

식나무 뿌리에서 분리한 트리테르페노이드계 화합물의 IL-6 저해효과

김청룡 · 김홍광 · 신지은 · 최은진 · 우은란*

조선대학교 약학대학

Inhibition of IL-6 Production in TNF- α Stimulated MG-63 by the Triterpenoids Isolated from *Aucuba japonica*

Qinglong Jin, Hong-Guang Jin, Ji Eun Shin, Eun Jin Choi and Eun-Rhan Woo*

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

Abstract – Six triterpenoid compounds, friedelin (1), 3 α -hydroxy-2-friedelanone (2), canophyllol (3), oleanolic aldehyde acetate (4), ursolic acid (5), and pachysandiol A (6) were isolated from the methylene chloride soluble fraction of the roots of *A. japonica*. The chemical structures of compounds 1-6 were determined by the basis of physico-chemical properties and spectroscopic methods such as 1D and 2D NMR. These compounds were isolated from this plant for the first time. For the isolated compounds (1-3), the inhibitory effect of IL-6 production in TNF- α stimulated MG-63 was examined. Among the isolates, 3 α -hydroxy-2-friedelanone (2) showed potent inhibitory effect on IL-6 production in TNF- α stimulated MG-63.

Key words – *Aucuba japonica*, Cornaceae, Triterpenoid, IL-6 inhibitory effect.

식나무(*Aucuba japonica* Thunb.)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 상록관목으로서 제주도, 울릉도, 전남, 경남의 산의 낮은 지대에서 자라며, 일본에도 분포한다. 식나무는 높이가 3m에 달하고 잎은 대생, 타원상 난형 또는 타원상 피침형이며 예두 또는 점첨두이고 길이 5~20 cm, 너비 2~10 cm로서 양면에 털이 없고 표면은 윤채가 있으며 가장자리에 치아상의 톱니가 있고 엽병은 길이 2~5 cm로서 표면에 얇은 홈이 있다. 원추화서는 가지 끝에 달리며 꽃은 3~4월에 피고 지름이 8 mm이며 4 수이다. 열매는 타원형이며 길이 1.5~2 cm로서 10월에 적색으로 익고 겨울 동안 가지에 달려있다. 잎에 황색 반점이 있는 것을 금식나무 for. *Variegata* REHDER 라고 하며 관상용으로 알려져 있다.¹⁾ 식나무의 잎을 천각판이라고 하여, 찰과상, 동상, 화상 및 치질에 쓰이며 요산의 배출을 촉진하므로 통풍 치료에도 사용한다.²⁾ 지금까지 식나무에 대한 성분연구로는 잎에 대한 연구가 진행되어 aucubin, aucubigenin 등의 iridoid계열 화합물에 대한 보고가 있었지만³⁾ 식나무 뿌리에 대한 성분연구는 이루어져 있지 않았다. 본 연구에서는 식나무 뿌리에 대한 성분 연구를 위해 식나무 뿌리의 CH₂Cl₂ 분획에 대한 컬럼 크로

마토그래피를 반복 실시하여 총 6종의 triterpenoid성분들을 분리하였고 이들의 화학구조를 분광학적 방법에 의해 결정하였다. 또한 분리한 화합물에 대해 MG-63 세포주를 이용하여 세포 독성이 없는 농도에서 TNF- α 에 의해 유도된 IL-6의 유리 저해효과를 검색하였다. hIL(human interleukin)-6는 cytokine의 일종으로 항세포증식작용, 항미생물작용, 항종양작용 등 면역조절에 중요한 역할을 한다. 이러한 여러 기능을 가진 IL-6의 생산 조절이 잘못되어 과잉 생산되면 여러 가지 자기 면역 질환과 염증성 관절 질환을 유발하는 것으로 알려졌고 이에 관한 많은 연구가 보고되어 있다.^{4,5)}

재료 및 실험

실험재료 – 본 실험에 사용한 식나무 뿌리는 조선대학교 약초원에서 채집하여 감정한 후 사용하였으며 일부는 표준품으로 조선대학교 약학대학 표본실에 보관하고 있다.

시약 및 기기 – 용적측정기는 Fisher Scientific (Model 307N0043, Canada)를 사용하였고 선광도는 AUTOPOL[®] automatic polarimeter (Rudolph Research Flangers, NJ07836)를 사용하였으며 IR 스펙트럼은 JASCO FT/IR-300E (JASCO Co., Japan)를 사용하였다. EIMS는 JMS 700 (JEOL, Japan)을 사용하였고 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR은

*교신저자 (E-mail): woer@chosun.ac.kr
(Tel): +82-62-230-6369

VARIAN Unity Inova 500 및 JEOL JNM-LA 300을 사용하였다. 분취용 컬럼 크로마토그래피의 packing material로는 Kieselgel 60 (63-200 μm , Art. 7734, Merck), Kieselgel 60 (40-63 μm , Art. 9385, Merck), Lipophilic Sephadex LH-20 (Beads size 25-100 μm , sigma), MCI gel CHP20P (75-150 μm , Mitsubishi Chemical Co.)을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate (layer thickness 0.25mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F₂₅₄ S plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 사용하였으며 추출 및 컬럼 크로마토그래피용 용매는 1급 시약을 기타시약은 1급 또는 특급을 각각 사용하였으며 발색시약으로는 10% H₂SO₄를 사용하였다.

