

암세포 성장 저해 및 항염증 효능을 나타내는 산여뀌 성분의 분리

김동화¹ · 이상국¹ · 박희준^{2*}

¹서울대학교 약학대학, ²상지대학교 제약공학과

Isolation of the Constituents with Cancer Cell Growth Inhibition and Anti-inflammatory Activity from *Persicaria nepalensis*

Donghwa Kim¹, Sang Kook Lee¹ and Hee-Juhn Park^{2*}

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Abstract – This study was initially explored to procure biomaterials capable of inhibiting cancer cell growth from nine *Persicaria* species (Polygonaceae). The extract of *P. nepalensis* that was selected from the initial screenings was further fractionated to identify bioactive compounds. The ethyl acetate (EtOAc) fraction was shown to be the most active in the inhibition of cell growth against six cancer cell lines (IC₅₀ value of 3.77–12.87 µg/ml). Phytochemical study led to the isolation of two galactolipids of 1,2-di-*O*-linolenoyl-3-*O*-β-D-galactospyranosyl-*sn*-glycerol (**1**) and 1-*O*-linolenoyl-3-*O*-β-D-galactospyranosyl-*sn*-glycerol (**2**) from the hexane fraction and three phenylpropanoyl sucroses of lapathoside A (**3**), vanicoside B (**4**) and lapathoside C (**5**) from the EtOAc fraction. These isolated compounds have not been reported from this plant. Compounds **3** and **4** exhibited the effective growth inhibition against a panel of cancer cell lines (IC₅₀ value of 6.90–18.09 µM). In addition, the anti-inflammatory activity was evaluated to determine lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) formation in RAW264.7 mouse macrophage cells. The EtOAc fraction (IC₅₀; 34.14 µg/ml) and its constituents, **3** (8.55 µM) and **4** (7.83 µM) were shown to be effective in the inhibition of LPS-induced NO production. Therefore, compounds **3** and **4** were considered to be active constituents for anti-inflammatory and antitumor activity from *P. nepalensis*.

Keywords – *Persicaria nepalensis*, Polygonaceae, Galactolipids, Phenylpropanoyl sucroses, Cancer cell growth, Inflammation

한국에 자생하는 여뀌과(Polygonaceae) 여뀌속(*Persicaria* species) 식물은 10여종 이상 서식하고 있다.¹⁾ 여뀌속 식물의 대표적인 종은 여뀌(*Persicaria hydropiper*)로서 그 성분 연구는 비교적 많이 이루어진 바 있다. 여뀌로부터 vanicoside A-D와²⁻⁴⁾ lapathoside A-F^{5,6)} 등 phenylpropanoyl sucrose 성분이 다수 보고되어 있다. Sucrose 구조의 수산기에 주로 *p*-coumaric acid 혹은 ferulic acid가 에스테르결합하여 생성된 화합물이 phenylpropanoyl sucrose 화합물이다.

Panda 등은⁶⁾ 이 계열의 성분에 속하는 lapathoside와 vanicoside 성분들 중 일부가 항종양활성을 나타낸 결과를 발표함에 따라 본 연구자는 강원도에서 수집된 대표적인 여뀌속 식물 추출물에 대하여 암세포에 대한 세포독성을 검색하고자 하였다. 저자들은 강원도 일대에서 서식하는

*Persicaria*속 식물로서 가시여뀌(*P. dissitiflora*), 개여뀌(*P. longiseta*), 고마리(*P. thunbergii*), 머느리밀짚개(*P. senticosa*), 미꾸리뉘시(*P. sieboldii*), 산여뀌(*P. nepalensis*), 이삭여뀌(*P. filiforme*), 장대여뀌(*P. yokusina* var. *laxiflora*) 및 여뀌(*P. hydropiper*) 9종 식물을 채집하여 그 추출물에 대한 약리활성을 평가하고자 하였다.

그 중 산여뀌가 상대적으로 높은 암세포 독성 효과를 보임에 따라 그 MeOH 추출물의 분획물에 대해서도 효능평가를 실시하였다. 이 식물의 활성물질을 확인하기 위하여 식물화학적 실험을 통하여 5종 화합물을 분리하고 그 활성을 검증하였다. 또한, 산여뀌의 추출물과 그 분획물, 그리고 분리된 성분에 대하여 LPS로 유도한 macrophage Raw 264.7 세포를 이용하여 nitric oxide (NO) 생산에 대한 저해능을 평가하여 항염증활성도 알아보고자 하였다.

본 연구를 통하여 산여뀌에서 얻은 EtOAc 분획물은 수종의 암세포에 대한 높은 성장저해작용을 나타내었

*교신저자(E-mail): hjpark@sangji.ac.kr
(Tel): +82-33-730-0564

으며, 그 활성분획으로부터 phenylpropanoyl sucrose 성분이 암세포 성장을 효과적으로 억제하며, 동시에 항염증 활성도 나타남을 확인하였다. 그리고 산여귀로부터 분리된 성분은 보고된 바 없다.

재료 및 방법

기기 및 시약 - 물질분리를 위해 사용된 사용된 컬럼은 Yamazen사의 prepacked column(30 μ m, Japan) 이었으며, TLC plate는 Merck사(Darmstadt, Germany)의 제품을 사용하였다. UV spectrum은 UV160A UV-vis recording spectrometer(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였으며, IR spectrum은 JASCO 4200 FT-NMR spectrometer를 이용하여 KBr 디스크법으로 측정하였다. ^1H -, ^{13}C -nuclear magnetic resonance(NMR) 스펙트럼과 2D-NMR spectrum은 Bruker AM-600 spectrometer(Bruker, Rheinstetten, Germany)의 제품으로 TMS(tetramethylsilane)를 내부표준물질로 사용하여 측정하였다. 그리고 HR-ESI-MS spectrum은 Synapt G-2(Waters, Miliford, MA) 제품을 사용하여 Q-TOF(quadrupole time-of-flight) 방식으로 측정하였다.

식물재료 - *Persicaria*속 식물은 강원도 원주시, 영월군, 그리고 평창군 일대에서 채집한 후 건조하여 추출을 위한 재료로 사용하였다(Table I). 특히 식물화학적 분리를 수행한 식물인 산여귀는 강원도 원주에서 7월경 전초를 채집하여 세척한 후 건조한 다음 세절하여 실험에 사용하였다. 9종의 식물은 상지대학교 산림과학과 송병민 교수에 의해 동정되었다. 표본(표본번호 natchem-137)은 현재 상지대학교 제약공학과 천연물화학 실험실에 보관 중이다.

