

## 돌단풍 (*Aceriphyllum rossii*)에서 분리한 플라보노이드의 항암활성

안은미 · 한재택<sup>1</sup> · 권병목<sup>2</sup> · 김성훈<sup>3</sup> · 백남인<sup>4,\*</sup>

대구한의대학교 한방식품약리학과, <sup>1</sup>(주)켄포트, <sup>2</sup>한국생명공학연구원, <sup>3</sup>경희대학교 동서의대학원, <sup>4</sup>경희대학교 생명자원과학연구원 및 식물대사연구센터

## Anti-cancer Activity of Flavonoids from *Aceriphyllum rossii*

Eun-Mi Ahn, Jae-Taek Han<sup>1</sup>, Byoung-Mog Kwon<sup>2</sup>, Sung-Hoon Kim<sup>3</sup> and Nam-In Baek<sup>4,\*</sup>

Department of Herbal Foodceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

<sup>1</sup>Chemport Inc., Seoul 150-834, Korea

<sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon 305-333, Korea

<sup>3</sup>College of Oriental Medicine, KyungHee University, Seoul 131-701, Korea

<sup>4</sup>Institute of Life Science & Resources, and Plant Metabolism Research Center, KyungHee University, Suwon 446-701, Korea

Received August 14, 2008; Accepted September 29, 2008

The methanol extract from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* was fractionated into ethyl acetate, *n*-BuOH and H<sub>2</sub>O layers through solvent fractionation. Repeated silica gel column chromatography of EtOAc and *n*-BuOH layers afforded five flavonol glycosides. They were identified as astragalins (1), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (2), rutin (3), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (4), and quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (5) on the basis of spectroscopic data. All of them showed an inhibition in farnesyl protein transferase (FPTase) activity, and rutin (3) inhibited the growth of rat H-*ras* cell and the cell migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

**Key words:** *Aceriphyllum rossii*, anti-cancer, cell migration, flavonol glycoside, FPTase, H-*ras*

### 서 론

정상세포가 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제제를 조절할 수 있는 데 비하여 암세포는 세포 내에 있는 조절기능이 상실되어 무제한으로 증식하는 미분화 세포로 이러한 미분화 세포로 구성된 종괴 또는 종양을 암이라고 한다. 암은 다양한 발암유전자의 발현에 의해 발병하는데, 그 중에서 *ras* 발암유전자는 인체 암의 30-50%에서 발견되는 유전자이다.<sup>1)</sup> 세포내에서 *ras*는 세포증식, 분화 등과 같은 다양한 기능을 수행하는데, 이 *ras* 유전자에 의해 발현되는 *ras* 단백질은 세포내부의 원형질막에 결합하여야 기능이 발현되므로 *ras* 단백질이 원형질막에 결합하는 것을 막게 되면 암 발달을 억제할 수 있다.<sup>2)</sup> *Ras* 단백질 활성화 과정 중에서 가장 중요한 과정은 carboxy 말단의 4번째 아미노산인 cysteine에 farnesyl 기가 도입되는 과정인데 이 과정에 관여하는 효소가 farnesyl protein

transferase(FPTase)이다. 이 효소의 저해제를 이용한 동물실험결과 선택적으로 암세포의 성장을 억제한다는 결과가 발표되고 있어서 항암제 탐색계로서 유력한 방법이라고 할 수 있다.<sup>3)</sup> 암세포는 궁극적으로 주위의 정상조직 또는 기관으로 침윤하여 정상세포를 파괴하고 새로운 성장 장소를 확보함으로써 개체의 생명을 빼앗는 질환이다. 암세포가 증식하기 위해서는 주위로부터 세포 증식에 필요한 양분이나 산소의 섭취와 아울러 세포 대사의 결과 생성된 노폐물의 배출이 필요하다. 암세포는 이를 위하여 신생혈관을 생성하여 세포증식을 계속할 수 있게 된다. 따라서 암의 증식과 전이는 신생혈관을 억제함으로써 감소시킬 수 있다. 암 전이는 크게 림프성 전이와 혈액성 전이로 구분되는데, 혈액성 전이가 일어나기 위해서는 여러 과정이 필요하다. 이 중에서 대표적인 것이 특정기관내의 혈관내피세포나 혈소판과의 접촉(cell adhesion), 주변조직으로의 침윤(invasion), 신생혈관의 생성 유도(angiogenesis), 세포이동(cell migration) 등이다. 그러므로 항암제 관련 연구는 암세포의 성장과 암전이 억제에 초점을 맞추어 연구할 필요가 있다.

한편, 암의 원인으로는 흡연, 식이, 대기오염, 자외선이나 방사선, 바이러스 등의 환경적 요인이 80~90%를 차지하며 그 밖의 원인으로는 유전과 성별에 의한 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 환경

\*Corresponding author

Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

적 요인 중에는 식이가 30~60%로 가장 큰 비중을 차지한다.<sup>5)</sup> 따라서 천연자원에서 항암제 개발을 위한 선도물질의 탐색은 의미 있다고 할 수 있다.

