

감국에서 분리한 Kikkanol F Monoacetate와 5-Hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone의 IL-6 생성억제활성

남정연 · 이현선 · 이승웅 · 정미연 · 최정호 · 유은숙¹ · 노문철* · 김영국
한국생명공학연구원 지질대사연구실, ¹제주대학교 의과대학

Effect of Kikkanol F Monoacetate and 5-Hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone Isolated from *Chrysanthemum indicum* L. on IL-6 Production

Jung Yeon Nam, Hyun Sun Lee, Seung Woong Lee, Mi Yeon Chung,
Eun Sook Yoo¹, Mun-Chual Rho*, and Young-Kook Kim

Laboratory of Lipid Metabolism, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
52 Eoundong, Yusong-gu, Daejeon 305-333, Korea

¹Department of Pharmacology, College of Medicine, Cheju National University, Ara 1 Dong, Jeju, Jeju-do 690-756, Korea

Abstract – Searching for inhibitors of lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-6 (Interleukin-6) production from medicinal herbs, we isolated two active compounds through bioactivity-guided fractionation from the methanol extract of *Chrysanthemum indicum* L.. They were determined as kikkanol F monoacetate (1) and 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone (2) by means of spectroscopy techniques such as NMR and MS. The compound 1 and 2 inhibited LPS-induced IL-6 production in the RAW264.7 cells with IC₅₀ value of 47 µg/ml and 27 µg/ml, respectively.

Key words – *Chrysanthemum indicum* L., kikkanol F monoacetate, 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone, IL-6, RAW264.7 cells

염증성 cytokine의 하나인 interleukin-6(IL-6)는 multi-functional lymphokine으로 면역계 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 생체 내에서 T세포의 분화 및 증식, B세포의 자극, 신경세포의 분화, 파골세포 형성, 간세포에서 급성기 단백질의 생산 등 다양한 기능을 가지며 면역기능 조절에 의한 생체의 항상성을 유지하는데 역할을 한다.¹⁻⁵⁾ 그러나 IL-6의 과도한 생산은 암성 악액질을 비롯한 다발성골수종, castleman 증후군, 만성관절염, 류마티스, 고칼슘 혈증, 골다공증 등의 다양한 질환에 관여하는 것으로 밝혀지고 있다.⁶⁻¹⁰⁾ 한편 최근의 보고에서 IL-6는 세포접착인자의 분비를 촉진시키며 insulin sensitivity를 감소시킨다. 또한 간 조직에서 피브리노겐의 분비를 촉진하여 혈액응고 현상을 유도하며 콜레스테롤의 합성을 증가시키거나 콜레스테롤의 분비를 감소시키며 LCAT(lecithin cholesterol acyltransferase)와 apo A-1(apolipoprotein A-1) 유전자를 upregulation함으

로써 동맥경화증을 유도하게 된다.¹¹⁾ 따라서 IL-6 활성저해제 및 생산저해제에 대한 연구는 면역관련질환 뿐만 아니라 동맥경화와 관련된 심혈관계 질환의 치료제 개발에 기여할 것으로 사료된다.

감국(*Chrysanthemum indicum* L.)은 국화과에 속하는 국내에 자생하는 다년생 초본으로서, 한방에서는 그 꽃의 해열, 소염 및 혈압강화작용이 알려져 있다.¹²⁾ 감국의 주성분으로는 플라보노이드 화합물인 luteolin, apigenin 및 acacetin, sesquiterpene lacton 화합물인 cumambrin A, cumambrin B, arteglinin A 및 angeloyljadin 등 다양한 성분에 대한 보고가 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 이들 성분 중 가장 함량이 많은 luteolin은 항염¹⁶⁾ 및 항암활성¹³⁾ 등이 알려져 있다.

본 연구에서는 감국의 methanol 추출물이 RAW264.7 세포에서 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도된 IL-6생성을 저해하였으므로 활성분획을 통하여 두종의 화합물을 분리하고 구조를 동정하여 이를 보고하고자한다.

