

수종 생약에 의한 Lens Aldose Reductase의 억제

정도래 · 박용양 · 이승호 · 이경순 · 노재섭

충북대학교 약학대학

Inhibition of Lens Aldose Reductase by Medicinal Plants

Do Rae Jeong, Woong Yang Park, Seung Ho Lee, Kyong Soon Lee and Jai Seup Ro
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Abstract—To search for inhibitory activities for lens aldose reductase, twenty two medicinal plants were tested by the method of bovine lens aldose reductase inhibition test. In this test *Rubia akane*(68%), *Artemisia selengensis*(61%), *Lespedeza cuneata*(58%), *Ligustrum lucidum*(58%), *Viola patrinii*(58%) extracts were shown to have aldose reductase inhibitory activity.

From the radix of *Rubia akane*, 2-methyl-1, 3, 6-trihydroxy-9, 10-anthraquinone-3-O-(6'-O-acetyl)- α -rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside was isolated and the IC₅₀ of this compound in the aldose reductase inhibition test was about 1.2×10^{-6} M.

Keywords—lens aldose reductase inhibitor · *Rubia akane* · 2-methyl-1, 3, 6-trihydroxy-9, 10-anthraquinone-3-O-(6'-O-acetyl)- α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside

당뇨병은 만성 대사성 질환으로 최근 해마다 발병 빈도가 증가하는 추세이며 여러 원인에 의해 우리가 섭취한 영양분을 정상적으로 이용하지 못해 지속적인 고혈당이 유발됨으로써 신체의 각 장기 즉 눈, 심장, 신장, 신경 및 혈관 손상등의 만성 합병증을 일으키는 질환이다. 당뇨병의 일차적 치료의 목표는 혈당치를 정상범위로 유지하는 것인데 인슐린 제제와 경구 혈당강하제의 개발로 어느정도 가능해져 당뇨병성 혼수와 같이 생명에 직접적인 영향을 미치는 일은 드물게 되었다. 따라서 오늘날 당뇨병 치료의 최대 목적은 고혈당에 기인하는 당뇨병성 합병증의 병발과 진전을 억제하는 것이라 할 수 있다. 당뇨병성 만성 합병증으로는 말초 신경장애, 신증, 망막증, 백내장등을 들 수 있는데 이중에서도 백내장은 당뇨 환자들에게 호발하는 질환으로 계속 진전되면 실명하게 되는 위험을

안고 있는 질환이다.¹⁾ 백내장의 lens는 정상적인 lens보다 더 많은 disulfide bond를 함유하고 있어서 lens protein의 polymerization에 참여하므로 빛을 산란시킨다는 주장^{2,3)} 외에도 현재 주목을 끌고 있는 당뇨병 합병증의 발병기전의 하나로 polyol대사의 이상을 들 수 있는데, polyol 대사 경로란 glucose대사 경로의 하나로 glucose가 sorbitol을 거쳐 fructose로 변환되는 경로이다.¹⁾ 이 polyol대사 경로는 2개의 반응계로 구성되어 있는데 aldose reductase(AR)와 sorbitol dehydrogenase(SDH)의 2종의 효소가 관여하고 있다.^{4,5)} AR과 SDH의 활성은 약 50:1 정도로 과량 생성된 sorbitol은 쉽게 fructose로 되기 어려운데,^{6,7)} 세포 내에 생성된 과량의 sorbitol은 세포내의 삼투압을 상승시키고 세포를 팽화시키며 수정체 섬유세포의 투과도를 항진시킴과 동시에 세포내 단백질의 변성을 일으켜 수정체를

혼탁하게 하여 당뇨성 백내장을 일으킨다.¹¹⁾ 따라서 AR의 활성을 억제하면 sorbitol의 생성이 억제되어 당뇨성 백내장의 발증억제가 가능하게 된다.⁸⁻¹¹⁾ AR 억제제로는 alestatin, sorbinil등이 밝혀져 있으며,¹²⁾ flavonoid, tannin, coumarin, essential oil등도 AR Inhibition(ARI)효과를 나타낸다고 보고되어 있다.¹³⁻¹⁶⁾

본 실험에 사용된 22종의 생약은 옛부터 안질 명목, 청열등의 치료효과를 지닌 것들로,^{17,18)} 이들의 ARI 효과를 *in vitro*에서 측정하였고 이들중 꼭두서니 *Rubia akane*로부터 anthraquinone glycoside를 유효성분으로 분리하여 ARI 효과를 *in vitro*에서 측정하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

실험재료—본 실험에 사용한 생약들은 청주의 한약 건재상에서 구입하거나 충북 지역에서 채집하여 감정받아 음건하여 사용하였다.

