

# 매죽나무(*Styrax japonica*) 수피 추출물의 항암 활성\*<sup>1</sup>

권 오 응\*<sup>2†</sup> · 김 우 진\*<sup>3</sup> · 이 학 주\*<sup>3</sup>

## Anti-cancer Activity of *Styrax japonica* Bark Extrats\*<sup>1</sup>

Oh-Woong Kwon\*<sup>2†</sup> · Woo-Jin Kim\*<sup>3</sup> · Hak-Ju Lee\*<sup>3</sup>

### 요 약

매죽나무(*Styrax japonica*) 수피 메탄올 추출물에서 단리된 화합물은 TLC 및 HPLC, coulumn chromatography 방법을 이용한 실리카겔 chromatography로 분리하였다. FAB-MS, NMR 분석을 통해 화합물의 구조를 구명한 결과 분자식은  $C_{27}H_{34}O_{11}Na$ 이고 화합물명은 styraxlignolide F로 판명되었다. 인간 정상 신장세포인 HEK293을 이용한 세포독성을 살펴본 결과, 각 추출물은 1.0 mg/ml의 농도에서 15.2%의 낮은 세포독성을 나타내었다. AGS와 MCF-7 세포에서의 항암 활성은  $CH_2Cl_2$  가용부가 1.0 mg/ml 농도에서 60% 이상의 억제 활성을 나타내었다. Bcl-2 단백질 정량을 통한 항암 활성 측정 결과,  $CH_2Cl_2$  가용부가 다른 가용부 및 styraxlignolide F 보다 낮은 Bcl-2 발현량을 보였고, p53 발현량 측정에서도  $CH_2Cl_2$  가용부가 가장 낮은 발현량을 보였다. 인간 폐암세포(A549)를 이용한 자가사멸 측정 실험에서  $CH_2Cl_2$  가용부는 46.9%로 높은 사멸비율을 나타냈으며, 그다음으로 styraxlignolide F가 43.5%의 사멸비율을 나타내었다.  $CH_2Cl_2$  분획물은 단리물질(styraxlignolide F)보다 항암 활성 효과가 높게 나타났는데 여러 가지 물질이 시너지 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

### ABSTRACT

A compound has been isolated from the methanol extract of *Styrax japonica* bark using conventional chromatographic methods including silica gel chromatography, TLC and HPLC. The molecular formula of Styraxlignolide F analyzed by spectrometric analyses using FAB-MS, NMR was found to be  $C_{27}H_{34}O_{11}Na$ . The cytotoxicity of the styraxlignolide F was showed 15.2% in 1.0 mg/ml on human kidney cell (HEK 293). As anticancer activity of  $CH_2Cl_2$  fraction, over 60% of AGS and MCF-7 cells were inhibited in concentration of 1.0 mg/ml. In the results of anticancer test using quantification of Bcl-2,  $CH_2Cl_2$  fraction showed lower Bcl-2 and p53 expression than those of styraxlignolide F and other fractions. In apoptosis of human lung carcinoma cancer cell (A549),  $CH_2Cl_2$  fraction showed the highest inhibition rate (46.9%) and styraxlignolide F was the next (43.5%). The  $CH_2Cl_2$  fraction showed higher anti-cancer activ-

\*<sup>1</sup> 접수 2013년 7월 16일, 채택 2014년 1월 10일

\*<sup>2</sup> 국립산림품종관리센터 품종심사과. Department of Variety Examination Korea Forest Seed and Variety Center, Chungju, 380-941, Korea

\*<sup>3</sup> 국립산림과학원 화학미생물과. Division Wood Chemistry & Microbiology Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 권오응(e-mail: owkwon@forest.go.kr)

ities than isolated substance (styraxlignolide F), probably due to the crude extract showing synergic effects by other components.

**Keywords :** *Styrax japonica*, styraxlignolide F, FAB-MS, NMR, cytotoxicity, HEK 293, AGS, MCF-7, Bcl-2, p53, anti-cancer

## 1. 서 론

산림식물들 중에는 이미 오래 전부터 민간요법으로 이용되어 여러 가지 약효가 인정되고 있는 식물이 많다. 이 식물들 가운데는 각종 질병 및 암을 치료할 수 있는 항암 효과가 있는 식물도 많다. 특히 주목과 주목屬의 식물, 대극과 대극屬의 식물 및 두릅나무과 오갈피屬의 식물들은 민간전래로서 항암 효과가 있거나 기타 여러 가지 질병 치료에 약효가 있는 것으로 전해지고 있다. 그러나 이 식물들의 특성과 성분은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않아 상세한 생태습성 및 성분규명이 요구된다[1].