추출 및 분획 - 산여귀 식물재료 800 g을 10 L의 MeOH로 환류 하에 추출하였다. 이와 같은 방법으로 3번 반복 추출하고 여과하였다. 여과한 액을 진공농축기에서 감압 하에 농축한 다음 동결건조기로 건조하여 산여귀 MeOH 추출물 77 g을 수득하였다.

이를 분획하기 위하여 H_2O 1.0 L에 현탁시킨 후 분획할 때기를 이용하여 hexane 용매로 분배하였다. Hexane 층을 농축하고 건조하여 hexane 분획물 13.6 g을 얻었다. 수층에 대하여 에테르 0.8 L로 분획하는 과정을 3회 반복하고 에테르 가용부를 건조하여 6.3 g을 얻었다. 남은 수층에 대하여 0.8 L의 EtOAc 용매로 각각 3회 분획하고 건조하여 얻은 EtOAc 분획물은 2.63 g이었다. 계속하여 수층을 BuOH 0.8 L로 분획하는 과정을 3회 반복한 후 건조하여 BuOH 분획 11.0 g을 수득하였다. 본 실험 중 얻은 ether 분획물은 hexane 분획물의 성분과 유사한 경향을 보여 이 분획을 제외한 3종의 분획을 활성실험을 위해 사용하였다.

Galactolipid(화합물 1, 2)의 분리 - Hexane 분획물 3.0 g을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하고자 MPLC

column(30 μ m, silica gel column, ϕ 3.0 cm \times 30 cm, Yamazen Co., Japan)을 사용하였고, 전개용매로서 CHCl_3 -MeOH- H_2O (8:2:1, 하층)을 사용하였다. 송액펌프를 사용하여 전개용매를 전개하였으며 분획수집기를 이용하여 30 mL씩 수집하였다. 수집한 분획들을 TLC로 체크하면서 분획 # 6 - 10과 # 31 - 44을 수집하여 각각 농축한 다음 이들을 Sephadex LH-20 column chromatography로 정제하였다. 이들을 # 6 - 10으로부터 화합물 1(43 mg)을, 그리고 # 31 - 44로부터 화합물 2를(32 mg) 얻었다.

화합물 1 - Glassy resin, IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3379 (OH), 2960, 2924 (CH), 1707 (C=O), 1628, 1605 (C=C), 1514, 1455 (CH_2), 1361 (CH_3), 1265, 1163 (C-O), 833; ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : glycerol - 4.20 (1H, dd, $J=3.0, 12.0$ Hz, H_a -1), 4.24 (1H, dd, 6.6, 12.0 Hz, H_b -1), 5.34 (1H, brs, H-2), 3.76 (1H, dd, 5.4, 10.8 Hz, H_a -3), 3.94 (1H, dd, $J=5.4, 10.8$ Hz, H_b -3); linolenoyl - 2.35 (4H, q, $J=2.35$ Hz, H-2', 2''), 1.63 (4H, m, H-3', 3''), 1.31 (12H, brs, H-4', 4'', 5', 5'', 6', 6''), 1.37 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-7), 2.08 (4H, m, H-8', 8''), 5.36 - 5.43 (10H, H-9', 9'' 10', 10'', 12', 12'', 13', 13'', 15', 15''), 5.34 (2H, m, H-16', 16'') 2.83 (8H, t-like, H-11', 11''), 2.11 (4H, m, H-17', 17''), 1.00 (6H, t, $J=7.8$ Hz, H-18', 18''); D-gal - 4.30 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1''), 3.63 (1H, t-like, H-2), 3.62 (1H, dd-like, H-3), 4.04 (1H, brs, H-4), 3.58 (1H, t-like, H-5), 3.89 (1H, dd-like, H_a -6), 3.99 (1H, dd-like, H_b -6); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : glycerol - 62.8 (C-1), 70.2 (C-2), 68.4 (C-3); linolenoyl - 173.5 (C-1', 1''), 34.1 (C-2', 2''), 29.0, 29.1, 29.2 (C-4', 4'', 5', 5'', 6', 6'', 7', 7''), 27.2 (C-8), 127.7 (C-9', 9''), 128.3 (C-10', 10''), 25.6 (C-11', 11''), 131.4 (C-12', 12''), 130.2 (C-13', 13''), 25.4 (C-14', 14''), 128.2 (C-15', 15''), 127.1 (C-16', 16''), 20.5 (C-17', 17''), 14.3 (C-18', 18''); D-galactose - 103.1 (C-1'''), 71.7 (C-2'''), 73.5 (C-3'''), 69.7 (C-4'''), 74.6 (C-4'''), 62.7 (C-6'''); HR-ESI-MS m/z : 773.5311, calc. for $[\text{C}_{45}\text{H}_{75}\text{O}_{10}]^-$.

화합물 2 - Glassy resin, IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3374 (OH), 2967, 2931 (CH), 1712 (C=O), 1628, 1607 (C=C), 1514, 1464 (CH_2), 1365 (CH_3), 1268, 1163 (C-O); ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : glycerol - 4.04 (1H, m, H_a -1), 4.10 (1H, m, H-1), 5.33 (1H, brs, H-2), 3.86 (1H, m, H_a -3), 3.90 (1H, m, H_b -3); linolenoyl - 2.35 (2H, q, $J=8.4$, H-2'), 1.63 (2H, m, H-3'), 1.31 (6H, brs, H-4', 5', 6'), 1.37 (2H, d, $J=7.8$ Hz, H-7), 2.08 (2H, m, H-8), 5.36 - 5.43 (5H, H-9', 10', 12', 13', 15'), 5.34 (1H, m, H-16') 2.83 (4H, t-like, H-11', 14'), 2.11 (2H, m, H-17'), 1.00 (3H, t, $J=7.8$ Hz, H-18''); D-galactose - 4.31 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'''), 3.62 (1H, t-like, H-2'''), 3.60 (1H, dd-like, H-

3"), 4.02 (1H, brs, H-4"), 3.57 (1H, t-like, H-5"), 3.88 (1H, dd-like, H_a-6"), 3.98 (1H, dd-like, H_b-6"); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: Glycerol – 62.8 (C-1), 69.6 (C-2), 69.7 (C-3); linolenoyl – 173.4 (C-1'), 34.1 (C-2'), 24.9 (C-3'), 29.0, 29.1, 29.2 (C-4', 5', 6', 7'), 27.2 (C-8'), 127.9 (C-9'), 128.2 (C-10'), 25.6 (C-11'), 131.9 (C-12'), 130.2 (C-13'), 25.2 (C-14'), 128.3 (C-15'), 127.8 (C-16'), 20.5 (C-17'), 14.3 (C-18'); D-galactose - 101.1 (C-1"), 71.9 (C-2"), 73.3 (C-3"), 69.6 (C-4"), 74.6 (C-4"), 62.6 (C-6"); HR-ESI-MS *m/z*: 513.3114, calc. for [C₂₇H₄₅O₉].