***In vitro* 실험에서 사용한 소의 눈은** 사용시에 청주 도축장에서 도축직후 구입하여 수정체를 분리하여 사용하였다.

시약 및 기기—본 실험에 사용한 NADPH 및 *DL*-glyceraldehyde는 Sigma Co., ammonium sulfate 및 pot. phosphate(dibasic)는 Shinyo Pure Chem. Co., dimethylsulfoxide는 Tedia Co., pot. phosphate(monobasic)는 Hayashi Pure Chem. Industries에서 구입하여 사용하였다. 용접은 Swiss Büchi사의 Model 510-K 미량용점측정기를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았고, UV spectrum은 Beckman DU-70 spectrophotometer 및 Cecil CE 599 automatic scanning spectrophotometer로 측정하였으며, IR spectrum은 Perkin-Elmer spectrophotometer로 측정하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker Aspect 3000으로 측정하였고, MS spectrum은 Jeol GC-MS로 측정하였으며, centrifuge는 MSE COOLSPIN 2, lyophilizer는 Edward 12K Supermodulyo freeze dryer를 사용하였다.

Bovine lens aldose reductase의 조제—Harris 등¹⁹⁾의 방법에 따라 bovine lens를 사용

시에 적출한 후 칭량하여 3배량의 5 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 넣고 ice bath내에서 mince하여 glass homogenizer에서 homogenizing한 후 homogenate를 4°C에서 10,000×g로 40분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 30%가 될때까지 ammonium sulfate powder를 가하고 가끔 저어 주면서 15분간 방치하였다. 이 용액을 3,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 75%가 되게 ammonium sulfate powder를 가하고 가끔 저어 주면서 15분간 방치 후 원심분리하여 침전을 취한 후 5 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 효소원으로 사용하였다.

실험 방법

검액의 조제—음건한 생약을 각각 30 g씩을 세절하여 증류수로 환류냉각하면서 2시간씩 3회 반복 추출하여 여과한 여액을 감압 농축한 다음 동결 건조기로 완전 건조하여 desiccator에 보관하였다.

Bovine lens aldose reductase activity의 측정—Kohda 등^{20,21)}과 Kato 등²²⁾의 방법에 따라 UV cell안에 2.5×10⁻⁴M NADPH 0.15 ml, 1.5×10⁻³M *DL*-glyceraldehyde 0.3 ml, 0.1M phosphate buffer (pH 6.2) 0.6 ml, sample solution 및 증류수를 넣고 shaking한 후 효소를 가하여 전체 양이 3.0 ml가 되게 하여 검액의 농도는 0.001%가 되게 하였다. 효소를 가하여 반응 시작 5분 후의 흡광도 변화를 340 nm에서 측정하고 대조군의 변화치에서 공시험군의 변화치를 감해준 흡광도의 차는 0.030±0.005 unit/5 min로 하였다.²³⁾ 반응은 25±0.5°C에서 각군 모두 3회 반복 실시하였다. 공 시험군은 기질인 *DL*-glyceraldehyde만을 제외시켜 NADPH 이외의 타요인에 의한 반응치를 보정하였다.

효소 저해율(%)=100×

$$\frac{(\text{대조군}-\text{공시험군})-(\text{검액}-\text{검액의 공시험군})}{\text{대조군}-\text{공시험군}}$$

glyceraldehyde+NADPH+H⁺

$$\xrightarrow{\text{aldose reductase}} \text{glycerol}+\text{NADP}^+$$

꼭두서니로부터 bovine lens aldose reductase activity 성분의 확인—꼭두서니에는 anthraquinone계열의 성분이 다량 함유되어 있음

