

## Glucosidase 활성 저해제의 검색

김국희\*, 김봉석\*, 신동범<sup>†</sup>, 정덕상\*, 이선주\*

\* 제주대학교 자연과학대학 화학과,

<sup>†</sup> 제주대학교 자연과학대학 식품영양학과

## Screening of glucosidase inhibitors from plants

Guk-Hee Kim\*, Bong-Suk Kim\*,  
Dong-Bum Shin<sup>†</sup>, Duk-Sang Jung\*,  
and Sunjoo Lee\*

\* Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Cheju National University, Korea

<sup>†</sup> Department of Food Science & Nutrition, College of Natural Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

### ABSTRACT

Methanol extracts of 30 different plants collected in Jeju Island were tested for  $\alpha$ -glucosidase inhibition. When the final concentration of extracts was 0.2mg/ml for each sample, *Ardisia japonica* Blume. showed 91%, 92% and 87% of inhibition for maltase, sucrase, and nonspecific  $\alpha$ -glucosidase activity, respectively. *Potentilla chinensis* inhibited maltase and sucrase activities for 90% and 82%, respectively. *Euphorbia helioscopia* exerted 90% and 88% inhibition for maltase and nonspecific  $\alpha$ -glucosidase activity, respectively.

### 서 론

당뇨병은 현대인에게 많이 발생하는 만성질환으로 우리나라에서는 1980년대부터 갑자기 증가하여 현재 200만 명에 이르고 있으며, 이는 전체 인구의 5%에 해당한다. 이러한 당뇨병을 한방에서는 소갈(消渴)이라 하여 일찍부터 그 원인 규명과 처방에 대해서 많은 관심을 가져

왔다. 정상인의 혈액에서 포도당 농도는 공복시에 60~110 mg/dl이고 과당, 갈락토스, 만노스, 유당, 서당, 5탄당 등이 미량으로 존재한다. 포도당은 음식물로 섭취한 다당류가 소화효소에 의해 분해되어 소장의 상부에서 흡수되어 간장으로 운반된다. 혈액속의 포도당 농도는 장에서 흡수된 당질이 간장으로 가서 일부는 당원으로 합성 또는 포도당으로 분해되는 정도, 말초조직에서의 포도당의 이용 정도 및 신장에서의 배설과 재흡수등 여러 인자에 의해 좌우된다. 뿐만 아니라 농도 조절은 자율신경계와 각종 호르몬이 밀접한 관계를 갖고 있다. 당뇨병은 40~50세에 집중적으로 발생되고 있는 문화병으로 취급되고 있으나 식생활의 변화에 따라 소아 당뇨 환자도 증가하고 있는 추세이다.

당뇨병이란 인슐린이 충분치 못하거나 제 기능을 못하도록 된 메카니즘에 의하여 생체의 에너지 양의 조절기능을 상실함으로써 발생하는 것이다. 당뇨의 발병 방식은 크게 두가지의 경로에 의한다. 첫째는 Insulin-dependent diabetes mellitus(IDDM)이다. 인슐린은 위의 후방과 척추 사이에 있는 췌장에서 만들어진다. 췌장은 두 가지 큰 작용을 한다. 하나는, 췌액이라 불리는 강력한 소화액을 분비한다. 먹은 음식이 십이지장에 이르면 호르몬이 췌장을 자극하여 췌액이 십이지장에 흘러 들어가 장에서의 소화를 돕는다. 이를 외분비작용이라 한다. 또 다른 하나는 췌장의 내분비작용중의 하나로 인슐린을 생산하여 혈액 중으로 인슐린을 분비하는 것을 말한다. 인슐린은 혈액 중의 포도당의 양을 조절하는 활동을 하는데 인슐린의 호르몬 작용에 의하여 혈중에 존재하는 과다한 양의 포도당을 소모하는 신진대사가 일어나 포도당의 양을 감소시킴으로써 혈중의 당양을 일정하게 유지한다. IDDM은 인슐린을 생산하는 췌장  $\beta$ 세포의 자가 면역적 파괴에서 오기에 생명 유지를 위해서는 인슐린을 투여해야 하며, ketosis의 경향이 높다(Kahn et al., 1989 ; Soll et al., 1975).

