

## 보골지 및 염초보골지의 proteasome 저해 작용

심상희\*

영남대학교 생명공학부

### Protesome Inhibition Activity of Psoraleae Semen and Processed Psoraleae Semen

Sang Hee Shim\*

School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

**Abstract** – Ubiquitin-proteasome proteolytic system plays an important role in selective protein degradation and regulates cellular events including apoptosis. Cancer cells have been shown to be more sensitive to the proapoptotic effects of proteasome inhibition than normal cells. Thus, proteasome inhibitor can be potential anticancer agent. Since the MeOH extracts of psoraleae semen and processed psoraleae semen showed potent proteasome inhibition activity, the fractions of the extracts were evaluated on the activity to screen the proteasome inhibitors. The  $\text{CHCl}_3$  fr. of the processed psoraleae semen showed the most potent activity, of which chemical investigation led to two coumarins, psoralen and isopsoralen. Their structures were determined by spectroscopic methods such as  $^1\text{H-NMR}$  and EIMS spectra.

**Key words** – proteasome inhibitor, *Psoralea corylifolia*, structure determination, psoralen, isopsoralen

보골지(*Psoralea corylifolia* Linn.)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 1년생 초본으로 파고지라고도 불리우며 개암풀의 열매를 말린 것이다. 보골지는 예로부터 신장을 보하고 양기를 크게 북돋아 주는 약재로 전해지며, 새벽설사나 남자 성기능 저하, 발기부전, 유정 등의 치료에 널리 응용되어 왔다. 또한 허리나 무릎이 냉하고 아픈 증상을 치료하며 냉한기침을 개선시키기도 하는 것으로 알려져 왔다.<sup>1)</sup> 현대의 약리학적 연구에 의하면, 보골지는 인체의 면역기능을 높여주는 작용이 있으며, 관상 동맥의 혈류량을 개선하고 심장의 능률을 높이며 심혈관에 대한 뇌하수체 후엽소와 유사한 해로운 작용을 저하시키는 데에 좋은 효과가 있는 것으로 알려졌다.<sup>2)</sup> 또한 백반증이나 원형탈모증을 개선하고 자궁출혈 등의 치료에도 응용되고 있다. 최근의 연구에 의하면, 보골지는 *Helicobacter pylori*균에 저해작용,<sup>3)</sup> 폐경 증후군의 개선,<sup>4)</sup> 항균 및 항진균 작용,<sup>5)</sup> 항산화작용,<sup>6)</sup> antidermatophytic 효과,<sup>7)</sup> 항종양 작용,<sup>8)</sup> chemical carcinogenesis 억제 작용,<sup>9)</sup> trypsin 저해 작용<sup>10)</sup> 등이 있는 것으로 보고되어 왔다. 지금까지 기술한 바와 같이 보골지에는 무한한 약리 활성이 있는 것으로 알려져 왔다.

염초보골지는 보골지를 수리한 것으로 보골지의 신찬은 조(辛竄溫燥)한 성질을 완화시키고 약성을 신장으로 이끌어 보신(補腎)의 작용을 증강시켜, 허리통증, 무릎이 시리거나 냉습이 찻을 때 모든 저린 증상, 골절, 유뇨, 장결핵 등에 사용한다.

보골지 및 염초보골지의 성분으로는 psoralen, isopsoralen, psoralidin등과 같은 coumarins,<sup>11)</sup> corylifolin, corylin과 같은 flavones,<sup>12-13)</sup> BHT, bakuchiol, psoracorylifols 등과 같은 phenol성 물질들이 보고되어 왔다.<sup>14)</sup>

항암 치료에 있어 ubiquitin protease pathway (UPP)의 생물학적 역할이 최근 들어 중요하게 인식되었다. UPP는 진핵 세포에서 세포내 단백질을 분해하는 주요한 경로로 세포주기, 신호전달, 유전자 전이 및 세포 사멸(apoptosis)에 중요한 역할을 하는 세포 단백질 조절에 중요한 역할을 한다.<sup>15)</sup> Proteasome은 에너지 의존적 단백질 분해 기작의 중심적인 효소군으로 20S core와 19S regulator로 구성되어 있으며, proteasome은 주로 내인성 단백질과 반응하기 때문에 proteasome의 단백 분해 작용을 저해하면 NF- $\kappa$ B의 signaling action이 차단됨으로써 암세포의 유사 분열이 저해되어 apoptosis에 의한 세포 사멸, angiogenesis 및 metagenesis의 저해가 일어나는 것으로 알려져 왔다.<sup>16)</sup>