추출 및 분리 - 식나무(*A. japonica* Thunb.)뿌리 1 kg을 MeOH 로 3시간, 3회 반복 환류냉각 열탕추출하고 여과, 감압 농축하여 243.32g의 MeOH extract 를 얻었다. MeOH extract를 증류수로 현탁하고 methylene chloride(CH₂Cl₂), ethylacetate(EtOAc), *n*-butanol(BuOH), H₂O 순으로 계통분획하여 각각 23.6 g, 7.4 g, 28.4 g, 184.7 g의 분획물을 얻었다. CH₂Cl₂ 분획 5 g을 silica gel을 이용하여 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 용매 Hexane : EtOAc = 100 : 1 → 1 : 1 순으로 극성을 높여 주면서 용출시키고 각각의 분획들은 TLC pattern에 따라 유사한 것들을 합쳐 22개의 sub-fraction(D-1, D-2 ... D-22)을 얻었다. Sub-Fraction D-2를 Hexane : Ethyl acetate = 50 : 1 → 1 : 1 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하여 화합물 1 (63 mg)을 얻었다. Sub-Fraction D-8을 Hexane: Ethyl acetate = 30 : 1 → 1:1 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각의 silica gel 60 F₂₅₄, RP-18 F₂₅₄ TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 10개의 분획으로 나누었다. 분획들 중 4번째 분획D-8-4을 90% MeOH을 용매조건으로 하여 Sephadex LH-20을 이용한 Column chromatography를 실시하여 화합물 2 (10 mg)을 얻었다. Sub-Fraction D-9를 Hexane : Ethyl acetate = 30 : 1 → 1 : 1 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각의 silica gel 60 F₂₅₄, RP-18 F₂₅₄ TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 10개의 분획으로 나누었다. 그 중 7 번째 분획D-9-7 분획을 90% MeOH을 용매 조건으로 하여 MCI gel을 이용한 Column chromatography를 실시하여 화합물 3 (4 mg)을 얻었다. 또한 더 많은 화합물을 얻기 위하여 CH₂Cl₂ 분획 5 g을 Hexane, Ethylacetate 용매 비율을 조절하며 silica gel 60을 이용한 open column chromatography를 실시하여 5개의 sub-fraction(C-1, C-2, C-3, C-4, C-5)을 얻었다. Sub-Fraction C-2을 Hexane: Ethyl

acetate = 20 : 1 → 1 : 1 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각의 silica gel 60 F₂₅₄, RP-18 F₂₅₄ TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 5개의 분획으로 나누었다. 그 중 2번째 분획C-2-2를 Hexane : Ethyl acetate = 10 : 1을 전개 용매로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하고 100% methylene chloride를 전개용매로 Silica gel 60 (40-63 mesh)으로 정제하여 화합물 4 (1.93 mg)를 얻었다. Sub-Fraction C-5를 chloroform : MeOH =100% chloroform → 100% MeOH을 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각의 silica gel 60 F₂₅₄, RP-18 F₂₅₄ TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 5개의 분획으로 나누었다. 그 중 3번째 분획C-5-3을 Hexane: Ethyl acetate: MeOH = 5 : 1 : 0.1을 전개 용매로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하고 chloroform : MeOH =50 : 1을 전개용매로 Silica gel 60 (40-63 mesh)으로 정제하여 화합물 5 (1.35 mg)을 얻었다. Sub-Fraction C-6을 Hexane: Ethyl acetate = 20: 1 → 1:1을 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각의 silica gel 60 F₂₅₄, RP-18 F₂₅₄ TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 5개의 분획으로 나누었다. 그 중 2번째 분획 C-6-2를 Hexane : Ethyl acetate =100 : 1 → 1 : 1을 전개 용매로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하고 chloroform : MeOH =50 : 1을 전개용매로 Silica gel 60 (40-63 mesh)으로 정제하여 화합물 6 (1.08 mg)을 얻었다.

