

느티나무에서 단리한 카달렌 화합물에 관한 연구 III*¹ - 7-Hydroxy-3-methoxycadalene의 글루코오스 유도체화 -

최준원*^{2†} · 이오규*³ · 조명행*⁴ · 최돈하*³

Studies on the Cadalene Compounds From *Zelkova serrata* Wood III*¹

- Glucosylation of 7-hydroxy-3-methoxycadalene -

Joon-Weon Choi*^{2†} · Oh-Kyu Lee*³ · Myung-Haing Cho*⁴ · Don-Ha Choi*³

요 약

본 연구에서는 느티나무 심재부에서 단리한 7-hydroxy-3-methoxycadalene이 나타내는 세포독성을 경감시키고 물에 대한 낮은 용해도를 향상시킬 목적으로 반응물의 7번 위치에 존재하는 수산기를 친수성이 강하고 세포독성이 없는 글루코오스로 치환시켜 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을 합성하였으며, 수율은 약 55%에 이르렀다. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene은 반응 전 7-hydroxy-3-methoxycadalene에 비해 물에 대한 수용성이 크게 증가하였다. 카달렌-글루코오스 유도체는 정상 폐조직 세포(WI-38 cell line)와 폐암 세포주(A-549 cell line)에 대한 세포생존율, 즉 반수치사율(IC50)이 각각 298.2 μM과 88.6 μM로 나타났다. 이러한 결과는 7-hydroxy-3-methoxycadalene에 글루코오스 한 분자를 치환함으로써 폐암세포의 증식억제에 미치는 약리적 효과가 3배 이상으로 향상되었음을 의미한다.

ABSTRACT

In order to alleviate the cyto-toxicity and improve the poor water solubility of 7-hydroxy-3-methoxycadalene, it was substituted with glucose, a strong hydrophilic and non cyto-toxic

*¹ 접수 2008년 12월 10일, 채택 2009년 1월 13일

*² 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Dept. Forest Science, CALS, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*³ 국립산림과학원 화학미생물과, Div. Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

*⁴ 서울대학교 수의과대학, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

† 주저자(corresponding author) : 최준원(e-mail: cjw@snu.ac.kr)

compound, in the C-7 position. The yield of final product was ca. 55.4%. The IC₅₀ values of 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene against normal lung cell (WI-38 cell line) and human lung cancer cell (A-549 cell line), which is a parameter for determination of cell viability, were measured to 298.2 μm and 88.6 μm, respectively. This result indicates that the pharmaceutical efficiency of the cadalene-glucose derivative targeted to lung cancer cell could be improved more than three times compared to the non derivatized cadalene. In addition, glycosylation of 7-hydroxy-3-methoxycadalene turned its hydrophobic property to more soluble in water.

Keywords: *Zelkova serrata*, 7-hydroxy-3-methoxycadalene, glycosylation, 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene, IC₅₀ value, WI-38 cell line, A-549 cell line

1. 서 론

일반적으로 카달렌은 나프탈렌 구조의 세스퀴테르펜류 화합물에 속하며, 주로 느릅나무과 수목을 비롯하여 다양한 식물군에서 발견되고 있다(Fracheboud *et al.*, 1968; Lindgren *et al.*, 1968; Stipanovic *et al.*, 1981; Wiart *et al.*, 2001). 7-Hydroxy-3-methoxycadalene은 느릅나무과 중에서 느티나무 심재부에만 존재하는 특이한 천연물질로 이 화합물의 우수한 항산화활성은 이미 검증되어 고부가가치 의약품 원료로 활용할 목적으로 항암 활성에 대한 연구가 진행되고 있다(Lee *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2008; 2009). Kim (2004a; 2004b) 등은 실험용 쥐를 대상으로 폐암 발병원인 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)와 7-hydroxy-3-methoxycadalene을 동시에 처리한 실험용 쥐에서 카달렌 처리농도가 증가함에 따라 폐암 발생율이 45%에서 10%까지 크게 감소하는 점으로 미루어 7-hydroxy-3-methoxycadalene이 폐암세포분열에 관여하는 중요한 단백질의 발현을 억제시켜 폐암세포의 성장이나 증식을 억제하는 것으로 추측하였다(Jin *et al.*, 2007). 그러나 이러한 우수한 생물학적 효능에도 불구하고 7-hydroxy-3-methoxycadalene은 비교적 저 농도 범위에서 세포 생존율에 영향을 미치는 단점과 물에 잘 녹지 않는 지용성 성질은 의약품 원료나 식품첨가제로 활용하기 위해 보완해야 할 사항으로 지적되었다. 따라서 본 연구에서는 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 세포독성 저감과 물에

