

쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 Nitric Oxide 생성 저해활성

노태철, 최희철, 김보연, 김영호¹, 안종석, 김영국, 이현선*

생명공학연구소, ¹충남대학교 약학대학

Inhibitory Effect of Coumarins on Nitric Oxide Production in LPS-Activated Murine Macrophages

Tae Cheol Rho, Hee Cheol Choi, Bo Yeon Kim, Young Ho Kim¹,
Jong Seog Ahn, Young Kook Kim and Hyun Sun Lee*

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P. O. Box 115,
Yusong, Taejeon 305-600, Korea; and ¹College of Pharmacy,
Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea*

Abstract – During the screening for inhibitors on nitric oxide (NO) production in LPS-activated murine macrophage, RAW 264.7 cells, two coumarins were isolated from chloroform extract of Ponciri Fructus. They were identified as imperatorin (**10**), phellopterin (**11**) on the basis of spectroscopic methods. The IC₅₀ values for NO formation were about 5.4 μM and 35.0 μM, respectively, and then eleven coumarins were tested for the inhibitory effects on NO production in activated macrophages. All the test coumarins inhibited NO production in concentration-dependent manner and furanocoumarins (**6-11**) showed much more potent inhibitory effect than simple coumarins. Among the compounds examined xanthotoxin (**8**) was the most potent inhibitors of NO production (IC₅₀=1.4 μM). Analysis of the structure-activity relationship among these coumarins led to the conclusion that the substitution of C-5 position in furanocoumarins reduces greatly their inhibitory potency although the substitution of C-8 does not almost affect it.

Key words – Ponciri Fructus; coumarins; nitric oxide; RAW 264.7 cells; lipopolysaccharide (LPS).

Nitric oxide (NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈소판응집억제, 면역기능등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 여러 조직과 세포에서 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 합성된다.¹⁻²⁾ NOS는 크게 cNOS와 iNOS로 나눌 수 있으며, iNOS는 세포내 Ca²⁺의 농도에 비의존성이며 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포등 여러 세포에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ), interleukin-1 (IL-1)과 tumor necrosis factor-α (TNF-α)등의 자극에 의해 활성화되어 장시간동안 다량의 NO를 생성한다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 hypotension (혈관확장), 염증반응

으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.³⁻⁶⁾ 그러므로 NO생성저해제는 septic shock, 당뇨, 동맥경화등의 만성질환 치료제로의 가능성을 제시하고 있다.

따라서 이런 질병에 대한 치료제를 개발할 목적으로, 최근에는 천연물로부터 NO생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다. 그 대표적인 것으로 evodiamine과 dehydroevodiamine (*Evodia rutaecarpa*),⁷⁾ yomogin (*Artemisia princeps*),⁸⁾ EGb 761 (*Ginkgo biloba*),⁹⁾ curcumin (*Curcuma longa*)¹⁰⁾과 scopoletin (*Artemisia fedi*)¹¹⁾등이 보고되어 있다.

저자들은 지실 (Ponciri Fructus) 로부터 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에서의 NO생성 저해활

*교신저자 : Fax-042-860-4595

성을 나타내는 2종의 쿠마린계 물질의 분리하였으며, 이들의 구조와 11종의 coumarin계 물질의 구조와 NO생성 저해활성과의 관계에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료, 기기 및 시약 - 본 실험에 사용한 compound 1-5은 Sigma에서 구입하여 사용하였고, compound 6-9는 *Peucedanum japonicum* (갯기름나물)의 뿌리에서 분리하여 사용하였다.¹²⁾ compound 10, 11은 지실로부터 분리하였으며 이들의 분리와 구조동정은 실험 방법에 기술하였다.

박층크로마토그래피는 pre-coated TLC plate silica gel 60F₂₅₄ (Merck, Art. 5554)와 RP-18F₂₅₄S (Merck)를 이용하여 실시하였고 컬럼크로마토그래피용 담체로는 Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merck), YMC-gel (ODS-A, 60-230 mesh), Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였다. NMR spectrum은 Varian Unity 300 spectrometer, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine 5989A mass spectrometer를 사용하여 측정하였다. Griess시약으로 사용된 N-(1-naphthyl) ethylenediamine·2HCl, sulfanilamide은 Sigma, 대조약물로 사용된 L-NMMA(N^G-monomethyl-L-arginine, monoacetate)은 Calbiochem.으로부터 구입하여 사용했다.

