와 동일한 방법으로 실험하였다. 각각의 저해제에 의한 효소의 저해형태와 저해상수(K_{ii} 또는 K_{is})를 구하였다.

실험결과 및 고찰

갈근의 활성 성분의 분리 및 구조 결정 - 갈근의 methanol 추출물을 증류수에 현탁하고 chloroform, ethylacetate, 1-butanol로 각각 4회씩 순차적으로 추출한 후 수층 농축액 2.7g을 취하여 silica gel column chromatography(230~400 mesh, 10×400 mm)를 실시하여 alcohol dehydrogenase 저해 활성을 주로 보

이는 분획을 수집하였다. 그 분획에 대한 TLC(용매 chloroform : methanol : water = 6:4:0.1)를 실시하였을 때 $R_f=0.63$ 인 물질에서 활성을 확인하였다. 이 물질에 대하여 Sephadex LH-20 column chromatography (10×350 mm), Prep TLC(silica gel plate, 20×20 cm)를 실시하였을 때, $R_f=0.796\sim0.669$ 인 UV 흡수대에서 alcohol dehydrogenase 저해 활성을 보이는 물질을 얻었다. 계속하여 Sephadex LH-20 column chromatography(10×350 mm)를 실시하여 활성물질을 분리하였다. 분리된 물질은 FAB-MS를 이용한 실험에서 분자량이 416이었다. 1H , ^{13}C -NMR 실험과 DEPT 실험을 통해 6탄당 하나와 flavonoid 골격을 가진 구조임을 알 수 있었고, aromatic group을 assign하기 위하여 실시한 HMQC(Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) 실험과 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation)(delay time(Δt)=45 msec) 실험을 통하여 isoflavone의 C8 위치에 glucose가 C-glycoside 결합된 puerarin($C_{21}H_{20}O_9$) 구조임을 확인하였다. 또한 COSY와 TOCSY 실험을 통하여 6탄당의 구조와

Table I - Assignments of the 1H and ^{13}C -NMR spectral data of Puerarin

Number of ^{13}C	$\delta^{13}C$ (ppm)	^{13}C multiplicity obtained from DEPT	$\delta^{13}C$ (ppm) ^{a)}	$\delta^{13}C$ (ppm) ^{b)}	δ^1H (ppm) obtained from HMQC	assignments
C-sugar						
1	61.0	t	61.1	61.3	3.69/3.50	6"
2	70.1	d	70.5	70.5	3.24	4"
3	70.4	d	73.2	70.8	4.09	2"
4	73.4	d	78.6	74.1	4.80	1"
5	78.7	d	70.5	79.2	3.27	3"
6	81.4	d	81.7	81.6	3.24	5"
Isoflavone						
7	111.9	s	112.5	111.9	-	8
8	114.7	d	114.8	115.1	6.80	3', 5'
9	115.1	s	116.6	117.4	-	10
10	116.0	d	114.8	114.3	6.94	6
11	122.5	s	122.4	122.9	-	1'
12	122.6	s	122.9	123.1	-	3
13	125.6	d	126.1	125.8	7.85	5
14	129.7	d	130.0	130.1	7.37	2', 6'
15	152.3	d	152.6	152.0	8.27	2
16	156.7	s	156.1	151.1	-	9
17	157.2	s	157.1	157.3	-	4'
18	163.8	s	161.2	166.4	-	7
19	174.6	s	174.9	174.8	-	4

^{a)}Data from Lee *et al.* (1994)¹¹⁾

^{b)}Data from Ingham *et al.* (1986)¹²⁾

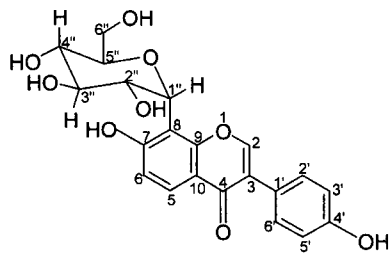


Fig. 1 - The structure of puerarin.

chemical shift를 할당할 수 있었다(Table I, Fig. 1).

