

*Umbilicaria esculenta*가 생산하는 Depside계 화합물의 구조 및 Phospholipase A₂ 저해활성

김진우 · 송경식¹ · 장현욱² · 유승헌³ · 유익동*

한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹경북대학교 농화학과,
²영남대학교 약학대학, ³충남대학교 농생물학과

A Phospholipase A₂ Inhibitor Isolated from *Umbilicaria esculenta*

Jin-Woo Kim, Kyung-Sik Song¹, Hyeun Wook Chang²,
Seung-Hun Yu³ and Ick-Dong Yoo*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea

¹Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

²College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

³Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

Abstract — Phospholipase A₂ (PLA₂) is lipolytic enzyme that has known to be involved in inflammation. In the course of our screening for antiinflammatory compounds from natural products, a compound having PLA₂ inhibitory activities was isolated from the methanol extract of *Umbilicaria esculenta*. The compound was identified as lecanoric acid based on various NMR studies including DEPT, HETERO-COSY and HMBC experiments. Lecanoric acid inhibited human rheumatoid synovial PLA₂ activity with IC₅₀ of 0.17 mM and also exhibited antitumor activity (ED₅₀=2.7 µg/ml) against skin tumor cell line (LOX-IMVI).

Phospholipase A₂(PLA₂; Phosphatide 2-acylhydro-lase, EC 3.1.1.4)는 세포막의 주요성분인 인지질의 sn-2 위치의 acyl ester 결합을 가수분해하는 효소이다(1). 특히 포유동물의 PLA₂는 아미노산의 배열특성에 따라 12~18 kDa의 sPLA₂(secretory PLA₂)와 80~110 kDa의 cPLA₂(cytosolic PLA₂)로 분류되며 다시 sPLA₂는 효소단백질내의 disulfide 결합의 차이에 따라 타입 I과 타입 II로 분류한다. 이중 타입 I PLA₂는 포유동물의 체장이나 혈액 등에 많이 존재하며 주로 소화와 관련한 분해효소로서 작용한다. 그러나 타입 II PLA₂는 혈소판, 호중구와 같은 세포들에 분포하며, 류마티스성 관절염을 앓고 있는 환자의 synovial fluid에서도 가용성 형태로 발견되어 염증과 관련된 질병에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(2,3).

세포막 인지질로부터 PLA₂에 의해 생성된 arachidonic acid는 염증, 천식, 혈전증 등을 일으키는 eicosanoids 생성에 관여하는 중요한 물질이다. Arachidonic acid는 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase의 작용으로 arachidonic acid cascade를 거쳐 prostaglan-

dins, leukotrienes, thromboxanes과 같은 eicosanoids를 생성한다. 이러한 물질들은 호흡기관의 평활근 수축작용, 혈관수축성 항진작용, 말초기도 수축작용 및 천식, 염증 등과 깊이 관련되어 있음이 보고되었다(4). 따라서 PLA₂는 arachidonic acid cascade의 율속효소로서 각종 염증관련 질병유발에 중요한 역할을 하는 것으로 추측되어지고 있다(4).

이상과 같은 연구 결과를 기초로 하여 PLA₂ 저해 물질에 대한 연구가 진행되어져 미생물 대사산물로부터 leteosporin(5), folipastatin(6), thielocin A1 β(7), 해양생물로부터 manoalide(8), 식물체로부터 ochnavlavone(9), aristolochic acid(10) 등이 분리 보고되었다. 본 연구는 항염증 치료제의 개발을 목표로 천연물로부터 PLA₂ 저해물질을 탐색하던 중 지의류의 일종인 석이(*Umbilicaria esculenta*)로부터 PLA₂ 저해물질을 분리, 동정하고, 생물활성을 조사하였기에 보고한다.

재료 및 방법

실험 재료

실험 재료는 1993년 8월 강원도 오대산 해발 700 m 이상의 암반지대에서 수집하고 Yoshimura의 방법(11)

Key words: *Umbilicaria esculenta*, Phospholipase A₂ (PLA₂), Lecanoric acid

*Corresponding author

에 의하여 석이(石耳; *Umbilicaria esculenta*)로 동정하였다. 수집한 석이를 세절, 건조한 후(건조중량 100 g) 분리·정제실험에 사용하였다.