화합물 1 - Colorless needles; m.p., 267-269°C; EIMS, m/z 426[M]⁺; [α]_D²⁵ -75.8° (CHCl₃); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 2.39(1H, ddd, J=14.0, 5.3, 2.0 Hz, H-2 α), 2.30(1H, m, H-2 β), 2.25(1H, m, H-4), 1.97(1H, m, H-1 α), 1.75(1H, m, H-6 α), 1.68(1H, dd, J=12.0, 5.2 Hz, H-1 β), 1.22(1H, m, H-19), 1.18(3H, s, CH₃-28), 1.05(3H, s, CH₃-27), 1.01(3H, s, CH₃-26), 1.00(3H, s, CH₃-30), 0.95(3H, s, CH₃-29), 0.89(3H, d, J=6.8 Hz, CH₃-23), 0.87(3H, s, CH₃-25), 0.72(3H, s, CH₃-24); ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 213.1(s, C-3), 59.4(d, C-10), 58.2(d, C-4), 53.0(d, C-8), 42.7(d, C-18), 42.1(s, C-5), 41.5(t, C-2), 41.2(t, C-6), 39.6(s, C-13), 39.2(t, C-22), 38.2(s, C-14), 37.4(s, C-9), 36.0(t, C-16), 35.6(t, C-11), 35.3(t, C-19), 35.0(q, C-30), 32.7(t, C-21), 32.4(t, C-15), 32.0(q, C-28), 31.8(q, C-29), 30.5(t, C-12), 29.9(s, C-17), 28.1(s, C-20), 22.2(t, C-1), 20.2(s, C-26), 18.6(q, C-27), 18.2(t, C-7), 17.9(q, C-25), 14.6(q, C-24), 6.8(q, C-23).

화합물 2 - Colorless needles; m.p., 254°C; EIMS, m/z

442[M]⁺; $[\alpha]_D^{25}$ -7.4° (CHCl₃); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 3.82(1H, ddd, J=11, 3.5, 1 Hz, H-3), 2.53(1H, dd, J=13.8, 3 Hz, H-1α), 2.40(1H, ddd, J=13.5, 14, 1 Hz, H-1β), 1.85(1H, dt, J=13, 3 Hz, H-6α), 1.17(3H, s, CH₃-28), 1.05(3H, d, J=6.5 Hz, CH₃-23), 1.03(3H, s, CH₃-24), 1.01(3H, s, CH₃-26), 0.99(3H, s, CH₃-29), 0.98(3H, s, CH₃-27), 0.94(3H, s, CH₃-30), 0.89(3H, s, CH₃-25). ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 211.9(s, C-2), 77.0(d, C-3), 60.4(d, C-10), 54.5(d, C-4), 53.1(d, C-8), 42.7(d, C-18), 40.6(t, C-6), 39.6(s, C-13), 39.2(t, C-22), 38.3(s, C-14), 38.1(s, C-5), 37.6(s, C-9), 36.1(t, C-1), 35.9(t, C-16), 35.3(t, C-19), 35.0(q, C-30), 35.0(t, C-11), 32.7(t, C-21), 32.3(t, C-15), 32.1(q, C-28), 31.7(q, C-29), 30.3(t, C-12), 30.0(s, C-17), 28.1(s, C-20), 20.2(q, C-26), 18.6(q, C-27), 17.6(t, C-7), 17.4(q, C-25), 14.1(q, C-24), 10.8(q, C-23).

화합물 3 – Colorless needles; m.p., 282-283°C; EIMS, m/z 442[M]⁺; $[\alpha]_D^{25}$ -28.2° (CHCl₃); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 3.63(2H, s, CH₂OH-28), 2.39(1H, ddd, J=13.5, 5, 2 Hz, H-2α), 2.30(1H, m, H-2β), 2.25(1H, m, H-4), 1.13(3H, s, CH₃-26), 0.99(3H, s, CH₃-30), 0.98(3H, s, CH₃-29), 0.91(3H, s, CH₃-27), 0.88(3H, d, J=6.5 Hz, CH₃-23), 0.87(3H, s, CH₃-25), 0.72(3H, s, CH₃-24); ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 213.2(s, C-3), 68.0 (t, C-28), 59.5(d, C-10), 58.2(d, C-4), 52.5(d, C-8), 42.1(s, C-5), 41.5(t, C-2), 41.2(t, C-6), 39.4(s, C-13), 39.3(d, C-18), 38.1(s, C-14), 37.4(s, C-9), 35.4(t, C-11), 35.1(s, C-17), 34.5(t, C-19), 34.2(q, C-30), 33.3(t, C-22), 32.8(q, C-29), 31.4(t, C-21), 31.2(t, C-15), 30.1(t, C-12), 29.1(t, C-16), 28.1(s, C-20), 22.2(t, C-1), 19.2(q, C-26), 19.1(q, C-27), 18.2(t, C-7), 18.1(q, C-25), 14.6(q, C-24), 6.8(q, C-23).