같은 활성 성분에 의한 저해 - 분리된 물질인 puerarin에 대한 말 간 alcohol dehydrogenase 저해

실험의 결과는 Table II와 Fig. 2에서 요약하였다. Puerarin은 조효소인 NAD⁺와 기질인 에탄올에 대하여 비경쟁적 저해 유형(noncompetitive inhibition pattern)을 보였다. 쥐 간 alcohol dehydrogenase 저해 실험에 대한 결과도 HLADH 저해 실험과 마찬가지로 NAD⁺와 기질인 에탄올에 대하여 비경쟁적 저해 유형 (noncompetitive inhibition pattern)을 나타내었다(Table II, Fig. 3). 이는 같은 HLADH 저해활성 성분으로 분리된 puerarin이 alcohol dehydrogenase에서 효소 자체나 조효소가 부착된 이중 복합체(binary complex)에 작용하여 효소에 대한 조효소의 부착 또는 효소 : 조효소 이중 복합체에서 기질의 부착을 저해함으

Table II - Inhibition studies of Puerarin were performed at 25°C in 33 mM sodium phosphate (pH 8.0) containing 0.25 mM EDTA

Substrate		Inhibitor	Enzyme	K _m	K _{is} ^{a)}	K _{ii} ^{b)}	V	Pattern ^{c)}
Fixed	Varied							
C ₂ H ₅ OH (20 mM)	NAD ⁺ (20-200 μM)	Daidzein	HLADH	35.874	63.380	64.444	5.460	NC
NAD ⁺ (1 mM)	C ₂ H ₅ OH (1-5 mM)	(0.00-62.95 μM)		1.561	33.941	85.814	7.075	NC
C ₂ H ₅ OH (20 mM)	NAD ⁺ (20-200 μM)	Genistein	HLADH	32.075	47.001	61.963	4.707	NC
NAD ⁺ (1 mM)	C ₂ H ₅ OH (1-5 mM)	(0.00-39.79 μM)		0.958	35.853	54.874	6.264	NC
C ₂ H ₅ OH (20 mM)	NAD ⁺ (20-200 μM)	Puerarin	HLADH	31.093	46.204	98.122	4.879	NC
NAD ⁺ (1 mM)	C ₂ H ₅ OH (1-5 mM)	(0.00-82.21 μM)		0.728	27.380	70.720	7.020	NC
C ₂ H ₅ OH (20 mM)	NAD ⁺ (0.05-1 mM)	Puerarin	Rat liver cyto-	0.112	115.35	252.14	5.078	NC
NAD ⁺ (1 mM)	C ₂ H ₅ OH (1-5 mM)	(0.00-102.76 μM)	solic fraction	0.479	64.905	179.92	6.729	NC