\*교신저자(E-mail): shshim29@ynu.ac.kr  
(FAX): 053-810-4769

실제로 정상 세포는 proteasome의 활성이 잠시 억제되더라도 세포분열 능력을 회복하는데 반해 여러 가지 암세포들은 proteasome의 활성이 잠시라도 억제되면 곧바로 사멸 과정으로 들어가는 것으로 전임상 실험 결과 밝혀졌다.<sup>17)</sup> 이는 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미치는 기존의 다른 항암제와 달리 정상세포에 미치는 영향이 상대적으로 적음을 의미한다. 최초의 proteasome 저해제로 개발된 항암제는 bortezomib (Velcade<sup>TM</sup>, Millenium)으로 2003년 미국 FDA에 허가를 받았다.<sup>18)</sup> 이 분야는 항암제 연구 분야에서 최근 각광받고 있으며 계속 연구 진행 중이다.

Proteasome은 특히 chymotrypsin과 유사한 단백 분해 작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 실제로 보골지에서 trypsin 저해 작용을 나타내는 성분이 있는 것으로 보고되었다.<sup>10)</sup>

이에 본 연구자는 보골지 및 염초보골지의 추출물에서 proteasome 저해 작용이 있는 성분을 규명하는 것을 목표로 activity-guided fractionation에 따라 보골지 및 염초보골지의 메타놀 추출물을 극성에 따라 5개의 분획으로 나누고 각각의 분획물에 대해 proteasome 저해 효과를 측정하여 이를 보고하고자 한다. 또한 활성 분획에서 분리된 2종의 화합물의 구조에 대해서도 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 보골지 및 염초보골지는 대구시내 약전 골목에서 구입하여 전문가의 확인을 거쳐 사용하였다. 표본은 영남대학교 생명공학부의 천연물화학 연구실에 보관 중이다.

**시약 및 기기** - NMR spectra는 Bruker ARX spectrometer (250 MHz)의 Bruker's standard pulse program을 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 나타내었다. 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F254 (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 Merck의 70~230 Mesh의 silica gel을 사용하였다. Proteasome 저해 작용 측정을 위해 효소, 기질, buffer 등은 Biomol<sup>®</sup> International LP의 20S Proteasome Assay Kit (AK-740)을 사용하였고 기질로 사용된 Suc-LLVY-AMC에서 유리된 AMC의 fluorescence를 측정하기 위한 fluorescence plate reader로 FLOUoptima가 사용되었다.

**추출, 분획 및 분리** - 건조된 보골지 및 염초 보골지 각 1 kg 씩을 먼저 Hexane 5 리터에 5일씩 3회 반복하여 percolation 시켜 Hexane 분획을 얻었다. 그 후 다시 메타놀로 냉침하였다(5 L×4회). 메타놀 추출물을 농축한 후 극성에 따라 n-Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, n-BuOH 순

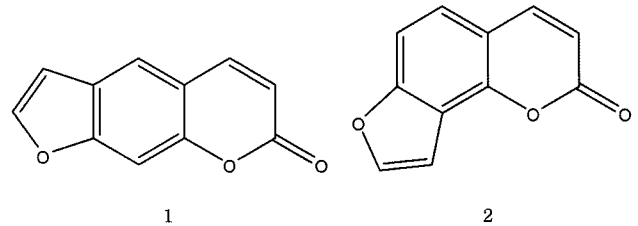


Fig. 1. Chemical structures of psoralen (1) and isopsoralen (2).

으로 분획하였다. 이 중 chloroform 층에 대하여 n-Hexane 및 Ethyl acetate의 gradient 용매로 용리시켜 전부 20개의 분획을 얻었다. 이 중 13번째 및 15번째 분획을 n-Hexane, Ethyl acetate 및 MeOH 용매로 재결정을 유도하여 화합물 1과 2를 분리하였다.

**화합물 1:** Colorless crystals. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.36 (1H, d, J=9.6 Hz, H-3), 6.82 (1H, dd, J=0.9, 2.4 Hz, H-3'), 7.46 (1H, br s, H-8), 7.67 (1H, s, H-5), 7.68 (1H, d, J=2.4 Hz, H-2'), 7.78 (1H, d, J=9.6 Hz, H-4); EIMS m/z 186 [M]<sup>+</sup> (98), 158 [M-CO]<sup>+</sup> (100).

**화합물 2:** Colorless crystals. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.36 (1H, d, J=9.6 Hz, H-3), 7.09 (1H, m, H-3'), 7.34 (1H, d, J=8.5 Hz, H-5), 7.40 (1H, d, J=8.5 Hz, H-6), 7.66 (1H, br d, J=2.1 Hz, H-2'), 7.78 (1H, d, J=9.6 Hz, H-4); EIMS m/z 186 [M]<sup>+</sup> (100), 158 [M-CO]<sup>+</sup> (85).

