

천연물로부터 프로릴 엔도펩티다제 저해제의 검색

이경희 · 이현진 · 박훈일 · 홍은옥 · 송경식*

경북대학교 농과대학 농화학과

(Received February 22, 1997)

Screening of Prolyl Endopeptidase Inhibitors from Natural Products

Kyung-Hee Lee, Hyun-Jin Lee, Hun-Il Park,
Eun-Ok Hong and Kyung-Sik Song*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National
University, Taegu 702-701, Korea

Abstract—One hundred and seventy crude drugs were screened for prolyl endopeptidase (PEP) inhibitors. Among them, 80% methanolic extract of 18 medicinal plants such as *Polygonum cuspidata*, *Sanguisorba officinalis*, *Eugenia caryophyllata*, *Rubus coreanus*, *Cinnamomum cassia* (Cassiae Cortex and Cinamomomi Ramulus), *Rheum palmatum*, *Ulmus pumila*, *Sorbus commixta*, *Areca catechu*, *Uncaria sinensis*, *Terminalia chebula*, *Caesalpinia sappan*, *Nelumbo nucifera*, *Machilus thunbergii*, *Paeonia moutan*, *Elscholtzia patrini* and *Cynomorium coccineum* inhibited more than 70% of PEP activity at a concentration of 40 ppm. The active principles of *P. moutan*, *M. thunbergii*, *T. chebula*, *A. catechu*, *S. commixta*, *R. palmatum*, *R. coreanus*, *E. caryophyllata* and *P. cuspidata* were transferred into organic solvents, which showed more than 75% inhibition at 5 ppm.

Keywords □ Alzheimer disease, Prolyl endopeptidase inhibitor, Screening, Natural products.

단독 혹은 혈관계질환과 병합되어 치매의 원인이 되고 있는 것으로 알려진 Alzheimer disease(AD)¹⁾는 치매로 사망한 중년 여인의 뇌에서 특징적인 병리학적 소견 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle: NFT) 및 amyloid혈관을 발견한 Alois Alzheimer의 이름을 딴데서 유래한다.²⁾ 신경세포내에서 보여지는 NFT의 주요 구성성분은 tau protein이며³⁾ 또한 amyloid와 그 주변의 팽창한 변성 돌기로부터 유래되는 노인반은 β protein 또는 β /A4 protein으로부터 형성된다.⁴⁾ 노인성 치매의 중요한 병변 중 하나는 세포내와 혈관에 침착하는 amyloid β protein인 것으로 알려져 있으며 그 결과 뇌기능의 광범위한 장애가 오게 된다. Amyloid β protein은 막에

1/3이, 막외측에 2/3가 위치하고 있는데 아직은 어떻게 이 β protein이 큰 분자의 amyloid precursor protein에서 잘라져서 유래되는지는 확실히 밝혀지지 않고 있다. 그러나 정상상태의 뇌에서는 β protein의 N말단의 15 혹은 16 번째 아미노산 부위가 amyloid degrading enzyme (ADE)에 의해 절단되어 세포외로 유리되지만 AD의 뇌에서는 prolyl endopeptidase (PEP) 등의 효소에 의해 다른 부위의 β 단백질이 절단되어 β /A4 amyloid를 형성하고 이것이 뇌내에 축적되는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁹⁾

한편 PEP (EC 3.4.21.26)는 peptide의 proline잔기에 높은 기질 특이성을 나타내는 intracellular endopeptidase의 일종으로 Walter 등¹⁰⁾에 의해 인간의 자궁내에서 oxytocin을 파괴하는 enzyme으로 처음 발견되었다. 현재까지 이 효소의 정확한 생리역할에 대하여는 알려지지 않고 있으나 최근 이 효소가 memo-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-950-5715 (팩스) 053-950-5715

ry process에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다는 흥미로운 보고가 있다. 실제로 잘 알려진 PEP 저해제인 *N*-benzyloxycarbonyl-proline (Z-Pro)와 *N*-benzyloxycarbonyl-glycyl-proline (Z-Gly-Pro)^{11, 12)} 등은 쥐에 있어 항건망 효과를 보여주고 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 PEP inhibitor의 하나인 Z-Proprinal이 흰쥐 건망 model에 대해 효과를 나타내는 것으로 보고되어¹²⁾ PEP inhibitor가 치매에 있어 기억 및 학습장애에 대한 연구와 치료에 매우 유용할 것으로 기대된다.

실험방법

시약 및 재료 - 본 연구에 사용한 생약은 대구시 소재 한약재상에서 구입하여 사용하였으며 prolyl endopeptidase 및 기질은 일본 생화학공업 (Seikagakukougyo, Co., Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. 한편 본 실험에서 positive control로 사용한 Z-Proprinal은 Bakker¹³⁾의 방법에 준하여 합성하였다.

시료의 조제 - 우선 1차 screening을 위하여 구입한 건조시료 2g을 100 ml의 80% 수성 MeOH에 15일간 상온에서 냉침한 후 여과하고 각 추출물 10 µl를 효소 반응액 중 가하여 저해활성을 측정하였으며 이렇게 하여 선발된 천연물에 대하여는 추출물을 농축후 적당량의 MeOH을 가하여 10, 40, 80 ppm의 농도로 맞추어 2차 screening을 행하였다. 또한 2차 screening에서 선발된 천연물에 대하여는 농축 잔사에 대하여 상법에 의하여 *n*-hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH로 분획하고 각 분획을 MeOH로 희석하여 1 및 5 ppm의 농도로 조절하여 3차 screening에 이용하였다.

