



Cytotoxic compounds against adenocarcinoma alveolar epithelial A549 cells from *Paeoniae Radix*

Ji Won Park¹ · Sang-Eun Shin¹ · Haewon Park¹ · Jeong Ah Kim¹ ·
Eun-Ju Yang² · Kyung-Sik Song¹

작약 뿌리에서 분리한 폐포 선암 세포주 A549에 대한 세포독성 화합물

박지원¹ · 신상은¹ · 박해원¹ · 김정아¹ · 양은주² · 송경식¹

Received: 19 April 2023 / Accepted: 27 June 2023 / Published Online: 5 July 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract It has been known that *Paeoniae Radix* (PR) contains monoterpene glycosides showing a variety of biological activities such as anti-spasmodic, anti-inflammatory, anti-viral, neuroprotective, and sedative effects. This study aimed to find the cytotoxic compounds isolated from the dichloromethane (CH₂Cl₂)- and ethyl acetate-soluble fractions of PR. As results, thirteen compounds (**1-13**) were isolated and the chemical structures were identified. In addition, the human alveolar adenocarcinoma cell line (A549) was treated with isolated compounds to determine the cytotoxic effect via evaluation of cell viability. The reduction of A549 cell viability was shown as following order; gallic acid (**8**) > (2*S*)-naringenin (**9**) > methyl gallate (**10**) > 6'-*O*-benzoylpaeoniflorin (**7**) > palmitic acid (**3**). Especially, **7** did not show the cytotoxicity in the human lung fibroblast cell line (MRC-5). The effect of **7** on the cell viabilities in A549 and MRC-5 is firstly reported in this study. Further study is required to find out the cytotoxic

mechanism and the selectivity for the cancer cells of **7** in detail.

Keywords A549 · 6'-*O*-Benzoylpaeoniflorin · Cytotoxicity · *Paeoniae Radix*

서 론

우리나라 통계청에서 발표한 2021년 사망원인통계[1]에 의하면 한국인 3대 사망원인은 암, 심장질환, 폐렴 순이었으며, 전체 사망자의 26%가 암으로 사망한 것으로 나타났다. 그 중 폐암으로 인한 사망이 인구 10만 명당 36.8명으로 가장 높은 것으로 조사되었다. 미국에서는 남성의 경우 전립선암(prostate cancer) 다음으로, 여성은 유방암(breast cancer) 다음으로 폐암 발병률이 높은 것으로 알려져 있다[2]. 특히, 폐암은 진행 정도에 따라 다르지만 진단 후 5년 생존율이 4-17%에 불과한 것으로 나타나[3] 폐암 조기진단법 및 치료제 개발이 절실한 실정이다.

폐암은 조직학적으로 크게 2가지 유형으로 분류되는데, 비소세포폐암(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)과 소세포폐암(small cell lung carcinoma, SCLC)이 그것이다. 그 중 NSCLC가 전체 폐암의 약 85%를 차지하는 것으로 보고되었으며, NSCLC는 선암(adenocarcinoma)이 40%, 편평상피세포암(squamous cell carcinoma)이 25%를 차지하는 것으로 알려져 있다[2]. 최근 NSCLC를 치료를 위한 화학방사선 요법(radiochemotherapy), 분자 표적 치료제(molecular targeted therapy), 면역항암제(immunotherapy) 등이 활발히 개발되어 왔지만 약물에 대한 내성이 유발되거나 환자의 생존기간 연장이 수개월에 불과한 것으로 나타났다[3,4]. 따라서 폐암 치료제 시장에서는 여전히 새로운 약물 개발이 요구되고 있으며, 천연물(natural products) 유래 항암

Eun-Ju Yang (✉)
E-mail: ejy125@cau.ac.kr

Kyung-Sik Song (✉)
E-mail: kssong@knu.ac.kr

¹Research Institute of Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

²College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성분 탐색이 여러 전략 중 하나로 인식되고 있다. 천연물은 합성약물에 비해 상대적으로 독성과 부작용이 적으며 단일 메커니즘 타겟이 아닌 멀티 타겟팅(multi-targeting)으로 작용할 수 있다는 장점이 있다[5].

작약(*Paeonia lactiflora*)은 작약과(Paeoniae)에 속하는 여러해살이 식물이며[6], 그 뿌리는 숙지황(*Rehmanniae Radix Preparata*), 천궁(*Cnidii Rhizoma*), 당귀(*Angelicae Gigantis Radix*) 등과 함께 배합하여 월경불순, 갱년기 장애 등에 사용되어 왔다[7]. 작약 뿌리(*Paeoniae Radix*, PR)의 주요성분으로는 paeoniflorin, albiflorin, paeonol, gallic acid 등이 보고되어 있으며[8], 그 중 monoterpene glycoside 계통 화합물인 paeoniflorin과 albiflorin은 대한민국약전(The Korean Pharmacopoeia, KH)에서 지표성분(marker compound)으로 설정되어 있다[9]. 최근 연구에 의해 PR 구성성분 중 gallic acid와 methyl gallate는 항암활성을, paeoniflorin과 paeonol은 항암활성과 더불어 항염활성을 가지는 것으로 알려졌다[8]. 뿐만 아니라, paeoniflorin과 albiflorin은 신경보호 효과가 있으며 paeoniflorin, ethyl palmitate 및 ethyl linoleate는 간세포보호 효과가 있는 것으로 밝혀졌다[8].

사람 유래 폐포 선암 세포주(alveolar adenocarcinoma cell line)인 A549는 NSCLC 중 가장 높은 빈도로 발생하는 선암에 대한 세포독성 유도 물질 및 그 작용 메커니즘 탐색을 위한 연구에 활용되어 왔다. 선암에서는 편평상피세포암 혹은 SCLC와는 달리 Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog 및 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR) 유전자 변이(mutation)가 특징적인데[10], Zhou 등[11]에 의해 사람 유래 정상 기관지 상피세포인 BEAS-2B에 비해 A549가 phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) 및 EGFR 단백질 발현이 높은 것으로 보고된 적 있다. 뿐만 아니라, 미국 Food and Drug Administration (FDA)에서 표적항암제(가역적 EGFR tyrosine kinase 저해제)로 승인 받은 gefitinib이 실제로 A549에서 ERK와 EGFR 인산화를 억제함으로써 세포사멸을 유도하는 것이 확인된 바 있어[12], A549는 NSCLC 항암제 탐색에 유용한 세포주라 할 수 있다.

이번 연구에서는 PR에서 분리한 단일화합물들을 A549에 처리한 후 세포생존을 변화를 관찰하였으며, 지금까지 보고된 적 없는 A549 세포독성 물질을 탐색하고자 하였다. 아울러 세포생존을 결과를 바탕으로 화합물 구조와 세포독성 활성 상관관계를 유추해 보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 중국산 건조 PR은 농촌진흥청(Eumseong, Korea)으로부터 제공받았다. 표본은 경북대학교 약학대학 천연물약학 연구실에 보관하였다(표본번호: KNUNPM PL-2020-001).

시약

추출 및 chromatography를 위한 용매 즉, *n*-hexane, dichloromethane (CH₂Cl₂), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc),

methanol (MeOH), *n*-butanol (*n*-BuOH) 등은 Duksan Chemical (Anseong, Korea)에서 구입하였다. HPLC용 MeOH과 acetonitrile (ACN)은 Honeywell-Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA), HPLC용 acetic acid (HOAc)는 J.T. Baker (Rendow, PA, USA) 제품을 사용하였다. 또한 column chromatography 용출양상 확인을 위해 thin-layer chromatography (TLC)를 실시하였으며, Merck (Darmstadt, Germany) 사로부터 구입한 TLC silica gel 60 RP-18 F254_s와 TLC silica gel 60 F254를 사용하였다.

