

Chitosan 올리고당의 안지오텐신 전환효소 활성 억제 및 SHR에서의 고혈압 억제 특성

홍상필 · 김명희 · 오세욱 · 한찬규 · 김용현
한국식품개발연구원

ACE Inhibitory and Antihypertensive Effect of Chitosan Oligosaccharides in SHR

Sang-Pill, Hong, Myung-Hee, Kim, Se-Wook, Oh,
Chan-Kyu, Han and Yong-Hyun, Kim
Korea Food Research Institute

Abstract

Effect of chitosan oligosaccharides on the ACE (angiotensin I converting enzyme) inhibition and antihypertension in SHR (Spontaneously hypertensive rat) was examined. The ACE inhibition activity was observed in all the chitosan oligosaccharides used in this study, and chitosan trimer exhibited the highest inhibitory activity ($IC_{50}=0.9 \mu M$) compared with other chitosan oligosaccharides (IC_{50} : 2.4~100 μM). The results suggested that chitosan trimer was a good inhibitor of ACE in molecular level. When the single oral dose (2.14 mg/kg, similar to dose level of Captopril, known as strong ACE inhibitor) of chitosan trimer was given to 8 or 21 week aged SHR, the blood pressure reduction of both SHRs in 4hrs were $27 \pm 4.8 \text{ mmHg}$ and $36 \pm 4.3 \text{ mmHg}$, respectively. Therefore, it was suggested that chitosan trimer could be applicable as natural ACE inhibitor related to antihypertension.

Key words: chitosan oligosaccharides, ACE inhibition, antihypertension

서 론

고혈압은 주로 레닌-안지오텐신계에 의한 생리 생화학적 기전으로 설명되고 있으며 고혈압의 직접적인 억제를 위하여 안지오텐신 전환효소의 활성을 억제할 수 있는 물질에 초점이 맞추어져 있다⁽¹⁾. ACE (angiotensin I converting enzyme)는 dipeptide를 생성하는 것 외에는 pancreatic carboxypeptidase A와 유사한 효소-기질 반응기작을 나타내는 것으로 추정되고 있다⁽²⁾. ACE 저해제로서는 1960년대 말 *Bothrops jararaca* 독사의 독에서 BPFs가 발견되었고⁽³⁾ BPFs 중 nonapeptide인 SQ20881이 Engel 등에 의해서 우수한 ACE 저해제로 제시되었다⁽⁴⁾. 1977년 ACE의 강력한 저해제인 Captopril(2-D-mercaptopropanoyl-L-proline)이 개발되었고 이후 Enalapril, Benazepril 등 수종의

ACE 저해제가 상품화되어 고혈압 치료제로서 이용되고 있으나⁽⁵⁾ 마른기침, 두통, 식욕부진, 미각이상, 발진, 백혈구 감소 등 각종 부작용이 많다⁽⁶⁾.

식품관련 분야에서의 ACE 저해제로서는 우유⁽⁶⁻⁸⁾, 대두⁽⁹⁾, 우수수⁽¹⁰⁾, 정어리⁽¹¹⁾, 참치⁽¹²⁾ 등의 단백질 가수분해물, 돼지혈장⁽¹³⁾에서 분리된 peptide 등의 주로 C 말단에 proline을 가지는 peptide류, 감귤 및 과실류의 flavonoid 배당체류⁽¹⁴⁾, 차성분의 카테킨류⁽¹⁵⁾ 등을 들 수 있다. 그러나 이들 성분은 천연물이라는 측면에서 안전성이 높지만 ACE 저해에 대한 역가가 Captopril 보다 최소한 20배 이상 낮아 강력한 ACE 저해능을 가지는 천연물질에 대한 탐색이 지속적으로 이루어지고 있다⁽⁶⁻¹⁵⁾.

한편 ACE 활성기작을 기초로 aminosugar로 널리 알려진 키토산 올리고당의 구조 및 화학적인 특성이 ACE의 inhibitor로서 작용할 수 있을 것으로 예상되고 있으나 이에 관한 보고는 거의 없다. 따라서 본 연구팀은 단당을 비롯하여 2량체에서 6량체에 이르는 키토산

올리고당의 ACE 활성억제 및 SHR (Spontaneously Hypertensive Rat)에서의 혈압저하효과를 검토하여 유효한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

키토산 올리고당류는 순도 99% 시약급으로 SEIKA-KAKU (Japan) 제품을 사용하였고 ACE 및 Hippuryl His-Leu은 Sigma社 제품을 사용하였으며 기타 시약은 모두 순도 99% 이상의 시약급을 이용하였다. SHR은 일본의 SLC (Shizuoka Laboratory Animal Center)社에서 수입하여 사용하였다.