둘째는 Noninsulin-dependent diabetes mellitus(NIDDM)이다. NIDDM은 glucose tolerance의 비정상적인 상태가 됨에 의하여 발생한다. 정상적인 glucose tolerance로부터 비정상적인 상태로 되어 당뇨병으로 전환됨에 따라 인슐린에 대한 저항성은 증가하고, 반면에 인슐린의 분비는 감소한다.  $\beta$ -세포가 인슐린 저항성을 상쇄 할만큼의 기능을 한다면 glucose tolerance는 정상적인 값을 가질 수 있지만, 만약 인슐린 분비가 제대로 되지 않는다면 glucose tolerance의 손상을 입게되어

hyperglycemia를 일으킨다. 이는 인슐린의 분비와 작용을 저해하며, 더 발전되어 glucose tolerance의 손상을 거쳐 당뇨병으로 진전된다. NIDDM의 발병에는 비만이 중요하게 작용하며, 서구 사회의 전체 NIDDM환자의 대부분이 비만이다(Chiasson et al., 2002 ; Henry et al., 1993 ; Muchora et al., 1999).

배당체를 가수분해하는 효소를 glucosidase라고 총칭하지만, 특히 당 부분이 glucose일 때 glucosidase라고 부른다. 글루코시드결합이  $\alpha$ 인가  $\beta$ 인가에 따라서  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucosidase로 나눈다. 전자는 동식물 및 미생물계에 널리 분포한다. 말타아제가 이에 속하는데, 이는  $\alpha$ -1, 4-glucosidase로서 말토오스, 아밀로오스 등에 작용한다. 그러나 설탕이나 메틸- $\alpha$ -글루코시드에는 작용하지 않는다. 사람의 장점막(腸粘膜)에서는 5종류의  $\alpha$ -glucosidase가 분리되었는데, 이 장점막의 효소는 장관에서 이당류(二糖類)의 소화흡수에 관여한다. 한편, 후자인  $\beta$ -glucosidase는 미생물, 고등동물, 동물의 간·신장·소장점막, 달팽이의 소화액 등에 널리 분포한다(Hyuck-Jai Choi, 2000 ; Yo Shikawa et al., 2002).

인슐린 저항성을 감소시키기 위하여 glucose tolerance에 영향을 주거나,  $\beta$ -세포를 보호할 수 있다면 당뇨병으로 진행되는 것을 방지하거나 늦출 수 있다. 인슐린에 대한 반응도를 증진시키거나 식후의 hyperglycaemia를 감소시키기 위해서  $\alpha$ -glucosidase의 저해제를 개발한다는 것은 이 병을 치료하는 중요한 방법이 되고 있다(Chiasson et al., 2002). 최근 천연물에서  $\alpha$ -Glucosidase 저해제들을 개발하는 연구가 많이 이뤄지고 있는데, 여기에 질소를 포함하는 당의 유도체들이 있다(Hines et al., 1999 ; Lebovitz et al., 1998). 탄소고리 내에 질소를 가지고 있는 Nojirimycin계열의 화합물과 탄소고리 외에 질소를 포함하고 있는 acarbose, valiolamine이 있으며, 이들 각각의 작용양식도 다르다(Deleon et al., 2002 ; Felicia et al., 2001 ; Nitin et al., 2002 ; Simeon et al., 2002).

본 연구에서는 제주도에서 자생하는 여러 종류의 식물들로부터 생체분자들을 메탄올로 추출하여  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 저해하는 물질들을 추출하고 확인함으로써 당뇨 치료제의 개발에 기초가 되고자 한다.

