

한국산 해산식물의 추출물로부터 Aldose Reductase 억제활성의 검색

이연실 · 이상현^{1,*} · 김박광¹ · 신국현

((주) 월드씨그린 석원생명과학연구소, ¹서울대학교 약학대학)

Screening for Aldose Reductase Inhibitory Activity of Extracts of the Marine Plants from Korea

Yeon Sil Lee, Sanghyun Lee^{1,*}, Bak-Kwang Kim¹ and Kuk Hyun Shin

Seokwon Life Science Research Institute, World Sea Green Co. Ltd., Paju 413-832, and
¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

We examined MeOH extracts of the marine plants from Korea for their inhibitory activities on rat lens aldose reductase *in vitro*. Among the MeOH extracts tested, the extracts of *Enteromorpha prolifera*, *Ecklonia cava*, *Pelvetia siliquosa* and *Salicornia herbacea* exhibited a rat lens aldose reductase inhibition (IC₅₀: 3.04, 8.84, 11.42 and 4.99 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectively) *in vitro*.

Key Words: aldose reductase activity, *Ecklonia cava*, *Enteromorpha prolifera*, *Pelvetia siliquosa*, *Salicornia herbacea*, marine plant

서 론

당뇨병은 대표적인 성인병 중의 하나로서 전 세계적으로 격증하고 있고, 우리나라에서도 현재 그 환자 수는 증가 일로에 있다. 오늘날 당뇨병 치료에 있어서 최대목표 중의 하나는 당뇨병 합병증의 유발이나 진전을 억제하는데 있다. 최근에 당뇨병조절과 합병증과의 관계연구(Diabetes Control and Complication Trial)에 의하면 강화된 insulin 치료로 혈당을 정상화 시키면 당뇨병 합병증 발생을 크게 감소시킬 수 있었다(Seaquist *et al.* 1989).

당뇨병에 있어서 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway의 이상(Sato and Rifkin 1989), oxidative stress(Williamson *et al.* 1993), myoinositol의 감소와 Na⁺, K⁺-ATPase 활성의 감소(Greene *et al.* 1987) 등이 보고되어 있다. 정상상태에서 glucose는 생명을 유지하기 위한 중요한 에너지원으로 insulin에 의해 세포 내로 유입된 후 대부분이 해당계에서 대사되므로 polyol pathway를 통하여 대사되는 것은

약 3%에 불과하다(Greene *et al.* 1987). 그러나 신장세포, 신경세포, 수정체, 망막세포와 적혈구 등은 glucose 유입에 있어 insulin에 의존하지 않고 확산에 의해 유입되므로, 당뇨병에 의해 고혈당이 유발되면 이러한 세포 내 glucose 농도는 자동으로 상승한다. 세포 내 유입된 고농도의 glucose에 의해 aldose reductase가 활성화되어 정상상태의 약 2-4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성된다(Travis *et al.* 1974; Malone *et al.* 1980). 축적된 sorbitol은 세포 내 삼투압과 세포 투과성을 초래하여 생체 내 대사장애를 가져오게 된다.

본 연구는 다양한 종의 한국산 해산식물을 선발하여 당뇨병 합병증의 발생기전에 관여하는 효소로 알려져 있고, glucose의 aldehyde를 NADPH의 존재 하에 당 alcohol로 환원시키는데 관여하는 효소인 aldose reductase에 대한 억제활성을 보이는 종을 선발하고 그에 대한 결과를 보고하고자 한다.

*Corresponding author (jnp@korea.com)

재료와 방법

실험재료

본 연구에 사용된 실험재료는 해산식물인 가시파래(1, *Enteromorpha prolifera*), 감태(2, *Ecklonia cava*), 뜸부기(3, *Pelvetia siliquosa*), 툫(4, *Hizikia fusiformis*), 참김(5, *Porphyra tenera*), 앵초(6, *Primula sieboldii*), 구슬모자반(7, *Sargassum piluliferum*), 지충이(8, *Sargassum thunbergii*), 꼬시래기(9, *Garacilaria verrucosa*), 왕우뚝가사리(10, *Gelidium pacificum*), 모자반(11, *Sargassum fulvellum*), 우뚝가사리(12, *Gelidium amansii*), 다시마(13, *Laminaria japonica*), 미역(14, *Undaria pinnatifida*), 빗살미역(15, *Undaria pinnatifida* var. *elongata*), 청각(16, *Codium fragile*)와 함초(17, *Salicornia herbacea*)로 목포 남쪽 바다에서 채집하여 사용하였고, 각 실험재료는 (주)윌드씨그린 석원생명과학연구소에 보관하였다.

시약

β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(reduced form), DL-glyceraldehyde와 tetramethylene glutaric acid(TMG) 등의 시약을 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 그 외 추출과 분획용 시약 등은 1등급 시약을 사용하였다.

