

銀杏 種衣의 Phospholipase C γ 1 저해 활성 성분 (2)

이지숙, 조유선, 김진웅*, 이현선¹, 안종석¹

서울대학교 약학대학, 생명공학연구소¹

Phospholipase C γ 1 Inhibitory Principles from the Sarcotestas of *Ginkgo biloba* (2)

Ji Suk Lee, You Sun Cho, Jinwoong Kim*, Hyun Sun Lee¹ and Jong Seog Ahn¹

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; and ¹Korea Research Institutes Bioscience Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejon 305-600, Korea

Abstract – Using the bioassay-guided fractionation and isolation technique, two PLC γ 1 inhibitors were isolated from the sarcotestas of *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae). The structures of these compounds were identified as (3R)-(-)-8-hydroxy-3-(6'-pentadecenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**1**) and 3-heptadecen-2-one (**2**) by UV, IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and ¹H-¹³C COSY. Isolated compounds **1** and **2** have not been reported previously from the sarcotestas of *G. biloba* and Ginkgoaceae, respectively. In addition, these compounds showed significant PLC γ 1 inhibitory effects with the IC₅₀ of the 9.7 (**1**) and 25.6 μ M (**2**).

Key words – Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1); *Ginkgo biloba* sarcotestas; Ginkgoaceae; (3R)-(-)-8-hydroxy-3-(6'-pentadecenyl)-3,4-dihydroisocoumarin; 3-heptadecen-2-one.

Phosphatidylinositol specific phospholipase C (PLC)는 세포내 신호전달에 중요한 효소로 세포막에 존재하는 minor phospholipid인 phosphatidylinositol(PI, PIP, PIP₂)을 가수분해하여 inositol triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)를 형성시키고, 이들은 일련의 세포반응을 거쳐 세포증식을 촉진시킨다.¹⁻³⁾ PLC는 β 1, β 2, γ 1, γ 2, δ 1, δ 2의 여러 isozyme으로 나뉘어지고⁴⁾, 이중 epidermal growth factor(EGF), plateletderived growth factor (PDGF) 등의 세포성장인자에 의해 활성화되는 PLC γ 1은 암과 특히 관련이 깊은 것으로 보고되었다.¹⁾ 또한, 최근의 많은 보고들은 PLC γ 1의 저해제가 새로운 항암제 후보물질이 될 수 있음을 나타내고 있다.^{1,5,6)}

저자들은 현재 사용 중인 암치료제의 단점중 하나인 정상세포에 대한 독성의 한계를 개선한 새로운 항암제 후보물질을 개발하기 위해 PLC γ 1의 저해 활성 성분에 대한 연구를 수행해왔다.⁵⁻⁹⁾ 즉, 지모(*Ane-marrhena asphodeloides*)로부터 2종의 norlignan⁵⁾, 은

행종의 (*Ginkgo biloba* sarcotestas)로부터 10종의 long chain phenol⁶⁾, 권백 (*Selaginella tamariscina*)으로부터 biflavone⁷⁾, 및 조구둥 (*Uncaria rhynchophylla* hooks)으로부터 8종의 triterpene ester^{8,9)} 등 PI-PLC γ 1 저해 활성 성분을 분리 보고하였다. 지모에서 분리된 PLC γ 1 저해제인 *cis*-hinokiresinol은 혈액암 세포에서보다 폐암, 직장암, 유방암 등 PLC γ 1이 과발현되고 있는 인체암세포에서 더 강한 세포독성을 나타내었고⁵⁾, 은행 종의에서 분리된 PLC γ 1 저해제인 anacardic acids, cardanols 및 bilobols은 몇몇 PLC γ 1 과발현 인체암 세포에서 성장 저해 활성을 나타내었으며 특히 직장암세포에서는 정상적인 직장 세포에서보다 더 강한 저해 활성을 나타내었다.⁶⁾

본고에서는 유의성있는 PLC γ 1 저해 활성을 나타내는 은행 종의 (*G. biloba* sarcotestas)의 CHCl₃ 분획으로부터 전보에 보고⁶⁾한 long chain phenol계 성분인 anacardic acid 3종, cardanol 4종, bilobol 3종의 저해 활성 성분외에 추가로 분리한 2종의 PLC γ 1 저해 활성 성분을 보고하고자 한다.

