

山茱萸 種子の 毒性과 렉틴 成分

鄭時鍊 · 全瓊姬 · 朴昭映 · 章順子
嶺南大學校 附設 藥品開發研究所

Toxicity and Lectins Constituents from the Seed of *Cornus officinalis*

See Ryun Chung, Kyung Hee Jeune, So Young Park and Soon Ja Jang
Institute for Drug Research, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—The pericarp of *Cornus officinalis* is well known famous medicinal drug in oriental countries. In this work, we have tried to evaluate the toxicity and also to find the lectin components from this seed. The lyophilized seed extract was lethal to experimental mouse at 250~300 mg/kg and this toxic components were related to proteins. The lectins components were partially purified from the extract by ion exchange column chromatography. These lectins were relatively stable at temperature variations and also stable at pH 4~7. The activity of these lectins did not inhibit by common carbohydrates molecules.

Keywords—*Cornus officinalis* · Chinese herbs · toxicity · lectins · ion exchange chromatography · lectin activity

中國 古典 本草書에는 산수유에 대하여 山茱萸酸澁微溫 補腎強陰固精元 去頭面風除疝瘕 逐痺調經益肝源이라고 治寒門에 수록하고 있다.¹⁾ 漢藥材 山茱萸(*Corni Fructus*)는 山茱萸 나무(*Cornus officinalis*)에서 가을에 성숙하는 붉은색 열매의 씨를 제거(去心)한 것(皮肉)으로 漢方에서 滋養, 強壯, 補腎, 溫肝 등으로 용도가 광범위한 귀한 藥材이다. 그러나 種子는 일반적으로 有毒하다하여 어렵게 씨를 제거하고 果肉(또는 皮肉)만을 藥用으로 한다. 하지만 그 毒性이 어떤 것인지, 어느 정도인지는 알려진 바 없어 이를 과학적으로 밝혀 볼 필요가 있었다. 한편, 본 대학 生藥學 교실에서 십수년간의 렉틴 성분 검색 결과 유의한 함량으로 판정되어진 대상중에 山茱萸 종자가 해당되어 이로부터 독성 단백질에 속하는 렉틴 성분을 연구하여 봄이 신의약품 개발에 기여하는 기초가 되리라는 생각에서 이 실험을 시도하였다.

렉틴에 대한 연구는 지금부터 약 1세기 전 1888년 Stillmark가 피마자(*Ricinus communis*)의 추출물이 적혈구를 응집시킨다는 사실을 발견한 것으로부터 시작되었다.²⁾ 처음에 이 물질은 식물체로부터 발견한 적혈구 응집성 물질이라하여 phytohemagglutinin, hemagglutinin, protectin 등으로 불려져 왔으며, 1954년 Boyd와 Shapleigh는 이 물질이 적혈구뿐만 아니라 lymphocyte, fibroblast, spermatozoa, bacteria, fungi 등의 세포도 응집시킬수 있다는 특이성을 근거로, 라틴어 *legere*(=to pick or choose)로부터 렉틴이란 용어를 창안하였다.^{3,4)}

최근 Goldstein 등은 렉틴을 “당과 결합하는 단백질 또는 당단백질로서, 면역학적 경로에 의해서 생기는 물질이 아니면서 적혈구 세포를 응집시키고 당화합물을 침전시키며, 적어도 두개 이상의 당과의 결합부위(sugar binding site)를 갖는 것”으로 정의하였다.⁵⁻⁸⁾ 렉틴의 특이 당분자

와의 결합에 의한 응집은 일반적으로 monosaccharide에 의해서 저해되나 몇몇의 경우 di-, tri-, 심지어 polysaccharide가 필요한 경우도 있다.