추출, 분리 및 정제

PR 10 kg을 95% MeOH (13 L)을 사용하여 60 °C에서 3시간씩 4회 반복 환류추출 하였다. MeOH 추출물은 filter paper (Ø 500 mm; Advantec, Tokyo, Japan)로 여과한 후, 감압회전 농축기를 이용해 45 °C에서 농축하여 작약 MeOH 추출물 1.96 kg을 얻었다. 이를 2 L 증류수에 분산시킨 후, 동량의 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, 및 *n*-BuOH을 이용하여 순차적으로 분배추출 하였다. 각 분획들은 무수 황산나트륨(Na₂SO₄)을 사용하여 탈수하였으며, *n*-hexane 분획 95.0 g, CH₂Cl₂ 분획 29.7 g, EtOAc 분획 136.3 g, *n*-BuOH 분획 296.8 g을 각각 얻을 수 있었다. CH₂Cl₂ 분획(29.7 g)에 대해 silica gel column chromatography (70-230 mesh, Ø 7.5×45 cm; CHCl₃:MeOH = 200:1~100% MeOH)를 실시하였으며, 총 15개의 fraction을 얻었다 (Fr. 1~15). 그 중 Fr. 4 (1.1 g)를 다시 silica gel column chromatography (230-400 mesh, Ø 3.0×47 cm; *n*-hexane:EtOAc = 10:1~100% EtOAc) 하여 13개의 fraction을 얻었다(Fr. 4-1~4-13). Fr. 4-6 (430.9 mg)에서 침전물이 형성되었으며, 이를 MeOH로 수회 세척하여 화합물 1 (25.2 mg)을 얻을 수 있었다. Fr. 5 (1.1 g)에 대해 silica gel column chromatography (230-400 mesh, Ø 3.5×47.5 cm; CHCl₃:MeOH = 200:1~100% MeOH) 하여 5개의 fraction을 얻었으며(Fr. 5-1~5-5), 그 중 Fr. 5-4 (172.5 g)를 medium pressure liquid chromatography (MPLC; Grace Reveleris, Columbia, MD, USA) 하였다. 고정상은 C₁₈ (40 µm, 4 g), 이동상은 물과 ACN(100% 물~100% ACN)을 사용하였다. 유속(flow rate)은 10 mL/min이었으며, 용출된 물질은 evaporative light scattering detector (ELSD)로 검출하였다. 그 결과, 화합물 2 (13.2 mg)와 3 (18.9 mg)을 각각 분리할 수 있었다. Fr. 7 (0.95 g)은 silica gel column chromatography (70-230 mesh, Ø 3.5×50 cm; *n*-hexane:ether = 10:1~1:5)에 의해 5개의 fraction으로 나누었으며(Fr. 7-1~7-5), Fr. 7-2 (290.0 mg)에 대해 reversed-phase column chromatography를 실시하였다. 고정상은 YMC gel ODS-A (150 µm, 120 Å; Ø 3.0×35 cm)를 사용하였으며, 이동상으로는 물과 ACN을 사용하였다(물:ACN = 3:1~1:10). 얻어진 4개의 fraction (Fr. 7-2-1~7-2-4) 중 Fr. 7-2-1에서 화합물 4 (260.0 mg)를 얻을 수 있었다. 한편, Fr. 11 (9.8 g)에 대해서는 Prep-LC를 실시하였다. Hypersil ODS C18 column (Ø 10×250 mm; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에 각각 0.1% HOAc를 포함하고 있는 물과 MeOH을 이동상으로 사용하였다(물:MeOH = 95:5~100% MeOH). 유속은 5 mL/min이었으며, UV 254 및 280 nm에서 검출하였다. 이를 통해 화합물 5 (38.2 mg)을 분리하였다. Fr. 12 (3.1 g)에 대한 silica gel column chromatography (230-400 mesh, Ø

3.5×47.5 cm; CH₂Cl₂:MeOH = 100:1~100% MeOH)를 통해 총 8개의 fraction을 획득하였으며(Fr. 12-1~12-8), 그 중 Fr. 12-3 (1.5 g)에 대해 HPLC를 실시한 결과[고정상, Luna 5 µm C18(2) 100 Å column (Ø 10×250 mm; Phenomenex); 이동상, 45% MeOH; 유속, 3 mL/min; 검출, UV 254, 280, 365 nm], 화합물 **6** (9.9 mg) 및 **7** (20.6 mg)을 분리할 수 있었다. EtOAc 분획(136.3 g)에 대해 silica gel column chromatography (70-230 mesh, Ø 11×44 cm; CH₂Cl₂:MeOH = 100:1~100% MeOH)를 실시하여 8개의 fraction을 획득하였다(Fr. 1~8). 이후 Fr. 7 (21.2 g)은 YMC gel ODS-A (150 µm, 120 Å; Ø 5.1 ×31 cm)에 주입 하였으며, 물:MeOH = 50:1~100% MeOH의 이동상 조건으로 용출시켜 총 8개의 fraction을 확보하였다(Fr. 7-1~7-8). Fr. 7-3 (397.8 mg) 및 Fr. 7-4 (350.4 mg)는 Prep-LC [고정상, YMC-Actus Triart S-5 µm C18 column (20×250 mm); 이동상, 각각 1% HOAc를 포함하는 물:MeOH = 100:1~1:1; 유속, 15 mL/min; 검출, UV 254, 280 nm]하여 화합물 **8** (101.6 mg)을 얻었다. Fr. 7-5 (650 mg)는 Hypersil ODS C18 column (Ø 10×250 mm)에 주입한 뒤 48% MeOH로 용출(유속, 15 mL/min; 검출, UV 280 nm)한 결과, 화합물 **9** (11.4 mg)가 얻어졌다. Fr. 7-6 (995.0 mg) 역시 Prep-LC[고정상, YMC-Actus Triart S-5 µm C18 column (20×250 mm); 이동상, 각각 1% HOAc를 포함하는 물:MeOH = 100:1~100% MeOH; 유속, 15 mL/min; 검출, UV 254, 280 nm]하여 화합물 **10** (12.0 mg)을 분리할 수 있었다. Fr. 7-7 (11.42 g)은 Fr. 7-6과 동일한 분리조건으로 화합물 **11** (262.2 mg)과 **12** (26.4 mg)가 얻어졌다. Fr. 7-8 (2.8 g)은 Hypersil ODS C18 column (Ø 10×250 mm)에 주입한 후, 1% HOAc를 포함하는 48% MeOH를 사용하여 용출(유속, 15 mL/min; 검출, UV 280 nm)한 결과, 화합물 **13** (18.0 mg)을 분리할 수 있었다.

NMR 분석

분리한 단일화합물의 구조동정을 위해 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 스펙트럼 분석을 실시하였다. NMR 기기는 Bruker Avance Digital 500 spectrometer (Karlsruhe, Germany)를 사용하였다. NMR 용매는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, 내부표준물질로서 tetramethylsilane (TMS)을 사용하여 chemical shift (δ)를 0 ppm으로 고정하였다.

화합물 **1** - ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.34 (1H, m, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, CH₃), 0.84 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃), 0.80 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃), 0.68 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.8 (C-14), 56.1 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13), 39.8 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 36.1 (C-20), 33.9 (C-22), 31.9 (C-2, C-8), 31.7 (C-7), 29.2 (C-25), 28.3 (C-16), 26.1 (C-23), 24.3 (C-15), 23.1 (C-28), 21.1 (C-11), 19.8 (C-26), 19.4 (C-19), 19.0 (C-27), 18.8 (C-21), 12.0 (C-18), 11.9 (C-29).

화합물 **2** - ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.43-5.30 (4H, m,

H-9, H-10, H-12, H-13), 2.77 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-11), 2.35 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2), 2.07-2.03 (4H, m, H-8, H-14), 1.63 (2H, m, H-3), 1.38-1.30 (14H, m, H-4-H-7, H15-H-17), 0.89 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-18); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 180.0 (C-1), 130.2 (C-13), 130.0 (C-9), 128.0 (C-12), 127.9 (C-10), 34.0 (C-2), 31.5 (C-17), 29.6 (C-15), 29.3 (C-7), 29.2 (C-6), 29.1 (C-5), 29.0 (C-4), 27.2 (C-8, C-14), 25.6 (C-11), 24.6 (C-3), 22.6 (C-16), 14.1 (C-18).

화합물 **3** - ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 2.35 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2), 1.63 (2H, m, H-3), 1.25 (24H, m, H-4-H-15), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-16); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 179.9 (C-1), 34.0 (C-2), 31.9 (C-3), 29.7~29.1 (C-4-C-13), 24.7 (C-14), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16).

화합물 **4** - ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8.02 (2H, d, *J* = 7.9 Hz, H-2, H-6), 7.58 (1H, t, *J* = 7.9 Hz, H-4), 7.46 (2H, t, *J* = 7.9 Hz, H-3, H-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 169.9 (C-7), 134.0 (C-4), 132.0 (C-1), 130.8 (C-2, C-6), 129.5 (C-3, C-5).