대한 용해도를 향상시킬 목적으로 본 화합물의 7번 위치에 존재하는 수산기에 글루코오스를 부착시킨 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을 합성하였으며, 이에 대한 세포독성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료 및 시약

카달렌-글루코오스 유도체 합성에 이용한 카달렌 화합물(7-hydroxy-3-methoxycadalene)은 3등급 느티나무 심재부에서 단리하였다. 7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadalene 합성에는 penta-O-acetyl-β-D-glucopyranose (Aldrich 285943)을 사용하였다. 그 외 합성반응에 필요한 triethylamine (Aldrich 471283), methylene chloride, boron trifluoride diethyl etherate (BF₃.OEt₂, Aldrich 216607), n-butylamine (Aldrich 471305), sodium bicarbonate, magnesium sulfate와 메탄올 등은 reagent 급 시약을 사용하였다.

2.2. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene의 글루코오스 유도체화

이 반응의 첫 과정은 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 7번 위치에 존재하는 수산기를 아세틸화(acetyl)된 글루코오스로 치환하는 단계와 여기서 합성된 중간물질인 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-

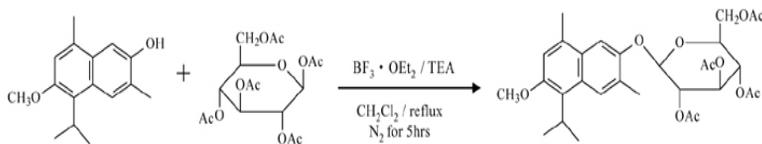


Fig. 1. Preparation of 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadale.

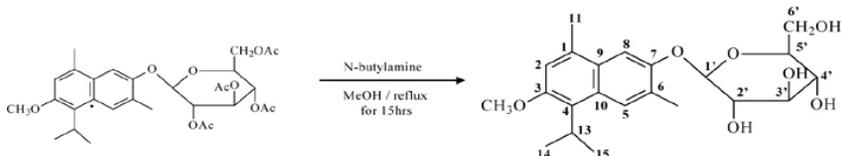


Fig. 2. Glucosylation of 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadale.

3-methoxycadale에서 아세틸기를 제거하여 최종 목표물질을 얻는 두 단계의 합성과정으로 구성되었다(Oyama *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001).

2.2.1. 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadale 제조

첫 단계 반응은 7-hydroxy-3-methoxycadale (1.22 g)과 penta-O-acetyl-β-D-glucopyranose (2.25 g)을 100 ml의 등근 플라스크에 넣고, triethylamine (0.23 ml)가 섞인 CH₂Cl₂ (20 ml)를 첨가하여 용해시켰다. 질소 조건하에서 이 용액에 BF₃ · OEt₂ (2 ml)가 용해된 CH₂Cl₂ (5 ml)를 첨가한 후에 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 다음 혼합액에 포화 sodium bicarbonate를 첨가하고 CH₂Cl₂ (20 ml)로 세 번 추출한 후에 농축하였다. 순수한 상태의 중간 생성물을 얻기 위해서 반응생성물질을 포화용액이 되도록 소량의 메탄올에 용해하고 12시간 동안 -4°C 상태로 보관하여 결정체를 유도하였다. 이렇게 형성된 결정을 조심스럽게 분리하여 메탄올로 세척한 후에 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadale 분자량을 EI-MS (JMS-600W, JOEL)로 확인하였다(2.11 g, 수율 약 73.4%).

2.2.2. 7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadale 제조

두 번째 반응은 중간물질로 획득한 7-O-(tetra-

O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadale 결정체를 등근 플라스크에 넣고 메탄올(50 ml)과 *n*-butylamine (3.5 ml)을 첨가하여 15시간 동안 환류조건 하에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 반응용액을 농축시키고 분취용 박층크로마토그래프로 이물질을 제거하여 최종 반응 생성물인 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadale을 획득하였다(1.13 g, 수율 약 55.4%). 7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadale의 구조와 분자량은 EI-MS와 ¹H- 및 ¹³C-NMR로 구조를 확인하였다.