효소저해 활성의 측정은 각 시료에 대하여 2구씩 2회 반복 실험하였으며 그 평균치로 저해활성을 표시하였다.

생물검정 - PEP의 효소활성 측정은 Toda 등¹⁴⁾이 이용한 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 210 µl, 2mM Z-Gly-Pro-pNA (in 40% dioxane) 20 µl, sample 10 µl, 0.1 unit/ml PEP 10 µl의 mixture 250 µl를 30°C에서 30분간 incubation한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하고 (A) 따로 0.1M Tris-HCl (pH 7.0) 240 µl, sample 10 µl의 mixture를 준비하여 역시 410 nm에서 흡광도를 측정한 후 (B)

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A_{410} \text{ of Control} - (A - B)}{A_{410} \text{ of Control}} \times 100$$

로나타내어 활성의 지표로 삼았다. Control은 sample 대신 증류수를 사용했을 때의 A₄₁₀값이다.

결과 및 고찰

일반적으로 많은 양의 시료를 검토해야하는 1차 screening에 있어서 각 시료를 농도별로 조절하여 저해활성을 측정하는 것은 많은 시간과 노력을 필요로 한다. 따라서 전술한 방법에 따라 추출물의 농도조절 없이 일차 screening을 행하도록 하였다. 총 170종의 생약에 대하여 저해활성을 검토하였으며 그 결과 이들 중 저해활성이 50%이상인 대황, 적작약, 만삼, 하고초, 감국 등의 시료 57종이 선발되었으며 이들을 2차 screening에 이용하도록 하였다. 한편 한방서에서 두통, 현훈, 신경쇠약 등에 사용되는 것으로 기재되어¹⁵⁾ 향치매, 또는 항건망효과와 관련이 있을 것으로 예상된 황련, 천마, 백복신, 오수유, 조구등, 모려, 단삼, 백지, 석창포, 연자육, 향부자, 시호, 원지, 천궁, 산조인, 하수오 등에 높은 활성이 나타날 것으로 기대하였으나 이들중 황련, 조구등, 향부자, 단삼만이 비교적 높은 활성을 나타내었을 뿐 다른 생약에서는 거의 활성이 나타나지 않았다. 1차 screening의 결과는 Table I에 요약하였다.

선발된 57종의 생약에 대하여 농도별 활성의 차이를 비교하기 위하여 10, 40, 80 ppm으로 희석된 시료를 준비하여 이들에 대하여 활성을 재검토하도록 하였다. 2차 screening의 결과 80 ppm의 농도에서는 실험대상 시료의 약 반수가 50%이상의 저해율을 나타내었다. 따라서 대상 생약의 범위를 좀 더 좁히기 위하여 40 ppm의 농도에서 70%이상의 저해활성을 나타낸 호장근, 지유, 정향, 복분자, 육계, 대황, 계지, 유근피, 마가목, 빈랑자, 조구등, 가자, 소목, 석련자, 후박, 목단피, 향유, 쇄양 등 18종의 생약을 대상으로 3차 screening을 행하도록 하였다. 2차 screening의 결과는 Table II에 요약하였다.

한편 활성성분의 유기용매로의 이행정도를 알아보기 위하여 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH로 추출하여 각 분획의 활성을 재검토하도록 하였다. 이와같은 3차 screening의 실험결과는 Table III에 요약하였다. 이들

Table 1— Inhibitory activity of 80% methanolic extract of crude drugs against prolyl endopeptidase