화합물 **5** - ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8.02 (2H, dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, H-2", H-6"), 7.63 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, H-4"), 7.51 (2H, t, *J* = 7.9 Hz, H-3", H-5"), 4.91 (1H, brd, *J* = 4.4 Hz, H-9), 4.78 (2H, s, H-8), 4.63 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-1'), 3.84 (1H, brd, *J* = 11.0 Hz, H-6'β), 3.67 (1H, dd, *J* = 11.0, 4.9 Hz, H-6'α), 3.50 (1H, m, H-3'), 3.35-3.33 (2H, m, H-4', H-5'), 3.20 (1H, dd, *J* = 9.5, 8.2 Hz, H-2'), 2.78-2.73 (1H, m, H-4), 2.76 (1H, d, *J* = 18.0 Hz, H-2β), 2.53 (1H, d, *J* = 18.0 Hz, H-2α), 2.51 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H-5β), 2.18 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.7 Hz, H-5α), 1.50 (3H, s, H-10); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 218.7 (C-3), 167.6 (C-7"), 134.7 (C-4"), 130.8 (C-1"), 130.7 (C-2", C-6"), 129.9 (C-3", C-5"), 104.2 (C-6), 96.5 (C-1'), 86.7 (C-1), 81.6 (C-9), 80.1 (C-5'), 76.2 (C-2'), 74.8 (C-3'), 71.7 (C-4'), 63.8 (C-8), 62.4 (C-6), 56.9 (C-7), 48.2 (C-2), 38.7 (C-4), 31.7 (C-5), 16.4 (C-10).

화합물 **6** - ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8.05 (4H, m, H-2", H-6", H-2"', H-6'''), 7.61 (2H, m, H-4", H-4'''), 7.48 (4H, m, H-3", H-5", H-3''', H-5'''), 4.73 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-8β), 4.62 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-8α), 4.55 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 4.51 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-6α'), 3.98 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-4), 3.66 (1H, m, H-6β'), 3.58 (1H, m, H-5'), 3.37-3.23 (3H, m, H-2'-H-4'), 2.81 (1H, dd, *J* = 12.5, 5.2 Hz, H-5), 2.74 (1H, dd, *J* = 10.8, 7.9 Hz, H-7β), 1.98 (1H, dd, *J* = 15.4, 6.4 Hz, H-3β), 1.85 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H-3α), 1.71 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-7α), 1.38 (3H, s, H-10); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 177.9 (C-9), 167.9 (C-7"), 167.6 (C-7'''), 134.4 (C-4", C-4'''), 131.4 (C-1", C-1'''), 130.8 (C-2", C-6", C-2''', C-6'''), 129.8 (C-3", C-5", C-3''', C-5'''), 100.0 (C-1'), 93.3 (C-2), 86.8 (C-1), 77.9 (C-3'), 75.4 (C-

5'), 74.8 (C-2'), 72.0 (C-4'), 68.3 (C-4, C-6'), 61.9 (C-8), 56.6 (C-6), 41.5 (C-3, C-5), 28.1 (C-7), 20.5 (C-10).

화합물 7 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.03 (4H, m, H-2", H-6", H-2'", H-6'''), 7.63 (2H, m, H-4", H-4'''), 7.48 (4H, m, H-3", H-5", H-3''', H-5'''), 5.37 (1H, s, H-9), 4.70 (2H, s, H-8), 4.65 (1H, dd, $J=11.7, 7.1$ Hz, H-7 β), 4.57 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.51 (1H, dd, $J=11.7, 7.1$ Hz, H-7 α), 3.61 (1H, ddd, $J=9.3, 7.6, 1.9$ Hz, H-5'), 3.38 (2H, m, H-3', H-4'), 3.26 (1H, dd, $J=8.8, 7.6$ Hz, H-2'), 2.51 (1H, d, $J=6.8$ Hz, H-5), 2.47 (1H, dd, $J=10.6, 6.8$ Hz, H-7 β), 1.85 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-3 α), 1.83 (1H, d, $J=10.6$ Hz, H-7 α), 1.70 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-3 β), 1.24 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.0 (C-7'''), 167.7 (C-7''), 134.5 (C-4", C-4'''), 131.4 (C-1"), 131.3 (C-1'''), 130.7 (C-2", C-6''), 130.6 (C-2''', C-6'''), 129.7 (C-3", C-5", C-3''', C-5'''), 106.3 (C-4), 102.3 (C-9), 100.1 (C-1'), 89.3 (C-1), 87.1 (C-2), 77.9 (C-3'), 75.3 (C-5'), 75.0 (C-2'), 72.1 (C-4'), 72.0 (C-6), 65.2 (C-6'), 61.6 (C-8), 44.5 (C-3), 43.8 (C-5), 23.1 (C-7), 19.6 (C-10).

화합물 8 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.08 (2H, s, H-2, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.6 (C-7), 146.5 (C-3, C-5), 139.7 (C-4), 122.1 (C-1), 110.5 (C-2, C-6).

화합물 9 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.31 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2", H-6"), 6.82 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3", H-5"), 5.89 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.88 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 5.34 (1H, dd, $J=13.0, 3.1$ Hz, H-2), 3.11 (1H, dd, $J=17.1, 13.0$ Hz, H-3 α), 2.69 (1H, dd, $J=17.1, 3.1$ Hz, H-3 β); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 197.8 (C-4), 168.4 (C-7), 165.5 (C-5), 164.9 (C-9), 159.1 (C-4'), 131.1 (C-1'), 129.1 (C-2', C-6'), 116.4 (C-3', C-5'), 103.4 (C-10), 97.1 (C-6), 96.2 (C-8), 80.5 (C-2), 44.1 (C-3).

화합물 10 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.04 (2H, s, H-2, H-6), 3.81 (3H, s, $-\text{COOCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 169.1 (C-7), 146.5 (C-3, C-5), 139.8 (C-4), 121.5 (C-1), 110.1 (C-2, C-6), 52.3 ($-\text{COOCH}_3$).

화합물 11 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.05 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-2", H-6"), 7.61 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-4"), 7.49 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3", H-5"), 5.42 (1H, s, H-9), 4.87 (2H, s, H-8), 4.75 (1H, d, $J=11.9$ Hz, H-6 β), 4.54 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.52 (1H, dd, $J=11.9, 6.3$ Hz, H-6 α), 3.59 (1H, ddd, $J=11.9, 6.3, 1.4$ Hz, H-5'), 3.24-3.20 (3H, m, H-2'~H-4'), 2.66 (1H, d, $J=6.3$ Hz, H-5), 2.50 (1H, dd, $J=11.0, 6.3$ Hz, H-7 β), 2.20 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-3 α), 1.96 (1H, d, $J=11.0$ Hz, H-7 α), 1.82 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-3 β), 1.37 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.0 (C-7''), 134.5 (C-4''), 131.2 (C-1''), 130.7 (C-2''), C-6''), 129.7 (C-3'', C-5''), 106.4 (C-4), 102.3 (C-9), 100.2 (C-1'),

89.4 (C-1), 87.3 (C-2), 78.1 (C-5'), 78.0 (C-3'), 75.0 (C-2'), 72.3 (C-6), 71.8 (C-4'), 62.9 (C-6'), 61.7 (C-8), 44.6 (C-3), 44.0 (C-5), 23.4 (C-7), 19.6 (C-10).

화합물 12 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.07 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-2", H-6"), 7.60 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-4"), 7.48 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3", H-5"), 4.80 (1H, d, $J=12.2$ Hz, H-8 β), 4.69 (1H, d, $J=12.2$ Hz, H-8 α), 4.54 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.26 (1H, t, $J=5.5$ Hz, H-4), 3.84 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-6' α), 3.58 (1H, dd, $J=11.4, 5.3$ Hz, H-6' β), 3.27-3.20 (4H, m, H-2'~H-5'), 2.90 (1H, brt, $J=5.5$ Hz, H-5), 2.79 (1H, dd, $J=11.0, 7.8$ Hz, H-7 β), 2.40 (1H, dd, $J=15.4, 5.5$ Hz, H-3 β), 2.04 (1H, d, $J=11.0$ Hz, H-7 α), 1.99 (1H, dd, $J=15.4$ Hz, H-3 α), 1.52 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 178.2 (C-9), 168.1 (C-7''), 134.5 (C-4''), 131.4 (C-1''), 131.0 (C-2'', C-6''), 129.8 (C-3'', C-5''), 100.2 (C-1'), 93.6 (C-2), 87.1 (C-1), 78.3 (C-3', C-5'), 75.0 (C-2'), 71.7 (C-4'), 68.5 (C-4), 63.0 (C-6'), 62.1 (C-8), 57.0 (C-6), 41.8 (C-3, C-5), 28.6 (C-7), 20.7 (C-10).

