

## 물푸레나무 수피의 생쥐 해마 유래 HT22 세포 보호와 항산화 활성 물질

정길생<sup>1</sup> · 윤권하<sup>1</sup> · 김현철<sup>2</sup> · 오승환<sup>2</sup> · 김명중 · 강대길<sup>3</sup> · 이호섭<sup>3</sup> · 김윤철\*

원광대학교 약학대학, <sup>1</sup>원광대학교 의산방사선영상과학연구소, <sup>2</sup>광동제약, <sup>3</sup>원광대학교 한의학전문대학원

## Cytoprotective Constituents of the Stem Barks of *Fraxinus rhynchophylla* on Mouse Hippocampal HT22 Cells and Their Antioxidative Activity

Gil-Saeng Jeong<sup>1</sup>, Kwon-Ha Yoon<sup>1</sup>, Hyun-Chul Kim<sup>2</sup>, Seung-Hwan Oh<sup>2</sup>, Myongjung Kim, Dae-Gill Kang<sup>3</sup>, Ho-Sub Lee<sup>3</sup>, and Youn-Chul Kim\*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea

<sup>1</sup>Institute for Radiological Imaging Science, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea

<sup>2</sup>Central R & D Center, Kwang Dong Pharmaceutical Co., Pyongtaek, 459-020, Korea

<sup>3</sup>Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea

**Abstract** – Phytochemical investigation of the MeOH extract of the dried stem barks of *Fraxinus rhynchophylla* Hance (Oleaceae), as guided by cytoprotective activity against *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-induced cell injury in mouse hippocampal HT22 cells, furnished two coumarins, esculetin (**1**) and fraxetin (**2**). Compounds **1** and **2** had the significant cytoprotective effects on *t*-BHP-induced cellular oxidative injury in HT22 cells. Furthermore, compounds **1** and **2** showed potent DPPH radical scavenging effect, exhibiting IC<sub>50</sub> values of 14.68 and 9.64 μM, respectively.

**Key words** – *Fraxinus rhynchophylla*, HT22, *t*-butyl hydroperoxide, cytoprotective effect, DPPH radical scavenging

진피(秦皮; Fraxini Cortex)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 낙엽활엽교목인 물푸레나무(*Fraxinus rhynchophylla* Hance)의 수피로 한방에서 만성 기관지염과 세균성 설사의 치료에 이용되고 있다.<sup>1)</sup> 진피의 생리활성 성분연구로는 inducible nitric oxide 합성 억제 효과,<sup>2)</sup> 사염화탄소로 유도된 생쥐의 간 독성에 대한 보호효과,<sup>3)</sup> DPPH 프리라디칼 소거 활성을 가지는 성분으로 쿠마린류와 알칼로이드류 등이 보고되어 있다.<sup>4)</sup> 또한 동속 식물의 성분 연구로는 쇠 물푸레나무(*Fraxinus sieboldiana* Blume)의 근피에서 쿠마린 배당체 화합물이 분리 되었으며,<sup>5)</sup> 긴 물푸레나무(*Fraxinus japonica* Blume)의 근피에서 쿠마린류의 화합물이 분리되었다.<sup>6)</sup>

산화적 스트레스는 알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추 신경계의 퇴행성 뇌질환의 중요한 요인으로 알려져 있다.<sup>7-10)</sup> *tert*-Butyl hydroperoxide(*t*-BHP)는 다양한 세포에서 산화적 스트레스를 유도하는 화합물로 사용되고 있다.<sup>11,12)</sup> 또한, *t*-BHP는 미립체의 cytochrome

