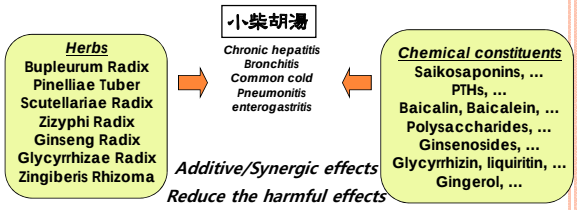
천연물의 활성 연구 방법

이기용
pinklee1@snu.ac.kr

생약 (生藥)의 발전

1. 자연상태의 식물, 동물, 광물 등 천연물 : 인류의 최초 질병 퇴치 수단으로 직접 치료에 사용하였음
2. 약효가 인정된 천연물을 수집, 재배, 저장하고 효과적으로 투여하는 방법을 모색
3. 천연물에서 약리 활성성분을 단리하여 작용 기전을 규명
4. 생약 성분을 화학적으로 변형시켜 보다 약효가 우수한 의약품을 제조

생약제제의 약효



생약의 약효

- 생약의 약효 ⟺ 생약의 성분
- 생약의 성분 중 한 개 또는 공통된 몇 개의 성분에 의한 것
- 전체 활성 성분간의 상가(相加), 상승(相乘), 및 상쇄(相殺) 작용의 총화
- 복합제로 투여 (한약 처방)하는 경우 - 처방의 구성, 투여량의 증감, 조제의 방법에 따라 약효가 다를 수 있다

생약의 성분이란?

생약성분은 식물형태와 함께 식물유전자(genotype)의 다른 표현형(phenotype)의 하나

대부분 생물(식물, 동물, 미생물)의 2차 대사산물이 대부분

약리작용을 가지는 천연유기 화합물

(pharmacologically active natural organic compound)

선도 화합물로서 새로운 역할 재조명

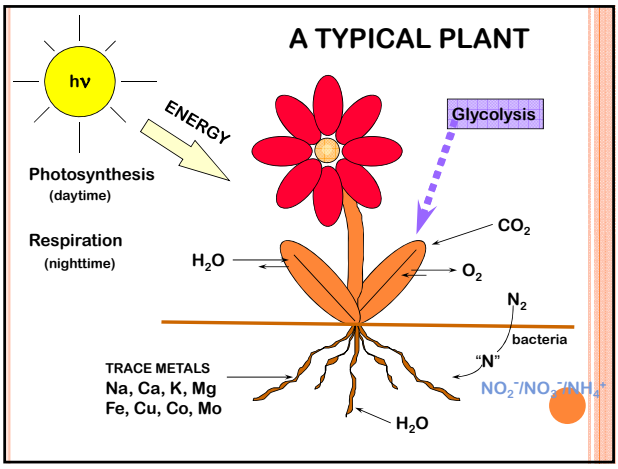
약용 식물의 성분

식물 성분 생합성 과정에 의한 구분

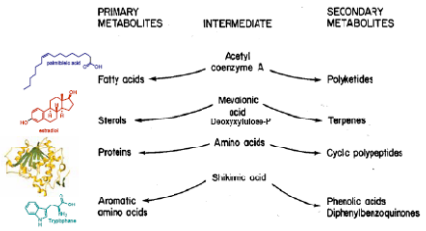
➢1차 대사 산물
- 식물이 생존하는데 필수적인 기본적인 대사 과정 속에서 생산되는 물질
- 거의 모든 식물에 함유되어 있음

➢2차 대사 산물
- 각 식물 특유의 생합성 과정에서 생산됨
- 활성 성분은 대부분이 여기에 속함

"어느 일정한 종류의 생물에 의해서만 생성되고 어떤 면에서 보면 활발한 대사활동도 없으며, 환경조건에 따라서는 생성되지 않을 수도 있는 화합물"



Intermediates linking primary and secondary metabolism



Secondary Metabolite?

Secondary metabolites **are those chemical compounds in organisms that are *not directly involved* in the normal growth, development or reproduction of organisms.** Secondary metabolites are *often species-specific* (or found in only a small set of species in a narrow phylogenetic group), and without these compounds the organism suffers from only a mild impairment, lowered survivability, aesthetic differences, or else no change in phenotype at all, especially when observed in controlled and optimized laboratory conditions.

