

뽕나무에서 분리한 Steppogenin과 Oxyresveratrol의 효모 α -Glucosidase의 억제효과

진희승* · 남궁우**,***, #

*정산생명공학연구소, **고려대학교의과대학

(Received April 28, 2010; Revised September 27, 2010; October 2, 2010)

Inhibitory Effects of Steppogenin and Oxyresveratrol from *Morus alba* L. against Yeast α -Glucosidase

Hwi Seung Chin* and Kung-Woo Nam**,**, #

*R&D Center, Jung San Bio Technology, Hwaseong 445-964, Korea

**Department of Neuroscience, College of Medicine, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — α -Glucosidase inhibitor is a target in the treatment of type II diabetes through the mainly inhibition of glucose levels after meals. In this study, we purified steppogenin and oxyresveratrol from the stem of *Morus alba* L. and examined their inhibitory activity against yeast α -glucosidase. Steppogenin and oxyresveratrol were inhibited yeast α -glucosidase in a dose dependent manner. The IC₅₀ activities (50% inhibition) were 34.4 and 9.3 μ M, respectively. The kinetic inhibition of steppogenin showed noncompetitive inhibition (K_m : 1.1 \times 10⁻³ M; K_i : 1 \times 10⁻⁵ M), meanwhile oxyresveratrol showed competitive inhibition (K_m : 4.3 \times 10⁻³ M; K_i : 3.4 \times 10⁻⁶ M) against yeast α -glucosidase. These results indicate that steppogenin and oxyresveratrol are noncompetitive and competitive inhibitors, respectively, against yeast α -glucosidase.

Keywords □ *Morus alba*, α -glucosidase, steppogenin, oxyresveratrol

당뇨병의 치료제를 개발하기 위한 표적으로는 소화 및 흡수 억제, 췌장에 작용하여 인슐린 분비 촉진, 간장에 작용하여 포도당 대사 조절, 인슐린 민감성 또는 인슐린 저항성 개선, 중추신경계에 작용 등을 대상으로 연구가 이루어지고 있다.¹⁾ 이들 표적 중에서 소화 및 흡수를 억제하는 물질은 식후에 급격히 증가하는 혈당의 수치를 낮추어주는 효과가 있기 때문에 당뇨 환자들이 식후에 혈당이 급격히 상승하는 것을 막는데 이용된다.

α -Glucosidase는 탄수화물을 분해하는 첫 번째 단계의 효소로 탄수화물의 분해 속도를 결정하며 glycoprotein과 glycolipid의 생합성에도 중요한 역할을 담당한다. 따라서 α -Glucosidase를 억제시키게 되면 장에서 탄수화물의 소화와 흡수가 억제됨으로써, 결과적으로 음식의 섭취로 인한 혈당의 상승을 억제시킬 수 있다.²⁻⁴⁾

이러한 작용의 α -Glucosidase 저해제는 주로 균 또는 식물에

서 유래한 소재로부터 개발되었으며 대표적인 화합물로 *Actinoplates* sp. 속(genus)의 발효산물에서 분리한 acarbose를 들 수 있다.⁵⁾ 이 외에도 뽕잎에 포함되어 있는 단당류 1-deoxynojirimycin⁶⁾과 콩의 대표적인 isoflavone인 genistein^{7,8)}이 식물에서 유래된 α -glucosidase 저해물질로 알려져 있다. 우리 그룹 또한 식물 추출물을 이용하여 α -glucosidase 억제 소재를 검색하던 중 뽕나무 줄기에서 이러한 효능이 있는 것을 알게 되었다.

뽕나무(*Morus alba* L.)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하며 높이 6~10 m까지 자란다. 전국에서 재식하며, 일본, 민주, 중국, 몽골 등 동아시아에 널리 분포한다. 잎을 상엽이라고 하며, 거풍, 청열, 명목의 효능이 있고, 풍온발열, 두통, 목적, 구갈을 치료한다. 뿌리 껍질을 상백피라고 하며, 사폐평천, 해열, 진해, 행수소종의 효능이 있고, 폐열천해, 토혈, 수종, 횡달, 각기, 빈뇨를 치료한다.⁹⁾ 뽕나무에는 항산화 물질인 steppogenin, rutin, quercetin, isoquercetin 같은 플라보노이드,⁹⁻¹¹⁾ 상백피에는 oxyresveratrol은 tyrosinase 활성 억제, 항염증, 항산화 기능이 있는 것으로 알려있으며,¹²⁻¹⁴⁾ 또한 γ -aminobutyric acid 등의 기능성 물질이 함유되어 있어 혈액 중 중성지방과 콜레스테롤 저하 작용, 동맥경