저자 등은 국내자생식물로부터 항암소재를 찾기 위한 연구의 일환으로 400여종의 국내산 자생식물 추출물의 FPTase 활성에 대한 억제효과를 검증하였다. 그 중 돌단풍의 MeOH 추출물이 유의성 있는 억제효과(100 µg/ml에서 FPTase의 활성을 대조군에 비하여 87% 억제)를 나타냈다. 돌단풍(*Aceriphyllum rossii*)은 범의귀과(Saxifragaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 북반구의 한대 및 온대지역이 원산지이다. 우리나라에서는 계곡의 물가 근처에 있는 벼랑이나 바위틈에서 자라며 뿌리줄기가 바위틈새로 벌어 나가면서 생장, 번식한다. 잎의 모양이 단풍잎과 비슷하고 바위틈에서 자란다고 하여 돌단풍이라고 부른다. 초봄에 연한 잎은 나물로 식용하며, 잎은 단풍잎을 닮아 있고 꽃은 붉은 보라색을 띠는 흰색의 작은 꽃이 무리 지어 매우 아름답게 피기 때문에 화단에서 관상용으로 기꾸거나 재배를 하기도 한다.<sup>6)</sup> 지금까지 돌단풍으로부터 triterpenoid<sup>7)</sup>와 플라보노이드<sup>8)</sup> 성분이 분리, 보고되어 있고, triterpenoid의 항보체활성<sup>9)</sup>과 세포독성<sup>10)</sup>에 관한 연구결과가 보고되어 있다. 하지만 FPTase에 대한 억제활성 등 항암관련 활성에 관하여는 보고된 바가 없다.

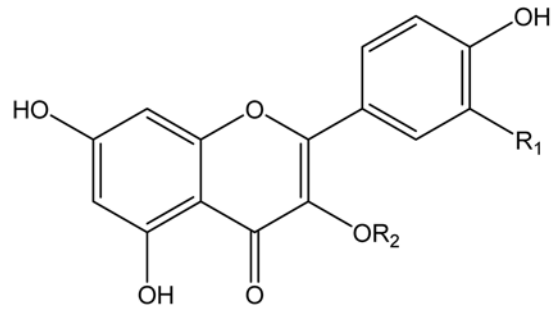
따라서 본 실험에서는 한국 자생의 식용 식물로 오랜 기간 동안 식품으로 섭취해 온 식물인 돌단풍에서 플라보노이드 화합물을 분리하고, 이들이 암과 관련된 효소, 즉 FPTase의 활성에 미치는 효과와 ras 도입세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 혈관생성과 관련된 cell migration의 억제 활성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 본 실험에 사용한 돌단풍(*Aceriphyllum rossii*)은 2006년 7월 경기도 가평 일대에서 채취하였으며, 우석대학교 약학대학 김대근 교수가 동정하였다. 표본시료는 경희대학교 생명과학대학 천연물화학실험실(KHU060722)에 보관되어 있다.

**시약 및 기기.** 시료의 추출과 분획에 사용한 유기 용매는 대정화학주식회사(서울, 한국)에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>와 RP-18 F<sub>254s</sub>를 사용하였고, TLC 상의 물질 검출에는 UV lamp(Spectroline, Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, New York, USA)와 10% aq. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400(Varian, California, USA)으로, 용점은 Fisher-Johns 용점측정기(Fisher Scientific, Pennsylvania, USA)를 사용하여 측정하였고, 미보정하였다. 비선광도는 P-1010(JASCO, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였고, IR 스펙트럼은 Spectrum One(Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)으로, FAB-MS는 JMS-700(JEOL, Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

**추출 및 분획.** 건조된 돌단풍 지상부 3 kg을 분쇄기로 분쇄한 후 80% MeOH 수용액(15 l)에 12시간 담가서 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과하고 남은 것은 동일한 방법으로 1회 더 반복 추출하였다. 얻어진 여액은 모두 합쳐 40°C 이하에서 감압 농축하여 MeOH추출물을 얻었다. MeOH 추출물을 ethyl



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1 H	β-D-Glc
2 H	α-L-Rhm(1→6)-β-D-Glc
3 OH	α-L-Rhm(1→6)-β-D-Glc
4 H	α-L-Rhm(1→4)-α-L-Rhm(1→6)-β-D-Glc
5 OH	α-L-Rhm(1→4)-α-L-Rhm(1→6)-β-D-Glc

Fig. 1. Structures of compounds 1-5 from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii*.

acetate(EtOAc, 1.5 l×2)와 물(1.5 l)로 분배 추출하고, 다시 물층은 *n*-butanol(*n*-BuOH, 1 l×2)로 분배 추출하였다. 얻어진 각층을 감압 농축하여 EtOAc 가용분획(78 g), *n*-BuOH 가용분획(132 g) 및 물분획을 얻었다.

**플라보노이드의 분리.** EtOAc 분획70g을 silica gel column chromatography(이하 c.c.)(EtOAc-*n*-BuOH-H<sub>2</sub>O=20:2:0.5)를 실시하여 6개의 분획물(ARE1~ARE6)을 얻었다. 그 중 ARE3(1.9 g) 분획에 대하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(4:1)로 silica gel c.c.를 실시하여 화합물 1(61 mg)을 분리하였다. 분획 ARE5(1.7 g)에 대하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(3:1)로 silica gel c.c.를 실시하여 화합물 2(56 mg)를 얻었다. *n*-BuOH 분획(125 g)에 대하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(7:4:1→6:4:1)을 기울기용리 방식으로 silica gel c.c.를 실시하여 11개의 분획물(ARB1~ARB11)을 얻었다. 분획 ARB4(2.5 g)에 대하여 EtOAc-*n*-BuOH-H<sub>2</sub>O(14:1:0.5)의 용매로 silica gel c.c.를 실시하여 화합물 3(48 mg)을 얻었고, 분획 ARB6(4.7 g)에 대하여 EtOAc-*n*-BuOH-H<sub>2</sub>O(7:2:0.5)의 용매로 silica gel c.c.를 실시하여 화합물 4(55 mg)를 분리하였다. ARB8분획에 대하여 EtOAc-*n*-BuOH-H<sub>2</sub>O(4:4:1)의 용매로 silica gel c.c.를 실시하여 화합물 5(32 mg)를 분리하였다.

