

꾸지 뽕나무로부터 분리한 flavonoid계 화합물의 암세포성장 저해 및 항산화 활성

이인경 · 송경식¹ · 김창진 · 김환목 · 오구택 · 유익동*

한국과학기술연구원 유전공학연구소

¹경북대학교 농과대학 농화학과

초록 : 꾸지 뽕나무의 줄기껍질로부터 P388 tumor cell line에 대한 세포 성장 저해활성과 흰쥐 간 microsome 분획의 과산화 지질을 사용하여 Fe⁺⁺/ascorbate법으로 측정한 결과 세포 성장 저해활성과 항산화활성을 갖는 5개의 flavonoid계 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조분석을 실시한 결과 각종 spectral data와 보고된 문헌에 의하여 taxifolin, orobol, eriodictyol, dihydrokaempferol, steppogenin으로 각각 동정되었다. 이 화합물들의 항산화활성은 IC₅₀이 각각 6, 3, 3, >50, 10 µg/ml이었고 taxifolin을 제외한 P388 cell line에 대한 세포 성장 저해는 각각 IC₅₀이 0.18, 3.3, 15, 6.2 µg/ml이었다. 한편 *Escherichia coli* BE 1186, *Salmonella typhimurium* SL 1102, *Staphylococcus aureus* IFO 12732, *Staphylococcus aureus* R 209, *Candida albicans*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다(1994년 2월 28일 접수, 1994년 4월 11일 수리).

꾸지 뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽성 소교목 또는 관목으로서 우리나라의 남부 지방과 중국, 일본등지에 주로 분포하는 식물이다.¹⁾ 이 식물은 우리나라에서 예로부터 민간 상용 약초로 부인들의 봉중, 혈결 및 요통, 타박상, 지통, 습진, 유행성 이하선염, 폐결핵, 급성관절 등을 치료하는데 사용되었고²⁾ 특히 그 뿌리와 줄기를 다려먹으면 간암치료에 특효하다고 전해내려오고 있다.³⁾ 한편 꾸지 뽕나무의 화학성 분에 대한 연구는 1983년부터 보고되기 시작하여 꾸지 뽕나무의 뿌리껍질로부터 cudraxanthone A-O,⁴⁻⁸⁾ cudraflavone A-D,^{9,10)} euchrestaflavone C,¹¹⁾ cycloartocarpesin, populinin, quercimeritrin,¹²⁾ 6-deoxyisojacareubin⁶⁾ 등이 분리되었고, 박, 양 등은 줄기와 잎으로부터 kaempferol, kaempferol-7-O-glucopyranoside, naringen-7-O-glucopyranoside,¹³⁾ β-sitosterol, β-sitosterol glucoside, 5-O-methyl genistein¹⁴⁾ 등의 물질을 보고하였다. 그러나 상기의 보고에서는 각 물질들의 화학구조만 밝혔을 뿐 생물활성에 관한 연구는 전무하였다. 필자들은 천연물로부터 항산화 및 암세포 독성을 갖는 물질들을 탐색하던 중 꾸지 뽕나무의 메탄올 추출물로부터 P388 cell line에

대해 강한 저해활성을 나타낸 뿐만 아니라 지질과산화 저해 활성을 나타낸다는 것을 발견하고 그 추출물로부터 이와 같은 활성을 갖는 5가지 flavonoid계 화합물을 분리하였다. 본 연구에서는 이들의 화학구조와 생물활성을 조사하였으므로 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 꾸지 뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 1991년 4월 전라남도 구례군 지리산에서 채집하였다.

추출 및 분리

꾸지 뽕나무의 줄기 껍질(1 kg)을 풍건하고 세척한 후 80% methanol을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 용매를 감압하에서 제거하였다. Methanol이 제거된 추출물을 diaion HP-20 column(Nippon Rensui Co. 5 × 30 cm)에 흡착 시키고 50% methanol로 씻어낸 후 마지막으로 100% methanol로 용출시켰다. 이중에서 항산화

Key words : *Cudrania tricuspidata*, Moraceae, Taxifolin, Orobol, Eriodictyol, Dihydrokaempferol, Steppogenin, Cytotoxicity, Antioxidant activity