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-920-6096 (팩스) 02-953-6095
(E-mail) kwnam1@korea.ac.kr

화증 및 고지혈증 등의 치료에 효과가 있는 것으로도 알려져 있다.^{15,16)} 하지만 이러한 여러 가지 효능의 보고에도 불구하고 α -glucosidase에 대한 활성보고는 아직 되어있지 않다. 우리는 뽕나무줄기(상지)로부터 α -glucosidase에 대한 활성을 기초로 steppogenin과 oxyresveratrol을 분리하였다.

이 두 물질은 공통적으로 tyrosinase와 cycloxygenase 억제에 대한 보고가 되어 있으며 특히 oxyresveratrol은 항산화작용은 물론 신경보호작용,¹⁷⁾ 항염증(anti-inflammatory effect) 등이 보고되어 있지만 α -glucosidase에 대한 활성은 연구되어 있지 않다.

본 연구는 상지에서 분리한 steppogenin과 oxyresveratrol을 이용하여 효모 α -glucosidase의 활성에 미치는 영향과 저해 기작에 대하여 연구하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용된 뽕나무의 어린 가지(상지)는 2009년 2월 경동시장에서 대량으로 구입하여 수세 후 음건, 분쇄하여 사용하였다. 증거시료는 정산생명공학연구소의 시료보관소에 [증거번호: 상지(K1027/JS)]에 보관하였다.

상지의 용매 추출 및 항균활성 물질의 분리

구입 한 상지 중 5 kg을 수세·건조하여 EtOH로 3회 추출하여 여과하고 감압농축하여 EtOH 추출물 203 g을 얻었다. 메탄올 추출물은 중류수(2*l*)를 이용하여 혼탁시키고 *n*-Hexane, chloroform, ethyl acetate를 가하여 순차 분획하여 chloroform 분획물 12 g, ethyl acetate 분획물 32 g을 얻어 활성물질의 분리에 이용하였다.

Chloroform 분획 12 g을 chloroform : methanol=100 : 1에서 메탄올 단독까지 gradient 용매로 silica-gel(Kiesel gel 60(70~230 and 230~400 mesh, ASTM Art. 7734 and 9385, Merck) column chromatography(C.C)를 실시하여 11개의 분획(F1~F11)으로 나누었으며, 그 중 F5~F7 분획(3.5 g)을 합쳐 MeOH-methylene chloride(1 : 1) 용매를 이용, Sephadex LH-20(packing 물질: Sephadex LH-20(Amersham Biosciences) C.C를 실시하여 활성 분획물(F59) 298 mg을 획득하였다. F59는 40% 함수 메탄올에서 100% MeOH을 유출 용매로 하여 단계적으로 RP Lobar-A C.C를 실시하여 48 mg의 F593을 획득하였으며, F593을 *n*-hexane/ethyl acetate(1/1)을 유출용매로 하는 silica-gel C.C를 실시하여 백색분말의 최종 화합물 compound 1(7.5 mg)을 분리하였다(Fig. 1).

Ethyl acetate 분획물 28g을 *n*-hexane/ethyl acetate(3/2에서 0/1까지의 gradient)의 유출용매로 silica gel C.C를 실시하여 8개의 분획(F1~F8)으로 나누었다. 이중 F5분획(13.2 g)을

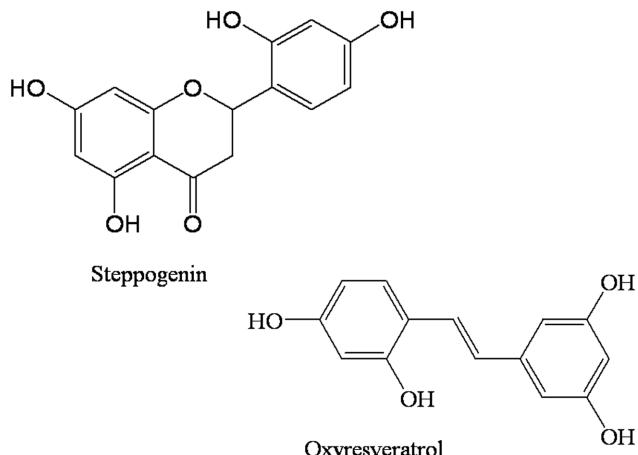


Fig. 1 – The structure of compound 1 and 2 from *Morus alba* L.

sephadex LH-20 C.C(CH₂Cl₂/MeOH=1/1)를 실시하여 compound 2(10.2 g)을 단리하였다(Fig. 1). 분리된 화합물은 ¹H 및 ¹³C-NMR은 Varian Unity Inova 500NB spectrometer, LC-MS는 Agilent 1100LC/MSD trap classic을 사용하여 동정하였다.

