

현호색의 Acetylcholinesterase 활성 저해 성분 및 그 작용기전

황세영, 장영표, 변순정, 전미희¹, 김영중*

서울대학교 약학대학, ¹보건복지부 중앙약사 심의위원회

An Acetylcholinesterase Inhibitor Isolated from Corydalis Tuber and Its Mode of Action

Se Young Hwang, Young Pyo Chang, Soon Jung Byun,
Mee Hee Jeon¹ and Young Choong Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; and
¹The Central Pharmaceutical Affairs Council, Government Complex II, Kwachun-City,
Kyungkido 427-760, Korea

Abstract - In the course of searching for acetylcholinesterase inhibitors from crude drugs, it was found that total MeOH extract of Corydalis Tuber showed significant inhibitory effect on acetylcholinesterase. To isolate acetylcholinesterase inhibitors from Corydalis Tuber, total MeOH extract of the crude drug was subjected to activity guided fractionation. The MeOH extract was suspended in water and fractionated with methylene chloride and subjected to acid-base fractionation. Silica gel column chromatography of the basic fraction which showed significant inhibitory effect on acetylcholinesterase was carried out and 5 sub-fractions (1-5) were obtained. From subfraction 4, compound I was isolated. The structure of isolated compound I was identified by spectroscopic parameters of ¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-MS and FAB-MS. The compound I was identified as berberine. It was found from the Lineweaver-Burk plot that berberine was a reversible and specific inhibitor of acetylcholinesterase having 90% inhibitory effect at the concentration of 2.5 μM.

Key words - acetylcholinesterase; Corydalis Tuber; berberine; reversible inhibitor.

노인성 질환 중에서 최근 사회문제로까지 대두되고 있는 치매는 그 발병 원인이 주로 알츠하이머씨 병이라는 것이 알려지면서 그 치료제 개발에 선진제국은 심혈을 기울이고 있다. 알츠하이머씨 병은 뇌의 신경계, 특히 콜린성 신경계에 가장 심각한 손상이 일어나는 것으로 알려지고 있어 손상된 콜린성 신경계를 강화시킴으로써 알츠하이머씨 병을 치료하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁾ 이러한 연

구 중에서 아직까지는 acetylcholinesterase (AChE)의 저해제를 찾아 아세틸콜린의 분해를 억제시킴으로써 치매를 개선시키려는 노력이 경주되고 있다. 실제 velnacrine과 같은 AChE의 저해제는 아직 그 부작용에 관한 문제가 완전히 해결되지는 않았지만 임상에서 활발히 응용되고 있다.^{2,3)}

본 연구는 생약으로부터 AChE의 활성을 저해시키는 물질을 분리하여 이를 알츠하이머씨 병을 개선시킬 수 있는 약물의 후보 물질로 제시하고자 천연물을 검색하던 중 현호색 (*Corydalis ternata*

*교신저자 : Fax 02-888-2933

Nakai)의 MeOH 추출물이 AChE의 활성을 유의성 있게 억제시킴을 발견하고 이로부터 활성물질을 분리하고자 시도되었다.

현호색은 양귀비꽃과 (Papaveraceae)에 속하는 식물로서 들현호색 (*Corydalis ternata* Nakai) 또는 그 밖의 동속 식물의 덩이 줄기이다. 현호색의 성분으로는 corydaline, tetrahydropalmatine, protopine, dehydrocorydaline, hydrastine, berberine 등의 alkaloid가 분리 보고되었다.⁴⁾ 현호색 성분의 약리 작용으로는 corydaline의 진통 작용,⁵⁾ tetrahydropalmatine의 중추신경 억제 작용,⁶⁾ protopine의 혈소판 응집 억제 작용,^{7,8)} dehydrocorydaline의 소염 및 aldose reductase에 대한 저해 효과,⁹⁾ hydrastine의 GABAA 수용체에 대한 강력하고 선택적인 저해 효과¹⁰⁾ 등이 보고되었다. Berberine은 호흡기 자극, 일시적 저혈압 유도, tyrosine decarboxylase에 대한 저해 효과, 항균, 항진균, 항종양 작용¹¹⁾ 및 AChE에 대한 저해 활성¹²⁾이 있다고 보고되었다. 그러나 현호색의 AChE에 대한 저해 활성과 그 저해양상은 보고된 바 없어 본 연구에서는 현호색의 MeOH 추출물로부터 AChE에 대한 저해 활성을 추적해 가며 물질 분리를 시도하여 compound I을 분리, 동정하였다. 또한 이 물질의 AChE에 대한 활성 저해 양상을 밝혔다.

