

낙엽송총버섯의 Nitric Oxide 생성저해 물질

장현진 · 김안근 · 표명윤 · 양기숙*

숙명여자대학교 약학대학

(Received September 1, 2007; Revised November 20, 2007)

Inhibitors of Nitric Oxide Synthesis from *Phellinus pini* in Murine Macrophages

Hyun-Jin Jang, Ahn-Keun Kim, Myoung-Yun Pyo and Ki-Sook Yang*

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

Abstract — The anti-inflammatory activity of fruit body of *Phellinus pini* was investigated by activity-guided fractionation. From the screening of each fraction for the inhibitory activity of NO production in lipopolysaccharide (LPS) activated RAW 264.7 cells, methanol extract and its hexane soluble fraction of *Phellinus pini* exhibited inhibition of NO production compared with LPS control without toxicity. The hexane soluble fraction showed dose-dependent inhibition of NO production. The active hexane fraction was repeatedly chromatographed over silica gel, ergosta-7,24(28)-dien-3-ol(1) and ergosterol peroxide (2) were isolated and identified. Ergosterol derivatives were inhibited NOS activation, IC₅₀ of them were 18.9±3.9 μM (1) and 20.4±4.5 μM (2).

Keywords □ *Phellinus pini*, ergosta-7,24(28)-dien-3-ol, ergosterol peroxide, nitric oxide, RAW 264.7 cell

낙엽송총버섯(*Phellinus pini*(Brot ex Fr.) Ames)은 민주름버섯목(Aphyllphorales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)¹⁾에 속하며 침엽수 특히 가문비나무, 낙엽송, 소나무 등의 생목위에 기생하는 다년생의 버섯으로 일반적으로 송상황(松桑黃)버섯이라 부른다.

성분으로는 ergosterol, vanillic acid, p-hydroxybenzoic acid 등 버섯의 일반적인 성분²⁾ 이외에 각종 나무에 병을 일으키는 곰팡이를 억제하는 성분으로 2,4,6-triphenylhex-1-ene, 2-farnesyl-5-methylbenzoquinone, 8-methyl-13-phenyltri-deca-4,6,8,10,12-pentaene-3-one, 4-vinylphenol and 4-vinyl resorcinol 등이 알려져 있고,³⁾ 버섯의 자실체를 유도하는 성분으로는 N-(2'-hydroxynonacosanoyl)-D-erythro-1,3,4-trihydroxy-2-amino-octadecane, N-(2'-hydroxytriacontanoyl)-D-erythro-1,3,4-trihydroxy-2-amino-octadecane, 그리고 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one이 보고되었다.^{4,5)} 약리작용으로는 항암작용,⁶⁾ 면역증강작용,⁷⁾ 혈중지질감소효과⁸⁾ 등에 대한 보고가 있다.

대식세포는 생체 내에서 감염, 염증 등의 자극에 의하여 L-arginine을 NOS에 의해 대사하여 NO를 생성하여 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 하고 있다.^{9,10)} 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 속근에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.¹¹⁻¹⁴⁾ 본 연구에서는 낙엽송총버섯의 항염활성을 규명하고자 nitric oxide 생성에 미치는 영향을 측정하여 염증억제작용을 평가하고, 그 활성성분을 단리하고자 하였다.

실험 방법

실험재료

낙엽송총버섯은 2003년 12월 서울시 소재 백제건재약업사를 통하여 구입하였으며 표본(SMP0505)은 숙명여자대학교 생약표본실에 보관하였다.

기기 및 시약

박층크로마토그래피는 pre-coated TLC plate silicagel 60F254 (Merck, Art. 5554), 컬럼크로마토그래피용 담체로는 Kieselgel

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9578 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) ksyang@sookmyung.ac.kr

60(70~230 mesh, Merck)을 사용하였다. NMR spectrum은 Bruker, Avance 500 spectrometer, GC-MS는 JEOL, JMS-AX505WA, HP5890 Series II를 사용하여 측정하였다.