Compound 1 – White powder, LC/ESI/MS(m/z): 287[M-H]⁻, ¹H-NMR: (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 7.25(1H, d, *J*=8.30 Hz, H-6), 6.35(1H, dd, *J*=8.30 Hz, 2.44Hz, H-5'), 6.34(1H, d, *J*=2.44 Hz, H-3'). 5.93(1H, s, H-8), 5.90(1H, s, H-6), 5.62(1H, dd, *J*=13.18 Hz, 2.93 Hz, H-2), 3.08(1H, dd, *J*=13.18 Hz, 17.09 Hz, H-3)ax., 2.72(1H, dd, *J*=17.09 Hz, 2.93 Hz, H-3)eq., ¹³C-NMR: (125 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 197.3(C-4), 167.1(C-7), 164.3(C-5), 164.2(C-9), 158.5(C-2'), 155.6(C-4'), 127.6(C-6'), 116.7(C-1'), 106.6(C-5'), 102.2(C-3'), 102.1(C-10), 95.7(C-6), 94.9(C-8), 74.8(C-2), 41.9(C-3).

Compound 2 – Colorless plates(in MeOH), LC/ESI/MS (m/z): 245[M+H]⁺, ¹H-NMR: (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 7.33(1H, d, *J*=8.8 Hz, H-6), 7.28(1H, d, *J*=16.1 Hz, H-a), 6.82(1H, d, *J*=16.1 Hz, H-B), 6.45(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.45(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 6.32(1H, d, 2.44 Hz, H-5), 6.31(1H, d, *J*=2.44 Hz, H-3) 6.15(1H, t, *J*=2.0 Hz, H-4'), ¹³C-NMR: (125 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 158.4(C-3'), 158.4(C-5'), 158.0(C-4), 156.1(C-2), 141.0(C-1'), 127.2(C-6), 125.3(C-B), 123.6(C-a), 116.7(C-1), 107.2(C-5), 104.5(C-2'), 104.5(C-6'), 102.4(C-3), 101.1(C-4').

Yeast α -glucosidase의 활성 측정

효모 기원의 5.7 unit α -glucosidase(Sigma, Mo, U.S.A)와 최종농도 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M^o 되도록 희석한 steppogenin과 oxyresveratrol을 0.2 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.1 mM ρ -nitrophenyl

α -D-glucopyranoside를 첨가하여, 37°C에서 20분간 반응 후 0.1 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 종결시켰다. ELISA reader (Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 측정하였으며 대조군(control)으로는 DMSO를 사용하였다.

효소의 활성저해에 대한 반응 기작

Steppogenin과 oxyresveratrol 처리에 따른 α -glucosidase의 저해 활성 기작을 알아보기 위해서 기질 및 steppogenin과 oxyresveratrol을 농도별로 처리하여 농도와 시간에 따른 K_m 및 K_i 값을 계산하였고, 또한 Line weaver-burk plot으로부터 저해 활성 기작을 구하였다.

실험결과 및 고찰

상지의 EtOH 추출물로 부터의 분리된 화합물의 구조 동정

Compound 1는 백색 분말로 LC/ESI/MS 및 NMR 스펙트럼 data로부터 분자식을 C₁₅H₁₂O₆로 추정하였다. LC/ESI 스펙트럼에서 buffer 조건이 염기성이 강하여 분자이온 peak가 m/z 287[M-H]⁺에서 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 5.62 ppm에서의 doublet ($J=13.1$ Hz, 2.9 Hz)은 C-2의 proton을 나타나고, δ 2.72 ppm에서 doublet ($J=17.1$ Hz, 2.9 Hz)으로 C-3의 equatorial proton을 보여주고, δ 3.08 ppm에서 doublet ($J=13.18$ Hz, 17.1 Hz)은 C-3의 axial proton을 나타낸다. δ 5.90 ppm과 δ 5.93 ppm에서 doublet은 H-6과 H-8의 meta coupling을 나타낸다. δ 6.34 ppm ($J=8.3$ Hz, 2.44 Hz)과 δ 7.25 ppm ($J=8.3$ Hz)은 ortho coupling을 보여준다. ¹³C-NMR spectrum에서는 aromatic ring에서 기인하는 chemical shift를 나타내었고, carbonyl의 C-4는 δ 197.3 ppm에서 확인하였다. 이상의 기기분석 결과와 문헌^{17,18}과의 비교로 compound 1는 steppogenin (5,7,2',4'-tetrahydroxyflavanone)으로 동정하였다(Fig. 1).

