

## Yakuchinone 과 그 유도체의 합성 및 Nitric Oxide 생성 저해효능

윤정화 · 안한나 · 류재하<sup>#</sup> · 김희두<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학

(Received December 18, 2000; Revised January 21, 2001)

### Synthesis of Yakuchinone Derivatives and Their Inhibitory Activities on Nitric Oxide Synthesis

Joung Wha Yoon, Hanna Ahn, Jae-Ha Ryu<sup>#</sup> and Hee-Doo Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — Novel yakuchinone derivatives have been designed, synthesized and evaluated their inhibitory activity of NO production in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. From this study, some enone compounds have been found to be highly active in the assay. In view of the importance of NO in septic shock and inflammation, these compounds may be useful candidates for the development of new drug to treat endotoxemia and inflammation accompanying overproduction of NO.

**Keywords** □ Nitric oxide, enone, inhibitor, yakuchinone

Nitric oxide(NO)는 무기 저분자 라디칼로서 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등에서의 역할이 알려지고 있다. 그런데 NO를 생성하는 효소(NOS: nitric oxide synthase)는 정상적인 생리적 기능을 위한 NO생성을 담당하는 constitutive NOS(c-NOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS(i-NOS)의 두 가지로 크게 분류된다.<sup>1,2)</sup> i-NOS는 Ca<sup>2+</sup>의존성이 없으며, 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. 이와 같은 i-NOS는 외부상처에 대한 반응 및 염증같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokines인 interleukin 1 이나 tumor necrosis factor, 염증원인 내독소(lipopolysaccharide: LPS) 등에 의해 유도되고 glucocorticoids에 의해 그 효소의 유도가 저해되는 것으로 알려져있다.<sup>3,4)</sup>

특히 i-NOS에 의해 생성된 과도한 NO는 생체에 다양한 유해작용을 나타낸다. 즉, 폐혈증 환자에게서

의 혈관확장으로 인한 과도한 혈압강하, cyclooxygenase의 활성화로<sup>5,6)</sup> prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성의 촉진으로 인한 염증의 심화, Alzheimer병을 위시한 다양한 뇌질환의 심화 등이<sup>7,8)</sup> 과도한 NO의 생성과 관련한 대표적인 병리학적인 현상이다.

따라서 i-NOS에 의한 NO의 생성을 억제하는 물질을 확보하고 이를 의약품으로 개발하려는 노력이 다양하게 진행되고 있다. 현재까지 알려진 NOS 저해제로는 NOS의 기질인 L-arginine의 구조유사체로서,<sup>9)</sup> N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine(L-NMMA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), aminoguanidine,<sup>10,11)</sup> 등이 있다. 그리고 각종 염증치료제 및 항암제가 i-NOS 저해제로 보고되고 있으며,<sup>12-14)</sup> 천연물에서 유래한 i-NOS 저해제로는 cepharanthine같은 bisbenzylisoquinoline alkaloids,<sup>15)</sup> nicotinamide,<sup>16)</sup> benzoquinone,<sup>17)</sup> sesquiterpene lactone,<sup>18)</sup> polyacetylene류,<sup>19,20)</sup> lignan 등이<sup>21)</sup> 있으며, 이들 대부분은 i-NOS의 mRNA 합성을 저해함으로써 그 활성을 나타낸다.

이들 중 생강과(Zingiberaceae) 식물과 녹차 등으

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-710-9567 (팩스) 02-703-0736

로부터 vanilloid류와 diarylheptanoid류에 속하는 페놀성 화합물들이 i-NOS의 유도를 억제하며<sup>22)</sup> 소염작용과 암예방 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다. 대표적인 화합물로서 *Curcuma longa*에서 분리된 curcumin은 활성화된 대식세포에서 i-NOS효소의 발현을 억제하고,<sup>23)</sup> NO의 합성을 억제함으로써 대장암 발생을 저해하는 것으로<sup>24)</sup> 보고 되었으며, yakuchinone A와 B는 약용식물 *Alpinia oxyphylla*에서 분리된 케톤기를 가진 diarylheptanoid로서 암예방효과가 있는 것으로 확인되었다.<sup>25)</sup> 녹차에 분리된 epigallocatechin gallate 역시 활성화된 대식세포에서 핵전사인자인 NF- $\kappa$ B의 i-NOS promotor에의 결합을 방해함으로써 i-NOS발현을 억제하며,<sup>26,27)</sup> 발현된 i-NOS의 효소활성도 동시에 억제함이 확인되었다.<sup>26)</sup>