실험재료의 추출과 분획

한국산 해산식물을 채취한 후 동정하여 확인된 실험재료를 증류수로 충분히 세척하여 염분을 제거하고, 통풍이 잘되는 그늘에서 건조시켜 막자 사발로 마쇄하여 분말로 하였다. 준비된 해산식물의 각 분말(각 50g)을 추출기에 넣어 methanol(MeOH)로 6시간씩 3회 추출하고, 이를 모아 evaporator로 감압 농축하여 aldose reductase 억제효과를 측정할 MeOH 추출물을 각각 얻었다. 스크리닝을 실시한 결과로부터 활성이 있는 해산식물을 선별하였고, 이들 해산식물의 각 MeOH 추출물에 대하여 aldose reductase 억제작용을 나타내는 분획물을 검색하기 위해 극성의 차이에 따라 *n*-hexane(Hex), methylene chloride(MC), ethyl acetate(EtOAc), *n*-butanol(BuOH)로 분획을 실시하여 각 분획물을 얻었다.

Aldose Reductase 억제효과 측정

Aldose reductase 억제효과를 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hayman and Kinoshita(1965)가 사용한 방법을 수정하여 실시하였다. 즉 흰쥐의 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량의 phosphate buffer를 가하여 homogenization 하였다. 이를 4°C에서 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 ammonium sulfate로 40%까지 포화시키고 원심 분리한 상등액을 취하여 다시 70%가 되도록 ammonium sulfate를 가하

Table 1. Aldose reductase inhibitory activity of MeOH extracts of the marine plants from Korea

Samples	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Inhibition ^{a)} (%)	IC ₅₀ ^{b)} ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
TMG*	10	92.6	0.63
	1	70.2	
	0.1	11.9	
1	10	61.1	3.04
	1	43.9	
	0.5	27.0	
2	10	55.0	8.84
	5	38.6	
	1	28.0	
3	10	50.9	11.42
	5	38.3	
	1	26.0	
4	10	57.6	-
5	10	45.1	-
6	10	42.8	-
7	10	35.2	-
8	10	32.9	-
9	10	46.4	-
10	10	27.7	-
11	10	37.9	-
12	10	29.2	-
13	10	39.8	-
14	10	33.9	-
15	10	47.7	-
16	10	36.5	-
17	10	58.7	4.99
	5	45.3	
	1	38.9	

*Tetramethylene glutaric acid, a reference compound as one of typical aldose reductase inhibitors.

^{a)} Inhibition rate was calculated as percentage with respect to the control value.

^{b)} IC₅₀ values were calculated from the least-squares regression equation in the plot of the logarithm at three graded concentrations vs % inhibitions.

여 1시간 가량 저어준 다음 원심 분리하여 얻어진 pellet을 최소량의 buffer에 현탁하여 1일 정도 투석한 다음, 효소원으로 하였다. 위에서 조제한 효소원과 DL-glyceraldehyde를 기질로 하여 반응시키고, spectrophotometer(Spectra)를 이용하여 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다.

결과와 고찰

당뇨합병증의 유발기전 중 하나인 polyol pathway는 두 개의 반응계로 구성되는데 glucose의 aldehyde를 NADPH의 존재 하에 당 alcohol로 환원시키는 aldose reductase와 sorbitol을 NAD⁺ 존재 하에서 fructose로 산화시키는 효소인

Table 2. Aldose reductase inhibitory activity of fractions for the marine plants from Korea

Samples	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Inhibition ^{a)} (%)	IC ₅₀ ^{b)} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
TMG*	10	92.6	0.63	
	1	70.2		
	0.1	11.9		
1	Hex	10	10.60	
		5		
		1		
	MC	10		4.53
		5		
		1		
2	EtOAc	10	-	
		BuOH		
	Hex	10		
		5		
		1		
	MC	10		14.75
		5		
		1		
	EtOAc	10		5.83
		5		
		1		
		BuOH		
1				
0.5				
3	Hex	100	17.6	
		10		
		1		
	MC	100		28.1
		50		
		10		
	EtOAc	100		38.0
		10		
		5		
	BuOH	100		65.9
		10		
		1		
17	Hex	10	-	
		MC		
		1		
	EtOAc	0.5		0.26
		10		
		1		
BuOH	0.1	6.46		
	10			
	5			
	1	2.1		

*Tetramethylene glutaric acid, a reference compound as one of typical aldose reductase inhibitors.

^{a)} Inhibition rate was calculated as percentage with respect to the control value.

^{b)} IC₅₀ values were calculated from the least-squares regression equation in the plot of the logarithm at three graded concentrations vs % inhibitions.

sorbitol dehydrogenase가 관여하고 있다. Insulin 등의 대사 장애로 세포 내로 유입된 고농도의 glucose는 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose를 생성함으로써 백내장, 당뇨병 신경증, 망막증 등의 합병증을 야기시키게 된다. 이에 본 연구는 aldose reductase 활성을 검색하기 위해 흰쥐 수정체를 이용하여 스크리닝하였다.