세포배양과 시료처리

RAW 264.7 세포를 10% FBS DMEM으로 1.5×10^5 cells/ml로 하여 48 well plate에 분주하여 24시간 동안 부착시키고 새로운 1% FBS DMEM으로 교환한 다음 LPS를 $1 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 가하였다. 시료는 최종농도 0.1% DMSO 용액이 되도록 LPS와 동시에 배양액에 다양한 농도로 가한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양하여 각 well의 배양액으로 유리된 NO의 생성 정도를 측정하였다. 기질저해를 평가하기 위하여, 위와 같은 방법으로 LPS를 $1 \mu\text{g/ml}$ 을 넣고 20시간 배양한 후에 상등액을 제거하고 PBS로 세척한 후에 DMEM으로 교환하고 시료를 0~40 μM 의 농도로 가하고 20시간 배양하여 상등액에 유리된 NO의 생성 정도를 측정하였다.

Nitrite assay

NO 합성의 지표로 nitrite(NO₂) 생성량을 측정하였다. 96 well에 세포배양한 배지 상등액 100 μl 를 넣고 Griess reagent A 75 μl , B 75 μl 씩을 첨가하여 37°C에서 5분간 incubation 시킨 후 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성을 위해 sodium nitrite(NaNO₂)를 표준품으로 하여 비교하였다.¹⁵⁾

MTT assay

48 well plate에 각 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 MTT의 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 10% FBS DMEM에 녹여 200 μl 씩을 가한다. 이 때 대사활동을 하고 있는 세포의 경우 NADH와 NADPH의 작용으로 인한 환원반응으로 MTT(tetrazolium salt, 노란색)가 formazan crystal(보라색)로 변하게 된다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양한 후 solubilization 용액을 200 μl 씩 넣어 18시간 실온에 방치하여 용해한다. Crystal이 완전히 용해되면 대조과장을 650 nm로 하고 측정과장을 570 nm로 하여 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

추출 및 분리

낙엽송충버섯 자실체를 음건한 후 조말로 하여 5 kg을 취하여, MeOH 30l로 추출한 후 60°C 이하에서 1/5로 감압 농축하였다. 농축된 액을 동결 건조하여 MeOH ex. 297 g을 얻었다. 그 후 MeOH ex.를 열수에 녹여 물 가용부분 70 g과 물 불용부분 220 g으로 나누었다. 물 불용부분은 다시 hexane으로 추출하여 hexane 분획 24.2 g을 얻었다. Hexane 분획 12 g을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(hexane : EtOAc, 10 : 1→5 : 1)를 실시하여 활성 분획

인 Fr.7(500 mg), Fr.8(550 mg)을 얻었고, Fr.7(500 mg)을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(hexane : EtOAc, 2 : 1)를 실시하여 Fr.7-3에서 화합물 1(30 mg)을 단리 하였다. Fr.8(550 mg)을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(hexane : acetone, 2 : 1)를 실시하여 Fr.8-5 (175 mg)를 얻었고 다시 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(hexane : EtOAc : isopropylalcohol, 1 : 1 : 0.1)를 실시하여 화합물 2(40 mg)를 단리하였다.

화합물 1 - Colorless needle, C₂₈H₄₆O EI-MS: *m/z* 398[M]⁺, 383[M-CH₃]⁺, 314[M-C₆H₁₂]⁺, 271[M-C₉H₁₇-H₂]⁺, 255[M-C₉H₁₇-H₂O]⁺, ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ : 0.54(3H, 18-CH₃), 0.93(3H, 19-CH₃) 0.96(3H, d, *J*=6.4 Hz 21-CH₃), 1.02(3H, d, *J*=7.0 Hz 27-CH₃), 1.03(3H, d, *J*=7.0 Hz 26-CH₃), 3.61(1H, s, 3-H), 5.18(1H, m, 7-H), 4.65(1H, s, 28-H), 4.71(1H, s, 28-H). ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 36.82(C-1), 37.34(C-2), 71.28(C-3), 38.09(C-4), 40.45(C-5), 38.09(C-6), 117.67(C-7), 139.74(C-8), 49.65(C-9), 34.40(C-10), 20.72(C-11), 31.28(C-12), 43.01(C-13), 39.27(C-14), 21.75(C-15), 23.16(C-16), 29.85(C-17), 12.05(C-18), 13.23(C-19), 56.22(C-20), 19.04(C-21), 34.01(C-22), 39.77(C-23), 157.02(C-24), 55.23(C-25), 22.06(C-26), 22.19(C-27), 106.16(C-28).

