

수종의 국화과 식물에서 분리한 Sesquiterpene Lactone들의 생리활성(제3보). Nitric oxide 방출 및 ACAT 저해활성

장대식, 박기훈, 고태룡¹, 이현선¹, 권병목¹, 양민석*

경상대학교 농화학과, ¹생명공학연구소

Biological Activities of Sesquiterpene Lactones isolated from Several Compositae Plants. Part 3. Inhibitory Activity on Nitric Oxide Release and ACAT

Dae Sik Jang, Ki Hun Park, Hack Lyong Ko¹, Hyun Sun Lee¹,
Byoung Mog Kwon¹ and Min Suk Yang

Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701,
Korea and ¹Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB),
P.O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea

Abstracts - Nine sesquiterpene lactones, which were isolated from *Hemisteptia lyrata* Bunge, *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura and *Chrysanthemum boreale* Makino were evaluated for the inhibition upon the nitric oxide release from the Raw cell and for the ACAT (acyl Co A: cholesterol acyltransferase) inhibitory assay. In the nitric oxide release inhibitory experiment, hemistepsin B (IC₅₀=0.05 µg/ml, 0.15 µM), cumambrin B, tulipinolide and costunolide exhibited strong inhibition with IC₅₀ values 0.05 µg/ml (0.15 µM), 0.1 µg/ml (0.38 µM), 0.2 µg/ml (0.69 µM) and 0.2 µg/ml (0.86 µM), respectively. In the ACAT inhibitory assay, angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin B, tulipinolide and costunolide exhibited strong inhibition with IC₅₀ values 33 µg/ml (95.4 µM), 22 µg/ml (63.6 µM), 38 µg/ml (151 µM) and 17 µg/ml (73.3 µM), respectively, whereas other compounds did not exhibit significant activity against ACAT above 100 µg/ml.

Key words - sesquiterpene lactone; nitric oxide; acyl Co A: cholesterol acyltransferase (ACAT).

Nitric oxide(NO)는 최근에 생리학, 생화학, 의학 분야에서 가장 열성적으로 연구되고 있는 분야 중의 하나로서, 면역기능, 혈장확장, 뇌와 말초신경에서의 신경전달, 돌연변이성, tumor cell의 growth 등을 조절하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 정상적인 농도의 NO는 생체 내에서 필수적인 역할을 담당하지만 고

농도에서는 박테리아에 의해 유발된 위궤양이나²⁾ insulin 의존성 당뇨병³⁾에 관여하는 등 여러 가지 생리학적인 문제를 유발할 수 있기 때문에 NO에 대한 연구도 NO 생성을 억제하는 방향과 촉진하는 방향으로 나누어 이루어지고 있다. Acyl Co A: cholesterol acyltransferase(ACAT)는 작용기작이 확실하고 부작용이 없는 새로운 고지혈증 치료제를 개발하기 위한 mechanism-based bioassay의

*교신저자 : Fax 0591-757-0178

target 중 하나이다. ACAT은 콜레스테롤과 acyl CoA의 에스테르화에 관여하여 소장에서 콜레스테롤의 흡수, 간장에서 very low density lipoprotein (VLDL)의 합성, 지방세포와 혈관내벽에 cholesterol ester의 축적에 관여하는 등 포유동물에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 따라서, ACAT의 저해의 측정은 고지혈증이나 동맥경화증의 치료제를 개발하기 위하여 활용되는 훌륭한 방법으로 평가되고 있다.⁶⁾

본 연구자 등은 지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 sesquiterpene lactone들의 생리활성에 대한 연구의 일환으로 이미 sesquiterpene lactone계 화합물의 가장 대표적인 생물학적활성인 세포독성을 확인한 바 있다.⁷⁾ 그러나 sesquiterpene lactone은 세포독성과 관련된 활성 이외에도 위장세포의 보호작용⁸⁾이나 항염증작용⁹⁾ 등과 같은 다양한 약리학적 활성을 가진다는 사실이 보고된 바 있기 때문에 본 연구에 사용된 화합물들이 항암관련활성 이외의 또 다른 영역의 생리활성을 가지고 있을 것이라 기대하였다.