*교신저자(E-mail) : rho-m@kribb.re.kr
(FAX) : 042-861-2675

재료 및 방법

실험 재료 - 본 실험에 사용한 생약시료인 감국은 대전에 소재하는 칠성약품(주)에서 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기 - 저해활성 측정에 사용된 시료는 DMSO (Sigma Co.)에 녹여 PBS buffer(GIBCO BRL)로 희석하여 사용하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum), kanamycin sulfate는 GIBCO BRL(USA)의 제품을, sodium hydrogen carbonate는 Wako Co.의 제품을, IL-6 측정용 ELISA development system은 R&D Systems 제품을 사용하였다. LPS는 Sigma Co.(USA)의 제품을 사용하였다.

UV spectrum은 Shimadzu model UV-160A spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. HPLC는 Shimadzu model LC-10 AD pump, SPD-M10A photodiode array detector와 CTO-10A column oven을 사용하였다. HR-FABMS spectra는 JEOL JMS-AX505 HA으로부터 얻었으며, NMR spectra는 Varian Unity 300 spectrometer로 측정하였다. 흡광도 측정은 microplate reader(Molecular devices, VERSAmax, USA)를 사용하였다.

IL-6 생성 측정 - RAW264.7 세포를 1×10^5 cells/ml로 조정하여 24 well plate에서 18시간 배양한 후, 최종농도 $1 \mu\text{g/ml}$ 에 LPS 처리하여 IL-6 생성을 유도하는 동시에 각 농도의 시료를 처리하였다. 시료처리 후 6시간동안 동일 조건에서 배양한 다음 상등액을 취한다. 상등액 중의 IL-6 량을 ELISA development system을 이용하여 다음과 같이 정량 하였다. 96-well ELISA plate에 capture antibody(rat anti-mouse IL-6, 1:180 dilution in PBS) $100 \mu\text{l}$ 로 실온에서 24시간 코팅 후, 세척용 buffer(0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)로 4회 세척한 다음 1% BSA(in PBS, pH 7.4)로 1시간 blocking한다. 코팅된 plate에 반응배지 상등액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후, 뚜껑을 덮고 실온에서 2시간 배양시킨다. 배지를 제거하고 세척용 buffer $400 \mu\text{l}$ 로 4회 세척한 후, 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 의 detection antibody(biotinylated goat anti-mouse IL-6)를 넣고 뚜껑을 덮고 2시간 반응시킨다. 다시 4회 세척한 후 streptavidin-HRP를 $100 \mu\text{l}$ 를 처리하여 실온에서 빛을 차단하여 20분간 반응한다. 그 후 4회 세척한 다음, 다시 substrate solution [color reagent A(H_2O_2)+color reagent B(tetramethylbenzidine)=1+1] $100 \mu\text{l}$ 를 처리하고 빛을 차단하여 20분 반응시킨다. 각 well에 $50 \mu\text{l}$ stop solution(2 N H_2SO_4)을 처리한 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IL-6 생성억제 활성물질의 추출과 분리 - 건조된 감국 10 kg을 잘게 분쇄하여 methanol로 실온에서 추출한 뒤 감압 농축하여 methanol 추출물 800 g을 얻었다. 이를 물과 ethyl acetate로 분획하여 ethyl acetate 추출물 190 g을 얻었

다. 이 분획을 chloroform/methanol : 100/0-0/100 조건 하에서 1차 silica gel(230-400 mesh, Merck) column chromatography를 실시하여 12개의 분획을 얻었다. 각각의 분획을 RAW264.7 세포를 이용하여 LPS에 의해 유도되는 IL-6 생성을 측정한 결과, 4, 5, 6번 분획에서 활성을 나타내었다. 이 활성 분획을 모아 농축하여 20 g을 얻었다. 이 분획을 methanol/ H_2O : 50/50-0/100 조건 하에서 RP-18(YMC* GEL, ODS-A, 60 Å, 70×230 mesh) column chromatography를 실시하여 15개의 분획을 얻었으며, 이중 5번(1 g), 6번(650 mg)의 활성 분획을 얻었다. 먼저 5번 분획을 hexane/ethyl acetate : 100/0-0/100 조건으로 silica gel column chromatography를 수행하여 7번(272 mg)의 활성 분획을 얻었으며, 이 분획을 Lichroprep RP-18($40-63 \mu\text{m}$, Lobar, 50% acetonitrile)를 이용하여 화합물 1(14.3 mg)을 얻었다. 또한 6번 분획을 hexane/ethyl acetate : 100/0-0/100 조건으로 silica gel column chromatography를 수행하여 13번 분획(72 mg)을 얻었다. 최종적으로 semi-preparative HPLC($4 \mu\text{m}$, 80 Å, 20×250 mm, 50% methanol)를 이용하여 화합물 2(11.8 mg)를 얻었다(Fig. 1).