화합물 13 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.03 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-2", H-6"), 7.60 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-4"), 7.48 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3", H-5"), 7.08 (2H, s, H-2'', H-6'''), 5.38 (1H, s, H-9), 4.70 (2H, s, H-8), 4.54 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 3.54 (1H, brt, $J=6.4$ Hz, H-5'), 3.35 (2H, m, H-3', H-4'), 3.24 (1H, brt, $J=7.8$ Hz, H-2'), 2.53 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-5), 2.45 (1H, dd, $J=10.5, 7.5$ Hz, H-7 β), 1.92 (1H, d, $J=12.7$ Hz, H-3 β), 1.75 (1H, d, $J=10.7$ Hz, H-7 α), 1.70 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-3 α), 1.25 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.1 (C-7'', C-7'''), 146.6 (C-3'', C-5'''), 140.0 (C-4'''), 134.4 (C-4''), 131.2 (C-1''), 130.7 (C-2'', C-6''), 129.7 (C-3'', C-5''), 121.4 (C-1''), 110.2 (C-2'', C-6'''), 106.3 (C-4), 102.2 (C-9), 100.1 (C-1'), 89.4 (C-1), 87.2 (C-2), 77.9 (C-3'), 75.3 (C-5'), 75.0 (C-2'), 72.1 (C-4'), 72.0 (C-6), 64.7 (C-6'), 61.7 (C-8), 44.4 (C-3), 43.9 (C-5), 23.0 (C-7), 19.6 (C-10).

세포 배양

사람 유래 폐포 선암 세포주 A549와 폐 섬유아세포주(human lung fibroblast; disease, normal) MRC-5는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. A549 배양액으로서 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco #16000, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin/streptomycin (p/s; Welgene, Gyeongsan, Korea)가 포함된 RPMI1640 (Welgene #LM011-06)을, MRC-5 배양액으로는 10% FBS 및 1% p/s를 포함하는 MEM (Welgene #LM007-09)을 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였으며, 72시간 마다 계대하였다.

세포생존율 측정

세포에 처리하기 위한 각 단일화합물은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich #D2650)에 용해시켜 stock solution을 제조하였다. 이들은 세포배양액에 100배 이상 희석하여 DMSO

최종농도가 0.1% 이하가 되도록 하였다. A549 및 MRC-5 세포는 96-well plate에 4×10^3 cells/well의 밀도로 계대한 후, 24 시간 동안 배양하였다. 이후, 기존 배양액을 제거하고 준비된 시료를 48시간 동안 처리하였다. 세포생존을 측정을 위해 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Biosesang #MC1029, Seongnam, Korea) 시약을 phenol red-free RPMI1640 (Welgene #LM011-02A) 및 phenol red-free MEM (Welgene #LM007-12)에 용해시켜 0.2 mg/mL의 농도로 100 μ L/well씩 처리하였다. 1시간 배양 후, MTT 용액을 제거하고 살아있는 세포에 의해 생성된 비수용성 formazan을 100 μ L DMSO에 용해, 575 nm에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 상대적인 % 값으로 표현하였다. 양성대조군은 doxorubicin hydrochloride (DOX; Sigma-Aldrich #D1515)을 사용하였다[13].

결과 및 고찰

화합물 구조동정

각 화합물의 NMR 분석결과를 기존 문헌치와 비교하여 다음과 같이 최종 구조동정 하였다(Fig. 1).

화합물 1 - 흰색의 무정형 고체로 분리되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 5.34 (1H, m, H-6)는 olefinic proton의 특징적인 신호로 판단하였으며, δ 3.53 (1H, m, H-3)에서 oxymethyl group 유래인 것으로 예상되는 신호가 관측되었다. 또한 총 6개의 methyl group이 확인되었는데, primary methyl group에 해당되는 triplet 신호 1개 [δ 0.84 (3H, t, $J=6.8$ Hz)], secondary methyl group에 해당되는 doublet 신호 3개 [δ 0.91 (3H, d, $J=7.3$ Hz), 0.84 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.80 (3H, d, $J=6.8$ Hz)], tertiary methyl group에 해당되는 singlet 신호가

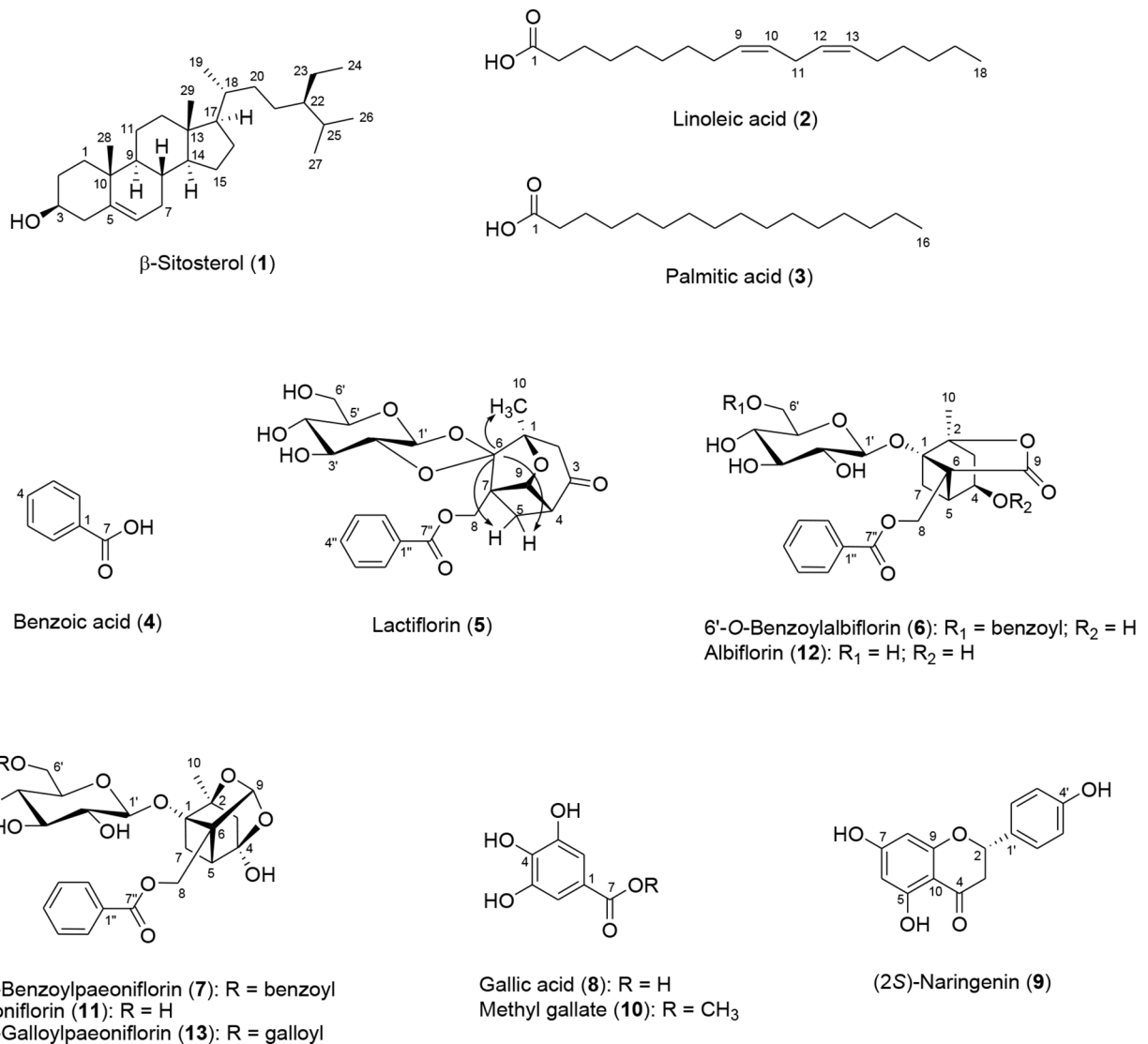


Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-13 isolated from Paoniae Radix (PR). \rightarrow , Heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)

2개[δ 1.00 (3H, s), 0.68 (3H, s)] 나타났다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 총 29개의 신호가 관측되었다. δ 71.8 (C-3)에서 hydroxyl group이 치환되어 있는 C-3 위치의 신호를 확인하였고, C-5 및 C-6에서의 이중결합 유래 신호는 각각 δ 140.7과 δ 121.7에서 확인하였다. 화합물 1은 문헌치와 비교하여 β -sitosterol로 동정하였다[14].