Korean Name	Pharmaceutical Name	Scientific Name	Inhib.(%)
호장근(虎杖根)	Polygoni cuspidatae Radix	<i>Polygonum cuspidata</i> Sieb. et Zucc.	65.8
지유(地榆)	Sanguisorbae Radix	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	93.8
정향(丁香)	Caryophylli Flos	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg	100.4
복분자(覆盆子)	Rubus Fructus	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	95.1
육계(肉桂)	Cassiae Cortex	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	66.1
대황(大黃)	Rhei Rhizoma	<i>Rheum palmatum</i> L.	73.7
적작약(赤芍藥)	Paeoniae Radix	<i>Paeonia albiflora</i> Pallas var. <i>trichocarpa</i> Bunge	94.5
만삼(蔓蔘)	Codonopsis pilosulae Radix	<i>Codonopsis pilosula</i> Nannfeldt	77.5
고삼(苦蔘)	Sophorae Radix	<i>Sophora angustifolia</i> Sieb. et Zucc.	45.0
하고초(夏枯草)	Prunella Spica	<i>Prunella vulgaris</i> L. var. <i>liachina</i> Nakai	76.3
수질(水蛭)	Hirudo	<i>Hirudo nipponia</i> Whitman	13.2
죽여(竹茹)	Bambusae Caulis in Taeniis	<i>Phyllostachys nigra</i> (Lodd.) Munro var. <i>henonis</i> (Mitf.) Stapf et Rendle	37.2
사삼(沙蔘)	Adenophorae Radix	<i>Adenophora tetraphylla</i> (Thunb.) Fisch	-14.1
감국(甘菊)	Chrysanthemi Flos	<i>Chrysanthemum sinense</i> Sabine	95.8
대풍자(大風子)	Hydnocarpus Semen	<i>Hydnocarpus anthelmintica</i> Pierre	-11.0
록각상(鹿角霜)	Cervi Parvum Cornu	<i>Cervus elaphus</i> L.	-12.2
파고지(破故紙)	Psoraleae Fructus	<i>Psoralea corylifolia</i> L.	75.3
백두옹(白頭翁)	Pulsatillae Radix	<i>Pulsatilla koreana</i> Nakai	37.5
감인(감실, 茨實)	Euryales Semen	<i>Euryale ferox</i> Salisb.	-14.1
천마(天麻)	Gastrodial Rhizoma	<i>Gastrodia elata</i> Blume	-11.2
계내금(鷄內金)	Corium Stomachicum Galli	<i>Gallus ferrugineus</i> var. <i>domesticus</i> Brisson	-6.0
신국(神麴)	Massa Medicata Fermentata		-9.5
포공영(蒲公英)	Taraxaci Radix	<i>Taraxacum platycarpum</i> H. Dahlstaedt	50.5
황기(黃芪)	Astragali Radix	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	12.4
계지(桂枝)	Cinnamomi Ramulus	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	60.5
지모(知母)	Anemarrhenae Rhizoma	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	19.0
오약(烏藥)	Linderae Radix	<i>Lindera strychnifolia</i> Viel	36.9
만형자(蔓荊子)	Vitidis trifoliae Fructus	<i>Vitex rotundifolia</i> L.	-1.5
당귀(當歸)	Angelicae gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai	52.8
지골피(地骨皮)	Lycii Cortex Radicis	<i>Lycium chinense</i> Miller	-9.8
우슬(牛膝)	Achyranthis Radix	<i>Achyranthes japonica</i> Nakai	2.1
소엽(蘇葉)	Perillae Herba	<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>crispa</i> Decaisne	62.6
지부자(地膚子)	Kochiae Fructus	<i>Kochia scoparia</i> Schrader	23.5
소회향(小茴香)	Foeniculi Fructus	<i>Anethum graveolens</i> L.	-11.5
유근피(榆根皮)	Ulmii Cortex	<i>Ulmus pumila</i> L.	94.1
은행(銀杏)	Ginkgo Semen	<i>Ginkgo biloba</i> L.	-19.1
곽향(藿香)	Pogostemon Herba	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth	33.7
관동화(款冬花)	Farfarae Flos	<i>Tussilago farfara</i> L.	46.0
구맥(瞿麥)	Dianthi Herba	<i>Dianthus chinensis</i> L.	12.8
금은화(金銀花)	Lonicerae Flos	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg	25.6
마가목(馬家木)	Sorbi Lignum	<i>Sorbus commixta</i> Hedl.	79.1
목과(木瓜)	Chaenomeles Fructus	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	99.9
백부근(百部根)	Stemonae Radix	<i>Stemona japonica</i> Miquel	36.2
백부자(百附子)	Aconiti Koreani Rhizoma	<i>Aconitum koreanum</i> Raymond	22.8
백선피(百鮮皮)	Dictamni Radicis Cortex	<i>Dictamnus albus</i> L.	33.1
상백피(桑白皮)	Mori Radicis Cortex	<i>Diploclisia glaucescens</i> (Bl.) Diels	31.0
선퇴(蟬退)	Cicadae Periostracum	<i>Cryptotympana atrata</i> Fabricius	19.5
소자(蘇子)	Perillae Semen	<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>crispa</i> Decaisne	47.7
아교주(阿膠珠)	Asini Gelatinum	<i>Equus asinus</i> L.	2.2
육종용(肉從蓉)	Cistanches Herba	<i>Cistanche salsa</i> G. Beck	39.0
인진호(茵陳蒿)	Artemisiae Messerschmidtiana Herba	<i>Artemisia Messerschmidtiana</i> Besser var. <i>viridis</i> Besser for. <i>typica</i> Nakai	76.7
천문동(天門冬)	Asparagi Radix	<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour) Merr	32.1
신이(辛夷)	Magnoliae Flos	<i>Magnolia kobus</i> A.P. De Candolle	31.4
토사자(菟絲子)	Cuscutae Semen	<i>Cuscuta australis</i> R. Brown	50.7
지각(枳殼)	Aurantii Fructus	<i>Citrus aurantium</i> L.	7.1
치자(梔子)	Gardeniae Fructus	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	61.9
민랑자(檳榔子)	Arecae Semen	<i>Areca catechu</i> L.	92.0
세신(細辛)	Asiasari Radix	<i>Asarum sieboldii</i> Miquel	6.2