화합물 1 (Kikkanol F monoacetate)

$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_4$, colorless oil, FAB-MS : m/z 296 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.02 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H_3-12), 1.02 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H_3-13), 1.28 (1H, m, H-7), 1.42 (1H, dd, $J=2.0, 5.0$ Hz, H-6 β), 1.68 (1H, dd, $J=2.0, 4.0$ Hz, H-6 α), 1.78 (1H, dq, $J=1.5, 7.5$ Hz,), 1.83 (1H,

Chrysanthemum indicum L. (10 kg)

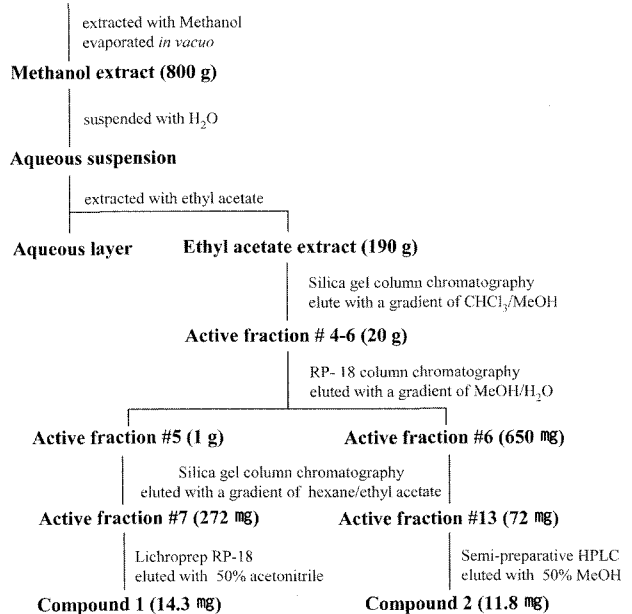


Fig. 1. Isolation of compounds 1 and 2 from *Chrysanthemum indicum* L..

ddd, $J=4.1, 4.1, 13.8$ Hz, H-5), 2.08 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.26 (1H, m, H-1 α), 2.32 (1H, m, H-5), 2.37 (1H, m, H-2), 2.46 (1H, m, H-2), 2.50 (1H, m, H-1 β), 3.53 (1H, d, $J=10$ Hz, H-9), 3.96 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-8), 4.51 and 4.62 (ABq, $J=12.2$ Hz, H₂-15)], 5.02 and 5.06 (1H each, s, H₂-14), 5.53 (1H, dd, $J=6.5, 7$ Hz, H-3), ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 21.01 (C-12), 21.05 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 21.27 (C-13), 27.12 (C-6), 27.66 (C-2), 32.24 (C-11), 32.64 (C-5), 35.10 (C-1), 42.69 (C-7), 63.64 (C-15), 72.80 (C-8), 77.00 (C-9), 113.93 (C-14), 130.91 (C-3), 135.09 (C-4), 149.56 (C-10), 171.16 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$).

화합물 2 (5-Hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxy-flavone)

$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$, pale yellow powder, FAB-MS : m/z 359 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.92 (3H, s, C6-O CH_3), 3.96 (3H, s, C4'-O CH_3), 3.97 (3H, s, C3'-O CH_3), 3.98 (3H, s, C7-O CH_3), 6.55 (1H, s, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 6.97 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.34 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 7.52 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6'), 12.85 (1H, s, C5-OH), ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 56.09 (C-4'-O CH_3), 56.12 (C-3'-O CH_3), 56.32 (C-7-O CH_3), 60.85 (C-6-O CH_3), 90.57 (C-8), 103.76 (C-3), 106.14 (C-10), 108.78 (C-2), 111.16 (C-5'), 120.06 (C-6'), 123.79 (C-1'), 132.65 (C-6), 149.34 (C-3'), 152.29 (C-4'), 153.06 (C-9), 153.10 (C-5), 158.73 (C-7), 163.96 (C-2), 182.59 (C-4).