P450 시스템으로 인하여 활성 산소종으로 대사되며,<sup>13)</sup> 그 후에 지질 과산화를 일으키고, 세포의 환원형 글루타치온을 고갈시키는 것으로 알려져 있다.<sup>13,14)</sup> 이러한 현상은 세포와 조직에서 발생하는 산화적 스트레스의 양상과 유사하다. HT22 세포주는 생쥐의 해마에서 유래한 세포주로 퇴행성 뇌질환으로 인한 산화적 손상에 대한 유용한 실험 모델 중 하나이다.<sup>15)</sup> 따라서 최근에 *t*-BHP에 의한 산화적 스트레스로부터 HT22 세포를 보호하는 성분 검색에 대한 연구가 보고 되고 있다.<sup>16,17)</sup> 본 연구에서는, 천연물로부터 뇌 세포 보호활성 물질을 탐색하는 과정에서 진피의 메탄올 추출물이 100 μM의 농도에서 *t*-BHP으로 유발한 HT22 세포주 사멸에 대하여 유의한 보호효과(보호율(%)=61.0±0.3)를 나타냈기 때문에 함유 성분의 분리를 수행하여 얻어진 2종의 화합물에 대한 뇌 세포 보호활성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에 사용한 진피는 2004년 11월 익산

\*교신저자 (E-mail): yckim@wku.ac.kr  
(FAX): 063-852-8837

시 소재 대학 한약국에서 구입하였으며, 시료의 일부는 표준품 (WK04-399)으로 보관하고 있다.

**시약 및 기기** - Column chromatography용 담체는 Kiesel gel 60(70~230 mesh, Merck), RP-18 Lichroprep(Merck), Sephadex LH-20(Sigma)을 각각 사용하였다. NMR spectrum은 JEOL JNM-ECP 500(<sup>1</sup>H, 500 MHz; <sup>13</sup>C, 125 MHz)을, ESI-MS는 API-2000 spectrometer를 사용하여 측정하였다. DMEM 배지와 trypsin-ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)는 Gibco Laboratories사에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. Trolox, t-BHP, 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다.

**HT22 세포배양 및 뇌세포 보호활성 측정** - 생쥐 해마 유래 HT22 세포주는 American Type Culture Collection에서 분양하여 사용하였으며, t-BHP으로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 강 등의 방법<sup>16)</sup>에 따라 실시하였다. 간략하게 설명하면, HT22 세포(2×10<sup>5</sup> cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 37°C에서 24시간 배양한 다음, 화합물(1, 2)의 시료 용액 (50, 100, 200, 300 µM)을 처리한 후 1시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양한 뒤, 60 µM t-BHP을 처리한 후 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였고 50%의 세포보호 효과를 나타내는 농도를 EC<sub>50</sub>치로 나타냈다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포 보호율을 mean ± S.D.로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다. 통계처리는 one-way ANOVA test를 적용하여 수행하였고, p값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미 있다고 간주하였다.

**DPPH 프리라디칼 소거 활성 측정** - DPPH 프리라디칼 소거 능력 Okada 등의 방법<sup>17)</sup>에 의해 다음과 같이 측정하였다. 0.05 M의 Tris-염산 완충액(pH 5.5, 0.95 ml)에 시료의 EtOH 용액(1.0 ml) 및 0.1 mM DPPH-EtOH 용액(1.0 ml)을 가하고, 50 µM 농도의 시료와 음성 대조군으로 증류수를 처리한다. DPPH 프리라디칼의 환원은 시료를 처리하고 실온에 방치한 후, 30분 후 517 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 시료의 DPPH프리라디칼 소거 활성은 시료 무첨가의 control의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(µg), 즉 IC<sub>50</sub>치를 측정하였으며, 항산화제인 L-ascorbic acid를 대조군으로 하여 시험하였다.

**추출 및 정제** - 건조된 진피(1 kg)을 MeOH(5 l×2회)로 3시간 동안 가열추출하고 여액을 감압농축하여 MeOH 추출물(109.0 g)을 얻었다. 이 추출물을 증류수(1 l)에 현탁하

고 n-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, n-BuOH 순으로 극성에 따라 분획하였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부(10.4 g)를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH(60:1 → 30:1 → 1:1)을 용출용매로 한 silica gel column chromatography (CC)를 통하여 4개의 소분획(Fr. A~D)을 얻었다. Fr. C(2.1 g)를 MeOH을 용매로 결정화하여 화합물 1(1.34 g)을 얻었다. Fr. B(1.76 g)는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH(1:1) 혼합용매를 용출용매로 하는 Sephadex LH-20 CC에 의하여 화합물 2(203 mg)를 얻었다.