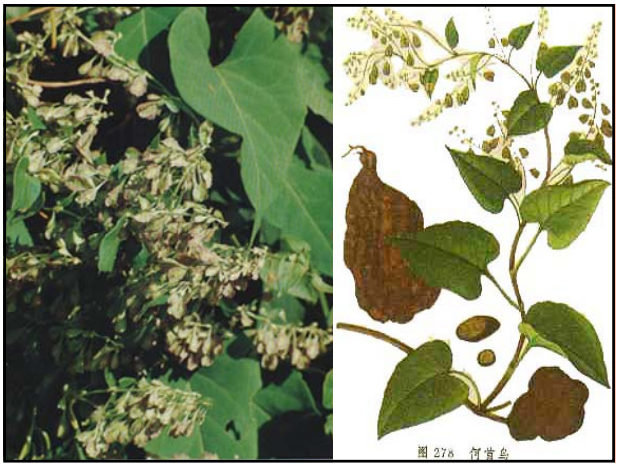
The function or importance of these compounds to the organism is usually of an *ecological nature* as they are used as defences against predators, parasites and diseases, for interspecies competition, and to facilitate the reproductive processes (coloring agents, attractive smells, etc).

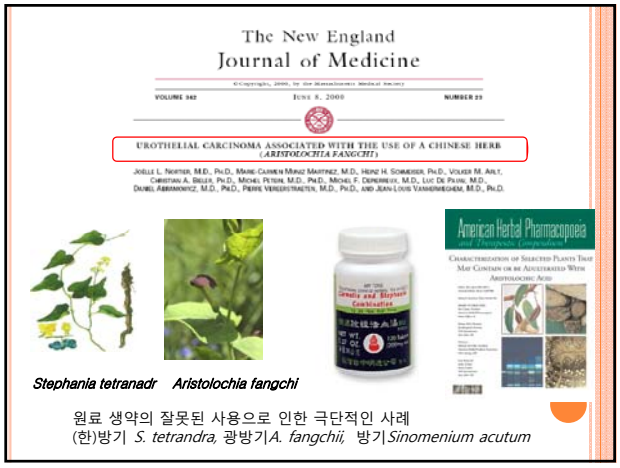
Modified from: *Secondary metabolite*. (2007, January 11). In *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. January 24, 2007, from http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Secondary_metabolite&oldid=100037073

Natural product = Secondary metabolites

천연물의 활성 성분

- 생물 종에 고유한 생합성 경로에 따라 생성되는 것
- 기원 (식물의 종)이 다르면 성분이 다를 수 있다
  - 백하수오, 적하수오
- 같은 종이라도 산지와 생육 조건이 다르면 성분 조성이나 함량이 다를 수 있다
  - 국산 생약, 수입 생약 - 신토불이





Stephania tetranadr *Aristolochia fangchi*

원료 생약의 잘못된 사용으로 인한 극단적인 사례
(한)방기 *S. tetrandra*, 광방기*A. fangchii*, 방기*Sinomenium acutum*

문제점

- 근연 식물의 무비판적인 대체 생약으로 사용
  - 생약의 사용 역사가 오래됨에 따라 관습적으로 사용되었음
- 각국의 사용 용도 차이
  - 기원이 같은 생약을 다른 용도로 사용
- 품질 검정법의 부재
  - 생육 조건이나 품종 등에 대한 검토 없이 사용

애로 사항

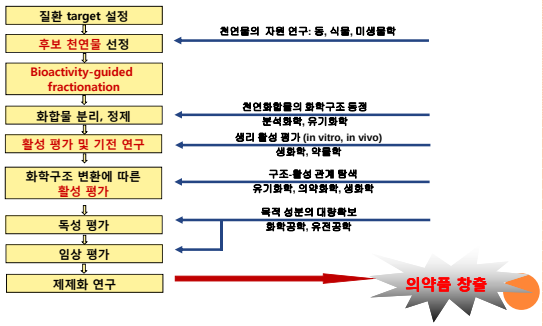
- 현대 약학적 해석이 불가능
  - 고전적인 대중 요법과 경험에 근거한 것이 대부분
  - 약효 검정 방법의 확립이 어렵다
  - 동물 시험을 통한 활성 성분 분리 시도가 실패할 가능성이 크다
  - 복합 성분에 의한 약효는 과학적으로 분석하는 것이 현재 불가능하다

천연물 연구의 장점, 가능성

- 생약의 성분은 다양한 화학 구조를 가지고 있다
  - 활성 성분이 직접 또는 유도체 합성을 통하여 보다 우수한 의약품의 개발에 응용
  - lead compound, model compound, 합성의 중간 원료로 이용
- 새로운 약물학적 기전 해석에 이용된다
- 인접학문과 공동 협력이 필요함

천연물에서 의약품은 어떠한 과정을 통해 개발되나?