결과 및 고찰

염증성 cytokine인 IL-6는 다양한 외인성 자극(IL-1, TNF, PDGF, LPS 등)에 의해 fibroblast, macrophage, dendritic cell, lymphocyte, endothelial cell 등 다양한 세포로부터 분비되어진다. 생성된 IL-6는 IL-6 receptor α (IL-6R α)와 gp130/IL-6 β 와 결합하여 dimerization을 유도하고 Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) 활성화 경로와 CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP)활성화 경로를 통하여 염증관련질환 및 동맥경화 등 다양한 질환의 진전에 관여한다.^{11,17)} RAW264.7 세포에 LPS를 처리하여 IL-6 생성을 유도하는 동시에 시료를 처리하여 IL-6의 생성을 억제하는 물질을 탐색한 결과, 감국의 methanol 추출물에서 활성이 확인되어(100 $\mu\text{g/ml}$: 82.5% inhibition), 활성물질의 분리 및 정제를 시도하였다. 활성이 확인된 ethyl acetate 추출물(50 $\mu\text{g/ml}$: 79.5% inhibition)을 다양한 column chromatography와 분취 HPLC를 통하여 두 종의 활성 화합물 1(14.3 mg)과 2(11.8 mg)를 얻었다(Fig. 1).

화합물 1은 무색 오일상으로 얻어졌으며, FAB-MS로부터 m/z 296 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 의 분자 이온 peak가 관찰되었으며 high

resolution FAB-MS로부터 이 물질의 분자식은 $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 로 결정되었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 2.08 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-CO-}$)의 acetyl methyl proton이 관찰되었고, δ 4.51과 4.62 (ABq, $J=12.2$ Hz, H₂-15)의 acetoxyl group의 proton이 관찰되었다. δ 1.02 (6H, d, $J=6.5$ Hz, H₃-12 and H₃-13)에서 2개의 methyl proton과, 5.02과 5.06 (1H each, s, H₂-14)의 methylene proton이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 총 17개의 탄소가 관찰되었으며, HMBC spectrum으로부터 C-15과 acetyl proton 사이에 long-range correlation이 관찰되었다. 이상의 기기 분석 결과와 기존의 data¹⁸⁾를 비교한 결과, 화합물 1 구조는 kikkanol F monoacetate로 동정되었다(Fig. 2).

화합물 2는 옅은 노란색 분말로 얻어졌으며, FAB-MS로부터 m/z 359 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 의 분자 이온 peak가 관찰되었으며 high resolution FAB-MS로부터 화합물 2의 분자식은 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$ 로 결정되었다. ¹H-NMR(CDCl_3) spectrum에서 δ 3.92 (3H, s, C6-O CH_3), 3.96 (3H, s, C4'-O CH_3), 3.97 (3H, s, C3'-O CH_3), 3.98 (3H, s, C7-O CH_3)의 4개의 methyl group이 관찰되었으며, δ 6.55(1H, s, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 6.97 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.34 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 7.52 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6')의 aromatic protons이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서 19개의 탄소가 관찰되었으며, δ