**화합물 1(astragalín)** Yellow powder(MeOH-H<sub>2</sub>O); m.p. 178-180°C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: +16.0°(c=1.1, MeOH); pos FAB/MS *m/z*: 471 ([M+H]<sup>+</sup>), 449, 287; IR(KBr) ν: 3348, 2925, 2360, 1655, 1608, 1500 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>H</sub>) 8.03(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2',6'), 6.86(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3',5'), 6.35(1H, d, *J*=1.4 Hz, H-8), 6.16(1H, d, *J*=1.4 Hz, H-6), 5.22(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1"), 3.21~3.48(4H, m, H-2", 3", 4", 5"), 3.69(1H, dd, *J*=12.0, 2.2 Hz, H-6a"), 3.53(1H, dd, *J*=12.0, 5.4 Hz, H-6b); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>C</sub>) 179.2(C-4), 165.7(C-7), 162.7(C-5), 161.3(C-4'), 158.8(C-9), 158.2(C-2), 135.3(C-3), 132.2(C-2',6'), 122.6(C-1'), 115.9(C-3',5'), 105.6(C-10), 104.0(C-1"), 99.8(C-6), 94.7(C-8), 78.2(C-3"), 77.9(C-5"), 75.6(C-2"), 71.2(C-4"), 62.5(C-6").

**화합물 2**(kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside) Yellow powder(MeOH-H<sub>2</sub>O); m.p. 168-170°C;  $[\alpha]_{25}^D$ : -14.9°(c=1.3, MeOH); pos. FAB/MS *m/z*: 617 ([M+H]<sup>+</sup>), 595, 449, 287; IR(KBr) *v*: 3364, 2935, 2362, 1654, 1605, 1510 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_H$ ) 8.05 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2',6'), 6.88(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3',5'), 6.37(1H, s, H-8), 6.19(1H, s, H-6), 5.11(1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1"), 4.51(1H, s, H-1"), 3.25~3.81(9H, m, H-2", 2"', 3", 3"', 4", 4"', 5", 5"', 6"), 1.12(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6"); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_C$ ) 179.0(C-4), 165.7(C-7), 162.7(C-5), 161.2(C-4), 159.2(C-9), 158.2(C-2), 135.4(C-3), 132.2(C-2',6'), 122.5(C-1'), 116.0(C-3',5'), 105.5(C-10), 104.6(C-1"), 102.2(C-1"), 99.9(C-6), 94.8(C-8), 78.0(C-3"), 77.0(C-5"), 75.6(C-2"), 73.8(C-4"), 72.2(C-3"), 71.9(C-2"), 71.3(C-4"), 69.6(C-5"), 68.5(C-6"), 18.0(C-6").

**화합물 3**(rutin) Yellow powder(MeOH-H<sub>2</sub>O); m.p. 210-212°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : -8.8°(c=1.4, MeOH); pos. FAB/MS *m/z*: 633 ([M+H]<sup>+</sup>), 611, 465, 303; IR(KBr) *v*: 3410, 2935, 1658, 1560, 1502 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_H$ ) 7.66(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.62(1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.86(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.37(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-8), 6.19(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-6), 5.08(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1"), 4.52(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-1"), 3.25~3.81(9H, m, H-2", 2"', 3", 3"', 4", 4"', 5", 5"', 6"), 1.12(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6"); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_C$ ) 179.6(C-4), 165.7(C-7), 162.6(C-5), 159.1(C-9), 158.2(C-2), 149.6(C-4'), 145.6(C-3'), 135.5(C-3), 123.4(C-1'), 122.9(C-6'), 117.6(C-5'), 115.9(C-2'), 105.5(C-10), 104.7(C-1"), 102.2(C-1"), 99.8(C-6), 94.8(C-8), 78.0(C-3"), 77.0(C-5"), 75.6(C-2"), 73.8(C-4"), 72.1(C-3"), 72.0(C-2"), 71.2(C-4"), 69.6(C-5"), 68.5(C-6"), 17.9(C-6").

