

## 느릅나무의 근피로부터 분리한 Mansonone E의 항암효과

이경호\* · 조좌형<sup>1</sup> · 윤원호<sup>2</sup>

코오롱중앙기술원, <sup>1</sup>국립익산대학 식품공업과, <sup>2</sup>서일대학 식품가공과

### *In vivo* Antitumor Activity of Mansonone E isolated from *Ulmus davidiana* var. *japonica* NAKAI

Keyong Ho Lee\*, Choa Hyung Cho<sup>1</sup>, and Won Ho Yoon<sup>2</sup>

Kolon Central Research Park, Yongin-city 449-797, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Engineering Iksan National College, Iksan 570-752, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science & Technology Seoill College, Seoul 131-702, Korea

**Abstract** – A highly potent antitumor sesquiterpene *O*-naphthoquinone has been isolated from *Ulmus davidiana*, which has been traditionally used as the folk medicine. The structure of this compound was established on the basis of spectral data obtained from UV, IR, MS, and NMR spectrometry, and determined as mansonone E. This compound showed potent antitumor activity on *in vivo* assay, hollow fiber and xenograft assay.

**Key word** – *Ulmus davidiana*, hollow fiber assay, antitumor activity, mansonone E

느릅나무(*Ulmus* sp.)는 이른 봄이나 가을에 뿌리 껍질을 벗겨서 약으로 사용되어 왔다. 분포지역으로는 우리나라를 비롯하여 일본, 사할린, 쿠릴열도, 중국 북부 및 동시베리아 등이다. 한방에서는 껍질을 유평(楡皮)라는 약재로 사용되며, 치습(治濕), 이노, 소종독(消腫毒)의 처방에 사용되어 있다. 느릅나무 근피의 성분연구로는 Moon 등이  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside, catechin 등을 분리하였고<sup>1)</sup> Kim 등은 참느릅나무(*U. parvifolia*)의 잎으로부터 isoquercitrin, rutin을 분리하였고<sup>2)</sup> Son 등은 당느릅나무(*U. davidiana* Planch) 근피에서 catechin, catechin 5-*O*- $\beta$ -D-apiofuranoside 등을 보고하였고<sup>3)</sup> Lee 등은 느릅나무(*U. davidiana* var. *japonica*) 근피에서 lyoniside, 5'-methoxyisolariciresinol-9'-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside, isolariciresinol-9'-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside, rel-trans-dihydrodehydroconiferyl alcohol 4'-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside, icariside E3 등의 lignan 및 neolignan을 분리하였으며,<sup>4)</sup> Kim 등은 당느릅나무 근피에서 신규한 sesquiterpene *O*-naphthoquinone 물질로 davidianone A, B, C와 알려진 mansonone E, F, H, I의 을 분리하였다.<sup>5)</sup>

활성에 관한 연구로는 느릅나무 수피의 메탄올 추출의 gastric erosion 및 ulcer에 대한 효과,<sup>6)</sup> triterpenoid계 성분인 friedelin, epifriedelanol 및 taraxerol에 의한 진통 작용,<sup>7)</sup> 느릅나무의 부탄올 추출 분획의 항암제와의 병용투여에 의한 상승효과,<sup>8)</sup> 참느릅나무의 물 추출에 의한 소염 및 진통작용,<sup>9)</sup> mansonone F에 의한 항산화 작용 및 methicillin내성 균주(MRSA)에 대한 항균작용 등이 보고되었다.<sup>5,10)</sup>

Mansonone은 서아프리카에 서식하는 *Mansonia altissima* 라는 식물로부터 분리되어 구조규명이 되었고, 현재까지 보고된 생리활성으로는 항산화효과에 대한 연구가 보고되었다. 그러나, 아직까지 mansonone E에 의한 항암효과는 보고된 바가 없었다.

본 연구에서는 느릅나무(*Ulmus davidiana*)의 근피로부터 분리한 mansonone E의 항암효과에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험 재료에 사용한 느릅나무의 근피(楡根皮)는 한약 재료상으로부터 구입하여 사용하였으며, 표본은 건국대학교 동물자원연구센터에 보관되어 있다.