ACE 저해효과

Cushman과 Cheung의 방법⁽¹⁾을 이용하여 분석하였다. 즉 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3)에 키토산 올리고당을 농도별로 첨가한 후 37°C에서 10분간 방치한 다음 계속해서 ACE 0.004 unit를 넣고 30분간 반응을 행하고 0.2 N HCl 되도록 하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 3 mL를 가하여 상층액 2.5 mL을 취하여 완전히 전조시킨 후 중류수 3 mL에 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 따라 ACE 저해활성을 계산하였다.

$$\text{ACE inhibitory activity (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료첨가구의 흡광도, B: 시료무첨가구의 흡광도

공시동물 및 SHR의 혈압 측정

본 실험에 공시한 동물은 8주령 및 21주령의 본태성 고혈압 랙트(SHR)로서 각각 5마리를 대상으로 하였으며 체중은 각각 203±9.6 g, 320±4.5 g이었고 3량체 키토산을 2.143 mg/kg을 강제 경구투여한 후 300분간 경시적으로 혈압을 측정하였다. 혈압의 측정은 랙트를 29~30°C로 조절된 항온통에 넣어 10~15분간 안정화 시킨 다음 尾靜脈으로부터 非觀血 血壓測程器(IITC Inc., Woodland Hills, California)를 이용하여 동일한 시간과 조건에서 수축기 혈압을 3회 반복 측정하였다. 각 group에서의 혈압강하(mmHg)는 투여전 혈압에서 투여후 혈압을 뺀 값을 mean±S.D.로 나타내었다.

결과 및 고찰

키토산 분해물의 ACE 활성 저해효과

고혈압의 기전은 레닌-안지오텐신계의 생리적 생화

학적 기전으로 설명되고 있다. 즉, ACE (angiotensin converting enzyme)의 작용을 받아 생성된 Angiotensin II는 혈관 평활근에 위치한 AII 수용체와 결합하여 직접 동맥 및 소동맥을 수축시키는 작용과 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시켜 혈압을 올려주는 작용을 하는 것으로 알려지고 있다⁽¹⁾. 따라서 고혈압의 억제는 ACE 활성을 억제함으로서 가능하며 대부분의 고혈압 치료약이 켭토프릴 등과 같은 ACE 활성 저해제로 알려져 있다⁽²⁾.

ACE는 pancreatic carboxypeptidase와 같이 zinc를 갖는 metalloprotein이며 효소상에 Zn²⁺를 함유하는 부위, 수소결합을 하는 H⁺부위(carboxypeptidase는 비극성의 pocket형임) 및 양전하를 가지는 부위의 3군데 활성부위로 구성되고 있는 것으로 추정되고 있다⁽²⁾. ACE의 기질인 angiotensin I과 경쟁적 inhibitor가 되기 위해서는 N말단에는 amide 결합의 carbonyl group이 zinc이온과 결합할 수 있어야 하고 C말단에는 proline과 같은 방향족 아미노산으로 구성된 일정한 길이의 peptide가 제시되고 있다. 또한 Ondetti 등⁽³⁾은 N말단 부위의 carboxy group을 -SH로 치환할 경우에는 강력한 ACE 저해능을 나타낸을 확인한 바 있으며 이 물질이 바로 Captopril(2-D-mercaptopropionyl-L-proline)이다.

Table 1에는 단당을 비롯하여 2~6량체 키토산 올리고당의 ACE 저해활성(IC₅₀)을 나타낸 것으로 단당을 비롯한 키토산 올리고당은 모두 ACE 저해활성을 보였다. 이 결과는 지금까지 우유, 옥수수, 정어리 등의 특정구조의 peptide류⁽⁶⁻¹¹⁾나 감귤류 등의 flavonoid 배당체 등 및 차의 catechin 등이 ACE 저해작용을 나타낸 경우⁽¹⁴⁻¹⁵⁾나 Ondetti 등⁽²⁾ ACE의 활성부위에 위치

Table 1. Comparison of ACE inhibitory activity of chitosan oligosaccharides with other materials reported in reference

Materials	IC ₅₀ (μmole)
monomer	>100
dimer	2.40
trimer	0.90
tetramer	>100
pentamer	>100
hexamer	>100
captopril	0.10
captopril ^{(1), (2)}	0.02~0.18
Val-Ala-Pro ⁽³⁾	2.00
Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro ⁽⁴⁾	0.87
Leu-Arg-Pro(H2) ⁽⁵⁾	0.27
(-)-Epigallocatechin gallate ⁽⁶⁾	90

^{(1), (4)}Ondetti et al. (1977), ⁽²⁾Patchett et al. (1980)⁽¹⁸⁾, ⁽³⁾Maruyama et al. (1987), ⁽⁵⁾Miyoshi et al. (1991), ⁽⁶⁾Hara et al. (1987).

