

## 수종의 생약이 Bovine Adrenal Tyrosine Hydroxylase 및 Dopamine $\beta$ -Hydroxylase 활성에 미치는 영향 (II)<sup>1)</sup>

황윤정 · 이승호 · 김학성 · 이경순 · 노재섭 · 이명구  
충북대학교 약학대학

Effects of Herbal Drugs on Bovine Adrenal Tyrosine Hydroxylase and Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase (II)<sup>1)</sup>

Yoon Jeong Hwang, Seung Ho Lee, Hack Seang Kim,  
Kyong Soon Lee, Jai Seup Ro and Myung Koo Lee  
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

**Abstract**—MeOH extracts of sixteen herbal drugs were tested for the effects on bovine adrenal tyrosine hydroxylase and dopamine  $\beta$ -hydroxylase. The MeOH extracts of *Paeoniae Radix* and *Pinelliae Tuber* showed 65% inhibition on the tyrosine hydroxylase activity at the concentration of 100  $\mu$ g in the enzyme reaction mixture. Those of *Paeoniae Radix*, *Pinelliae Tuber* and *Evodiae Fructus* showed 87, 84 and 62%, respectively, on the dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity.

**Keywords**—Bovine adrenal tyrosine hydroxylase · dopamine  $\beta$ -hydroxylase · *Paeoniae Radix* · *Pinelliae Tuber* · *Evodiae Fructus*

Tyrosine 수산화효소(TH, tyrosine hydroxylase, EC 1.14.16.2)는 보호소 tetrahydrobiopterin의 존재하에 tyrosine에서 L-DOPA의 생합성을 촉매하는, catecholamine 생합성 과정의 제 1 단계를 촉매하는 효소이다.<sup>2)</sup> TH가 그의 생합성을 조절하고 있는 catecholamine은 고혈압, 심장병 등의 순환기질환, Parkinson병, Dementia 등의 신경질환, 정신분열증, 우울증 등의 정신질환 등 광범위한 질환과 관련이 있는 것으로 추정되기 때문에 TH의 병태생화학적 변화가 주목을 받고 있다. 또한 dopamine  $\beta$ -수산화효소(DBH, dopamine  $\beta$ -hydroxylase, EC 1.14.17.1)는 dopamine에서 norepinephrine의 생합성을 촉매하는 효소이다.<sup>3)</sup>

현재, 반응되고 있는 하수오의 15종의 생약(Table I)에 대한 주요 활성성분은 알려져 있으

나, 이들 생약의 활성성분들이 TH 및 DBH 활성에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 진행되지 않았다.

따라서, 본 연구는 새로운 활성성분을 검색하기 위하여, 16종의 생약의 MeOH 엑스가 bovine adrenal TH 및 DBH 활성(*in vitro*)에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

### 실험 방법

**실험재료**—활성검색을 위하여 사용한 하수오의 15종의 생약은 시중에서 구입하였으며, 감정 후 사용하였다.

**표준엑스의 제조**—각각의 생약시료(50 g)를 세 절한 후, MeOH을 가하여 수욕상에서 3회 반복 추출한 다음 은시 여과하였다. 여과액을 감

Table I. Medicinal plants selected for experiments

Herbal drugs	Weight extracted* (g) (yields, %)
하수오 (Polygoni multiflori Radix, Polygonaceae)	4.3 (8.6)
지황 (Rehmaniae Radix, Scrophulariaceae)	4.1 (8.2)
길경 (Platycodi Radix, Campanulaceae)	6.3 (12.6)
대조 (Zizyphi Fructus, Rhamnaceae)	2.8 (5.8)
부자 (Aconiti Tuber, Ranunculaceae)	2.5 (5.0)
오미자 (Schizandrae Fructus, Schizandriaceae)	2.9 (5.8)
복령 (Hoelen, Polyporaceae)	0.8 (1.6)
방풍 (Sileris Radix, Umbelliferae)	3.2 (6.4)
독활 (Aralia cordatae Radix, Araliaceae)	3.4 (6.8)
오수유 (Evodiae Fructus, Rutaceae)	1.6 (3.2)
강활 (Angelicae Koreanae Radix, Umbelliferae)	2.7 (5.4)
반하 (Pinelliae Tuber, Araceae)	0.6 (1.2)
작약 (Paeoniae Radix, Ranunculaceae)	7.3 (14.6)
계지 (Cinnamomi Ramulus, Lauraceae)	1.7 (3.4)
황기 (Astragali Radix, Leguminosae)	5.1 (10.2)
황금 (Scutellariae Radix, Labiatae)	5.6 (11.2)

\* : Herbal drugs, 50 g were used for MeOH extract.

압 건조시킨 후 시료엑스(MeOH 엑스)로 하였으며, 필요시 동결건조하였다.