## 실험재료 및 방법

글루코시다제의 활성측정에 사용된 UV-visible

spectrophotometer는 Hewlett Packard 8453 (USA)을 사용하였으며, 시료준비를 위해서 Aspirator A-3S와 rotary vacuum evaporator SB-651(Eyela, Japan)를 사용하였다. Vacuum freezer dryer는 Heto FD를 사용하였다. 원심분리기는 한일과학의 Mega 17R을 사용하였다.

$\alpha$ -glucosidase, p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, Peroxidase, Glucose oxidase, O-Phenylenediamine dihydrochloride, Glycine, Sodium phosphate monobasic와 Sodium phosphate dibasic은 Sigma(U.S.A) 제품을 사용하였다. Maltose와 Saccharose는 Hanawa(Japan)로부터 구입하였다. Hydrochloric acid는 Yakuri(Japan)로부터, Metanol은 Merck(Germany)로 부터 각각 구입하였다. 실험방법은 다음과 같다.

### In vitro에서 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해 실험

시료의 추출; 실험에 사용된 각각의 시료들을 1kg씩 채취하여 2L의 메탄올에 한달 동안 추출하였다. 그 후 상온에서 Aspirator를 이용하여 감압 여과시킨 후, vacuum freezer dryer로 완전 건조시킨 시료를 1mg/ml이 되도록 3차 증류수에 용해시킨 후 실험에 사용하였다. 활성을 측정할 때 반응용액상의 시료 최종농도는 0.2mg/ml이 되도록 하였다.

maltase와 sucrase의 활성 저해실험; 효소 반응용액은 0.1M phosphate buffer(maltase는 pH7.0, sucrase는 pH6.0), 기질(10mM maltose와 sucrose) 및 시료를 가하여 maltase는 40분간, sucrase는 3시간동안 37°C에서 각각 반응시킨 다음, 95°C의 수조에서 효소를 2분간 비활성화 시키고 3000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액 0.1 ml에 o-phenylenediamine 0.05mg/ml, peroxidase 2 unit/ml, glucose oxidase 0.384unit/ml등으로 조제한 반응용액을 가하여 30분간 배양 후, 1N HCl을 가하여 효소반응을 정지시킨 후에 492nm에서 흡광도를 측정하였다. Control 반응은 시료의 저해 반응조건에서 시료를 제외한 상태에서 반응을 진행하여 결과를 얻었다.

$\alpha$ -glucosidase(p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) 저해 활성; 2mM의 p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside에 효소반응 용액과 시료를 가하여 30분간 37°C에서 배양한 후, 1M Glycine-NaOH(pH 9.0)로 반응을 정지시킨다. 그 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻어 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 실험결과 및 토의

제주도에서 채취한 식물들로부터 메탄올 추출한 시료들이 가지는 maltase, sucrase에 대한 효소활성 저해능력과 비특이적  $\alpha$ -glucosidase 저해작용에 대하여 측정하였다. 그 결과는 표 1에 기록되었다. 등대풀, 석위뿌리, 싸리나무, 위룽채, 자금우에서는 maltase의 활성을 저해시킬 수 있는 능력이 80%이상이고, 더덕, 위룽채와 자금우에는 sucrase의 활성을 80%이상 저해할 수 있는 성분들이 포함된 것으로 밝혀졌다. 비특이적  $\alpha$ -glucosidase의 저해작용을 80%이상 할 수 있는 추출물은 등대풀과 자금우이다. 특히, 소나무 추출물인 pycnogenol은 maltase, sucrase와 비특이적  $\alpha$ -glucosidase의 강력한 저해기능을 가진 것으로 밝혀졌다. 자금우는 세종류의 효소활성에 공통적으로 아주 높은 저해능력을 보이며, 위룽채는 maltase와 sucrase에 높은 저해능력을 나타내고, 등대풀은 maltase와 비특이적  $\alpha$ -glucosidase에 큰 저해작용을 하는 것으로 판단된다.