화합물 4 – Colorless needles; m.p., 225°C; EIMS, m/z 442[M]⁺; $[\alpha]_D^{25}$ +59.0° (CHCl₃); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.40(1H, s, -CHO, H-28), 5.34(1H, t, J=3.5 Hz, -C=CHCH₂-, H-12), 4.49(1H, dd, J=7.5, 8.5 Hz, -CH(COCH₃)CH₂-, H-3), 2.63(1H, br dd, J=4.5, 13.5 Hz, -CHCH₂CH=), 2.05(3H, s, COCH₃-3), 1.13(3H, s, CH₃-27), 0.93(3H, s, CH₃-25), 0.92(3H, s, CH₃-29), 0.91(3H, s, CH₃-30), 0.86(3H, s, CH₃-24), 0.74(3H, s, CH₃-26); ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 207.5(d, C-28), 171.0(s, OCOMe), 143.0(s, C-13), 123.1(s, C-12), 80.9(d, C-3), 55.3(d, C-5), 49.1(s, C-17), 47.5(d, C-9), 45.5(s, C-13), 41.7(d, C-18), 40.4(s, C-14), 39.6(s, C-8), 38.1(t, C-1), 37.7(s, C-4), 36.9(s, C-10), 33.1(t, C-21), 33.1(q, C-29), 32.7(t, C-7), 30.6(s, C-20), 28.0(q, C-23), 27.7(t, C-12), 26.7(t, C-15), 25.5(q, C-27), 23.5(t, C-2), 23.4(t, C-11; q, C-30), 22.1(t, C-16), 21.3(q, OCOMe), 18.2(t, C-6),

17.0(q, C-26), 16.7(q, C-24), 15.4(q, C-25).

화합물 5 – White amorphous powder; m.p., 288-289°C; EIMS m/z 456 [M]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.5521(1H, pseudo-t, J=3.5Hz, H-12), 3.487(1H, dd, J=6.4Hz, 9.4Hz, H-3), 2.668(1H, d, J=11.5Hz, H-18), 2.356(1H, ddd, J=3.8, 5.7, 10.8Hz, H-11b), 2.149(1H, ddd, J=4.1, 13.6, 14.1, H-15a), 1.274(3H, s, H-27), 1.254(3H, s, H-23), 1.084(3H, s, H-25), 1.052(3H, s, H-26), 1.028(3H, d, J=6, H-29), 0.976(3H, d, J=6.5Hz, H-30), 0.913(3H, s, H-24); ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 180.3(s, C-28), 139.6(s, C-13), 126.0(d, C-12), 78.5(d, C-3), 56.2(d, C-5), 53.9(d, C-18), 48.4(s, C-9), 48.4(s, C-17), 42.9(s, C-14), 40.3(s, C-8), 39.9(s, C-4), 39.8(d, C-19), 39.8(d, C-20), 39.4(t, C-1), 37.8(t, C-22), 37.7(s, C-10), 33.9(t, C-7), 31.4(t, C-21), 29.2(q, C-23), 29.2(t, C-15), 28.5(t, C-2), 25.3(t, C-16), 24.3(q, C-29), 24.0(t, C-11), 21.8(q, C-30), 19.2(t, C-6), 17.9(q, C-29), 17.8(q, C-26), 17.0(q, C-24), 16.1(q, C-25).

화합물 6 – Colorless needles; m.p., 283-284.5°C; EIMS m/z 444 [M]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 3.544(2-H, m), 3.984(3-H, m), 1.18(3H, s, CH₃-28), 1.01(3H, s, CH₃-26), 0.99(3H, s, CH₃-27), 0.99(3H, s, CH₃-30), 0.95(3H, s, CH₃-29), 0.94(3H, d, J=6.8 Hz, CH₃-23), 0.94(3H, s, CH₃-24), 0.85(3H, s, CH₃-25); ¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃) δ : 76.5(d, C-3), 71.4(d, C-2), 53.2(d, C-10), 52.2(d, C-8), 43.6(d, C-4), 42.8(d, C-18), 41.3(t, C-6), 39.7(s, C-13), 39.3(t, C-19), 38.4(s, C-14), 37.8(s, C-5), 36.5(s, C-9), 36.0(t, C-16), 35.5(t, C-11), 35.3(t, C-19), 35.0(q, C-30), 32.8(t, C-21), 32.3(t, C-15), 32.1(q, C-28), 31.8(q, C-29), 30.6(t, C-12), 30.0(s, C-17), 28.2(s, C-20), 23.9(t, C-1), 20.1(q, C-27), 18.7(q, C-26), 18.1(q, C-25), 17.5(t, C-7), 15.9(q, C-24), 10.9(q, C-23).