Phenylpropanoyl Sucrose(화합물 3, 4, 5) 성분의 분리 – EtOAc 분획물(3.0 g)로부터 silica gel column(Yamazene 3.0 × 40 cm, 30 μm)에서 이동상 CHCl₃-MeOH-H₂O(8:3:1, 하층)으로 분리하였다. 30 mL씩 수집하면서 # 17 – 20 및 # 22 – 24 수집액을 농축하여 MeOH에서 각각 재결정하여 화합물 3(31 mg)과 4(39 mg)를 얻었다. 그리고 # 29 – 33 수집액을 모아 농축시키고 MeOH에서 재결정하여 화합물 5(54 mg)를 얻었다.

Compound 3 (lapathoside A) – White powder, [α]_D(23) + 22.7° (*c* 0.26, MeOH), UV λ_{max} (MeOH) nm (log ε): 271 (4.47), 345 (4.51); IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3188 (broad, OH), 2957, 2925 (aliphatic C-H), 1652 (α,β-unsaturated ester), 1630, 1514 (aromatic C=C), 1449 (CH₂), 1264, 1161 (C-O), 1059 (glycoside C-O), 834; HR-ESI-MS *m/z*: 985.2704, calc. for [C₅₀H₄₉O₂₁]: ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: D-glucose – 3.30 (1H, m, H-4), 3.30 (1H, m, H-5), 3.47 (1H, dd, *J*=9.6, 4.0, H-2), 3.65 (1H, dd, *J*=9.6, 9.0, H-3), 4.20 (1H, m, H_b-6), 4.72 (1H, m, H_a-6), 5.57 (1H, d, *J*=4.0 Hz, H-1); D-fructose – 4.20 (1H, m, H-5'), 4.33 (2H, m, H-1'), 4.56 (1H, m, H_a-6'), 4.58 (1H, m, H_b-6'), 4.74 (1H, m, H-4'), 5.65 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-3'); 6-*O*-feruloyl – 3.84 (3H, s, OCH₃), 6.48 (1H, d, *J*=16.0, H-8"), 6.76 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.01 (1H, dd, *J*=8.4 Hz, 2.0 Hz, H-6"), 7.20 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2"), 7.72 (1H, d, *J*=16.0, H-7"); 1'-*O*-feruloyl – 3.83 (3H, s, OCH₃), 6.39 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8"), 6.75 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5"), 7.04 (1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6"), 7.15 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2"), 7.65 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-7"); 3'-*O*-*p*-coumaroyl – 6.44 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8"), 6.78 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3", 5"), 7.47 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2", 6"), 7.70 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-7"); 6'-*O*-*p*-coumaroyl – 6.26 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8"), 6.76 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-3", 5"), 7.33 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2", 6"), 7.58 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-7"); ¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ: D-glucose – 65.8 (C-6'), 72.2 (C-4), 72.4 (C-5), 72.9 (C-2), 74.9 (C-3), 92.9 (C-1); D-fructose - 65.5 (C-6'), 66.2 (C-

1'), 74.0 (C-4'), 79.1 (C-3'), 81.0 (C-5'), 103.4 (C-2'); 6-*O*-feruloyl – 56.4 (OCH₃), 111.5 (C-2"), 115.3 (C-8"), 116.4 (C-5"), 124.5 (C-6"), 127.7 (C-1"), 147.2 (C-7"), 148.3 (C-3"), 150.6 (C-4"), 169.3 (C-9"); 1'-*O*-feruloyl – 56.4 (OCH₃), 111.6 (C-2"), 115.0 (C-8"), 116.3 (C-5"), 124.4 (C-6"), 127.6 (C-1"), 147.4 (C-7"), 149.3 (C-3"), 150.7 (C-4"), 168.5 (C-9"); 3'-*O*-*p*-coumaroyl – 114.3 (C-8"), 116.8 (C-3", 5"), 127.1 (C-1"), 131.5 (C-2", 6"), 147.9 (C-7"), 161.5 (C-4"), 168.5 (C-9"); 6'-*O*-*p*-coumaroyl – 114.8 (C-8"), 116.8 (C-3", 5"), 127.1 (C-1"), 131.6 (C-2", 6"), 146.8 (C-7"), 161.3 (C-4"), 168.9 (C-9").