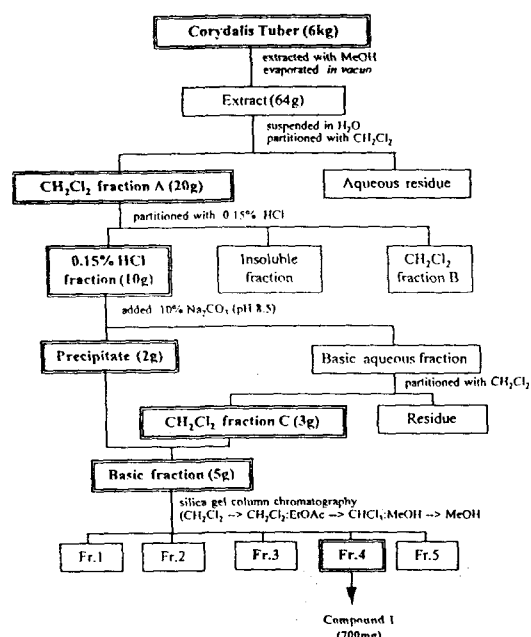
재료 및 방법

식물-본 실험에 사용된 현호색은 1995년 3월 7일에 서울 경동시장의 대우약업사에서 구입하였으며, 확장표본은 서울대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

Cholinesterase의 활성 측정-Cholinesterase의 활성은 Ellman 방법을 응용하여 측정하였다.¹³⁾

시료 제조-현호색의 각각의 분획 및 berberine은 DMSO를 (최종 농도 : 1% 미만) 첨가하여 1 mg/ml의 농도로 제조하였다.

추출 및 분획-현호색 (건조 중량 6 kg)을 초음파 장치를 이용하여 MeOH (5 l)로 6회 추출하고 그 추출물을 감압 농축하여 MeOH 엑스 (64 g)를 얻었다. MeOH 엑스를 물과 CH₂Cl₂로 분배 추출하여 CH₂Cl₂ 분획 (20 g)을 얻었다. CH₂Cl₂ 분획을 산, 알칼리 분획법에 의해 나눈 후 알칼리 분획 (5 g)을



Scheme I. The extraction and fractionation of *Corydalis* Tuber.

silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂:EtOAc (1:1) → CHCl₃:MeOH (1:1) → MeOH)를 시행하여 5개의 소분획 (1-5)으로 나누었다 (Scheme 1).

Compound I의 분리-현호색의 알칼리 분획을 silica gel column chromatography를 시행하여 얻은 5개의 소분획 중 소분획 4에서 얻은 황색의 침전물을 MeOH로 재결정하여 황색 침상 결정 700 mg을 분리하였다.

황색 침상 결정 (MeOH)

FAB MS (*m/z*) : 337 [M+H]⁺

EI-MS : *m/z* 321, 320, 306, 304, 292, 278

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃:CF₃COOD=5:1):
 δ 7.39 (s, H-1), 6.86 (s, H-4), 3.25 (t, J=6Hz, H-5), 4.87 (t, J=6Hz, H-6), 9.51 (s, H-8), 7.94 (d, J=9.0Hz, H-11), 7.87 (d, J=9.0 Hz, H-12), 8.34 (s, H-13) 6.11 (s, O-CH₂-O), 4.23 (s, 9-OCH₃), 4.10 (s, 10-OCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃:CF₃COOD=5:1):
 δ 105.46 (C-1), 120.02 (C-1a), 149.35 (C-2), 151.79 (C-3), 108.99 (C-4), 129.94 (C-4a), 27.66 (C-5), 56.96 (C-6), 144.43 (C-8), 122.27

(C-8a), 144.04 (C-9), 150.94 (C-10), 127.71 (C-11), 123.33 (C-12), 133.76 (C-12a), 120.75 (C-13), 138.85 (C-13a), 102.84 (O-CH₂-O), 62.42 (9-OCH₃), 57.23 (10-OCH₃) ppm.