천연물을 이용한 의약품 개발 과정



의약품 개발에서 천연물의 특징

- 대부분 천연물은 의약적 성질을 나타내는 저분자 물질로 생체 내에서 쉽게 흡수, 대사될 수 있는 장점을 가지고 있음
- 식물의 2차 대사산물은 일반적으로 일정한 과나 속에 한정하여 생산 되므로 이에 따른 화학분류는 시료의 선택에 방향을 제시할 수 있음
- 오랫동안 축적된 임상경험지식 이용 가능

- 식물에 대한 활성, 식물화학적 연구가 미미한 이유
  - 접근의 어려움에 따른 시료채취의 제한
  - 식물 중 탄닌이나 다른 단백질 침전성분에 의하여 활성검색법이 제기능을 발휘하지 못한 경우
  - 다양한 성분이 혼재되어 있어 활성이 가려질 수 있음
  - 활성 물질이 극미량 존재하기 때문에 분리와 양 확보가 어려움

Biological tools used in Bioassay

- Pure enzyme
- Primary cultured cells and continuous cell line
- Experimental animals

Pure Enzymes

✓AChE : 콜린성 신경의 손실에 따른 질환

ex) 치매 개선제

✓COX-2 : 염증작용에 관여

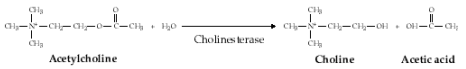
ex) 소염제

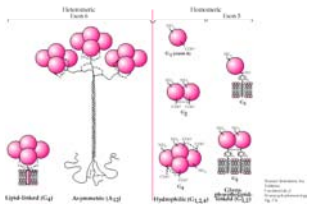
✓GOT, GPT : 간세포 손상의 검사시 이용

ex) 간염, 간경화 진단

Pure Enzymes

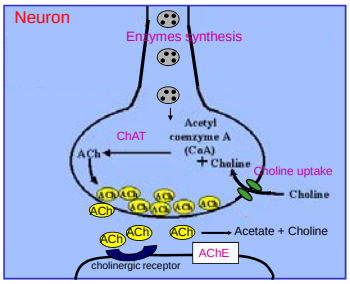
✓AChE : 콜린성 신경의 손실에 따른 질환 ex) 알쯔하이머씨 병



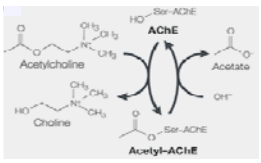


Characteristic of cholinergic neuronal loss

- Choline acetyltransferase ↓
- Acetylcholine synthesis ↓
- Choline uptake ↓
- Muscarinic receptor ↓



Acetylcholinesterase (AChE) activity assay



Electric eel AChE (type V-S) in PB (0.1M, pH 8.0)

↓ DTNB(dithiobisnitrobenzoate) Sample

Pre-incubation for 5 min at 36 °C

↓ Acetylthiocholine iodide

Incubation for 3 min at 36 °C

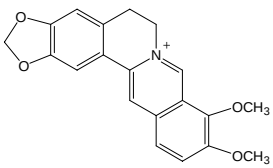
↓ Neostigmine bromide

Measurement of the absorbance at 412nm

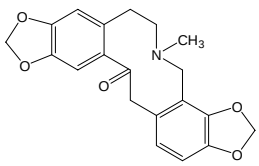
Corydalis ternata Nakai (Papaveraceae)



- used in sedative and anodyne in Korea
- Part used : dried tuber
- Known constituents; alkaloids (ca 0.5%)