**시약 및 기기** – 본 연구에 사용된 시약은 모두 특급(GR) 및 1급(EP)시약을 사용하였다. 용점은 Haakebuchler 미량용

\*교신저자(E-mail) : khlee67@kolon.com  
(FAX) : 031-280-8999

점 측정기를 사용하여 측정하였으며 측정치는 따로 보정하지 않았다. 물질의 동정을 위하여 EI-MS (70 eV)는 JEOL 사의 JMS-DX 303 mass spectrometer,  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR spectra는 Bruker의 AM-300 및 AMX-500를 사용하였고, IR spectra는 FT-IR (Shimadzu, Japan)을 이용하여 측정하였다. Column chromatography는 silica gel 60 (70–230 mesh, Merk)를 사용하였고, prep. HPLC는 GIGAPREP SK-1 (SHISEIDO, Japan)를 이용하였다. TLC plate는 silica gel 60F<sub>254</sub> precoated plate (Merk)를 사용하였다.

**추출 및 분리** - 세절한 느릅나무 근피 5 kg을 methanol (MeOH) 로 상온에서 하룻밤 동안 교반 추출한 후, 물에 현탁시켜 dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )로 분획하여  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  추출물 37 g를 얻었다.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  추출물 37g를 hexane/ethylacetate 혼합용매를 용출용매로 사용하여 stepwise gradient elution 방식으로 silica gel chromatography ( $\varnothing=3.0\times 50$  cm)를 실시하여 18개의 분획으로 나누었다. 이 중 14번째 분획(7.5 g)을 prep. RP-C18 HPLC를 이용하여 1차에는 60% acetonitrile 용매조건으로 분리하였고, 분리된 물질을 재차로 70% methanol 용매조건으로 분리하여 2.4 g의 mansonone E를 분리하였다.

Mansonone E는 주황색의 침상결정, mp 148°C, UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) nm (log  $\epsilon$ ): 445 (3.05), 370 (3.03), 264 (4.21), 220 (3.74); IR  $\lambda_{\text{max}}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 1695, 1645, 1615, 1580; EIMS,  $m/z$  (rel. int.): 244  $[\text{M}+2]^+$ (11), 242  $[\text{M}]^+$ (31), 214  $[\text{M}-\text{CO}]^+$ (100), 199  $[\text{M}-\text{CO}-\text{Me}]^+$ (76), 186  $[\text{M}-\text{CO}-\text{CO}]^+$ (12), 171  $[\text{M}-\text{CO}-\text{CO}-\text{Me}]^+$ (42);  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.35 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, 9-Me), 1.95 (3H, s, 3-Me), 2.61 (3H, s, 8-Me), 3.09 (1H, m, H-9), 4.41 (1H, dd,  $J=10.7, 5.1$  Hz, H-10a), 4.23 (1H, dd,  $J=10.7, 3.9$  Hz, H-10b), 7.22 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-7), 7.35 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.78 (3-Me), 17.82 (7-Me), 22.33 (8-Me), 30.86 (C-9), 70.81 (C-10), 117.15 (C-3), 126.71 (C-5), 127.04 (C-4a), 132.64 (C-6), 134.62 (C-7), 136.71 (C-8a), 142.64 (C-8), 162.42 (C-4), 180.25 (C-2), 182.28 (C-1).

**항암활성 평가** - 인간 암종을 위한 항암 스펙트럼은 Hollow fiber assay와 Xenographic animal assay를 이용하여 측정하였다.<sup>11,12)</sup> Hollow fiber assay는 암세포를 한쪽 끝이 봉인된 hollow fiber에 주입한 후 나머지 한 쪽을 봉하여 macrocapsule를 만들었다. 이 capsule을 24시간 동안  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양한 후, 마우스의 좌우 옆구리에 피하 이식하였다. 시료 투여 일로부터 8일 후에 마우스로부터 hollow fiber 캡슐을 적출하여 캡슐 내에 있는 세포농도를 MTT 시약(1 mg/ml)으로 염색한 후, 형성된 formazan를 DMSO로

녹여 흡광도(540 nm)를 측정하여 저해율로 평가하였다.