Compound 4 (vanicoside B) – White powder, [α]_D(23) + 15.6 (*c* 0.70, MeOH), UV λ_{max} (MeOH) nm (log ε) : 270 (4.45), 344 (4.49); IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3361 (broad, OH), 2932 (aliphatic C-H), 1654 (α,β-unsaturated ester), 1610, 1491 (aromatic C=C), 1447 (CH₂), 1262, 1162 (C-O), 1094 (glycoside C-O), 838; HR-ESI-MS *m/z* : 955.2702, calc. for [C₄₉H₄₇O₂₀]: ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: D-glucose - 3.34 (1H, m, H-4), 3.50 (1H, dd, *J* = 10.2, 4.2 Hz, H-2), 4.35 (1H, m, H-5), 4.59 (2H, m, H-6), 4.75 (1H, m, H-3), 5.20 (1H, d, 3.8 Hz, H-1); D-fructose – 3.67 (1H, t, *J*=9.0 Hz, H-4'), 4.24 (1H, m, H_a-6'), 4.59 (2H, m, H-1'), 4.74 (1H, m, H_b-6'), 5.62 (1H, d, 8.4 Hz, H-3'), 5.67 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'); 6-*O*-feruloyl - 3.87 (3H, s, OCH₃), 6.49 (1H, d, *J*=16.2 Hz, H-8"), 7.22 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2"), 7.74 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-7"); 1'-*O*-*p*-coumaroyl - 6.46 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8), 6.82 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-3), 7.50 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-2), 7.68 (1H, d, *J*=16.2 Hz, H-7); 3'-*O*-*p*-coumaroyl - 6.36 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8"), 6.79 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-3"), 7.44 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-2"), 7.64 (1H, d, *J*=16.2 Hz, H-7"); 6'-*O*-*p*-coumaroyl - 6.29 (1H, d, *J*=16.2 Hz, H-8"), 6.78 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-3"), 7.36 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-2"), 7.60 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-7"); ¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ: D-glucose – 66.3 (C-6), 72.8 (C-4), 72.9 (C-5), 73.5 (C-2), 74.6 (C-3), 93.5 (C-1); D-fructose - 65.4 (C-1'), 66.9 (C-6'), 75.7 (C-4'), 79.7 (C-3'), 81.5 (C-5'), 103.9 (C-2'); 1'-*O*-feruloyl – 57.1 (3"-OCH₃), 112.2 (C-2"), 115.3 (C-8"), 116.8 (C-5"), 125.0 (C-6"), 128.3 (C-1"), 147.3 (C-7"), 149.8 (C-3"), 151.1 (C-4"), 169.8 (C-9"); 1'-*O*-*p*-coumaroyl – 115.3 (C-8), 117.3 (C-3, 5), 127.7 (C-1), 132.0 (C-2, 6), 147.7 (C-7), 161.9 (C-4), 169.4 (C-9); 3'-*O*-*p*-coumaroyl – 114.9 (C-8"), 117.3 (C-3", 5"), 127.7 (C-1"), 132.0 (C-2", 6"), 148.4 (C-7"), 161.7 (C-4"), 169.4 (C-9"); 6'-*O*-*p*-coumaroyl – 115.3 (C-8"), 117.3 (C-3", 5"), 127.7 (C-1"), 131.8 (C-2", 6"), 149.8 (C-7"), 169.0 (C-

9'''), 161.9 (C-4''').

Compound 5 (lapathoside C) – White powder, mp 125 - 127°C, UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ) : 230 (4.23), 320 (4.56); ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3189 (broad, OH), 3023 (aromatic C-H), 2925 (aliphatic C-H), 1698 (α,β -unsaturated ester), 1630, 1604, 1514 (aromatic C=C), 1449 (CH_2), 1361 (CH_3), 1264 (C-O), 1059 (glycoside C-O), 835, 755; HR-ESI-MS m/z : 809.2409, calc. for $[\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{O}_{18}]$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : D-glucose - 3.32 (1H, m, H-4), 3.35 (1H, m, H-5), 3.48 (1H, m, H-2), 3.65 (1H, m, H-3), 4.29 (1H, m, H_a-6), 4.71 (1H, m, H_b-6), 5.50 (1H, m, H-1); D-fructose - 3.60 (2H, m, H_b-1', H-1'a), 4.18 (1H, m, H-5'), 4.55 (2H, m, H-6'a, 6'b), 4.65 (1H, m, H-4'), 5.54 (1H, m, H-3'); 6-O-*p*-feruloyl - 3.84 (3H, s, OCH_3), 6.48 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8''), 6.75 - 6.82 (1H, m, H-5''), 7.02 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6''), 7.21 (1H, brs, H-2''), 7.62 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7''); 3'-O-*p*-coumaroyl - 6.43 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8'''), 6.75 - 6.82 (2H, m, H-3''', 5'''), 7.52 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2''', 6'''), 7.73 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7'''); 6'-O-*p*-coumaroyl - 6.24 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8'''), 6.75 - 6.82 (2H, m, H-3''', 5'''), 7.34 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2''', 6'''), 7.62 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7'''); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD) δ : D-glucose - 65.8 (C-6), 72.1 (C-4), 72.3 (C-5), 73.1 (C-2), 74.8 (C-3), 92.5 (C-1); D-fructose - 65.4 (C-1'), 65.8 (C-6'), 75.0 (C-4'), 79.0 (C-3'), 81.1 (C-5'), 104.8 (C-2'); 6-O-*p*-feruloyl - 56.4 (OCH_3), 111.5 (C-2''), 115.3 (C-8''), 116.3 (C-5''), 124.5 (C-6''), 127.7 (C-1''), 147.2 (C-7''), 149.3 (C-3''), 150.6 (C-4''), 169.3 (C-9''); 3'-O-*p*-coumaroyl - 114.6 (C-8'''), 116.8 (C-3''', C-5'''), 127.1 (C-1'''), 131.5 (C-2''', 6'''), 147.6 (C-7'''), 161.4 (C-4'''), 168.4

(C-9'''); 6'-O-*p*-coumaroyl - 114.8 (C-8'''), 116.8 (C-3''', 5'''), 127.1 (C-1'''), 131.2 (C-2''', 6'''), 146.8 (C-7'''), 161.4 (C-4'''), 168.4 (C-9''').

세포배양 – 인체 암세포인 폐암 세포(A549), 대장암 세포(HCT116), 유방암 세포(MDA-MB-231), 위암 세포(SNU-638), 간암 세포(SK-HEP-1), 전립선암 세포(PC3) 등의 암세포와 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 American Type Culture Collection(ATCC, VA, USA)로부터 제공받았다. 세포주들은 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotics-antimycotics(PSF; 100 units/mL penicillin G sodium, 100 ng/mL streptomycin, and 250 ng/mL amphotericin B)를 추가한 배지를 사용하여 배양하였다. 여기서 SK-HEP-1, MDA-MB-231, RAW 264.7 세포주는 DMEM 배지로 배양하였고, 나머지 4종 세포주는 A549, HCT116, SNU-638, PC3에 대해서는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 각 세포들 5% CO_2 를 함유한 습윤 공기 중에서 37°C 온도로 유지하였다.

세포증식 실험 – 세포의 증식에 대한 시료의 억제효과는 5종의 세포주에 대해서 모두 sulforhodamine B(SRB) assay로 수행하였다.⁷⁾ 시료의 여러 농도를 넣은 96-well plate에 세포를 접종하고 5% CO_2 를 함유한 습윤 공기 중에서 37°C에서 72시간 배양한 후 10% trichloroacetic acid로 고정하였다. 고정된 세포 단백질은 1% acetic acid 용액을 포함하는 0.4% SRB로 염색한 후 10 mM Tris buffer(pH 10.0)에 녹였다. 흡광도는 515 nm 파장으로 측정하였다. 세포증식 백분율(%)은 $\text{cell proliferation}(\%) = 100 \times [(A_{\text{treated}} - A_{\text{zero day}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{zero day}})]$ 의 계산식을 이용해서 얻었다. 여기서, A는 평균 흡광도를 말한다. IC_{50} 값은 TableCurve 2D v5.01 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 비직선 회귀분석을 통하여 계산하였다.

