

L1210 세포에 대한 제라닐화 후라본의 세포독성

백 경 업 · 안 병 준

충남대학교 약학대학

(Received March 9, 1988)

Cytotoxic Activities of some Geranylated Flavones against L1210 Cell

Kyeong-Up Baik and Byung-Zun Ahn

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 302-764, Korea

Abstract—Geranylation of some synthetic and natural flavones have yielded cytotoxic products against L1210 cell; 5, 2'-dihydroxy-6, 7, 8-trimethoxy-6'-geranyloxyflavone 4 (8.5 µg/ml), 5, 6-dihydroxy-7-gerenyloxyflavone 9 (2.3 µg/ml). 2 has showed the same range of cytotoxicity as the starting material, 5, 2'-dihydroxy-6, 7, 8-trimethoxy-6'-benzyloxyflavone (17.0 µg/ml). The cytotoxicity of 4 was lower than its starting substance, 5, 2', 6'-trihydroxy-6, 7, 8-trimethoxyflavone (4.5 µg/ml). On geranylating 5, 6, 7-trihydroxyflavone (baicalein, 15.0 µg/ml) the cytotoxic activity has been strongly potentiated (2.3 µg/ml of 9). The presence of at least a free hydroxy group in B-ring of Skullcapflavone II-type flavones. was essential for a high activity. A larger RD-group than methoxy in the B-ring has weakened the activity. The cytotoxicities of baicalein series could not be correlated to their structures.

한약재 및 민간약을 소재로하여 세포독성물질을 분리하는 일련의 실험을 행하던 중 황금 (*Scutellaria baicalensis*)의 에테르 엑기스가 L1210세포에 대하여 좋은 세포 독성을 나타냄을 발견하고 그 작용물질을 분리, 구조를 동정하였던 바, 5, 2'-dihydroxy-6, 7, 8, 6'-tetramethoxyflavone (Skullcapflavone II, 6)임이 밝혀졌다. 동시에 분리된 baicalein 8도 약한 세포독성을 보인하고 언급한 바 있다.¹⁾

한편 지실 (*Poncirus trifoliata*의 미숙과)의 에테르 엑기스도 같은 세포에 대하여 독성을 나타내었는데 이는 7-geranyloxy coumarin (aurapten)에 기인함을 알게되었다. 이 물질을 가수 분해한 후 geraniol과 7-hydroxy coumarin을 얻어 세포독성 검사를 행하였던 바 geraniol만이 미약한 독성을 보였다.²⁾

Geraniol 및 geranyl기가 부착된 구조가 항암성을 나타낸다는 사실은 이미 보고된 바 있다. Baranger 등³⁾은 geraniol을 항종양제와 병용하던 실험암의 치료효율을 높인다고 하였다. 또한 Amonkar 등⁴⁾은 anthrone체의 geranyl ether가

P388세포에 대하여 세포독성을 나타낸다고 보고하였다.

위에서 볼 수 있는 바와 같이 geranyl기와 flavone류가 동시에 세포독성을 나타내고 있으므로 이들 물질끼리 소위 twin화합물을 제조하고 이 물질의 세포독성효과가 개개 물질의 그것에 비하여 어느정도 향상되는지를 시험해보는 일은 흥미있을 것으로 생각된다.

이와 같은 기대아래 몇가지 twin화합물을 제조, 그들의 구조와 L1210세포에 대한 독성과의 관계를 관찰하여 몇가지 소견을 얻었으므로 그 결과를 여기에 보고한다.

실험 및 방법

시약 및 기기—시약은 일급 및 특급을 사용하였다. Baicalein, wogonin 등 천연 flavone은 유등이 기술한 방법⁵⁾으로 황금으로부터 분리하였다.

생물실험—L1210세포의 유지 배양 및 이에 대한 작용물질의 ED₅₀ 값의 측정에는 이 등의 방법⁶⁾

에 의거하였다.