*Corresponding author : I.-D. Yoo

및 세포 성장 저해활성이 비교적 강한 100% methanol용출 분획을 감압 농축하고 물에 분산시킨 후 ethylacetate 1L로 3회 반복 추출하였다. Ethylacetate분획을 감압 농축하여 silicagel column(70~230 mesh, Merck Art. 7734, 4×20 cm)에 가하여 chloroform-methanol=30:1, 20:1, 10:1, 5:1의 전개용매에 의해 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 분획들을 chloroform-methanol=5:1의 silicagel TLC(MERCK Art. 5715)상에서 monitor 하여 분획 I~IV의 4개의 분획으로 나눈 후 Rf치 0.3인 분획 III로부터 결정성 화합물을 1(300 mg)을 얻었다. 한편 Rf치 0.6~0.7인 분획 I에 대해서 HPLC(Senshu Pak. ODS, 20×250 mm, 48% MeOH, 9 mL/min, UV 290 nm)를 실시하여 화합물 2(13 mg), 3(4 mg), 4(20 mg), 5(3 mg)를 순수하게 분리하였다.

기기 분석

UV/Vis spectrophotometer는 Kontron Uvicon 930을 사용하였고 HPLC는 Tosoh CCPM과 UV 8010을, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine 5989A를, NMR spectrophotometer는 Varian Unity 300을 사용하였다.

항균 활성 측정

항균 활성에 사용된 균주는 *Escherichia coli* AB 1157(KCTC 1923)균주와 이 균을 모균주로 하는 고감수성 변이주인 *E. coli* BE 1186(KCTC 1924), *Salmonella thyphimurium* TV 119(KCTC 1925)균주와 이 균을 모균주로 하는 고감수성 변이주인 *S. thyphimurium* SL 1102(KCTC 1926), *Staphylococcus aureus* IFO 12732(KCTC 1947)균주와 이 균의 약제 내성균주인 *S. aureus* R 209(KCTC 1928), *Candida albicans* IFO 1594(KCTC 1940) 등을 대상으로 하여 paper disc assay 방법¹⁵⁾에 의해 1 mg/mL의 농도로 조사하였고 각각에 대한 활성은 생육 저지환의 직경(mm)을 측정하였다.

항산화 활성 측정

항산화 활성을 이미 보고된 방법에 의하여 비효소적 측정방법의 하나인 Fe⁺⁺/ascorbate법¹⁶⁾에 의해 조사하였다. 즉 생후 6주된 흰 쥐(male Sprague-Dawley)의 간 microsome을 기질로 하여 Fe⁺⁺/ascorbate에 의해 생성되는 malon dialdehyde(MDA)의 양을 TBA와 반응 시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정함으로써 각 시료에 대한 항산화 활성을 측정하였으며 무처리구와 비교하여 상대적인 저해율을 백분율로 나타내었다. 양성 대조구로는 유기합성제인 BHT(butylated hydroxytoluene, Sigma)를

사용하였다.

암 세포 성장 저해 측정

본 연구에서 암세포 성장 저해를 측정하기 위하여 사용한 세포주는 미국 국립 암연구소로부터 분양받은 마우스 임파종 유래 세포주인 P388를 사용하였다. P388 세포주는 5% FCS(fetal calf serum, Gibco BRL)가 함유된 RPMI 1640(Gibco BRL)매지를 사용하여 5% CO₂, 37°C를 유지하는 세포 배양기에서 배양하였다. 실험에 사용한 세포의 농도는 5×10⁴ cell/mL로 조정하여 96 well tissue culture microplate에 0.2 mL/well로 접종하여 사용하였다. 각 microplate에는 무처리군과 용매 대조군을 두었으며, 각 처리군은 4개 이상의 well로 구성하였다. 검체는 DMSO(dimethylsulfoxid, Sigma)에 녹여서 DMSO의 최종농도가 0.1% 이하가 되게 하였다. 세포 성장은 Monks 등¹⁷⁾의 SRB assay로 측정하였다. 즉 세포를 TCA(trichloroacetic acid, Sigma)로 침전 시킨 후 단백질과 결합하는 dye인 SRB(sulforhodamine B, Sigma)를 결합시켜 10 mM tris base로 녹인 후 570 nm에서 ELISA reader(Flow)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 세포의 성장률은 각 plate의 대조군과 비교하여 측정하였다. 50% 세포 성장 저해농도(IC₅₀)의 계산은 검체를 처리한 well의 흡광도(T)에서 검체를 처리하는 시점에서 만든 time zero plate의 흡광도(T₀)를 제한 후, 대조군 well의 흡광도(C)에서 time zero plate의 흡광도(T₀)를 제한 값으로 나눈 후 100을 곱해서 50이 나오는 농도, 즉 100×T-T₀/C-T₀=50을 구하였다.