Table 2. Systolic blood pressure reduction after administration of chitosan trimer to SHR

Sample	Dose (mg/kg)	Group	No. of rats	Blood pressure before administration	Blood pressure reduction (mmHg)				
					1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
Trimer	2.14	8 week aged SHR	5	175±3.9	10±4.0 ^a	14±5.2	20±6.1	27±4.8	24±5.3
Trimer	2.14	21 week aged SHR	5	185±4.2	17±5.0	25±6.7	30±5.5	36±4.3	35±7.9

^aMean ± S.D.

한 zinc 이온의 ligand로서 작용할 수 있는 carbonyl group을 질소를 포함하는 물질인 amine, amide 및 guanidine으로 치환할 경우 ACE의 저해효과를 높이지 못했다는 결과와는 전혀 다르다. 특히 3량체 키토산 올리고당의 ACE 저해활성(IC_{50})은 0.9 μ mole수준으로 0.27 μ mole의 합성 peptide (H2)⁽¹⁰⁾나 0.1 μ mole의 captopril 보다는 약간 낮았지만 2.0 μ mole의 카제인 유래 peptide⁽⁸⁾나 90 μ mole의 catechin⁽¹⁵⁾ 보다 우수하였다. 0.87 μ mole의 Bothrops jararaca-유래 nonapeptide (SQ20881)⁽²⁾와 유사하게 나타나 3량체 키토산 올리고당은 천연물로서 아주 우수한 ACE 저해능력을 가지는 것으로 평가된다.

한편 1) ACE는 N 및 C말단 각각 arginine으로 구성된 bradykinin에 대하여 분해활성을 나타낸다는 점⁽¹⁾, 2) 키토산 올리고당은 chelating 기능이 있다는 점⁽¹⁷⁾, 3) ACE 저해활성은 단량체나 6량체 보다는 3량체 올리고당에서 가장 강하게 나타난 본 실험결과를 고려해 볼 때 키토산 올리고당의 C₂-NH₂ group (pKa 6.4)이 시험조건인 pH 8.3에서 nucleophile성을 나타나기 때문에 zinc 이온과 결합할 수 있고 C말단의 양이온을 가지는 활성부위와 이온결합이 일어날 수 있으며 키토산 올리고당의 -OH group 혹은 C₂-NH₂ groupⁱ 중 양의 H⁺활성부위와 수소결합을 이를 수 있다는 것과 효소-기질반응의 입체적인 적합성에 의하여 3량체의 키토산 올리고당이 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내고 있을 가능성이 높다. 또한 3량체 키토산 올리고당은 zinc 이온이 있는 활성부위에 끊어지기 쉬운 amide 결합(peptide bond)을 가지는 peptide⁽²⁾와는 달리 안정한 당의 구조를 유지하기 때문에 peptide와 같이 분해되지 못하고 ACE의 활성부위를 지속적으로 blocking하고 있을 가능성이 높다.

키토산 분해물의 SHR의 혈압저하효과

강한 ACE 저해활성을 나타낸 3량체 키토산 올리고당의 *in vivo*에서의 혈압강하효과를 검토하였다. SHR에 대하여 기존의 ACE 저해제(고혈압치료제)로 알려진 Captopril의 인체에 대한 투여량인 150 mg/70 kg (성인)/day를 기초로 환산하여 3량체 키토산 올리고당

2.14 mg/kg SHR을 강제 경구투여 후 시간별로 혈압을 측정하였다(Table 2).

그 결과, 투여전 혈압이 각각 175±3.9 mmHg 및 185±4.2 mmHg이던 8주령 및 21주령 SHR의 혈압은 3량체 키토산 올리고당 투여 후 시간경과에 따라 서서히 감소하다가 4시간 경에 8주령 및 21주령 모두 최저 혈압을 보였으며 이 때의 혈압 강하율은 8주령 SHR 27±4.8 mmHg, 21주령 SHR 36±4.3 mmHg였다.