**Bovine adrenal TH**—TH 시료는 bovine adrenal을 사용, Joh 등<sup>4)</sup>의 방법을 이용하여 부분 정제하여 사용하였다. Bovine adrenal medulla을 잘게 자른 후, 5 mM pot. phosphate buffer (pH 7.0)을 가하여 homogenize 한다음 원심분리 한다. 상등액을 경사한후 침전물에 sod. phosphate buffer (10 mM, pH 7.0)을 가하여 용해시킨다. 이 용액에 trypsin (5 mg/ml/100 ml)을 가한다음 원심분리 한다. 상등액에 포화 ammonium sulfate을 가한 다음(80% 용액), 원심분리 한다. Pellet는 pot. phosphate buffer (5 mM, pH 6.5)을 사용, dialyze하여 효소시료로 사용하였다.

**Bovine adrenal DBH**—DBH 시료는 bovine adrenal을 부분 정제하여 사용하였다.<sup>4)</sup> Bovine adrenal medulla을 잘게 자른 후, 4배량의 5 mM pot. phosphate buffer (pH 6.5)을 사용하여 homogenize 한다음 원심분리 한다(1200 g, 10 분). 상등액을 취하여 다시 원심분리 한다음 (105,000 g, 15분), 상등액에 동량의 포화

ammonium sulfate을 가하고, 원심분리 한다. 상등액을 경사한 다음 pellet에 5 mM pot. phosphate buffer (pH 6.5)을 가하여 용해시킨 다음, dialyze 하여 효소시료로 하였다.

시료엑스의 전처치—엑스(100 µg, 증류수 또는 DMSO에 용해하여 사용)를 효소반응액중에 가한 다음 효소 반응후 효소활성을 측정하였다. 효소활성에 미치는 엑스의 영향은 대조군과 비교하여 %로 나타내었다.

**TH 활성 측정**—TH 활성 측정은 Nagatsu 등<sup>5)</sup>의 방법을 보정하여 사용하였다. 효소 반응액은 1.5 M NaOAc (pH 6.0) 75 µl, 2 mg/ml catalase 50 µl, 10 mM L-tyrosine 50 µl, 10 mM DL-6-methyltetrahydropterin 25 µl 및 효소시료 50 µl 이다. 37°C에서 10분간 효소반응후 3.0 M HClO<sub>4</sub> 100 µl 및 10 µM α-methyldopa(내부표준) 100 µl 를 가하여 반응을 정지시킨 다음, 반응액에 5 ml disodium EDTA (2%), 1.5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.35 M)을 가하고 N-NaOH을 사용하여 pH 8.4~8.6 로 조절한다. 반응액을 alumina column에 통과시킨 다음, 흡착된 반응 생성물을 0.5 M HCl 300 µl를 사용하여 용출시킨다. 용출액 50 µl를

HPLC-전기화학검출기에 주입, L-DOPA의 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다.

**DBH 활성 측정**—DBH 활성 측정은 Lee 등<sup>6)</sup>의 방법을 보정하여 사용하였다. 효소반응액은 1.5 M NaOAc buffer (pH 5.0) 50  $\mu$ l, 10  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 20  $\mu$ l, 30 mM ascorbic acid 20  $\mu$ l, 0.2 M disodium fumarate 20  $\mu$ l, catalase (1300 unit) 30  $\mu$ l, 4 mM pargyline 10  $\mu$ l, 80 mM dopamine 20  $\mu$ l, 0.1 M N-ethylmaleimide 30  $\mu$ l 및 효소 시료 50  $\mu$ l이다. 37°C에서 15분간 효소반응후 0.5 M trichloroacetic acid 700  $\mu$ l 및 4 nmol/ml epinephrine(내부표준) 100  $\mu$ l을 가한 후 원심분리한다. 상등액(100  $\mu$ l)을 Toyopak IC-SP M cartridge(cation exchanger)에 주입하여 전처리한 다음, 흡착한 monoamine을 acetonitrile—0.6 M KCl 혼액으로 용출한다. 용출액에 diphenylethylenediamine 용액을 가하여 형광 유도체화

한 다음, 최종 반응액 100  $\mu$ l를 HPLC-형광검출기에 주입, norepinephrine 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다.

**단백질 함량 측정**—효소 활성은 각 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였다. 단백질 함량은 bovine albumin을 사용하여 Lowry법<sup>7)</sup>에 의하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에 사용한 생약에 대한 주성분과, 그에 따른 약리작용은 대부분 알려져 있으나, catecholamine 생합성의 제 1 단계 효소인 TH 및 norepinephrine 생합성 효소인 DBH 활성에 미치는 영향에 대한 검토는 아직 보고되지 않았다. 따라서, 새로운 활성성분을 검색할 목적으로 *in vitro* TH 및 DBH 활성에 미치는 영향을

Table II. Effect of herbal drugs on tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH) activities