따라서, 본 연구에서는 지칭개, 구절초 및 산국에서 분리된 9종류의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 고혈압, 심장병, 당뇨 등과 같은 현대의 주요한 질병의 치료제로써의 이용가능성을 알아보기 위해 NO 방출저해실험과 ACAT 저해실험을 실시하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험물질 및 재료-지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 hemistepsin A, hemistepsin B, angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin B, cumambrin A, cumambrin B, hendelin, costunolide 및 tulipinolide를 실험재료로 사용하였다(Fig. 1).⁷⁾

NO 방출저해활성-NO 방출저해활성은 macrophage에 의해 배양액으로 방출되는 NO₂⁻의 량을 Griess reagent을 이용한 흡광도법으로 측정하였다.¹⁰⁾ 세포주는 murine macrophage인 RAW 264.7 cell로서 2~3일 마다 계대배양하여 사용하였다. 배양액은 glucose(Sigma) 4.5 g/mg, 2 mM

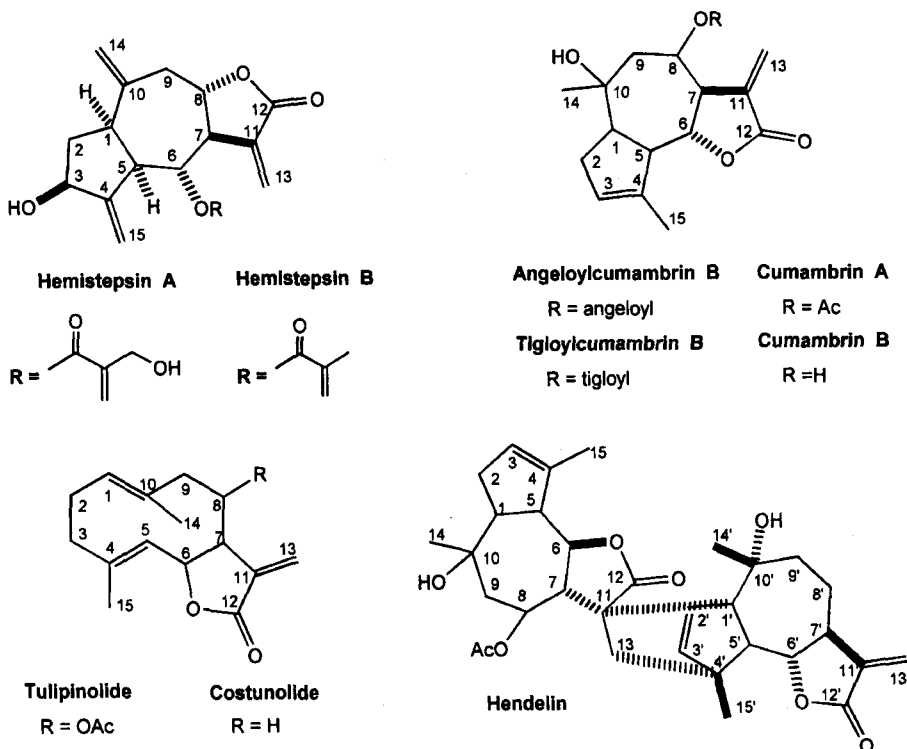


Fig. 1. The nine sesquiterpene lactones isolated from *H. lyrata*, *C. zawadskii* and *C. boreale*.

L-glutamine(Sigma), antibiotics(penicillin, streptomycin; Sigma) 100 $\mu\text{g/ml}$ 및 10% FBS 를 첨가한 DMEM(phenol red 함유, Sigma) 배지를 사용하였으며, $5\sim 10\times 10^5$ cell/ml이 되도록 10 ml Petri dish에 10 ml 씩 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

실험하기 하루 전에 cell을 현미경을 이용하여 1×10^6 /ml의 농도로 조정한 후 96 well microplate의 각 well에 200 μl 씩 분주하여 2시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 진공흡입법으로 상등액을 제거한 후 새로운 배지로 교환한 다음 DMSO에 다양한 농도로 녹인 시료액 5 μl 와 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) 5 μl 를 차례로 처리하여 다시 20시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 후 각 well에서 100 μl 씩 상등액을 취하고 여기에 Griess reagent(A: 0.1% N-(1-naphtyl)ethylenediamine 2HCl(in DW), B: 1% sulfanil amide in 5% conc. H_3PO_4 (in DW)) 100 μl 을 가한 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 필요한 경우, NaNO_2 를 이용한 standard curve와 비교해서 NO_2 의 농도를 결정하였다.