화합물 2 - 무색의 유상 형태로 분리되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 olefinic proton에 해당되는 신호가 δ 5.43-5.30 (4H, m, H-9, H-10, H-12, H-13)에서 관측되었다. Terminal methyl group에 해당하는 triplet 신호가 δ 0.89 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-18)에서, carbonyl group에 대한 α 및 β 위치의 methylene proton 신호가 각각 δ 2.35 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2)과 δ 1.63 (2H, m, H-3)에서 확인되었다. 또한 olefin group 사이의 methylene proton에 해당하는 δ 2.77 (2H, t, $J=6.4$ Hz, H-11) 신호가 나타났으며, 지방족 사슬의 methylene group에 해당하는 multiplet 신호가 δ 1.38-1.30 (14H, m, H-4~H-7, H15~H-17)에서 확인되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 총 18개의 신호가 관측되었으며, δ 130.2-127.9에서 4개의 olefinic carbon에 해당되는 신호를 확인하였다. 또한 δ 14.1 (C-18)는 terminal methyl group에 해당됨을 알 수 있었다. δ 34.0-22.6에서 총 12개의 methylene group과 δ 180.0 (C-1)에서 carboxyl group 유래 신호가 관측됨에 따라, 화합물 2는 linoleic acid로 동정하였다[15,16].

화합물 3 - 흰색의 무정형 고체로 분리되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 terminal methyl group에 해당하는 triplet 신호가 δ 0.88 (3H, t, $J=6.8$ Hz, H-16)에서, carbonyl group에 대한 α 및 β 위치의 methylene proton 신호가 각각 δ 2.35 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2)과 δ 1.63 (2H, m, H-3)에서 확인되었다. 지방족 사슬의 methylene group에 해당하는 multiplet 신호가 δ 1.25 (24H, m, H-4~H-15)에서 확인되었다. 하지만 화합물 2에서 나타난 δ 5.43-5.30의 olefinic proton 신호나 olefin group 사이의 methylene proton에 해당하는 δ 2.77 신호가 관측되지는 않았다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서도 역시 olefinic carbon에 해당되는 신호는 관측되지 않았다. 반면, δ 14.1 (C-16)에서 terminal methyl group과 δ 179.9 (C-1)에서 carboxyl group 유래 신호는 확인할 수 있었다. 따라서 화합물 3은 palmitic acid로 예상되었으며, 문헌치와 비교하여 최종 구조동정 하였다[17].

화합물 4 - 흰색의 무정형 고체로 분리되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 8.02 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-2, H-6), 7.58 (1H, t, $J=7.9$ Hz, H-4) 및 δ 7.46 (2H, t, $J=7.9$ Hz, H-3, H-5) 신호로 보아 benzene ring에서 1번 위치가 치환된 형태인 것으로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 총 7개의 신호가 관측되었다. 그 중 δ 132.0 (C-1)에서의 quaternary carbon과 δ 169.9 (C-7)에서의 carbonyl carbon이 나타난 것을 종합하여 화합물 4를 benzoic acid로 동정하였다[18].

화합물 5 - 흰색의 무정형 고체로 분리되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 8.02 (2H, dd, $J=7.9, 1.2$ Hz, H-2", H-6"), 7.63

(1H, dd, $J=7.9, 1.2$ Hz, H-4") 및 δ 7.51 (2H, t, $J=7.9$ Hz, H-3", H-5") 신호가 관측됨에 따라 화합물 4와 같은 benzoyl group이 부분구조로 존재할 것으로 예상하였다. δ 3.84 (1H, brd, $J=11.0$ Hz, H-6' β)와 δ 3.67 (1H, dd, $J=11.0, 4.9$ Hz, H-6' α)에 나타난 1개의 hydroxymethyl group, 그리고 δ 4.63 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-1')에 관측된 anomeric proton 신호에 의해 sugar moiety가 포함된 것을 알 수 있었다. 또한 δ 1.50 (3H, s, H-10)에서 나타난 tertiary methyl group에 의한 특징적인 신호도 확인되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 총 23개의 신호가 검출되었으며, $^{135}\text{DEPT}$ 분석결과와 종합하여 secondary carbon이 δ 63.8 (C-8), 62.4 (C-6'), 48.2 (C-2) 및 δ 31.7 (C-5)에, 그리고 quaternary carbon이 δ 104.2 (C-6), 86.7 (C-1) 및 δ 56.9 (C-7)에 나타난 것으로 판단하였다. HMQC 분석에 이은 HMBC 분석 결과에서 δ 1.50 (3H, s, H-10)은 δ 104.2 (C-6) 및 δ 86.7 (C-1)과 correlation하는 것을 확인하였다. δ 2.51 (1H, d, $J=14.0$ Hz, H-5 β)과 δ 2.18 (1H, dd, $J=14.0, 4.7$ Hz, H-5 α)은 각각 δ 104.2 (C-6)와 δ 38.7 (C-4), 그리고 δ 104.2 (C-6), 56.9 (C-7) 및 δ 38.7 (C-4)과 correlation 하였다. δ 2.76 (1H, d, $J=18.0$ Hz, H-2 β) 및 δ 2.53 (1H, d, $J=18.0$ Hz, H-2 α)도 마찬가지로 주변 carbon과의 correlation을 확인하여 H-2 및 H-5의 2개의 methylene group 위치를 동정하였다. 또한 δ 2.78-2.73 (1H, m, H-4)은 δ 81.6 (C-9) 및 δ 31.7 (C-5)과 correlation하는 것으로 나타나, 문헌치와 비교하여 화합물 5는 monoterpene glucoside에 속하는 lactiflorin으로 동정하였다[19].

화합물 6 - 무정형 고체로 분리되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 화합물 5에서 나타났던 benzoyl group 유래 신호를 δ 8.05 (4H, m, H-2", H-6", H-2"', H-6'''), 7.61 (2H, m, H-4", H-4''') 및 δ 7.48 (4H, m, H-3", H-5", H-3''', H-5''')에서 확인할 수 있었으며, 이들은 모두 화합물 5에 비해 integration이 2배에 해당되는 것으로 보아 화합물 6 구조 내에 2개의 benzoyl group이 존재할 것으로 예상하였다. δ 4.55 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1')에서 anomeric proton이, δ 1.38 (3H, s, H-10)에서 tertiary methyl group이 각각 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 benzoyl group에 해당되는 신호를 δ 167.9 (C-7"), 167.6 (C-7'''), 134.4 (C-4", C-4'''), 131.4 (C-1", C-1'''), 130.8 (C-2", C-6", C-2''', C-6''') 및 δ 129.8 (C-3", C-5", C-3''', C-5''')에서 확인하였다. 한편, benzoyl group 유래 외 추가적인 ester group 신호가 δ 177.9 (C-9)에서 나타남에 따라, 화합물 6은 6'-O-benzoylalbiflorin으로 예상하였으며 문헌치와 비교하여 동정하였다[20].