2.3. 7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadale의 세포독성 측정

카달렌-글루코오스 유도체의 세포독성을 측정하기 위해 CCK-8 assay를 실시하였다. 본 실험에서는 human non-small cell lung cancer cell 중 adenocarcinoma cell line인 A549를 사용하였으며, 10% FBS가 함유된 RPMI 배지로 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. A549 cell을 96 well plate에 well 당 1 × 10⁴ cells을 넣어주고 안정화 시킨 후에 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadale를 최고농도(500 μm)에서부터 공비를 2로 두어 처리 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포의 mitochondria에만 침투하여 오렌지색의 formazan을 형성하는 수용성 tetrazolium salt-8를 처리하여

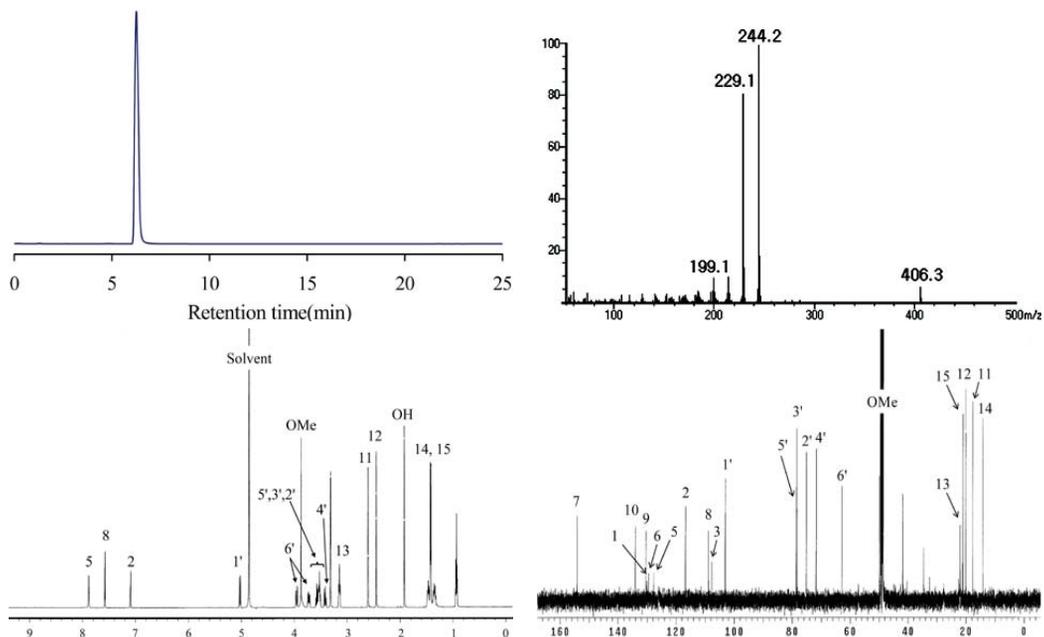


Fig. 3. Instrumental analysis of 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene. Above left; HPLC chromatogram, above right; molecular weight determination (EI-MS), below left; ¹H-NMR spectrum, below right; ¹³C-NMR spectrum.

75분 동안 배양한 후 microplate reader를 사용하여 455 nm와 650 nm에서 OD (optical density)값을 측정하여 IC₅₀을 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene의 글루코오스 유도체 제조

7-Hydroxy-3-methoxycadalene은 느티나무 심재부에서 추출한 천연물질로서 인간의 폐암세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내는 특징을 지니고 있다 (Kim *et al.*, 2004a; 2004b; Jin *et al.*, 2007). 그러나 위 화합물은 이러한 유용한 생리활성과 동시에 일정 농도 이상에서는 치명적인 세포독성을 띠고 있는 것으로 판명되었다(Choi *et al.*, 2008). 아울러 물에 대한 용해도가 극히 낮다. 이러한 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 화학적, 생물학적 특이성은 의약

품이나 식품 첨가제로서의 활용도 면에서 상당한 취약점으로 지적되었다. 따라서 7-hydroxy-3-methoxycadalene를 폐암치료제와 같은 고부가가치 의약품 원료로 활용하기 위해서는 세포독성을 낮추고 물에 대한 용해도를 향상시키는 연구는 필수적이다.

카달렌 화합물의 물에 대한 용해도를 향상시키기 위해서는 카달렌 화합물에 수용성 관능기를 치환시키는 방법을 들 수 있다. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene은 화학 구조적으로 7번 위치에 반응성이 높은 수산기가 존재하고 있으며, 이는 적당한 화학반응에 의해서 수용성 관능기로 치환할 수 있다. 주요 수용성 관능기로는 -SH, Salt화, PEG와 글루코오스/셀로비오스 등을 들 수 있다.

