

## 산앵도(*Vaccinium koreanum*) 잎 유래 화합물들의 Aldose Reductase 및 혈전응집에 미치는 효과

임순성\* · 주화균<sup>1</sup> · 정상훈<sup>2</sup> · 조선행<sup>3</sup> · 신국현<sup>1</sup>

한림대학교 실버생물산업기술연구센터, <sup>1</sup>서울대학교 약학대학 천연물과학연구소

<sup>2</sup>한국과학기술연구원 천연물연구센터, <sup>3</sup>공주교육대학교 실과교육과

## Effects of *Vaccinium koreanum* on Rat Lens Aldose Reductase and Platelet Aggregation

Soon Sung Lim\*, Wha Kyun Joo<sup>1</sup>, Sang Hoon Jung<sup>2</sup>, Seon Heang Cho<sup>3</sup>, and Kuk Hyun Shin<sup>1</sup>

Silver Biotechnology Research Center, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

<sup>1</sup>Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

<sup>2</sup>Natural Products Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

<sup>3</sup>Gonju National University of Education, Gongju 314-711, Korea

**Abstract** – Inhibitory effects of the whole extract and isolated compounds from the leaves of *Vaccinium koreanum* (Ericaceae) on rat lens aldose reductase (RLAR) and on platelet aggregation were investigated for the prevention or the treatment of chronic diabetic complications. Arbutin, isolated from *n*-butanol fraction of methanol extract, exhibited a potent inhibitory effects on rat platelet aggregation induced by ADP (IC<sub>50</sub>=0.12 μM) and collagen (IC<sub>50</sub>=0.039 μM) and showed same inhibitory activities with positive control, tetramethylene glutaric acid, on RLAR.

**Key words** – *Vaccinium koreanum*, Ericaceae, Arbutin, Rat lens aldose reductase(RLAR), platelet aggregation

*Vaccinium*속 식물의 일종인 산앵도나무(*Vaccinium koreanum* Nakai)는 우리나라에 자생하는 특산식물로 Ericaceae에 속하며, 일명 산앵두나무 또는 몰앵도나무라고도 한다. *Vaccinium*속 식물의 기원은 잘 알려져 있지 않으나 Latin어의 vacca=cox 또는 bacca=berry로부터 유래되었다고 한다.<sup>1)</sup>

*Vaccinium*속 식물의 성분 연구에서 주로 anthocyanoside와 같은 polyphenol, cinnamic acid, benzoic acid 유도체, flavan-3-ol과 flavonol-glycoside 등이 함유되어 있는 것으로 알려졌다.<sup>2)</sup> 주 등은 *V. koreanum* 잎 추출물의 에틸아세테이트 가용성 분획과 노르말-부탄올 가용성 분획으로부터 flavonoid를 포함한 6종의 phenolic 화합물을 분리하여 그들의 화학구조를 각각 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-O-β-D-glucoside (I, isoquercitrin), 2'-O-caffeoylarbutin (II), 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (III, quercetin), 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-O-α-L-arabinofuranoside (IV,

avicularin), arbutin (V) 및 chlorogenic acid (VI)로 동정하였다.<sup>3)</sup>

본 속 식물의 약리학적 연구로 항염,<sup>4)</sup> 항균,<sup>5)</sup> 간보호,<sup>6)</sup> 항위염,<sup>7)</sup> 항 virus,<sup>8)</sup> anticancer activity,<sup>9)</sup> free radical scavenger,<sup>10)</sup> hypolipidemic activity<sup>11)</sup> 등이 보고되었으며, Morazzoni 등은 *Vaccinium*속에서 분리한 anthocyanoside가 platelet aggregation을 강력하게 억제함을 보고하였다.<sup>12)</sup>