화합물 7 - 흰색의 무정형 고체로 분리되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 8.03 (4H, m, H-2", H-6", H-2''', H-6'''), 7.63 (2H, m, H-4", H-4''') 및 δ 7.48 (4H, m, H-3", H-5", H-3''', H-5''') 신호가 관측됨에 따라 화합물 6과 같이 2개의 benzoyl group이 존재할 것으로 예상하였다. 또한 δ 4.57 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1')에 관측된 anomeric proton과 δ 1.24 (3H, s, H-10)에서 tertiary methyl group도 확인되어 화합물 6과 구조적으로 유사할 것으로 생각되었다. 하지만 δ 5.37 (1H, s, H-9)에서 acetal group 유래의 특징적인 singlet 신호가 추가로 관측되었다. ^{13}C

NMR 스펙트럼에서 δ 106.2 (C-4), 102.2 (C-9), 89.3 (C-1), 87.1 (C-2), 72.0 (C-6), 61.6 (C-8), 44.4 (C-3), 43.8 (C-5), 23.0 (C-7) 및 δ 19.5 (C-10)에서 나타난 신호를 통해 monoterpene 계통의 pinene type 구조를 가진다는 것을 알 수 있었다. δ 100.0 (C-1')에서 anomeric carbon이 관측되었고, δ 167.9 (C-7'')와 δ 167.6 (C-7''')에서의 carbonyl carbon 신호를 통해 각각 glucose와 benzoic acid가 결합, pinene type 구조와 benzoic acid가 결합하는 구조를 유추할 수 있었다. 이러한 내용들을 종합하여 화합물 7은 6'-O-benzoylpaeoniflorin으로 예상되었고, 문헌치와 비교하여 최종 구조동정 하였다[20,21].

화합물 8 - 회색 분말 형태로 분리되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 7.08 (2H, s, H-2, H-6)의 aromatic proton에 해당하는 singlet 신호만이 관측되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 총 7개의 carbon이 검출되었으며, 그 중 δ 146.5 (C-3, C-5) 및 δ 139.7 (C-4) 신호를 통해 hydroxyl group이 연결된 carbon 3개가 존재하는 것을 알 수 있었다. δ 170.6 (C-7)에서 carbonyl carbon도 관측됨에 따라, 화합물 8은 문헌을 참고하여 gallic acid로 동정하였다[22].

화합물 9 - 노란색의 무정형 고체로 분리되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 flavonoid 화합물의 A ring을 구성하는 meta 위치의 aromatic proton [δ 5.89 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.88 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8)]과 B ring에서의 1,4-disubstituted benzene proton [δ 7.31 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', H-6'), 6.82 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3', H-5')]이 관측되었다. 특히, vicinal coupling에 해당하는 δ 5.34 (1H, dd, $J=13.0, 3.1$ Hz, H-2)와 geminal coupling에 해당하는 δ 3.11 (1H, dd, $J=17.1, 13.0$ Hz, H-3 α) 및 δ 2.69 (1H, dd, $J=17.1, 3.1$ Hz, H-3 β) 신호가 관측된 것으로 미뤄보아 flavanone 골격을 가지는 것으로 판단되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 1개의 carbonyl carbon [δ 197.8 (C-4)]과 4개의 oxygenated aromatic carbon [δ 168.4 (C-7), 165.5 (C-5), 164.9 (C-9), 159.1 (C-4')] 신호가 나타났다. 화합물 9는 (2S)-naringenin으로 동정하였다[23].

화합물 10 - 흰색 분말 형태로 분리되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 화합물 8의 경우와 같이 δ 7.04 (2H, s, H-2, H-6)에서 singlet 신호가 관측되었으나, methoxyl group 신호가 δ 3.81 (3H, s, -COOCH₃)에서 추가적으로 확인되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 총 8개의 carbon이 검출되었다. 그 중 methyl carboxylic acid 신호가 δ 52.3 (-COOCH₃) 및 δ 169.1 (C-7)에서 나타남에 따라, 화합물 10은 methyl gallate로 동정하였다[24].

화합물 11 - 흰색 분말 형태로 분리되었다. ¹H-NMR 스펙트럼은 전체적으로 화합물 7과 유사한 패턴을 보였으나, δ 8.05 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-2'', H-6''), 7.61 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-4''), 및 δ 7.49 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3'', H-5'') 신호로 미뤄 화합물 11은 1개의 benzoyl group이 존재하는 것을 알 수 있었다. 또한 δ 5.42 (1H, s, H-9)의 acetal proton, δ 4.54 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1')에서의 anomeric proton 및 δ 1.37 (3H, s, H-10)에서의 tertiary methyl group도 확인됨에 따라 화합물 7과 같이 sugar moiety를 포함하는 pinene type monoterpene 골격

을 가지는 것으로 판단하였다. 한편, ¹³C-NMR 스펙트럼에서 δ 100.2 (C-1')에서 anomeric carbon이 관측되었지만 δ 168.0 (C-7'')에서 1개의 carbonyl carbon 신호만 관측됨에 따라, 화합물 7과 달리 glucose의 C-6' 위치에 더 이상 O-benzoyl group이 연결되어 있지 않은 것으로 판단, 화합물 11은 paeoniflorin으로 동정하였다[20].

화합물 12 - 흰색 분말 형태로 분리되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 4.26 (1H, t, $J=5.5$ Hz, H-4) 신호가 나타남에 따라, 화합물 11에 존재하던 hemiketal 구조가 사라진 것으로 예상하였다. 또한 화합물 6과 달리 화합물 12에서는 1개의 benzoyl group만 관측되었다 [δ 8.07 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-2'', H-6''), 7.60 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-4''), 7.48 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3'', H-5'')]. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 총 23개의 carbon이 검출되었다. 그 중 ester carbon에 해당하는 δ 178.2 (C-9)와 δ 168.1 (C-7'')을 미뤄보아, 화합물 11에서 hemiketal 구조가 사라지고 pinene 구조에 benzoyl group이 연결된 부분구조가 그대로 유지된 것으로 예상하였다. 따라서 문헌치를 참고하여 화합물 12는 albiflorin으로 동정하였다[20].

화합물 13 - 흰색의 무정형 고체로 분리되었다. ¹H-NMR 스펙트럼을 통해 화합물 11과 동일한 기본골격을 가지는 것으로 판단되었으나, δ 7.08 (2H, s, H-2'', H-6'')에서 galloyl group 유래 신호가 추가로 관측되었다. 따라서 화합물 13은 문헌치와 비교하여 6'-O-galloylpaeoniflorin으로 동정하였다[18].

분리한 화합물의 A549 세포사멸 유도 효과

화합물 1-13을 10, 50 및 100 μ M로 처리하여 A549 세포사멸 유도 효과를 평가하였다. 그 결과, 처리 최고농도인 100 μ M에서 gallic acid (8) > naringenin (9) > methyl gallate (10) > 6'-O-benzoylpaeoniflorin (7) > palmitic acid (3) 순으로 강한 세포독성을 가지는 것으로 확인되었다. 각 세포생존율은 100 μ M에서 대조군(control, 100.0 \pm 8.1%) 대비 59.0 \pm 5.2% (8), 65.1 \pm 3.7% (9), 67.6 \pm 2.0% (10), 70.7 \pm 2.8% (7) 및 74.2 \pm 4.9% (3)인 것으로 나타났다. 양성대조군인 2 μ M DOX를 처리한 구간의 세포생존율은 10.6 \pm 0.6%였다(Fig. 2 and Table 1).

가장 높은 세포독성을 보인 페놀성 화합물 8은 이전의 Kwon 등[22]의 연구에서 A549 세포생장 50% 억제 농도(50% inhibitory concentration, IC₅₀)가 13.2 μ M이었으며, Orabi 등[25]의 연구에서는 8 및 10의 A549에 대한 IC₅₀가 각각 10.5 \pm 0.7 μ M과 20.7 \pm 1.9 μ M로 8의 세포독성이 더 강한 것으로 나타났는데 이러한 경향은 이번 결과와도 일치한다. Flavanone 계통의 9의 경우, 이번 결과와 대조적으로 Zhang 등[26]과 Lee 등[27]의 연구에 의해 100 μ M 수준까지 A549에 대한 세포독성이 나타나지 않는 것으로 보고된 바 있으며, fatty acid인 3은 A549에 대한 IC₅₀가 150 μ M인 것으로 확인된 바 있다[28]. Monoterpene glycoside에 속하는 7은 아직 A549에 대한 세포사멸 유도 효과에 대한 보고가 없으며, 이번 연구를 통해 처음으로 보고되는 것이다. 추가적으로 A549와 normal cell인 MRC-5에 대한 7의 세포독성 비교를 위해 농도구간별로 처리하였을 때, 최고 농도인 300 μ M까지 MRC-5에서의 세포독성은