매죽나무과의 낙엽소교목인 매죽나무(*Styrax japonica*)는 우리나라에서는 중부 이남의 산야에 분포되어 있고, 중앙아메리카, 멕시코 서쪽과 남쪽 아나톨리아를 포함한 지중해 연안에서 발견되었다[2]. 예부터 매죽나무의 기름성분은 피부염증을 치료하기 위한 전통 약으로 사용되었고[3], 로마인, 이집트인, 페니키아인, 이오니아인 치료학에서는 향료로서 사용되어 왔다[4].

본 연구는 항암 활성이 우수한 매죽나무 수피 추출물로부터[5] 활성물질을 분리·정제하였으며, 여기서 얻어진 화합물에 대해서는 MS, NMR 등의 기기 분석을 이용하여 그 화학구조를 명확히 동정하였다. 따라서 매죽나무 수피 추출물과 단리물질 항암 활성 실험을 통하여 기능성 식품 소재로서의 개발 및 이용가치를 평가하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료

본 실험에 사용된 공시수종은 2009년 9월 경남 하

동군 화계면 정금리에 있는 35년생 매죽나무를 채취하여 사용하였다.

### 2.2. 추출 및 용매분획

매죽나무 수피를 음건시킨 후, 분쇄기로 분말화하였으며, 그 분말시료를 메탄올(Methanol, MeOH)에 72시간 동안 실온에서 침지시켜 조추출물을 얻었으며, 이 조작을 3회 실시하였다. 여기서 얻어진 수피 메탄올 조추출물은 노르말 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(Dichloromethane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 에칠아세테이트(Ethyl acetate, EtOAc) 등의 용매를 사용하여 순차연속추출하여 분획하였다.

### 2.3. 기기분석

추출수율을 측정하기 위한 HPLC 기기는 BIO-TEK instrument (Italy)사의 HPLC 500 series로 Pump : BIO-TEK 522 controller, Column : Alltech Prevail C18 5  $\mu$ , Detector : BIO-TEK HPLC 535 Detector를 사용하였다. 단리한 화합물의 질량(MS) 스펙트럼은 JEOL JMS-SX102A, 그리고 <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, HMQC (<sup>1</sup>H Detected Multiple Quantum Coherence), HMBC (<sup>1</sup>H Detected Multiple Bond Connectivity) 등의 핵자기공명(Nuclear magnetic resonance : NMR) 스펙트럼은 Varian Unity-Inova 500 MHz를 사용하여 측정하였다.

### 2.4. 항암 활성 검정

#### 2.4.1. 인간 정상세포에 대한 독성 실험

SRB (Sulforhodamine B) assay[6]는 세포 단백질 을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법

으로 실험 대상 세포인 HEK293 (10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를  $4\sim 5 \times 10^4$  cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가해 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 100  $\mu$ l씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (Trichloroacetic acid) 100  $\mu$ l를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100  $\mu$ l씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100  $\mu$ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용해 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4.2. SRB assay를 이용한 항암 활성 측정

SRB assay를 이용하여 정상 신장세포(HEK293)에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay를 이용하여 각 암세포주의 생육억제 활성을 측정 후 각 농도에서의 세포독성에 대한 암세포 생육억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다[7].

$$Selectivity = \frac{\text{암세포 생육억제 활성}}{\text{정상세포의 세포독성}}$$

#### 2.4.3. Bcl-2 단백질 정량을 통한 항암 활성

이 실험은 계획된 세포의 사멸 즉 apoptosis를 억제함으로써 세포 생존기간을 연장시켜 종양 발생에 관여하는 Bcl-2 단백질의 발현량을 측정하여 암의 발생에 대해 측정하는 방법이다.  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 정도의 정상 신장세포인 HEK293을 사용하여 cytochrome c의 Western blotting을 위한 세포질성 단백질을 분리하였다. 일단 플라스크에 있는 배지를 제거하고 cold PBS를 첨가한 후 scraper로 세포를 수집하였다. 10초간 원침하여 상등액을 버린 후 400  $\mu$ l의 cold buffer A (10 mM Hepes-KOH[pH7.9], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF,