렉틴은 분자량, subunit, 당 특이성 등 생물·물리·화학적 성질이 다양하며 여러가지 독특한 생리활성을 가진 것으로 보고되고 있다. 그 중 흥미있는 몇가지를 살펴보면 첫째로, 림프구 자극 분열효과를 들 수 있다. 이들 렉틴은 T cell 자극분열 렉틴이 대부분이나 B cell을 자극분열하는 렉틴도 보고되고 있다.⁹⁾ 둘째로, 항종양 효과를 들 수 있다. 렉틴은 어떤 종류의 암세포를 응집시키는 능력을 가지고 있다. 셋째는, 인슈린 유사 효과라고 할 수 있다.¹⁰⁾ 이런 다양한 렉틴의 생물·물리·화학적 특성은 렉틴이 당과 특이적으로 결합하며, 적어도 두개 이상의 당과의 결합부위를 가지고 있다는 성질에 기인하며, 이와같은 성질을 이용하여 당 화합물의 분리 및 구조 연구, 세포막 연구, 세포 분리, 미생물의 확인, blood typing, drug carrier, immune disease 및 cancer의 진단과 연구는 물론 임상적 응용에 까지 시도되고 있다.^{11,12)}

한편 이 물질의 고부가가치는 최근 Sigma Chemical Catalog¹³⁾을 살펴보면 약 300종의 렉틴이 상품화되어 있으며 이들은 매우 값이 비싸 앞으로 이 성분의 개발 필요성이 강조됨을 입증할 수 있다.

본 실험에서는 山茱萸 종자를 대상으로 그 독성을 밝혀 분과 아울러 렉틴 성분에 대한 연구를 수행하여 흥미있는 결과를 얻었다.

실험재료 및 방법

실험 재료—Cornaceae(층층나무과)에 속하는 山茱萸나무(*Cornus officinalis*)의 성숙한 열매에서 과육을 제거한 종자를 건조시켜 실험재료로 사용하였다.

시약—DEAE-Sephadex A-50은 Pharmacia Fine Chemicals(Uppsala, Sweden)에서, Tris(Tris-hydroxy-methylaminoethane), N-acetylneuraminic acid, D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine 등 30여종의 당은 Sigma Chemical Co. (St.

Louis, Mo., USA)에서, trypsin 및 electrophoresis에 사용된 각종 시약은 Wako, Hayashi, Junsei, Katayama, Fluka, Dojin 등의 특급시약을 사용하였다. 기타 시약은 시중에서 구입한 특급 내지 일급품을 사용하였다.

기기—본 실험에 사용된 주요 기기는 high speed centrifuge: Hitachi Kōki Co. Ltd., Japan; fraction collector: ISCO RETRIEVER II, USA; spectrophotometer: Hitachi model 200-20, Japan & Perkin Elmer, USA; electrophoresis apparatus: SJ-1016 & V-C Stabilizer SJ-1051, ATTO, Japan; freeze dryer(lyophilizer): LABCONCO, LYPH-LOCK 77530, USA 등 이었다.

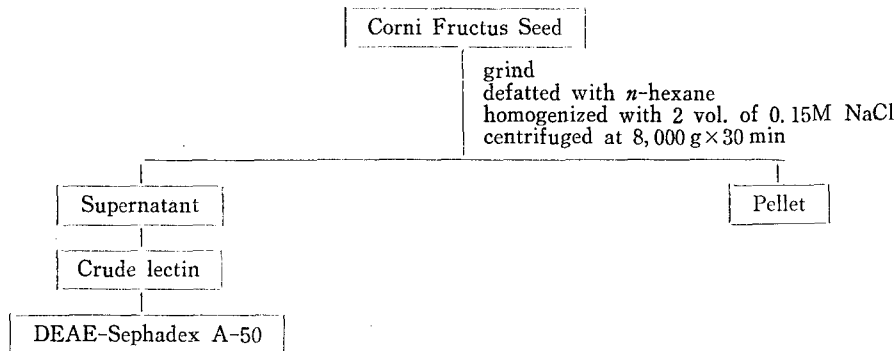
독성연구—산수유 종자를 다음 세가지 즉 1) total crude: 산수유 종자를 잘게 파쇄하여 생리 식염수로 1:2비로 추출한 것을 동결건조한 분말, 2) defatted crude: 산수유 종자를 잘게 파쇄하여 hexane 처리하여 지방을 제거하고 생리 식염수로 1:2비로 추출한 것을 동결건조한 분말, 3) boiled crude: 산수유 종자를 잘게 파쇄하여 증류수에 1:2비로 넣고 100°C에서 2시간 끓인 후 흡인여과한 것을 동결건조한 분말로 자기 다르게 처리하여 얻은 시료를 mouse를 대상으로 비교 실험하였다.