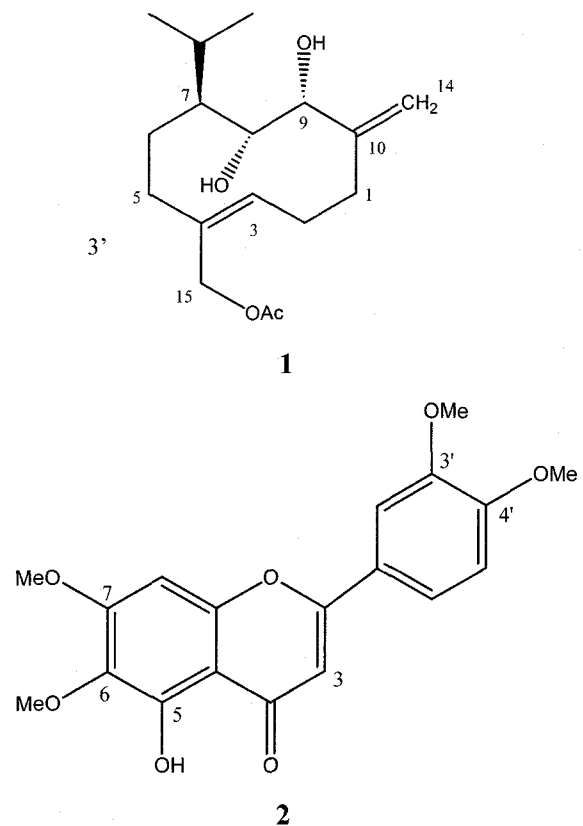


Fig. 2. Structures of compounds 1 and 2.

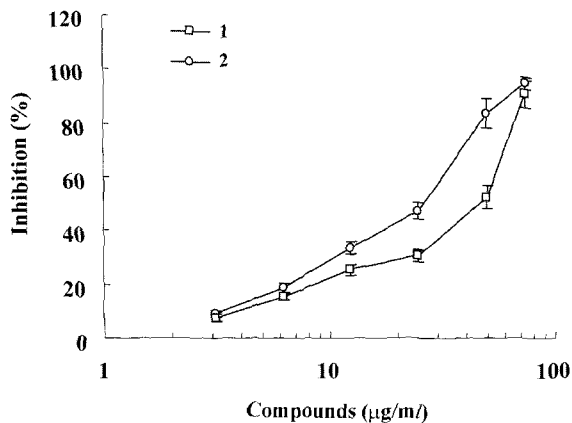


Fig. 3. Inhibitory effect of compounds 1 and 2 on LPS-induced IL-6 production in RAW264.7 cells. RAW264.7 (1×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) in the presence of samples for 6 hr. Secreted IL-6 was measured using ELISA development system described as Material and Method. Values are given as mean \pm S.E. (n=4).

183.59에서 carbonyl group carbon이 관찰되었다. DEPT spectrum에서는 4개의 CH_3 peak와 5개의 CH peak가 관찰되었다. 이상의 기기 분석 결과와 기존의 data¹⁹⁾를 비교한 결과 화합물 2는 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone로 동정되었다(Fig. 2).

Macrophage 또는 lymphocytes와 같은 염증성 세포는 TNF- α , IL-1 및 LPS와 같은 외부 자극에 의해 NF- κ B의 활성화를 통해 cytokine, chemokine, growth factor, matrix metalloprotein과 같은 염증 매개체를 분비한다.²⁰⁾ 순수하게 분리된 두 화합물의 RAW264.7 세포에 LPS를 처리했을 때 생성되는 IL-6의 양에 미치는 영향을 ELISA법으로 확인한 결과, kikkanol F monoacetate (1)와 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone (2)는 각각 농도 의존적으로 IL-6 생성을 저해하였으며 각각의 IC_{50} 값은 $47 \mu\text{g/ml}$, $27 \mu\text{g/ml}$ 로 측정되었다(Fig. 3).

결 론

감국의 methanol 추출물에서 LPS자극에 의한 RAW264.7 세포의 IL-6생성저해활성이 확인되어 활성물질의 분리정제를 시도한 결과, 화합물 1과 2를 분리하였으며, 각종 기기 분석 및 문헌비교를 통하여 화합물 1은 kikkanol F monoacetate, 화합물 2는 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone임을 밝혔다.