0.1% NP-40)에 잘 현탁하여 얼음에서 30분간 방치하였다. 30분 후 10초간 vortex한 후 원심 분리하여 상등액을 취하여 단백질의 농도를 측정한 후 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

위에서 분리한 세포주의 단백질 40  $\mu$ l을 9% SDS-polyacrylamide gel에서 Tris-glycine buffer로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 분리하여 Western blotting 장치에 설치한 후 여기에 transfer buffer를 채우고, 50V로 2시간 전이하고 membrane을 분리하여 30분간 blocking solution으로 blocking한 후 BclXL 혹은 Mcl-1에 대한 1차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 blocking solution으로 잘 soaking 한 후 여기에 horseradish peroxidase 또는 alkaline phosphatasek 중합되어 있는 anti-mouse immunoglobulin G 항체 또는 anti-mouse immunoglobulin G 항체를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 위에서와 같이 PBS, PBST를 바꾸어 가면서 membrane을 세척한 다음 membrane에 ECL 발색 시약을 첨가하여 반응시킨 후 X-선 필름에 적정 시간 동안 노출시켰다[8].

#### 2.4.4. p53 단백질 정량을 통한 항암 활성

p53 유전자는 인체의 종양에서 가장 흔하게 변성을 보이는 유전자로 많은 실험에 의해 유전자의 이상과 암 발생과의 연관성이 밝혀져 있다[9]. p53 단백질과 bcl-2 단백질은 암세포의 세포사멸사 또는 증식에 관여하여 암 진행 과정에 중요한 역할을 하는 조절 인자이다[10]. p53과 bcl-2 계열 단백질들은 세포사멸사 과정에서 복합적이고 상보적인 조절기능을 수행한다. 즉 p53 단백질은 bax mRNA의 발현을 유도하고, bcl-2 mRNA 발현을 저하시킨다[11-12].

$1.0 \times 10^6$  cells/ml 정도의 유방암 세포인 MCF-7을 사용하여 cytochrome c의 Western blotting을 위한 세포질성 단백질을 분리하였다. 일단 플라스크에 있는 배지를 제거하고 cold PBS를 첨가한 후 scraper로 세포를 수집하였다. 10초간 원심 분리하여 상등액을 버린 후 400  $\mu$ l의 cold buffer A (10 mM Hepes-KOH[pH7.9], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.1% NP-40)에 잘 현

탁하여 얼음에서 30분간 방치하였다. 30분 후 10초간 vortex한 후 원심 분리하여 상등액을 취하여 단백질 농도를 측정 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 사용하였다.

위에서 분리한 세포주의 단백질 40  $\mu\text{l}$ 을 9% SDS-polyacrylamide gel에서 Tris-glycine buffer로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 분리하여 Western blotting 장치에 설치한 후 여기에 transfer buffer를 채우고, 50V로 2시간 전이하고 membrane을 분리하여 30분간 blocking solution으로 blocking한 후 BclXL 혹은 Mcl-1에 대한 1차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 blocking solution으로 잘 soaking 한 후 여기에 horseradish peroxidase 또는 alkaline phosphatase에 중합되어 있는 anti-mouse immunoglobulin G 항체 또는 anti-rabbit immunoglobulin G 항체를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 위에서와 같이 PBS, PBST를 바꾸어 가면서 membrane을 세척한 다음 membrane에 ECL 발색 시약을 첨가하여 반응시킨 후 X-선 필름에 적정 시간 동안 노출시켰다[13].

