

광대싸리잎의 Acetylcholinesterase 활성 저해성분

장춘희 · 은재순 · 박혜원 · 서선미 · 양재현 · 임강현 · 오석흥¹ · 오찬호¹ · 백남인² · 김대근*

우석대학교 약학대학, ¹우석대학교 이공대학, ²경희대학교 생명과학부

An Acetylcholinesterase Inhibitor from the Leaves of *Securinega suffruticosa*

Choon Hee Jang, Jae Soon Eun, Hye Won Park, Seon Mi Seo, Jae Heon Yang, Kang Hyun Leem,
Seok Heung Oh¹, Chan Ho Oh¹, Nam In Baek², and Dae Keun Kim*

College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

¹College of Science and Technology, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

²Department of Life Science, Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea

Abstract – In the course of screening Korean natural plants for acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity, we found that a methanolic extract of the leaves of *Securinega suffruticosa* showed significant inhibitory effects on AChE. Bioassay-guided fractionation of the methanolic extract resulted in the isolation of dihydrosecurinine, as a active principle. This compound inhibited AChE activity in a dose-dependent manner, and the IC₅₀ value of dihydrosecurinine was 18.9 µg.

Key words – *Securinega suffruticosa*, acetylcholinesterase, dihydrosecurinine

현대 의학의 빠른 진보는 인간의 수명을 연장시키는데 많은 공헌을 하였다. 그러나 이에 따른 노령인구의 증가는 이에 비례하여 많은 퇴행성 질환과 함께 더욱 심각하게 대두되는 노인성 뇌신경계 질환을 앓는 환자들 수의 증가로 인하여 새로운 사회적인 문제와 의학적인 새로운 문제를 야기시키고 있다. 이들 뇌신경계 질환 중 대표적인 질병 중의 Alzheimer's disease (AD)라 일컫는 노인성 치매는 지적인 기능 장애가 오는 것이 가장 큰 특징으로 기억력, 인지능력, 언어 구사력, 자발성 저하 및 이상행동 등이 나타나는 질환으로 알려져 있다. 현재 AD의 발병률은 증가 추세에 있으나 아직까지 현대의학의 눈부신 발전에도 불구하고 아직까지 정확한 병태생리나 치료법이 확립되어 있지 않아 최근까지 항정신성약물, 항우울제, 항불안제, 항경련제, 뇌기능 개선제, 신경전달 관련 효소차단제, 칼슘차단제 등의 약물을 대증적으로 사용해오고 있는 실정이다. 지금까지의 연구 결과에 의하면 AD를 앓는 환자의 뇌에서 여러 신경전달물질의 감소가 관찰되었는데 그 중 acetylcholine (ACh)의 함량이 크게 감소하였으며, 이것은 ACh를 생산하는 choline성

신경의 손상이나 세포소실이 수반되어 학습, 기억력 감퇴와 인지력이 저하와 같은 병리현상과 관련이 있는 것으로 보고되었다.¹⁻³⁾ 이러한 연구가설을 바탕으로 AD의 손상된 choline성 신경을 개선시키는 치료제의 개발이 진행되어 왔다.^{4,6)} 실제로 AD 치료제로 개발되어 사용되는 치매개선제 들로는 donepezil, rivastigmine, eptastigmine, metrifonate, tacrine, physostigmine, galantamine 등은 AChE 저해 효능을 약리작용으로 갖고 있는 약물들이다. 그러나 이들 약물들은 ACh의 분해를 막아 ACh의 농도를 유지시킴으로써 저하된 인지기능을 개선시키는 효과를 가지고 있지만, 간독성이나 낮은 생체내 이용률 등의 문제가 야기되어 이러한 약물보다 선택적으로 뇌의 AChE에 작용하면서 부작용이 적은 새로운 AChE 저해제의 개발이 요구되고 있다. 이에 본 연구는 새로운 AChE 저해제를 Ellman 법⁷⁾을 이용하여 국내에 자생하고 있는 식물 중에서 활성을 검색하던 중 광대싸리잎의 methanol 추출물이 유의성 있는 활성이 나타나 실험에 착수하였다.