Berberine



Protopine

INHIBITION OF PROTOPINE, BERBERINE AND REFERENCE COMPOUNDS ON ACHE AND BUCHE ACTIVITIES

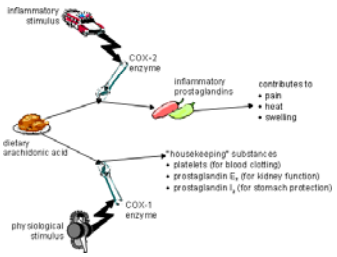
Compounds	AChE activity (%)	BuChE activity (%)
Protopine 100μM	74	-4
Berberine 2.5μM	91	-10
TPPA 10μM	-5	70
AAPP 10μM	100	-13

AChE source was electric eel AChE (Type V-S).
BuChE source was human serum BuChE.

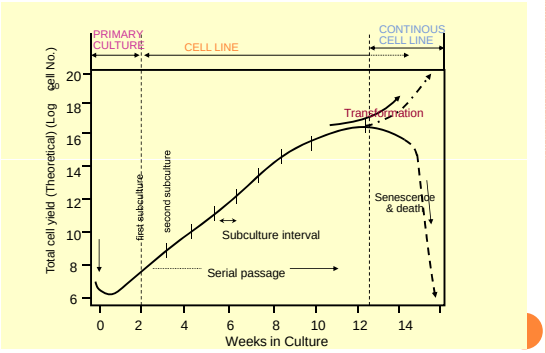
TPPA is tetraisopropyl pyrophosphoramide, specific inhibitor of BuChE.
AAPP is 1,5-bis (4-allyl dimethyl ammonium phenyl) pentan-3-one, specific inhibitor of AChE.

PURE ENZYMES

✓ **COX-2 : 염증작용에 관여 ex) 항염제**

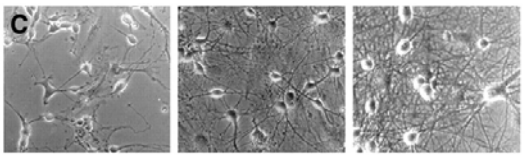


Primary culture



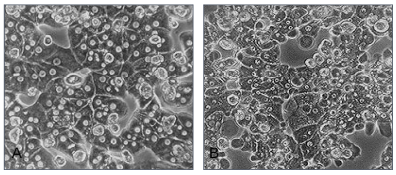
Primary Cultured Cell

Primary Cultured Rat Hippocampal Neurons

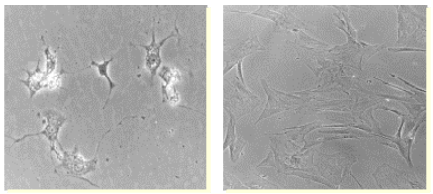


DIV: 3d 7d 14d

Primary Cultured Rat Hepatocytes

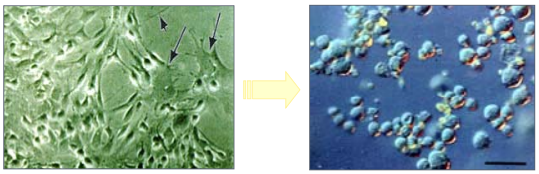


Primary Cultured Rat Hepatic Stellate Cells



Primary cultured cell

Transformed cell



rat embryonic retinal cell monolayer culture

Y79 retinoblastoma cells

PRIMARY CULTURE의 특징 및 장점

*** Natures**
- usually heterogenous
- have a low growth fraction
- express the specific properties of their original tissue

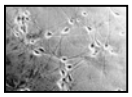
*** Advantages**
- 세포 내에서 일어나는 변화, 성장단계를 현미경으로 관찰가능
- 실험동물에서 세포수준의 whole life cycle을 보기 어렵지만 이것에서는 증식, 분화, 노쇠의 관찰이 가능, 생화학적 방법에 의해 연구가능
- 고등동물의 cell to cell interaction을 *in vitro*로 연구가능

RAT CORTICAL CELL CULTURE I

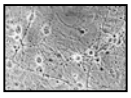


RAT CORTICAL CELL CULTURE II





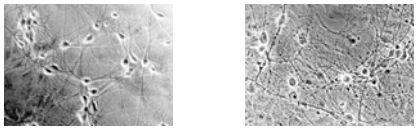
Control cells



Glutamate-treated cells

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

- **Assay of neuroprotective activity**



1. Primary cultures of rat cortical neurons
2. Excitotoxicity
   Exposure to 100 μM glutamate for 24 hrs
3. Cell viability
   LDH (lactate dehydrogenase) assay
   MTT assay