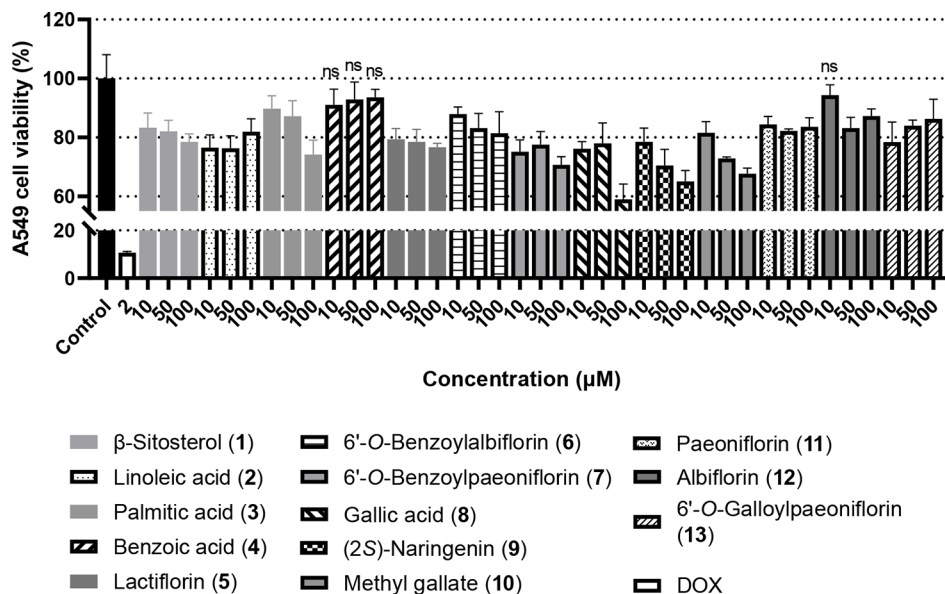


Fig. 2 Changes in the A549 cell viability by treatment of compounds 1-13 for 48 h. The data were expressed as mean ± standard deviation (SD) compared to the control (100.0±8.1%). Statistical difference ($p < 0.05$) was determined by ordinary one-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparison’s test using GraphPad Prism 9 software. All the values are statistically different from the control, except for those indicated as non-significant (ns). DOX (2 μM) was used as a positive control (10.6±0.6%)

Table 1 The summary of cytotoxic effects of 1-13 at 100 μM on A549

Compound	A549 cell viability (%)
β-Sitosterol (1)	78.5±2.8
Linoleic acid (2)	81.9±4.4
Palmitic acid (3)	74.2±4.9
Benzoic acid (4)	93.6±2.7
Lactiflorin (5)	76.6±1.3
6'-O-Benzoylalbiflorin (6)	81.4±7.3
6'-O-Benzoylpaeoniflorin (7)	70.7±2.8
Gallic acid (8)	59.0±5.2
(2S)-Naringenin (9)	65.1±3.7
Methyl gallate (10)	67.6±2.0
Paeoniflorin (11)	83.6±3.1
Albiflorin (12)	87.3±2.4
6'-O-Galloylpaeoniflorin (13)	86.3±6.7

Control, 100.0±8.1%; 2 μM DOX, 10.6±0.6%

관찰되지 않았다(Fig. 3A). 한편, 양성대조군인 DOX는 A549 및 MRC-5 모두에서 유의적인 세포생존을 감소를 보였으며, absolute IC₅₀ 값은 각각 A549에서 412.1 nM ($r^2 = 0.9168$), MRC-5에서 516.4 nM ($r^2 = 0.9794$)인 것으로 확인되었다(Fig. 3B).

화합물 구조와 A549 세포독성을 고려해 봤을 때, 각 100 μM 수준에서 세포독성은 6'-O-galloylpaeoniflorin (13) < paeoniflorin (11) < 7 순으로 나타나 paeoniflorin 기본구조에서 C-6' 위치가 benzoyl group으로 치환되어 있는 것이 세포독성이 가장 강한 것으로 판단되었다. 이러한 경향은 albiflorin (12) 보다 6'-O-benzoylalbiflorin (6) 처리구간의 A549 세포생존율이 더 낮게

관찰된 것에서도 추측할 수 있었다. 다만, 보다 확실한 결론을 도출하기 위해서는 더 많은 유사화합물에 대한 구조-활성 상관 관계가 조사되어야 할 것이다.

이번 연구를 통해 새롭게 밝혀진 PR 유래 세포독성 화합물 7에 대한 그 외 생리활성 관련 보고로서, 사람 유래 흑색종 세포주인 SK-MEL-28에 10 μg/mL의 농도로 처리되었지만 세포독성을 나타내지 못하는 것으로 확인된 적이 있다[21]. 한편, Kim 등[29]의 연구에서 7은 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 사람 제대 정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 및 사람 단핵구 세포주(human monocytic cell line, THP-1)의 염증반응을 억제할 수 있을 뿐 아니라, mouse 패혈증(sepsis) 모델에서 효과적으로 사망률을 감소시켜 줄 수 있는 것으로 나타났다. Zhu 등[30]에 의한 *in vitro* 수준의 실험에서, 염증반응에 중요하게 작용하는 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2) 활성이 7에 의해 효과적으로 억제되었으며 IC₅₀ 값은 12.6 μM인 것으로 확인되었다. 하지만 COX-1에 대한 IC₅₀ 값도 13.2 μM로 나타나 7의 COX-1 또는 -2 효소활성 저해에 대한 선택성은 없는 것으로 판단되었다. 또한 rat 유래 초대배양 대뇌 피질세포(cortical cells)에서 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 사멸을 7이 유의적으로 억제시키는 것으로 나타났다[31]. 이렇듯 7은 PR 유래 대표 구성성분 중 하나로서 항염증[29,30] 및 뇌세포보호[31] 등의 생리활성이 확인되고 있으며, 앞으로도 추가적인 생리활성 검증에 적용될 가치가 크다고 판단된다. 다만, 이번 연구에서 평가한 7의 세포독성은 NSCLC 세포주인 A549와 섬유아세포주인 MRC-5의 세포생존을 변화만으로 판단한 것인 만큼 향후 A549 또는 NSCLC 세포독성 메커니즘, SCLC에 대한 효능 및 폐암세포에 대한 선택성 등에 관한 추가연구가 필요하다고 판단된다.

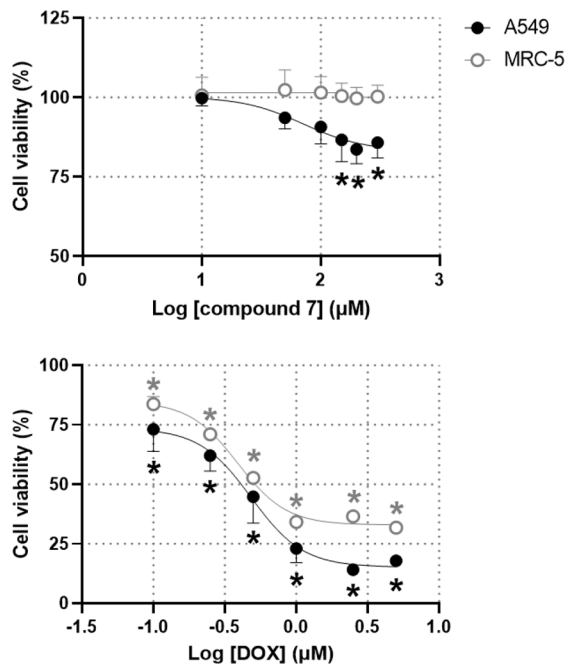


Fig. 3 Comparison of the cytotoxicities induced by 7 on A549 and MRC-5. A) Cytotoxicities of 7. B) Cytotoxicities of DOX, a positive control. The absolute IC_{50} values of DOX were 412.1 nM ($r^2 = 0.9168$) for A549, and 516.4 nM ($r^2 = 0.9794$) for MRC-5, respectively. The data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) compared to each control. Statistical difference ($p < 0.001$) was determined by ordinary one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison's test using GraphPad Prism 9 software

초 록

작약 뿌리는 monoterpene glycoside계 물질을 함유하고 있으며, 이들 화합물은 항경련, 항염증, 항바이러스, 신경보호 및 진정 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이번 연구에서는 작약 뿌리의 dichloromethane (CH_2Cl_2) 및 ethyl acetate (EtOAc) 가용성 분획으로부터 세포독성 물질을 탐색하고자 하였다. 그 결과, 총 13종의 화합물을 분리할 수 있었으며, 이들의 세포독성 평가를 위해 사람 유래 폐암 선암 세포주인 A549에 처리하여 세포생존을 변화를 관찰하였다. A549에 대한 세포독성은 gallic acid (8) > (2S)-naringenin (9) > methyl gallate (10) > 6'-O-benzoylpaconiflorin (7) > palmitic acid (3) 순으로 나타났다. 특히, 7은 normal cell인 MRC-5에 대한 독성은 없는 것으로 확인되었으며, 7의 A549 및 MRC-5 세포생존율에 미치는 영향에 대한 보고는 이번이 처음이다. 향후 7에 대한 세포독성 메커니즘 및 선택성과 관련된 추가연구가 필요할 것으로 판단된다.