통계 처리 - 통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "one way ANOVA" test로 하였다. P값이 5% 미만일 때를 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

현호색의 총 MeOH 추출물이 AChE의 활성을 유의성 있게 저해시킴을 발견하였기에 scheme 1에 따라 총 MeOH 추출물을 분획한 다음 각 분획의 AChE에 대한 저해 활성을 검색하였다 (Fig. 1). 분획된 각각의 분획의 활성을 측정한 결과 알칼리 분획이 AChE의 활성을 유의성 있게 저해시킴을 알 수 있었다. 따라서 알칼리 분획을 silica gel column chromatography를 시행하여 5개의 소분획 (1-5)으로 나누었으며, 소분획 4에서 compound I을 분리하였다.

Compound I은 UV에서 연두색 형광을 띄었으며, FAB-MS에서 분자량이 336임을 알 수 있었다.

또한 EI-MS spectrum으로부터 berberine계 화합물에서 전형적으로 나타나는 methyl anion의 split에 의해 형성된 321 (m/z) peak가 관찰되어 compound I을 berberine으로 추정할 수 있었다. 1H-NMR spectrum에서는 δ 7.39 (1H, s), 6.86 (1H, s), 7.94 (J=9.0Hz, d), 7.87 (J=9.0Hz, d) ppm의 aromatic proton에 의한 peak를 확인하였으며, methylenedioxy proton에 의한 6.11 (1H, s) ppm을 확인할 수 있었고, 4.23 (s)과 4.19 (s) ppm을 통해 2개의 methoxyl proton이 있음을 알았다. 13C-NMR spectrum에서는 methylenedioxy carbon에 의한 102.84 ppm의 peak와, methoxyl carbon에 의한 62.42, 57.23 ppm의 peak를 확인하였다. 이상의 결과로부터 compound I을 berberine으로 추정할 수 있었으며, 문헌치와 비교하였을 때 일치하였으므로 berberine으로 동정하였다 (Table I).

이와같이 분리 동정된 berberine은 AChE의 활성을 저해시키는 작용이 있다는 보고¹²⁾는 있었으나 이의 저해기전은 보고된 바 없다. 이에 berberine이 어떻게 AChE의 활성을 저해시키는 지를 알아보기 위하여 berberine의 농도에 따른 AChE 활성저

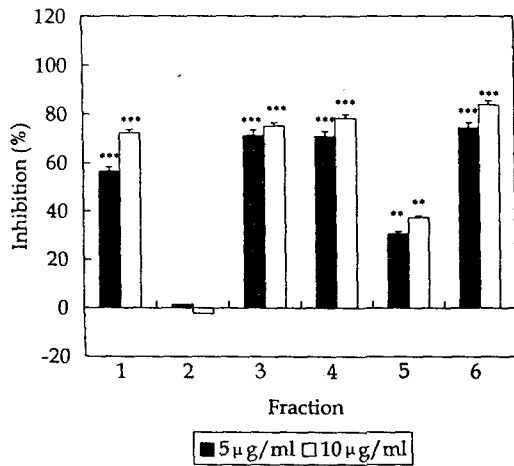


Fig. 1. The inhibitory effect of each fraction of Corydalis Tuber on AChE. The asterisk denotes data significantly different from the control (**: p < 0.01, ***: p < 0.001).

- 1: MeOH fr.
- 2: Aqueous residue
- 3: CH₂Cl₂ fr. (A)
- 4: 0.15% HCl fr.
- 5: CH₂Cl₂ fr. (B)
- 6: Basic fr.

Table I. ¹³C-NMR chemical shifts of berberine chloride and compound I

Berberine chloride δ _c	¹³ C	Compound I δ _c
105.1	C-1	105.4
119.8	C-1a	120.0
148.6	C-2	149.4
151.0	C-3	151.8
108.5	C-4	109.0
129.8	C-4a	130.0
27.2	C-5	27.7
56.3	C-6	57.0
141.1	C-8	144.4
121.8	C-8a	122.3
144.1	C-9	144.0
150.5	C-10	150.9
126.9	C-11	127.7
123.1	C-12	123.3
133.5	C-12a	133.8
120.2	C-13	120.8
138.2	C-13a	138.9
102.3	OCH ₂ O	102.8
61.9	9-OMe	62.4
56.7	10-OMe	57.2