본 실험에서는 위의 여러 수용성 관능기 중에서 글루코오스를 이용하여 카달렌 유도체화를 시도하였다. 즉, 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 7번 수산기에 글루코오스 한 분자를 치환하여 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene를 합성하였

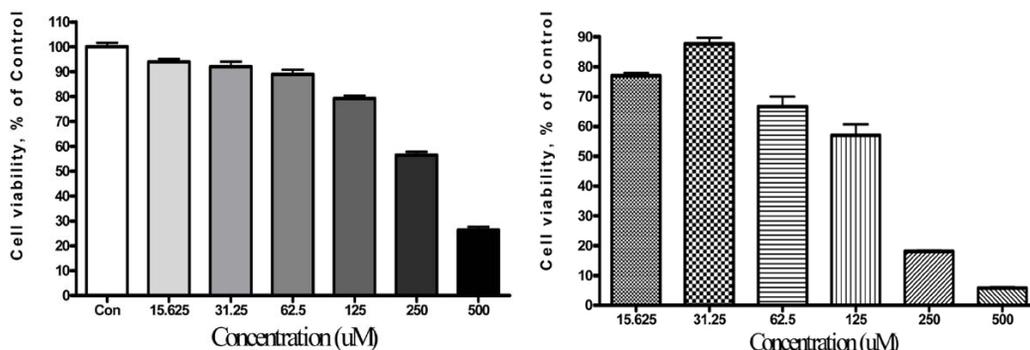


Fig. 4. Comparison of cell viability for 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene between normal lung cell line WI-38 and lung carcinoma cell line A-549.

으며, 수율은 약 45%에 이르렀다. 7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadalene에 대한 분석 데이터인 HPLC 크로마토그램, EI-MS, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼을 Fig. 3에 각각 제시하였다. HPLC 크로마토그램에서 보듯이 반응 후에 반응 혼합물로부터 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene를 매우 순수한 상태로 분리하였으며, EI-MS 분석에 의해 분자량이 406 m/z 임을 확인하였다. 합성한 유도체의 ¹³C-NMR 스펙트럼은 Fig. 3에서 보듯이 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 탄소 피크들과 함께 102 ppm 부근에 글루코오스의 anomeric 탄소(C1) 피크가 뚜렷하게 나타났으며, 그 외의 글루코오스 탄소들에 대한 피크들은 80~60 ppm 부근에서 명확하게 발견할 수 있었다.

3.2. 7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 세포독성 평가

7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadalene이 정상세포 및 폐암 세포주에 미치는 독성을 측정하기 위해 사람 정상 폐조직 세포인 WI-38 cell line과 폐암세포주인 A-549 cell line을 대상으로 세포생존율을 측정하여 Fig. 4에 제시하였다. 7-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxycadalene이 정상세포(좌)와 폐암세포주(우)에 대한 세포생존율, 즉 반수치사율(IC₅₀)은 각각 298.2 μM와 88.6 μM로 나타났다. 이러한 결과는 7-hydroxy-3-methoxycadalene에 글루

코오스 한 분자를 치환함으로써 정상세포에 대한 세포독성이 경감되었을 뿐만 아니라 폐암세포 증식억제에 미치는 약리적 효과가 3배 이상으로 향상되었음을 의미한다. 이와 함께 카달렌의 7번 수산기를 글루코오스로 치환함으로써 지용성이던 카달렌의 물에 대한 용해도가 크게 향상되었다.

카달렌-글루코오스 유도체 제조방법은 카달렌의 산업적 용도개발을 위해 세포독성 경감과 물에 대한 용해도 향상이라는 문제점에 대한 해결방안을 제시했다는 데 의미가 있다. 나아가 카달렌-글루코오스 유도체를 폐암 치료제와 같은 고부가가치 의약품 원료로 활용하기 위해서는 글루코오스가 치환된 카달렌이 폐암세포 증식억제에 미치는 약리적 작용에 대한 명확한 학문적 규명이 뒷받침되어야 할 것이다.