Cytotoxicity Assay – 본 실험에서는 SRB 검색법을 이용하여 세포독성을 측정하였으며 사용한 세포주는 MG-63으로 세포주는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하고, 10회 이상 계대한 후 trypsinization (trypsin-EDTA)하여 single cell suspension을 확보한 뒤, 세포의 성장속도를 고려하여 적정수의 세포 (3×10⁴)를 96-well plate에 200 μl씩 접종하였다. 시료는 DMSO에 10 mg/ml 되도록 용해시키고, 실험 농도에 따라 serial dilution하여 DMSO의 최종 농도가 1% 이하가 되도록 100 μl씩 각 well에 첨가 하였다. 검체 투여가 끝난 plate는 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 48시간 배양하였다. 배양이 종료된 후 부착성 세포는 10% formalin solution 100 μl를 가하여 실온에서 30분 충분히 고정시켰다. 고정된 각 well의 세포로부터 formalin을 제거하기 위해 증류수로 5회 세

척한 후 건조시켰다. 건조된 well에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB (sulforhodamine B)용액 100 μ l를 가한 후, 상온에서 30분 이상 방치하여 충분히 염색시키고 1% acetic acid로 5회 세척하여 건조시켰다. 완전히 건조시킨 후 200 μ l의 10mM Tris-base용액(pH 8.0)으로 염색된 세포를 부유시켜, micro plate reader를 사용하여 540 nm에서 OD(optical density)를 측정하였다. 세포주에 대해 대조군의 평균 OD값과 실험군의 평균 OD값을 비교하여 세포독성(%)을 구하였다.⁶⁾

$$\text{Cytotoxicity (\% inhibition)} = (1 - T/C) \times 100$$

C : 대조군의 평균 OD 값

T : 실험군의 평균 OD 값

MG-63 cell 에서 IL-6의 유리 확인 - 사람의 골육 암세포 유래 MG-63 세포주는 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였으며, 세포주는 10% FBS (fetal bovine serum)가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 culture dish에 증식시킨 MG-63 세포를 24-well plate에 적정수의 세포(3×10⁴)를 500 μ l씩 접종한 후 하루 동안 incubation하고 배지를 교체하였다. 여기에 TNF(Tumor Necrosis Factor)- α 와 세포독성이 없는 농도의 sample을 처리한 후 37°C incubator에서 배양한 후 24시간과 48시간 뒤 각각 70 μ l씩 배지를 채취하여 냉동 보관한다. 96-well plate에 1차 anti-body 100 μ l(anti-human IL-6 2 μ g/ml in 0.1 M NaHCO₃)를 넣은 후 4°C에서 overnight하여 1차 anti-body가 96 well plate에 부착되도록 하였다. 결합되지 않은 1차 anti-body를 씻어내기 위해 washing solution [0.05% Tween 20 in (PBS) phosphate buffered saline] 100 μ l로 3번 씻어낸 후 blocking solution (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) 200 μ l로 처리하고 실온에서 2시간 동안 방치한 후 washing solution 200 μ l로 2번 씻어낸다. 위에서 24시간 후와 48시간 후에 채취한 배양액 50 μ l와 blocking solution 50 μ l를 넣어 실온에서 4시간 또는 4°C에서 overnight하여 1차 anti-body와 결합하도록 하였다. 100 μ l의 washing solution으로 4번 세척한 후 100 μ l의 2차 anti-body (biotin conjugated rat anti-human IL-6 1 μ g/ml in blocking solution)를 첨가하여 45분 동안 결합시킨 뒤 결합되지 않은 2차 anti-body를 100 μ l의 washing solution으로 6번 세척하여 씻어낸다. 100 μ l의 Streptavidin HRP (0.1% BSA, 0.05% Tween 20 in tris buffered saline, pH 7.3)를 첨가하여 20분 동안 결합시킨 뒤 washing solution으로 6번 세척한다. TMB (Tetra Methyl Benzidine) 100 μ l를 넣어 발색시킨 즉시 micro plate reader를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 1% DMSO와 TNF- α (50 ng/ml)가 들어갔을 때 hIL-6의 유리정도(%)를 control로 하였으며 실험의

표준물질로는 dexamethasone을 사용하였다. IL-6의 유리 확인은 control에 대한 상대적인 퍼센트 즉, (rate of sample reaction/rate of control)×100으로 표시하였다.^{7,8)}

통계처리학적 처리 - 모든 data는 mean±S.D로 나타내었고 통계처리는 Student's *t*-test를 실시하여, *p*<0.05 또는 *p*<0.01이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

화합물 **1**은 무색의 침상결정 화합물로서 m.p.는 267~269°C이다. ¹H-NMR spectrum을 보면 δ 0.72(3H), 0.87 (3H), 0.95 (3H), 1.00 (3H), 1.01(3H), 1.04 (3H), 1.18 (3H)에서 7개의 angular methyl기가 singlet로, δ 0.89 (3H) 에서 1개의 secondary methyl기가 doublet (J=6.8 Hz)로 나타나고 있다. 또한 ¹³C-NMR에서 30개의 carbon signal이 나타나고 있는 것으로 보아 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었으며, 특히 δ 6.8에서 friedelane triterpenoid 계열에 전형적으로 존재하는 C-4에 연결된 methyl기의 존재와 δ 213.4에서 carbonyl group의 존재를 확인하였다. EIMS에서는 분자이온이 m/z 426에서 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하여 기존에 보고된 문헌과 비교하여 friedelin으로 동정하였다.^{9,11)}