*교신저자 : Fax 02-887-8509

재료 및 방법

실험재료 - 은행 種衣 (*Ginkgo biloba* sarcotestas)는 서울대학교 관악 캠퍼스에서 1996년 9월에 채집하여 사용하였다.

효소 - PLC γ 1은 bovine cerebellum에서 DE-52, matrix green gel affinity, phenyl 5-PW, MONO O column chromatography를 이용하여 정제 (95%이상 순수)된 것을 사용하였다.¹⁰⁾

시약 및 기기 - L-3-phosphatidylinositol (PI), HEPES, EGTA와 sodium deoxycholate (SDC)는 Sigma Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였고, [³H]-PI와 cocktail solution은 Amersham (Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

HPLC는 Hitachi L-6000 pump, Hitachi L-4000 UV detector 및 Hitachi D-2500 chromatointegrator (Japan)를 이용하였고, HPLC column은 Econosil silica 10U (250×7.8 mm)와 Phenomenex ultracarb 5 ODS 30 (250×10.0 mm)을 사용하였다. IR은 Perkin Elmer 1710 spectrometer (UK)를, Mass는 VG TRio-2 spectrometer를, NMR은 JEOL GSX 400 spectrometer (400 MHz)와 Varian VXR 300 spectrometer (300 MHz)를 이용하였다. 또한, 효소 활성 측정을 위한 radioactivity는 Wallac 1409 liquid scintillation counter(USA)를 이용하여 측정하였다.

In vitro PLC γ 1 저해 활성 측정 - Rhee 등의 방법¹⁰⁾에 의해 측정하였다. 50 mM HEPES/NaOH (pH 7.0), 3 mM CaCl₂, 1 mM EGTA를 함유한 효소용액, 10 nM cold PI와 0.02 μ Ci의 [³H-inositol] PI를 함유한 기질용액, HEPES/NaOH (pH 7.0)의 완충용액을 DMSO에 녹인 시료와 함께 37°C에서 10분간 반응시켰다. CHCl₃-MeOH-conc. HCl (50:50:0.3)를 넣은 반응종결용액 A와 1 N HCl, 5 mM EGTA를 넣은 반응종결용액 B를 넣어 반응을 정지시키고, 원심분리하여 두 층으로 나누고 상층인 수층을 취하여 생성된 [³H-inositol] IP₃의 radioactivity를 liquid scintillation counter로 측정하였다. 효소를 넣지 않은 것을 background로, 시료대신 DMSO만을 넣은 것을 대조군으로 하였고, positive control로는 이미 분리 보고된 amentoflavone¹¹⁾을 사용하였다. 시료용액은 DMSO에 녹여 5 mg/ml용액으로 만들고, 단계별로 희석하여 사용하였다. 각각을 triplicate으로 실험하였으며 IC₅₀은 최고농도 250 μ g/ml, 최저농도 3.09 μ g/ml로 하여 least square method를 이용해 결정하였다.

저해율(%) = 1 - [(시료 dpm-background dpm)/(대조군 dpm-background dpm)] × 100

추출 및 분리 - 은행 종의 4 kg을 CHCl₃로 1시간 초음파 추출 후 1일 방치하여 (3번 반복) 80 g의 엑스를 얻었다. CHCl₃ 엑스를 silica gel column chromatography(CHCl₃-MeOH=100:1→MeOH)를 실시하여 6개의 분획으로 나누고 각 분획에 대하여 저해활성을 측정된 결과 2번 분획이 95.2%로 가장 좋은 활성을 나타내었고, 이것을 다시 Sephadex H-20(*n*-hexane-CH₂Cl₂-MeOH=6:6:1→MeOH)를 실시하여 2개의 소분획으로 나누었다. 이중 1번 소분획에 대해 HPLC (254 nm, 2.0 ml/min, *n*-hexane-CHCl₃-*i*-PrOH=500:500:1)를 실시하여 화합물 1 (Rt=16 min)을 얻었고, 2번 소분획에 대해 RP-HPLC (254 nm, 2.0 ml/min, CH₃CN-MeOH=10:1)를 실시하여 화합물 2 (Rt=42 min)를 얻었다.