해산식물의 MeOH 추출물의 aldose reductase 활성을 측정해 본 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 가시파래(1, *E. prolifera*), 감태(2, *E. cava*), 뜰부기(3, *P. siliquosa*)와 함초(17, *S. herbacea*)에서 활성이 나타났고, 그들의 IC₅₀값은 각각 3.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 8.84 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 11.42 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 와 4.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 를 나타내었다. 그 외 다른 해산식물에서는 aldose reductase 억제활성을 보이지 않았다. 상기에서 활성을 보인 네 종류의 해산식물로부터 활성을 갖는 fraction을 찾기 위하여 각각 Hex, MC, EtOAc와 BuOH로 순차적으로 분획한 fraction에 대하여 aldose reductase 억제활성을 측정해 본 결과 농도 의존적 경향을 나타내었다. Table 2에서 나타난 바와 같이 함초의 EtOAc 분획(IC₅₀: 0.26 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)이 가장 높은 활성을 보였고, 그 다음은 함초의 MC 분획(IC₅₀: 2.65 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 가시파래의 MC 분획(IC₅₀: 4.53 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 감태의 BuOH 분획(IC₅₀: 4.83 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 순으로 나타났다. 그리고 뜰부기의 경우는 Hex 분획(IC₅₀: 17.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)에서 가장 강하게 나타났다.

이상의 결과로 보아 여러 해산식물 중 가시파래, 감태, 뜰부기와 함초의 MeOH 추출물은 aldose reductase 억제활성을 통해 당뇨병증에 효과가 있는 것으로 사료된다. 그 동안의 연구를 보면 범부채(*Belamcanda chinensis*)에서 분리한 isoflavonoids(Jung et al. 2002), 참당귀(*Angelica gigas*)에서 분리한 coumarin(Lee et al. 2002), 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)에서 분리한 hyperin(Lee et al. 2003) 등 성분 수준에서의 aldose reductase 억제활성과 한국산 여러 생약에 대한 aldose reductase 연구보고(Jung et al. 2003)가 있었다. 하지만 한국산 해산식물의 aldose reductase 억제활성에 관한 연구는 보고된 바 없으며, 해산식물을 이용한 aldose reductase 억제활성 등 여러 생리활성을 연구함으로써 당뇨병 치료제 개발에 관심을 가질 필요가 있다. 그리고 aldose reductase 억제활성이 나타난 가시파래, 감태, 뜰부기와 함초로부터 활성 성분을 찾는 연구가 진행될 필요가 있으며, 특히 fraction 레벨에서 활성을 나타낸 함초(17, *S. herbacea*)는 해산식물을 이용한 천연물신약 개발의 가능성을 내포하고 있는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 보건복지부 산하 한국보건산업진흥원(KHIDI)의 지원(No. 03-PJ1-PG11-VN01-SV04-0016)에 의하여 이루어

졌으며, 이에 감사 드린다.

참고문헌

- Greene D.A., Lattimer S.A. and Sima A.F. 1987. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *New Eng. J. Med.* **316**: 599-606.
- Hayman S. and Kinoshita J.H. 1965. Isolation and properties of lens aldose reductase. *J. Biol. Chem.* **240**: 877-882.
- Jung S.H., Lee Y.S., Lee S., Lim S.S., Kim Y.S. and Shin K.H. 2002. Isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetic rat tissues. *Arch. Pharm. Res.* **25**: 306-312.
- Jung S.H., Lim S.S., Lee S., Lee Y.S., Shin K.H. and Kim Y.S. 2003. Aldose reductase inhibitory activity of methanol extracts from the Korean plants. *Nat. Prod. Sci.* **9**: 34-37.
- Lee S., Jung S.H., Lee Y.S. and Shin K.H. 2002. Coumarins from *Angelica gigas* roots having rat lens aldose reductase activity. *J. Appl. Pharmacol.* **10**: 85-88.
- Lee S., Jung S.H., Lee Y.S. and Shin K.H. 2003. Hyperin, an aldose reductase inhibitor from *Acanthopanax senticosus* leaves. *Nat. Prod. Sci.* **9**: 4-6.
- Malone J.I., Knox G., Benford S. and Tedesco T.A. 1980. Red cell sorbitol. An Indicator of diabetic control. *Diabetes* **29**: 861-864.
- Sato Y. and Rifkin D.B. 1989. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transformation growth factor B1-like molecule by plasmin during coculture. *J. Cell. Biol.* **109**: 309-315.
- Seaquist E.R., Goetz F.C., Rich S. and Barbosa J. 1989. Familial clustering of diabetic kidney disease: Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *New Eng. J. Med.* **320**: 1161-1165.
- Travis S.F., Morrison A.D., Clements R.S.Jr., Winegrad A.I. and Oski F.A. 1974. The role of the polyol pathway in metahemoglobin reduction in human red cells. *Br. J. Haematol.* **27**: 597-605.
- Williamson J.R., Chang K., Frangos M., Hasan K.S., Ido Y., Kawamura T., Nyengard J.R., Van Den Enden M., Kilo C. and Tilton R.G. 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* **42**: 801-813.

Received 28 July 2004

Accepted 14 December 2004