위의 각 시료에 대해 각각 6마리의 mouse를 대상으로, 먼저 150 mg/kg을 복강주사하고 점차 그 양을 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 500mg/kg으로 증가시키면서 나타나는 독성을 조사하였다.

렉틴 성분의 분리 및 정제: 렉틴의 분리 및 정제는 Scheme I과 같은 방법으로 시행하였다.

Crude extract—건조한 산수유 종자를 잘게 파쇄하여, n-hexane을 가해 24시간 방치하여 지방 성분을 제거한 후, 0.15M NaCl로 렉틴 성분을 추출하고 원심분리한 다음 그 상층액을 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에서 투석시켜 crude extract로 하였다.

Ion exchange column chromatography—Crude extract를 anion exchanger인 DEAE-Sephadex A-50 column으로 정제하였다. 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 미리 평형시켜 둔 DEAE-Sephadex A-50 column(1.5×20 cm)에 crude



Scheme I. The purification procedure of the lectins from the seed of Corni Fructus

lectin을 주입하고, 같은 buffer로 씻어낸 다음 stepwise salt gradient로 유출시켰다.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의한 순도 검정—각 정제 단계에서 얻은 렉틴 분획의 순도를 검정하기 위하여 일정 농도로 만든 각 분획을 Davis¹⁴⁾의 방법에 따라 pH 8.3에서 PAGE(polyacrylamide disc gel electrophoresis)를 실시하였다. 이때 10.0% polyacrylamide gel을 사용하였으며, 전류는 1 mA/tube로 시작하여 tracking dye(0.001% bromophenol blue)가 stacking gel을 통과하는 순간부터 4 mA/tube로 하여 완결시켰다. 단백질부위는 0.1% coomassie brilliant blue R-250 solution(10% acetic acid: 0.25% coomassie brilliant blue R-250 in 95% ethanol=1:1)으로 염색하였다.

렉틴의 생물·물리·화학적 특성

적혈구 응집력—렉틴의 적혈구응집력은 microtiter plate(Nunc Co.)에서 시료(50 μl)를 2배수 희석법으로 희석한 후, 3% 적혈구 용액(50 μl)을 가하여 Chung 등¹⁵⁻¹⁷⁾의 방법에 따라 실시하였다. 실험에 사용한 사람의 혈액은 생리식염수로 세척하여 3% 적혈구를 조제 사용하였다. 또한 각종 적혈구의 trypsin 처리는 Sharon과 Lis⁴⁾의 방법으로 실시하였다. 즉, 세척한 4% 적혈구 용액을 1% trypsin용액(10:1)으로 상온에서 1시간동안 반응시킨 후, 생리식염수로 세척한 다음 3% 용액으로 만들어 사용하였다. 적혈구 응집력(HU: hemagglutinating unit)은 세포응집력을 나타내는 렉틴의 최대 희석배수의 역수로 나타내었다.

pH의 영향—Crude lectin을 pH 2.0~10.8 범

위의 buffer로 4°C에서 2시간동안 투석시킨 후 남아있는 렉틴 활성을 조사하였다. 이때 buffer는 25 mM KCl-HCl(pH 2.0), 25 mM Glycine-HCl(pH 3.2), 25 mM Citrate(pH 4.0, pH 5.0), 25 mM Phosphate(pH 6.5), 25 mM Tris-HCl(pH 7.4, pH 8.8), 25 mM Carbonate buffer(pH 9.6, pH 10.8) 등을 사용하였다.