^{a)}Slope inhibition constant

^{b)}Intercept inhibition constant

^{c)}NC, noncompetitive inhibition

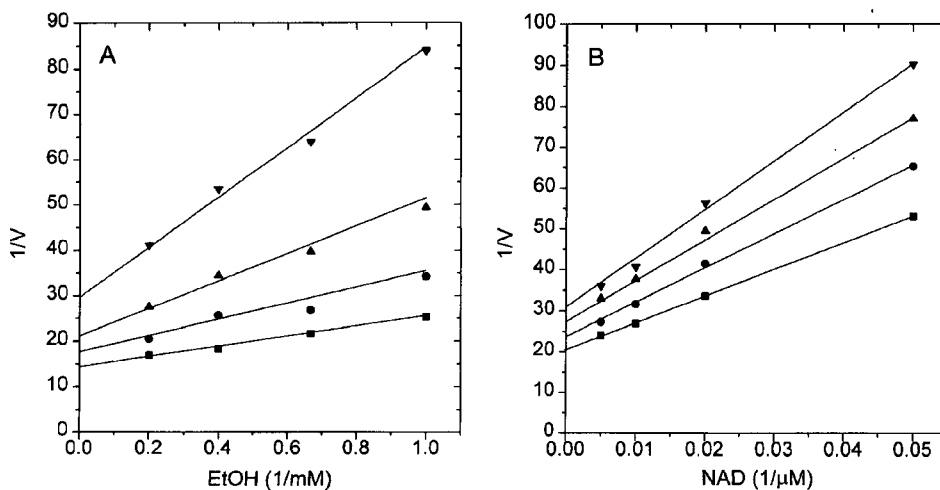


Fig. 2 - Inhibition studies of puerarin were performed at 25°C in 33 mM sodium phosphate (pH 8.0) containing 0.25 mM EDTA. Horse liver alcohol dehydrogenase was used as enzyme. A: Puerarin 0.00~82.21 μM (■: 0.00, ●: 20.55, ▲: 41.11, ▼: 82.21 μM). B: Puerarin 0.00~41.11 μM (■: 0.00, ●: 20.55, ▲: 27.40, ▼: 41.11 μM)

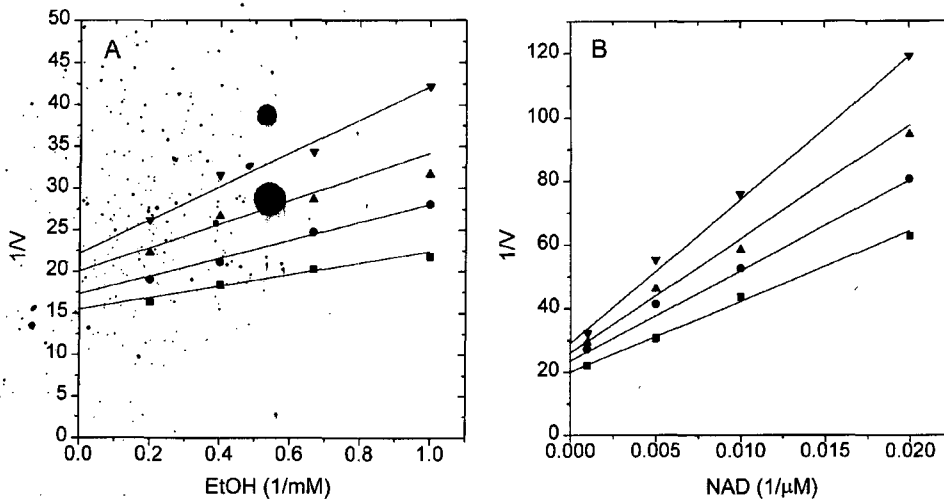


Fig. 3 - Inhibition studies of puerarin were performed at 25°C in 33 mM sodium phosphate (pH 8.0) containing 0.25 mM EDTA. Rat liver cytosolic fraction was used as enzyme. A: Puerarin 0.00~82.21 μM (■: 0.00, ●: 41.11, ▲: 61.66, ▼: 82.21 μM). B: Puerarin 0.00~102.76 μM (■: 0.00, ●: 61.66, ▲: 82.21, ▼: 102.76 μM)

로써 효소 활성을 방해하는 것으로 이해된다.

Isoflavonoid에 의한 저해 - Puerarin 구조 유사체인 daidzein과 genistein에 대한 저해 실험의 결과는 Table II와 같았다. daidzein과 genistein 모두 NAD^+ 와 에탄올에 대하여 비경쟁적 저해 유형(noncompetitive inhibition pattern)을 보였다. 이러한 결과는 isoflavonoid 구조가 알코올 탈수소효소에 있어서 효소 또는 효소 : 조효소 이중복합체에 친화성이 있어 효소에 조효소의 부착을 저해하고, 효소 : 조효소 이중복합체에 기질의 부착을 저해함으로써 효소 활성 감소를 초래하는 것으로 추정하게 한다.