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

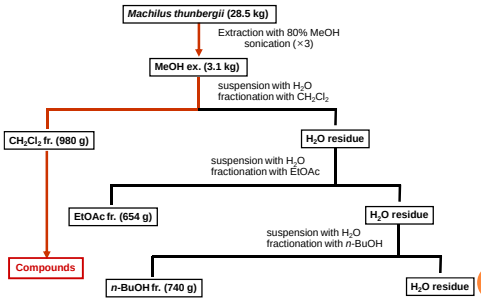
• 토후박 *(Machilus thunbergii)*



Lauraceae
Pharmacology
Treatment of leg edema, abdominal distension and pain
Used Part
Cortex
Major Component
Lignans, Flavonoids, Essential Oils

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

- **Extraction and fractionation of cortex of *M. thunbergii***



천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

• **Sample Preparation**

1. 식물 재료의 **추출**
   - 추출용매 선정 (ex. 80% MeOH, 50% MeOH, EtOH, Water…)
   - 추출방법 결정 (sonication, 열탕추출, 냉침)

2. 추출액 **농축**
   - 감압 농축기 사용
   - N_2 gas : 수분 제거
   - 동결 건조

3. 활성 평가용 시료제조
   - 추출액 및 추출 분말을 DMSO에 녹여 시료로 사용 (DMSO의 최종농도 0.1% 이하)
   - 필요 농도로 **멸균 증류수**를 사용하여 희석

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

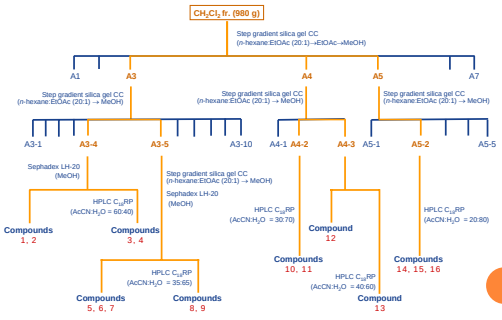
- **Neuroprotective activities of *M. thunbergii* fractions on primary cultures of rat cortical cells injured by glutamate**

	Concentration (μg/ml)	Protection (%)
Control		100.0 ± 0.1
Glutamate-injured		0.0 ± 0.1
Total extract	1.0	45.1 ± 8.4 **
	10.0	62.8 ± 4.1 ***
CH_2Cl_2	1.0	49.1 ± 6.4 **
	10.0	63.8 ± 2.8 ***
EtOAc	1.0	21.7 ± 6.7
	10.0	40.9 ± 4.8 **
n-BuOH	1.0	40.4 ± 3.6 **
	10.0	54.1 ± 6.5 **
MK-801	10.0	80.8 ± 5.4 ***

(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

- **The Isolation of neuroprotective compounds from CH_2Cl_2 fraction**

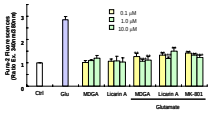


NEUROPROTECTIVE ACTIVITIES OF COMPOUNDS ISOLATED FROM *M. THUNBERGII* ON PRIMARY CULTURES OF RAT CORTICAL CELLS INJURED BY GLUTAMATE