당 특이성—적혈구 응집력 저해효과는 Ravindranath 등¹⁸⁾의 방법을 응용하여 4HU(hemagglutinating unit)의 응집력을 나타내는 산수유 렉틴 용액으로 실시하였다. N-acetylneuraminic acid, N-acetyl-D-glucosamine, D-glucose, D-galactose 등 30종의 당용액(200 mM, 33 μl)을 microtiter plate에서 2배수 희석법으로 희석한 후, 각 well에 산수유 렉틴 시료용액(33 μl)을 가하고 다시 3% 적혈구 용액(33 μl)을 넣었다. 당에 의한 적혈구 응집력 저해효과는 4HU 적혈구 응집력을 완전히 저해할 수 있는 최소한의 당농도로 표시하였다.

실험결과 및 고찰

산수유 종자의 독성—산수유 종자의 세가지 시료(total, defatted, boiled crude)를 mouse의 복강내에 투여하고 나타나는 중독현상을 조사하였다. Table I의 결과에 나타난 바와 같이 total crude와 defatted crude에서는 각각 300 mg/kg, 250 mg/kg에서 치사하였으므로 산수유 종자는 독·극약의 범주에는 들지 않지만 안구돌출 등의 부작용과 함께 치사 현상이 일어나 독성이 인정되었다. 이 독성은 끊임으로써 상당히 감소(치사

Table I. Toxicity of Corni Fructus seed in three different extracts

Sample	Amounts administered [mg/kg]	Results*
Total crude	150	6/6
	200	6/6
	250	5/6
	300	2/6
	500	0/6
Defatted crude	150	6/6
	200	5/6
	250	1/6
	300	1/6
	500	0/6
Boiled crude	150	6/6
	200	6/6
	250	6/6
	300	4/6
	500	0/6

* Numbers in parentheses mean animals alive from 6 experimental animals. Mouse weight, 33~36g.

량 500 mg/kg) 되므로 이는 단백질성 물질과 관련성이 있는 것으로 생각된다.

산수유 종자 중의 렉틴성분 :

Crude lectin의 분리—산수유 종자의 지방을 제거한 crude extract와 제거하지 않은 total crude의 렉틴 활성을 비교한 결과 defatted crude의 활성이 조금 높았다. 또한 가을에 채취한 종자를 다음해 여름에 렉틴 활성을 재확인한 결과 활성이 더 높았다(Table II). 이것은 새로 수확한 비

교적 신선한 종자에는 지방이 많아 상대적으로 렉틴활성이 낮고, 한편 일년이상 경과된 종자는 기름성분이 감소하면서 렉틴활성이 증가함을 나타내므로 휘발성 지방이 시간이 경과함에 따라 소실된 것에 기인하는 것으로 추정된다.

산수유 종자의 지방을 제거하고 생리식염수로 추출한 crude extract를 salt fractionation과 organic solvent fractionation을 시도하였으나 렉틴은 효과적으로 분리되지 않았으므로 crude extract 상태로 바로 이온교환 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

Crude lectin의 정제 및 순도 검정—Crude lectin을 anion exchanger인 DEAE-Sephadex A-50 column으로 정제하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에서 stepwise NaCl gradient로 유출시켰을 때 0.1M, 0.2M, 0.3M 분획에서 렉틴활성이 나타났으며 그 중 0.3M 분획이 가장 활성이 컸다. 산수유 종자 렉틴의 여러 정제단계에서 얻은 각 분획을 polyacrylamide disc gel electrophoresis(10% PAGE, pH 8.3)한 결과, 이들 렉틴은 정제도가 상당히 낮았다. 이것은 산수유 종자 중의 단백질 함량이 매우 적었거나, 렉틴의 당단백 비율에 당의 함량이 단백질보다 상대적으로 많았거나, 또는 함유된 단백질의 분자량이 작았기 때문인 것으로 추정된다.

렉틴의 적혈구 응집력—Crude lectin의 활성은 Table II와 같았다. 산수유 종자 렉틴의 정제 분획인 DEAE-Sephadex A-50 0.1M, 0.2M, 0.3M 분획을 사람의 적혈구로 활성을 조사하였다. 각 분획은 사람의 A, B, O, AB형 혈액 모두에 대해

Table II. Blood group specificity and lectin activity of Corni Fructus seed lectin in different sample preparations(Numbers are hemagglutinating unit)

Samples	Blood type			
	A	B	AB	O
Total crude (1)	512	512	1,024	512
Total crude (2)	1,024	1,024	2,048	2,048
Total crude(trypsinized cell)	4,096	4,096	4,096	4,096
Defatted crude (ether)	256	32	32	32
Defatted crude (n-hexane)	1,024	512	1,024	1,024
Defatted crude (trypsinized)	2,048	8,192	4,096	2,048

(1) collected in autumn and tested in same autumn.