화합물 **2**는 무색의 침상결정 화합물이다. ¹H-NMR spectrum을 보면 δ 0.89 (3H), 0.94 (3H), 0.98 (3H), 0.99 (3H), 1.01(3H), 1.03 (3H), 1.17 (3H)에서 7개의 angular methyl기가 singlet로, δ 1.05 (3H) 에서 1개의 secondary methyl기가 doublet (J=6.5 Hz)로 나타나고 있다. 또한 ¹³C-NMR에서 30개의 carbon signal이 나타나고 있는 것으로 보아 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었으며, 특히 δ 77.0에서 hydroxyl group의 존재와 δ 211.9에서 carbonyl group의 존재를 확인하였다. EIMS에서는 분자이온이 m/z 442에서 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하여 기존에 보고된 문헌치와 비교하여 3 α -hydroxy-2-friedelanone으로 동정하였다.^{12,13)}

화합물 **3**은 무색의 침상결정 화합물이다. ¹H-NMR data를 보면 δ 0.72 (3H), 0.87 (3H), 0.91 (3H), 0.98 (3H), 0.99(3H), 1.13 (3H), 에서 6개의 angular methyl기가 singlet로, δ 0.88 (3H) 에서 1개의 secondary methyl기가 doublet (J=6.5 Hz)로 나타나고 있었으며 angular methyl기가 하나 적어진 대신 δ 3.63에서 singlet으로 나타나는 peak로부터 하나의 angular methyl기가 하나의 hydroxyl group과 결합하여 -CH₂OH로 변화 했을 수 있다. 또한 ¹³C-NMR에서 30개의 carbon signal이 나타나고 있는 것으로 보아 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었으며, 특히 δ 68.0에서 methylene에 연결된 hydroxyl group의 존재와 δ 213.2에서 carbonyl group의 존재를 확인하였다. EIMS에서는 분자이

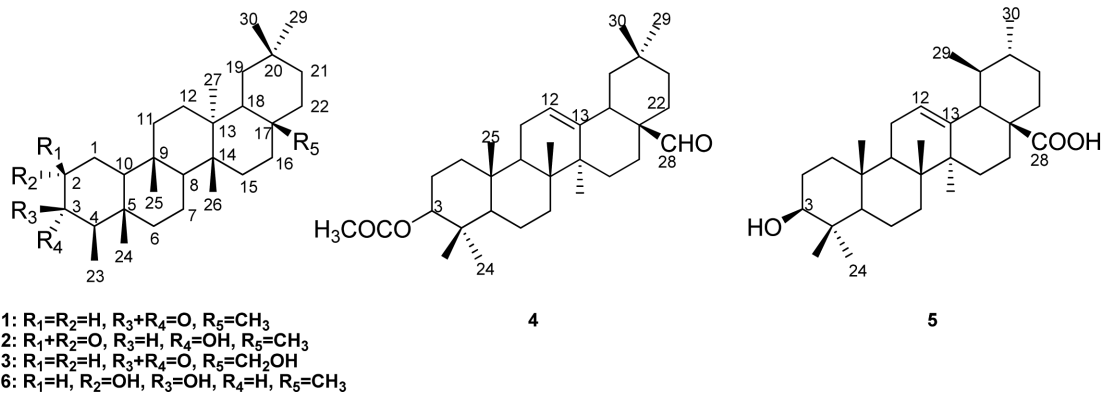


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-6 isolated from *A. japonica*

온이 m/z 442에서 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하여 기존에 보고된 문헌과 비교하여 Canophyllol로 동정하였다.^{10-12,14,15)}

화합물 4는 무색의 침상결정 화합물이다. ¹H-NMR에서 δ 9.40에서 aldehyde가 검출되었고, δ 4.49에서 3번 위치의 proton이 double doublets으로 나타났으며, 이와 같은 3번 proton의 저자장 shift는 acetyl기가 연결되어 있음을 시사해 주고 있다. angular methyl기를 보면 δ 0.74의 singlet은 H₃-26, 0.85의 것은 H₃-23, 0.86의 것은 H₃-24, 0.91의 것은 H₃-30, δ 0.92의 것은 H₃-29, δ 0.93의 것은 H₃-25, 그리고 δ 1.13의 것은 H₃-27으로 추정되었다. ¹³C-NMR에서 두 개의 acetate의 탄소를 제외하고 30개의 carbon signal이 나타나고 있는 것으로 보아 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었다. 특히 δ 171.0에서 acetyl group의 존재와 δ 207.5에서 aldehyde group의 존재를 확인하였으며 δ 123.1과 δ 143.0으로부터 C-12와 C-13사이 이중결합의 존재를 확인하였다. EIMS에서는 분자이온이 m/z 442에서 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하여 기존에 보고된 문헌과 비교하여 Oleanolic aldehyde acetate로 동정하였다.¹⁶⁻¹⁸⁾