물질의 합성—5, 2'-dihydroxy-6, 7, 8-trimethoxy-6'-benzyloxyflavone 1, 5, 2', 6'-trihydroxy-6, 7, 8-trimethoxyflavone 3, 5, 2'-dihydroxy-6, 7, 8, 6'-tetramethoxyflavone 6은 유등의 방법¹⁰⁾으로 합성하였다.

페놀기의 geranyl화를 위하여는 Coates등⁷⁾이 행한 marmin의 합성법을 응용하였다. 여기에서는 baicalein의 geranyl화를 그 실시예로 든다.

5, 6-dihydroxy-7-geranyloxyflavone 9 (7-Geranylbaicalein)의 합성—geranylbromide 80mg을 dimethylformamide 1ml에 용해시킨다. Baicalein 200mg을 dimethylformamide 1.5ml에 용해시킨 후 여기에다 sodium hydride 10mg을 가한다. 여기에 위의 geranylbromide용액을 적가한 다음 6시간 교반한다. 반응을 끝낸후 물을 가하고 에테르로 추출하여 반응혼합물을 얻고 이를 silica gel column상에서 benzene: acetone=9:1로 분리하여 9, 140mg를 얻었다. PMR(CDCl₃) ppm: 5.40부터 1.50까지(geranyloxy기의 전형적인 흡수), 6.50(s, H-3), 7.75(q, H-2', H-6'), 7.40(q, H-3', H-5', H-4'), 12.30(s, hydroxyproton at C-5).

위의 방법에 따라 합성한 geranylflavone들의 PMR 데이터를 아래에 나타내었다.

5-Hydroxy-7-geranyl-8-methoxyflavone 12(7-geranylwogonin). PMR(CDCl₃) ppm: 5.50-1.65(geranyloxy기), 6.32(s, H-3), 3.90(s, methoxy at C-8), 6.61(H-6), 7.8(q, H-2', H-6'), 7.50(q, H-3', H-5', H-4'), 12.45(s, dihydroxyproton at C-5).

5, 2'-Dihydroxy-6, 7, 8-trimethoxy-6'-geranyloxyflavone 4. PMR(CDCl₃) ppm: 5.54-1.55(geranyloxy기), 6.37(s, H-3), 3.80-4.00(3x methoxy), 6.58-6.47(3x H of B-ring), 13.25(Hydroxy at C-5).

5-Hydroxy-6, 7, 8-trimethoxy-2'-benzyloxy-6'-geranyloxyflavone 2. PMR(CDCl₃) ppm: 5.25-1.51(geranyloxy기), 6.22(s, H-3), 3.67-3.87(3x methoxy), 5.0(s, 2x benzyl protons), 6.45-7.15(8x aromatic H), 12.50(s, hydroxy

at C-5).

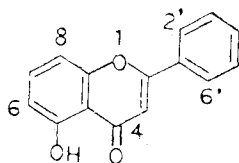
결과 및 고찰

후라본의 geranyl화는 Coates⁷⁾이 coumarin monoterpene을 geranyl화할 때 사용하였던 조건을 응용하였다. Geranylflavone들의 구조는 반응 전후의 핵자기분광 데이터를 비교함으로써 쉽게 확인 할 수 있었다. 물질 4의 NMR에는 5, 2', 6'-trihydroxy-6, 7, 8-trimethoxyflavone의 피이크들과 더불어 geranyl기의 피이크도 같이 나타나 있다. Geraniol의 NMR상에서는 1번 메틸렌기가 4.15ppm에서 나타나지만 4의 스펙트럼상에서는 4.50ppm인 저자장 쪽으로 이동하여 나타나게 되는데 이는 geraniol이 페놀기와 에테르결합을 했음을 뜻한다. 여기서 취한 조건에서는 분자내 수소교결합을 하고 있는 5번 탄소상의 OH는 반응하지 않으므로 에테르화는 B환에 이루어 졌음을 알 수 있다. 이 사실은 13.25ppm에 5번 탄소의 OH가 그대로 남아 있는 것으로 보아서도 확신할 수 있다.