이에 본 논문에서는 yakuchinone을 기본골격으로 하여 그 유도체를 합성하고 이들의 LPS로 활성화된 대식세포에서 NO 합성저해활성을 평가하였다. 우수한 활성을 가진 분자는 NO의 합성저해를 통한 소염, 항암, 폐혈중의 예방 및 치료의 목적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 실험재료 및 방법

### 시약 및 기기

4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde(1) 및 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-2-one(7)은 Aldrich사의 제품으로 순도 98% 이상인 것을 사용하였다. THF(tetrahydrofuran)는 질소 기류하에서 benzophenone sodium ketyl로부터 증류하여 사용하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectra는 Bruker-300 및 Bruker AMX 500 spectrometer를 이용하여 tetramethylsilane을 내부표준물질로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는  $\delta$  unit로, coupling constant는 Hz단위로 나타내었다. IR spectra는 Jasco FT/IR-430로 측정하였으며, frequency는  $\text{cm}^{-1}$ 로 표시하였다. Mass spectra는 JMS AX505WA를 사용하여 EI 및 CI mode로 측정하였다. Thin layer chromatography는 Kiesel gel 60F254(Merck)를, column chromatography는 silicagel (Kieselgel 60, 230~400 mesh, Merck)을 사용하였다. 융점은 Buchi melting point B-545를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)은 Gibco Laboratories(De-

troit, MD)에서, LPS(*Escherichia coli*, 0127:B8), bovine serum albumin, sodium nitrite, N-(1-naphthyl)ethylenediamine, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) and L-arginine은 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였다. ELISA 판독기는 Dynatech사의 MR5000 모델을 사용하였다.

### 합성

**3-[4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-methoxyphenyl] propenal (2)** – 질소가스로 치환된 가지달린 플라스크에 cinnamaldehyde 1(1.71 g, 9.6 mmol)을 THF 15 ml에 희석하여 cannular를 통해 가하고 NaH(60% dispersion in mineral oil, 1.15 g, 28.7 mmol)을 가한 후 30분 동안 교반한다. 0°C로 한 후 *t*-butyldimethylsilyl chloride를 THF 5 ml에 녹여 서서히 추가하고 7시간 교반 한 후 TLC로 반응 완결을 확인하고 포화 NH<sub>4</sub>Cl 용액을 가하여 반응을 종결한다. EtOAc(100 ml)로 추출하여 포화 NH<sub>4</sub>Cl 용액(15 ml), H<sub>2</sub>O(15 ml×3), brine(15 ml)으로 세척하고 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조한 다음 감압 농축하여 얻어진 잔사를 칼람크로마토그래피(*n*-Hexane : EtOAc=20 : 1, SiO<sub>2</sub>)하여 2.78 g(99.3%)의 미색결정을 얻었다 : R<sub>f</sub>=0.72 (*n*-Hexane : EtOAc=2 : 1, SiO<sub>2</sub>); IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3430, 3007, 2857, 2748, 1674, 1621, 1596, 1511, 1465, 1288, 1128; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.22 (1H, d, *J*=15.8), 6.89 (2H, dd, *J*=8.2, 2.3), 6.70 (1H, d, *J*=7.9), 6.42 (1H, dd, *J*=15.8, 7.8), 3.67 (3H, s), 0.82 (9H, s), 0.00 (6H, s).

**1-[4-*tert*-Butyldimethylsilyloxy]-3-methoxyphenyl]-7-phenylhept-1-en-3-ol (3)** – 아르곤 가스로 치환된 가지 달린 플라스크에 magnesium turning (63.2 mg, 2.6 mmol)을 넣고 감압 하에서 가열 교반한다(150°C~200°C, 약2시간). THF 1 ml을 넣고 1,2-dibromoethane을 1방울 떨어뜨리고 교반한다. 1-Bromo-4-phenylbutane을 THF에 희석하여 서서히 가한다. 이 때 THF 1.3 ml을 사용하여 1.0M solution을 만든다. 10분 정도 가온 후, 반응이 격렬하게 일어나기 시작하면 상온에서 반응 완결 후 -78°C로 cooling한 다음, 2(203.4 mg, 0.7 mmol)를 THF에 희석하여 서서히 가한 다음 30분간 교반 후 서서히 상온으로 한다. TLC로 반응완결을 확인하고 sat. NH<sub>4</sub>Cl로 반응을 종결하고 반응혼합물을 EtOAc로 희