Aldose reductase 억제제는 당뇨병합병증의 치료와 예방에 있어 중요한 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.<sup>13)</sup> 또한 당뇨병환자들의 혈소판(platelets) 응집증가 현상 및 산화적 스트레스는 당뇨병성 만성합병증의 주요 원인임이 밝혀졌다.<sup>14,15)</sup> 이러한 사실에 기반을 두고, 임 등은 flavonoid 유도체들로부터 Rat Lens Aldose Reductase (RLAR) 억제, 항산화 및 항혈전 효과를 동시에 만족하는 화합물들이 당뇨병성 합병증의 치료 및 억제효과를 가짐을 보고한 바 있다.<sup>16,17)</sup>

또한 신 등은<sup>18)</sup> 1995년 산앵도나무(*V. koreanum* Nakai)잎의 methanol (MeOH) 추출물이 RLAR 억제작용이 있음을 보고한 바 있다.

\*교신저자(E-mail) : limss@hallym.ac.kr  
(FAX) : 033-244-1738

따라서 본 고는 산앵도나무 잎의 메탄올 추출물로부터 얻은 각 분획물들과 6종의 분리화합물을 대상으로 RLAR 억제 활성과 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 및 쥐의 platelet 응집 억제능을 알아봄으로서 당뇨병성 합병증의 치료 및 억제 가능성에 관하여 알아보았다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 산앵도나무(*Vaccinium koreanum* Nakai) 잎은 2000년 9월 중순에 충청북도 월악산에 자생하는 것을 채집하여 공주교대의 조선행박사가 정확히 감정한 후 사용하였다. 표본은 서울대학교 천연물과학연구소 표본실(SNU00-9-3)에 보관되어 있다.

**분획방법 및 화합물** - 실온에서 음건한 산앵도의 잎(2 kg)을 세절한 후 60°C에서 메탄올로 3회 추출한 후 감압농축하여 메탄올 추출물(150 g)을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수(1000 ml)에 현탁시켜 노르말-헥산, 크로로포름( $\text{CHCl}_3$ ), 에틸아세테이트(EtOAc), 노르말-부탄올 순으로 용매분획하여 각각 96.5 g, 0.6 g, 9.7 g, 10.8 g을 얻었다. 이들 분획 중 EtOAc층으로부터 column chromatography를 반복하여 화합물 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3- $\beta$ -glucoside (I, isoquercitrin), 2'-*O*-caffeoylarbutin (II)를 분리하였고, 노르말-부탄올층으로부터 화합물 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (III, quercetin), 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (IV, avicularin), arbutin (V) 및 chlorogenic acid (VI)을 분리하여 실험에 사용하였다.<sup>3)</sup>

**시약 및 기기** - 생리활성 실험은 Hitachi U-3210 spectrophotometer와 platelet aggregometer (Chrono-Log, M-500US)를 사용하였으며, 사용한 시약 중 DL-glyceraldehyde,  $\beta$ -NADPH ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium), ADP, collagen 등은 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였으며 DMSO 등 용매는 특급시약을 정제하지 않고 사용하였다.

### Rat Lens Aldose Reductase 효소원의 조제 및 *in vitro* 활성

효소원의 조제는 Hayman<sup>19)</sup> 등이 사용한 방법을 약간 수정하여 실시하였다. 즉 흰쥐의 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량의 phosphate buffer를 가하여 homogenization 하였다. 이를 4°C에서 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 ammonium sulfate로 40%까지 포화시키고 원심분리한 상등액을 취하여 다시 70%가 되도록 ammonium sulfate를 가하여 1시간 가량 저어준 다음 원심 분리하여 얻어진 pellet을 최소량의 완충액에 현탁하여 투석을 1일정도 한 다음,

효소원으로 하였다. 조제한 효소원과 DL-glyceraldehyde를 기질로 하여 반응시키고 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 공시험군은 기질인 DL-glyceraldehyde만을 제외시켜  $\beta$ -NADPH 이외의 타 요인에 의한 반응치를 보정하였다. 각 농도의 저해율을 계산한 후  $\text{IC}_{50}$  값( $\mu\text{g/ml}$  및  $\mu\text{M}$ )을 계산하였다.