화합물 1 - 무색 액상 물질; [α]_D, -22.7° (c 1.0 in CHCl₃); UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ); 216 (4.06), 245 (3.79), 313 (3.59); IR ν_{max} (neat, cm⁻¹); 3040 (aromatic C-H), 2950 (aliphatic C-H), 1677 (C=O), 1620 (C=C), 1470, 1250; MS (EI, 70 eV) *m/z* (rel. int.), 372 (M⁺, 25), 354 (M⁺-H₂O, 20), 346(10), 328(5), 163(70), 67(100); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.88 (3H, t, *J*=7.0 Hz, H-15'), 1.25 (18H, br, methylene H), 1.70 (1H, m, H-1'_o), 1.84 (1H, m, H-1'_a), 2.02 (4H, q, *J*=6.5 Hz, allylic H), 2.90 (1H, d, *J*=5.3 Hz, H-4_{eq}), 2.91 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4_{ax}), 4.58 (1H, m, H-3), 5.35 (2H, m, olefinic H), 6.68 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-5), 6.88 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-7), 7.40 (1H, dd, *J*=7.0, 8.4 Hz, H-6), 11.03 (1H, s, -OH); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 14.10 (C-15'), 22.65 (C-14'), 24.81 (C-2'), 27.16 (allylic C), 27.22 (allylic C), 28.98 (methylene C), 29.16 (methylene C), 29.31 (methylene C), 29.35 (methylene C), 29.70 (methylene C), 29.72 (methylene C), 31.77 (C-13'), 32.94 (C-4), 34.79 (C-1'), 79.73 (C-3), 108.53 (C-9), 116.17 (C-7), 117.89 (C-5), 129.74 (olefinic C), 130.02 (olefinic C), 136.06 (C-6), 139.51 (C-10), 162.17 (C-8), 169.97 (C-1).

화합물 2 - 무색 액상 물질; UV λ_{max} (*n*-hexane) nm (log ϵ), 228 (3.89); IR ν_{max} (neat, cm⁻¹), 2926 (aliphatic C-H), 1680 (C=O), 1629 (C=C), 1467, 1253, 979; MS (EI, 70 eV) *m/z* (rel. int.), 252 (M⁺, 16), 237

(M^+-CH_3 , 10), 194(6), 125(10), 97(20), 55(100); 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.86 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-17), 1.24 (20H, br, methylene H), 1.42 (2H, quintet, $J=7.0$ Hz, H-6), 2.20 (2H, m, allylic H), 2.23 (3H, s, H-1), 6.04 (1H, dt, $J=15.9, 1.5$ Hz, olefinic H), 6.78 (1H, dt, $J=15.9, 7.0$ Hz, olefinic H); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.13 (C-17), 22.70 (C-16), 26.83 (C-1), 28.11 (C-6), 29.20 (methylene C), 29.36 (methylene C), 29.40 (methylene C), 29.53 (methylene C), 29.65 (methylene C), 31.93 (C-15), 32.49 (allylic C), 131.29 (olefinic C), 148.68 (olefinic C), 198.79 (C-2)

화합물 1의 acetylation - 화합물 1(6.1 mg)을 pyridine 100 μ l에 녹인 후 acetic anhydride 100 μ l를 넣어 하룻밤 방치시켰다. TLC로 반응완결을 확인한 후 $CHCl_3$ 와 H_2O 를 넣어 용매분획하였다. 하층을 취하여 *n*-heptane을 과량 가하고, 농축하여 acetate 체인 화합물 1a (6.2 mg)를 얻었다.

결과 및 고찰

은행 종의 $CHCl_3$ 엑스와 그 분획의 PLC γ 1 저해 활성 - 은행 종의 $CHCl_3$ 엑스에 대하여 PLC γ 1 저해 활성을 측정된 결과 89.8% (125 μ g/ml)로 유의성 있는 활성을 나타내었고, 이 엑스를 silica gel column chromatography하여 6개 분획으로 나누었다. 이 분획들의 PLC γ 1 저해 활성을 측정하여 각각의 활성을 3.5, 95.2, 88.0, 92.6, 91.9, 74.0%로 결정하였다.