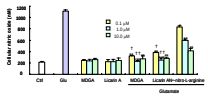
	Protection (%)		
	0.1 μM	1.0 μM	10.0 μM
Control	100.0 ± 0.21		
Glutamate-treated	0.0 ± 0.14	1.2 ± 0.19	1.3 ± 0.20
meso-dihydroguaiaretic acid (1)	36.3 ± 2.88**	58.5 ± 1.18**	39.0 ± 1.24**
(+)-guaiacin (2)	16.7 ± 1.05	36.1 ± 1.32**	34.0 ± 1.15**
(-)-isoguaiacin (3)	31.6 ± 2.74*	35.0 ± 4.29**	37.9 ± 2.57**
(-)-sesamin (4)	20.9 ± 3.22	24.0 ± 3.33*	22.3 ± 5.45
machilin A (5)	15.1 ± 4.10	21.8 ± 3.20	23.6 ± 2.09
(+)-galbelgin (6)	16.6 ± 1.26	10.0 ± 2.89	12.8 ± 4.23
licarin A (7)	35.3 ± 3.57**	54.2 ± 1.86**	46.5 ± 3.47**
(7S,8S,8'R)-3',4'-dimethoxy-3,4,-ethylenedioxylignan-7-ol (8)	21.4 ± 2.64*	24.5 ± 3.19*	26.1 ± 2.15*
1-hydroxy-7-hydroxymethyl-6-methoxy xanthone (9)	18.4 ± 2.84	20.7 ± 3.64	22.8 ± 2.88
5,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxy flavan-3-ol (12)	25.1 ± 2.55*	29.8 ± 4.51*	32.1 ± 1.22**
(+)-(3S,4S,6R)-3,6-dihydroxypiperitone (14)	10.1 ± 1.10	15.4 ± 2.19	20.1 ± 3.25
protocatechuic acid methyl ester (15)	30.0 ± 2.58**	36.2 ±2.54**	38.9 ± 3.66**
tyrosol (16)	29.4 ± 2.11*	36.5 ± 2.88**	41.2 ± 3.69**
nordihydroguaiaretic acid	30.8 ± 1.44*	43.2 ± 3.41**	34.8 ± 3.21**
isoguaiacin dimethylether	18.4 ± 2.54	25.1 ± 2.80*	23.1 ± 3.84
MK-801			80.3 ± 2.01**
CNQX			70.5 ± 1.53**
APV			43.8 ± 3.22**

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

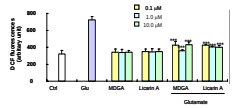
The effect of MDGA or licarin A on intreacellular $[Ca^{2+}]_i$ in glutamate-injured rat cortical cells.



The effect of MDGA and licarin A on intracellular NO concentration in glutamate-injured rat cortical cells



The effect of MDGA and licarin A on cellular peroxide concentration in glutamate-injured rat cortical cells



The effect of MDGA and licarin A on glutathione content in glutamate-injured rat cortical cells

	Glutathione (mmol/mg protein)		
	w/o Lignan	MDGA	Licarin A
Control	2.42 ± 0.21	2.38 ± 0.24	2.26 ± 0.14
BSO-treated	1.15 ± 0.10	1.17 ± 0.19	1.32 ± 0.20
DEM-treated	1.14 ± 0.24	1.18 ± 0.15	1.21 ± 0.25
Glu-treated	0.86 ± 0.12	2.05 ± 0.11*	1.91 ± 0.21*
BSO + Glu-treated	0.75 ± 0.19#	1.52 ± 0.17*	1.44 ± 0.17*
DEM + Glu-treated	0.73 ± 0.17#	1.55 ± 0.21*	1.46 ± 0.23*

→ MDGA and licarin A significantly protect primary cultured neuronal cells against glutamate-induced oxidative stress, *via* antioxidative activities.

CELL LINE

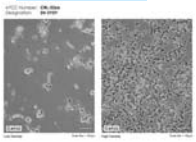
: once a primary culture is subcultured
(or passaged , or transferred)

: subculture

advantages	disadvantages
Propagation	Trauma of enzymatic or mechanical disaggregation
More cells	Selection of cells adopted to culture
Possibility of cloning	Overgrowth of unspecialized or stromal cells
Increased homogeneity	Genetic instability
Characterization of replicate samples	Loss of differentiated properties
Frozen storage	(may be inducible)

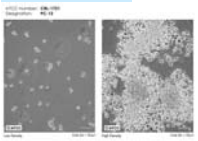
CELL LINE

SH-SY5Y



Source: Human, 4 years, female
Tissue: brain metastatic site, bone marrow neuroblastoma
Growth properties: mixed, adherent, suspension
Morphology: epithelial
(SK-N-SH->SH-SY->SH-SY5->SH-SY5Y)
subline of the neuroblastoma cell line
SK-N-SH from a metastatic bone tumor
dopamine beta hydroxylase activity
saturation density >1 X 10^6 cells/cm^2
Doubling time: 48h
Culture model for Parkinson's disease