### DPPH radical 소거 효과

DPPH radical 소거 효과의 측정은 M.S. Blois<sup>20)</sup>의 방법으로 실시하였다. 다양한 농도의 시료가 든 4 ml의 메탄올 용매에 1 ml의 DPPH용액( $1.5 \times 10^{-4}$  M)을 넣었다. 실온에서 30분간 놓아둔 후 spectrophotometer를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 남아있는 DPPH의 양을 계산하였다. 각 농도의 저해율을 계산한 후  $\text{IC}_{50}$  값( $\mu\text{g/ml}$  및  $\mu\text{M}$ )을 계산하였다.

### 혈소판 응집 억제 작용

**Platelet-rich plasma (PRP) 및 platelet-poor platelet (PPP)의 준비** - 체중 180-250 g의 Sprague Dawley 웅성 랫트를 디에틸에테르로 흡입 마취한후 2.2% trisodium citrate (1 volume)가 든 플라스틱주사기로 심장에서 혈액(9 volumes)을 채취하여 흔들어서 섞은 후 상온에서 1200×g에서 10분간 원심분리하여 상층부의 PRP를 얻었다. PRP를 취하고 남은 층을 3000×g에서 15분간 다시 원심분리하여 PPP를 얻었다.

### Turbidometric method

혈소판이 응집함에 따른 투과도의 차이를 aggregometer를 사용하여 측정하는 기존의 혈소판 응집 검색법인 Born and Cross의 turbidometry method에 기초하여 실험하였다.<sup>21)</sup> PRP를 thrombocounter를 사용하여 혈소판의 수를 측정하고 PPP로 혈소판의 수를 100만/ $\text{mm}^2$ 로 맞추었다. 이를 0.9% 식염수로 혈소판의 수를 50만/ $\text{mm}^2$ 로 희석하여 사용하였다.

PRP 0.49 ml를 plastic micropipette를 사용하여 plastic cuvette에 옮기고 37°C로 유지된 aggregometer에서 incubation 시키고 800-1200 rpm으로 stirring시키면서 검액 0.005 ml를 가하고 1분후 aggregating agent (ADP 2.5  $\mu\text{M}$  또는 collagen 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) 0.005 ml를 첨가한다. PPP를 blank로 하여 4분-6분간 600 nm에서 투과도의 변화를 측정하였다. 각 농도의 저해율을 계산한 후  $\text{IC}_{50}$  값( $\mu\text{g/ml}$  및  $\mu\text{M}$ )을 계산하였다.

## 실험결과 및 고찰

### Rat Lens Aldose Reductase(RLAR) 억제효과

메탄올 추출물이 5.4  $\mu\text{g/ml}$ 에서 RLAR의 활성을 50% 억

**Table I.** Biological activity (IC<sub>50</sub>) of each fractions and isolated compounds from the leaves of *V. koreanum*

Extracts or compounds	RLAR	DPPH	Platelet aggregation	
			ADP	Collagen
			$\mu\text{g/ml}$	
Methanol extract	5.4	10.81	0.95	0.69
<i>n</i> -Hexane frs.	>50.0	20.52	Spontaneous aggregation	
Chloroform frs.	8.7	21.30	0.34	0.18
Ethyl acetate frs.	2.4	5.26	0.082	0.021
<i>n</i> -Butanol frs.	3.8	7.98	0.43	0.22
Water frs.	5.6	19.67	1.23	1.89
			$\mu\text{M}$	
Isoquercitrin (I)	75.01	15.35	0.59	0.24
2'- <i>O</i> -caffeoylarbutin (II)	5.82	12.52	0.56	0.29
Quercetin (III)	1.40	6.75	0.36	0.15
Avicularin (IV)	42.12	10.82	0.68	0.19
Arbutin (V)	6.73	12.67	0.12	0.039
Chlorogenic acid (VI)	3.54	7.98	0.65	0.18
Tetramethylene glutaric acid	6.52	—	—	—
$\alpha$ -Tocopherol	—	8.8	—	—
Aspirin	—	—	0.17	0.015

제하는 비교적 강한 억제 활성을 나타내었으며, 이 추출물을 분획한 분획물들 중에서는 에틸아세테이트분획과 노르말-부탄올분획이 각각 2.4와 3.8  $\mu\text{g/ml}$  로 강한 억제 활성을 나타내었다.