화합물 2 - White needles, C₂₈H₄₄O₃, EI-MS: *m/z* 428[M]⁺, 410[M-H₂O]⁺, 396[M-O₂]⁺, 363[M-O₂-H₂O-CH₃]⁺, 271[M-C₉H₁₇-O₂]⁺, ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 0.75(3H, s, 18-CH₃), 0.75(3H, d, *J*=7.0 Hz, 27-CH₃), 0.76(3H, d, *J*=6.9 Hz, 26-CH₃), 0.81(3H, s, 19-CH₃), 0.84(3H, d, *J*=6.8 Hz, 28-CH₃), 0.93(3H, d, *J*=6.6 Hz, 21-CH₃), 3.90(1H, m, 3-H), 5.07(1H, dd, *J*=8.4, 15.3 Hz, 23-H), 5.15(1H, dd, *J*=7.5, 15.3 Hz, 22-H), 6.17(1H, d, *J*=8.5 Hz, 6-H), 6.44(1H, d, *J*=8.5 Hz, 7-H); ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ 34.65(C-1), 30.67(C-2), 66.42(C-3), 36.88(C-4), 79.40(C-5), 130.71(C-6), 135.36(C-7), 82.14(C-8), 51.03(C-9), 36.92(C-10), 20.85(C-11), 39.30(C-12), 44.52(C-13), 51.64(C-14), 23.37(C-15), 28.63(C-16), 56.14(C-17), 12.84(C-18), 18.15(C-19), 39.72(C-20), 20.60(C-21), 135.17(C-22), 132.30(C-23), 42.73(C-24), 33.03(C-25), 19.93(C-26), 19.61(C-27), 17.53(C-28).

통계학적 분석

모든 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 자료분석은 Student's *t*-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

낙엽송충버섯이 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 NO 생성을 저해활성에 미치는 작용을 실험한 결과 MeOH

추출물이 30 µg/ml의 농도에서 75%의 저해활성을 나타내었다. 용매 분획을 실시한 결과 hexane 분획에서 NO 생성을 저해하는 효과가 가장 좋게 나타났으며, H₂O 분획에서는 반대로 NO 생성을 촉진하는 결과를 얻었다. NO 생성을 저해하는 효과를 나타내는 성분을 분리하기 위하여 hexane 분획으로부터 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 ergosterol 유도체 2종을 분리하였다.

EI-MS와 ¹³C-NMR로부터 화합물 1은 ergosta-7,24(28)-dien-3-ol,^{16,17} 화합물 2는 5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol인 ergosterol peroxide로^{18,19} 그 구조를 규명할 수 있었으며 이미 보고된 문헌의 기기분석 자료와 일치하였다.

각 분획과 화합물 1 및 2의 LPS에 의해 유도된 NO 생성 저해 활성

iNOS에 의한 NO의 생성은 각 분획(10 µg/ml)의 단독 투여와 LPS와 병용 투여에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 존재하는 nitrite(NO₂)의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 각 분획을 단독 처리했을 때의 nitrite(NO₂)의 양은 H₂O 분획에서 유의성있는 증가를 나타냈으며 다른 분획에서는 변화가 없거나 배양액과 유사한 정도의 변화를 나타냈다. 각 분획과 LPS를 동시에 처리했을 때, H₂O 분획을 제외한 모든 분획에서 저해활성을 나타냈으며 hexane 분획에서 가장 강한 저해 활성이 관찰되었다(Fig. 1).

Hexane 분획에서 분리된 화합물 1과 2는 단독 투여에 의한 NO생성은 모두 대조군에 비해 별다른 차이가 인정되지 않았으나, LPS와 동시에 처리했을 때는 농도 의존적인 저해 활성이 관찰되었으며 화합물 1과 2의 IC₅₀ 값은 18.9±3.9 µM과 20.4±4.5 µM로 나타났다(Fig. 2, 3). 또한 이들 화합물은 본 연구에서

사용한 농도에서는 세포생존에 영향을 미치지 않았다.

화합물의 iNOS 유도 후 단계에 대한 저해활성

NO 생성 저해 기전을 알아보기 위해 먼저 효소에 대한 분리된 화합물의 영향을 알아보았다. LPS로 활성화된 iNOS는 수 시간에서 수일 동안 활성을 유지한다. 그러므로 LPS(1 µg/ml)로 RAW 264.7 세포를 20시간 동안 완전히 활성화시킨 후에 배양액 중의 LPS를 완전히 제거한 후에 새로운 배지로 교환하고 분리된 물질을 처리하였다. 20시간 후에 배양액 중에 생성된 nitrite 양을 Griess 반응으로 측정하여 세포내에 존재하는 iNOS에 대한 NO 생성저해를 조사하였다(Fig. 4). 양성대조군으로 L-arginine