Xenographic animal assay는 적정 농도의 암세포를 누드 마우스의 옆구리에 이식하여 종양을 만든 후, 형성된 종양을 clean bench에서 적출하여 가로, 세로, 높이를 3 mm 정도로 일정하게 절단하여 새로운 마우스의 옆구리에 절단한 종양을 이식하였다. 이식 후, 종양의 크기가 200–300  $\text{mm}^3$ 가 되는 시점부터 시료를 투여하였으며 항종양 효과의 판정은 투여 시작일로부터 28일째까지의 종양의 크기를 대조군과 비교하여 저해율로 평가하였다.

시료는 DMSO에 녹여 5, 10 및 20 mg/kg의 농도로 복용으로 매일 1회씩 총5회 투여하였다.

실험에 사용한 대장암 세포로는 HCT-15, Colo-320DM, WiDr와 HCT116을, 자궁암 세포로는 HeLa와 SiHa를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

느릅나무 근피로부터 분리한 항암활성 성분의 여러 가지 기기분석 결과, IR 스펙트럼의 1695와 1645 $\text{cm}^{-1}$ 의 흡수대는  $> \text{C}=\text{O}$ 와  $\text{C}=\text{C}$ 에 기인한 것으로 판단되었고, EIMS 결과  $[\text{M}+2]^+$ 의 *ortho*-naphthoquinone의 특징적인 ion peak가 관찰되었다.  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서는 8개의 proton signal이 관찰되어 2개의 aromatic proton으로 보이는 signal  $\delta$  7.22와 7.35가 상호간에 *ortho*-coupled된 것으로 판단되었으며,  $\delta$  4.23과 4.41에서 methylene proton의 상호 coupling이,  $\delta$  1.35의 aliphatic methyl doublet에 영향을 받아  $\delta$  3.09에서 methine proton이 multiplet으로 나타나  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{O}$ 의 존재가 확인되었다. Quinone carbonyl에 peri position됨을 짐작하게 하는 강하게 deshielded된 aromatic methyl signal이  $\delta$  2.61에서 관찰되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼은 총 15개의 carbon이 관찰되었으며, quinone의 2개의 carbonyl carbon으로 보이는 carbon signal이  $\delta$  180.25와 182.28에서 관찰되었다. UV  $\lambda_{\text{max}}$ 의 측정결과, 445 nm에서 *ortho*-naphthoquinone의 특징적인 흡수파장 대가 관찰되었다. 따라서 느릅나무 근피의 methanol 추출물로부터 분리한 물질은 mansonone E ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ )로 판단되었으며 이 결과는 기존에 보고된 문헌의 결과와 일치하는 것으로 나타났다.<sup>13-17)</sup>

4종의 대장암 세포주와 2종의 자궁암 세포주를 대상으로 한 항암스펙트럼 결과는 Table I과 II와 같다. 6종류의 종양세포주에 대한 평가 결과, HeLa에 대하여 두 가지 검색법에서 일관된 항암활성이 나타났다. 즉, 20 mg/kg 농도에서 모두 50% 이상의 종양증식 저해효과를 나타내었으며 그 효과도 농도에 따라서 의존적으로 나타났다. 감수성이 높은 순서로는 HeLaK>KWiDrK>KHCT-15로 나

**Table I.** *In vivo* hollow fiber assay에 의한 종양증식 저해 효과

Cell lines	Cisplatin		Mansonone E	
	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
HCT-15	34	15	30	52*
Colo-320DM	48	10	18	25
WiDr	28	24	31	57*
HCT116	64*	5	6	11
HeLa	70*	20	38	59*
SiHa	11	12	28	49

\*: ≥50%의 종양증식 저해율

**Table II.** Xenographic animal assay에 의한 종양증식 저해 효과

Cell lines	Cisplatin		Mansonone E	
	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
HCT-15	45	14	32	40
Colo-320DM	55*	11	21	30
WiDr	28	19	37	45
HCT116	49	9	12	12
HeLa	59*	10	34	58*
SiHa	24	15	23	39

\*: ≥50%의 종양증식 저해율

타났고, 나머지 종양세포주는 유의한 차이를 볼 수 없었다.