분석 기기

UV 스펙트럼은 메탄올을 용매로 Shimazu UV-260 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며, IR 스펙트럼은 Fourier-Transform Infrared(FT-IR) spectrophotometer(Laser precision analect RFX-65s)를 사용하여 KBr법으로 측정하였다. 융점 측정은 MEL-TEMP II(Laboratory device)를 이용하여 측정하였다. NMR spectrum은 Varian UNITY 300(300 MHz)을 이용하여 측정하였으며, 용매로는 DMSO-*d*₆, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane을 이용하였다.

Phospholipase A₂ 저해활성 조사

효소는 류마티스성 관절염 환자의 관절액에서 추출 정제한 타입 II Phospholipase A₂를 사용하였고 기질은 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-L-3-phosphatidylethanolamine(Amershame Co.)을 사용하였다. 저해 활성 측정방법은 다음과 같다. 1M Tris-HCl 완충용액 20 μl, 60 mM CaCl₂ 20 μl, 20 nmole의 기질, 20 ng의 PLA₂를 함유한 전체용적 200 μl의 반응용액을 37°C 항온수조에서 진탕하면서 20분 동안 반응시킨 후 생성된 유리지방산을 Dole의 방법(12)으로 추출하였다. 즉 반응액에 Dole's 용액을 넣어 반응을 정지시킨 다음, n-헵탄과 증류수를 가하여 혼합한 후 원심분리하여 n-헵탄층을 분리하였다. 여기에 100 mg의 silica gel을 넣어 미반응 기질을 흡착시킨 후 n-헵탄층을 취하고 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)로 유리된 [¹⁴C] 지방산의 양을 측정하였다. 저해활성은 기질만 처리한 대조구에 대하여 백분률로 나타내었다.

세포독성 조사

세포독성은 Monks 등의 SRB검정법(13)에 의하여 측정하였다. 즉 공시 암세포주를 일정 농도로 희석한 후 96 well microplate에 well당 0.2 ml씩 분주하였다. 시료를 각 농도별로 DMSO에 용해시켜 첨가한 후 2, 6, 24, 48, 72, 96시간 간격으로 현미경하에서 세포에 유발되는 급성세포독성을 관찰하였다. 96시간 배양한 세포를 Trichloroacetic acid를 이용하여 고정시킨 다음 SRB용액을 첨가하여 세포를 염색하고 염색된 배양 용기를 1% 초산으로 세척하여 비결합한 SRB를 제거하였다. 배양용기를 건조시키고 Tris-HCl 완충용액을 가하여 세포와 결합한 SRB를 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

활성물질의 분리·정제

풍건한 100 g의 시료를 세절하여 80% 메탄올 1l에 침적하고 초음파처리하면서 6시간 추출, 여과하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 메탄올 추출물을 감압 농축하여 메탄올을 제거한 후, 물을 가하고 pH를 9.0으로 조절한 후 에틸아세테이트로 추출하였다. 용매층을 Na₂SO₄로 탈수한 후 감압농축하여 1.7 g의 조활성 분획을 얻었다. 활성분획은 클로로포름, 메탄올을 용매로하여 silica gel column chromatography(φ 3.5×50 cm)를 실시하였으며, 다시 농축후 Sephadex LH-20 column chromatography(φ 1.9×40 cm)를 행하여 백색분말의 순수한 화합물 15.2 mg을 얻어 G1 화합물이라 명명하였다(Fig. 1).