석하여 H<sub>2</sub>O, brine으로 세척하여 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조한 후 감압농축하여 칼람크로마토그래피(*n*-Hexane : EtOAc=15 : 1)하여 260.3 mg(85.0%)의 미색 액상물질을 얻었다 : R<sub>f</sub> = 0.20 (*n*-Hexane : EtOAc = 6 : 1); IR (neat) 3392, 3027, 2930, 2857, 1600, 1512, 1280; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.15~7.00(m, 5H), 6.75 (d, 1H, *J*=1.9), 6.70 (dd, 1H, *J*=1.9, 8.1), 6.34 (d, 1H, *J*=8.1), 6.34 (d, 1H, *J*=15.8), 5.93 (dd, 1H, *J*=15.8, 7.0), 4.15~4.05 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.49 (t, 2H, *J*=7.7), 1.58~1.10 (m, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.02 (s, 6H).

**1-[4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-3-methoxyphenyl]-7-phenylhept-1-en-3-one (4)** - Allyl alcohol 3(R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, 110.0 mg, 0.25 mmol)을 *n*-pentane에 희석한 후 격렬히 교반하며 manganese dioxide(MnO<sub>2</sub>, 217.4 mg, 2.5 mmol)을 서서히 가한다. 2시간 동안 reflux시키고 TLC로 반응완결을 확인한다. MnO<sub>2</sub>를 여과로 제거한 후 감압농축하여 얻은 잔사를 칼람크로마토그래피(*n*-Hexane : EtOAc=30 : 1)하여 황색결정 102.8 mg(93.9%)을 얻었다 : R<sub>f</sub>=0.51 (*n*-Hexane : EtOAc = 6 : 1); IR (neat) 2930, 2857, 1654, 1594, 1572, 1285; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.30 (1H, d, *J*=16.1), 7.13~6.92 (m, 5H), 6.88~6.84 (m, 2H), 6.67 (1H, d, *J*=8.6), 3.66 (s, 3H), 2.51~2.43 (m, 4H), 1.62~1.50 (m, 4H), 0.82 (s, 9H) 0.00 (s, 6H).

**1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-phenylhept-1-en-3-one (5: Yakuchinone B)** - Enone 4(93.8 mg, 0.22 mmol)를 THF 5 ml에 용해시킨 후 tetrabutylammonium fluoride (1M solution in THF, 0.45 ml, 0.45 mmol)를 서서히 가하고 20분간 교반 한 다음 TLC로 반응완결을 확인한다. EtOAc로 추출하여 H<sub>2</sub>O (4 ml×2), brine (4 ml)의 순으로 세척하고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조한 다음 감압농축하여 얻은 잔사를 칼람크로마토그래피(*n*-Hexane : EtOAc = 7 : 1, SiO<sub>2</sub>)하여 순수한 황색결정 62.7 mg(90.3%)를 얻었다 : R<sub>f</sub> = 0.34 (*n*-Hexane : EtOAc = 3 : 1); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.20(d, 1H, *J*=16.1), 7.04~6.87(m, 5H), 6.82(dd, 1H, *J*=1.9, 8.2), 6.77(d, 1H, *J*=1.9), 6.66(d, 1H, *J*=8.2), 6.32(d, 1H, *J*=16.1), 5.66(s, 1H) 3.66(s, 3H), 2.42~2.37(m, 4H), 1.48~1.37(m, 4H).

**1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-phenylheptan-3-one (6 : Yakuchinone A) - Yakuchinone B(5)** (31 mg, 0.1 mmol)를 ethanol에 희석 후 palladium on activated carbon(Pd/C, 10 mg)을 넣고 flask내를 H<sub>2</sub> gas로 치환시켜 교반한다. 2시간 후 TLC로 반응완결을 확인하고 Pd/C을 여과로 제거하고 감압농축하여 얻은 잔사를 칼람 크로마토그래피(*n*-Hexane : EtOAc = 5 : 1)하여 무색 유상물질 28 mg(90%)를 얻었다 : R<sub>f</sub> = 0.6 (*n*-Hexane : EtOAc=2 : 1); IR (neat) 3423, 3021, 2935, 1710, 1604, 1516, 1270; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.58~6.87(5H, m), 7.05 (1H, d, *J*=7.9), 6.99~6.84(2H, m), 5.73(1H, s), 4.08 (3H, s), 3.07~2.99(2H, m), 2.93~2.78(4H, m), 2.65~2.60 (2H, m), 1.84~1.78(4H, m).