**Proteasome 저해 작용 측정** - Biomol<sup>®</sup> International LP의 20S Proteasome Assay Kit (AK-740)의 사용설명서에 준하여 실험하였고 모든 구성 성분들은 사용 직전 assay buffer나 DMSO에 희석하여 사용되었다. Proteasome은 인간 적혈구에서 분리, 정제된 것이고 기질은 Suc-LLVY-AMC이며 사용된 assay buffer를 activation 시키기 위하여 SDS (sodium dodecyl sulfate)가 사용되었다. Positive control로는 20S Proteasome의 chymotrypsin-like activity의 비가역적 저해제인 epoximicin이 사용되었다. 보골지 및 염초보골지의 추출물, 분획들은 DMSO에 4 mg/mL의 용액으로 제조한 후 이 용액 10 μL에 assay buffer 70 μL를 가하여 제조되었다. 측정 시 먼저 assay buffer에 3% SDS를 가하여 activation 시킨 후 96 well에 sample, enzyme를 가한 후 37°C에서 10 분간 incubation 시켰다. 그 후 기질(Suc-LLVY-AMC)을 가하였고, 이로써 proteasome의 chymotrypsin-like activity는 효소-기질 반응의 결과 유리되는 AMC의 양을 fluorescence plate reader로 excitation 355 nm, emission 460 nm에서 측정함으로써 결정되었다.

## 결과 및 고찰

보골지 및 염초보골지의 MeOH 추출물 및 극성에 따른

**Table 1.** Proteasome inhibitory activities of fractions from psoraleae semen and processed psoraleae semen

Sample	Inhibition (%)
보골지 MeOH ex.	91
보골지 n-Hexane fr.	50
보골지 CHCl <sub>3</sub> fr.	87
보골지 EtOAc fr.	75
보골지 H <sub>2</sub> O fr.	60
염초보골지 MeOH ex.	74
염초보골지 n-Hexane fr.	45
염초보골지 CHCl <sub>3</sub> fr.	96
염초보골지 EtOAc fr.	80
염초보골지 H <sub>2</sub> O fr.	70

Inhibition rates were calculated as percentages with respect to the control value.

4개 분획물들의 proteasome inhibition activity를 측정된 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 볼 수 바와 같이 보골지 및 염초보골지의 MeOH 추출물은 각각 91%, 74%로 강한 proteasome 저해 작용을 나타냈다. 분획물들 중 비극성 분획 CHCl<sub>3</sub> 층이 87%(보골지), 96%(염초보골지)로 가장 강한 proteasome 저해 작용을 나타냈고 그 다음 EtOAc 층도 75%(보골지), 80%(염초보골지)로 강한 저해 작용을 나타냈다. 그러나 proteasome 저해 작용은 수치에 크게 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다.

가장 활성이 강한 염초보골지의 CHCl<sub>3</sub> 분획물을 대상으로 column chromatography를 시행하여 2종의 화합물을 분리하였고 이들의 구조를 <sup>1</sup>H-NMR 및 EI-MS를 측정하여 결정할 수 있었다.

화합물 1의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 coumarin의 특징적인  $\alpha$ -pyrone ring에서 기인한 H-3 및 H-4가 각각  $\delta$  6.36 및 7.78에서 doublet ( $J=9.6$  Hz)으로 나타남을 확인할 수 있었다. 또한  $\delta$  6.82 및 7.68에서 각각 doublet ( $J=2.4$  Hz) 또는 doublet of doublet ( $J=0.9, 2.4$  Hz)으로 두 개의 proton signal이 나타나 이 화합물이 furanocoumarin 골격을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. Coumarin의 H-5가  $\delta$  7.67에서 singlet으로 나타났고, H-8은  $\delta$  7.46에서 H-3' (dd,  $J=0.9, 2.4$  Hz)과 long range coupling 하여 broad singlet으로 나타났음을 확인할 수 있었으며, 또한 H-4가 broad doublet으로 나타나 H-8과 long range coupling함을 확인할 수 있었다. 이 화합물의 EIMS spectrum에서는  $m/z$  186에서 molecular ion peak이, 여기서 CO가 탈리된 signal이  $m/z$  158에서 나타나 이를 NMR spectrum과 종합하여 이 화합물의 구조를 보골지에서 다량으로 존재한다고 알려진 psoralen으로 결정하였고 이 data는 문헌치와 일치하였다.<sup>6)</sup>