**Esculetin (1)** - Light yellow needles; (-)-ESI-MS *m/z* 177 [M-H]<sup>-</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 7.86 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-4), 6.97 (1H, s, H-5), 6.74 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-3).

**Fraxetin (2)** - Pale yellow prisms; (-)-ESI-MS *m/z* 207 [M-H]<sup>-</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 7.88 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-4), 6.78 (1H, s, H-5), 6.21 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-3), 3.81 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 161.1 (C-2), 112.4 (C-3), 145.6 (C-4), 100.9 (C-5), 145.9 (C-6), 139.8 (C-7), 133.4 (C-8), 139.9 (C-9), 110.8 (C-10), 56.6 (6-OCH<sub>3</sub>).

## 결과 및 고찰

천연물로부터 뇌 세포 보호활성물질을 발견할 목적으로 산화적 손상을 유발하는 t-BHP를 생쥐 해마 세포 유래의 HT22 세포주에 처리한 후 세포생존율을 증가시키는 천연물 추출물을 검색하였다. 진피의 메탄올 추출물이 유의한 보호 효과를 나타내어(Table I), 함유 성분의 분리를 수행하였으며, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부로부터 2종의 화합물(1, 2)을 분리 정제하였다. 화합물 1, 2의 구조는 문헌에 기재되어 있는 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR의 data와 비교하여, 각각 esculetin,<sup>19)</sup> fraxetin,<sup>20)</sup>으로 동정하였다(Fig. 1).

산화적 손상은 허혈성 재관류 손상, 퇴행성 뇌질환 등을 포함하는 여러 질병과 노화와 깊은 연관이 있다. t-BHP는

**Table I.** Cytoprotective effects of the MeOH extract of *F. rhynchophylla* and its fractions against t-BHP-induced cytotoxicity in HT22 cells

| Sample <sup>a)</sup>                | Protection ratio (%) |
|-------------------------------------|----------------------|
| MeOH extract                        | 61.0±0.3*            |
| n-Hexane Fr.                        | -                    |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Fr. | 58.7±0.4*            |
| n-BuOH Fr.                          | 45.3±0.2             |
| Aqueous Fr.                         | 7.6±3.3              |
| Trolox <sup>b)</sup>                | 52.3±2.2             |

<sup>a)</sup>Tested at the concentration of 100 µg/ml,

<sup>b)</sup>Positive control, tested at the concentration of 100 µM,

\**P*<0.05.

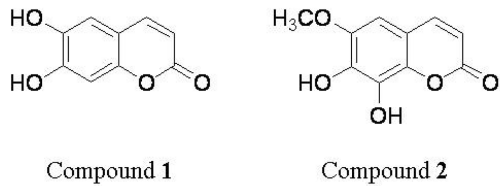


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1 and 2.