**1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)pent-1-en-3-one (8)** - R<sub>f</sub> = 0.44 (*n*-Hexane : EtOAc=2 : 1); IR (neat) 3418, 3069, 2970, 1850, 1662, 1602, 1515; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.51 (1H, d, *J*=16.1), 7.11 (1H, dd, *J*=8.2, 1.8), 7.07 (1H, d, *J*=1.8), 6.94 (1H, d, *J*=8.2), 6.63 (1H, d, *J*=16.1), 6.02 (1H, s), 3.95(3H, s), 2.74~2.65(2H, m), 1.21~1.14 (3H, m).

**3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenylpropanone (9)** - R<sub>f</sub> = 0.16 (*n*-Hexane : EtOAc = 3 : 1); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.04~8.01 (m, 2H), 7.76 (d, 1H, *J*=22.5), 7.63~7.49 (m, 3H), 7.39 (d, 1H, *J*=15.6), 7.24 (dd, 1H, *J*=8.2, 1.9), 7.19 (d, 1H, *J*=1.9) 6.98 (d, 1H, *J*=8.2).

**(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-phenylpent-1-en-3-one (10)** - R<sub>f</sub> = 0.24 (*n*-Hexane : EtOAc = 2 : 1, SiO<sub>2</sub>); IR (KBr) 3395, 3027, 2937, 1680, 1647, 1586, 1514, 1454, 1429, 1281, 1157; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.48 (1H, d, *J*=16.1), 7.32~7.18 (5H, m), 7.07 (1H, dd, *J*=8.2, 1.9), 7.03 (1H, d, *J*=1.9), 6.92 (1H, d, *J*=8.2), 6.59 (1H, d, *J*=16.1), 5.90 (1H, s), 3.93 (3H, s), 3.00 (4H, m).

**1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-phenylhex-1-en-3-one (11)** - R<sub>f</sub> = 0.2 (*n*-Hexane : EtOAc = 3 : 1); IR (neat) 3422, 2930, 2857, 1688, 1597; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.36 (d, 1H, *J*=16.1), 7.24~7.10 (m, 5H), 7.00 (dd, 1H, *J*=8.1, 1.8), 6.96 (d, 1H,

$J=1.8$ ), 6.84 (d, 1H,  $J=8.1$ ), 5.82 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.64~2.56 (m, 4H), 2.00~1.90(m, 2H).

**4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-butan-2-one (12)** –  $R_f = 0.38$  (*n*-Hexane : EtOAc = 2 : 1); IR (neat) 3418, 3004, 2939, 1711, 1602, 1517, 1272;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 6.84(1H, d,  $J=8.0$ ), 6.71 (1H, d,  $J=1.9$ ), 6.68(1H, dd,  $J=8.0, 1.9$ ), 3.88 (3H, s), 2.87~2.81 (2H, m), 2.77~2.71 (2H, m), 2.15 (3H, m).

**1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-phenylpentan-3-one (13)** – 무색 유상물질;  $R_f = 0.19$  (*n*-Hexane : EtOAc = 2 : 1,  $\text{SiO}_2$ ); IR (neat) 3445, 3026, 2935, 1711, 1604, 1515, 1453, 1431, 1270;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.20~7.06 (5H, m), 6.74 (1H, d,  $J=7.9$ ), 6.59 (1H, d,  $J=1.9$ ), 6.56 (1H, dd,  $J=7.9, 1.9$ ), 5.41 (1H, s), 3.78 (3H, s), 2.81 (2H, t,  $J=7.4$ ), 2.74 (2H, t,  $J=7.1$ ), 2.66~2.58 (4H, m); Mass (EI)  $m/e$ (relative intensity) 284( $\text{M}^+$ ) 179 (26), 137 (100), 91 (30).

#### RAW 264.7 세포의 배양 및 시료의 처리

Macrophage 계열의 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM을 배양액(10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, penicillin 100 U/mL 및 streptomycin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 포함)으로 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하

고 1주일에 2번 계대배양하여 유지하였다.