화합물 5는 백색의 무정형분말 화합물이다. ¹H-NMR data를 보면 δ 0.91 (3H), 1.05 (3H), 1.08 (3H), 1.25 (3H), 1.27 (3H), 에서 5개의 angular methyl기가 singlet로, δ 0.98 (3H)과 1.03 (3H)에서 2개의 secondary methyl기가 doublet ($J=6.5$ Hz)로 나타나고 있었다. 또한 ¹³C-NMR에서 30개의 carbon signal이 나타나고 있는 것으로 보아 ursane계열의 triterpenoid 화합물임을 예상할 수 있었으며, 특히 δ 78.5에서 hydroxyl group의 존재와 δ 180.3에서 carboxyl group의 존재를 확인하였으며 δ 126.0과 δ 139.6으로부터 C-12와 C-13사이 이중결합의 존재를 확인하였다. EIMS에서는 분자이온이 m/z 456에서 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하여 기존에 보고된 문헌과 비교하여 Ursolic acid로 확인 동정하였다.^{19,20)}

화합물 6은 무색의 침상결정 화합물이다. ¹H-NMR data를 보면 δ 0.85(3H), 0.94 (3H), 0.95 (3H), 0.99 (3H),

Table I. Inhibitory effect of compounds 1-3 on IL-6 production in TNF- α stimulated MG-63 cell

MG-63 cells (3×10^4) were incubated for 24 h. Cultures were incubated with or without compounds for 30 min and then stimulated with TNF- α (15 ng/ml) for 24 h. IL-6 in the supernatant was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Results are expressed as the mean \pm S.E. from three different experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with TNF- α treated value.

Treatment	IL-6 (pg/ml)	Inhibition (%)
None	10.6 \pm 1.5	-
TNF- α	252.3 \pm 17.1	-
Compound (1), μ g/ml		
25	260.6 \pm 20.3	-
50	242.9 \pm 15.8*	2.94*
100	218.6 \pm 18.2*	9.42*
Compound (2), μ g/ml		
25	220.3 \pm 14.2*	7.44*
50	149.6 \pm 10.8*	40.4*
100	70.8 \pm 6.2**	82.93**
Compound (3), μ g/ml		
25	256.6 \pm 15.3	-
50	249.6 \pm 21.3	0.42
100	254.6 \pm 12.3	-

0.99(3H), 1.01 (3H), 1.18 (3H)에서 7개의 angular methyl기가 singlet로, δ 0.94 (3H)에서 1개의 secondary methyl기가 doublet ($J=7.0$ Hz)로 나타나고 있다. 또한 ¹³C-NMR에서 30개의 carbon signal이 나타나고 있는 것으로 보아 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었으며, 특히 δ 76.5와 71.4에서 두 개의 hydroxyl group의 존재를 확인하였으며 EIMS에서는 분자이온이 m/z 444에서 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하여 기존에 보고된 문헌과 비교하여 pachysandiol A로 확인 동정하였다.^{21,22)}(Fig. 1 참조).

화합물 1-6은 식나무 뿌리로부터 처음으로 분리된 화합물로서 화합물 1-3에 대해 MG-63 세포에서 IL-6의 유리에 미치는 영향을 검토한 결과 화합물 2의 MG-63 세포에 대한 IL-6의 유리 억제율은 82.93 %로 IL-6의 유리를 현저히 감소시키는 것으로 나타났다. 그리고 화합물 4-6은 낮은 수율로 인해 IL-6 유리억제 활성을 평가하지 못하였다 (Table I).

결론

식나무(*Aucuba japonica* Thunb.)의 뿌리로부터 6종의 triterpenoid 성분들을 분리하여 각각 friedelin (1), 3 α -hydroxy-2-friedelanone (2), canophyllol (3), oleanolic aldehyde acetate (4), ursolic acid (5), pachysandiol A (6)으로 동정하였다. 분리된 화합물들은 모두 식나무로부터 처음으로 분리된 화합물로서 분리된 화합물중 화합물 2는 IL-6의 유리를 현저히 억제하는 것으로 나타나 염증 반응 및 IL-6의 과다 발현으로 인한 질병을 개선시키는 데 효과가 있을 것으로 판단된다.