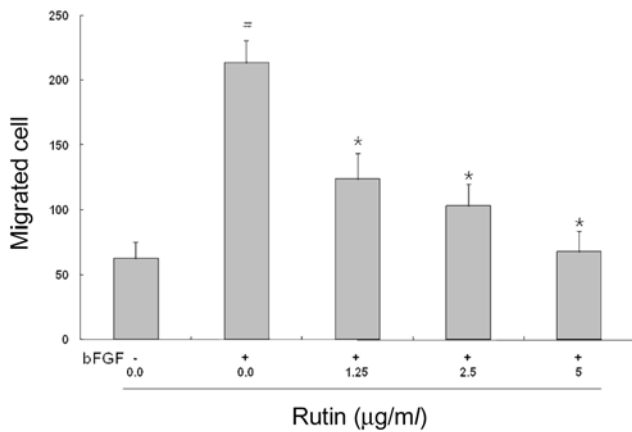
**화합물 4**(kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside) Yellow powder (MeOH-H<sub>2</sub>O); m.p. 171-172°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : -73°(c=0.5, MeOH); pos. FAB/MS *m/z*: 763([M+H]<sup>+</sup>), 741, 595, 449, 287; IR (KBr) *v*: 3420, 2930, 1660, 1565 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_H$ ) 8.01(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2',6'), 6.89 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3',5'), 6.37(1H, d, *J*=2.0 Hz H-8), 6.17(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.59(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-1"), 5.11(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-1"), 4.51(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-1"), 3.21~4.08 (13H, m, H-2", 2"', 2"', 3", 3"', 3"', 4", 4"', 4"', 5", 5"', 5"', 6"), 1.07(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6"), 0.98(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6"); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_C$ ) 179.0(C-4), 165.4(C-7), 162.9(C-5), 161.1(C-4'), 158.8(C-9), 158.2(C-2), 134.2(C-3), 132.0(C-2',6'), 123.4(C-1'), 116.0(C-3',5'), 105.8(C-10), 102.4(C-1"), 102.2(C-1"), 100.3(C-1"), 99.7(C-6), 94.7(C-8), 79.7(C-4"), 78.8(C-3"), 76.9(C-5"), 73.9(C-2"), 73.7(C-4"), 72.3(C-3"), 72.2(C-2"), 72.2(C-3"), 72.0(C-2"), 71.8(C-4"), 69.8(C-5"), 69.7(C-5"), 68.2(C-6"), 17.9(C-6"), 17.6(C-6").

**화합물 5**(quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside) Yellow powder

(MeOH-H<sub>2</sub>O); m.p. 204-205°C;  $[\alpha]_{20}^D$ : -2.3°(c=0.4, MeOH); pos. FAB/MS *m/z*: 779([M+H]<sup>+</sup>), 757, 611, 465, 303; IR (KBr) *v*: 3415, 2940, 1660, 1520 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_H$ ) 7.60(1H, d, *J*=2.4 Hz, H-2'), 7.59(1H, dd, *J*=8.8, 2.4 Hz, H-6'), 6.86(1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5'), 6.36(1H, d, *J*=2.0 Hz H-8), 6.17(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.58(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1"), 5.22(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-1"), 4.50(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-1"), 3.21~4.08(13H, m, H-2", 2"', 2"', 3", 3"', 3"', 4", 4"', 4"', 5", 5"', 5"', 6"), 1.06(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6"), 1.00(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6"); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_C$ ) 179.0(C-4), 165.4(C-7), 162.9(C-5), 158.7(C-9), 158.2(C-2), 149.4(C-4'), 145.7(C-3'), 134.3(C-3), 123.4(C-1'), 123.2(C-6'), 117.3(C-5'), 115.9(C-2'), 105.8(C-10), 102.5(C-1"), 102.1(C-1"), 100.4(C-1"), 99.6(C-6), 94.6(C-8), 79.9(C-4"), 78.8(C-3"), 77.0(C-5"), 74.0(C-2"), 73.8(C-4"), 72.3(C-3"), 72.2(C-2"), 72.2(C-3"), 72.1(C-2"), 71.8(C-4"), 69.9(C-5"), 69.7(C-5"), 68.3(C-6"), 17.9(C-6"), 17.5(C-6").

**FPTase 활성 측정<sup>1)</sup>**: FPTase 활성은 [<sup>3</sup>H]-scintillation proximity assay(SPA) 방법을 이용하여 실시하였다. FPTase 활성은 Biotin-KKKSSTKCVIM(FPTase의 기질로서 Ki- *Ras* C-terminal sequence)에 [<sup>3</sup>H] farnesyl pyrophosphat로부터 [<sup>3</sup>H] farnesyl group의 전이를 측정하여 결정하였다. 반응용액(최종 부피: 100  $\mu$ l)은 50 mM HEPES, pH 7.5, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 0.01% triton X-100, 150~250 mM [<sup>3</sup>H] farnesyl pyrophosphate(60  $\mu$ M, 1 Ci/ $\mu$ l), 5  $\mu$ g의 부분 정제된 FPTase, 10~200 nM Biotin-KKKSSTKCVIM을 포함하고 있으며, 시료는 DMSO(vehicle)에 녹여 첨가하였다. 60분 동안 37°C에서 반응시킨 후, 150  $\mu$ l의 STOP/bead 시약을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 시료를 잘 섞은 후 실온에서 30분 동안 방치한 후, 1450 Microbeta Counter(Wallac, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)를 이용하여, Biotin-KKKSSTKCVIM에 transfer된 [<sup>3</sup>H] farnesyl의 양을 측정함에 의해 FPTase 활성을 측정하였다. 효소 억제활성은 다음과 같이 나타났다. 활성저해율(%)=[1-(S-B2)/(C-B1)] $\times$ 100; S: 시료와 효소 처리, B2: 시료만 처리, C: 효소만 처리, B1: 무처리. 각 실험은 3반복하였다.