Table I — Continued

Korean Name	Pharmaceutical Name	Scientific Name	Inhib.(%)
차전자(車前子)	Plantaginis Semen	<i>Plantago asiatica</i> De Candolle	11.6
목죽(目賊)	Equiseti Herba	<i>Equisetum hiemale</i> L.	37.1
조구둥(釣鉤藤)	Uncariae Ramulus et Uncus	<i>Uncaria sinensis</i> (Oliv.) Havil	99.5
택사(澤瀉)	Alismatis Rhizoma	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk	11.8
미자(五味子)	Schizandrae Fructus	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon	4.8
진피(陳皮)	Aurantii nobilis Pericarpium	<i>Citrus nobilis</i> Makino	22.9
파극(巴戟)	Morindae officinalis Radix	<i>Morinda officinalis</i> How	-4.1
애엽(艾葉)	Artemisiae Folium	<i>Artemisia argyi</i> Leveil. et Vant	55.8
목통(木通)	Akebiae Lignum	<i>Akebia quinata</i> Decaisne	10.1
마황(麻黃)	Ephedrae Herba	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	19.3
청피(靑皮)	Citri immaturi Pericarpium	<i>Citrus tanger</i> Hort. et Tanaka	38.3
행인(杏仁)	Armeniacaе Semen	<i>Prunus armeniaca</i> Maximowicz	-10.0
백출(白朮)	Atractylodis Rhizoma Alba	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz	8.0
현삼(玄參)	Scrophulariae Radix	<i>Scrophularia buergeriana</i> Miquel	-6.1
삼칠근(三七根)	Pseudoginseng Radix	<i>Panax pseudoginseng</i> Wall var. <i>notoginseng</i> Hoo & Tseng	6.4
방기(防己)	Sinomeni Caulis et Rhizoma	<i>Sinomenium acutum</i> Rehder et Wilson	23.3
모려분(牡蠣粉)	Concha Ostreae	<i>Ostrea rivularis</i> Gould	-24.2
황정(黃精)	Polygonati falcati Rhizoma	<i>Polygonatum falcatum</i> A. Gray	0.0
단삼(丹參)	Salviae Radix	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	75.8
백급(白及)	Bletillae Tuber	<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb	-12.9
결명자(決明子)	Cassiae Semen	<i>Cassia tora</i> L.	-2.5
가자(訶子)	Chebule Fructus	<i>Terminalia chebula</i> Retz	98.6
산초(山椒)	Zanthoxyli Fructus	<i>Zanthoxylum piperitum</i> De Candolle	-1.5
와송(瓦松)	Orostachyos Herba	<i>Orostachys fimbriatus</i> (Turcz.) Berge	-1.4
자초(紫草)	Lithospermum Radix	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc.	-9.1
개자(芥子)	Sinapis Semen	<i>Brassica juncea</i> Cosson	-4.9
연교(連翹)	Forsythiae Fructus	<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	66.2
오령지(五靈脂)	Trogopterum Faeces	<i>Trugopterus xanthipes</i> Milne-Edwards	12.1
봉출(蓬朮)	Zedoariae Rhizoma	<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg.) Rosc.	4.0
산사육(山楂肉)	Crataegi Fructus	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	90.1
산수유(山茶葉)	Corni Fructus	<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.	76.3
산약(山藥)	Dioscoreae Rhizoma	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne	11.0
석창포(石菖蒲)	Acori Rhizoma	<i>Acorus gramineus</i> Soland	38.2
승마(升麻)	Cimicifugae Rhizoma	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov	46.1
연자육(蓮子肉)	Nelumbinis Semen	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	110.7
용안육(龍眼肉)	Longanae Arillus	<i>Euphoria longana</i> Lamarck	23.2
위령선(威靈仙)	Clematidis Radix	<i>Clematis mandshurica</i> Maximovicz	27.6
익모초(益母草)	Leonuri Herba	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	60.5
전호(前胡)	Peucedani Radix	<i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffmann	15.2
초과(草果)	Tsaoko Fructus	<i>Amomum tsao-ko</i> Crevoet et Lem.	79.8
후박(厚朴)	Magnoliae Cortex	<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	85.1
용담(龍膽)	Gentianae scabrae Radix	<i>Gentianae scabra</i> Bunge var. <i>buergeri</i> Max.	23.9
백편두(白扁豆)	Dolichoris Semen	<i>Dolichos lablab</i> L.	-11.3
조각자(早角刺)	Gleditsiae Spina	<i>Gleditsia officinalis</i> Hemsley	8.2
패모(貝母)	Fritillariae Rhizoma	<i>Fritillaria verticillata</i> Willdenow var. <i>thunbergii</i> Baker	30.0
측백(側柏)	Thuhae Folium	<i>Thuja orientalis</i> L.	92.8
감초(甘草)	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer et De Candolle	51.5
향부자(香附子)	Cyperi Rhizoma	<i>Cyperus rotundus</i> L.	51.1
시호(柴胡)	Bupleuri Radix	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	86.2
창출(蒼朮)	Atractylodis Rhizoma	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	46.8
등심초(燈心草)	Junci Caulis Medulla	<i>Juncus decipiens</i> Buchen.	39.5
원지(遠志)	Polygalae Radix	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	28.6
지실(枳實)	Aurantii Fructus Immaturus	<i>Citrus aurantium</i> L.	71.4
목향(木香)	Saussureae Radix	<i>Saussurea lappa</i> Clarke	53.4
두충(杜沖)	Eucommiae Cortex	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	61.6
우방자(牛蒡子)	Bardanae Fructus	<i>Arctium lappa</i> L.	48.7
독활(獨活)	Angelicae Tuhou Radix	<i>Aralia cordata</i> Thunb.	-2.1
창이자(蒼耳子)	Xanthii Fructus	<i>Xanthium strumarium</i> L.	-6.0