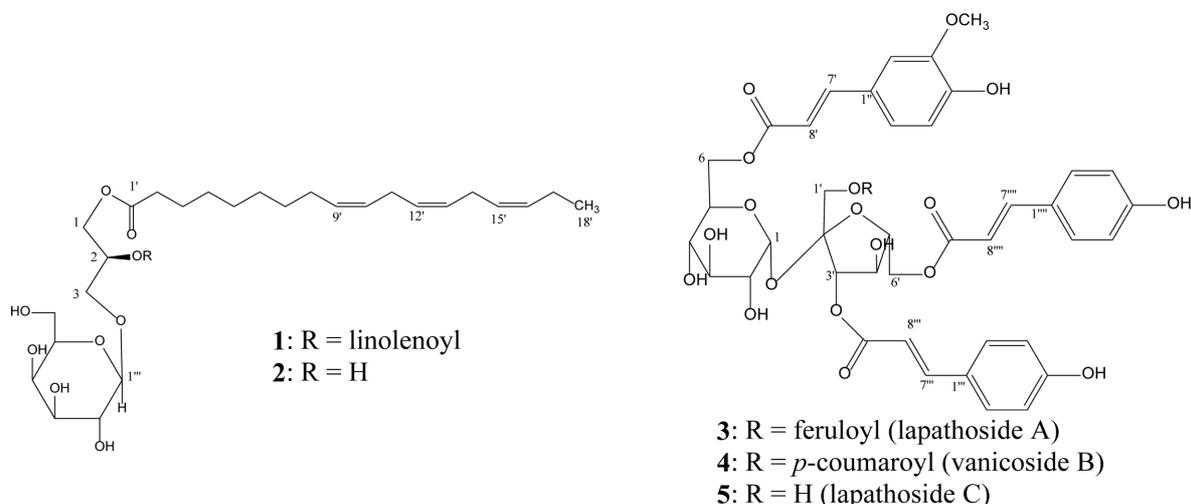


Fig. 1. Structure of compounds 1 – 5 isolated from *P. nepalensis*.

iNOS Assay – 마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 cell을 10% FBS-DMEM에서 배양하고 24-well plates(2×10^5 cells/mL)에 접종하였다. 다음 날 1% FBS-DMEM으로 교체하고 시료를 처리하였다. 1시간 후 NO 생성을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide(LPS)-control을 제외하고 1 μ g/mL LPS를 첨가하였다. 세포를 18시간동안 배양한 후 Griess 반응을 이용하여 배지의 NO 생성의 양을 측정하였다. 간략히 요약하여, 180 μ L의 Griess reagent(0.1% *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in H₂O and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 100 μ L 배지에 첨가하였다. 흡광도는 540 nm 파장으로 측정하였다. iNOS 억제율은 $100 \times [(A_{\text{treated}} - A_{\text{LPS}}) / (A_{\text{LPS}^+} - A_{\text{LPS}})]$ 의 계산식을 이용해서 얻었다. 여기서, A는 평균 흡광도를 말한다. IC₅₀ 값은 TableCurve 2D v5.01 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 비직선 회귀분석을 통하여 계산하였다.⁸⁾

Cell Viability Assay – 항염증 효과 평가시 사용한 상기 24-well plate에 최종농도를 500 μ g/mL으로 한 MTT 용액 각 well에 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 dimethylsulfoxide (DMSO)를 가하였다. 세포생존율은 570 nm에서 흡광도를 측정하여 컨트롤 그룹(LPS+)과 비교하여 결정하였다.

결과 및 고찰

저자들은 식물화학적으로 그 성분이 충분히 이루어져 있지 않은 마디풀과의 *Persicaria*속에 속하는 식물을 소재로 하여 항암활성을 검색하기 위해 9종의 *Persicaria*속 식물을 채집하여 그 MeOH 추출물들을 제조하였다. 이들 추출물들을 대상으로 하여 5종 암세포종에 대해 암세포 성장억제 효능 평가를 하여 Table I과 같은 결과를 얻었다. 그 결과 산여뀌(*P. nepalensis*) 추출물이 3종의 암세포에 대하여, 여뀌(*P. hydropiper*) 추출물이 4종의 암세포에 대하여 100 μ g/ml 농도 이하에서 성장저해효과를 나타냄을 확인하였다.

이 중 산여뀌가 여뀌보다 더 희귀한 자원이기 때문에 본 연구에서는 산여뀌 추출물을 선택하여 용매 극성 정도에 따른 분획물을 제조하고, 각 분획물에 대한 암세포성장 저해 효능을 평가하였다(Table II). 분획을 위한 효능 실험에는 A549, SNU638, HCT116, MDA-MB-231, SK-Hep-1, PC3의 6종 암세포주를 사용하였다. 이 실험에서 40 μ g/mL 이하 농도에서 산여뀌 MeOH 추출물은 효과를 나타내지 않았으나 EtOAc 분획물은 9.01 – 38.88 μ g/mL에서 6종의 암세포종에 대하여 크게 성장 억제 효과를 나타내었기에 이 분획물이 암세포 성장 억제 효능의 주요 분획일 가능성이

Table I. Inhibition activity (IC₅₀) of the MeOH extracts of ten *Persicaria* species on cancer cell growth *in vitro*

Extract	MDA-MB-231 ¹⁾	SK-MB-231	A549	HCT116	SNU638
<i>P. dissitiflora</i>	>100 ²⁾	>100	>100	>100	>100
<i>P. longiseta</i>	57.93	>100	>100	>100	32.02
<i>P. thunbergii</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. senticosa</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. sieboldii</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. nepalensis</i>	55.52	>100	>100	>87.3	>65.59
<i>P. filiforme</i>	93.86	>100	>100	>100	>100
<i>P. yokusaiana</i> for. <i>laxiflora</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. hydropiper</i>	85	>100	46.27	94.57	95.81
Etoposide (μ M) ³⁾	5.48	0.33	0.24	0.41	0.60

¹⁾Cancer cell line: A549 (lung), HCT116 (colon), MDA-MB-231 (breast), SNU638 (stomach), SK-Hep-1 (liver). ²⁾Unit: μ g/mL.