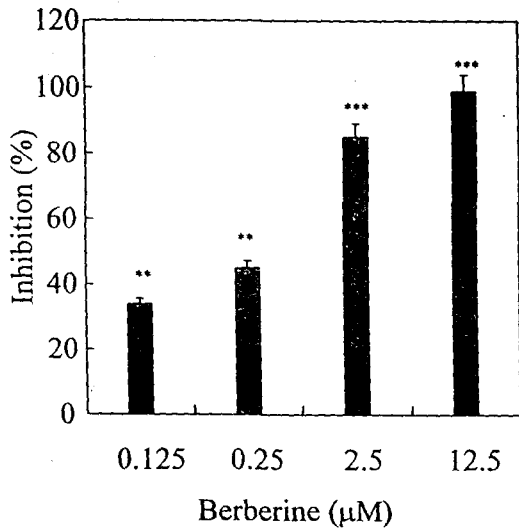


Fig. 2. The inhibitory effect of berberine on AChE. The concentration of acetylthiocholine was 0.2 mM. The asterisk denotes data significantly different from the control (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

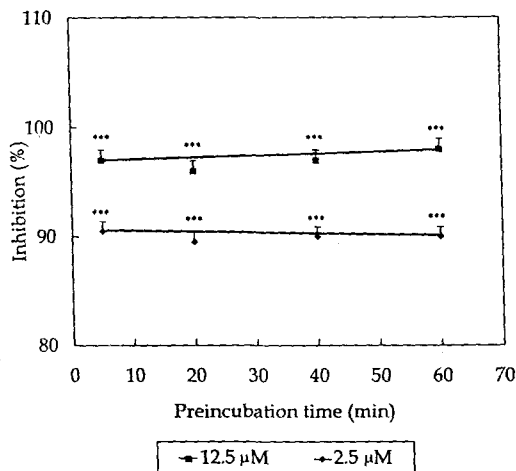


Fig. 3. Time dependency of the inhibitory effect of berberine on AChE. The Asterisk denotes data significantly different from the control (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

해 정도를 알아보았다. Berberine은 AChE의 활성을 농도의존적으로 저해시켰으며 2.5 μM 농도에서 90% 정도의 저해활성을 나타내었다(Fig. 2). Berberine의 IC_{50} 는 650 nM로 기존의 AChE 억제제인 physostigmine (0.69 nM)이나 tacrine (81 nM) 보다는 낮은 억제 활성을 나타내었다.¹⁴⁾

Table II. Inhibitory effect of berberine and reference compounds on AChE and BuChE

Compounds	AChE activity (%)	BuChE activity (%)
Berberine 2.5 μM	91	-10
^a TPPA 10 μM	-5	70
^b AAPP μM	100	-13

^aTPPA: tetraisopropyl pyrophosphoramide, specific inhibitor of nonspecific AChE.

^bAAPP: 1,5-bis(4-allyl dimethyl ammonium phenyl)pentan-3-one, specific inhibitor of AChE.

AChE 활성에 대한 berberine의 저해 양상을 알아보기 위하여 우선 berberine이 AChE 활성을 가역적으로 저해시키는 지 또는 비가역적으로 저해시키는 지를 알아보았다. Berberine을 기질을 가하기 전에 5분에서 60분 까지 반응 시간을 변화시키면서 반응시켜 반응시간에 따른 AChE 활성 억제 정도를 알아보았다. Berberine은 반응시간에 관계없이 AChE 활성을 일정하게 억제시켰으며, 농도 의존적으로 AChE의 활성을 저해시켰으므로 AChE에 가역적으로 작용하여 그 활성을 억제시킴을 밝힐 수 있었다(Fig. 3).

또한 berberine이 AChE에 특이적으로 작용하는지의 여부를 알아보기 위하여 AChE와 BuChE 각각에 대한 활성 저해 정도를 알아보았다. Berberine은 2.5 μM에서 AChE의 활성을 90% 정도 억제시킨 반면, BuChE에 대해서는 같은 조건하에서 전혀 저해 작용을 나타내지 않았다(Table II). 따라서 berberine은 AChE에 대해 선택적으로 작용함을 알 수 있었다. Berberine은 Lineweaver-Burk plot에서 K_m 은 일정하게 유지시키거나 V_{max} 는 농도 의존적으로 감소시켜 AChE의 활성을 비경쟁적으로 저해시킴을 알 수 있었다(Fig. 4). 이는 기질과 AChE가 결합 후 형성된 acetyl화된 AChE의 또 다른 결합 부위인 anionic site에 berberine의 N^+ 가 이온 결합을 했거나 AChE의 hydrophobic region에 berberine이 hydrophobic interaction을 하였기 때문인 것으로 추측할 수 있다.