Table I—Continued

Korean Name	Pharmaceutical Name	Scientific Name	Inhib.(%)
몰약(沒藥)	Myrrha	<i>Commiphora molmol</i> Engles	-7.7
괄루인(括樓仁)	Trichosanthis Semen	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximowicz	8.0
저령(猪苓)	Fungus Poria	<i>Poria cocos</i> Wolf	-31.0
천궁(川芎)	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> Makino	1.1
산조인(酸棗仁)	Zizyphi Semen	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	-4.7
하수오(何首烏)	Polygoni multiflori Radix	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg	11.8
왕불유행(王不留行)	Melandrii Herba	<i>Melandryum firmum</i> Rohrbach	22.7
대추(大棗)	Zizyphi Fructus	<i>Zizyphus vulgaris</i> La Marck var. <i>inermis</i> Bunge	-19.5
의이인(薏苡仁)	Coicis Semen	<i>Coix lachryma-jobi</i> L. var. <i>ma-yuen</i> Staph.	59.7
황련(黃連)	Coptidis Rhizoma	<i>Coptis japonica</i> Makino	94.0
천산갑(穿山甲)	Manitis Squama	<i>Manis pentadactyla</i> L.	17.7
목단피(牡丹皮)	Moutan Cortex	<i>Paeonia moutan</i> Sims.	87.7
오매(烏梅)	Mume Fructus	<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.	19.2
백개자(白芥子)	Sinapis Semen Alba	<i>Sinapis alba</i> L.	-5.3
쇄양(鎖陽)	Cynomorii Herba	<i>Cynomorium coccineum</i> L.	104.5
익지인(益智仁)	Alpiniae oxyphyllae Fructus	<i>Alpina oxyphylla</i> Miq.	-23.0
방풍(防風)	Ledebouriellae Radix	<i>Saposhnikovia divaticata</i> Schischk	56.9
자완(紫菀)	Asteris Radix et Rhizoma	<i>Aster tataricus</i> L. f.	-4.9
초오(草烏)	Aconiti Tuber	<i>Aconitum</i> spp. (<i>A. tryphyllum</i> Nakai)	-4.8
진침향(真沈香)	Aquilariae Lignum	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxburgh	53.6
골쇄보(骨碎補)	Drynariae Rhizoma	<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Smith	74.3
산두근(山豆根)	Sophorae subprostratae Radix	<i>Sophora subprostrata</i> Chun et T. Chen	49.5
천남성(天南星)	Arisaematis Rhizoma	<i>Arisaema consanguineum</i> Schott	-17.6
음양곽(淫羊藿)	Epimedii Herba	<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	58.5
인삼(人蔘)	Ginseng Radix Alba	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	-12.8
석련자(石蓮子)	Nelumbinis Semen	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	94.7
황금(黃芩)	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i> George	85.1
구기자(枸杞子)	Lycii Fructus	<i>Lycium chinense</i> Miller	20.7
홍화(紅花)	Carthami Flos	<i>Carthamus tinctoris</i> L.	93.5
황백(黃柏)	Phellodendri Cortex	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	74.9
현호채(玄胡索)	Corydalis Tuber	<i>Corydalis ternata</i> Nakai	-13.4
오수유(吳茱萸)	Evodiae Fructus	<i>Evodia officinalis</i> Dode	69.5
반하(半夏)	Pinelliae Tuber	<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach	-15.4
속단(續斷)	Dipsaci Radix	<i>Phlomis umbrosa</i> Turczaninow	8.8
해동피(海東皮)	Kalopanaxii Cortex	<i>Erythrina variegata</i> L. var. <i>orientalis</i> (L.) Merr.	2.3
맥아(麥芽)	Hordei Fructus Germiniatu	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i> Aschers.	29.7
편축(篇蓄)	Polygoni avicularis Herba	<i>Polygonum aviculare</i> L.	35.4
향유(香薷)	Elsholtziae Herba	<i>Elscholtzia patini</i> Garcke	65.2
갈근(葛根)	Puerariae Radix	<i>Pueraria thunbergiana</i> Bentham	39.6
건강(乾姜)	Zingiberis Rhizoma	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	19.0
구판(龜板)	Testudinis Plastrum	<i>Chinemys reevesii</i> Gray	30.0
도인(桃仁)	Dorsicae Semen	<i>Prunus persica</i> Sieb. et Zucc.	58.4
백복신(白茯苓)	Poria	<i>Pachyama hoelen</i> Rumph	-13.0
맥문동(麥門冬)	Liriois Tuber	<i>Liriope koreana</i> Nakai	-13.4
지황(地黃)	Rehmanniae Radix	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var <i>purpurea</i> Makino	-7.6
사인(砂仁)	Amomi Semen	<i>Amomum xanthioides</i> Wallich	-7.8
박하(薄荷)	Menthae Herba	<i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> Malinvaud	63.4
백복령(白茯苓)	Hoelen	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	15.3
백지(白芷)	Angelicae dahuricae Radix	<i>Angelica dahurica</i> Bentham et Hooker	29.3
인동(忍冬)	Lonicerae Folium	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg	14.6
견우자(牽牛子)	Pharbitidis Semen	<i>Pharbitis nil</i> (L.) Choisy	-3.1
나복자(蘿藦子)	Raphani Semen	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>raphanistroides</i> Makino	-3.6
천화분(天花粉)	Trichosanthis Radix	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximowicz	2.0
소목(蘇木)	Sappan Lignum	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	81.4