RAW 264.7 세포주를 10% FBS DMEM으로  $8 \times 10^5$  cell/ml 로 하여 24well plate에 1 ml씩 분주하여 2시간 동안 부착시키고 새로운 10% FBS DMEM으로 교환한 다음 (-)LPS, (+)LPS, 시료처리군으로 나누어 각각 3 well씩 처리하였다. 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 20시간 배양한 후 각 well의 배양액으로 유리된 NO를 측정하였다. 사용한 세포의 단백질량을 측정하기 위해 바닥에 부착된 세포를 PBS로 2회 세척하고 0.5N-NaOH 500  $\mu\text{l}$ 를 이용하여 100°C에서 30분간 단백질을 용해하였다. Bradford 법으로<sup>28)</sup> BSA를 표준물질로 하여 단백질의 양을 결정하였다.

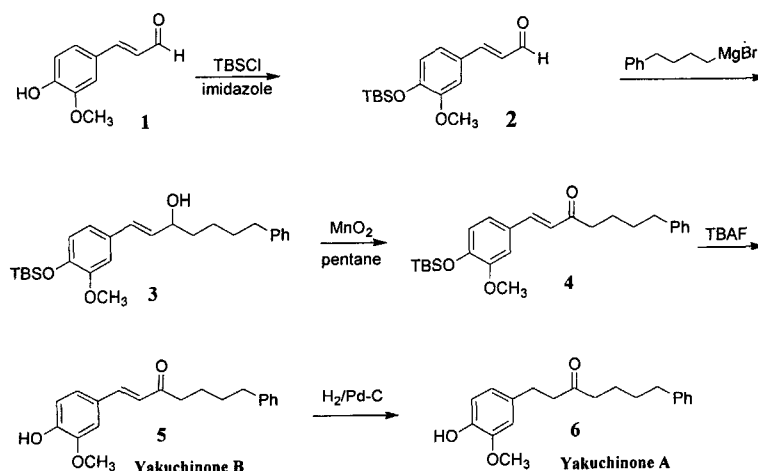
#### Griess 시약을 이용한 NO의 정량

RAW 264.7 세포주에 LPS와 시료를 처리하여 20시간 배양한 배양액 100  $\mu\text{l}$ 를 96well plate에 취하고 Griess시약(2.5% 인산에 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine용액<sup>29)</sup> 150  $\mu\text{l}$ 씩을 가하고 10분 동안 반응을 시킨다음 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선을 작성하기 위하여 sodium nitrite를  $\text{NO}_2^-$ 의 표준품으로 사용하였다.

#### 실험결과 및 고찰

##### 합성

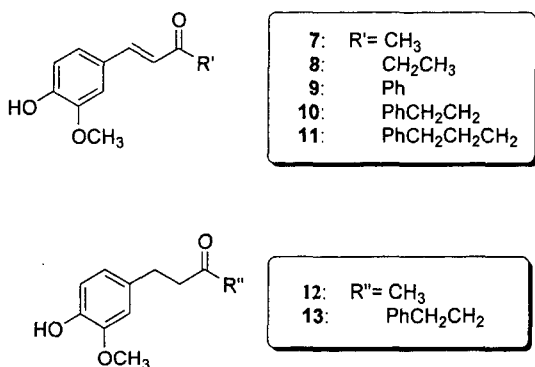
Yakuchinone 및 관련 유도체의 합성은 Scheme 1



Scheme 1 – Synthesis of Yakuchinone A and B.

에 표시한 합성법에 의거 합성하였다(Scheme 1).

출발물질인 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde(1)의 phenolic OH기를(TBSCl, NaH, THF)에서 TBS ether 형태로 보호시켰다. 이렇게 하여 얻어진 2에 phenylbutylmagnesium bromide시약을 이용해 1,2-부가반응을 하여 allyl alcohol 3을 합성하였다. 3을 MnO<sub>2</sub>로 산화하여 α, β-불포화 케톤(4)을 합성하였다. TBAF로 처리하여 보호기인 TBS기를 제거함으로써 5, 즉yakuchinone B를 합성했고 이어 팔라디움을 이용한 수소화 반응을 통해 yakuchinone A인 6을 최종 합성하였다. 8-13의 화합물도 유사한 방법으로 합성하였다.