G1 화합물의 물리화학적 특성

G1 화합물의 융점은 175~178°C이었으며, 메탄올을 용매로 하여 UV 스펙트럼을 조사한 결과 300(logε=4.68), 269(logε=4.27), 211(logε=4.02) nm에서 흡수극대피크를 나타내었다. IR 스펙트럼에 있어서 3400, 1735 및 1600 cm⁻¹에서 각각 hydroxyl group, ester group 및 C=C stretching에 유래하는 밴드가 관찰되었다(14). TLC 상에서 다양한 발색시약에 대한 반응성을 조사한 결과 vanillin, I₂ vapor, sulfuric acid, phosphomolybdic acid 및 ferric chloride 등에는 양성이었으나, ninhydrin, Dragendorff's reagent, Rhodamine B, 4-dimethylaminocinnamaldehyde에는 음성으로 나타났으며 이 결과로부터 본 화합물은 phe-

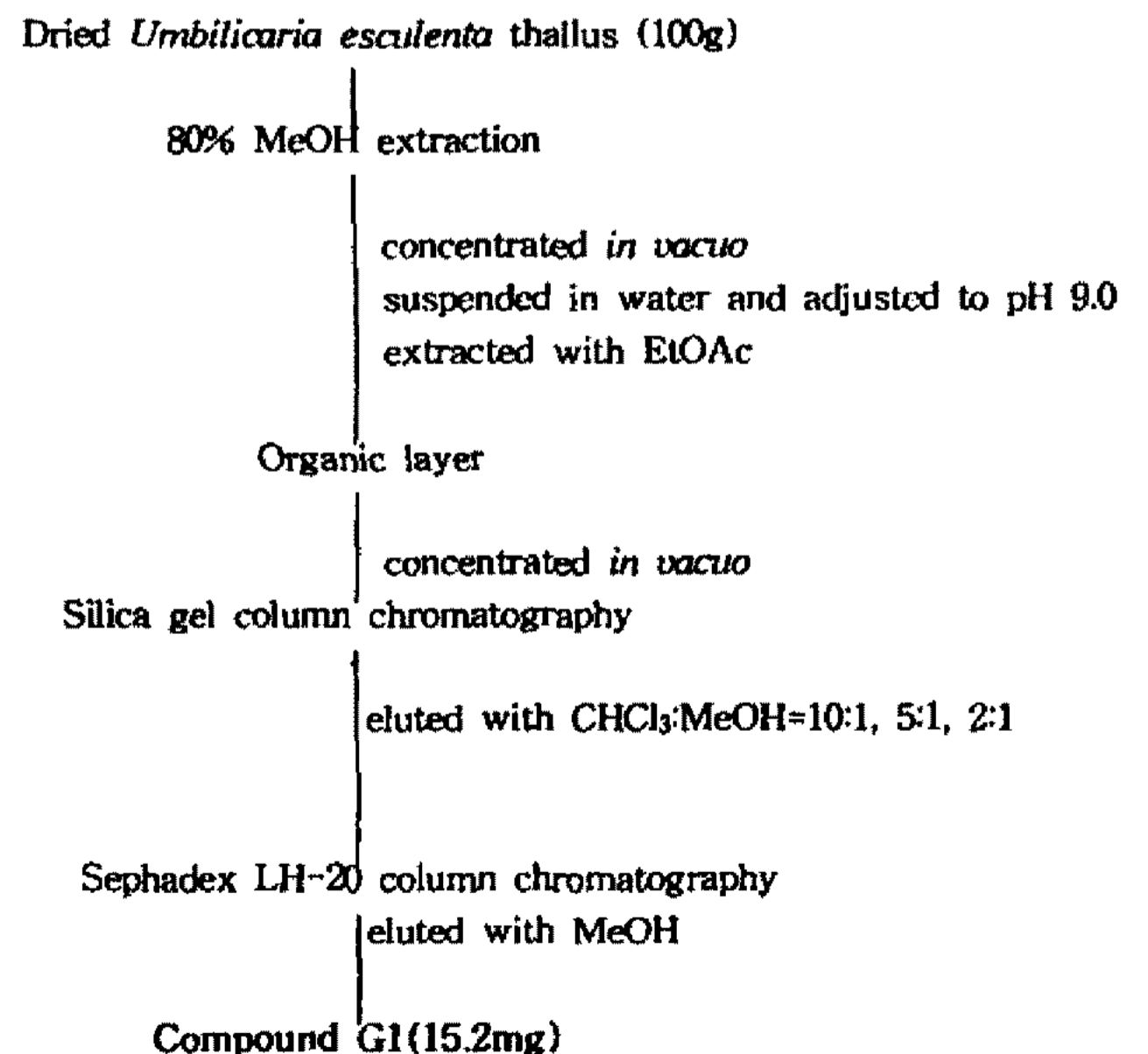


Fig. 1. Purification procedure of compound G1.