광대싸리(*Securinega suffruticosa* Rehder)는 대극과(Euphorbiaceae)에 속하며 전국에 자생하고 높이 3~4 m까지 자라는 낙엽관목이다. 꽃은 6~8월에 피며 암·수의 그루가

*교신저지(E-mail) : dkkim@woosuk.ac.kr
(FAX) : 063-290-1567

다르고 모두 잎겨드랑이에 달린다. 잎은 어긋나며 뒷면은 회백색이고 길이 2~6 cm의 긴 타원형이며 가장자리는 밋밋하고 털이 없다.⁸⁾ 중국에서는 일엽추(一葉萩)라 하여 活血舒筋, 健脾益腎, 強筋骨 등의 효능을 이용하여 風濕腰痛, 四肢麻木, 陽萎, 顏面神經麻痺 등에 사용하고 있다.⁹⁾ 본 연구는 광대싸리잎의 methanol 추출물을 시료로 bioassay-guided fractionation에 따라 실험을 진행하여 alkaloid 화합물 1종을 분리하여 물리화학적 성상과 spectral data를 이용하여 그 구조를 동정하였으며, 이 화합물의 AChE활성 저해효과를 측정된 결과 농도 의존적으로 유의성 있는 효과를 나타내어 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 광대싸리(*Securinega suffruticosa* Rehder)는 2001년 8월에 전북 순창군에 자생하는 것을 직접 채취하였다. 위 식물은 정확히 감정한 후에 음건한 다음 세절하여 실험에 사용하였으며, 표품(WSU-01-07)은 우석대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다.

시약 및 기기 - 실험에 사용한 기기로는 융점에 Electrothermal melting point apparatus(Denmark)를 UV는 Shimadzu UV-1601 UV-Visible spectrophotometer (Japan)를 사용하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR은 Jeol JMN-EX 400 spectrometer(Japan)를 EI-MS는 VG70-VSEQ(UK)로 측정하였다. 추출 및 분획용 시약은 1급 용매를 사용하였으며, TLC 및 column용 시약 등은 1급 용매를 재증류하여 사용하거나, 특급시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Art. 1.07734, Merck)으로 230-400 mesh를, molecular sieve column chromatography용 packing material은 Sephadex LH-20(Pharmacia)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ precoated plate(Art. 1.07752, Merck), low pressure liquid chromatography (LPLC)용 column은 Lobar-A Lichroprep Si 60(Merck) column을 사용하였다. 발색시약으로는 10% H₂SO₄(in EtOH) 분무시액과 Dragendorff 분무시액을 사용하였다. 효소반응의 기질로 사용한 acetylthiocholine iodide(ATCh), coupling agent로 사용한 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

효소활성 저해효과 측정 - 효소활성은 Ellman법⁷⁾을 사용하여 측정하였다. AChE 효소는 생쥐의 뇌에서 추출하였다. 추출방법은 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ 및 1% Triton X-100 이 포함되어 있는 10 mM Tris-HCl(pH 7.2)를 PC12 세포 5 배량을 넣고 균질하게 homogenation한 후에 10,000×g에서 30분간 원심분리하고 상층액을 분리하였다.¹⁰⁾ 완충액은

50 mM 인산완충액(phosphate buffer, pH 8.0)을 제조하여 사용하였다. 기질액은 0.5 mM acetylthiocholine(ATCh)과 1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitro benzoic acid)가 함유되어 있는 50 mM 인산완충액(phosphate buffer, pH 8.0)을 실험전에 만들어 사용하였다. 시료반응은 96 well plate에 완충액 30 μl, 화합물 10 μl와 효소 10 μl를 넣은 후 기질액을 50 μl를 넣어 100 μl로 만들어 37°C 항온기에 넣어 30분간 배양하였다(SR). 그리고 시료대조군으로 효소대신 완충액 10 μl를 넣어 함께 배양하였다(SC). 효소반응으로는 시료대신 완충액 10 μl를 넣어 함께 배양하였으며(ER), 효소에 대한 대조군으로 효소대신 완충액 10 μl를 넣어 함께 배양하였다(EC). 30분간 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 효소활성저해도(%)는 아래와 같은 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{효소활성저해도(\%)} = \{1 - [(SR - SC)/(ER - EC)]\} \times 100$$