PC12

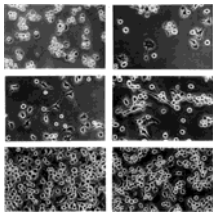


Source: rat
Tissue: adrenalgland, pheochromocytoma
Growth properties: lossely adherent, multicell aggregates
Morphology: polygonal
Doubling time: 92 h
Cellular products: catecholamine, dopamine, norepinephrine
The cells respond reversibly to NGF by induction of the neuronal phenotype.
The cells do not synthesize epinephrine.
Culture model for Parkinson's disease

CELL LINE

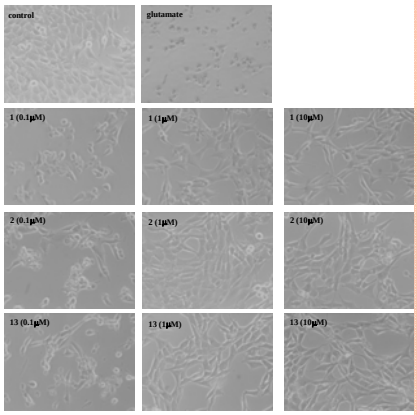
BV2

Source: mouse
Tissue: microglial cells
Growth properties: adherent
Morphology: small, round
Doubling time: 24 h
Cellular products: IL1 and TNF
Generated by infecting primary microglial cell cultures with a v-raf/v-myc oncogene carrying retrovirus (J2)
→ J2 virus infection has resulted in the immortalization of active microglial cells.
BV-2 cells retain most of the morphological, phenotypical and functional properties described for freshly isolated microglial cells.



HT22

The mouse hippocampal cells



Neuroprotective activities of compound **1**, **2**, and **13** on HT22 cells injured by glutamate

Compound	Cell viability (%)[b]		
	0.1 μM	1.0 μM	10.0 μM
Control[c, d]	100.0		
Glutamate-injured[c, d, e]	0.0		
1	1.7 ± 3.8	46.0 ± 7.5*	52.6 ± 7.8*
2	-3.2 ± 5.3	45.5 ± 8.0*	0.4 ± 3.5
13	-6.4 ± 3.7	70.0 ± 6.0**	36.0 ± 4.0**

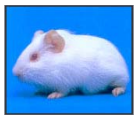
Experimental animals



생쥐 (mice)



Rabbit



Guinea-Pig



Beagle Dog



Hamster



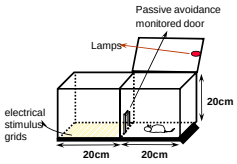
Mongolian gerbil

실험동물 사용의 한계점

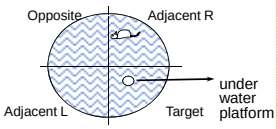
- 시험하려는 물질의 대부분이 체내에서 대사, 배설되므로 다량의 시료가 요구됨.
- 실험동물의 개체차가 커서 실험결과의 재현성이 떨어짐.
- 실험동물의 관리가 어렵고 시간이나 경제적 측면에서 비효율적임.
- 실험동물 사용규제법에 따라 그 사용이 점점 어려워지는 추세임.