Herbal drugs	TH activity <sup>1)</sup>	DBH activity <sup>1)</sup>
	(nmol/min/mg protein)	(nmol/min/mg protein)
Drug treatment (100 $\mu$ g/Reaction mixture)		
Control	3.27 $\pm$ 0.14 (100)	220 $\pm$ 11.8 (100)
Polygoni multiflori Radix	4.48 $\pm$ 0.18 (138)***	223 $\pm$ 12.3 (101)
Rehmaniae Radix	3.77 $\pm$ 0.16 (115)*	194 $\pm$ 8.4 (88.6)
Platycodi Radix	3.59 $\pm$ 0.10 (109)	179 $\pm$ 7.1 (81.4)*
Zizyphi Fructus	3.19 $\pm$ 0.12 (97.7)	198 $\pm$ 9.8 (90.2)
Aconiti Tuber	2.72 $\pm$ 0.11 (83.3)*	188 $\pm$ 8.5 (85.7)
Schizandrae Fructus	2.61 $\pm$ 0.06 (79.9)**	172 $\pm$ 6.2 (78.5)*
Hoelen	2.52 $\pm$ 0.14 (77.1)**	127 $\pm$ 8.7 (58.1)***
Sileris Radix	2.15 $\pm$ 0.15 (65.9)***	179 $\pm$ 8.1 (81.3)**
Aralia cordatae Radix	1.87 $\pm$ 0.12 (57.4)***	147 $\pm$ 7.6 (66.7)***
Evodiae Fructus	1.66 $\pm$ 0.09 (50.8)***	82.5 $\pm$ 2.5 (37.5)***
Angelicae Koreanae Radix	1.41 $\pm$ 0.11 (43.3)***	192 $\pm$ 5.4 (87.5)
Pinelliae Tuber	1.13 $\pm$ 0.04 (34.7)***	34.1 $\pm$ 2.1 (15.5)***
Paeoniae Radix	1.13 $\pm$ 0.11 (34.5)***	28.3 $\pm$ 1.2 (12.9)***
Cinnamomi Ramulus	0.86 $\pm$ 0.13 (26.4)***	169 $\pm$ 6.8 (77.1)**
Astragali Radix	0.33 $\pm$ 0.11 (10.1)***	185 $\pm$ 8.5 (84.3)*
Scutellariae Radix	0.16 $\pm$ 0.08 (5.3)***	11.1 $\pm$ 1.2 (5.0)***

1) TH activity of control (3.27 nmol/min/mg/protein) and DBH activity of the control (220 nmol/min/mg protein) were taken as 100. The percent of control activity was shown in parenthesis. The data were expressed as means $\pm$ S.E. for five experiments. Significantly different from the corresponding control value: \*. p<0.05; \*\*. p<0.01; \*\*\*. p<0.001 (Student's t test).

검토하였다.

생약은 각각 표준엑스(MeOH 엑스)를 제조하여 검색의 시료로 하였으며, 엑스의 수득율은 1.2~14.6%이었다(Table I). TH 및 DBH 효소시료는 bovine adrenal을 부분 정제하여 사용하였다.

각각의 생약엑스를 사용하여 TH 및 DBH 활성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table II에 나타내었다. TH 활성에 대하여 강한 억제작용(strong inhibition, 대조군의 35% 이하)을 나타낸 생약은 계지, 작약, 반하이며, 중간 정도의 억제작용(weak inhibition, 대조군의 40~70%)을 나타낸 생약은 강활, 오수유, 독활, 방풍이며, 약한 억제작용(weak inhibition)을 나타낸 생약은 복령, 오미자, 부자(대조군의 75~85%)이었다. 또한 이들 생약 엑스에 대하여 DBH 활성에 미치는 영향에 대하여 검토한 결과, 작약, 반하, 오수유는 강한 억제작용을, 길경, 오미자, 방풍, 계지, 황기는 약한 억제작용을 나타내었다. 그러나 황기, 황금에 의한 TH 활성 및 황금에 의한 DBH 활성의 매우 강한 억제작용은 독성작용으로 사료된다. 또한, 지황 및 하수오는 TH 활성을 약간 증가시켰다.

따라서 활성이 나타난 생약에 대하여 생리활성 성분을 추적, 분리하고, 이들 활성성분을 이

용한 효소화학적 작용기전의 연구 및 animal model에 적용한 연구가 요구된다.

감사의 말씀—본 연구는 1992~1993년(1차년도) 과학기술처 선도기술개발사업의 연구비로 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

〈1994년 2월 16일 접수 : 3월 3일 수리〉

## 참 고 문 헌

1. 김학성, 이승호, 이경순, 노재철, 오기완, 이명구 : 약학논문집(충북대학교 약학대학) 8, 39 (1993).
2. Nagatsu, T., Levitt, M. and Udenfriend, S.: *J. Biol. Chem.* 239, 2910 (1964).
3. Friedman, S. and Kaufman, S.: *J. Biol. Chem.* 240, 4763 (1965).
4. Joh, T.H. and Ross, M.E.: Preparation of catecholamine synthesizing enzymes as immunogens for immunohistochemistry. In *Immunohistochemistry* (ed. Cuellar, A.C.) IERO, pp.121~138 (1983).
5. Nagatsu, T., Oka, K. and Kato, T.: *J. Chromatogr.* 163, 247 (1979).
6. Lee, M., Nohta, H. and Ohkura, Y.: *J. Chromatogr.* 421, 237 (1987).
7. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).