#### NO 합성 저해활성 및 구조활성관계

RAW 264.7 세포주를 24-well plate에  $8 \times 10^5$  cell/mL 농도로 부착시킨 후 LPS를 1 μg/ml로 처리하여 세포를 활성화한 후 20시간동안 배양 후 배양액으로 유리된 NO의 농도를 NO<sub>2</sub> 형태로 Griess시약을 이용하여 정량하였다. 이는 NO가 매우 불안정하여 NO<sub>2</sub>로 즉시 변환되기 때문이다. 시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해한 후 멸균증류수를 이용하여 원하는 농도로 희석하여 사용하였고, DMSO의 최종농도가 0.1%로 조정하였을 때 활성검정계에 영향을 미치지 않는 것을 예비실험에서 확인하였다. 세포 배양액 대조군의 경우 NO<sub>2</sub>의 농도가 0.5 μM이하인 반면 LPS의 처리에 의해 약 20~30 μM로 현저히 증가하였다. 이와 같이 LPS로 세포를 활성화할 때 활성검정용 시료를 처리하고 시료에 의해 NO의 생성이 감소하는 능력의 농도의존성을 관찰하였다. 활성화한 대식세포의 NO합성 저해활성은 LPS 대조군에 대한 저해율(%)로 표현하였으며 계산식은 다음과 같다. 즉,

**Table I** – Inhibition of nitric oxide production in LPS-activated macrophages by yakuchinone derivatives

Compounds	Inhibition (%)		IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
	25 μM	50 μM	
1	84.6	-	9.0
5	65.5	-	18.0
6	-	26.6	ND <sup>b</sup>
7	99.8	-	5.3
8	-	24.6	ND <sup>b</sup>
9	95.1	-	4.1
10	71.0	-	8.6
11	96.3	-	8.1
12	-	4.8	ND <sup>b</sup>
13	50.4	-	33.2

<sup>a</sup>Concentration (μM) needed for the 50% inhibition of NO production in LPS-activated macrophages.

<sup>b</sup>Not determined

$$\text{저해율 (\%)} = 100 \times \frac{[\text{OD}_{\text{LPS}} - \text{OD}_{\text{sample}}]}{[\text{OD}_{\text{LPS}} - \text{OD}_{\text{media}}]}$$

이때 OD값은 각 시료를 처리한 세포배양액을 Griess시약으로 발색한 후 ELISA판독기에서 570 nm에서 측정된 흡광도이다. 양성 대조군으로 NOS의 저해제로 알려져 있는 N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)를 0.1 mM로 처리하였을 때 NO생성저해활성이 65%이었으며, NO의 생성을 50%저해하는 농도를 IC<sub>50</sub>으로 표현한 결과는 Table I에 나타내었다.

대체적으로 IC<sub>50</sub>값이 10 μM이하로 비교적 강한 NO생성저해활성을 나타내었다. 이중결합이 없는 12, 13은 활성이 매우 약한 것으로 나타났다. 즉 enone형태의 화합물 중 측쇄가 메틸이나 페닐기가 있는 7 및 9가 높은 저해활성을 나타낸 것으로 관찰되었다. 앞으로 분자 내에 페놀성 OH기의 존재 필요성, 측쇄의 길이, 벤젠환의 전자밀도 등에 영향을 정확히 평가할 수 있는 유도체를 확보할 예정이며 이들 화합물의 NO생성저해활성에 대한 작용기전과 NOS활성과 관련이 있는 cyclooxygenase활성, TNF-α 활성 등에 관한 종합적인 검토를 통해 더욱 다양한 응용가능성을 도출할 예정이다.

#### 결론

본 논문에서는 yakuchinone을 기본골격으로 하여 그 유도체를 합성하고 이들의 LPS로 활성화한 대식세포에서 NO 합성저해활성을 평가하였다. Enone형태의 화합물 중 측쇄가 메틸이나 페닐기가 있는 7 및 9가

IC<sub>50</sub>가 4~5 μM 정도의 높은 저해활성을 나타내었다. 추후 연구를 통해 보다 우수한 활성을 가진 분자를 개발할 예정이며 이들 화합물들은 궁극적으로 NO의 합성저해를 통한 소염, 항암, 폐혈증의 예방 및 치료의 목적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 말씀

이 연구는 과학기술부 주관 특정연구개발사업인 여자대학교연구기반 확충사업(과제번호 : 00-B-WB-07-A-05)에 의해 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