Table 1. Physico-chemical properties of compound G1

Appearance	white powder
Molecular weight	318
Molecular formula	C ₁₆ H ₁₄ O ₇
Melting point	175~178°C
UV λ _{max} ^{MeOH} nm(logε)	300(4.68), 269(4.27), 211(4.02)
IR ν _{max} ^{KBr} cm ⁻¹	3400, 2930, 1735, 1670, 1660, 1600, 1290, 1140, 840
Solubility	
soluble	MeOH, EtOH, DMSO, Me ₂ CO
slightly soluble	EtOAc, H ₂ O, BuOH
insoluble	CHCl ₃ , Benzene, Hexane
TLC ^a R _f	
CHCl ₃ -MeOH(2:1)	0.41
Benzen-EtOAc- MeOH(1:1:1)	0.63
EtOAc-Me ₂ CO(1:2)	0.70
TLC color reactions	
positive	Vanillin, I ₂ vapor, Sulfuric acid Phosphomolybdic acid Ferric chloride
negative	Ninhydrin, Rhodamine B 4-Dimethylaminocin- namaldehyde Dragendorff's reagent

^aSilica gel TLC plate 60 F₂₅₄ (Merck).

nol 구조를 함유하고 있음을 추측할 수 있었다(15). G1 화합물은 메탄올, 에탄올, 아세톤, DMSO 등의 용매에는 잘 용해되나 클로로포름, 벤젠, 헥산에는 불용이었다(Table 1).

G1 화합물의 구조분석

구조분석을 위하여 G1 화합물 11 mg을 DMSO-*d*₆ 0.6 ml에 용해시킨 후 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HETERO-COSY, HMBC 등의 기기분석을 실시하였다. 그 결과 ¹H-NMR에서는 2.36, 2.55 ppm에서 methyl proton으로 보이는 2개의 signal, 6.23, 6.35, 6.41 ppm에서 이중결합성 혹은 방향족 methine proton으로 보이는 signal들을 포함하여 8개의 signal들이 관측되었다. 그중 10.07 ppm은 carboxylic acid에서, 10.43 ppm은 수소결합한 -OH에서 유래되는 signal들로 추측되었다(Table 2).

¹³C-NMR 스펙트럼을 측정된 결과 총 16개의 sig-

Table 2. ¹³C and ¹H NMR spectral data of compound G1 in DMSO-*d*₆ (300 MHz)

Position	δ _C		δ _H
1	108.02	C	
1-COO	167.40	C	
2	161.08	C	
2-OH			10.43
3	100.41	CH	6.23
4	160.37	C	
4-OH			7.20
5	109.90	CH	6.23
6	140.34	C	
6-CH ₃	21.48	CH ₃	2.36
1'	151.60	C	
2'	107.24	CH	6.41(d, 1.8) ^a
3'	164.32	C	
3'-OH			10.43
4'	115.69	C	
4'-COOH	172.48	C	10.07
5'	142.02	C	
5'-CH ₃	22.74	CH ₃	2.55
6'	113.24	CH	6.35(d, 1.8)

^aProton signal multiplicity and coupling constants (*J* = Hz) in parentheses.

nal들이 관측되었으며, 각 signal에 대한 귀속을 Table 2에 나타냈다. 그 중 21.48과 22.74 ppm은 methyl 탄소로, 100.41에서 164.32 ppm까지의 12개의 signal은 방향족 탄소로, 그리고 167.40과 172.48 ppm은 ester group의 carbonyl 탄소로 추정되었다. DEPT spectrum의 분석결과 21.48과 22.74 ppm은 methyl 탄소로, 100.41, 107.24, 109.90 및 113.24 ppm은 방향족 환에서 유래한 methine 탄소로 동정되었으며 나머지는 모두 4급탄소로 나타났다.