³⁾Positive control

Table II. Inhibition activity of the fractions of *P. nepalensis* on cancer cell growth *in vitro*

IC ₅₀ (μ g/ml)	A549 ¹⁾	SNU638	HCT116	MDA-MB-231	SK-Hep-1	PC3
Hexane fr.	> 40 ²⁾	31.32	39.63	> 40	28.36	> 40
EtOAc fr.	38.88	10.47	9.01	17.15	3.77	12.87
BuOH fr.	> 40	35.64	24.02	> 40	> 40	> 40
Etoposide (μ M) ³⁾	0.47	0.18	0.52	4.05	0.84	>20

¹⁾Cancer cell line: A549 (lung), HCT116 (colon), MDA-MB-231 (breast), SNU638 (stomach), SK-Hep-1 (liver), PC3 (prostate).

²⁾Unit: μ g/mL. ³⁾Positive control

높다고 여겼다. Hexane 분획도 3종의 세포종에 대하여 28.36 – 39.63 $\mu\text{g/ml}$ 에서 효과를 나타내었으나 EtOAc 분획에 비하여는 그 활성이 다소 약함을 알 수 있었다.

따라서, 본 연구에서 산여뀌 추출물로부터의 주요 활성 성분 분리는 우선적으로 hexane 분획과 EtOAc 분획을 대상으로 실시하였다. 분리 결과, hexane 분획으로부터 galactolipid에 속하는 화합물 **1**과 **2**를 분리하였으며, EtOAc 분획으로부터 phenylpropanoyl sucrose에 속하는 화합물 **3**, **4**, **5**를 분리하였다.

이들은 그 분광분석치에 의거하여 화합물 **1**은 1,2-di-*O*-linolenoyl-3-*O*- β -D-galactospyranosyl-*sn*-glycerol 이었으며, 화합물 **2**는 1-*O*-linolenoyl-3-*O*- β -D-galactospyranosyl-*sn*-glycerol 구조를 가지는 화합물임을 확인할 수 있었다. 화합물 **3**, **4**, **5**는 분광분석치를 문헌치와 비교하여 각각 lapathoside A(**3**),⁵⁾ vanicoside B(**4**),⁴⁾ lapathoside C(**5**)⁶⁾로 확인되었다.

Galactolipid에 속하는 화합물 **1**은 Takahashi 등이⁹⁾ NMR data를 보고한 바 있으나 이에 관하여 보다 자세한 assignment가 없으므로 본 연구를 통하여 assignment를 할 수 있었으므로 그 과정과 결과를 보고한다. 이 화합물은 δ 5.36 – 5.43에 걸쳐 12H에 해당하는 피크가 나타났으므로 이중결합을 각각 3개 가지는 linoleic acid 두 분자가 결합한 것임을 알 수 있었다. 또 glycerol moiety에 의한 피크가 δ 4.20,

4.24(H-1), δ 5.34(H-2), δ 3.76, 3.94(H-3)의 피크의 분열 양상으로부터 이 galactolipid는 glyceroglycolipid에 속함을 알 수 있다. 그리고 당의 존재는 D-galactopyranose의 anomeric proton이 $J=7.8$ Hz로 갈라지는 δ 4.30의 피크로부터 β -결합을 하고 있음을 알 수 있다. ¹³C-NMR spectrum에서 문헌치의 D-galactopyranosyl의 피크와 일치하므로 monogalactosyl diacylglycerol로 간주되었다. 이 화합물의 HMQC NMR spectrum을 이용하여 ¹³C-NMR spectrum의 데이터를 assignment할 수 있었을 뿐 아니라, 더욱이 HMBC spectrum을 해석을 통하여 이를 확실히 할 수 있었으므로 HMBC correlation을 Fig. 2에 나타내었다.

화합물 **2**는 화합물 **1**에서 linolenoyl기 하나가 없는 monogalactosyl monoacylglycerol에 속하는 화합물인 것은 그 linolenoyl의 수소 피크 개수로부터 알 수 있었다. D-galactopyranosyl기에 인접한 곳에 2-OH에 linolenoyl기가 없으므로 당의 anomeric proton도 화합물 **1**과 달리 δ_c 101.1에서 나타났다. 이에 비해 화합물 **1**에서 D-galactose의 anomeric carbon은 δ_c 103.1에서 그 피크가 나타나 비교된다. 이상과 같이 화합물 **1**과 **2**의 NMR spectrum의 assignment의 결과를 재료 및 방법 항에 기술하였다.

화합물 **4**는 백색의 분말로 얻어졌다. 이 화합물의 UV spectrum에서는 270 nm와 344 nm에서 λ_{max} 가 나타나 일반적인 phenylpropanoid의 피크에 따른 것으로 예상되었다. IR