추출 및 분리 - 신선한 광대싸리잎을 음건세절하여 건조 중량 약 300 g을 MeOH을 넣어 가끔 진탕하면서 50°C에서 5시간씩 3회 온침 추출하였다. 추출액을 여과한 후에 수욕 상에서 감압농축하여 MeOH 엑스 140 g을 얻었으며, 이 MeOH 엑스에 0.1 N HCl 1 l를 가하여 용해시킨 다음 상법에 따라 조alkaloids를 분획하였다. 산성 수층에 CHCl₃을 동량 넣어 2회 반복 추출하여 탈지한 다음, 10% NH₄OH로 알칼리성이 될 때까지 가하고, 다시 CHCl₃으로 추출하여 조alkaloids 분획 13 g을 얻었으며, 나머지는 수층으로 하였다.

Ellman법에 의한 AChE활성 저해효과검색 결과 저해활성이 더 강한 조alkaloids분획 엑스 15 g을 *n*-hexane : CHCl₃ : MeOH(10 : 1 : 1)를 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 TLC 양상에 따라 7개의 분획으로 나누었다. 각 분획 중 AChE활성 저해효과가 가장 강하게 확인된 5번 분획에 대하여 dragendorff 시액에 강하게 양성을 나타낸 부분을 *n*-hexane : CHCl₃ : Acetone(1 : 1 : 2)를 유출용매로 Lobar-A Lichroprep Si 60(Merck) column과 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 1종의 화합물을 분리하였다.

화합물 1 - Yellow powder; mp 55-56°C; EIMS *m/z* 219 [M⁺]; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.55 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-12), 3.30 (1H, m, H-7), 2.92 (1H, m, H-6α), 2.66 (1H, m, H-8α), 2.64 (1H, m, H-6β), 1.90 (1H, m, H-2), 1.76 (1H, m, H-8β); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 178.0 (C-11), 175.3 (C-13), 109.9 (C-12), 93.0 (C-9), 62.9 (C-2), 61.5 (C-7), 49.4 (C-6), 38.5 (C-8), 32.7 (C-14), 25.4 (C-3), 23.7 (C-5), 21.3 (C-4).

통계처리 - 통계적 유의성의 검토는 Student *t*-test를 실

Table I. AChE inhibitory activity of each fraction from the leaves of *Securinega suffruticosa*

Fraction	IC ₅₀ (μg/ml)
MeOH	49.5
Crude alkaloids	27.3
H ₂ O	>80
Berberine	0.52

시하여 p<0.05를 기준으로 하여 판정하였다.