**Rat H-ras에 대한 Cell Growth Inhibition Assay.** Rat의 H- *ras*(H- *ras*-transformed NIH3T3) 세포주는 10% fetal bovine serum을 포함하는 DMEM을 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 humidified-incubator에서 배양하였다. Cell growth inhibition assay는 WST-1(Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland) 방법으로 실시하였다. 80%로 성장한 융합세포들(NIH3T3, H- *ras*)을 trypsinization 하여 microtiter plate의 각 well에 3,000-5,000 cells/well 되게 나누어 넣었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 대기조건에서 24시간 동안 배양한 후 각 well로부터 media를 제거하였다. 저해제를 DMSO에 녹인 후, media로 농도를 희석하여 (0.1% DMSO) 각 well에 처리하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 대기조건에서 48시간 동안 저해제를 처리한 후, cell proliferation assay를 위해 대사적 활성 cell의 mitochondria dehydrogenase에 의해 bioreduction되는 WST-1(Cell Proliferation Reagent)을 넣고 4시간 동안 다시 배양한 다음 microplate reader(Bio-Rad,



**Fig. 2. Inhibition activity of rutin (3) on cell migration of HUVECs.** HUVECs were pretreated with 1.25, 2.5, and 5 µg/ml of rutin (3) for 1 hr. Cells were stimulated with 5 ng/ml of bFGF and allowed to migrate through transwell for 2 hrs. The migrated cells were counted with optical microscope ( $\times 200$ ). Bars represent the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test. # indicates statistical significance of  $p < 0.01$  with respect to negative control (without bFGF treatment), and \* does of  $p < 0.01$  with respect to positive control (with bFGF treatment).

California, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Cell Migration Assay.** 정상 혈관내피세포인 human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)은 삼성 산부인과(수원)에서 공급받아 primary culture 한 것을 0.1% gelatine이 coating된 plate에서 3 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) 5 unit/ml heparin, antibiotics가 첨가된 M199배지에서 배양하였고, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다. Membrane filter(pore size 12.0 µM)가 부착된 48 well boyden chamber를 사용하여 invasion assay를 실시하였다. HUVECs 세포 현탁액 ( $5 \times 10^5$  cell/ml)을 0.1% BSA를 함유한 배지에 시료 혹은 단독으로 transwell의 upper chamber에 넣고, lower chamber에는 bFGF(5 ng/ml)를 넣고 2시간 배양하였다. 배양 완료 후 transwell의 upper chamber 내의 배지를 제거하고 membrane을 통과한 세포를 고정시키고 Diff-Quik I 용액과 Diff-Quik II 용액으로 염색하고 광학현미경( $\times 200$ )으로 transwell을 통과한 세포의 수를 세었다. 각 실험은 3반복하였으며, 통계처리는 student *t*-test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

들단풍 지상부로부터 얻어진 MeOH 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O로 순차 분획하고 각 분획은 감압 농축하여 3개의 분획을 얻었다. EtOAc 및 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 5개의 화합물을 분리하였다. 이들 화합물의 구조는 astragalinal(1), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (2), rutin(3), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside(4), quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside(5)로 기존의 문헌과 비교하여 각각 구조 결정하였다.<sup>12-14)</sup>

이들 플라보노이드 화합물들은 식물화학물질 중 가장 주목을 받고 있는 생리활성물질군의 하나로, 항산화,<sup>15)</sup> 항암,<sup>16)</sup> 항혈전,<sup>17)</sup> 항염증,<sup>18)</sup> 항알러지<sup>19)</sup> 및 항균작용<sup>20)</sup> 등 다양한 생리활성을 보여주고 있다. 이와 같이 플라보노이드 화합물들의 생리활성이 널리 알려지면서 이들 물질을 이용한 식품 및 의약품 개발에 관심 및 연구가 지속적으로 증가하고 있다. 따라서 들단풍에서 분리한 플라보노이드 화합물들의 항암활성을 확인하기 위하여 발암 유전자 *ras*의 기능발현에 관련이 깊은 효소인 FPTase의 활성에 미치는 영향과, H-*ras*가 도입된 rat 세포주의 생장에 미치는 영향 및 신생혈관 형성의 중요한 단계의 하나인 cell migration 억제 활성을 검색하였다.

들단풍의 지상부로부터 분리한 5종의 flavonol 배당체 화합물의 FPTase 활성에 미치는 영향을 실험하였는데 그 결과는 Table 1과 같다. 모든 flavonol 배당체가 100 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 FPTase의 활성을 34.0%에서 78.1%까지 억제하는 것으로 나타났다. Flavonol 화합물 중에서 3번 탄소에 수산기를 가진 quercetin 배당체가 수산기를 갖지 않은 kaempferol 배당체보다 저해활성이 더 높게 나타났으며, 또한 결합한 당의 개수가 적을수록 저해활성이 더 높게 나타났다. 플라보노이드 화합물이 FPTase 활성에 미치는 효과의 정도는 FPTase의 활성 부위에 적절한 크기의 플라보노이드가 수소결합 또는 극성결합을 통하여 어느 정도 강하게 결합하는가에 따라 달라진다. 문헌<sup>21)</sup>을 보면 C환의 C-2와 C-3 사이에 이중결합을 가진 flavone 이나 flavonol이 단일결합을 가진 flavanone이나 flavanonol보다 FPTase에 대한 저해 활성이 더 높은 것도 극성의 차이가 원인