세포배양 - Murine macrophage RAW 264.7 세포는 10% FBS (fetal bovine serum), 2 mM L-arginine과 100 µg/ml의 penicilline, streptomycin이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양되었다. RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/ml의 농도로 하여 96-multiwell plate의 각 well에 200 µl씩 분주하고 2시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 새로운 배지로 교환하였다. 각 well에 1 µg/ml의 lipopolysaccharide (*E. coli* serotype 055:B5, Sigma)와 검정시료용액 5 µl를 첨가하여 20시간 배양하였다.

Nitrite assay - macrophage로부터 생성된 Nitric oxide (NO)의 양은 세포배양액중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 µl와 Griess시약 [0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine·2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H₃PO₄ in H₂O] 100 µl를 혼합하여 96-multiwell plates에서 10분 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 microplate reader (Dynatech, MR 700)로 흡광도를 측정하였다.¹³⁾

지실로부터 nitric oxide 생성저해물질, compound 10과 11의 분리 - 지실(Ponciri Fructus) 600 g을 마쇄한 후 MeOH 6L로 실온에서 3일간 2회 추출, 감압농축하여 얻은 MeOH추출물 (130 g)을 CHCl₃층과 물층으로 분획하여 CHCl₃추출물 44 g을 얻었다. 이 CHCl₃추출물 (35 g)을 실리카겔 크로마토그래피(CHCl₃/MeOH, 30: 1→10: 1)를 실시하여 활성분획 7.2 g을 얻고 계속해서 hexane/EtOAc/MeOH (3: 1: 0.5) 혼합용매를 용매로 2차 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 활성분획 50 mg을 얻었다. 이 분획을 ODS 컬럼크로마토그래피(50% MeOH→90% MeOH)로서 2개의 분획 Fr. A와 Fr. B로 나누었으며, Fr. A로부터 50% MeOH의 용매와 semi-prep. HP LC(column; J'sphere ODS-H80, 4 µm, 80 Å, 20×150 mm I.D., flow rate: 7 ml/min., UV detector; 254 nm)를 이용하여 compound 10(2 mg)을 얻었으며, Fr. B로부터 55% CH₃CN의 용매를 사용하여 Compound 11(3 mg)을 분리하였다.

Imperatorin (10) - C₁₆H₁₄O₄; EI-MS(70eV), *m/z* (rel. int.) 270(M⁺, missing), 202(100), 174(35), 145(10), 89(48.5), 63(45.6); ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ : 7.76(1H, d, *J*=9.6Hz), 7.69(1H, d, *J*= 2.3Hz), 7.36(1H, s), 6.81(1H, d, *J*=2.3Hz), 6.37(1H, d, *J*=9.6Hz), 5.61(1H, t-like, *J*=7.2Hz), 5.01(2H, d, *J*=7.2Hz), 1.74(3H, s), 1.72(3H, s); ¹³C-NMR(75MHz, CDCl₃) δ : 18.1, 25.8, 70.2, 106.7, 113.1, 114.7, 116.5, 119.8, 125.9, 131.6, 139.8, 143.8, 144.3, 146.6, 148.6, 160.5.

Pellopterin (11) - C₁₇H₁₆O₅; EI-MS(70eV), *m/z* (rel. int.) 300(M⁺, missing), 232(100), 217(87.8), 189(17.3), 161(9.6), 89(11.9), 69(4.2); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.12(1H, d, *J*=9.6Hz), 7.62 (1H, d, *J*=2.4Hz), 6.99(1H, d, *J*=2.3Hz), 6.28(1H, d, *J*=9.6Hz), 5.60(1H, t-like, *J*=7.2Hz), 4.85(2H, d, *J*=7.2Hz), 4.17(3H, s), 1.74(3H, s), 1.70(3H, s); ¹³C-NMR(75MHz, CDCl₃) δ : 18.1, 25.8, 60.8, 70.4, 105.1, 107.6, 112.8, 114.6, 119.8, 126.8, 139.4, 139.7, 144.4, 145.1, 150.8, 160.5.