중 비교적 활성이 우수한 것으로 나타난 시료들 중에는 지유, 정향, 유근피, 빈랑자, 가자, 쇠양 등과 같이 다량의 tannin을 함유하는 것으로 보고된 생약들이 있어¹⁶⁾ 이들

의 활성이 tannin과 단백질의 비특이적 결합에 의한 false-positive reaction일 가능성을 배제할 수 없었다. 따라서 우선 비교적 tannin이 적게 함유된 것으로 알

Table II— Concentration-dependent activity of 80% methanolic extract of the selected crude drugs against prolyl endopeptidase

Korean Name	Scientific Name	Inhibition(%)		
		10 ppm	40 ppm	80 ppm
대황(大黃)	<i>Rheum palmatum</i> L.	5.4	81.1	87.9
석작약(赤芍藥)	<i>Paeonia albiflora</i> Pallas var. <i>trichocarpa</i> Bunge	-24.4	8.7	91.0
만삼(蔓蓼)	<i>Codonopsis pilosula</i> Nannfeldt	-17.1	-7.2	13.6
하고초(夏枯草)	<i>Prunella vulgaris</i> L. var. <i>liachina</i> Nakai	-9.5	30.8	59.5
감국(甘菊)	<i>Chrysanthemum sinense</i> Sabine	5.4	18.1	48.2
과고지(破故紙)	<i>Psoralea corylifolia</i> L.	12.3	26.0	42.8
포공영(蒲公英)	<i>Taraxacum platycarpum</i> H. Dahlstaedt	8.0	30.5	58.6
계지(桂枝)	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	24.8	74.5	90.5
황백(黃柏)	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	18.3	53.0	67.9
오수유(吳茱萸)	<i>Evodia officinalis</i> Dode	9.2	14.4	25.5
당귀(當歸)	<i>Angelica gigas</i> Nakai	-1.1	2.6	7.0
소엽(蘇葉)	<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>crispa</i> Decaisne	8.0	37.2	62.9
유근피(楡根皮)	<i>Ulmus pumila</i> L.	56.7	92.6	92.5
마가목(馬家木)	<i>Sorbus commixta</i> Hedl	94.5	97.6	100.2
목과(木瓜)	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	15.2	29.6	51.0
인진호(茵陳蒿)	<i>Artemisia Messer-schmidtiana</i> Besser var. <i>viridis</i> Besser for. <i>typica</i> Nakai	7.8	35.1	76.5
토사자(兔絲子)	<i>Cuscuta australis</i> R. Brown	0.3	10.8	13.2
향유(香薷)	<i>Elscholtzia patrini</i> Garcke	11.9	72.4	90.7
도인(桃仁)	<i>Prunus persica</i> Sieb. et Zucc.	4.5	4.2	18.9
치자(梔子)	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	0.9	3.3	23.7
빈랑자(檳榔子)	<i>Areca catechu</i> L.	90.0	91.4	96.1
조구등(釣鉤藤)	<i>Uncaria sinensis</i> (Oliv.) Havil	23.6	70.9	90.0
애엽(艾葉)	<i>Artemisia argyi</i> Leveil. et Vant	17.3	41.4	53.4
단삼(丹參)	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	9.6	15.2	36.9
가자(訶子)	<i>Terminalia chebula</i> Retz	96.0	97.4	98.2
박하(薄荷)	<i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> Malinvaud	2.1	13.9	26.1
황금(黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> George	12.2	16.7	16.7
홍화(紅花)	<i>Carthamus tinctoris</i> L.	-11.4	5.8	4.9
측백(側柏)	<i>Thuja orientalis</i> L.	8.4	23.6	35.6
감초(甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer et De Candolle	-1.9	5.1	-3.4
향부자(香附子)	<i>Cyperus rotundus</i> L.	2.8	-3.5	-0.2
시호(柴胡)	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	8.8	4.7	21.2
지실(枳實)	<i>Poncirus trifoliata</i> Ratinesgue	-9.7	-0.2	-2.6
목향(木香)	<i>Saussurea lappa</i> Clarke	-13.5	-4.9	-2.2
두충(杜沖)	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	1.5	30.5	46.8
의이인(薏苡仁)	<i>Coix lachryma-jobi</i> L. var. <i>mayuen</i> Stapf.	-3.0	4.7	5.6
황련(黃連)	<i>Coptis japonica</i> Makino	6.7	11.1	41.0
목단피(牡丹皮)	<i>Paeonia moutan</i> Sims.	48.1	58.8	90.3
쇄양(鎖陽)	<i>Cynomorium coccineum</i> L.	1.3	67.2	94.9
방풍(防風)	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischk	2.1	0.0	4.7
진침향(眞沈香)	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxburgh	-11.5	5.9	7.5
골쇄보(骨碎補)	<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Smith	5.6	24.2	40.6
음양곽(淫羊藿)	<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	-14.2	-2.1	10.0
산사육(山柢肉)	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	0.7	12.2	42.3
산수유(山茱萸)	<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.	30.0	23.6	10.9
연자육(蓮子肉)	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	23.3	17.4	21.7
익모초(益母草)	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	10.7	-3.8	8.2
석련자(石蓮子)	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	83.2	94.6	100.3
초과(草果)	<i>Amomum tsaoko</i> Crevast et Lem.	9.8	2.7	13.9
후박(厚朴)	<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	96.2	95.5	95.6
호장근(虎杖根)	<i>Polygonum cuspidata</i> Sieb. et Zucc.	89.9	87.7	89.9
지유(地榆)	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	86.5	88.0	89.5
정향(丁香)	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg	73.6	94.0	85.8
복분자(覆盆子)	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	84.3	93.5	96.9
소목(蘇木)	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	23.0	92.7	94.9
연교(連翹)	<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	16.5	42.3	51.3
육계(肉桂)	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	25.2	89.2	93.4