Kinoshita 등⁽⁹⁾은 SHR에 카제인 peptide를 3.6 mg/kg rat 단위로 투여하여 4시간경에 24.7±6.4 mmHg의 혈압저하효과를 얻은 바 있고 Miyoshi 등⁽¹⁰⁾은 SHR에 합성 peptide인 Leu-Arg-Pro(H2) 30 mg/kg을 정맥투여하여 2분만에 15 mmHg의 혈압강하 효과를 얻은 바 있다. 그러나 실험에 투여된 peptide의 농도를 고려할 경우에는 3량체 키토산의 혈압저하효과가 이들의 결과 보다 훨씬 우수하다고 할 수 있으며 Captopril을 Goldblatt two renal hypertensive rat에 3 mg/kg을 강제 경구투여 후 4시간 경에 40 mmHg의 혈압저하효과를 얻은 Ondetti 등⁽²⁾의 결과와는 유사하다고 할 수 있다.

따라서 3량체 키토산 올리고당은 2량체 키토산 올리고당과 함께 향후 폭넓은 보완시험을 거쳐 고혈압 치료제로서 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

키토산 올리고당이 ACE 저해활성과 SHR의 혈압에 미치는 영향을 검토하였다. 키토산 올리고당은 모두 ACE 저해활성을 나타내었다. ACE 저해활성(IC_{50})은 3량체가 0.9 μ mole로 가장 우수하였고 2량체의 경우에는 2.4 μ mole, 그 외의 올리고당은 모두 >100 μ mole였다. 강력한 ACE 저해제인 Captopril(2-D-mercaptopropyl-L-proline)의 인체 투여량을 기준으로 3량체 키토산 올리고당 2.14 mg/kg을 SHR에 강제 경구투여 한 바, 4시간 경에 8주령 및 21주령 SHR 모두 최저 혈압을 보였고 이 때의 혈압 강하는 8주령 SHR 27±4.8 mmHg, 21주령 SHR 36±4.3 mmHg로 나타났다. 따라서 3량체 키토산 올리고당은 2량체 키토산 올리고당과 함께 향후 고혈압 치료제로서 응용가능함이 시

사되었다.

문 헌

1. William, O.A., Thomas, L.L. and David, A.W.: Renin-angiotensin inhibitors. Principles of Medical Chemistry. 4th ed., William & Wilkins, Baltimore, p.724 (1995)
2. Ondetti, M.A., Rubin, B. and Cushman, D.W.: Design of specific inhibitors of angiotensin. *Science*, **196**, 441-444 (1977)
3. Cushman, D.W. and Ondetti, M.A.: In Progress in medicinal chemistry. Elsevier, North Holland, Amsterdam, 17, p.41 (1979)
4. Engel, S.L., Schaeffer, T.R., Gold, B.I. and Rubin, B.: Inhibition of pressor effects of angiotensin I and augmentation of depressor effects of bradykinin by synthetic peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 240-245 (1972)
5. 水島裕, 宮本昭正: 今日の治療薬. 南江堂, 東京, 505-506 (1996)
6. Maruyama, S., Mitachi, H., Tankata, H., Tomizuka, N. and Suzuki, H.: Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(6), 1581-1586 (1987)
7. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H.: Angiotensin converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **49**(5), 1405 (1985)
8. Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. and Suzuki, H.: Angiotensin I converting enzyme inhibitor activity of the C-terminal hexapeptide of α -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(9), 2557-2561 (1987)
9. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuchi, M.: Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(7), 1107-1110 (1993)

10. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S.: Structures and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(5), 1313-1318 (1991)
11. Seki, E., Osajima, K., Matsui, T. and Osajima, Y.: Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **40**(11), 783-791 (1993)
12. Kohama, Y.: Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**(1), 332-336 (1988)
13. Hazato, T. and Kase, R.: Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**(1), 52-55 (1986)
14. Ohara, T., Ohinata, H., Muramatsu, N., Oike, T. and Matsubara, T.: Enzymatic degradation of rutin in processing of buckwheat noodles. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkashi*, **36**(2), p.121 (1989)
15. Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T.: Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **61**(7), 803-808 (1987)
16. Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.*, **20**, 1637-1640 (1971)
17. Dunn, E.T., Grandmison, E.W. and Goosen, M.F.A.: Applications and properties of chitosan. In Application of chitin and chitosan. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, p.3-29 (1997)
18. Patchett, A.A., Harris, E., Tristram, E.W., Wyvratt, M.J., Wu, M.T., Taub, E., Peterson, E.R. and Ikeler, T.J.: A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature*, **288**(20), 280-283 (1980)

(1998년 10월 9일 접수)