화합물 1의 구조분석 - 화합물 1은 무색 액상 물질로서 1% $FeCl_3$ 에 양성 반응을 나타내었다. IR spectrum에서는 aromatic C-H (3040 cm^{-1}), aliphatic C-H(2950 cm^{-1}), carbonyl기 (1675 cm^{-1}), C=C (1620 cm^{-1})를 확인할 수 있었다. Mass spectrum에서는

m/z 372에서 분자이온 peak를, m/z 354에서 H_2O 가 탈락된 peak를, m/z 328에서 COOH가 탈락된 peak를 관찰할 수 있었고, long chain에 의해 m/z 값이 14씩 줄어드는 peak cluster를 관찰할 수 있었다. 1H -NMR spectrum을 보면, δ 6.68, 6.88, 7.40에서 J value가 각각 7.0, 8.4 Hz로 1, 2, 3 치환을 한 benzene ring을, δ 11.03에서 분자내 수소결합한 OH의 peak를, δ 0.88, 1.25, 2.02, 5.35의 peak에서 2중 결합이 존재하는 long chain을 확인하였다. 따라서 화합물 1은 long chain이 치환된 isocoumarin계열임을 추정하였고, 1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum을 통하여 확인할 수 있었다. 1H -NMR spectrum에서는 δ 4.58에서 산소에 인접한 H-3 peak, δ 1.70과 1.84에서 인접한 chiral center에 의해 갈라진 H-1' peak, δ 2.90, 2.91에서 chiral center에 의해 각각 doublet으로 갈라진 H-4_{ax}($J=5.3$ Hz), H-4_{eq}($J=9.5$ Hz)의 peak 등을 관찰할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서는 δ 27.16, 27.22의 peak로 long chain의 이중 결합이 *cis* configuration임을 확인할 수 있었고¹¹⁾, δ 79.73의 peak는 산소에 인접한 C-3에 의한 peak이며, 1H - ^{13}C COSY spectrum으로 δ 34.79의 C-1'과 δ 32.94의 C-4에 의한 peak를 확인하였다. 또한, 선풍도가 -22.7로 *R* form임을 알 수 있었으며, 이상의 모든 분광학적 data가 은행의 잎으로부터 보고된 바 있는 side chain이 46-15:1인 dihydroisocoumarin의 문헌치와 일치하여 화합물 1을 (3R)-(-)-8-hydroxy-3-(6'-pentadecenyl)-3,4-dihydroisocoumarin으로 동정하였다.¹²⁾ 이 화합물은 본 연구를 통하여 은행의 종에서 처음으로 분리되었다.

화합물 2의 구조 분석 - 화합물 2는 무색 액상 물질로 IR, MS, 1H -NMR, ^{13}C -NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 3-heptadecen-2-one으로 동정하였다.¹³⁾ 또한, 화합물 2는 은행나무과 (Ginkgoaceae)에서 처음 분리보고 되었다.

화합물 1과 2의 *in vitro* PLC γ 저해 활성 - 은행 종의 $CHCl_3$ 엑스에서 분리한 2종의 화합물에 대하여 *in vitro*상에서 PLC γ 1 저해 활성을 측정하였다. 화합물 1과 2는 IC_{50} 이 각각 9.7 및 25.6 μ M로 모두 유의성 있는 PLC γ 1 저해 활성을 나타내었고, 지금까지 보고된 저해제와 비슷한 정도의 활성을 나타내었다. 이 isocoumarin계열 및 long chain ketone 계열 화합물에 대한 PLC γ 1 저해활성은 본고에서 처음으로 보고한다. 화합물 1은 acetylation하였을 때(화합물 1a) IC_{50} 이 250 μ g/ml 이하로 활성이 현저히 감소하는 것으

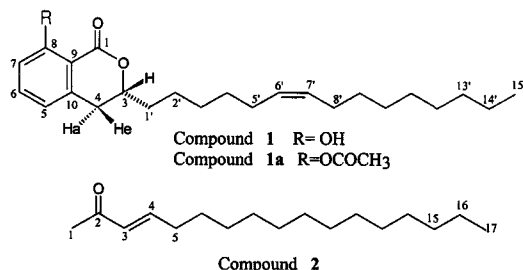


Fig. 1. The structure of compounds 1, 1a and 2 from the sarcotestas of *G. biloba*.