ACAT 저해활성 - ACAT의 활성측정은 ACAT 효소와 기질로 cholesterol과 방사능으로 표식된 oleoyl CoA를 반응시키고 반응생성물인 cholesterol ester를 유기용매로 추출한 후 방사능을 측정하는 방법을 사용하였다.¹¹⁾

ACAT 효소는 Erickson 등¹¹⁾의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 즉, 수컷의 Sprague-Dawley의 간을 적출하여 그 무게의 5배 량의 빙냉 0.9% NaCl 용액으로 씻어주고 가위로 적당한 크기로 잘라 0.1 mM EDTA(Sigma), 10 mM mercaptoethanol(Sigma)이 포함된 0.1 M KPB(K-phosphate buffer, pH 7.4, Sigma) 용액을 동량 넣고 Teflon bar homogenizer에서 균질화 시킨 후 4 $^{\circ}\text{C}$, 15,000 \times g에서 15분간 원심분리 하여 상등액만 취하여 4 $^{\circ}\text{C}$, 100,000 \times g에서 1시간 원심분리하여 침강물에 원심분리 초기와 같은 량의 KPB 완충용액을 넣어 homogenizer로 균질화시킨 후 4 $^{\circ}\text{C}$, 100,000 \times g에서 1시간 2차로 원심분리하여 전단계와 동일하게 상등액은 버린 후 KPB 완충액을 적당히 넣어 Teflon bar homogenizer로 혼화시키고 일부를 취하여 단백질의 농도가 8~10 mg/ml이 되도록

KPB 완충액으로 희석한 후 -135 $^{\circ}\text{C}$ 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

이와 같이 부분 정제한 rat liver microsome을 ACAT 효소원으로 하고 아세톤에 용해시킨 cholesterol(Sigma) 33.35 $\mu\text{g/ml}$ 와 Triton WR-1339(Amersharm)를 물에 현탁시켜 아세톤은 질소가스로 제거한 후 KPB(pH 7.4, 최종농도 0.1 M)와 bovine serum albumin(BSA) 30 μM 을 넣고, DMSO 또는 MeOH로 녹인 시료를 넣어 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 전반응 시킨 후, $[1-^{14}\text{C}]$ oleoyl-Coenzyme A(Amersharm)를 0.04 μCi 가 되게 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후, isopropanol-heptane(4:1) 1 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 n-heptane 0.6 ml와 KPB buffer 0.4 ml를 넣고 잘 섞은 후 2분간 방치하여 분액되면 상등액 200 μl 를 취하여 scintillation vial에 넣고 scintillation counter(Packard Delta-200)를 이용하여 생성된 cholesteryl oleate의 양을 측정하였으며 저해 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (T - C_2) / (C_1 - B)] \times 100$$

T : sample and enzyme

C_1 : without sample and with enzyme

C_2 : with sample and without enzyme

B : without sample and enzyme

결과 및 고찰

NO 방출저해활성 - 9종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 murine macrophage로부터 방출되는 nitric oxide의 량을 얼마나 감소시키는가를 알아보기 위하여 Griess reagent를 이용한 NO assay를 실시하였다.