(2) collected in autumn and tested in next summer.

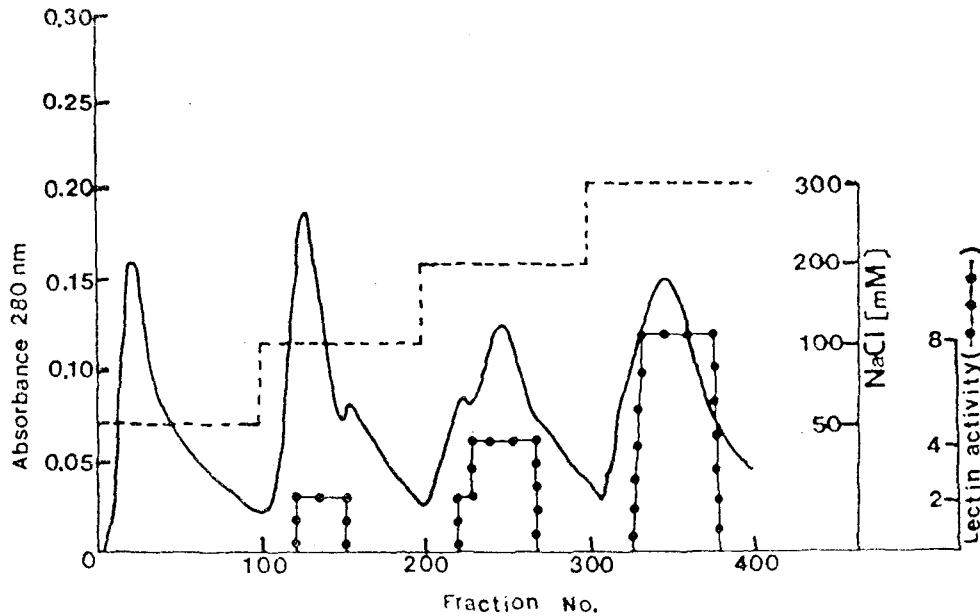


Fig. 1. Elution profiles of the lectins From Corni Fructus seed extract on DEAE-Sephadex A-50 column Column, 1.5×20cm; Eluent, 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) with a step-wise salt gradient. Flow rate, 40ml/hr; Fraction vol., 8ml/tube; Absorbance at 280nm, —; Lectin activity, - - -; Salt gradient,.....

Table III. Effects of pH on hemagglutinating activity of Corni Fructus seed lectin

Buffer	pH	Hemagglutinating activity[HU]
25mM KCl-HCl buffer	2.0	4
25mM Glycine-HCl buffer	3.2	4
25mM Citrate buffer	4.0	16
25mM Citrate buffer	5.0	16
25mM Phosphate buffer	6.5	16
25mM Tris-HCl buffer	7.4	16
25mM Tris-HCl buffer	8.8	0
25mM Carbonate buffer	9.6	0
25mM Carbonate buffer	10.8	0

활성을 나타내었다. Crude lectin에 대하여 trypsin 처리한 혈구로 활성을 조사한 결과 각각의 활성은 대체로 증가하였다.

pH의 영향—pH에 따른 산수유 종자 렉틴의 적혈구 응집력은 Table III과 같았는바, 약산성과 중성(pH 4.0~7.4)의 범위에서는 비교적 안정한 것으로 나타났으며 염기성 범위에서는 활성이 거의 소실되었다.