Table I. PLC γ 1 inhibitory activities of compounds **1**, **1a** and **2**

Compound	Inhibitory activity on PLC γ 1 (IC ₅₀ , μ M)
1	9.7 \pm 0.5
2	25.6 \pm 1.8
1a	> 250
Amentoflavone ^a	29.0 \pm 1.5

^a: positive control

로 (Table I) 화합물 **1**의 PLC γ 1에 대한 저해활성에서는 OH가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

결 론

은행 종의 CHCl₃ 엑스로부터 PLC γ 1 저해 활성 성분을 추적하여 화합물 **1**과 **2**를 분리하였고, 화합물 **1**은 (3R)-(-)-8-hydroxy-3-(6'-pentadecenyl)-3,4-dihydroisocoumarin으로, 화합물 **2**는 3-heptadecen-2-one으로 동정하였다. 화합물 **1**은 은행종에서 처음으로 분리하여 보고하며 화합물 **2**는 Ginkgoaceae에서 처음으로 분리하여 보고하는 성분이다. 또한, 이 isocoumarin계열 및 long chain ketone 화합물에 대한 PLC γ 1 저해활성은 처음으로 보고하는 것으로 앞으로 항암활성이나 기전연구를 통하여 새로운 항암제 후보 물질로의 가능성을 기대할 수 있다.

사 사

이 연구는 서울대학교 약학대학의 신의약품개발연구센터를 통하여 한국과학재단의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드린다.

인용문헌

- Hill, S. R., Rosanne, R., Powis, G., Abraham, R. T., Ashendel, C. L. and Zalkow, L. H. (1994) A multisample assay for inhibitors of phosphatidylinositol phospholipase C: identification of naturally occurring peptide inhibitors with antiproliferative activity. *Anticancer Drug Design* 9: 353-361.
- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- Berridge, M. J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325.
- Rhee, S. G. and Choi, K. D. (1992) Regulation of inositol phospholipid specific phospholipase C isozyme. *J. Biol. Chem.* 267: 12393-12396.
- Lee, J. S., Park, S.-Y., Kim, J. Y., Oh, W. K., Lee, H. S., Ahn, J. S. and Kim, J. (1996) Isolation of phospholipase C γ 1 inhibitors from *Ane-marrhena asphodeloides*. *Seoul Natl. Univ. J. Pharm. Sciences* 21: 30-42.
- Lee, J. S., Cho, Y. S., Park, E. J., Oh, W. K., Lee, H. S., Ahn, J. S. and Kim, J. (1998) Phospholipase C γ 1 inhibitory principles from the sacotestas of *Ginkgo biloba*. *J. Nat. Prod.* 61: 861-871.
- Lee, H. S., Oh, W. K., Kim, B. Y., Ahn, S. C., Kang, D. O., Shin, D. I., Kim, J., Mheen, T. I. and Ahn, J. S. (1996) Inhibition of phospholipase C γ 1 activity by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Med.* 62: 293-296.
- Lee, J. S. (1998) Phospholipase C γ 1 inhibitory constituents from the hooks of *Uncaria rhynchophylla* and their antitumor effects. Thesis of Ph. D. in Department of Pharmacy, Seoul National University.
- Lee, J. S., Yang, M. Y., Yeo, H., Lee, H. S., Ahn, J. S. and Kim, J. (1999) Uncarinic acids: phospholipase C γ 1 inhibitors from hooks of *Uncaria rhynchophylla*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 1429-1432.
- Rhee, S. G., Ryu, S. H., Lee, K. Y. and Cho, K. S. (1991) Assays of phosphoinositide-specific phospholipase C and purification of isozymes from bovine brain. *Methods in Enzymology* 197: 502-511.
- Rossi, R. (1982) Insect pheromone components-Use of ¹³C-NMR spectroscopy for assigning the configuration of C=C double bonds monomeric or dienic pheromone components and for quantitative determination of Z/E mixtures. *Tetrahedron* 38: 639-644.
- Braham, N. C., Asakawa, Y. and Lepoittevin, J. P. (1994) Isolation, structure determination and synthesis of new dihydroisocoumarin from *Ginkgo biloba* L. *Tetrahedron* 35: 3949-3952.
- Kazlauskas, R., Mulder, J., Murphy, P. T. and Wells, R. J. (1980) New metabolites from the brown alga *Caulocystis cephalorhthos*. *Aust. J. Chem.* 33: 2097-2101.

(1999년 6월 7일 접수)