이전 보고에서 여러 가지의 생약재료에 대한 methanol 추출물의 항암효과를 측정한 결과, HeLa와 SK-MEL-2에 대하여 항암효과가 뛰어난 생약재료로 느릅나무와 백화사설초가 검색되었다.<sup>18)</sup> 이중 느릅나무 근피 추출물에 대한 항암효과를 추적한 결과 본 연구에서 mansonone E라는 물질을 분리할 수 있었다.

현재까지 보고된 mansonone의 생리활성에 관한 연구는 다음과 같다. *Masonia gagei*의 heartwood로부터 분리된 mansonone C와 E의 *Cladosporium cucumerinum*과 *Candida albicans*에 대한 항균효과<sup>19)</sup> *Ulmus davidiana* var. *japonica* NAKAI로부터 분리한 mansonone F의 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)에 대한 저해효과<sup>10)</sup> *Thespesia populnea*의 heartwood로부터 얻어진 mansonone D의 superoxide anion radical 생성에 의한 MCF-7 세포에 대한 세포독성효과<sup>20)</sup> 역시 mansonone D의 ricin, modecin, *Pseudomonas* toxin 및 diphtheria toxin 유래의 독성을 저해하는 효과<sup>21)</sup> *Mansonia altissima* Cher.로부터의 mansonone C, E와 F의 lipid peroxidation 저해, cytochrome p450 손상 저해, NADPH-supported aniline 4-hydroxylase 활성저해, Fe(III)ADP reduction 저해, superoxide anion generation

촉진 및 ascorbate 산화 촉진 등<sup>22)</sup>의 활성이 보고되었다.

본 연구결과, mansonone E는 *in vivo* 검색법인 hollow fiber assay 및 xenograft assay에서 대장암 및 자궁암 세포주에 대한 항암활성 평가결과, 마우스에 이식된 종양세포에 대하여 50% 증식저해효과를 나타내었다. 농도는 20 mg/kg의 수준이었고, 이 농도에서 종양증식저해효과가 나타난 세포주는 10 mg/kg 농도에서 대략 30% 정도의 증식저해 수준을 나타내었다. Mansonone E에 대해서 가장 감수성이 좋은 종양세포주로는 HeLa로 판단되었으며, 기 보고 한 결과<sup>18)</sup>와 활성이 일치된 감수성이 나타났다.

현재까지 보고된 느릅나무 근피로부터의 항암활성에 관한 연구로는 근피의 *n*-BuOH 분획의 Hep-G<sub>2</sub> 세포에 대한 증식 억제효과 및 기존 항암제와 병용효과<sup>8)</sup> hollow fiber assay에 의한 methanol 분획의 HeLa 및 SK-MEL-2에 대한 증식 억제효과<sup>18)</sup> 및 근피의 methanol 추출물의 topoisomerase I 저해효과<sup>23)</sup> 등이 있다. 그러나 이들 추출물은 어느 성분이 위와 같은 효과를 갖는가는 알 수 없다.

본 연구결과로부터 느릅나무 근피의 methanol 추출물의 항암효과 물질은 mansonone E임을 알 수 있었으며, 향후 이 물질에 대한 pharmacocore의 확인 및 용해성 개선 등에 관한 연구가 필요하리라 생각된다

### 인용문헌

1. 문영희, 임기룡(1995) 참느릅나무의 성분에 관한 연구. 생약학회지 26(1): 1-7.
2. 김성환, 황금택, 박종철(1992) 참느릅나무 잎에서 flavonoid 성분의 분리 및 HPLC에 의한 정량. 생약학회지 23(4): 229-234.
3. Son, B. W., Park, J. H., and Zee, O. P. (1989) Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* 12: 219-222.
4. Lee, M. K., Sung, S. H., Lee, H. S., Cho, J. H., and Kim, Y. C. (2001) Lignan and neolignan glycosides from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *Arch. Pharm. Res.* 24: 198-201.
5. Kim, J. P., Kim, W. G., Koshino, H., Jung, J., and Yoo, I. D. (1996) Sesquiterpene *O*-naphthoquinones from the root bark of *Ulmus davidiana*. *Phytochemistry* 43(2): 425-430.
6. 이은방, 정기화, 정춘식, 김옥경(1995) 느릅나무 수피 엑스가 흰쥐의 위염, 위궤양 및 발부종에 미치는 영향. 생약학회지 39(6): 671-675.
7. 홍남두, 노영수, 김남재, 김진식(1900) 유백피의 성분에 관한 연구. 생약학회지 12(3): 201-204.
8. 은재순, 송원영(1994) 암세포주에 대한 유근피 *n*-BuOH 분획과 항암제의 병용효과. 생약학회지 25(20): 144-152.
9. 조승길, 이순교, 김창중(1996) 참느릅나무 근피수침엑스의 소염 진통작용. 생약학회지 27(3): 274-281.