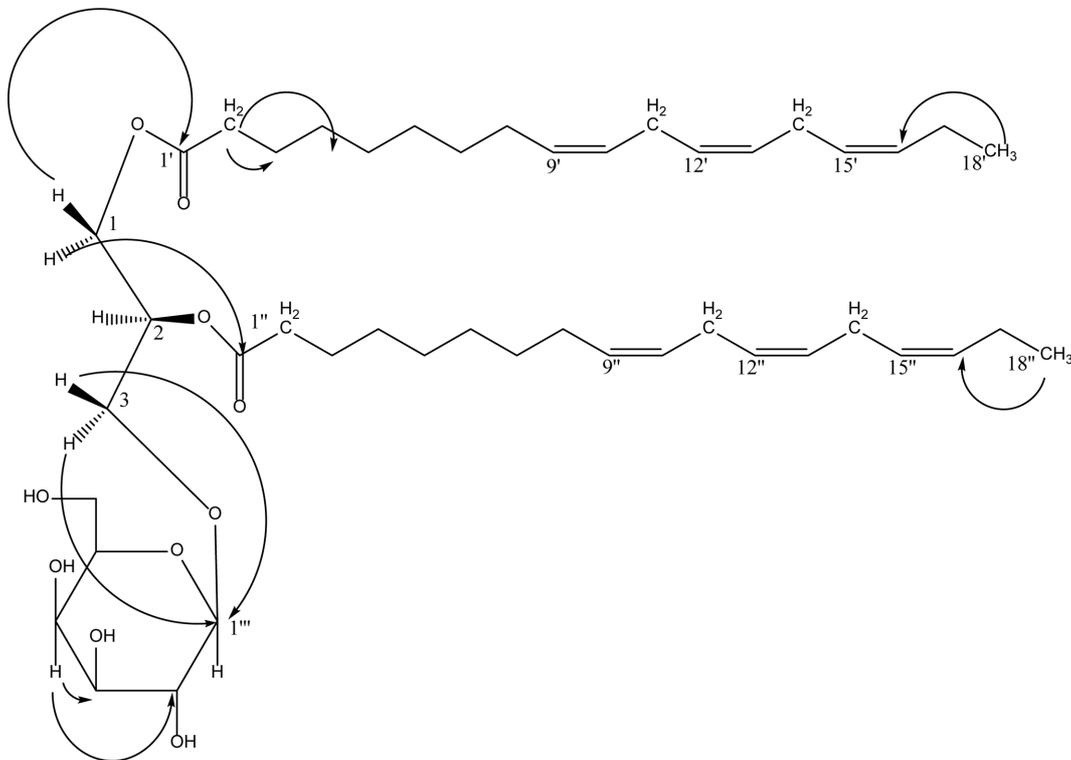


Fig. 2. Selected HMBC correlation of compound **1**.

spectrum에서는 α,β -unsaturated ester에 기인한 1654 cm^{-1} , aromatic C=C에 기인한 $1610, 1491\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타나 이러한 피크는 이 화합물의 phenylpropanoid moiety에 기인한 것임을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 D-glucose의 anomeric proton이 $\delta\ 5.20$ 에서 $J=3.8\text{ Hz}$ 로서 doublet로 나타나 α -결합을 함을 알 수 있고, D-fructose의 H-1'가 $\delta\ 4.59(2\text{H, m})$ 에서 나타나며, $\delta\ 4.24$ 와 $\delta\ 4.74$ 에서 2H 분의 H-6'가 나타나므로 당은 sucrose인 것으로 예상되었다. *p*-coumaric acid와 ferulic acid와 같이 α,β -unsaturated carbonyl기를 가지는 moiety가 *trans*-double bond에 해당하는 J 값이 $15.6\text{--}16.2\text{ Hz}$ 로 나타나는 피크가 8개가 나타나므로 이 화합물은 sucrose에 phenylpropanoid가 4분자 결합한 화합물임을 알 수 있었다.

Fig. 3에 HMBC correlation을 나타내었듯이 4개의 phenylpropanoid는 D-glucose C-6, D-fructose의 C-1', C-3', C-6'에 결합하고 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 메톡시기에 기인한 한 개의 피크가 $\delta\ 57.0$ 에서 나타나므로 4개의 phenylpropanoid 중 하나는 ferulic acid이고 나머지 3개는

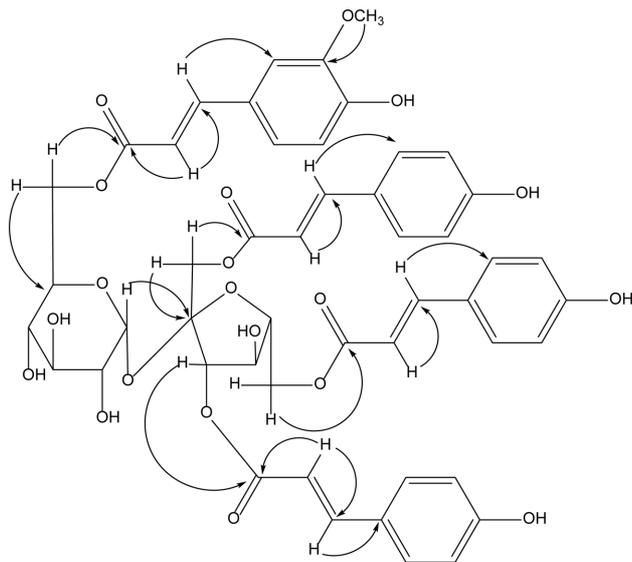


Fig. 3. Selected HMBC correlation of compound 2.

p-coumaric acid로 예상된다. Vanicoside A–C, lapathoside A–D와 같은 phenylpropanoyl sucrose 화합물에서 통상 ferulic acid는 sucrose의 C-6에 결합하는 것으로 나타난다. Fig. 3의 HMBC correlation에서 보듯이, ferulic acid는 D-glucose의 C-6에 결합하고 있고 나머지 3개의 *p*-coumaric acid는 C-1', C-3', C-6'에 각각 결합하고 있었다. 그러므로 이 화합물은 6-*O*-feruloyl-1',3',6'-tri-*O*-*p*-coumaroylsucrose 구조를 갖는 vanicoside B 화합물로 동정할 수 있다. 이 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼의 데이터가 vanicoside B의 데이터와⁴⁾ 일치하였으므로 화합물 4는 vanicoside B이다.

그리고, 화합물 3과 5는 화합물 4와 같이 phenylpropanoyl sucrose구조의 화합물로서 HR-ESI-MS data와 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ data에 의거하여 각각 6,1'-di-*O*-feruloyl-3',6'-tri-*O*-*p*-coumaroylsucrose(3, lapathoside A) 및 6-*O*-feruloyl-3',6'-di-*O*-*p*-coumaroylsucrose(5, lapathoside C)로 동정하였다. 화합물 3과 5의 화합물의 NMR assignment는 화합물 4의 NMR assignment의 결과 및 문헌치와^{5,6)} 비교하여 실험항에 나타내었다.

분리된 화합물 5종을 6종의 암세포주에 대한 성장억제 효과에 관한 실험을 수행하여 그 결과를 Table III에 나타내었다. 이 중 화합물 3과 4만이 $20\ \mu\text{M}$ 이하에서 활성이 있었으나 나머지 화합물은 효과가 없었다. 이 두 화합물은 SNU638, MDA-MB-231, SK-Hep-1 세포주에 대한 억제활성을 나타내었다. Phenylpropanoyl moiety 3개를 가지는 화합물 5는 $20\ \mu\text{M}$ 농도에서 효과가 없었으나 4개를 가지는 화합물 3과 4는 큰 암세포성장 저해작용을 나타내었다. 이상과 같이 산여뀌의 EtOAc 분획이 가지는 높은 암세포성장 저해효과는 이들의 phenylpropanoyl sucrose에 기인한 것으로 예상되므로 이를 이용하여 암 치료를 위한 선도물질로 개발할 수 있을 것으로 예상된다.