Baicalein 8을 geranyl화하는 경우 6 또는 7번 탄소의 OH중 어느것이 geranyl화가 되었는지를 확인하기란 매우 어렵다. 다만 세개의 OH중 7번 위치의 것이 가장 큰 산도를 갖고 있기 때문에⁸⁾ 우선적으로 geranyl화되었다고 생각하고 있다. 기타 geranyl화 후라본의 구조는 이 두 물질의 구조결정결과를 응용하면 쉽게 해석할 수 있다.

강등²⁾은 auraptin구조중 세포독성을 나타내는 부분구조를 알아내기 위하여 이를 가수분해하여 7-hydroxycoumarin과 geraniol을 얻었다. 이들 중 geraniol만이 세포독성(ED₅₀=6.5μg/ml)을 보인다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 행한 여러차례의 세포독성 측정결과 geraniol은 20μg/ml 보다 높은 ED₅₀ 값을 보이고 있었다. 그러므로 세포독성물질의 구조중에 결합되어 있는 geranyl기가 세포독성을 나타내는 주 요인이 될 수 없다. 한편 세포독성을 보이는 auraptin 및 6-geranyloxy-3-methyl-1, 8-dihydroxyanthrone을 가수분해하여 geranyl기를 제거하고 얻은 7-

Table 1—ED₅₀ values of some synthesized flavones on L1210 cell.



Flavone No.	C-6	C-7	C-8	C-2	C-6	ED ₅₀ (μg/ml)
1	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OBz	17.0
2	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OGe	OBz	14.0
3	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	4.5
4	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OGe	8.5
5	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OGe	OGe	>20
6	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	2.5
7	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	>20
8	OH	OH	H	H	H	15.0
9	OH	OGe	H	H	H	2.3
10	OGe	OGe	H	H	H	>20
11	H	OH	OCH ₃	H	H	15.0
12	H	OGe	OCH ₃	H	H	>20

Me=methyl, Bz=benzyl, Ge=geranyl

hydroxycoumarin 및 6-hydroxy-3-methyl-1, 8-dihydroxyanthrone은 세포독성을 보이지 않고 있다. 그러므로 이들 aglycon과 geranyl기가 이루는 구조전체가 세포독성발현을 위한 기본구조임을 알 수 있다.

출발물질 및 geranylflavone들의 L1210세포에 대한 ED₅₀ 값을 Table 1에 표시하였다. 여기에 주어진 결과를 보면 B환에 OH기가 있는 skullkapflavone II 6형의 물질인 3을 geranyl화하면 세포독성이 대폭 감소되는 반면 A환에만 수산기를 갖고 있는 8을 geranyl화하여 9를 만들면 그 작용이 6~7배 강화되고 있다. 1의 세포독성은 geranyl화에 의해서 크게 변하지 않고 있다. 물질 1 및 4와 표준물질인 6의 공통된 점은 5, 2'-dihydroxy기를 갖고 있다는 것이다. 그럼에도 이들은 6에 비하여 훨씬 낮은 세포독성을 갖고 있다. 저자들은 후라본의 C-환과 B-환사이의 각도가 L1210세포로부터 분리한 세포막 ATPase의 작용과 상호관계가 있다고 보고한 바있다.⁹⁾ 이 결과에 따르면 B-환의 C-2'와 C-6'에 methoxy

와 hydroxy기가 치환되었을 때 ATPase의 활성을 가장 심하게 저지하고 이들 기보다 큰기들을 갖는 flavone들은 이보다 약한 저지 작용을 보였다. 즉 2'-methoxy 및 6'-hydroxy기의 경우가 ATPase 활성저지를 위하여 가장 적합한구조였다. 말하자면 이 구조의 B-환과 C-환사이에 이루어진 각도가 효소저지작용을 위하여 가장 적정한 각도라고 생각하였다. 이 효소저지작용과 세포독성간에는 비례적 관계가 성립되었으므로 ATPase의 저지작용이 세포독성작용의 기전이라고 밝혔다.