물리화학적 특성 및 이상의 결과들을 토대로 현재까지 보고되어 있는 지의성분들과 비교, 검토한 결과 본 화합물은 depside나 depsidone계 화합물일 가능성이 높은 것으로 판단되어졌다. 특히 Nicollier 등 (16, 17)이 보고한 lecanoric acid의 NMR data와 큰 차이가 없었으므로 분리한 화합물 G1이 lecanoric acid이거나 lecanoric acid 유도체일 가능성이 큰 것으로 판단되었다. 따라서 정확한 활성물질의 구조동정을 위하여 HETERO-COSY 및 HMBC 실험을 실시하였다. HETERO-COSY를 측정된 결과 2.36 및 2.55 ppm의 methyl proton은 각각 21.48과 22.74 ppm의 methyl 탄소와 연결되었으며, 6.23 ppm(2H)의 peak는 100.41과 109.90 ppm의 탄소와 연결을 보여 두개의 방향족 proton이 중첩되었음을 확인하였다. 또한 6.35

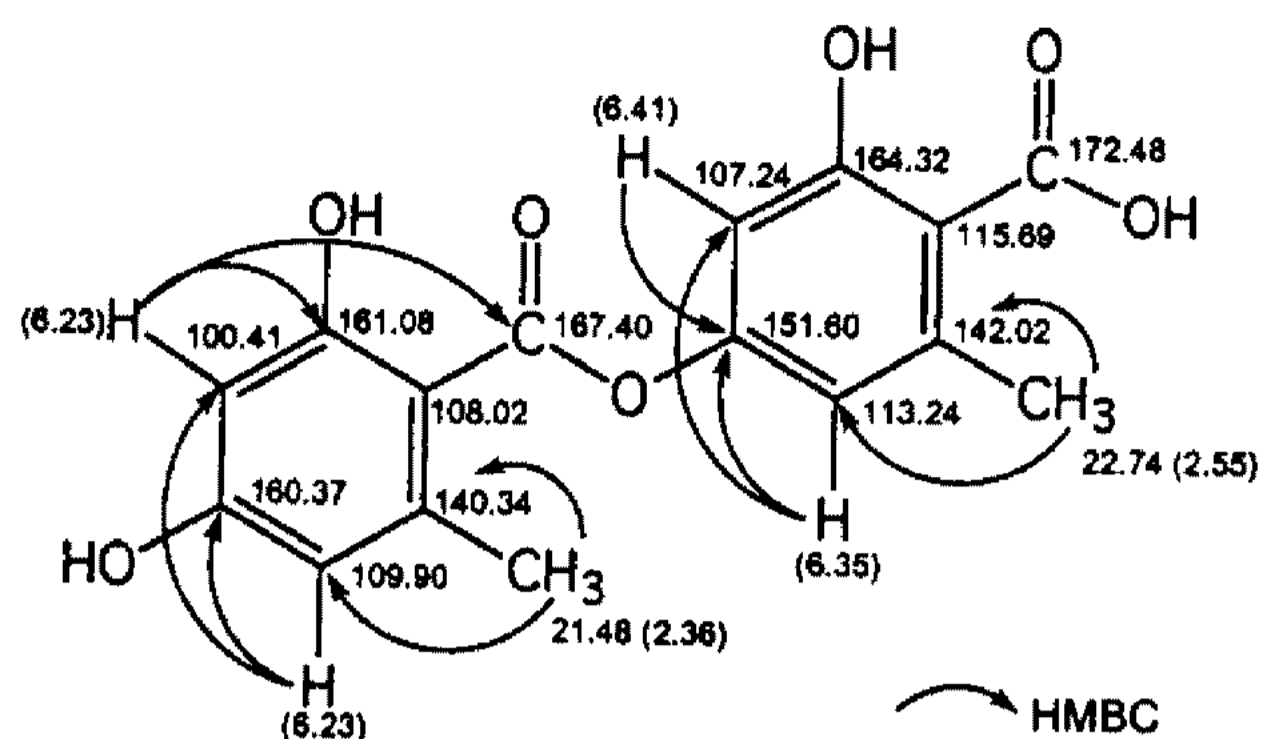


Fig. 2. ^1H - ^{13}C long range correlations of compound G1 observed by HMBC experiments.

와 6.41 ppm은 각각 113.24와 107.24 ppm의 방향족 탄소에 귀속되었다.