화합물 2 역시 <sup>1</sup>H-NMR spectrum의  $\delta$  6.36 및 7.78에서

coumarin의 특징적인 H-3 및 H-4를 확인할 수 있었고, 역시  $\delta$  7.09 및 7.66에서 furan 기의 존재를 확인하여 furanocoumarin 골격을 지님을 확인할 수 있었다. 이 화합물의 경우 coumarin의 benzene ring에 기인한 proton 들이  $\delta$  7.34 및 7.40에서 각각  $J=8.5$  Hz의 doublet 으로 ortho coupling 함을 확인하여 angular-type의 furanocoumarin임을 확인할 수 있었다. 또한 H-3'이 multiplet 으로, H-6'가 broad doublet 으로 나타나 이 두 proton들이 서로 long range coupling 함을 확인할 수 있었다. 이들 NMR data와 EIMS data를 이용하여 이 화합물이 보골지에서 다량으로 존재하는 것으로 알려진 isopsoralen임을 확인할 수 있었고 문헌의 기기분석 data와 잘 일치하였다.<sup>6)</sup>

## 사 사

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구 (KRF-2007-E00113)이며 이에 감사를 표합니다. 또한 본 연구에 많은 도움을 준 영남대학교 생명공학부 학부 학생 김유진에게 감사를 표합니다.

## 인용문헌

1. Jiangsu New Medical College, Dictionary of Traditional Chinese Herbs, Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai, 1985, p. 1178.
2. Wang, S. (2006) Research survey of pharmacological effects of Fructus Psoraleae. *Shizhen Guoyi Guoyao*, 17, 1081-1082.
3. Yin, S., Fan, C-Q., Dong, L., and Yue, J-M. (2006) Psoracorylifols A-E, five novel compounds with activity against *Helicobacter pylori* from seeds of *Psoralea corylifolia*. *Tetrahedron*, 62: 2569-2575.
4. Zhang, C. J., Wang, S. X., Zhang, Y., Chen, J. P., and Liang, X. M. (2005) *In vitro* estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 98: 295-300.
5. Yin, S., Fan, C-Q., Wang, Y., Dong, L., and Yue, J-M. (2005) Antibacterial prenylflavone derivatives from *Psoralea corylifolia*, and their structure-activity relationship study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 4387-4392.
6. Guo, J., Weng, X., Wu, H., Li, Q., and Bi, K. (2005) Antioxidants from a Chinese medicinal herb - *Psoralea corylifolia* L. *Food Chemistry*, 91: 287-292.
7. Prasad, N. R., Anandi, C., Balasubramanian, S., and Puglendi, K. V. (2004) Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 21-24.

8. Latha, P. G., Evans, D. A., Panikkar, K. R., and Jayavar-dhanan, K. K. (2000) Immunomodulatory and antitumour properties of *Psoralea corylifolia* seeds. *Fitoterapia*, **71**: 223-231, 2000
9. Latha, P. G. and Panikkar K. R. (1999) Inhibition of chemical carcinogenesis by *Psoralea corylifolia* seeds. *Journal of Eth-nopharmacology*, **68**: 295-298.
10. Yang, X., Li, J., Wang, X., Fang, W., Bidochka, M. J., She, R., Xiao, Y., and Pei, Y. (2006) Psc-AFP, an antifungal pro-tein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*, **27**: 1726-1731.
11. Khastgir, H. N., Duttagupta, P. C., and Sengupta, P. (1961) The structure of psoralidin. *Tetrahedron*, **14**: 275-283.
12. Gupta, G. K., Dhar, K. L., and Atal, C. K. (1978) Corylinal: A new isoflavone from seeds of *Psoralea corylifolia*. *Phy-tochemistry*, **17**: 164.
13. Suri, J. L., Gupta, G. K., Dhar, K. L., and Atal, C. K. (1978) Psoralenol: A new isoflavone from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Phytochemistry*, **17**: 2046.
14. Mehta, G., Nayak, U. R., and Dev, S. (1973) Meroterpenoids-I: *Psoralea corylifolia* Linn.-1. Bakuchiol, a novel monot-erpene phenol *Tetrahedron*, **29**: 1119-1125.
15. Myung, J., Kim, K. B., and Crews, C. M. (2001) The Ubiq-uitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.*, **21**: 245-273.
16. Almond, J. B. and Cohen, G. M. (2002) The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, **16**: 433-443.
17. Adams, J. (2004) The Proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat. Rev.*, **4**: 349-460.
18. Paramore, A. and Frantz, S. (2003) Fresh from the pipeline: Bortezomib. *Nat. Rev.*, 611-612.

(2008년 2월 19일 접수)