Keywords 사람 유래 폐포 선암 세포주 · 세포독성 · 작약 뿌리 · 6'-O-Benzoylpaconiflorin

감사의 글 이 논문은 2022학년도 경북대학교 연구년 교수 연구비에 의하여 작성되었음. 중앙대학교에서 실시한 활성평가 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ014208)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Causes of Death Statistics in 2021. Statistics Korea (2022) <https://www.korea.kr/news/policyBriefingView.do?newsId=156527816> Accessed 27 Sep 2022
- Schabath MB, Cote ML (2019) Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 28: 1563–1579. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran Jr WJ, Wu Y-L, Paz-Ares L (2017) Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet* 389: 299–311. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8
- Jones GS, Baldwin DR (2018) Recent advances in the management of lung cancer. *Clin Med* 18: s41. doi: 10.7861/clinmedicine.18-2s-s41
- Li Z, Feiyue Z, Gaofeng L (2021) Traditional Chinese medicine and lung cancer—From theory to practice. *Biomed Pharmacother* 137: 111381. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111381
- Kim SJ, Park JH, Choi SY, Son KH, Kim KU (2007) Isolated and identification of biological activity compounds from leaves and stem of *Paeonia lactiflora* Pallas. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 6–11
- Won JB, Ma JY, Lee JH, Ma CJ (2009) Simultaneous quantification of three marker compounds in Samultang by HPLC/DAD. *Korean J Pharmacogn* 40: 298–302
- Tan YQ, Chen HW, Li J, Wu QJ (2020) Efficacy, chemical constituents, and pharmacological actions of *Radix Paeoniae Rubra* and *Radix Paeoniae Alba*. *Front Pharmacol* 11: 1054. doi: 10.3389/fphar.2020.01054
- The Korean Pharmacopoeia (2022) Ministry of Food and Drug Safety (KFDA), Cheongju
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman S (2008) Molecular origins of cancer: Lung cancer. *N Engl J Med* 359: 1367–1380. doi: 10.1056/NEJMra0802714
- Zhou P, Hu J, Wang X, Wang J, Zhang Y, Wang C (2018) Epidermal growth factor receptor expression affects proliferation and apoptosis in non-small cell lung cancer cells via the extracellular signal-regulated kinase/microRNA 200a signaling pathway. *Oncol Lett* 15: 5201–5207. doi: 10.3892/ol.2018.7961
- Rho JK, Choi YJ, Lee JK, Ryoo B-Y, Yang SH, Kim CH, Lee JC (2009) Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer* 63: 219–226. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.05.017
- Tong N, Zhang J, Chen Y, Li Z, Luo Y, Zuo H, Zhao X (2012) Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of doxorubicin in vitro. *Oncol Lett* 3: 1263–1267. doi: 10.3892/ol.2012.644
- Park YH, Lim SH, Ham HJ, Kim HY, Jeong HN, Kim KH, Kim SM (2010) Isolation of anti-inflammatory active substance β -sitosterol from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) stem. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 980–985
- Paliyan AS, Sivasothy Y, Awang K, Rizman-Idid M, Alias SA (2014) Marine derived fungi of peninsular Malaysia—A biochemical perspective. *Chiang Mai J Sci* 41: 894–909
- Abdullah BM, Zubairi SI, Huri HZ, Hairunisa N, Yousif E, Basu RC (2016) Polyesters based on linoleic acid for biolubricant basestocks: Low-temperature, Tribological and Rheological properties. *Plos One* 11: e0151603. doi: 10.1371/journal.pone.0151603
- Thapi DB, Ramaite ID, Anokwuru CP (2021) Metabolomic profiling and antioxidant activities of *Breonadia salicina* using 1H-NMR and UPLC-QTOF-MS analysis. *Molecules* 26: 6707. doi: 10.3390/molecules26216707
- Samy MN, Mahmoud BK, Shady NH, Abdelmohsen UR, Ross SA (2022) Bioassay-guided fractionation with antimalarial and antimicrobial activities of *Paeonia officinalis*. *Molecules* 27: 8382. doi: 10.3390/molecules27238382

19. Yean MH, Lee JY, Kim JS, Kang SS (2008) Phytochemical studies on *Paeoniae Radix* (1); Monoterpene glucosides. *Korean J Pharmacogn* 39: 19–27
20. Yen PH, Van Kiem P, Nhiem NX, Tung NH, Quang TH, Van Minh C, Kim JW, Choi EM, Kim YH (2007) A new monoterpene glycoside from the roots of *Paeonia lactiflora* increases the differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Arch Pharm Res* 30: 1179–1185. doi: 10.1007/BF02980258
21. Chu BY, Jin WY, Choi SL, Myung PK, Seong YH, Song KS, Bae KH (2004) A Cytotoxic Compound from Moutan Cortex Radicis. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 255–261
22. Kwon OK, Kim CS, Suh WS, Park KJ, Cha JM, Choi SU, Kwon HC, Lee KR (2016) Phenolic compounds from the twigs of *Corylopsis coreana* Uyeki and their cytotoxic activity. *Korean J Pharmacogn* 47: 1–6
23. Kim JG, Le TPL, Hong HR, Han JS, Ko JH, Lee SH, Lee MK, Hwang BY (2019) Nitric oxide inhibitory constituents from the fruits of *Amomum tsao-ko*. *Nat Prod Sci* 25: 76–80
24. Oh JY, Choi U, Kim YS, Shin DH (2003) Isolation and identification of antioxidative components from bark of *Rhus javanica* Linne. *Korean J Food Sci Technol* 35: 726–732
25. Orabi MA, Zidan SA, Attia GH, Alyami HS, Matsunami K, Hatano T (2021) Ellagitannins and simple phenolics from the halophytic plant *Tamarix nilotica*. *Nat Prod Res* 36: 177–185. doi: 10.1080/14786419.2020.1774757
26. Zhang FY, Du GJ, Zhang L, Zhang CL, Lu WL, Liang W (2009) Naringenin enhances the anti-tumor effect of doxorubicin through selectively inhibiting the activity of multidrug resistance-associated proteins but not P-glycoprotein. *Pharm Res* 26: 914–925. doi: 10.1007/s11095-008-9793-y
27. Lee ER, Kang YJ, Choi HY, Kang GH, Kim JH, Kim BW, Han YS, Nah SY, Paik HD, Park YS (2007) Induction of apoptotic cell death by synthetic naringenin derivatives in human lung epithelial carcinoma A549 cells. *Biol Pharm Bull* 30: 2394–2398. doi: 10.1248/bpb.30.2394
28. Sandeep K, Won Bong L, Ji Sun K, Sang Woo K, Hui Z, Kum Hue B, Min Sung C, Hee Kyun O, Ok Su K, Hong Ran C (2012) C16 Saturated fatty acid induced autophagy in A549 cells through topoisomerase I inhibition. *Food Nutr Sci* 2012: doi: 10.4236/fns.2012.39160
29. Kim C, Sim H, Bae JS (2022) Benzoylpaeoniflorin activates anti-inflammatory mechanisms to mitigate sepsis in cell-culture and mouse sepsis models. *Int J Mol Sci* 23: 13130. doi: 10.3390/ijms232113130
30. Zhu X, Fang ZH (2014) New monoterpene glycosides from the root cortex of *Paeonia suffruticosa* and their potential anti-inflammatory activity. *Nat Prod Res* 28: 301–305. doi: 10.1080/14786419.2013.858340
31. Kim SH, Lee MK, Lee KY, Sung SH, Kim J, Kim YC (2009) Chemical constituents isolated from *Paeonia lactiflora* roots and their neuroprotective activity against oxidative stress in vitro. *J Enzym Inhib Med Chem* 24: 1138–1140. doi: 10.1080/14756360802667977