B-환에 geranyl화된 flavone의 세포독성작용은 모두가 geranyl화되기 이전의 flavone들에 비하여 낮은 값을 보이고 있다. 이와 같은 현상도 위에 언급한 B-환/C-환 간의 각도와 관계를 지워 설명할 수 있다. 즉 B-환에 geranyl기를 도입하면 B-환/C-환 간의 각도가 적정치를 벗어남으로써 L1210 세포내상의 ATPase의 활성에 대한 저지정도가 감소하기 때문에 세포독성도 감소한다고 풀이할 수 있다.

B-환에 치환기가 없는 8, 9 및 11의 세포독성작용은 이와는 다른 기전으로 설명되지 않으면 안될 것이다. 말하자면 지용성의 증가로 약물운반을 용이하게 할 뿐더러, 또 한편으로는 산도가 강한 7번 탄소의 수산기를 가진 세포독성 물질 8 및 11은 그 수산기가 geranyl화 됨으로써 세포내의 파괴로부터 보호될 것이라는 가정이 가능할 것이다.

또한 물질 1, 3, 4 및 6은 좋은 세포독성을 나타내나 2, 5 및 7은 낮은 세포독성을 보이고 있다. 물질 1, 3, 4 및 6은 B-환에 적어도 하나의 OH를 갖고 있는 반면 2, 5 및 7의 경우에는 모두 치환되어 있음을 볼 수 있다. 이 사실로부터 얻을 수 있는 결론은 Skullkapflavone II 6형의 Flavone이 세포독성을 보이기 위하여는 그 B환의 C-2'와 C-6'에 적어도 하나의 hydroxy기가 있어야 한다고 주장할 수 있다. 이는 이들 구조의 A환이 과산화(peroxygenation)되는 것이 세포독성발현의 조건의 하나라는 주장¹⁰⁾과 더불어 이들 물질군의 세포독성과 구조의 관계를 설명하는 데에 유용한 자료를 제공할 것이다.

문 헌

- 1) Ryu, S.H., Ahn, B.Z. and Pack, M.Y.: The cytotoxic principle of *Scutellaria Radix* against L1210 cell, *Planta Med.*, 355 (1985).
- 2) Kang, K.S., Ryu, S.H. and Ahn, B.Z.: Antineoplastic Natural Products and the Analogues VI, *Archives of Pharm. Res.*, 8, 187(1985).
- 3) Baranger, P.: Antineoplastic and antiviral geraniol-containing homeopathic medicaments, *Fr. Demande* 2, 036, 924(1969).
- 4) Amonkar, A., Chang, C.J. and Cassady, J.M.: 6-Geranyloxy-3-methyl-1, 8-dihydroxyanthrone, a novel antileukemic agent from *Psorospermum febrifugum* var. *ferruginum*, *Experimentia*, 37, 1138(1981).
- 5) 유성호 : "Skullcapflavone II를 주로 한 후라본류의 항암작용" 1985년도 한국과학기술원 박사학위 논문 p. 19.
- 6) 이정형, 강석균, 안병준 : 한약재 및 민간약의 L1210 세포에 대한 세포독성 생약학회지 17, 286 (1986).
- 7) Coates, R.M. and Melvin, L.S.: Total synthesis of dl-marmin and related coumarin monoterpenes, *Tetrahedron*, 26, 5699 (1970).
- 8) Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M. B.: The systematic identification of flavonoids, pp.48-49, Springer Verlag, Heidelberg-Berlin-New York(1970).
- 9) Ryu, S.H. and Ahn, B.Z.: Beziehung zwischen dem UV-Absorptionsmuster einiger Flavone und ihrer gegen L1210-Zellen cytotoxischen Aktivitat, *Arch. Pharm. Res.* 10, 260(1987).
- 10) Ryu, S.H., Yoo, B.T., Ahn, B.Z. and Pack, M. Y.: Synthese einiger gegen L1210-Zellen cytotoxischen Flavone, *Arch. d. Pharm. (Weinheim)* 318, 659(1985).