결론

현호색에서 분리한 compound I을 berberine

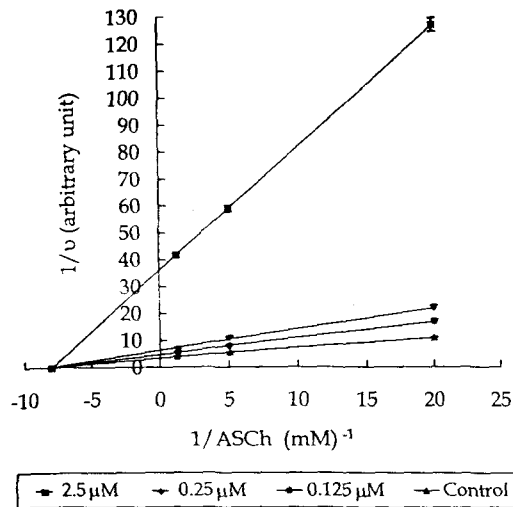


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of 1/v vs 1/ASCh in the absence and presence of berberine. ASCh: acetylthiocholine.

으로 동정하였다. Berberine은 AChE의 활성을 특이적, 가역적, 비경쟁적으로 저해시켰다.

사 사

본 연구에 소요된 경비의 일부는 신의약품 개발연구센터(한국과학재단 지원)의 연구비로 충당된 것으로 이 연구비 지원에 감사드립니다.

인용 문헌

- Lang, W. and Henke, H. (1983) Cholinergic receptor binding and autoradiography in brains of non-neurological and senile dementia of Alzheimer-type patients. *Brain Res.* 267: 271-280.
- Antuono, P. G. (1995) Effectiveness and safety of Velnacrine for the treatment of Alzheimers-disease-A double-blind, placebo-controlled study. *Archives of Internal Medicine* 155: 1766-1772.
- Siegfried, K. (1995) The efficacy of cholinergic drugs in patients with Alzheimers-disease-focus on the aminoacridines. *Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental* 10: 89-96.
- Hao, H. and Qicheng, F. (1986) Chemical study on alkaloids from *Corydalis bulleyana*.

- Planta Med.* 52: 193-198.
- Chin, K. C. and Hsu, P. (1957) The pharmacological activity of *Corydalis*. I. Analgesic action of *Corydalis* A, B and L. *Sheng Li Hsueh Pae* 21: 150-157.
- Chin, K. C., Cheng, H. G. and Hsu, P. (1964) The pharmacological activity of *Corydalis*. XII. The effect of optical isomers of tetrahydropalmatine on central nervous system. *Sheng Li Hsueh Pae* 27: 47-58.
- Matsuda, H., Shiimoto, H., Namba, K. and Kubo, M. (1988) Effect of protopine on blood platelet aggregation. *Planta Med.* 54: 498-501.
- Shiimoto, H., Matsuda, H. and Kubo, M. (1990) Effect of protopine on blood platelet aggregation. II. Effect of metabolic system of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in plates. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 2320-2322.
- Kubo, M., Matsuda, H., Tokuoka, K., Kobatashi, Y., Ma, S. and Tanaka, T. (1994) Studis of anti-cataract drugs from natural sources. I. Effects of a metabolic extract and alkaloidal components from *Corydalis* Tuber on *in vitro* aldose reductase activity. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 458-459.
- Huang, J. H. and Johnston, G. A. R. (1990) (+)-Hydrastine, a potent competitive antagonist at mammalian GABA_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* 99: 727-730.
- Tanaka, T., Metori, K. and Kobayashi, S. (1993) Inhibitory effects of berberine-type alkaloids on elastase. *Planta Med.* 59: 200-202.
- Chun, Y. T., Yip, T. T., Lau, K. L., Kong, Y. G. and Sankawa, U. (1979) A biochemical study on the hypotensive effect of berberine in rats. *Gen. Pharmacol.* 10: 177-184.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 75-88.
- Sugimoto, H., Tsuchiya, Y., Sugumi, H., Higurashi, K., Karibe, N., Imura, Y., Sasaki, A., Araki, S., Yamanishi, Y. and Yamatsu, K. (1992) Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* 35: 4542-4548.

(1996년 3월 22일 접수)