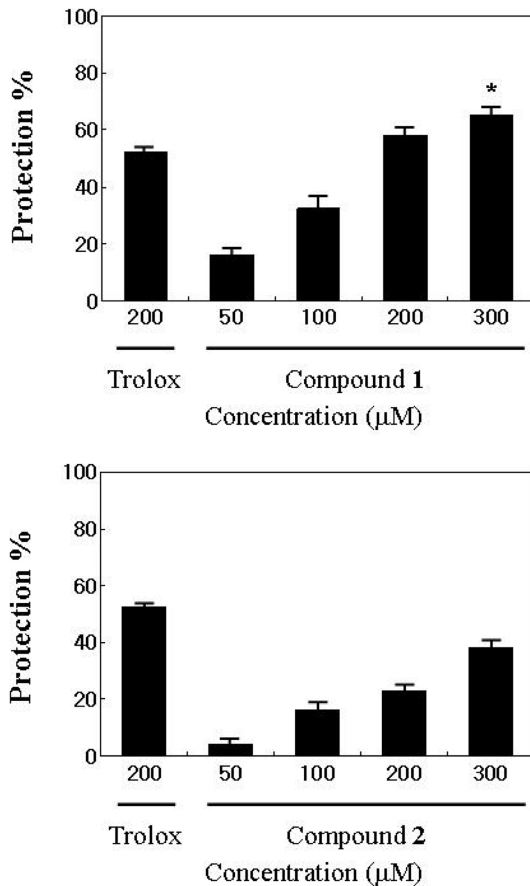


Fig. 2. The cytoprotective effects of compounds 1 and 2 on *t*-BHP-induced cytotoxicity in HT22 cells. Cytoprotective effect was assessed after 24-h incubation period with 60 μM of *t*-BHP in DMEM medium. Each value represents the mean ± S.D. of three experiments. Significantly different from the control; \**p*<0.05. Trolox was used as a positive control.

세포를 투과하고 cytochrome P450와 헤모글로빈을 통해서 활성 산소 중으로 대사되고 순차적으로, 지질 과산화를 유발하고 세포와 세포 분자들 간의 공유결합에 영향을 주어, 결국에 세포의 손상을 유발한다.<sup>7,21)</sup> 또한 DPPH는 프리라디칼로 알려져 있고, DPPH 라디칼 소거 활성은 지질 과산화의 억제와 깊은 관련이 있다.<sup>22,23)</sup>

진피에서 분리한 화합물들의 뇌 보호 효과를 측정하기 위하여, 생쥐의 해마 유래 HT22 세포의 *t*-BHP 세포독성으로부터 보호 효과를 검색하였다. 분리된 2종의 화합물(1, 2)은 200 μM의 농도에서 유의한 뇌 세포보호 활성을 보였으며,

각각 58.1±1.1, 23.1±0.9%의 보호율을 나타냈다(Fig. 2). 이들 2종의 화합물은 본 실험에서 사용한 200 μM의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다. 한편, 뇌 세포 보호 효과물질로 알려진 trolox를 양성 대조약물로 사용하였으며, trolox는 200 μM의 농도에서 52.4±0.2%의 세포 보호율을 나타냈다. 또한, 각 화합물의 DPPH 프리라디칼 소거 활성을 검색해 본 결과, 화합물 1, 2는 유의한 DPPH 프리라디칼 소거 활성을 나타내었으며, 각각 14.68, 9.64 μM의 IC<sub>50</sub>치를 나타내었다. 한편, DPPH 프리라디칼 소거 효과물질로 알려진 L-Ascorbic acid를 양성 대조약물로 사용하였으며, L-Ascorbic acid는 50.31 μM의 IC<sub>50</sub>치를 나타내었다. 따라서 화합물 1, 2는 생쥐 해마 유래 HT22 세포에서 *t*-BHP에 의해 발생하는 활성 산소종을 소거하고, 또한 활성 산소종이 일으키는 지질 과산화를 억제함으로써 세포의 손상을 억제하고, 세포를 보호하는 것으로 생각 되며, 이 두 화합물의 뇌 세포 보호기전에 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 생각한다.

## 결 론

천연물로부터 뇌 세포 보호활성 물질의 탐색을 목적으로 물푸레나무 수피(진피; 秦皮)의 MeOH 추출물을 각종 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 2종의 쿠마린계 화합물을 분리하였으며, 각각의 구조를 esculetin (1), fraxetin (2)으로 동정하였다. 이 두 화합물은 *t*-BHP로 유발한 HT22 세포주에 대하여 유의한 보호활성을 나타내었으며, 또한 유의한 DPPH 프리라디칼 소거 활성도 나타내었다.