4. 결 론

느티나무 심재부에서 단리한 세스퀴테르펜류 화합물인 7-hydroxy-3-methoxycadalene은 항산화활성과 항암효능 등 우수한 약리적 효과에도 불구하고 자체적으로 지닌 세포독성과 물에 대한 낮은 용해성에 기인하여 고부가가치 용도개발에 있어서 극복해야 할 문제점으로 지적되어 왔다. 본 연구는 이러한 문제점을 해결하기 위해 카달렌 화합물의 7번 위치에 존재하는 반응성 높은 수산기를 친수성이면서 세포독성이 없는 글루코오스로 치환하여 수율 약 55%의 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을

합성하였다. 카달렌-글루코오스 유도체는 반응 전 7-hydroxy-3-methoxycadalene과 비교하여 자체 세포독성은 경감되었고 물에 대한 용해도도 크게 향상되었다. 더욱이 카달렌에 글루코오스 한 분자가 치환된 후에도 7-hydroxy-3-methoxycadalene이 나타내던 폐암세포 증식억제효과에는 변함이 없었다. 특히, 카달렌-글루코오스 유도체는 정상세포보다 폐암 세포주에 대한 반수치사율이 3배 이상 높게 나타났는데, 이는 유도체화에 의해 폐암세포에 대한 항암효과가 3배 이상 향상되었음을 의미한다.

사 사

본 연구는 농림부의 농림기술개발사업 지원에 의해 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Choi, J. W., S. H. Mun, and D. H. Choi. 2008. Study on cadalene compounds purified from *Zelkova serrata* Wood I. Purification of 7-hydroxy-3-methoxycadalene and its distribution in xylem. *Mokchae Konghak* 36: 130~137.
2. Choi, J. W., S. H. Mun, and D. H. Choi. 2009. Study on cadalene compounds purified from *Zelkova serrata* Wood II. Biological activities of 7-hydroxy-3-methoxycadalene and purification of cadalene homologues. *Mokchae Konghak* 37: 63~71.
3. Fracheboud, M., J. W. Rowe, R. W. Scott, S. W. Fanega, A. J. Buhl, and J. K. Toda. 1968. New sesquiterpenes from yellow wood of slippery elm. *Forest Products Journal* 18: 37~40.
4. Jin, H., H. W. Kim, C. X. Xu, J. T. Kwon, S. K. Hwang, E. S. Lee, S. S. Chang, S. J. Park, M. S. Noh, M. A. Woo, K. N. Yu, H. J. Lee, J. W. Choi, D. H. Choi, and M. H. Cho. 2007. Effects of 7-hydroxy-3-methoxycadalene on cell cycle, apoptosis and protein translation in A549 lung cancer cell. *Biofactor* 29: 67~75.
5. Kim, J. H., H. J. Lee, G. S. Kim, D. H. Choi, S. S. Lee, J. K. Kang, C. H. Chae, N. W. Paik, and M. H. Cho. 2004b. Inhibitory effects of 7-hydroxy-3-methoxycadalene on 4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Lett* 213: 139~145.
6. Kim, J. H., H. J. Lee, S. C. Yeon, D. H. Choi, S. S. Lee, J. K. Kang, C. H. Chae, N. W. Paik, K. H. Lee, and M. H. Cho. 2004a. Antioxidative effects of 7-hydroxy-3-methoxy-cadalene extracted from *Zelkova serrata* on 4(methylnitros amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced oxidative stress in A/J mice. *Phytotherapy Research* 5: 425~427.
7. Lee, S. S., H. J. Lee, H. Y. Kang, and D. H. Choi. 2000. Studies on biological activity of wood extractives (II): antimicrobial and antioxidative activity of heart wood extractives. *Mokchae Konghak* 28: 32~41.
8. Lee, Y. S., E. S. Rho, Y. K. Kim, B. T. Kim, and K. H. Kim. 2001. Practical β -stereoselective O-glycosylation of phenols with penta-O-acetyl- β -D-glucopyranose. *Journal of carbohydrate chemistry* 20: 503~506.
9. Lindgren, B. O. and C. M. Svahn. 1968. Extractives of elm wood. *Phytochemistry* 7: 1407~1408.
10. Oyama, K. and T. Kondo. 1999. Highly efficient β -glycosylation of the acidic hydroxyl groups, phtanol and carboxylic acid, with an peracetylated glucosyl fluoride using a combination of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ and DTBMP as a promoter. *Synlett* 10: 1627~1629.
11. Stipanovic, R. D., G. A. Greenblatt, R. C. Beier, and A. A. Bell. 1981. 2-Hydroxy-7-methoxycadalene. The precursor of lacinilene C 7-methyl ether in *Gossypium*. *Phytochemistry* 20: 7298~730.