Compound 2는 무색 결정으로 LC/ESI/MS 및 NMR 스펙트럼 data로부터 분자식을 C₁₄H₁₂O₄로 추정하였다. LC/ESI 스펙트럼에서 buffer 조건이 산성이 강하여 분자이온 peak가 m/z 245[M+H]⁺에서 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.28 ppm과 δ 6.82 ppm에서의 doublet ($J=16.1$ Hz)은 olefinic proton으로 trans결합을 하고 있는 H-7과 H-8로 확인하였고, δ 6.32 ppm ($J=8.8$ Hz, 2.44 Hz)의 H-5가 δ 7.33 ppm ($J=8.8$ Hz)의 H-6과 ortho coupling을 하고, δ 6.31 ppm ($J=2.44$ Hz)의 H-3와 meta coupling을 하고 있다. δ 6.15 ppm ($J=2.0$ Hz)의 H-4'는 δ 6.45 ppm의 H-2' ($J=2.0$ Hz), H-6' ($J=2.0$ Hz)와 각각 meta coupling을 하고 있는 것을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 104.5 ppm에서 C2', C6', δ 158.4 ppm에서 C3', C5'을 확인할 수 있었다. 이상의 기기분석 결과와 문헌(19~21)과의 비교로

compound 2는 2-oxyresveratrol(2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene)으로 동정하였다(Fig. 1).

α -Glucosidase 활성 저해

상지에서 분리한 steppogenin과 oxyresveratrol에 의한 α -glucosidase의 활성 억제를 측정하기 위해서 최종 농도 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M로 처리한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Steppogenin은 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M로 처리시 α -glucosidase의 활성을 각각 6, 6, 6, 18, 72%, oxyresveratrol은 6, 7, 13, 62, 81% 활성이 억제되었다. 이 등²² 연구 결과에서 1-deoxynojirimycin의 IC₅₀이 18 μ M인 것으로 보고 하였으며, 본 연구 결과 steppogenin과 oxyresveratrol은 각각 34.3과 9.3 μ M인 것으로 측정(Table I)되어, oxyresveratrol은 1-deoxynojirimycin 보

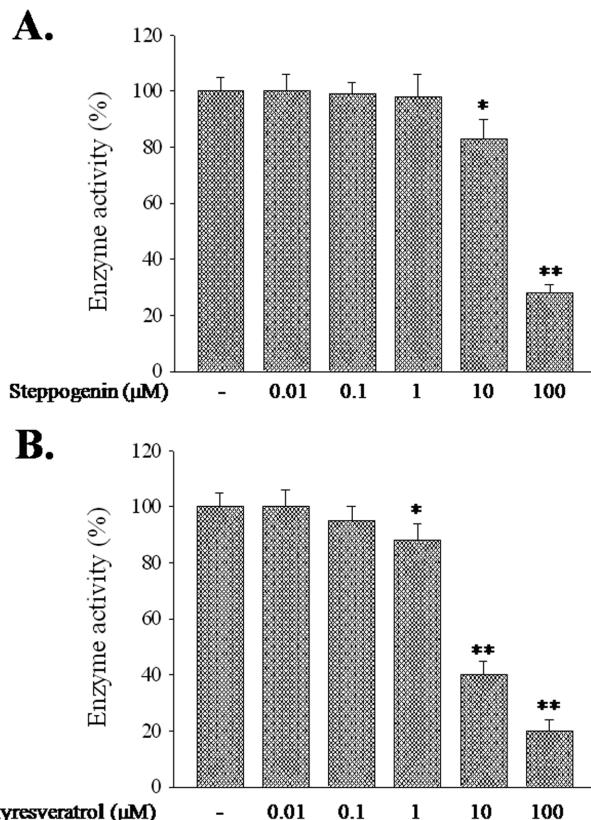


Fig. 2 – The inhibitory activities of steppogenin (A) and oxyresveratrol (B) against yeast α -glucosidase. Data are expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared with control.