**Table 1. Inhibitory effects of flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* on FPTase activity, rat H-ras cell growth, and HUVECs migration<sup>a</sup>**

Sample No.	FPTase <sup>b</sup>			rat H-ras <sup>c</sup> (1 µg/ml)	Migration <sup>d</sup> (10 µg/ml)
	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml		
1	54.2 $\pm$ 2.8%	- <sup>e</sup>	-	8.1 $\pm$ 1.9%	-
2	43.7 $\pm$ 2.9%	-	-	0	-
3	78.1 $\pm$ 6.7%	68.7 $\pm$ 4.8%	49.7 $\pm$ 2.4%	34.6 $\pm$ 3.7%	98.6 $\pm$ 3.8%
4	34.0 $\pm$ 3.2%	-	-	7.7 $\pm$ 2.8%	-
5	40.5 $\pm$ 3.5%	-	-	32.8 $\pm$ 3.2%	-

<sup>a</sup>Data represent the mean  $\pm$  SD of three replications. <sup>b</sup>FPTase assay was conducted using a scintillation proximity assay (SPA) kit following the protocol described by the manufacturer except that a biotinylated substrate peptide containing the Ki-Ras carboxyl-terminal sequence was used. <sup>c</sup>Cell growth inhibition assay was carried out using rat H-ras cell following the WST-1 (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland) method. <sup>d</sup>Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used for cell migration inhibition assay. <sup>e</sup>The inhibition activity was not examined.

이 될 수 있다. 또한 B환에 수산기가 도입되면 저해활성이 높아지는데, 수산기의 개수가 1개보다는 2개의 경우가 활성이 더 높았으며, 수산기가 methoxy기로 변환되면 극성이 낮아지면서 활성도 낮아지는 것을 알 수 있다.<sup>21)</sup> 하지만 A 환의 경우는 C-5나 C-7에 수산기가 도입되어도 활성이 크게 달라지지 않아,<sup>21)</sup> A환의 극성의 정도는 활성에 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이는 플라보노이드 화합물의 전체적인 입체구조도 활성과 관련이 있기 때문이라고 할 수 있다. 이번 실험의 결과나 문헌<sup>21-23)</sup>에서도 플라보노이드 배당체의 경우가 aglycone 보다 저해 활성이 낮게 나타났고, 결합한 당의 개수가 많을수록 저해활성도 낮아졌다. 이는 배당체의 경우는 극성을 높여주는 해도, 분자의 크기가 커지면서 FPTase의 결합부위에 대한 결합이 어려워지기 때문으로 생각된다. Isoflavonoid의 경우도 수산기의 개수나 이중결합의 유무에 상관 없이 저해활성이 낮은<sup>24)</sup> 이유는 입체적인 구조의 차이에 따른 결과라고 할 수 있다.

위의 화합물들 중에서 가장 활성이 높게 나타난 화합물 3(rutin)을 농도를 달리하여 처리하였고, 얻어진 값으로부터 IC<sub>50</sub> 값을 10 µg/ml로 결정하였다. FPTase는 암발생 유전자중에서 H-ras의 기능발현에 결정적인 영향을 미친다. 따라서 이번에 분리한 flavonol 배당체가 H-ras가 도입된 rat 세포주의 생장에 미치는 영향을 실험하였다. 각 화합물을 1 µg/ml 처리하였을 때, 화합물 3(rutin)과 화합물 5(quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→4)-α-L-rhamnopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside)는 각각 34.6%와 32.8%의 성장억제 효과를 보였고, 다른 화합물들은 뚜렷한 억제효과는 보이지 않았다. Quercetin 계열의 플라보노이드인 화합물 3과 5는 FPTase를 이용한 효소 활성 억제 실험에서도 좋은 효과를 보였고, 활성 검증을 위한 cell을 이용한 실험에서도 억제활성을 보였으므로 항암물질로서의 유용성이 있다고 판단되었다. 한편, 문헌<sup>24)</sup>에서는 유사한 실험에서 apigenin이나 kaempferol과 같은 flavone이나 flavonol 화합물에서도 활성이 있는 것으로 보고되고 있으나 각각 25 µM과 같이 높은 농도에서 측정된 것이라 이번 실험에서 활성을 보이지 않은 kaempferol 계 화합물인 화합물 1, 2, 4도 처리 농도를 높이면 활성을 보일 것으로 생각된다.

한편, 암이 단순히 무절제한 성장만을 하는 것이 문제라면 조기 진단과 수술을 통하여 치료의 목적을 달성 할 수 있을 것이다. 그러나 암은 이웃 조직 또는 멀리 떨어져 있는 장기로 전이할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이를 위하여 암조직은 암세포의 무한 증식을 위하여 외부로부터 산소와 영양분을 공급받음과 동시에 세포대사의 결과 생성된 노폐물을 배출해야 하기 때문에 새로운 혈관의 형성이 반드시 필요하다.<sup>25,26)</sup> 신생혈관형성은 activator의 자극을 받은 다음 endothelial cell activation, migration, proliferation, tube formation, extracellular matrix(ECM) remodeling과 vascular stabilization의 순으로 일어난다.<sup>27)</sup> 최근의 연구 결과들을 종합해보면 angiogenesis 등에 H-ras oncogene이 밀접한 관련이 있다는 연구결과가 발표되고 있어서 ras 발암 유전자의 조절은 암세포의 성장 및 암전이에 필수적인 신생혈관 형성도 조절이 가능하다고 생각된다.<sup>28)</sup> 신생혈관형성 과정 중 cell migration을 억제함으로써 암세포의 전이를 효율적으로 억제할 수 있다. 따라서 FPTase 활성 억제 효