이 알려져 있으며,^{23,24)} emodin과 sennoside A와 같은 anthraquinone 배당체가 AR를 억제한다는 보고가 있어²⁰⁾ 꼭두서니중 anthraquinone 계열 성분을 유효성분으로 추정하였다. 충북대학교 구내에서 채취한 꼭두서니뿌리(2.7 kg)를 음건 후 세절하여 95% MeOH로 3회 반복 추출하여 여과한 여액을 감압 농축한 농축액에 증류수를 가하여 benzene으로 추출하고 수층을 다시 EtOAc로 추출하였다. 이렇게 하여 얻은 benzene분획, EtOAc분획 및 H₂O분획을 각각 동결건조기로 건조하여 0.001%의 농도로 ARI효과를 *in vitro*에서 측정하였다. 이 중에서 ARI 효과가 가장 좋은 EtOAc분획에 대하여 CHCl₃-MeOH-H₂O = 13 : 7 : 2의 혼합용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 황색분말을 얻어 MeOH로 재결정하여 침상 결정 compound A를 얻었다.

Compound A—mp 235~238°, IR, ν_{\max}^{KBr} 3400 (OH), 1720(C=O)cm⁻¹; MS, *m/z* 270(base peak), 242, 43; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 1.10 (3H, d, *J*=6Hz, Rha-CH₃), 2.16 (3H, s, 2-CH₃), 5.28 (1H, d, *J*=2Hz, Rha-1), 5.42 (1H, d, *J*=7Hz, Glc-1), 7.18 (1H, dd, *J*=3, 8Hz, H-7), 7.37 (1H, s, H-4), 7.44 (1H, d, *J*=3Hz, H-5), 8.04 (1H, d, *J*=8Hz, H-8), 13.25 (1H, s, 1-OH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ : 8.76(2-Me), 18.10 (Rha-CH₃), 20.41 (Ac-CH₃), 63.37, 68.56, 70.11, 70.46, 70.46, 72.01, 74.09, 76.45, 77.09, 97.44, 100.27 (sugar-C), 105.22(C-4), 110.59(C-9a), 112.60(C-5), 120.56(C-2), 121.48(C-7), 124.31(C-8a), 129.56(C-8), 131.86(C-10a), 135.21(C-4a), 159.94(C-3), 161.27 (C-6), 163.63(C-1), 170.26 (Ac-CO), 181.56 (C-10), 186.18(C-9).

Compound A의 IC₅₀ 측정—Compound A의 2.2×10⁻⁸M, 2.2×10⁻⁷M 및 2.2×10⁻⁶M 농도

Table I. Inhibition of bovine lens aldose reductase by the compound A

Concentration(M)	Inhibitory activity(%)
2.2×10 ⁻⁸	3
2.2×10 ⁻⁷	21
2.2×10 ⁻⁶	62

에서 ARI 효과를 살펴보고 공시험 및 대조시험도 동일 농도로 시행하였다. Compound A의 각 농도별 효소억제력은 다음 Table I과 같다.

IC₅₀는 각 농도에서의 ARI율을 측정한 후 logit log paper상에 작도하여 구하였다.

결과 및 고찰

Bovine lens aldose reductase inhibition

효과—22종의 수침 엑스 중 0.001%이 농도에서 50%이상의 ARI 효과를 나타낸 것으로는 꼭두서니(68%), 물쭉(61%) 비수리(58%), 제주광나무(58%) 및 흰제비꽃(58%) 등 5종이었으며 각각을 Table II에 나타내었다.

꼭두서니의 ARI 효과는 EtOAc 분획 82%, benzene분획 43%, H₂O분획 18%로 EtOAc 분획에서 가장 높았다.

Compound A의 확인—Compound A는 Born-träger reaction과 Molisch test에서 양성을 나타내었고 UV (365 nm)하에서 주황색 형광을 나타내어 anthraquinone glycoside라고 추정하였다. IR spectrum은 3400 cm⁻¹에서 OH기에 의한 광범위한 흡수률, 2920 cm⁻¹에서 aliphatic CH기에 의한 흡수률, 1720 cm⁻¹에서 C=O기에 의한 흡수률을 확인할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum은 1.10 ppm에서 rhamnose의 CH₃기에 의한 signal, 1.95 ppm에서 CH₃CO기에 의한 signal, 2.16 ppm에서 2번 탄소에 결합한 CH₃기에 의한 signal이 관찰되고 3.30~4.00 ppm에서 sugar의 methine 및 methylene proton signal이 관찰되었으며, 5.28 ppm과 5.42 ppm에서 rhamnose와 glucose의 anomeric proton signal이 관찰되었는데 coupling constant가 각각 2Hz 및 7Hz로 rhamnose는 α -결합, glucose는 β -결합을 하고 있음을 알 수 있었다. 또 7.18 ppm에서 *o*- 및 *m*-coupling하고 있는 double doublet이 관찰되어 7위의 proton에 귀속되고, 7.37 ppm의 singlet, 7.44 ppm의 *m*-coupling하고 있는 doublet, 8.04 ppm에서의 *o*-coupling하고 있는 doublet이 관찰되어 각각 4, 5, 8위의 proton에 귀속되며, 13.25 ppm에서 1위의 chelated OH의 proton signal이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서 당부분에 해당하는 che-