## 사 사

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(B03-0009-AM0804-07A5-00030B)과 한국과학재단의 지원(M2-0415-01-0001)에 의하여 이루어진 것임.

## 인용문헌

1. Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese drugs of plant origin, Springer-Verlag, Berlin, pp. 521-523.
2. Kim, N. Y., Pae, H. O., Ko, Y. S., Yoo, J. C., Choi, B. M., Jun, C. D., Chung, H. T., Inagaki, M., Higuchi, R. and Kim, Y.C. (1999) In vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituents from *Faxinus rhynchophylla*. *Planta Med.* **65**: 656-658.
3. Kim, I. H., Kim, C. J. and Yook, C. S. (1993) The chemical constituents and their pharmacological activities of endemic medicinal plants in Korea. Pharmacologically active constituents of *Faxinus* species. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 197-

- 202.
4. Kim, H. C., An, R. B., Jeong, G. S., Oh, S. H. and Kim, Y.C. (2005) 1,1-Diphenyl-picrylhydrazyl radical scavenging compounds of Fraxini Cortex. *Nat. Prod. Sci.* **11**: 150-154.
  5. Yook, C. S. and Moon, C. K. (1981) Coumarin glycosides from the root bark of *Fraxinus sieboldiana* Blume (II). *Kor. J. Pharmacogn.* **12**: 143-145.
  6. Yook, C. S., Kim, D. S. and Kim, S. M. (1984) Coumarin glycosides of *Fraxinus japonica* Blume forma *intermedia* Hara. *Yakhak Hoeji.* **28**: 283-286.
  7. Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. and Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell.* **77**: 817-827.
  8. Coly, J. T. and Puttafärchen, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, **262**: 689-695.
  9. Makesbery, W. R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**: 134-147.
  10. Simonian, N. A. and Coly, J. T. (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **36**: 83-106.
  11. Gebhardt, R. (1997) Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artchoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144**: 279-286.
  12. Hogberg, J., Orrenius, S. and O'brien, P. (1975) Further studies on lipid peroxide formation in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **59**: 449-455.
  13. Davies, M. J. (1989) Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochem. J.* **257**: 603-606.
  14. Thornally, P., Trotta, R. J. and Stern, A. (1983) Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by *tert*-butyl hydroperoxide in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* **759**: 16-22.
  15. Davis, J. B. and Maher, P. (1994) Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* **652**: 169-173.
  16. Kang, T. H., Baek, H. Y. and Kim, Y. C. (2005) Protective effect of Jakyak-Gamcho-Tang extract and its constituents against *t*-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells. *Am. J. Chin. Med.* **33**: 181-189.
  17. Okada, Y. and Okada, M. (1998) Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 401-406.
  18. An, R. B., Oh, S. H., Jeong, G. S. and Kim, Y. C. (2006) Gomisins J with protective effect against *t*-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells from *Schizandra chinensis*. *Nat. Prod. Sci.* **12**: 134-137.
  19. Razdan, T. K., Qadri, B., Harkar, S. and Waight, E. S. (1987) Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, **26**: 2063-2069.
  20. Tsukamoto, H., Hisada, S. and Nishibe, S. (1985) Coumarins from bark of *Fraxinus japonica* and *F. mandshurica* var *japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 4069-4073.
  21. Rush, G. F., Gorski, J. R., Ripple, M. G., Sowinski, J., Bugelski, P. and Hewitt, W. R. (1985) Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **78**: 473-483.
  22. Matsubara, N., Fuchimoto, S., Iwagaki, H., Nonaka, K., Kimura, T., Kashino, H., Edamatsu, R., Hiramatsu, M. and Orita, K. (1991) The possible involvement of free radical scavenging properties in the actions of cytokines. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **71**: 239-242.
  23. Rekka, E. and Kourounakis, P. N., (1991) Effect of hydroxyethyl rutenosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 486-491.

(2007년 8월 9일 접수)