과가 가장 크게 나타난 화합물 3(rutin)을 이용하여 bFGF로 유도된 HUVECs의 cell migration 억제 활성을 실험하였다. Table 1을 보면 화합물 3(rutin)을 10 µg/ml로 처리하였을 때 HUVECs의 migration이 거의 완전히 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 농도를 1.25, 2.5, 5 µg/ml로 처리하여 실험하였는데, 억제활성이 농도의존적으로 나타났으며, 5 µg/ml 농도에서 96% 이상 억제하는 것으로 나타났다. 문헌<sup>29)</sup>에서도 쥐의 endothelial cell을 이용한 migration 억제 실험에서 rutin은 10 µg/ml의 처리농도에서 50%의 억제활성을 보였다. 한편 wound assay 법을 이용한 원숭이 endothelial cell의 migration 억제 실험에서 quercetin은 10-100 µM의 농도에서 농도의존적으로 migration 억제 효과를 보여,<sup>30)</sup> rutin과 같은 quercetin 계열의 flavonol 화합물이 다양한 기원의 세포에서도 migration을 억제하는 효과가 있다고 할 수 있다.

이상의 결과로 보아 돌단풍의 flavonol 배당체는 H-ras 암유전자의 기능발현에 깊은 관계를 가진 FPTase의 활성을 억제함으로써 암발달을 억제할 뿐만 아니라, 암전이에 필요한 신생혈관형성의 중요한 단계인 세포이동을 억제하는 것으로 관찰되었다. 특히 화합물 3(rutin)은 FPTase 활성 억제를 통하여 암의 성장을 조절하고, 신생혈관 생성을 억제하여 항암효과를 나타내는 것을 확인하였다. 물론 신생혈관의 형성 과정은 여러 가지의 기전들이 다양하게 일어나는 종합적인 과정이기 때문에 다른 기전을 통해 신생혈관 형성능이 저해 될 수 있으므로 앞으로도 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. Rutin뿐만 아니라 플라보노이드 화합물의 경우 angiogenesis와 관련하여 proliferation, migration, tube formation 등에 대하여 억제활성을 보인 연구결과가 많이 보고되고 있고, 그 활성기작도 규명되어 있다.<sup>29,33)</sup> 따라서 플라보노이드 화합물, 특히 항암과 관련하여 활성이 높은 flavonol 화합물을 함유하고 있는 돌단풍이 건강기능식품 또는 더 나아가 의약품의 소재로서의 개발 가능성이 있다고 여겨지며, 추후 이와 관련된 연구가 활발히 추진 될 것으로 기대한다.

초 록

돌단풍 지상부를 80% MeOH로 추출하고, 얻어진 추출물을 EtOAc, n-BuOH 및 H<sub>2</sub>O로 용매 분획하였다. 이 중 EtOAc 및 n-BuOH 분획으로부터 silica gel chromatography를 반복하여 5개의 화합물을 분리하였다. 각 화합물의 화학구조는 NMR, MS 및 IR 등의 스펙트럼 데이터를 해석하여, astragalín (1), kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside (2), rutin(3), kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside(4), quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside(5)로 동정하였다. 이들 화합물은 FPTase 활성을 억제하였으며, 특히 화합물 3(rutin)은 rat H-ras 세포주의 성장과 bFGF로 유도시킨 HUVECs의 cell migration을 억제하는 것으로 나타났다.

**Key words:** cell migration, flavonol 배당체, FPTase, H-ras, 돌단풍, 항암

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21및 한국과학재단 우수연구센터 (경희대학교 식물대사연구센터) 사업에서 지원한 연구비로 수행되었음.