결과 및 고찰

구조 분석

꾸지 뽕나무의 80% methanol추출물에 대해 HP-20을 이용한 흡착 chromatography와 ethylacetate 추출 그리고 silicagel chromatography를 하여 I~IV의 분획을 얻고 분획 III로부터는 화합물 1을, 분획 I로부터는 prep-HPLC에 의한 재정제에 의하여 화합물 2, 3, 4, 5를 각각 분리하였다.

이들 화합물의 구조 분석 결과 화합물 1은 EI-MS에 의하여 [M⁺] m/z=304, UVλ_{Max}nm(logε) 291(4.29), 335(3.66, sh)으로 나타났다. ¹H-NMR에서 δ 4.40 ppm(1H, d, J=11.4 Hz, H-3) 및 δ 4.50 ppm(1H, d, J=11.4 Hz, H-2)의 signal로 미루어 이 화합물이 flavanol의 일종인 것으로 생각되었다. 또한 aromatic region의 H-H coupling과 이들의 chemical shift치, ¹³C-NMR에서의 chemi-

cal shift 치 및 DEPT(distortionless enhancement by polarization transfer) spectrum에 의하여 이화합물은 taxifolin으로 동정하였다.

화합물 2는 EI-MS [M^+] $m/z=286$, UV $\lambda_{\text{Max}}\text{nm}(\log e)$ 273(2.74)로 나타났으며, 1H-NMR의 δ 6.12, 6.24 ppm (각각 1H, d , $J=1.8$ Hz, H-6, H-8)과 δ 6.74~6.92 ppm 부근의 resonance 특히 87.93 ppm의 singlet proton 및 ^{13}C -NMR에서의 8124.3 ppm의 resonance로 미루어 isoflavonoid의 하나인 orobol로 동정하였다.

화합물 3은 EI-MS [M^+] $m/z=288$, UV $\lambda_{\text{Max}}\text{nm}(\log e)$ 288(4.13), 337(3.25, sh)이었으며 1H-NMR에서 δ 2.96 ppm(1H, dd, $J=16.8$, 12.6 Hz, H-3A), δ 2.59 ppm(1H, dd, $J=16.8$, 3.3 Hz, H-3B) signal이 전형적인 ABX type의 coupling pattern을 보여주고 있는 것과 δ 5.18 ppm(1H, dd, $J=12.6$, 3.3 Hz, H-2) 및 δ 5.77~6.69 ppm의 signal 그리고 ^{13}C -NMR spectrum에 의하여 flavanone의 일종인 eriodictyol로 동정하였다.

화합물 4는 EI-MS [M^+] $m/z=288$, UV $\lambda_{\text{Max}}\text{nm}(\log e)$ 291(3.75), 330(3.56, sh)과 같았으며 1H-NMR 및 ^{13}C -NMR에서의 signal들이 화합물 1과 매우 유사하였다. 그러나 δ 6.84 및 7.35 ppm의 chemical shift와 H-H coupling constant로 비추어 볼 때(각각 2H, d , $J=8.7$, 2.6 Hz, 3' 및 5'-H)이 화합물의 구조는 화합물 1의 B ring의 catechol moiety로 치환된 dihydrokaempferol로 동정하였다.

화합물 5는 EI-MS에서 분자량 [M^+]=288 m/z , UV $\lambda_{\text{Max}}\text{nm}(\log e)$ 287(4.11), 335(3.56, sh)를 나타내었고 1H-NMR 및 ^{13}C -NMR signal이 화합물 3과 매우 유사하여 flavanone의 일종인 것으로 생각되었다. 그러나 H-3', H-5'에서 유래되는 것으로 생각되어지는 δ 6.31(1H, d , $J=2.1$ Hz), 6.33 ppm(1H, dd, $J=8.5$, 2.1 Hz)의 signal과

H-6'으로 귀속될 수 있는 87.23 ppm(1H, d , $J=8.5$ Hz)의 resonance와 ^{13}C -NMR에서 화합물 3의 C-2'로 assign된 8130.2 ppm의 signal이 8160.0 ppm으로 shift된 것으로 보아 C-2', 4'에 hydroxy기가 존재하는 steppogenin으로 동정하였다.

또한 이상과 같이 동정한 화합물 1-5(Fig. 1)의 각종 spectral data 및 이화학적 특성은 이미 보고된 문헌¹⁸⁾과 최종적으로 비교 확인하였다. 이들의 ^1H 및 ^{13}C -NMR data는 Table 1과 Table 2에 요약하였다.