한편, 산여뀌의 분획물과 성분이 항염증 활성에도 효과를 나타내는지를 알아 보고자 LPS로 유도한 마우스 macrophage RAW 264.7 세포에서의 NO 생성능에 대한 저해 효과를 평가하였으며 그 결과는 Table IV에 나타내었다. NO는 세포 신호전달에 중요한 역할을 하며 염증반응에 깊이 관여하는

Table III. Inhibition activity (IC_{50}) of the constituents isolated from *P. nepalensis* on cancer cell growth *in vitro*

IC_{50} (μM)	A549 ¹⁾	SNU638	HCT116	MDA-MB-231	SK-Hep-1	PC3
1	> $20^2)$	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
2	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
3	> 20	8.59	> 20	10.74	6.90	> 20
4	19.68	18.09	18.49	7.036	11.51	8.39
5	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
Etoposide (μM) ³⁾	0.13	0.13	0.54	1.1	0.18	> 20

¹⁾Cancer cell line: A549 (lung), HCT116 (colon), MDA-MB-231 (breast), SNU638 (stomach), SK-Hep-1 (liver), PC3 (prostate).

²⁾Unit: μM . ³⁾Positive control

Table IV. Inhibition activity (IC₅₀) of the fractions of *P. nepalensis* and the isolated compounds (**1** – **5**) on LPS-induced NO production and cell viability in RAW 264.7 cells

Treatment	iNOS	MTT
Hexane fr.	> 40	> 40
EtOAc fr.	34.14	> 40
BuOH fr.	> 40	> 40
1	> 20	> 20
2	> 20	> 20
3	8.55	> 20
4	7.83	> 20
5	> 20	> 20
AMT ¹⁾	< 0.2	-

¹⁾2-amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazine hydrochloride (AMT), iNOS 67% inhibition at 0.2 μM

²⁾Unit: extract and fractions (μg/mL), compounds (μM)

것으로 잘 알려져 있다.^{7,8)} 실험결과 EtOAc 분획에서 항염증 효능을 나타내었으며, 성분 중에서는 화합물 **3**과 **4**가 탁월한 항염증 효과를 가지는 것으로 평가되었다. 이들은 모두 20 μM 이하의 농도에서 macrophage Raw 264.7 세포에 대한 세포독성은 없이 NO 저해활성에 따르는 항염증 효과를 나타낼 것으로 여겨진다. 이상과 같이 산여귀 EtOAc 분획물은 phenylpropanoyl sucrose에 따르는 항암 및 항염효과를 나타내어 선도물질로서의 가치가 있을 것으로 기대된다.

결 론

한국의 강원도 일대에서 자생하는 9종의 *Persicaria*속 식물 중 암세포 성장억제 효능을 보인 산여귀(*P. nepalensis*)로부터 식물화학적 구조 분석 및 암세포성장 억제와 항염증 효능 평가를 실시하였다. 그 결과, 산여귀 추출물의 EtOAc 분획은 높은 암세포 성장 저해효과를 나타내었으며, EtOAc 분획물에서 얻은 phenylpropanoyl sucrose 계열 성분인 lapathoside A와 vanicoside B가 암세포 성장 억제효과를 나타내어 주요 성분임을 알 수 있었다. 두 성분은 항염증 효능도 나타낼 수 있었다. 또한, hexane 분획에서 얻은 두 화합물 1,2-di-*O*-linolenoyl-3-*O*-β-D-galactospyranosyl-*sn*-glycerol 및 1-*O*-linolenoyl-3-*O*-β-D-galactospyranosyl-

sn-glycerol에 대하여 그 NMR assignment를 구체적으로 실시하여 구조 분석을 명확히 하였다. 산여귀로부터 얻은 이들 5종 성분은 이 식물에서 보고된 바 없다.

인용문헌

- Lee, C. B. (2014) Coloured Flora of Korea, 262-277. Hyangmunsa, Seoul.
- Zimmermann, M. L. and Snenden, A. T. (1994) Vanicosides A and B, protein kinase C inhibitors from *Polygonum pensylvanicum*. *J. Nat. Prod.* **57**: 236-242.
- Brown, L. L., Larson, S. R. and Sneden, A. T. (1998) Vanicosides C-F, new phenylpropanoid glycosides from *Polygonum pensylvanicum*. *J. Nat. Prod.* **61**: 762-766.
- Wang, K. J., Zhang, Y. J. and Yang, C. R. (2005) Antioxidant phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. *J. Ethnopharmacol.* **99**: 259-264.
- Takasaki, M., Kuroki, S., Kozuka, M. and Konoshima, T. (2001) New phenylpropanoid esters of sucrose from *Polygonum lapathifolium*. *J. Nat. Prod.* **64**: 1305-1308.
- Panda, P., Applalashetti, M., Natarajan, M., Mary, C., Venkatraman, S. S. and Judeh, Z. M. A. (2012) Synthesis and antiproliferative activity of helonioside A. 3',4',6'-tri-*O*-feruloylsucrose, lapathoside C and their analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **58**: 418-430.
- Pyee, Y., Chung, H., Choi, T. J., Park, H. J., Hong, J., Kim, J. S., Kang, S. S. and Lee, S. K. (2014) Suppression of inflammatory responses by handelin, a guaianolide dimer from *Chrysanthemum boreale*, via down regulation of NF-κB signaling and pro-inflammatory cytokine production. *J. Nat. Prod.* **77**: 917-924.
- Kim, D., Lee, S. K., Park, Y., Kwon, N. and Park, H. (2019) Isolation of constituents with nitric oxide synthase inhibition activity from *Phryma leptostachya* var. *asatica*. *Nat. Prod. Sci.* **25**: 34-37.
- Takahashi, M., Sugiyama, Y., Kawabata, K., Takahashi, Y., Irie, K., Murakami, A., Kubo, Y., Kobayashi, K. and Ohigashi, H. (2011) 1,2-Di-*O*-α-linolenoyl-3-*O*-β-galactosyl-*sn*-glycerol as a superoxide generation inhibitor from *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**: 2240-2242.

(2019. 9. 21 접수; 2019. 10. 29 심사; 2019. 11. 5 게재확정)