이들의 분획에서 분리한 6개 화합물 중 quercetin (III)이 IC<sub>50</sub>값이 1.4  $\mu\text{M}$ 로 가장 강력한 RLAR 억제활성을 나타내었으며 chlorogenic acid (VI), 2'-*O*-caffeoylarbutin (II)이 각각 3.54과 5.82  $\mu\text{M}$ 로 표준비교물질인 tetramethylene glutaric acid (TMG) 보다 센 RLAR 억제활성을 보였으며, 그 다음 arbutin (V)이 TMG와 비슷하고, avicularin (IV)과 isoquercitrin (I)은 RLAR 억제활성이 약하게 나타났다.

#### DPPH radical 소거효과

각 분획물 중에서 DPPH 소거효과는 RLAR 억제활성과 같이 에틸아세테이트분획과 노르말-부탄올분획에서 각각 5.26와 7.98  $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 강한 DPPH radical 소거효과를 보였다.

분리된 성분에서의 효과는 quercetin(III)와 chlorogenic acid (VI)이 각각 IC<sub>50</sub>값이 6.75와 7.98  $\mu\text{M}$ 로 비교물질인  $\alpha$ -tocopherol의 8.8  $\mu\text{M}$  보다 강한 DPPH radical 소거효과를 나타내었다. 나머지 화합물은 10.82~15.35  $\mu\text{M}$  정도로 대부분 중간정도의 DPPH radical 소거효과를 나타내었다.

#### Anti-platelet aggregation

항혈전효과는 물분획을 제외한 모든 용매분획과 분리된

물질에서, ADP에 의한 혈전 응집유도 때 보다 collagen으로 유도한 경우에서 더 민감하게 억제활성을 보이는 특징을 나타냈다. 용매 분획들 중에 에틸아세테이트분획이 ADP와 collagen유도 양쪽 모두에서 IC<sub>50</sub>값이 각각 0.082와 0.021  $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 우수한 항혈전효과를 나타내었으며, 다음으로 크로로포름분획, 노르말-부탄올분획, 물분획 순으로 억제활성이 감소하였으며 핵산층의 경우 비극성으로 인하여 바로 침전이 형성되어 측정이 곤란하였다.

분리된 물질의 경우는 arbutin(V)의 경우 비교물질인 aspirin (ADP; 0.17  $\mu\text{M}$ , collagen; 0.015  $\mu\text{M}$ )에 비하여 ADP로 유도한 혈전응집실험에서는 IC<sub>50</sub> 값이 0.12  $\mu\text{M}$ 로 더욱 센 활성을 나타내었으며, Collagen으로 유도한 응집실험에서는 IC<sub>50</sub> 값이 0.039  $\mu\text{M}$ 로 약간 약하지만 분리된 물질 중에서는 가장 강한 억제활성을 보였으며, 이는 사람의 혈소판을 대상으로 한 실험에서의 경우와 비슷한 결과로 나타난 것이다.<sup>22)</sup>

## 결 론

산앵도(*V. koreanam*)는 한국 특산인 관계로 외국 유사종인 *V. myrtilloides*에 비하여 그 활용도나 성분 및 활성연구가 아주 미흡한 수준에 있다. 이 산앵도를 대상으로 RLAR 억제효과, DPPH radical 소거효과 및 항혈전효과를 알아 본 결과, 비교적 극성이 높은 에틸아세테이트분획과 노르말-부탄올분획의 구성성분들이 RLAR 억제활성, DPPH radical 소거효과 및 항혈전효과를 강하게 가지는 것을 알 수 있었으

며, 특히 분리된 화합물 중 quercetin (III)과 arbutin (V) 그리고 chlorogenic acid (VI)가 시험관 실험상에서 우수한 RLAR 억제효과, DPPH radical 소거효과 및 항혈전효과를 나타내었다.