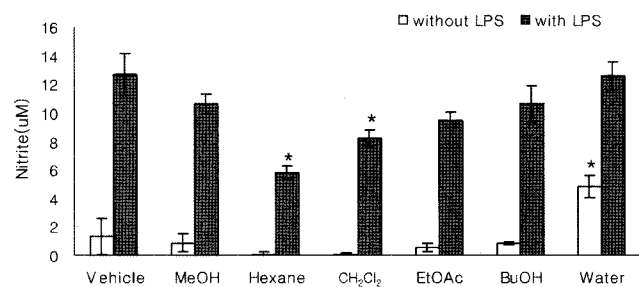


Fig. 1 – Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by MeOH extract and its fractions of *Phellinus pini*. RAW 264.7 cells (1.5×10⁵ cells/ml) were incubated for 24 hrs in DMEM containing 10% FBS and were treated for 18 hrs with MeOH extract and it's fractions of *Phellinus pini* (10 µg/ml) with or without LPS (1 µg/ml). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each data value is presented as mean±S.D. of three experiments. * Represent significant difference from control, * p<0.01.

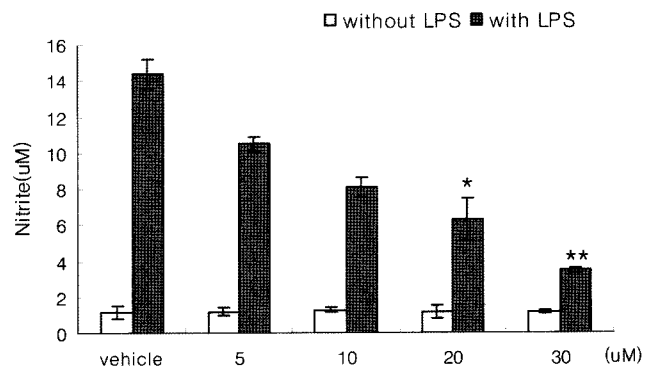


Fig. 2 – Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by compound 1. RAW 264.7 cells (1.5×10⁵ cells/ml) were incubated for 24 hrs in DMEM containing 10% FBS and were treated for 18 hrs with compound 1 with or without LPS (1 µg/ml). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each data value is presented as mean±S.D. of three experiments. * Represent significant difference from LPS control, * p<0.01, ** p<0.001.

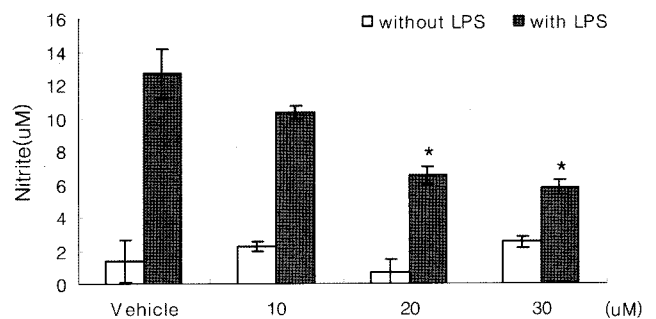


Fig. 3 – Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by compound 2. RAW 264.7 cells (1.5×10⁵ cells/ml) were incubated for 24 hrs in DMEM containing 10% FBS and were treated for 18 hrs with compound 2 with or without LPS (1 µg/ml). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each data value is presented as mean±S.D. of three experiments. * Represent significant difference from LPS control, * p<0.01.

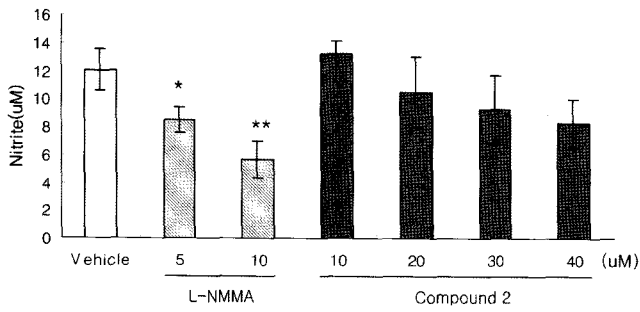


Fig. 4 - Effect of compound 2 on nitrite production when RAW 264.7 cells were incubated with effector for 20 hrs after LPS-activation for 20 hrs LPS (1 µg/ml). * Represent significant difference from control, * p < 0.01, ** p < 0.001.