인용문헌

- 김태정 (1996) 한국의 자원식물 III, p. 205. 서울대학교출판부, 서울
- 배기환 (2000) 원색도감. 한국의 자연시리즈 13 한국의 약용식물, p. 359. 교학사, 서울.
- Bemini, R., Iavarone, C. and Trogolo, C. (1984) 1-O- β -D-Glucopyranosyleucommol, an Iridoid glucoside from *Aucuba Japonica*. *Phytochemistry* **23**: 1431.
- Mysliwice, J., Kretowski, A., Topolska, J., Stepien, A. and Kinalska, I. (2002) The influence of corticosteroids on IL-6/IL-6R system in patients with graves ophthalmopathy. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **108**: 739.
- Ragab, A. A., Nalepka, J. L., Bi, Y. and Breenfield, E. M. (2002) Cytokine synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **283**: 679.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H. and Kenny, S. (1990) A new colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107.
- Joo, S. S., Kang, H. C., Lee, M. W., Choi, Y. W. and Lee, D. I. (2003) Inhibition of IL-1 β and IL-6 in osteoblast-like cell by isoflavones extracted from *Sophorae fructus*. *Arch Pharm Res.* **26**: 1029.
- Liu, Q. H., Jeong, J.-E., Choi, E. J., Moon, Y. H. and Woo, E.-R. (2006) A new furofuran lignan from *Geranium thunbergii*. *Arch. Pharm. Res.* **29**: 1109.
- Lee, S., Paek, S. H., Kim, S.-K., Kim, B.-K. and Shin, K. H. (2004) Triterpenoids from *Orostachys japonicus*. *Natural Product Sciences* **10**: 306.
- Ali, M. S., Mahmud, S., Perveen, S., Ahmad, V. U. and Rizwani, G. H. (1999) Epimers from the leaves of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **50**: 1385.
- Leslie Gunatilaka, A. A., Jasmin De Silva, A. M. Y., Sotheeswaran, S., Balasubramaniam, S., Mohamed, I. M. and Wazeer, M. I. M. (1984) Terpenoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum Calaba* and *Garcinia Spicata* from Sri Lanka. *Phytochemistry* **23**: 323.
- Guo, W. J., Guo, S. X., Yang, J. S., Chen, X. M. and Xiao, P. G. (2007) Triterpenes and steroids from *Armillaria melea* Vahl. ex Fr. *Biochemical Systematics and Ecology* **35**: 790.
- Li, L., Huang, X., Sattler, I., Fu, H., Grabley, S. and Lin, W. (2006) Structure elucidation of a new friedelane triterpene from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Magnetic Resonance in Chemistry* **44**: 624.
- Ngouamegne, E. T., Fongang, R. S., Ngouela, S., Boyom, F. F., Rohmer, M., Tsamo, E., Gut, J. and Rosenthal, P. J. (2008) Endodesmiadiol, a Friedelane Triterpenoid, and Other Antiplasmodial Compounds from *Endodesmia calophylloides*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 374.
- Nozaki, H., Suzuki, H., Hirayama, T., Kasai, R., Wu, R. Y. and Lee, K. H. (1986) Antitumour triterpenes of *Maytenus Diversifolia*. *Phytochemistry* **25**: 479.
- Kim, M. R., Lee, H. H., Hahm, K. S., Moon, Y. H. and Woo, E. R. (2004) Pentacyclic triterpenoids and their cytotoxicity from the Stem Bark of *Styrax japonica* S. et Z. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 283.
- Nomura, M., Tokoroyama, T. and Kubota, T. (1981) Biarylheptanids and other constituents from wood of *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **20**: 1097.
- Kircher, H. W. (1980) Triterpenes in *organ pipe cactus*. *Phytochemistry* **19**: 2707.
- Ibrahim, A., Khalifa, S. I., Khafagi, I., Youssef, D. T., Khan, S., Mesbah, M. and Khan, I. (2008) Microbial Metabolism of Biologically Active Secondary Metabolites from *Nerium oleander* L. *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 1253.
- Jaki, B. U., Franzblau, S. G., Chadwick, L. R., Lankin, D. C., Zhang, F., Wang, Y. and Pauli, G. F. (2008) Purity Activity Relationships of Natural Products: The Case of Anti-TB Active Ursolic Acid. *J. Nat. Prod.* **71**: 1742.
- Moiteiro, C., Justino, F., Tacaes, R., Marcelo-Curto, M. J., Florencio, M. H., Nascimento, M. S. J., Pedro, M., Cerqueira, F. and Pinto, M. M. (2001) Synthetic secfriedelane and friedelane derivatives as inhibitors of human lymphocyte proliferation and growth of human cancer cell lines in vitro. *J. Nat. Prod.* **64**: 1273.
- Qu, L., Chen, X., Lu, J., Yuan, J. and Zhao, Y. (2005) Chemical components of *Leptopus chinensis*. *Chemistry of Natural Compounds* **40**: 565.

(2010. 4. 27 접수; 2010. 5. 11 심사; 2010. 5. 17 게재확정)