저해작용이 우수한 위의 식물 추출물들이 각각의 경우에 같은 생체분자들이 서로다른 효소들의 저해작용에 관여하는지, 아니면 독립적으로 독특한 생체분자들이 효소활성의 저해제로 작용하는지는 이 실험으로 판단할 수가 없다. 그러므로 메탄올 추출물을 서로 다른 극성을 가지는 유기용매와 크로마트그래피와 같은 분리 정제법을 이용하여 더 세밀하게 순수 분리하는 것이 필요하고, 저해

작용이 우수한 위의 식물 추출물들이 각각의 경우에 같은 생체분자들이 서로다른 효소들의 저해작용에 관여하는지, 아니면 독립적으로 독특한 생체분자들이 효소활성의 저해제로 작용하는지는 이 실험으로 판단할 수가 없다. 그러므로 메탄올 추출물을 서로 다른 극성을 가지는 유기용매와 크로마트그래피와 같은 분리 정제법을 이용하여 더 세밀하게 순수 분리하는 것이 필요하고, 저해

표 1. 각 종 식물 추출물에서의  $\alpha$ -glucosidase저해 효과

Materials	% Inhibition		
	maltase	sucrase	비특이적 $\alpha$ -glucosidase
민들레 <i>Taraxacum mongolicum</i>	35%(0.0)	38%(15.6)	51%(28.3)
광대나물 <i>Lamium amplexicaule</i>	48%(11.0)	26%(5.0)	33%(0.0)
까마중 <i>Salanum nigrum</i>	60%(0.7)	37%(20.7)	39%(6.4)
까실쑥부쟁이 <i>Aster ageratoides</i>	17%(4.4)	18%(1.4)	40%(0.0)
꽃향류 <i>Elsholtzia splendens</i>	50%(10.7)	54%(24.0)	55%(0.0)
더덕 <i>Codonopsis lanceolata</i>	10%(2.8)	81%(14.1)	15%(2.5)
돌의 <i>Gynostemma pentaphyllum</i>	21%(9.6)	3%(0.0)	34%(0.0)
두릅 <i>Aralia elata</i>	30%(0.0)	29%(0.0)	41%(0.0)
등대풀 <i>Euphorbia helioscopia</i>	90%(4.9)	69%(6.4)	88%(2.9)
무화과 <i>Syconus</i>	2%(0.0)	N.D.	29%(0.0)
미국미역취 <i>Solidago serotina</i>	29%(17.0)	60%(9.3)	52%(17.7)
보리수나무 <i>Elaeagnus Umbellata</i>	34%(11.3)	27%(19.5)	28%(18.4)
복수초 <i>Adonis amurensis</i>	16.5%(3.5)	26%(0.0)	28%(0.7)
비름 <i>Amaranthus mangostanus</i>	17%(0.5)	24%(0.7)	37%(11.0)
산국 <i>Chrysanthemum boreale</i>	6%(0.7)	44%(0.0)	24%(9.0)
살갈퀴 <i>Vicia angustifolia var. segetilis</i>	36%(10.6)	16%(8.5)	9%(7.0)
석위 <i>Pyrrosia lingua</i>	85%(6.6)	50(18.6)	46%(6.4)
석위뿌리 <i>Pyrrosia lingua</i>	91%(2.1)	72%(8.1)	50%(7.2)
선인장열매 <i>Cactus</i>	13%(10.4)	10%(0.0)	16%(12.7)
순비기 잎 <i>Vitex rotundifolia</i>	43%(7.8)	41%(0.0)	40%(0.0)
순비기 줄기 <i>Vitex rotundifolia</i>	37%(2.8)	38%(22.0)	35%(7.8)
싸리나무 <i>Lespedeza bicolor</i>	81%(1.4)	31%(12.0)	54%(5.7)
위룽채 <i>Potentilla chinensis</i>	90%(9.0)	82%(2.8)	66%(9.6)
으름덩굴 <i>Akebia quinata</i>	26%(15.2)	14%(5.0)	33%(0.0)
자금우 <i>Ardisia japonica</i>	91%(2.5)	92%(3.6)	87%(12.0)
자리공 <i>Phytolacca esculenta</i>	11%(0.0)	10%(0.0)	15%(0.0)
키위열매 <i>Actinidia deliciosa</i>	22%(9.6)	22%(0.0)	20%(2.8)
팔손이 <i>Fatsia japonica</i>	29%(4.2)	N.D.	31%(0.0)
환삼덩굴 <i>Humulus japonicus</i>	61%(11.0)	40%(11.5)	30%(18.5)
소나무** pycnogenol	94%(3.2)	98%(0.5)	100%(0.7)

괄호안의 숫자는 표준편차이다.