Table III — Inhibitory activity of organic solvent-soluble fractions of the crude drugs against prolyl endopeptidase

Korean Name	Scientific Name	Inhibition(%)							
		n-Hex		EtOAc		n-BuOH		H ₂ O	
		1	5	1	5	1	5	1	5*
호장근(虎杖根)	<i>Polygonum cuspidata</i> Sieb. et Zucc.	6.3	10.5	7.9	24.0	14.4	87.6	10.7	11.8
지유(地榆)	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	15.3	14.0	17.5	69.4	17.5	31.9	16.8	27.9
정향(丁香)	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg	6.9	9.8	22.6	94.2	10.8	76.8	7.8	16.9
복분자(覆盆子)	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	17.8	13.8	8.6	79.4	11.7	6.20	13.2	30.1
육계(肉桂)	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	2.4	6.2	-3.5	4.1	-1.9	7.4	-1.8	11.7
대황(大黃)	<i>Rheum palmatum</i> L.	7.7	9.4	16.8	57.9	17.1	89.3	0.9	8.6
계지(桂枝)	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	-4.2	7.3	2.4	6.5	11.8	10.2	10.8	13.9
유근피(榆根皮)	<i>Ulmus pumila</i> L.	8.4	2.7	4.8	0.8	-3.8	2.5	5.1	4.9
마가목(馬家木)	<i>Sorbus commixta</i> Hedl.	31.5	65.9	36.8	75.5	62.3	93.5	46.6	100.4
빈랑자(檳榔子)	<i>Areca catechu</i> L.	17.1	16.9	25.2	49.7	65.9	89.1	26.5	76.0
조구등(釣鈎藤)	<i>Uncaria sinensis</i> (Oliv.) Havil	20.8	19.7	15.1	24.5	19.6	43.9	12.0	19.4
가자(訶子)	<i>Terminalia chebula</i> Retz	13.9	21.4	73.7	97.5	32.9	95.9	92.7	98.2
소목(蘇木)	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	6.8	0.6	13.3	11.5	16.4	7.4	11.4	13.5
석련자(石蓮子)	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	41.9	41.7	30.0	44.7	32.9	53.2	38.4	57.1
후박(厚朴)	<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	39.5	39.9	40.2	67.2	55.9	89.3	38.2	64.9
목단피(牡丹皮)	<i>Paeonia moutan</i> Sims.	6.9	36.6	94.0	99.5	14.5	32.7	-1.3	12.1
향유(香薷)	<i>Elscholtzia patrinii</i> Garcke	6.1	6.6	13.8	19.1	2.7	9.6	6.5	9.0
쇄양(鎖陽)	<i>Cynomorium coccineum</i> L.	2.5	13.9	7.2	27.5	21.4	66.1	-0.6	4.2

*ppm

려져 있으며 EtOAc 가용성 분획으로 활성이 이행되는 것으로 나타난 복분자, 후박, 목단피에 대하여 활성성분의 분리를 시도하고있으며 tannin함유생약 중 유기용매층에서 높은 활성을 나타낸 가자, 정향, 빈랑자 등에 대하여도 활성성분의 분리를 실시하고 있다.

한편 현재까지 보고된 PEP 저해제로서는 합성 peptide 유도체인 Z-Gly-Pro, Z-Pro-Val, Z-Pro-prolinal 등이 발표된 바 있으며¹⁷⁾ 또한 또다른 연구그룹들은 토양방선균으로부터 수종의 oligo peptide계통의 화합물을 보고하였다.^{18~20)} 그러나 이러한 oligo peptide계통의 화합물들은 그 친수성으로 인해 경구투여시 BBB (Blood-Brain Barrier)를 통과하기 어려운 단점이 있어 의약품으로의 개발 가능성은 전망이 밝지 못한 것으로 평가되고 있다. Nakajima 등은 BBB를 통과할 수 있는 소수성 비 peptide계 pyridine 및 thiophene 유도체를 합성하여 rat brain의 PEP에 대한 저해활성을 조사한 결과 K_i=0.95 nM의 농도에서 저해활성을 나타내는 것으로 보고한 적이 있으나^{11, 21)} 아직까지 유의성 있는 효과를 나타내는 소수성 저분자물질에 대한 보고는 거의 찾아볼 수 없다. 따라서 본 screening의 결과를 토대로 각종 생약으로부터 유기용매층으로 이행되는 소수성 PEP효소제를 탐색한다면 치매의 예방, 치료제 또는 항건망제 선도물질의 개발을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