과의 기질경쟁에 의해 iNOS에 대해 저해활성을 나타내는 L-NMMA를 사용하였다.

동일하게 처리한 양성대조구 L-NMMA는 10 µg/ml에서 43%의 저해활성을 나타내었고 화합물 2는 iNOS가 활성화된 후에도 농도에 비례하여 NO 생성 저해활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 화합물 2에 대하여 RAW 264.7 세포를 이용한 항염작용이 보고되어 있으니²⁰⁾ 본 연구를 통하여 iNOS 유도 후 단계에서도 저해활성이 있음을 확인하였다.

결 론

낙엽송충버섯(*Phellinus pini*) MeOH 추출물의 hexane 분획에서 NO 생성저해를 확인할 수 있었고, 그 활성분획중에서 ergosterol 유도체 2종, ergosta-7,24(28)-dien-3-ol(1), 5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol(2)을 분리하였다. 각 물질의 NO 생성 저해작용을 확인한 결과, 농도 의존적인 저해 활성이 관찰되었으며 물질 1, 2의 IC₅₀ 값은 18.9±3.9 µM과 20.4±4.5 µM로 나타났다. 또한 화합물 2는 iNOS를 유도시킨 후에도 NO 생성 저해작용은 농도에 비례하여 증가 하는 경향을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2007년도 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1) 박완희, 이호득 : 한국약용버섯도감. 교학사, 서울 p. 562 (1999).
 2) Epimenko, O. M. and Ageenkova, L. V. : Chemical composition of the wood-rotting fungus, *Phellinus pini* var. *abietis*. *Kormovye Belki Fiziol.* **107**, 42 (1965).

3) Ayer, W. A., Muir, D. J. and Chakravarty, P. : Phenolic and other metabolites of *Phellinus pini*, a fungus pathogenic to pine. *Phytochem.* **42**, 1321 (1996).
 4) Lourenco, A., Lobo, A. M., Rodriguez, B. and Jimeno, M. L. : Ceramides from the fungus *Phellinus pini*. *Phytochemistry* **43**, 617 (1996).
 5) Yang, K. S. and Jang, H. J. : Inhibition of nitric oxide synthesis by ergosterol derivatives from *Phellinus pini* in LPS activated RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **50**, 367 (2006).
 6) Ikegawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. : Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155 (1968).
 7) Jeong, S. C., Cho, S. P., Yang, B. K., Jeong, Y. T., Ra, K. S. and Song, C. H. : Immunomodulating activity of the exopolymer from submerged mycelial culture of *Phellinus pini*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 15 (2004).
 8) Yang, B. K., Park, J. B. and Song, C. H. : Hypolipidemic effect of exo-polymer produced in submerged mycelial culture of five different mushroom. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 957 (2002).
 9) Stamler, J. S., Singel, D. J. and Loscalzo, J. : Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Scienc.* **258**, 1898 (1992).
 10) Galla, H. J. : Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 378 (1993).
 11) Knowles, R. G. and Moncada, S. : Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* **17**, 399 (1992).
 12) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
 13) Stuehr, D., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. and Nathan, C. F. : Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA* **88**, 7773 (1991).
 14) McCartney, F. N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. : Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749 (1993).
 15) Feelisch, M. and Stamler, J. : Methods in nitric oxide research. John Wiley and Sons, 492 (1995).
 16) Morris, D. C., Safe, S. and Subden, R. E. : Detection of the ergosterol and episterol isomers lichesterol and fecosterol in nystatin-resistant mutants of *Neurospora crassa*. *Biochemical Genetics* **12**, 459 (1974).
 17) 金昌洙 : 목질진흠버섯(*Phellinus linteus*)의 성분분석. 충북대학교 석사학위논문 (1997).
 18) Sheffer, M., Fried, A., Gottlieb, H. E., Tietz, A. and Avron, M. : Lipid composition of the plasma-membrane of the halotolerant alga, *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta.* **857**, 165 (1986).
 19) Takaishi, Y., Adachi, R., Murakami, Y., Ohashi, T., Nakano,

- K. and Tomimatsu, T. : A polyoxygenated steroid from *Lasiosphaera nipponica*. *Phytochemistry* **31**, 243 (1992).
- 20) Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M. and Shinmoto, H. : Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW 264.7 macrophage and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 209 (2007).