#### 2.4.5. Apoptosis 측정

인간 폐암세포인 A549 (lung carcinoma, human)을 이용해 세포의 자가사멸형태를 관찰하기 위하여 A549를 배양한 후 이 배양된 인간 폐암세포인 A549 세포를 6 well plate에  $3.0 \times 10^4$  cell/ml로 각 well에 4 ml씩 분주한 후 각 well의 A549 세포를 5일간 세포 사멸형태를 TUNEL 염색법을 이용하여 관찰하였다. 분주된 각 well을 24시간 간격으로 배지를 제거한 후 4% paraformaldehyde (in PBS, pH 7.4)를 이용하여 상온에서 1시간 세포를 고정한다. 그 후 PBS로 well을 세척한 후 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (in methanol)를 투여하고 10분간 상온에서 방치한다. 다시 well을 PBS로 세척한 후 0.1% Triton X-100 (in 0.1% sodium citrate)를 이용하여  $4^{\circ}\text{C}$ 의 얼음 위에서 2분간 방치한다. well을 PBS로 2회 세척 후 well 주위를 잘 건조시킨다. 다 건조된 well에 50  $\mu\text{l}$ 의 TUNEL 혼합용액을 첨가하는데, 이때 용액의 누출 방지를 위해 well 주위를 파라필름을 이용하여 잘 감싼다. 파라필름으

로 감싼 well plate를 incubator에서 60분간 방치 후 PBS로 3회 세척한 후 형광현미경으로 세포를 관찰한다. 세포 관찰 후 다시 well을 건조한 후 50  $\mu\text{l}$ 의 Converter POD를 첨가하고 이것 또한 누출 방지를 위해 파라필름으로 감싸 incubator에서 30분가량 방치한 후 PBS로 3회 세척을 한다. 다시 여기에 100  $\mu\text{l}$ 의 DAB-substrate solution을 첨가하여 상온에서 10분간 방치 후 PBS로 3회 세척한 후에 최종적으로 광학현미경으로 세포의 사멸형태를 관찰한다[14-15].

## 2.5. 각 성분의 단리

### 2.5.1. 분획물 및 단리물질의 추출 수율

추출수율은 단리화합물을 내부표준액으로 하여 3 point calibration하여 각 point당 3회 반복하여 평균을 구하고 그에 대한 적분 값을 기준을 삼았다. 분석을 위한 시료제조는 디클로로메탄 층의 추출물을 완전 농축하여 얻어진 분말을 1 mg/ml이 되도록 메탄올에 녹인 후 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 후 LC 시료로 사용하였다. HPLC는 Waters 600 pump와 controller를 이용하였으며 Waters 486 UV system을 이용하여 254 nm에서 확인 정량하였다. 분석에 사용한 column은 Kromasil 5 u C18 (250  $\times$  4.6 mm)이며, 10  $\mu\text{l}$ 의 sample을 주입하였다. 분리 용매는 acetonitrile을 이용하여 10%에서 70%까지 gradient method를 이용하여 분리하였으며 유속은 1 ml/min으로 하였다.

### 2.5.2. 단리화합물의 구조 분석

매죽나무 수피 추출물(SJ-MeOH)의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  가용부로부터 한 개의 화합물을 단리하였고, 분리하는 active guided fraction법을 이용하였다.

매죽나무 수피의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  가용부(230.0 g)를 Sephadex LH-20을 충전제로 한 컬럼크로마토 그래피(8.5  $\times$  43.5 cm, MeOH-EtOH = 1 : 1, v/v)를 이용하여 100 ml씩 52개, 그리고 250 ml씩 6개의 분취물을 얻어, 이 분취물들을 박층 chromatography (TLC, 전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 5 : 4 : 1, v/v/v)에 전개시킨 후, UV lamp (254 nm)로 검색

하여 4개의 분획물(SJ-1~SJ-4)로 나누었다. 다시 SJ-2 분획물(225.23 g)을 silica gel column (8.0 × 36.0 cm, benzene-MeOH = 5 : 1, v/v)으로 250 ml씩 분취하여 65개의 분취물을 얻었으며, 이들 분취물을 6개의 분획물(SJ-2-1~SJ-2-6)로 나누었다. 이 중 각 분획물을 TLC 확인하여 하나의 spot으로 나타나는 SJ-2-4 분획물 (63.26 g)을 silica gel column (5.0 × 30.0 cm, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH = 8 : 1, v/v)으로 100 ml씩 분취하여 4개의 분취물을 얻었으며, 이 중 SJ-2-4-2로부터 화합물(780.0 mg)을 단리하였다(Fig. 1).