## 사 사

이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연구지원에 의하여 연구되었습니다. 이에 깊이 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 이창복(1982) 식물분류학, *향문사* 216-218.
2. Mzhavanadze, V. V., Targamadze, I. L., and Dranik, L. I. (1972) Phenolic compounds of unripe blueberry fruits, *Vaccinium arctostaphylos* L. *Bulletin of the Academy of Sciences of the Georgian SSR.* **68**: 205-208.
3. Joo, W. K., Doh, S. H., Lim, S. S., Shin K. H., and Woo, W.S. (1999) Phenolic compounds from the leaves of *Vaccinium koreanum*. *Natural Product Science* **5**(1): 60-63.
4. Roschin, Y. V. and Gerashchenko, G. I. (1973) Anti-inflammatory activity of some flavonoids. *CA*: 37683.
5. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., and Tawata, S. (1987) Antibacterial activity and mode action of plant flavonoids agent *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus* L. *Phytochemistry.* **26**: 2231-2234.
6. Harbone, T. B. (1994) The flavonoids advances in research. *Chapman & Hall, London* : 635-636.
7. Sharon, N. and Ofek, I. (2002) Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **42**(3 Suppl): 267-272.
8. Fokina, G. I., Roikhel, V. M., Frolova, M. P., Frolova, T. V., and Pogodina, V. V. (1993) The antiviral action of medicinal plant extracts in experimental tick-borne encephalitis *Vopr Virusol.* **38**(4): 170-173.
9. Bomser, J., Madhavi, D. L., Singletary, K., and Smith, M. A. L. (1996) *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* Species. *Planta Med.* **62**: 212-216.
10. Morazzoni, P. and Malandrino, S. (1988) Anthocyanins and their aglycons as scavengers of free radicals and antilipoperoxidant agents. *Pharmacol. Res. Comms.* **20** Suppl. 2: 254.
11. Cignarella, A., Bertozzi, D., Pinna, C., and Puglisi, L. (1992) Hypolipidemic activity of *Vaccinium myrtillus* leaves on a new model of genetically hyperlipidemic rat. *Planta Med.,* **58** Suppl. 1: A581-582.
12. Morazzoni, P., Livio, S., Scilingo, A., and Malandrino, S. (1991) *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides pharmacokinetics in rats. *Arzneimittelforschung.* **41**(2): 128-131.
13. Kaul, C. L. and Ramarao, P. (2001) The role of aldose reductase inhibitors in diabetic complications: recent trends. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* **23**(8): 465-475.
14. Vinik, A. I., Erbas, T., Park, T. S., Nolan, R., and Pittenger, G. L. (2001) Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **24**(8): 1476-85.
15. Maritim, A. C., Sanders, R. A., and Watkins, J. B. 3rd. (2003) Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**(1): 24-38.
16. Lim, S. S., Jung, S. H., Ji, J., Shin, K. H., and Keum, S. R. (2001) Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**(5): 653-668.
17. Lim, S. S., Jung, S. H., Ji, J., Shin, K. H., and Keum, S. R. (2000) Inhibitory effects of 2'-hydroxychalcones on rat lens aldose reductase and rat platelet aggregation. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **48**(11): 1786-1789.
18. 신국현, 임순성, 문형인, 조선행(1995) 산앵도나무 잎이 rat 수정체의 aldose 환원효소에 미치는 효과, *생약학회학술대회.*
19. Hayman, S. and Kinoshita, J. H. (1965) Isolation and Properties of Lens Aldose Reductase. *J. Biol. Chem.* **240**: 877-882.
20. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**: 1199-1200.
21. Born, G. V. R. (1962) Aggregation of Blood Platelets by adenosine diphosphate and its Reversal. *Nature* **194**: 927-929.
22. Okazaki, K., Nakayama, S., Kawazoe, K., and Takaishi, Y. (1998) Antiaggregant effects on human platelets of culinary herbs. *Phytother. Res.* **12**(8): 603-605.

(2003년 10월 7일 접수)