## 참고문헌

- Bos, J. L. (1989) *Ras* oncogenes in human cancer. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689.
- Feramisco, J. R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M. and Sweer, R. W. (1984) Microinjection of the oncogene from of human H-*ras* (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* **38**, 109-117.
- Kohl, N. E., Wilson, F. R., Mosser, S. D., Giuliani, E., de Solms, S. J., Conner, M. W., Anthony, N. J., Holtz, W. J., Gomez, R. P. and Lee, T. J. (1994) Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of *ras*-dependent tumors in nude mice. *PNAS* **91**, 9141-9145.
- Folkman, J. (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* **29**, 15-18.
- Doll, R. and Peto, R. (1981) The cause of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 1191-1308.
- Lee, W. T. (1996) In *Standard Illustrations of Korean Plants: Aceriphyllum rossii* (1<sup>st</sup> ed.) Academy Press, Seoul, Korea.
- Han, J. T., Kim, H. Y., Park, Y. D., Lee, Y. H., Lee, K. R., Kwon, B. M. and Baek, N. I. (2002) Aceriphyllinic acid A, a new ACAT inhibitory triterpenoid from *Aceriphyllum rossii*. *Planta Medica* **68**, 558-561.
- Han, J. T., Bang, M. H., Chun, O. K., Kim, D. O., Lee, C. Y. and Baek, N. I. (2004) Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 390-395.
- Min, B. S., Lee, I. S., Chang, M. J., Yoo, J. K., Na, M. K., Hung, T. M., Thoung, P. T., Lee, J. P., Kim, J.-H., Kim, J. C., Woo, M. H., Choi, J. S., Lee, H. K. and Bae, K. H. (2008) Anticomplementary activity of triterpenoids from the whole plant of *Aceriphyllum rossii* against the classical pathway. *Planta Medica* **74**, 726-729.
- Lee, I. S., Yoo, J. K., Na, M. K., Min, B. S., Lee, J. P., Yun, B. S., Jin, W. Y., Kim, H. J., Youn, U. J., Chen, Q. C., Song, K. S., Seong, Y. H. and Bae, K. H. (2007) Cytotoxicity of triterpenes isolated from *Aceriphyllum rossii*. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 1376-1378.
- Oh, H. M., Jwon, B. M., Baek, N. I., Kim, S. H., Lee, J. H., Eun, J. S., Yang, H. J. and Kim, D. K. (2006) Inhibitory activity of 6-*O*-angeloylprenolin from *Centipeda minima* on farnesyl protein transferase. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 64-66.
- Choi, W. H., Park, W. Y., Hwang, B. Y., Oh, G. J., Kang, S. J., Lee, K. S. and Ro, J. S. (1998) Phenolic compounds from the stem bark of *Cornus walteri* Wagner. *Kor. J. Pharmacog.* **29**, 217-224.
- Webby, R. F. and Markham, K. R. (1990) Flavonol 3-*O*-triglycosides from *Actindia* species. *Phytochemistry* **29**, 289-292.
- Beck, M. A. and Haberlein, H. (1997) Flavonol glycoside from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry* **50**, 329-332.
- Lee, M. W., Lee, Y. A., Park, H. M., Toh, S. H., Lee, E. J., Jang, H., D. and Kim, Y. H. (2000) Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 455-458.
- Kashiwada, Y., Nonada, G., Nishioka, I., Chang, J. J. and Lee, K. H. (1992) Antitumor agents, 129 tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.* **55**, 1033-1043.
- Choo, M. K., Park, E. K., Yoon, H. K. and Kim, D. H. (2002) Antithrombotic and antiallergic activities of daidzein, a metabolite of puerarin and daidzin produced by human intestinal microflora. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1328-1332.
- Theoharides, T. C., Alexandrakis, M., Kempuraj, D. and Lytinas, M. (2001) Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **14**, 119-127.
- Kobo, M., Matsuda, M., Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S. (1984) Scutellariae Radix. X. Inhibitory effects of various flavonoids on histamine release from rat peritoneal mast cells *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 5051-5054.
- Middleton, R. and Drzewiecki, G. (1984) Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 3333-3338.
- Kang, H. M., Kim, J. H., Lee, M. Y., Son, K. H., Yang, D. C., Baek, N. I. and Kwon, B. M. (2004) Relationship between flavonoid structure and inhibition of farnesyl protein transferase. *Nat. Prod. Res.* **18**, 349-356.
- Baek, N. I., Kim, D. S., Lee, Y. H., Park, J. D., Lee, C. B. and Kim, S. I. (1995) Cytotoxicities of ginseng saponins and their degradation products against some cancer cell lines. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 164-168.
- Liu, J. J., Huang, T. S., Cheng, W. F. and Lu, F. J. (2003) Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *Int. J. Cancer* **106**, 59-565.
- Kuo, M. L., Lin, J. K., Huang, T. S. and Yang, N. C. (1994) Reversion of the transformed phenotypes of v-H-*ras* NIH3T3 cells by flavonoids through attenuating the content of phosphotyrosine. *Cancer Lett.* **87**, 91-97.
- Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**, 27-31.
- Carmeliet, P. and Siegel, Y. (1992) Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364.
- Arbiser, J. L., Moses, M. A., Fernandez, C. A., Ghiso, N., Cao, Y., Klauber, N., Frank, D., Brownlee, M., Flynn, E., Parangi, S., Byers, H. R. and Folkman, J. (1997) Oncogenic H-*ras* stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *PNAS* **94**, 861-866.
- Guruvayoorappan, C. and Kuttan, G. (2007) Antiangiogenic effect of rutin and its regulatory effect on the production of VEGF, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in tumor associated macrophages. *J. Biol. Sci.* **7**, 1511-1519.
- Chen, Y., Li, X.-X., Xing, N.-Z. and Cao, X.-G. (2008)

- Quercetin inhibits choroidal and retinal angiogenesis *in vitro*. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **246**, 373-378.
31. Lin, C. M., Chang, H., Chen, Y. H., Wu, I. H. and Chiu, J. H. (2006) Wogonin inhibits IL-6-induced angiogenesis *via* down-regulation of VEGF and VEGFR-1, not VEGFR-2. *Planta Medica* **72**, 1305-1310.
32. Van der Bij, Gerben, J., Boegels, M., Oosterling, S. J., Kroon, J., Schuckmann, D. T. M., de Vries, Helga, E., Meijer, S., Beelen, R. H. J. and van Egmond, M. (2008) Tumor infiltrating macrophages reduce development of peritoneal colorectal carcinoma metastases. *Cancer Lett.* **262**, 77-86.
33. Bang, M. H., Jung, Y. J. and Kim, W. K. (2004) Effects of several flavonoids on cancer cell motility in human fibrosarcoma HT 1080 cells. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 739-743.