Proton과 탄소간의 원거리스핀결합을 알아보기 위하여 HMBC(heteronuclear multiple bond correlation)실험을 실시하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 2.36 ppm의 methyl proton은 109.90 ppm의 methine 탄소 및 140.34 ppm의 sp^2 4급탄소에, 또 다른 2.55 ppm의 methyl proton은 113.24 및 142.02 ppm의 탄소에 원거리스핀결합을 나타냈다. 또한, 6.35 ppm의 methine proton은 107.24 ppm의 methine 탄소와 151.60 ppm의 4급탄소에, 6.41 ppm의 methine proton은 151.60 ppm의 탄소에 원거리스핀결합을 나타냈다. 또한 6.23 ppm의 methine proton으로부터 167.40 ppm의 carbonyl 탄소에 4 결합의 원거리스핀결합이 관찰되었다. 이들 proton으로부터 관찰된 탄소의 chemical shift치가 lecanoric acid에서 관찰된 탄소의 chemical shift치와 잘 일치함을 알 수 있었다.

이상의 물리화학적 특성 및 HMBC실험에 의하여 관찰된 proton-carbon 원거리스핀결합을 종합한 결과, G1 화합물은 depside계 화합물인 lecanoric acid와 동일한 화합물이었다.

G1 화합물의 PLA₂ 저해활성

*Umbilicaria esculenta*로부터 분리한 lecanoric acid를 류마티스성 관절염 환자의 관절액에서 분리한 타입 II PLA₂에 처리하여 저해활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Lecanoric acid의 PLA₂에 대한 IC₅₀ 값은 0.17 mM이었으며, 저해활성은 농도의존적으로 나타났다.

Lecanoric acid 및 그 유도체가 prostaglandin synthetase 및 arachidonic acid release 저해활성을 나타내는 것은 보고된 바 있다(18).

G1 화합물의 인체암 세포주에 대한 세포독성

Table 3. PLA₂ inhibition activity of compound G1

Compound G1 (μg/ml)	Inhibition rate (%)
0.5	8.1
1.0	10.8
5.0	13.2
10.0	17.0
50.0	48.8
100.0	62.6

IC₅₀ (mM) 0.17

Table 4. Cytotoxicity of compound G1 against various human tumor cells

Human tumor cells	ED ₅₀ (μg/ml)
Breast	
MCF-7	>25
MCF-7/ADR	>25
Renal	
ACHN	>25
UO-31	>25
Central nervous system	
SNB-75	>25
SNB-19	>25
Skin	
CRL1579	>25
LOX-IMVI	2.7
Leukemia	
MOLT-4F	17.0
Prostate	
PC-3	>25
Lung	
A549	>25
NCI-H522	>25
Colon	
HT-29	>25
KM12	>25

한편 Umezawa 등은 benzanilide 구조를 가지는 lecanoric acid 유도체들이 mouse skin tumor promoter인 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)의 종양형성작용을 억제한다고 보고한 바 있으므로 (18, 19) 본 실험에서 얻어진 lecanoric acid에서도 항암활성이 있을 것으로 예측하고 인체 암세포주에 대한 세포독성을 조사하였으며 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 총 14개의 암세포주 중 피부암 세포주인 LOX-IMVI와 백혈병 암세포주 MOLT-4F에 대하여 각각 2.7 μg/ml, 17.0 μg/ml의 ED₅₀ 값을 갖는 세포

독성을 나타내었으며, 특히 피부암 세포주인 LOX-IMVI에 강한 세포독성을 나타내었다.

요 약

Phospholipase A₂(PLA₂)는 생체막의 주요 구성성분인 인지질의 sn-2 위치에서 acyl ester 결합을 가수분해하는 효소로 염증과 관련된 질병에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 항염증 치료제의 개발을 목표로 PLA₂의 특이적 저해물질을 탐색하던 중 *Umbilicaria esculenta*(石耳)의 메탄올 추출물로부터 PLA₂ 저해활성을 갖는 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 ¹H, ¹³C-NMR, DEPT, HETERO-COSY, HMBC 등의 NMR 실험에 의하여 lecanoric acid로 동정되었다. 본 화합물의 PLA₂ 저해활성은 IC₅₀ 값이 0.17 mM이었다. 또한 14종의 인체 암세포주에 대한 항암활성을 조사한 결과 피부암 세포주인 LOX-IMVI에 대해서만 ED₅₀ 값이 2.7 µg/ml로 선택적인 세포독성을 나타냈다.