Table I – IC₅₀ values of steppogenin and oxyresveratrol on α -glucosidase against α -glucosidase from yeast

	IC ₅₀ (μ M)
Steppogenin	34.3
Oxyresveratrol	9.3

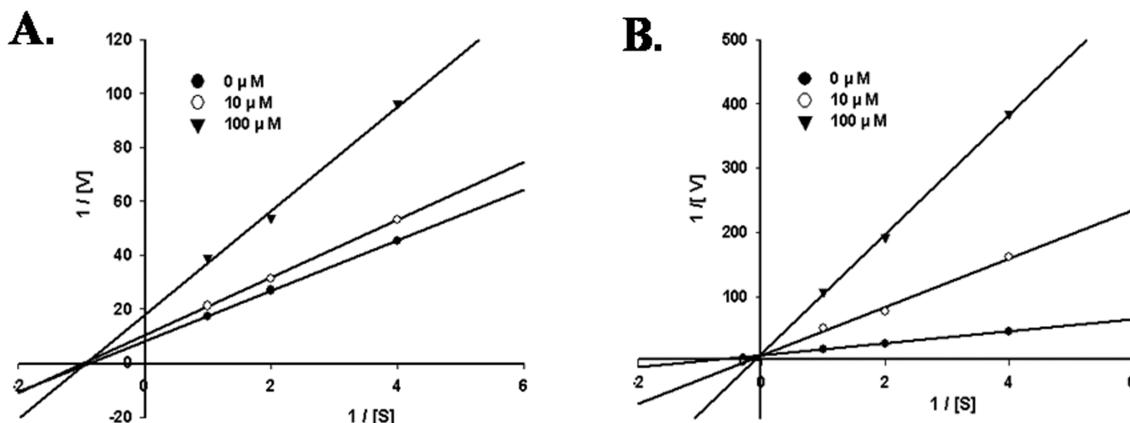


Fig. 3 – Line weaver-burk plot of the reaction of yeast α -glucosidase in the presence of steppogenin and oxyresveratrol. A: Steppogenin, B: Oxyresveratrol.

Table II – K_m and K_i values of steppogenin and oxyresveratrol for yeast α -glucosidase

	K_m (M)	K_i (M)
Steppogenin	1.1×10^{-3}	1.0×10^{-5}
Oxyresveratrol	4.3×10^{-3}	3.4×10^{-6}

다 높은 저해 활성을 나타내었다.

α -Glucosidase에 대한 저해 kinetics

Steppogenin과 oxyresveratrol 처리에 따른 α -glucosidase의 저해 활성을 규명하고자 실험을 진행한 결과를 Fig. 3과 Table II에 나타내었다. Steppogenin의 저해 기작은 비경쟁적 저해 기작을 나타내었고, oxyresveratrol은 경쟁적 저해 기작을 나타내었다. 또한 steppogenin과 oxyresveratrol의 K_m 값은 각각 1.1×10^{-3} 과 4.3×10^{-3} M이었고, K_i 값은 각각 1×10^{-5} 과 3.4×10^{-6} M로 나타났다.

결 론

상지(*Morus alba*)로부터 α -glucosidase 활성을 억제하는 2가지 물질인 steppogenin과 oxyresveratrol을 분리하였다. 2가지 물질을 대상으로 여러 농도(0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M)에 대하여 효모 유래의 α -glucosidase의 활성을 50% 억제하는 농도(IC₅₀)를 구하였다. 그 결과 steppogenin과 oxyresveratrol의 IC₅₀은 각각 34.3과 9.3 μ M인 것으로 측정되었다. α -Glucosidase에 대한 저해 유형은 steppogenin의 경우 비경쟁적 저해로 나타났으며 oxyresveratrol은 경쟁적 저해 기작을 나타내었다. Steppogenin과 oxyresveratrol의 α -glucosidase에 대한 K_m 값은 각각 1.1×10^{-3} 과 4.3×10^{-3} M로 측정이 되었으며, 이 때의 K_i 값은 1×10^{-5} 과 3.4×10^{-6} M로 측정되었다. 따라서 상지로부터 분리한 steppogenin

과 oxyresveratrol은 효모유래 α -glucosidase를 각각 비경쟁적, 경쟁적으로 억제하는 화합물이다.