결과 및 고찰

LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 nitrite의 양을 Griess 시약을 사용하여 생약자원의 MeOH추출물을 대상으로 NO 생성 저해

활성을 조사하였다. 그중 지실(Ponciri Fructus)의 MeOH추출액으로부터 2종의 coumarin계의 물질, **10**과 **11**를 분리하였으며, 이들의 MS, ¹H-과 ¹³C-NMR spectrum등의 기기분석 data와 문헌상의 결과를 비교함으로써 imperatorin (**10**)과 phellopterin (**11**)으로 동정하였다.^{14,15)}

Fig. 1은 compound **10**과 **11**의 농도에 따른 NO 생성 저해활성을 나타낸 표이다. 이들 물질들은 농도의존적으로 NO생성을 저해했으며 IC₅₀는 1.5 μg/ml (5.4 μM)과 10.5 μg/ml (35.0 μM)로 나타났다. 양성대조군으로는 L-arginine과의 기질경쟁에 의하여 활성을 나타내는 iNOS 저해제로 알려진 L-NMMA (IC₅₀=4 μM, N^G-monomethyl-L-arginine, monoacetate)와 iNOS mRNA의 발현을 억제하여 NO생성 저해활성을 나타내는 curcumin (IC₅₀=6 μM)을 사용하였다.^{16,10)}

저자 등은 생약자원으로부터 NO 생성 저해활성물질의 탐색과정 중 갯기름나무(*Peucedanum japonicum*)의 뿌리와 지실로부터 coumarin계 물질을 얻을 수가 있었으며, coumarin계 물질들의 구조와 NO 생성 저해활성간의 관계를 살펴보기 위해 5종의 simple coumarin으로 coumarin (**1**), 4-hydroxycoumarin (**2**), 6-methoxycoumarin (**3**), 7-hydroxycoumarin (**4**), 7-methylcoumarin (**5**)과 6종의 furanocoumarin으로, psoralen (**6**), bergapten (**7**), xanthotoxin (**8**), isopimpinelin (**9**), imperatorin (**10**), phellopterin (**11**)에 대한

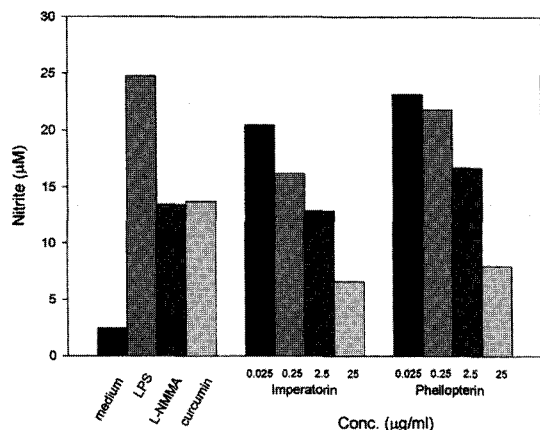


Fig. 1. The inhibitory effect of imperatorin (**10**) and phellopterin (**11**) on nitrite production in LPS-activated RAW 264.7 cells. Cells were cultured with test samples and LPS (1 μg/ml) for 20 h, and NO₂⁻ content in the culture supernatants was measured using Griess method. Results are indicated as mean of three experiments. L-NMMA (4 μM) and curcumin (6 μM) were used as positive control.

구조와 NO생성저해 실험을 행하여 그 결과를 Table I에 나타냈다.

Xanthotoxin (**8**)의 IC₅₀는 1.4 μM로 검색 시료중 가장 강한 저해활성을 보여주고 있으며, inducible NOS (nitric oxide synthase) 저해제로 알려진 L-NMMA보다도 더 강한 저해활성을 보여주고 있다. 또한 5.4 μM의 IC₅₀를 보여주는 compound **6**과 **10**은 대조군으로 사용된 curcumin과 유사한 NO 생성 저해활성을 보여 주었다.