Kikkanol F monoacetate(1)와 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone(2)는 LPS자극에 의해 유도된 IL-6 생성을 농도 의존적으로 저해하였으며 IC_{50} 값은 각각 $47 \mu\text{g/ml}$,

$27 \mu\text{g/ml}$ 이었다. 향후 두 화합물의 IL-6 생성저해 작용기작에 대한 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구지원(과제번호 PDM0200526)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

1. Akira, S., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J.* **4**: 2860-2867.
2. Matsuda, T., Yamasaki, K., Taga, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989) Current concepts of B cell modulation. *Int. Rev. Immunol.* **5**: 97-109.
3. Dowton, S. B., Waggoner, D. J., and Mandl, K. D. (1991) Developmental regulation of expression of C-reactive protein and serum amyloid A in Syrian hamsters. *Pediatr. Res.* **30**: 444-449.
4. Eaves, C. J., Cashman, J. D., Kay, R. J., Dougherty, G. J., Otsuka, T., Gaboury, L. A., Hogge, D. E., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C., and Humphries, R. K. (1991) Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. *Blood* **78**: 110-117.
5. Roodman, G. D. (1997) Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* **80**: 1557-1563.
6. Strassmann, G., Jacob, C. O., Evans, R., Beall, D., and Fong, M. (1992) Mechanisms of experimental cancer cachexia. Interaction between mononuclear phagocytes and colon-26 carcinoma and its relevance to IL-6-mediated cancer cachexia. *J. Immunol.* **148**: 3674-3678.
7. Yoshizaki, K., Matsuda, T., Nishimoto, N., Kuritani, T., Taeho, L., Aozasa, K., Nakahata, T., Kawai, H., Tagoh, H., and Komori, T. (1989) Pathogenic significance of interleukin-6(IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* **74**: 1360-1367.
8. Takagi, N., Mihara, M., Moriya, Y., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Takeda, Y., and Ohsugi, Y. (1998) Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**: 2117-2121.
9. Schweitzer, D. H., Boxman, I. L., Lowik, C. W., van Krieken, J. H., Weissglas, M. G., Baatenburg de Jong, R. J., and Papapoulos, S. E. (1995) Parathyroid hormone related protein and interleukin-6 mRNA expression in larynx and renal cell carcinomas from normocalcaemic and hypercalcaemic patients. *J. Clin. Pathol.* **48**: 896-900.

10. Zhang, X. G., Bataille, R., Jourdan, M., Saeland, S., Banchereau, J., Mannoni, P., and Klein, B. (1990) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood* **76**: 2599-2605.
11. Yudkin, J. S., Kumari, M., Humphries, S. E., and Mohamed-Ali, V. (2000) Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* **148**: 209-214.
12. 정보섭, 신민교(1989) 향약대사전, 1038-1039. 영림사, 서울.
13. Ryu, S. Y., Choi, S. U., Lee, C. O., Lee, S. H., Ahn, J. W., and Zee, O. P. (1994) Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch. Pharm. Res.* **17**: 42-44.
14. Uchio, Y., Tomosue, K., Nakayama, M., Yamamura, A., and Waki, T. (1981) Constituents of the essential oils from three terpenoid species of *Chrysanthemum*. *Phytochem.* **20**: 269-2693.
15. Mladenova, K., Tsankova, E., and Hubg, D. (1988) New sesquiterpenoids from *Chrysanthemum indicum* var. tuneful. *Planta Med.* **54**: 553-555.
16. Simoes, C. M., Schenkel, E. P., Bauer, L., and Langeloh, A. (1988) Pharmacological investigations on archyrocline satureioides. *J. Ethnopharmacol.* **22**: 281-293.
17. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Newen, G. M., Schaper, F., and Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* **334**: 297-314.
18. Yoshikawa, M., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S., and Matsuda, H. (2000) Medicinal flowers. II. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type sesquiterpenes, kikkanol D, D monoacetate, E, F, and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.. *Chem. Pharm. Bull.* **48**: 651-656.
19. Seo, J. M., Kang, H. M., Son, K. H., Kim, J. H., Lee, C. W., Kim, H. M., Chang, S. I., and Kwon, B. M. (2003) Antitumor activity of flavones isolated from *Artemisia argyi*. *Planta Med.* **69**: 218-222.
20. Stenvinkel, P., Pecoits-Filho, R., and Lindholm, B. (2003) Coronary artery in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: 1972-1939.

(2005년 5월 30일 접수)