\* N.D.는 측정되지 않음을 표시함.

\*\* 소나무 추출물인 pycnogenol은 상업용을 이용함.

작용물질의 화학적 구조를 결정하고 IC<sub>50</sub>을 측정하고, 쥐 모델을 이용한 생체실험등은 하는 것이 필요하여 본 실험실에서 현재 진행 중이다.

## 참 고 문 헌

- Chiasson, Jean-Louis, Josse, R. G., Gomis, R., Markolf, Hanefeld, A., and Laakso, M.: Acarbose for Prevention of type 2 Diabetes Mellitus: The STOP-NIDDM Randomised Trial. *The Lancet* 359(2002), 2072-77
- Deleon, M. J., Vikram, Chandurkar, S., Albert, G., and Mooradian, A. D.: Glucagon-like peptide-1 response to acarbose in elderly type 2 diabetic subjects, *Diabetes Research and Clinical Practice* 56(2002), 101-106
- Felicia, D. Giorgio, C., Manuela, M. and Barbara, V.: Concise synthesis of 1-deoxy-4- $\alpha$ - $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-nojirimycin avoiding a glycosylation step, *Tetrahedron Letters* 42(2001), 1139-1142
- Henry, R. R., Gumbiner, B., Ditzler, T., Wallace, P., Lyon, R. and Glauber, H. S.: Intensive conventional insulin therapy for type II diabetes, *Diabetes Care*, 16(1993), 21-31
- Hines, J. V., Chang, H., Melinda S., Gerdeman, D., and Warn, E.: Isotope edited NMR Studies of Glucosidase: Design and Synthesis of a Novel Glucosidase Inhibitor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9(1999), 1255-1260
- Hyuck-Jai Choi: Inhibitory Effect of *Gyrophora esculenta* on  $\alpha$ -Glucosidase(2000)
- Kahn, B. B., Charron, M. J., Lodish, H. F., Cushman, S. W. and Flier, J. S.: Differential regulation of two glucose transporters in adipose cells from diabetic and insulin-treated diabetic rats, *J. Clin. Invest.*, 84(1989), 404-411
- Lebovitz, H. E.:  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes, *Diabetes Rev.*, 6(1998), 132-145
- Muchova, J., Liptáková, A., Országhová, Z., Garaiová, I., Tisoňt, P., Čársky, J. and Ďuračková, Z.: Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus, *Diabetic Med.*, 16(1999), 74-78
- Nitin, T. P., Sheeja, J., Sushma, G. S. and Dilip, D.D.: 1-Aza-Sugar from D-Glucose. Preparation of 1-Deoxy-5-dehydroxymethyl-Nojirimicin. Its Analogues and Evaluation of Glycosidase Inhibitor Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10(2002), 2155-2160
- Simeon G.B., Taifo M., and Heinz G. F.: Biosynthetic studies on the  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor acarbose: the chemical synthesis of dTDP-4-amino-4,6-dideoxy- $\alpha$ -D-glucose, *Carbohydrate Research* 337(2002), 297-304
- Soll, A. H., Kahn, C. R., Neville Jr., D. M. and Roth, J.: Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity, *J. Clin. Invest.*, 56(1975), 769-780
- Yoshikawa, M., Morikawa, T., Matsuda, H., Tanabe, G. and Muraoka, O.: Absolute Stereostructure of Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor, Salacinol, with Unique Thiosugar Sulfonium Sulfate Inner Salt Structure from *Salacia reticulata*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10(2002), 1547-1554