총 170종 생약의 80% MeOH 추출물에 대하여 prolyl endopeptidase에 대한 저해활성을 측정하여 40 ppm의 농도에서 70% 이상의 저해활성을 나타내는 호장근, 지유, 정향, 복분자, 육계, 대황, 계지, 유근피, 마가목, 빈랑자, 조구등, 가자, 소목, 석련자, 후박, 목단피, 향유, 쇄양의 19종의 생약을 1차적으로 선별하였다. 또한 이들을 n-hexane, EtOAc 및 n-BuOH로 분배 추출한 후 각 분획의 활성을 조사한 결과 호장근, 정향, 복분자, 대황, 마가목, 빈랑자, 가자, 후박, 목단피의 9종이 5 ppm에서 75% 이상의 저해활성을 나타내는 것으로 확인되어 이들을 성분분석을 위한 최종 후보생약으로 선별하였다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 한국 학술진흥재단의 자유공모과제 연구비의 지원에 의하여 연구되었음을 감사드립니다.

문 헌

- 1) 서유현 : 알츠하이머병(Alzheimer disease: 노인성 치매)의 분자생물학, 생화학뉴스 12, 238 (1992).

- 2) Alzheimer, A. : uber eine eigenarte Erkrankung der Hirnrinde. *Zntrablbl Nervenheik* **30**, 177 (1907).
- 3) Nukina, N., Ihara, Y. : One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* **99**, 1541 (1986).
- 4) Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., Beyreuther, K. : Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4245 (1985).
- 5) Ishiura, S., Yamamoto, T., Yamamoto, M., Nojima, M., Aoyagi, T., Sugita, H. : Human skeletal muscle contains two major aminopeptidase. *J. Biochem. (Tokyo)* **102**, 1023 (1987).
- 6) Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Sugita, H. : Putative N-terminal splitting enzyme of amyloid A4 peptide is the multicatalytic proteinase, ingensin, which is widely distributed in mammalian cells. *FEBS Lett.* **257**, 388 (1989).
- 7) Ishiura, S., Nishikawa, T., Tsukahara, T., Momoi, T., Ito, H., Suzuki, K., Sugita, H. : Distribution of Alzheimer's disease amyloid A4-generating enzymes in rat brain tissues. *Neurosci. Lett.* **115**, 329 (1990).
- 8) Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata, K., Sugita, H. : Identification of a putative amyloid A4-generating enzyme as a prolyl endopeptidase. *FEBS Lett.* **260**, 131 (1990).
- 9) Tsukahara, T., Ishiura, S., Sugita, H. : An "ATP-dependent protease" and ingensin in K562 cells. *Eur. J. Biochem.* **117**, 261 (1988).
- 10) Walter, R., Shlank, H., Glass, J.D., Schwartz, I.L., Kerenyi, T.D. : Leucylglycinamide release from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* **173**, 827 (1971).
- 11) Nakajima, T., Kubota, A., Nakajima, K. : Anti-amnesic drugs and their post-proline cleaving enzyme inhibition. *Folia Pharmacol. Japan* **82**, 154 (1983).
- 12) Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H., Tsuru, D. : Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobio-Dyn.* **10**, 730 (1987).
- 13) Bakker, A. V., Jung, S., Spencer, R. W., Vinick, F. J. and Faraci, W. S. : Slow tight-binding of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem. J.* **271**, 559 (1990).
- 14) Toda, S., Obi, Y., Numata, K., Hamagishi, Y., Tomita, K., Komiyama, N., Kotake, C., Furumai, T. and Oki, T. : Eurystatins A and B. New prolyl endopeptidase inhibitors. I. Taxonomy, production, isolation and biological activities. *J. Antibiotics* **45**, 1573 (1992).
- 15) Namba, T. : *The encyclopedia of wakan-yaku with color pictures*, 2nd ed., Hoikusha, Osaka, Japan (1994).
- 16) 소학관 편저 : *중약대사전*, 상해과학기술출판사, 상해, 중국 (1975).
- 17) Tsuru, D., Yoshimoto, T. : 抗健忘症薬の開発-プロリルエンドペプチダーゼ 阻害劑の開発. *Bio Industry* **4**, 788 (1987).
- 18) Aoyagi, T., Nagai, M., Ogawa, K., Kojima, F., Okada, M., Ikeda, T., Hamada, M., Takeuchi, T. : Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase, produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiotics* **44**, 949 (1991).
- 19) Nagai, M., Ogawa, K., Muraoka, Y., Naganawa, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T. : Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase, produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. II. Structure determination and inhibitory activities. *J. Antibiotics* **44**, 956 (1991).
- 20) Kamei, H., Ueki, T., Obi, Y., Fukagawa, Y., Oki, T. : Protective effect of eurystatin A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors, on scopolamine-induced amnesia in rats. *Japan. J. Pharmacol.* **60**, 377 (1992).
- 21) Nakajima, T., Ono, Y., Kato, A., Maeda, J., Ohe, T. : Y-29794-a non-peptide prolyl endopeptidase inhibitor that can penetrate into brain. *Neurosci. Lett.* **141**, 156 (1992).