10. Shin, D. Y., Kim, H. S., Min, K. H., Hyun, S. S., Kim, S. A., Huh, H., Choi, E. C., Choi, Y. H., Kim, J. W., Choi, S. H., Kim, W. B., and Suh, Y. G. (2000) Isolation of a potent anti-MRSA sesquiterpenoid quinone from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **48**(11): 1805-1806.
11. Hollingshead, M. G., Alley, M. C., Camalier, R. F., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Malspeis, L., and Grever, M. R. (1995) In vivo cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Science* **57**(2): 131-141.
12. Maruo, K., Ueyama, Y., Inaba, M., Emura, R., Ohnishi, Y., Nakamura, O. Sato, O., and Nomura, T. (1990) Responsiveness of subcutaneous human glioma xenografts to various antitumor agents. *Anticancer Res.* **10**(1): 209-212.
13. Chen, G. M., Chen, Z. T., and Hong, Y. L. (1990) A mansonone from *Helicteres angustifolia*. *Phytochemistry* **29**(3): 980-982.
14. Letcher, R. M. and Shirley, I. M. (1992) *O*-naphthoquinones from the heartwood of *Azanza garckeana*. *Phytochemistry* **31**(12): 4171-4172.
15. Kim, J. P., Kim, W. G., Koshino, H., Park, J. H., Jung, J., and Yoo, I. D. (1996) Isolation and identification of sesquiterpene *O*-naphthoquinones, mansonone E, F and H, from the root bark of *Ulmus davidiana* Planch. *한국농화학회지* **39**(1): 89-94.
16. Milbrodt, M., Konig, W. A., and Hausen, B. M. (1997) 7-Hydroxy-2,3,5,6-tetrahydro-3,6,9-trimethylnaphtho[1,8-B,C]pyran-4,8-dione from *Thespesia populnea*. *Phytochemistry* **45**(7): 1523-1525.
17. Tanaka, N., Yasue, M. and Imamura, H. (1967) The chemistry of wood extractives. X VII. Constituents of *Mansonia altissima* (III). *木林學會誌* **13**(1): 16-20.
18. 이경호, 조좌형, 윤원호(2003) Hollow fiber 검색법과 Xenograft assay를 이용한 생약재의 암세포 저해활성 비교. *생약학회지* **34**(4): 288-292.
19. Tiew, P., Ioset, J. R., Kokpol, U., Chavasiri, W., and Hostettmann, K. (2003) Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei*. *Phytother Res.* **17**(2): 190-193.
20. Johnson, I. J., Gandhidasan, R., and Murugesan, R. (1999) Cytotoxicity and superoxid anion generation by some naturally occurring quinones. *Free Radic. Biol. Med.* **26**(9-10): 1072-1078.
21. Nambiar, M. P., Murugesan, R., and Wu, H. C. (1998) Inhibition of the cytotoxicity of protein toxins by a novel plant metabolite, mansonone-D. *Cell Physiol.* **176**(1): 40-49.
22. Villamil, S. F., Dubin, M., Galeffi, C., and Stoppani, A. O. (1990) Effects of mansonones on lipid peroxidation, P450 monooxygenase activity, and superoxide anion generation by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **40**(10): 2343-2351.
23. Lee, K. H., Lee, J. H., Cho, C. H., Noh, M. J., and Kim, Y. B. (2001) Radiosensitizing and topoisomerase I inhibitory effects of *Aloe vera*, *Formitella fraxinea* and *Ulmus davidainas* extracts. *Natural Product Sciences* **7**(2): 60-62.

(2004년 6월 15일 접수)