EVALUATION OF COGNITION-ENHANCING ACTIVITY

- Passive avoidance test : Learning Memory
- Water maze test : Spatial Memory



Passive avoidance test



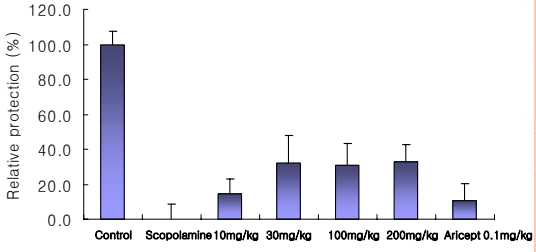
Water maize test

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 I

• Sample Preparation

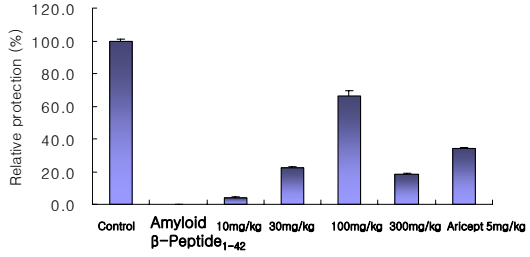
1. 경구투여용 시료제조
   - 0.5% CMC에 녹여서 시료로 사용
   - 추출액 및 추출 분말의 경우 현탁 상태에서도 시료로 사용
   - 화합물의 경우 잘 녹지 않으면 DMSO에 녹인 후 희석해서 사용 (DMSO의 최종 농도는 0.1% 이하)
2. 복강투여용 시료제조
   - 멸균 식염수에 녹여서 시료로 사용
   - 추출액 및 추출 분말의 경우 현탁 상태에서도 시료로 사용
   - 화합물의 경우 잘 녹지 않으면 DMSO에 녹인 후 희석해서 사용 (DMSO의 최종 농도는 0.1% 이하)

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 II



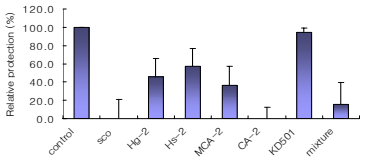
KD501의 경구투여 후 Passive Avoidance test (scopolamine) 결과

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 II



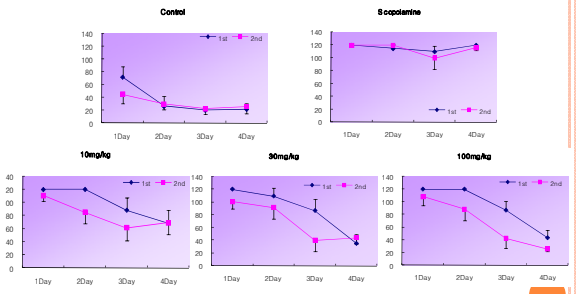
KD501의 경구투여 후 Passive Avoidance test (Amyloid β-Peptide $_{1-42}$) 결과

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 II



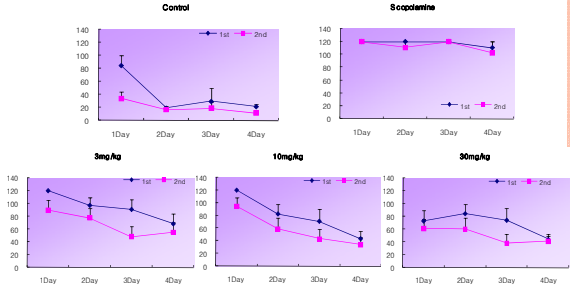
추출물 100 mg (4종 유효성분 총 약 2mg), 동일한 용량의 유효성분, 추출물과 동일한 비율의 유효성분 혼합물의 활성 비교
-> 추출물이 최대 효능 보임

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 II



KD501 단회 투여 후 Water Maze test 결과

천연물의 뇌신경세포 보호 활성 II



KD501 반복 투여 (15일) 후 Water Maze test 결과

천연물의 연구 방향-1

- 서지학적 연구

- 동서양의 고문서 기록, 본초서, 전승의약 등을 조사 고찰
- 명칭, 이명(異名), 기원, 내력, 사용법 및 유사 생약에 대한 연구

천연물의 연구 방향-2

- 생물학적인 특성의 연구

- 각국의 산물지(産物誌), 생물상에 대한 조사 연구
- 분류학적인 위치, 분포 및 생태학적인 특성 연구

천연물의 연구 방향-3

- 약효 평가법 설정

- 문헌상에 기재된 약효를 현대 의약학적으로 풀이
- 생약의 정확한 약효와 안전성을 기대
- 생약의 오용, 남용을 방지

천연물의 연구 방향-4

- 약효 성분의 구명(究明)

- 활성 성분의 화학적 구조를 결정
- 함유 성분상을 밝힘
- 화학적 품질 평가법을 위한 기초 확립

천연물의 연구 방향-5

- 구조 - 활성 상관관계의 구명

- 활성 성분의 화학 구조와 생리 활성간으 관계를 밝힘
- 보다 우수한 신약의 창제의 기초적 연구
- QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship)

천연물의 연구 방향-6

- 품질 평가법의 설정

- 정성, 정량적인 평가법의 설정
- 품질이 우수한 생약의 확보
- 생약제제의 품질 관리
- 복합제제의 품질 관리

천연물의 연구 방향-7

- 재배학적인 연구

- 활성 성분의 함량의 균일화
- 수요에 따른 적시 공급 가능
- 안위물의 혼입을 방지