감사의 말씀

본 연구는 2008년도 경기도기술개발과제(A08081910)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Moller, D. E. : New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **414**, 821 (2001).
- 2) Bertozzi, C. R. and Kiessling, L. L. : Chemical glycobiology. *Science* **293**, 2357 (2001).
- 3) Bell, D. S. H. : Type 2 diabetes mellitus: What is the optimal treatment regimen? *Am. J. Med.* **116**, 23S (2004).
- 4) Lebovitz, H. E. : Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrin. Metab. Clin.* **26**, 539 (1997).
- 5) Schmidit, D. D., Frommer, W., Junge, B., Muller, L., Wingender, W., Truscheit, E. and Schafer, D. : Alpha-glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* **64**, 535 (1977).
- 6) Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. : Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycina*. *Carbohydr. Res.* **253**, 235 (1994).
- 7) Lee, D. S. and Lee, S. H. : Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor. *FEBS Lett.* **501**, 84 (2001).
- 8) 배기환 : 한국의 약용식물. 교학사, 서울 p. 73 (2000).
- 9) Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsume, T., Kitajima, K., Anuurad, E., Yamasaki, M. and Yamane Y. : Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonyl-glucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* **135**, 729 (2005).

- 10) Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y., Shiwaku, K. and Yamane, Y. : Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.* **97**, 25 (2006).
- 11) Lee, I. K., Song, K. S., Kim, C. J., Kim, H. M., Oh, G. T. and Yoo, I. D. : Tumor cell growth inhibition and antioxydative activity of flavonoids from the stem bark of *Cudrania tricuspidata*. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. **37**, 105 (1994).
- 12) Chung, K. O., Kim, B. Y., Lee, M. H., Kim, Y. R., Chung, H. Y., Park, J. H. and Moon, J. O. : *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J. Pharm. Pharmacol.* **55**, 1695 (2003).
- 13) Lorunz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G. and Horn, T. F. W. : Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidativ stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*. **9**, 64 (2003).
- 14) Shin, N. H., Ryu, S. Y., Choi, E. J., Kang, S. H., Chang, I. M., Min, K. R. and Kim, Y. S. : Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **243**, 801 (1998).
- 15) Kim, S. Y., Lee, W. C., Kim, H. B., Kim, A. J. and Kim, S. K. : Antihyperlipidemic effects of methanol extracts from mulberry leaves in cholesterol-induced hyperlipidemia rats. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* **27**, 1217 (1998).
- 16) Andallu, B. and Varacacharyulu, N. C. H. : Antioxidant role of mulberry leaves in streptozotocin diabetic rats. *Clin Chim Acta*. **338**, 3 (2003)
- 17) Andraibi, S. A., Spina, M. G., Lorenz, P., Ebmeyer, U., Wolf, G. and Horn, T. F. : Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxy-stilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* **1017**, 98 (2004).
- 18) Deshpande, V. H., Srinivasan, R. and Rama R. A. V. : Wood phenolics of Morus-spp part 4 phenolics of the heart wood of 5 Morus-spp. *Indian J. of chemistry*. **13**, 453 (1975)
- 19) El-Sohly, H. N., Joshi, A., Li, X.-C. and Ross S. A. : Flavonoids from *Maclura tinctoria*. *Phytochemistry* **52**, 141 (1999).
- 20) Hirakura, K., Hano, Y., Fukai, T., Nomura, T., Uzawa, J. and Fukushima, K. : Structures of three new natural diels-alder type adducts, kuwanons P and X, and mulberrofuran J, from the cultivated mulberry tree (*Morus lhou* KOIDZ.). *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1088 (1985).
- 21) Lee, K. T., Lee, K. S., Jeong, J. H., Jo, B. K., Heo, M. Y. and Kim H. P. : Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis. *J. Cosmet. Sci.* **54**, 133 (2003).
- 22) Qiu, F., Komatsu, K., Kawasaki, K., Saito, K., Yao, X. and Kano, Y. : A novel stilbene glucoside, oxyresveratrol 3'-O- β -glucopyranoside, from the root bark of *Morus alba*. *Planta Med.* **62**, 559 (1996).
- 23) Lee, E. H., Ham, J. Y., Ahn, H. R., Kim, M. C., Kim, C. Y., Pan, C. H., Um, B. H. and Jung S H. : Inhibitory effects of the compounds isolated from *Sargassum yezoense* on a-glucosidase and oxidative stress. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**, 150 (2009).