전체적으로 볼 때 simple coumarin의 IC₅₀는 200 μM이상으로 매우 낮은 저해활성을 보여주고 있는 반면, furanocoumarin의 경우 simple coumarin보다는

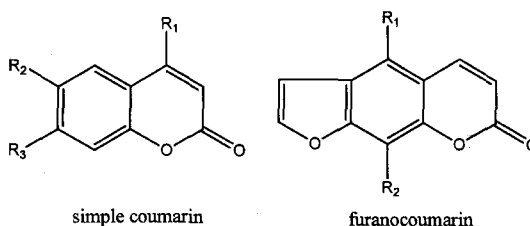


Table I. Inhibitory activity of **1**~**11** on nitric oxide formation in murine macrophage, RAW 264.7 cells stimulated by LPS

Compound	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)
Simple coumarins				
1	H	H	H	>200(30%) ^{a)}
2	OH	H	H	>200(30%)
3	H	OCH ₃	H	>200(45%)
4	H	H	OH	>200(40%)
5	H	H	CH ₃	>200(38%)
Furanocoumarins				
6	H	H	-	5.4
7	OCH ₃	H	-	115.7
8	H	OCH ₃	-	1.4
9	OCH ₃	OCH ₃	-	101.6
10	H	OCH ₂ CHC (CH ₃) ₂	-	5.4
11	OCH ₃	OCH ₂ CHC (CH ₃) ₂	-	35.0
L-NMMA	-	-	-	4.0
Curcumin	-	-	-	6.0

IC₅₀ values in table show the 50% inhibition concentration of NO production measured as amount of nitrite by the Griess method.

^{a)} inhibition % at the final concentration of 100 μM

강한 저해활성을 나타내고 있으며 치환기의 위치에 따른 저해활성의 정도에 차이를 보이고 있다. 즉, C-8위치의 R₂가 methoxy이나 -OCH₂CHC(CH₃)₂로 치환된 compound 8과 10은 furanocoumarin의 기본 골격인 psoralen (6)과 유사하거나 더 강한 저해활성을 보여주고 있는 반면, C-5위치의 R₁이 methoxy로 치환된 경우 약 6배~72배정도의 활성 감소를 보여주고 있다 (6 vs. 7, 8 vs. 9, 10 vs. 11).

이상의 결과로부터 furanocoumarin이 NO 생성 저해활성을 보이는데는 C-5위의 R₁위치의 치환 여부가 중요하며 C-8위의 R₂위치의 치환체의 종류에 따라 저해활성의 정도가 조절될 수 있다고 추정된다.

인용문헌

1. Stamler, J. S., Singel, D. J. and Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
2. Galla, H. J. (1993) Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 378-380.
3. Knowles, R. G. and Moncada, S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 17: 399-402.
4. Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
5. Stuehr, D., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. and Nathan, C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA.* 88: 7773-7777.
6. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749-754.
7. Chiou, W. F., Sung, Y. J., Liao, J. F. and Chen, C. F. (1997) Inhibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrophages. *J. Nat. Prod.* 60: 708-711.
8. Ryu, J. H., Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y. and Han, Y. N. (1998) Yomogin, an inhibitor of nitric oxide production in LPS-activated macrophages. *Arch. Pharm. Res.* 21(4): 481-484.
9. Kobuchi, H., Droy-Lefaix, M. T., Christen, Y. and Packer, L. (1997) Ginkgo biloba extract (EGb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem. Pharm.* 53: 897-903.
10. Brouet, I. and Ohshima, H. (1995) Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 533-540.
11. Kang, T. H., Pae, H. O., Jeong, S. J., Yoo, J. C., Choi, B. M., Jun, C. D., Chung, H. T., Miyamoto, T., Higuchi, R. and Kim, Y. C. (1999) Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*. *Planta Med.* 65: 400-403.
12. 최희철, 노태철, 김보연, 오원근, 성창근, 안중석, 이현선 (1999) 갯기름나물의 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 nitric oxide 생성 저해활성. *생약학 회지* 30: 99-104.
13. Feelisch, M. and Stamler, J. (1996) Methods in nitric oxide research. 492-497, *John Wiley & Sons.*
14. Bergendorff, O., Dekermendjian, K., Nielsen, M., Shan, R. Witt, R., Ai, J. and Sterner, O. (1997) Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepin receptors *in vitro*. *Phytochemistry* 44: 1121-1124.
15. Masuda, T., Tagasugi, M. and Anetai, M. (1998) Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. *Phytochemistry* 47: 13-16.
16. Reif, D. W. and McCreedy, S. A. (1995) N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* 320: 170-175.

(1999년 10월 4일 접수)