Table II. Inhibition of bovin lens aldose reductase by medicinal plants

Scientific name	Korean name	Part used	Inhibition rate (%)
<i>Acorus gramineus</i>	석창포	Rhizoma	26
<i>Artemisia selengensis</i>	물썩	Herba	61
<i>Astilbe chinensis</i> var. <i>dauidii</i>	노루오줌	Rhizoma	23
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	냉이	Herba	35
<i>Cibotium barometz</i>	금모구척	Rhizoma	32
<i>Cuscuta australis</i>	실새삼	Semen	19
<i>Dianthus sinensis</i>	패랭이꽃	Herba	42
<i>Equisetum hyemale</i>	속새	Herba	35
<i>Galium suprium</i>	갈퀴덩굴	Herba	47
<i>Humulus japonicus</i>	환삼덩굴	Herba	4
<i>Kochia scoparia</i>	땀싸리	Semen	45
<i>Lespedeza cuneata</i>	비수리	Herba	58
<i>Ligustrum lucidum</i>	제주광나무	Fructus	58
<i>Lycium chinense</i>	구기자	Fructus	3
<i>Magnolia kobus</i>	목련	Flos	12
<i>Melilotus alba</i>	흰전동싸리	Herba	32
<i>Plantago asiatica</i>	질경이	Semen	44
<i>Polygonum aviculare</i>	마디풀	Herba	24
<i>Rubia akane</i>	꼭두서니	Radix	68
<i>Spirodella polyrhiza</i>	개구리밥	Herba	48
<i>Viola mandshurica</i>	제비꽃	Herbe	39
<i>Viola patrinii</i>	흰제비꽃	Herba	58

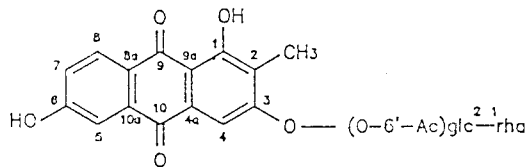


Fig. 1. Structure of the compound A

mical shift는 flavonoid에 rhamnosyl(1→2) glucose가 결합된 구조의 chemical shift와 유사했으나 glucose의 6의 chemical shift가 3 ppm정도 downfield shift하여 관찰되어 acetyl기의 결합을 예상할 수 있으며²⁵⁻²⁷⁾ 20.48 ppm에서 Ac-CH₃의 signal과 170.46 ppm에서 Ac-CO의 signal이 관찰되었다. 따라서 당부분의 구조는 rhamnosyl glucose의 6위에 acetyl기가 결합되어 있음을 알 수 있었다.

이상의 spectral data를 종합하여 compound A는 2-methyl-1, 3, 6-trihydroxy-9, 10-anthraquin-

one-3-O-(6'-O-acetyl)-α-L-rhamnosyl(1→2)-β-D-glucoside로 추정하여 표품과 spectral data를 비교하여 동정 하였다.²³⁾

Compound A의 IC₅₀—Compound A의 각 농도별 ARI 효과는 2.2×10⁻⁸M에서 3%, 2.2×10⁻⁷M에서 21%, 2.2×10⁻⁶M에서 62%로 이를 logit log paper에 작도하여 IC₅₀가 1.2×10⁻⁶M로 sennoside (1.4×10⁻⁶M) 및 emodin (3.4×10⁻⁶M)²⁰⁾ 보다도 높은 ARI 효과를 나타내었다.