참고문헌

- Dennis, E.A. 1983. Phospholipases, Pp. 307-353. In P.D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, Vol. 16, Academic Press, New York.
- Tanaka, K., H. Arita, and K. Inoue. 1993. Phospholipase A₂ Inhibitors. *Prot. nucl. acid enzym.* **38**: 1988-1999.
- Vadas, P. and W. Pruzanski. 1986. Biology of disease-Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* **55**: 391-404.
- Mitsunashi, H., O. Tanaka, S. Nozoe, and M. Nagai. 1992. *Chemistry of organic natural products*, Pp. 51-65. 4th ed. Tokyo.
- Singh, P.D., J.H. Johnson, C.A. Aklonis, K. Bush, S.M. Fisher, and J. O'Sullivan. 1985. Two new inhibitors of phospholipase A₂ produced by *Penicillium chermesinum*. *J. Antibiot.* **38**: 706-712.
- Hamano, K., M. Kinoshita-Okami, A. Hemmi, A. Sato, M. Hisamoto, K. Matsuda, K. Yoda, H. Haruyama, T. Hosoya, and K. Tanzawa. 1992. Folipastatin, a new depsidone compound from *Aspergillus unguis* as an inhibitor of Phospholipase A₂. *J. Antibiot.* **45**: 1195-1201.
- Tanaka, K., S. Matsutani, K. Matsumoto, and T. Yoshida. 1992. A novel type of phospholipase A₂ inhibitor, thielocin A1β and mechanism of action. *J. Antibiot.* **45**: 1071-1078.
- Lombardo, D. and E.A. Dennis. 1985. Cobra venom phospholipase A₂ inhibition by manoalide, A novel type of phospholipase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **260**: 7234-7240.
- Chang, H.W., S.H. Baek, K.W. Chung, K.H. Son, H.P. Kim, and S.S. Kang. 1994. Inactivation of Phospholipase A₂ by naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 843-849.
- Vishwanath, B.S., A.A. Fawzy, and R.C. Franson. 1988. Edema-inducing activity of phospholipase A₂ purified from human synovial fluid and inhibitor by aristolochic acid. *Inflammation* **12**: 549-561.
- Yoshimura, Isao. 1987. *Lichen flora of Japan in color*. Pp. 116-123. 5th ed. Hoikusha publishing Co., Osaka.
- Dole, V.P. and H. Meinertz. 1960. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* **235**: 2595-2599.
- Monks, A., D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hoes, J. Langley, P. Ronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, and M. Boyd. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 757-766.
- Pretsch, E., W. Simon, J. Seibl, and T. Clerc. 1989. *Table of spectral data for structure determination of organic compounds*, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Krebs, K.G., D. Heusser, and H. Wimmer. 1973. Z. Spray reagents, Pp. 854-905. In E. Stahl (ed), *Thin-layer chromatography: a laboratory handbook*, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Nicollier, G., M. Rebetez, and R. Tabacchi. 1979. Identification and synthesis of new depsides isolated from oakmoss *Evernia prunastri* (L.) Ach. *Helvet. Chim. Acta.* **62**: 711-717.
- Hunneck, S. and P. Linscheid. 1968. NMR-Spektroskopie einiger deposite und deposite. *Z. Naturforsch. B.* **23**: 717-732.
- Umezawa, K., S. Muramatsu, M. Ishizuka, T. Sawa, T. Takeuchi, and T. Matsushima. 1983. Inhibition of histidine decarboxylase and tumour promoter-induced arachidonic acid release by lecanoric acid analogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **110**: 733-739.
- Umezawa, K., T. Matsushima, T. Sawa, T. Takeuchi, and I. Hirono. 1984. Inhibition of tumor promotion by a lecanoric acid analogue. *Experientia* **40**: 100-101.

(Received 20 July 1995)