결과 및 고찰

수십 종의 국내 자생식물에 대하여 total MeOH 추출물을 조제하여 Ellman법에 따라 AChE활성 저해검색을 한 결과 광대싸리잎의 MeOH 추출물이 저해효과가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 광대싸리에 대한 문헌조사에서 alkaloid 성분을 많이 함유되는 있는 식물임을 확인하고 잎의 total MeOH 추출물을 일반적인 alkaloid 추출 방법에 따라 분획을 실시한 다음, 각 분획에 대하여 AChE활성 저해효과를 검토한 결과 조alkaloids분획에서 저해효과가 관찰되어 이 분획에서 AChE활성 저해성분을 단리하고자 하였다(Table I). 몇 가지 chromatography를 실시하여 가장 활성이 강한 소분획에서 화합물 1을 단리하였다. 화합물 1은 황색의 고체로 EIMS에서 분자량이 219임을 확인할 수 있었으며, ¹H-NMR spectrum에서 δ 5.55(1H, d, J=2.4 Hz) ppm에서 1개의 olefinic proton이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 178.0 ppm에서 1개의 carbonyl signal이 나타났으며, δ 175.3과 109.9 ppm에서 2개의 olefinic carbon signal이 관찰되었고, oxygen 또는 nitrogen bearing carbon으로 추정되는 signal이 δ 93.0, 62.9, 61.5 ppm에서 나타났으며, 그 외에 6개의 signal (δ 49.4, 38.5, 32.7, 25.4, 23.7, 21.3 ppm)이 관찰되어 모두 12개의 carbon signal이 확인되었다. 이와 같은 자료를 토대로 화합물 1은 본 식물에서 이미 보고되어 있는 securinine-type alkaloid임을 알 수 있었으며, 기존 문헌^{11,12}과 비교하여 화합물 1은 dihyrosecurinine으로 확인 동정하였다.

화합물 1의 AChE 저해활성은 IC₅₀ 값이 18.9 μg/ml (86.3 μM)로 측정되었으며, positive control로 사용한 berberine¹³ 0.52 μg/ml(1.6 μM)보다는 낮은 억제활성을 나타냈으나 AChE의 활성을 농도의존적으로 저해시켰다. 화합물 1의 작용 양상 중 기질인 acetylthiocholine (ATCh)과의 경쟁 관계를 알아 보기 위하여 농도를 달리하면서 그 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot을 작성하여 본 결과와 Fig. 3과 같이 나타났다. 화합물 1은 Michaelis-Menten 상수인 K_m은 일정하게 유지시켰으나 V_{max}는 농도 의존적으로 감소시켜 AChE

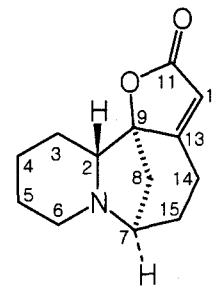


Fig. 1. Structure of dihydrosecurinine.

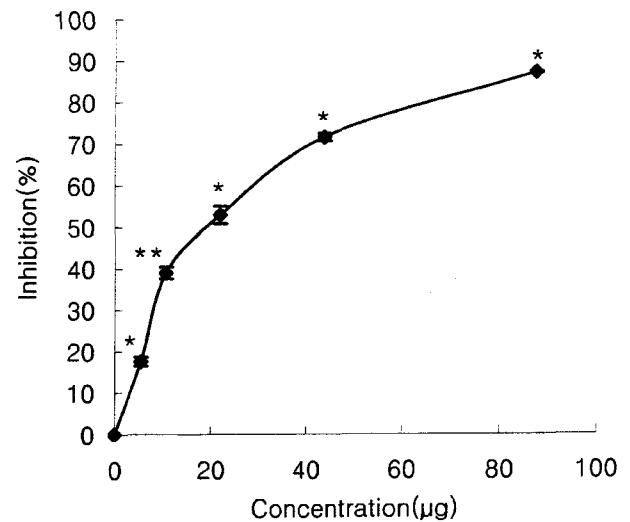


Fig. 2. The inhibitory activity of dihydrosecurinine on AChE. Differs significantly from the control, effective *p<0.05, **p<0.01

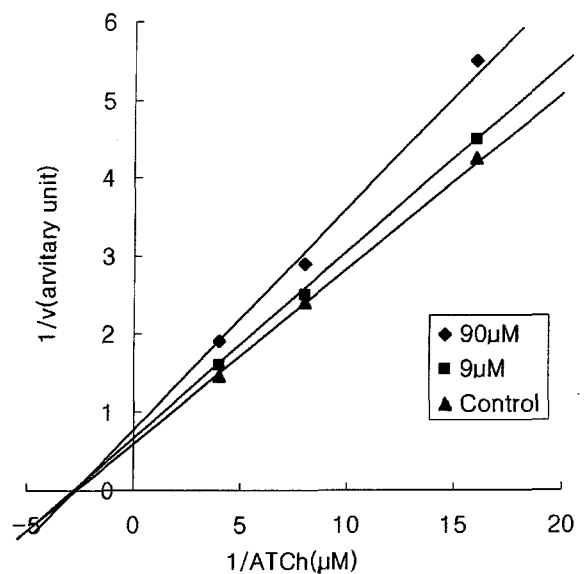


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of 1/v vs. 1/ATCh in the presence or absence of dihydrosecurinine