본 실험에 사용된 생약들은 주로 증약 대사전 및 원색 천연약물대사전에 명목, 안질, 청열명목등의 작용이 있다고 수제된 것들을 사용하였으며, 그중 효과가 강한 것들은 대부분 익간, 청간등의 효능이 있거나 간염, 황달등의 치료에 사용되는 것들이었다. 따라서 간병변에 사용되고 있는 생약들에 대한 당뇨성 백내장 억제제개발에 관한 연구가 더욱 폭 넓게 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

1. 22종의 생약에 대한 bovine lens aldose reductase inhibition 효과를 *in vitro*에서 실험한 결과 0.001%에서 50%이상의 ARI 효과를 보인 것은 꼭두서니(68%), 물쭉(61%), 비수리(58%), 제주광나무(58%) 및 흰제비꽃(58%) 등 5종이었다.

2. 꼭두서니뿌리의 EtOAc분획으로부터 bovine lens aldose reductase inhibitor로 분리된 compound A는 2-methyl-1, 3, 6-trihydroxy-9, 10-anthraquinone-3-O-(6'-O-acetyl)- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoside임을 동정하였으며 IC₅₀는 1.2 $\times 10^{-6}$ M 이었다

〈1993년 1월 13일 접수 : 1월 25일 수리〉

참 고 문 헌

1. Tanimoto, T.: *Pharmacia* 24, 459 (1988).
2. Cerami, A. and Stevens, V.J.: *Metabolism* 28; suppl. 1, 433 (1979).
3. Steven, V.J. and Rouzer, C.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2918 (1978).
4. Gabbay, K.H. and O'Sullivan, J.B.: *Diabetes* 17, 239 (1968).
5. Dvornik, D., Gabbay, K.H. and Kinoshita, J.H.: *Science* 182, 1146 (1973).
6. Van Heyningen, R.: *Nature* 184, 194 (1959).
7. Collins, J.G. and Clinton, N.C.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 242 (1977).
8. Beyer, M.A. and Farnsworth, P.N.: *Exp. Eye. Res.* 28, 709 (1979).
9. Parma, N.S. and Ghosh, M.N.: *Exp. Eye. Res.* 29, 229 (1979).
10. Okuda, J., Yashima, K., Inagaki, K. and Miwa, I.: *Chem. Pharm. Bull.* 33, 2990 (1985).
11. Sestani, K. and Bellini, F.: *J. Med. Chem.* 27, 255 (1984).
12. Sawada, H., Hamatake, M., Hara, A., Nakagawa, M. and Nakayama, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1662 (1989).
13. Moon, C.K., Lee, S.C., Yun, Y.P., Ha, B.J. and Yook, C.S.: *Arch. Pharm. Res.* 11, 308 (1988).
14. Okuda, J., Miwa, I., Inagaki, K., Horie, T. and Nakayama, M.: *Biochem. Pharmacol.* 31, 3807 (1982).
15. Varma, S.D. and Kinoshita, J.H.: *Biochem. Pharmacol.* 25, 2505 (1976).
16. Moon, C.K., Choi, S.Y. and Ha, B.J.: *Arch. Pharm. Res.* 11, 312 (1988).
17. 江蘇新醫學院：中藥大辭典，上海科學技術出版 小學館 (1985).
18. 金在佶：原色天然藥物大辭典，南山堂，서울(1984).
19. Harris, E.L.V. and Angal, S.: *Protein Purification Methods*, Oxford University Press, pp. 154-157 (1989).
20. Kohda, H., Takeda, O., Tanimoto, T., Kanda, N. and Tanaka, A.: *生藥學雜誌* 41, 341 (1987).
21. Kato, K., Nakayama, K., Mizota, M., Miwa, I. and Okuda, J.: *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1540 (1991).
22. Rosler, K.H.A., Goodwin, R.S., Mabry, T.J., Varma, S.D. and Norris, J.: *J. Nat. Prod.* 47, 316 (1984).
23. Itogawa, H., Mihara, K. and Takeyama, K.: *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2353 (1983).
24. Masui, Y.: *化學と教育* 36, 182 (1988).
25. Haymann, S. and Kinoshita, J.H.: *J. Biol. Chem.* 240, 877 (1965).
26. Harbone, J.B. and Mabry, T.J.: *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall, London, New York, pp. 86-87 (1982).
27. Levy, G.C., Lichter, R.L. and Nelson, G.L.: *Carbone-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, pp. 33-34 (1980).