### 문헌

- 1) Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. : Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9265 (1987).
- 2) Angus, J. A. and Cocks, T. M. : Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* **41**, 303 (1989).
- 3) Knowles, R. G., Salter, M., Brooks, S. L. and Moncada, S. : Anti-inflammatory glucocorticoids induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1042 (1990).
- 4) Rees, D. D., Celtek, S., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. : Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone: an insight into endotoxic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 541 (1990).
- 5) Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. : Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7240 (1993).
- 6) Salvemini, D., Seibert, K., Masferrer, J. L., Misko, T. P., Currie, M. G. and Needleman, P. : Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J. Clin. Invest.* **93**, 1940 (1994).
- 7) Akama, K. T., Albanese, C., Pestell, R. G. and Van Eldik, L. J. : Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFκappaB-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 5795 (1998).
- 8) Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K.C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., Weidner, J., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A. B., Lippa, C. F. and Sporn, M. B. : Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* **184**, 1425 (1996).
- 9) Moore, W. M., Webber, R. K., Jerome, G. M., Tjoeng, F. S., Misko, T. P. and Currie, M. G. : L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J. Med. Chem.* **37**, 3886 (1994).
- 10) Griffiths, M. J., Messent, M., MacAllister, R. J., Evans, T. W. : Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J. Pharmacol.* **110**, 963 (1993).
- 11) Misko, T. P., Moore, W. M., Kasten, T. P., Nickols, G. A., Corbett, J. A., Tilton, R. G., McDaniel, M. L., Williamson, J. R. and Currie, M. G. : Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.* **233**, 119 (1993).
- 12) Aeberhard, E., Henderson, S. A., Arabolos, N. S., Griscavage, J. M., Castro, F. E., Barrett, C. T. and Ignarro, L. J. : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 1053 (1995).
- 13) Park, E., Schuller-Levis, G. and Quinn, M. R. : Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. *J. Immunol.* **154**, 4778 (1995).
- 14) Brouet, I. and Oshima, H. : Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 533 (1995).
- 15) Kondo, Y., Yakano, F. and Hojo, H. : Inhibitory effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on nitrite oxide production in activated macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1887 (1993).
- 16) Pellat-Deceunynck, C., Wietzerbin, J. and Drapier, J. C. : Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem. J.* **297**, 53 (1994).

- 17) Niwa, M., Nakamura, N., Kitajima, K., Ueda, M., Tsutsumishita, Y., Futaki, S. and Takaishi, Y. : Benzoquinones inhibit the expression of inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 367 (1997).
- 18) Lee, H. J., Kim, N. Y., Jang, M. K., Son, H. C., Kim, K. M., Sohn, D. H., Lee, S. H. and Ryu, J.-H. : A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF in LPS-activated macrophages. *Planta Medica* **65**, 104 (1999).
- 19) Choi, Y. E., Ahn H. and Ryu, J.-H. : Polyacetylenes from *Angelica gigas* and their inhibitory activity on the nitric oxide synthesis in activated macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 884 (2000).
- 20) Ryu, J.-H., Jang, S. R., Lee, S. Y., Lee, H. J. and Han, Y. N. : Inhibitors of nitric oxide synthesis from ginseng in activated macrophages. *J. Ginseng Res.* **22**, 181 (1998).
- 21) Son, H. J., Lee, H. J., Yun-Choi, H. S. and Ryu, J.-H. : Inhibitors of nitric oxide synthesis and TNF- $\alpha$  expression from *Magnolia obovata* in activated macrophages. *Planta Medica* **66**, 469 (2000).
- 22) Prasain, J. K., Tezuka, Y., Hase, K., Basnet, P., Dong, H., Namba, T. and Kadota, S. : Inhibitory effect of diarylheptanoids on nitric oxide production in activated murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 371 (1998).
- 23) Chan, M. M., Huang, H. I., Fenton, M. R. and Fong, D. : In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1955 (1998).
- 24) Rao, C. V., Kawamori, T., Hamid, R. and Reddy, B. S. : Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis* **20**, 641(1999).
- 25) Chun, K. S., Sohn, Y., Kim, H. S., Kim, O. H., Park, K. K., Lee, J. M., Moon, A., Lee, S. S. and Surh, Y. J. : Anti-tumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin. *Mutat. Res.* **428**, 49 (1999).
- 26) Chan, M. M., Fong, D., Ho, C. T. and Huang, H. I. : Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1281 (1997).
- 27) Lin, Y. L. and Lin, J. K. : (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol. Pharmacol.* **52**, 465 (1997).
- 28) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 29) Gree, Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. : Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 131 (1982).