항균 활성 및 항산화 활성

분리 정제된 화합물들은 모두 1 mg/ml²도로 처리시 검정된 세균에 대해 항균활성을 나타내지 않았다. 항산화 활성을 나타내었다(Table 3). 분리된 화합물 모두 phenolic compound(acid phenol, flavonoids)가 항산화활성을 나타낸다는 보고¹⁹⁾와 같이 유사한 작용기작을 나타내어 항산화활성을 보였다. 특히 화합물 1의 경우 B ring의 meta-hydroxy기가 없는 화합물 4와 비교시 높은 활성을 보였는데 이러한 결과는 meta-hydroxy기를 지닌 caffeic

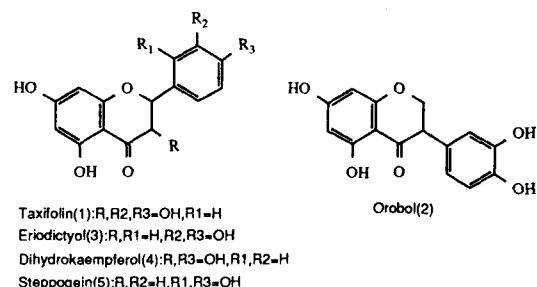


Fig. 1. Structure of compounds 1, 2, 3, 4 and 5.

Table 1. ^1H -NMR data of compound 1, 2, 3, 4, and 5 (Measured on 300 MHz in CD_3OD)

proton	1	2	3	4	5
H-2	4.50 ^a , d (11.4)b	7.93, s	5.18, dd (12.6, 3.3)	4.98, d (11.7)	
H-3 _A	4.40, d (11.4)		2.96, dd (16.8, 12.6)	4.53, d (11.7)	3.05, dd (15, 12.)
H-3 _B			2.59, dd (16.8, 3.3)		2.69, dd (15, 3.2)
H-6	5.78, d (1.8)	6.12, d (1.8)	5.77, d (2.1)	5.94, d (1.8)	5.85, d (2.3)
H-8	5.82, d (2.1)	6.24, d (1.8)	5.79, d (1.8)	5.89, s	5.88, d (2.3)
H-2'	6.87, d (1.5)	6.92, d (1.2)	6.82, s	6.84, d (8.7)	
H-3'				7.35, d (8.7)	6.31, d (1.83)
H-5'	6.70, d (8.1)	6.73, s	6.69, s	7.35, d (8.7)	6.33, dd (8.25, 2.3)
H-6'	6.75, dd (7.8, 1.5)	6.74, s	6.69, s	6.84, d (8.7)	7.23, d (8.25)

a: δ ppm from TMS, b: coupling constant (in Herz).

Table 2. ^{13}C -NMR data of compound 1, 2, 3, 4 and 5 (Measured on 300 MHz in CD_3OD)

Carbon	1	2	3	4	5
C-2	85.1, d	153.8, d	80, d	84.8, d	76.2, d
3	73.7, d	124.3, s	42.6, t	73.5, d	43.4, t
4	198.4, s	181.6, s	196.2, s	198.2, s	198.5, s
5	165.3, s	158.9, s	163.9, s	165.2, s	165.8, s
6	97.3, d	99.9, d	94.9, d	96.3, d	96.7, d
7	168.3, s	165.2, s	167.4, s	168.5, s	169.5, s
8	96.4, d	94.6, d	95.7, d	97.3, d	97.5, d
9	164.5, s	162.9, s	163.3, s	164.3, s	165.7, s
10	101.8, s	105.9, s	101.7, s	101.7, s	103.4, s
1'	129.9, s	123.1, s	130.3, s	129.1, s	118.3, s
2'	116.1, d	116.8, d	113.2, d	130.2, d	160.0, s
3'	146.3, s	146.0, s	145.0, s	116.1, d	103.7, d
4'	147.1, s	145.5, s	145.4, s	158.9, s	157.1, s
5'	115.9, d	115.9, d	114.8, d	116.1, d	108.0, d
6'	120.9, d	121.4, d	117.8, d	130.2, d	129.1, d

Table 3. Inhibitory activity of compound 1, 2, 3, 4 and 5 against lipid peroxidation (Inhibition rate: %)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	3	4	5	BHT
0.01	.*	24
0.05	87
0.10	88
1.0	30	40	40	28	28	.
5.0	37	76	69	33	40	.
25.0	86	93	78	35	62	.
50.0	97	94	90	40	73	.
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	6	3	3	>50	10	0.02

*: Not tested.