그 결과, Table I에 나타낸 바와 같이 hemistepsin B(IC_{50} =0.05 $\mu\text{g/ml}$, 0.15 μM), cumambrin B(IC_{50} =0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.38 μM), costunolide(IC_{50} =0.2 $\mu\text{g/ml}$, 0.86 μM) 및 tulipinolide(IC_{50} =0.2 $\mu\text{g/ml}$, 0.96 μM)가 IC_{50} 값 1 μM 이하의 강한 활성을 보였으며 나머지 화합물들도 어느 정도의 활성(IC_{50} =2~75 $\mu\text{g/ml}$)을 나타내었다. 화합물의 골격에 따른 NO 방출저해활성의 특정한 경향은 찾을 수 없었으나 화합물의 골격과 치환체의 종류에 따라 대단히 큰 활성차이를 보였다.

Table I. No release inhibitory activities and ACAT inhibitory activities of nine sesquiterpene lactones isolated from *H. lyrata*, *C. zawadskii* and *C. boreale*

Compounds	IC ₅₀ values (μg/ml)	
	Nitric Oxide*	ACAT**
Hemistepsin A	20 (57.8 μM)	>100
Hemistepsin B	0.05 (0.15 μM)	>100
Angeloylcumambrin B	20 (57.8 μM)	33 (95.4 μM)
Tigloylcumambrin B	2 (5.78 μM)	22 (63.6 μM)
Cumambrin A	6 (19.6 μM)	>100
Cumambrin B	0.1 (0.38 μM)	>100
Hendelin	75 (136 μM)	>100
Tulipinolide	0.2 (0.96 μM)	38 (151 μM)
Costunolide	0.2 (0.86 μM)	17 (73.3 μM)

*Nitric oxide release inhibitory activity against murine macrophage RAW 264.7 cell. **Acyl Co A: cholesterol acyltransferase inhibitory activity measured by scintillation proximity assay.

즉, 가장 강한 활성을 보인 hemistepsin B와 가장 낮은 활성을 보인 hendelin은 1,500배, 같은 골격을 가진 화합물인 hemistepsin A와 hemistepsin B는 400배 정도의 활성차이를 보였다.

따라서 α-methylene-γ-lactone ring과 NO 방출저해활성은 서로 연관성이 적은 것으로 판단되며 sesquiterpene lactone의 골격과 치환체의 종류에 따른 활성의 특이성은 NO의 합성에 관여하는 Nitric Oxide Synthase(NOS)의 active site에 대한 기질구조의 특이성과 세포막의 투과성이나 용해도의 차이 등에서 기인되는 것으로 추측되지만 정확한 NO 방출 저해기작을 해명하기 위해서는 앞으로 보다 구체적이고 다양한 실험들이 필요할 것으로 생각된다.

ACAT 저해활성-9종의 sesquiterpene lactones을 대상으로 ACAT 저해실험을 실시한 결과, Table I에 나타낸 바와 같이 angeloylcumambrin B(IC₅₀=33 μg/ml, 95.4 μM), tigloylcumambrin B(IC₅₀=22 μg/ml, 63.6 μM), tulipinolide(IC₅₀=38 μg/ml, 151 μM) 및 costunolide(IC₅₀=17 μg/ml, 73.3 μM)가 강한 활성을 보였으며 그 외의 화합물들은 유의성 있는 활성을 보여주지 않았다. 본 실험에서 분리한 tigloylcumambrin B나 costunolide 등은 국외에서 개발된 미생물유래 ACAT 저해제인 purpactin,¹²⁾ acatelin,¹³⁾ helmintosporol¹⁴⁾ 등과 같은 물질(IC₅₀=10 nM~50

μM)보다는 낮지만, 또 다른 미생물유래 ACAT 저해제인 GERI-BP001-A, B, M(IC₅₀=20~94 μM)^{15,16)} 등과는 거의 유사한 활성을 가지는 것으로서 식물유래 ACAT 저해제로서의 개발가능성이 있다고 생각된다. 또한 지금까지 천연 ACAT 저해제는 대부분 미생물에서 분리한 것이며 아직까지 식물유래 ACAT 저해제에 대한 연구보고는 미흡한 실정이기 때문에 이 부분에 대한 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