의 활성을 비경쟁적으로 저해시킴¹⁴⁾을 알 수 있었다.

결 론

국내 자생 식물 중 Ellman법을 이용하여 AChE 저해제를 검색하던 중 광대싸리(*Securinega suffruticosa* Rehder)의 methanol 추출물이 유의성 있는 활성이 나타나 bioassay-guided fractionation에 따라 실험을 진행하여 alkaloid 화합물 1종을 분리하였다. 기기분석 결과 dihydrosecurinine으로 동정된 이 화합물은 AChE의 활성을 농도 의존적으로 저해시켰으며, IC₅₀값이 18.9 µg/ml로 측정되었고, Lineweaver-Burk plot에서 K_m은 일정하게 유지시키고 V_{max}는 농도 의존적으로 감소시켜 기질과 비경쟁적으로 AChE의 활성을 저해시킴을 확인할 수 있었다.

사 사

본 논문은 교육부지원 우석대학교 한방재활연구사업비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Hachiski, V. C., Illiff, L. D., Zikhka, E., Du boulay, G H., McAllister, V. L., Marshall, J., Russel, R. W. R. and Symon, L. (1975) Cerebral blood flow in dementia. *Arch. Neurol.* **32**: 632-637.
- Webster, R. A. and Jordan, C. C. (1989) *Neurotransmitters, Drugs and Disease*, 428-445. Blacwell scienific publication, London.
- Aarsland, D., Larsen, J. P., Reinvang, I. and Aarsland, A. M. (1994) Effects of cholinergic blockade on language in healthy young women. *Brain*, **117**: 1377-1384.
- Brufani, M. and Filocamo, L. (1996) Rational design new acetylcholinesterase inhibitors: In Becker, R., and Giacobini, E. (eds.), *Alzheimer disease: from molecular biology to therapy*, 171-177, Birkhauser, Boston.
- Polinsky, R. J. (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* **20**: 634-647.
- Cummings, J. L. and Back, C. (1998) The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **6**: 64-78.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 68-75.
- 李昌福(1989) 大韓植物圖鑑, 508. 鄉文社, 서울.
- 蕭培根(1994) 中國本草圖鑑(第1卷), 63. 麗江出版社, 서울.
- Rieger, F., Shelanski, M. L. and Greene, L. A. (1980) The effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase and its multiple forms in cultures of rat PC12 pheochromocytoma cells: increased total specific activity and appearance of the 16 S molecular form. *Dev. Biol.* **76**: 238-43.
- Snieckus, V. (1973) The securinega alkaloids. In Manske, R. H. F. (ed.), *The alkaloids-Chemistry and physiology*, vol. XIV: 425-506. Academic Press. New York.
- Beutler, J. A. and Livant, L. (1984) CMR assignments of the securinine alkaloids. *J. Nat. Prod.* **47**: 677-681.
- Hwang, S. Y., Chang, Y. P., Byun, S. J., Jeon, M. H. and Kim, Y. C. (1996) An acetylcholinesterase inhibitor isolated from *Corydalis Tuber* and its mode of action. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**: 91-95.
- Cohen, S. G., Chishti, S. B., Bell, D. A., Howard, S. I., Salih, E. and Cohen, J. B. (1991) General occurrence of binding to acetylcholinesterase-substrate complex in noncompetitive inhibition and in inhibition by substrate. *Biochim Biophys Acta.* **1076**: 112-122.

(2003년 1월 20일 접수)