Table 4. Effect on the growth inhibition of compound 2, 3, 4 and 5 against P388 cell line (cell growth: %)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	2	3	4	5
0.5	47	89	91	94
1.0	31	76	87	81
5.0	0.7	45	67	83
10.0	-2.3	22	70	43
50.0	3	4	24	3
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	0.18	3.3	15	6.2

acid가 *p*-coumaric acid보다 강한 활성을 나타내는 것과 일치하였다.²⁰⁾ 따라서 본 화합물들은 항산화 활성을 갖는 phenolic compound이었고 B ring의 *meta*-hydroxy기의 치환 여부가 활성을 나타내는 중요한 작용 인자인 것을 알수있었다.

항암 활성

P388 tumor cell에 대한 50% 세포 성장 저해농도(IC_{50})는 Table 4에 나타낸 바와 같이 화합물 2, 3, 4, 5 각각 0.18, 3.3, 15, 6.2 $\mu\text{g/mL}$ 으로, 특히 화합물 2인 orobol의 경우 매우 높은 활성을 나타내었다. 현재 항암제로 널리 사용되고 있는 adriamycin의 P388 tumor cell에 대한 IC_{50} 은 0.113 $\mu\text{g/mL}$ (data는 나타내지 않음)으로 orobol은 adriamycin과 비슷한 정도의 세포 성장 저해효과를 가지는 물질이라고 사료된다.

참 고 문 헌

1. 이창복: 대한 식물도감. 향문사. p. 285(1982)

2. 강소 신의학원: 중약 대사전(제2권). 소학관. p. 2383 (1985)
3. 문화방송: 한국 민간요법대전. 금박 출판사. p. 31 (1987)
4. Nomura, Taro., Hano, Yoshi. and Fujimoto, Tomoko.: *Heterocycles*, 20 : 213(1983)
5. Fujimoto, Tomoko., Hano, Yoshi. and Nomura, Taro.: *Planta medica*, 50 : 218(1984)
6. Hano, Yoshi., Matsumoto, Y., Sun, J. Y. and Nomura, T.: *Planta medica*, 56 : 399(1990)
7. Hano, Yoshi., Matsumoto, Y., Sun, J. Y. and Nomura, T.: *Planta medica*, 56 : 478(1990)
8. Hano, Y., Matsumoto, Y., Shinora, K., Sun, J. Y. and Nomura, T.: *Planta medica*, 57 : 172(1991)
9. Fujimoto, T., Hano, Y., Nomura, T. and Uzawa, J.: *Planta medica*, 50 : 161(1984)
10. Hano, Y., Matsumoto, Y., Shinora, K., Sun, J. Y. and Nomura, T.: *Heterocycles*, 31 : 1339(1990)
11. Fugimoto, T. and Nomura, T.: *Heterocycles*, 22 : 997(1984)
12. Nomura, T.: *Planta medica*, 51 : 190(1985)
13. 박종철, 양한석, 최재수: 약학회지 36 : 40(1992)
14. Young, H. S., Park, J. H., Park, H. J. and Chio, J. S.: *Arch. Pharmacal res.*, 12 : 39(1989)
15. Hewitt, W. et al.: Theory and application of microbiological assay, ap.(1989)
16. Ohkawa, H., Ohish, N. and Yagi, K.: *Anal. biochem.*, 95 : 351(1979)
17. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., and Boyd, M. R.: *J. National Cancer Institute*, 83 : 757(1991)
18. Agrawal, P. K.: ¹³C-NMR of flavonoids(1989)
19. Larson, R.: *Phytochemistry*, 27 : 969(1988)
20. Cuvelier, M. E., Richard, H. and Bersey, C.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 : 324(1992)

Tumor cell growth inhibition and antioxydative activity of flavonoids from the stem bark of *Cudrania tricuspidata*

In-Kyoung Lee, Kyung-sik Song¹, Chang-Jin Kim, Hwan-Muk Kim, Goo-Taeg Oh and Ick-Dong Yoo (Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box 105, Yusoung-gu Taejon, Korea, 305-600 and ¹Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu, Korea, 702-701)

Abstract: Five cytotoxic and antioxidative flavonoids were isolated from the stem bark of *Cudrania tricuspidata* by consecutive purification using HP-20, silicagel and prep-HPLC. They were identified as taxifolin, orobol, eriodictyol, dihydrokaempferol and steppogenin by means of spectral studies. The antioxidative ativities (IC_{50}) assayed by TBA method of these compound 1~5 to were 6, 3, 3, >50, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The effect on the growth inhibition (IC_{50}) of these compounds against P388 cell line were found to be 0.18, 3.3, 15 and 6.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively in the order of compound 2 to 5.