식물유래 생리활성물질에 대한 연구의 일환으로, 지칭개, 구질초 및 산국에서 분리한 9종류의 sesquiterpene lactone에 대해 NO의 방출저해효과와 ACAT에 대한 저해실험을 각각 실시하였다. NO 방출저해실험 결과, hemistepsin B가 가장 강한 활성(IC₅₀=0.05 μg/ml, 0.15 μM)을 보였으며, cumambrin B, tulipinolide 및 costunolide도 각각 IC₅₀ 값 0.1 μg/ml(0.38 μM), 0.2 μg/ml(0.96 μM), 0.2 μg/ml(0.86 μM)의 높은 활성을 보였다. 그리고 ACAT 저해실험 결과, angeloylcumambrin B와 tigloylcumambrin B, tulipinolide 및 costunolide가 각각 IC₅₀ 값 33 μg/ml(95.4 μM), 22 μg/ml(63.6 μM), 38 μg/ml(151 μM), 17 μg/ml(73.3 μM)의 강한 활성을 보였다.

사사

이 연구는 1998년도 농림부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 연구결과 중 일부입니다.

인용문헌

1. Radi, R., Beckman, J. S., Bash, K. M. and Freeman, R. A. (1991) Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: Cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 228: 481-487.
2. Feldman, P. L., Griffith, O. W. and Stuehr, D. J. (1993) The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News* 71: 26-38.
3. Ya'acov, Y. L. (1996) Nitric oxide in biological system. *Plant Growth Regulation* 18: 155-159.

4. Chang, T. Y. and Doolittle, G. M. (1983) Acyl Coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase. *The enzyme Vol. XVII*, Academic Press, Inc. 523-539.
5. Catherine, C. Y., Hun, H. Y., Cadigan, K. M. and Chang, T. Y. (1993) Molecular cloning and functional expression of human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 268: 20747-20755.
6. Sliskovic, D. R. and White, A. D. (1991) Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and antiatherosclerotic agents. *Trends in Pharmacol. Sci.* 12: 194-199.
7. 장대식, 김환목, 홍동호, 전효근, 고영희, 양민석 (1998) 수종의 국화과 식물에서 분리한 sesquiterpene lactone들의 생리활성(제1보), 암세포주에 대한 세포 독성. *생약학회지* 29(3): 243-247.
8. Gtordano, O. S., Querreiro, E., Pestchanker, M. J., Guzman, J., Pastor, D. and Guardia, T. (1990) The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Natural Products* 53 (4): 803-809.
9. Abad, M. J., Bermejo, P., Valverde, S. and Villar, A. (1994) Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. *Planta Med.* 60: 228-231.
10. Kobuchi, H., Christen, Y. and Packer, L. (1997) Ginkgo biloba extract (EGb761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW264.7. *Biochem. Pharmacol.* 53: 897-903.
11. Ericson, S. K., Shrewbery, M. A., Brooks, C. and Meyer, D. J. (1980) Rat liver acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase: its regulation *in vivo* and some of its properties *in vitro*. *J. Lipid Res.* 21: 930-941.
12. Tomoda, H., Nishida, H., Masuma, R., Cao, J., Okuda, S. and Omura, S. (1991) Purpactins, new inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium purpurogenum* Production, isolation and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiotics* 44: 136-143.
13. Naganuma, S., Sakai, K., Hasumi, K. and Endo, A. (1992) Acaterin, a novel inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Pseudomonas* sp. A92. *J. Antibiotics* 45: 1216-1221.
14. Park, J. K., Hasumi, K. and Endo, A. (1993) Inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase by helminthosporol and its related compounds. *J. Antibiotics* 46: 1303-1305.
15. Jeong, T. S., Kim, S. U., Kwon, B. M., Son, K. H., Kim, Y. K., Choi, M. U. and Bok, S. H. (1994) GERI-BP001, a new inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus* F37. *Tetrahedron lett.* 35: 3569-3570.
16. Jeong, T. S., Kim, S. U., Son, K. H., Kwon, B. M., Kim, Y. K., Choi, M. U. and Bok, S. H. (1995) GERI-BP001 compounds, new inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus* F37. *J. Antibiotics* 48: 751-756.

(1998년 11월 8일 접수)