당 특이성—산수유 렉틴의 당에 의한 적혈구 응집 저해 현상을 조사한 결과 시험에 사용한

N-acetylneuraminic acid, N-acetyl-D-glucosamine, L-fucose, D-arabinose, D-galactose, L-arabinose, D-galacturonic acid, D-glucose, D-xylose, D-glucuronic acid, L-sorbose, L-xylose, L-lyxose, D-galactosamine, D-glucosamine, L-rhamnose, D-mannose 등 30종의 당에서는 적혈구 응집현상이 저해된 것이 없었다. 그러므로 산수유 종자중의 렉틴은 일반적인 monosaccharide에 대해서는 응집이 저해되지 않고 특수한 di-, tri-, 혹은 polysaccharide에 의해 저해될 것으로 추정된다.

결 론

山茱萸(*Cornus officinalis*) 종자의 독성을 밝혀 보고, 또한 이로부터 새로운 렉틴을 분리하고 부분 정제하여 몇가지 특성을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 山茱萸 종자는 毒·劇藥은 아니나 안구 돌출과 같은 부작용이 일어나며 250~300 mg/kg 투여시 치사됨으로 毒性이 있음을 알 수 있었다. 또 이 독은 단백질성 물질과 관련이 있다.

2) 山茱萸 종자로 부터 지방을 제거하고 생리 식염수로 추출한 crude lectin을 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography로 정제한 결과 0.1M, 0.2M, 0.3M NaCl 유출 분획에서 렉틴 활성이 나타났으며 이 중 0.3M 분획의 활성이 가장 강하였다.

3) 이 렉틴 활성은 pH 4~7까지의 약산성 및 중성에서는 안정하였고 온도 변화에는 상당히 안정한 것으로 나타났다.

4) 이 렉틴은 일반적인 당류에 대해서는 적혈구 응집력이 저해되지 않았다.

感謝의 말씀—이 研究는 大邱市藥 漢藥委員會가 嶺南大學校 附設 藥品開發研究所에 支援한 研究費에 의하여 遂行한 것으로 이에 感謝드리는 바입니다.

〈1993년 4월 15일 접수 : 5월 6일 수리〉

참 고 문 헌

1. 李 樞 : 本草, 醫學入門, 第七卷, 百二十九面 (1818).
2. Sharon, N. and Lis, H.: *Trends in Biochem. Sci.* 12, 488 (1987).
3. Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J.: Properties, function and application in biology and medicine. in *The Lectin*. Academic Press, New York, pp.1-600 (1986).
4. Sharon, N. and Lis, H.: *Science* 177, 949 (1972).
5. Dixon, H.B.F.: *Nature* 292, 192 (1981).
6. Goldstein, I.J. and Hughes, R.C., Monsigny, M., Csawa, T. and Sharon, N.: *Nature* 285, 66 (1980).
7. Kocourek, J. and Horejisi, V.: *Nature* 290, 188 (1981).
8. Nomenclature Committee of IUB-IUPAC joint commission and biochemical nomenclature: *J. Biol. Chem.* 256, 12 (1981).
9. Campbell, P. Hartman, A.L. and Abel, C.A.: *Immunology* 45, 155 (1982).
10. Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.* 248, 3528 (1973).
11. Chung, S.R.: Marine animal lectins (XII). Studies on bioactive marine natural substance, lectins, *Proceedings of International Congress of New Drug Development*, The Pharmaceutical Society of Korea, pp.345-356 (1991).
12. Chung, S.R.: *Arch. Drug Res.* 2, 212 (1992).
13. Sigma: Lectins, Sigma Chemical Co. MO., USA, pp.1708-1738 (1993).
14. Davis, B.J.: *Ann N.Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964).
15. Chung, S.R., Jeune-Chung, K.H. and Kim, K.A.: *Arch. Pharm. Res.* 3, 31 (1980).
16. Chung, S.R., Hong, S.S. and Jeune-Chung, K.H.: *Yakhak Hoeji* 27, 221 (1983).
17. Chung, S.R., Kim, J.H., Suh, Y.A. and Jeune-Chung, K.H.: *Arch. Pharm. Res.* 9, 201 (1986).
18. Ravindranath, M.H., Higa, H.H., Cooper, E.L. and Paulson, J.C.: *J. Biol. Chem.* 260, 8850 (1985).