결 론

한방과 민간에서 알코올 중독 치료제, 알코올 해독제 또는 간 보호제로 사용되는 갈근의 알코올 탈수소효소에 대한 활성 저해성분 분리와 화학구조 결정, 활성에 대한 영향을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 알코올 탈수소효소에 대한 활성 저해성분 분리를 실시한 후 얻어진 물질은 분자량이 416이었고, 이의 화학구조는 ^1H , ^{13}C -NMR을 이용한 실험으로 puerarin임을 확인하였다.

2. 순수 분리된 puerarin에 대하여 저해형태와 저해상수를 측정된 결과 조효소 NAD^+ , 기질 에탄올에 대

하여 비경쟁적 저해형태(noncompetitive inhibition pattern)를 나타냄을 확인하였다.

순수 분리된 puerarin은 동물의 알코올 대사 일차 효소인 알코올 탈수소효소를 저해함으로써 알코올의 산화물질이면서 숙취의 원인 물질인 알데하이드의 생성을 억제시켜 알데하이드에 기인하는 숙취현상을 억제할 가능성을 암시한다. 쥐 등을 이용한 *in vivo* 동물실험을 통하여 알코올의 1차대사를 억제함으로써 알데하이드 생성 억제 효과가 있음을 확인함이 추후 실험에서 요구된다.

감사의 말씀

본 연구에 사용한 생약의 식물학적 감정에 도움을 주신 도정에 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 본 연구는 1997년도 한국학술진흥재단 대학부설연구소과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Lee, H. J. and Lee, K. M.: Screening of alcohol dehydrogenase inhibitors from natural products, *Yakhak Hoeji* 43(4), 481 (1999).
- 2) Keung, W. M. and Vallee, B. L.: Kudzu root: an ancient Chinese source of modern antidipsotropic

- agents, *Phytochemistry* 47(4), 499 (1998).
- 3) Arao, T., Udayama, M., Kinjo, J. and Nohara, T. : Preventive effects of saponins from the Pueraria lobata root on in vitro immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures, *Planta Med.* 64(5), 413 (1998).
 - 4) Arao, T., Udayama, M., Kinjo, J., Nohara, T., Funakoshi, T. and Kojima, S. : Preventive effects of saponins from puerariae radix (the root of Pueraria lobata Ohwi) on in vitro immunological injury of rat primary hepatocyte cultures, *Biol. Pharm. Bull.* 20(9), 988 (1997).
 - 5) Keung, W. M. and Vallee, B. L. : Daidzin and its antidipsotropic analogs inhibit serotonin and dopamine metabolism in isolated mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(5), 2198 (1998).
 - 6) Shen, X. L., Witt, M. R., Nielsen, M. and Sterner, O. : Inhibition of [³H] flunitrazepam binding to rat brain membranes in vitro by puerarin and daidzein, *Yao. Hsueh. Hsueh. Pao.* 31(1), 59 (1996).
 - 7) Keung, W. M. and Vallee, B. L. : Therapeutic lessons from traditional Oriental medicine to contemporary Occidental Pharmacology, *EXS* 71, 371 (1994).
 - 8) Keung, W. M., Lazo, O., Kunze, L. and Vallee, B. L. : Potentiation of the bioavailability of daidzin by an extract of Radix puerariae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(9), 4284 (1996).
 - 9) 생약학연구회 저 : 현대생약학, pp. 409-411, 학창사 (1995).
 - 10) Kim, M. H. and Park, C. K. : Inhibition of ethanol absorption by *Rhodiola sachalinensis* in rats, *Arch. Pharm. Res.* 20, 432 (1997).
 - 11) Lee, S. J., Baek, H. J., Lee, C. H. and Kim, H. P. : Antiinflammatory activity of isoflavonoids from *Pueraria Radix* and Biochanin A derivatives, *Arch. Pharm. Res.* 17(1), 31 (1994).
 - 12) Ingham, J. L., Markham, K. R., Dziedzic, S. Z. and Pope, G. S. : Puerarin 6"-O-β-apiofuranoside, a C-glycosylisoflavone O-glycoside from *Pueraria Mirifica*, *Phytochemistry* 25(7), 1772 (1986).