FAB-MS  $m/z$  : 557.2006 ( $[M+Na+H]^+$ ),  $m/z$  556.1999, C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub>.  $[\alpha]_D^{32} = -17^\circ$ ,  $c = 0.23$ , MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  2.48 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 14.8$  Hz, H-8), 2.54 (2H, *dd*,  $J = 7.5$  Hz, H-7), 2.67 (1H, *dd*,  $J = 7.5, 13.0$  Hz, H-8'), 2.84 (1H, *dd*,  $J = 7.2, 13.0$  Hz, H-7'), 2.89 (1H, *dd*,  $J = 5.1, 13.0$  Hz, H-7''), 3.45 (2H, *m*, H-4'', 5''), 3.51 (2H, *m*, H-2'', 3''), 3.67 (1H, *dd*,  $J = 4.8, 12.0$  Hz, H-6''), 3.71(3H, *s*, -OCH<sub>3</sub>), 3.72(3H, *s*, -OCH<sub>3</sub>), 3.74(3H, *s*, -OCH<sub>3</sub>), 3.82 (1H, *d*,  $J = 12.0$  Hz, H-6''), 3.90 (1H, *t*,  $J = 8.5, 17.0$  Hz, H-9), 4.11 (1H, *t*,  $J = 8.5, 17.0$  Hz, H-9), 4.87 (1H, *d*,  $J = 7.1$  Hz, H-1''), 6.60 (1H, *d*,  $J = 8.2$  Hz, H-6), 6.66 (1H, *d*,  $J = 8.2$  Hz, H-6), 6.67 (1H, *d*,  $J = 8.1$  Hz, H-6'), 6.72 (1H, *s*, H-2'), 6.81 (1H, *d*,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 7.02 (1H, *d*,  $J = 8.2$  Hz, H-5).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  30.2 (*t*, C-7), 33.6 (*t*, C-7), 37.3 (*d*, C-8), 42.4 (*d*, C-8'), 51.5 (*q*, OMe × 2), 51.7 (*q*, OMe), 57.3 (*t*, C-6''), 66.0 (*d*, C-4''), 67.5 (*t*, C-9), 69.5 (*d*, C-2''), 72.2 (*d*, C-3''), 72.7 (*d*, C-5''), 97.4 (*d*, C-1''), 107.8 (*d*, C-5'), 109.1 (*d*, C-2, 2'), 111.2 (*d*, C-5), 117.4 (*d*, C-6), 117.7 (*d*, C-6'), 126.9 (*s*, C-1'), 129.6 (*s*, C-1), 141.3 (*s*, C-4), 144.0 (*s*, C-4'), 145.1 (*s*, C-3, 3'), 175.7 (*s*, C-9').

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY : H-7'↔H-8', H-8'↔H-8, H-9↔H-8, H-5'↔H-6', H-5↔H-6.

HMBC : H-5↔C-1/C-4/C-3, H-5'↔C-1'/C-3', H-2'↔C-1'/C-6'/C-4', H-2↔C-1/C-6/C-4, H-6↔C-2/C-4,

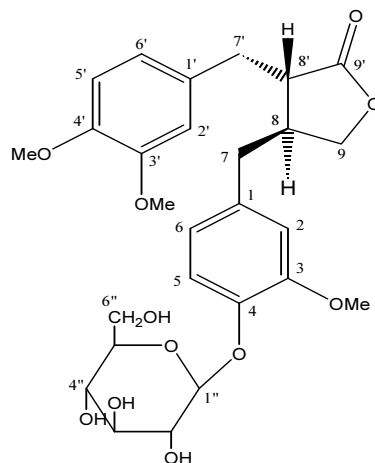


Fig. 1. Chemical structure of Styroxlignolide F.

H-6'↔C-2'/C-4', H-7'↔C-2'/C-6'/C-1'/C-9', H-8'↔C-1'/C-9', H-7↔C-1/C-2/C-6, H-8↔C-1.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 조추출물, 분획물 및 단리물질의 추출 수율

매죽나무 수피의 전건조시료 227.31 g 으로부터 메탄을 추출하여 44.74 g의 메탄을 추출물을 획득하였다. 이를 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 에틸아세테이트(EtOAc)를 이용하여 용매분획하여 얻은 수율은 각각 0.77%, 3.62%, 6.34%를 나타내었다. 분획물 중 유일하게 27.10% 함유하고 있는, 디클로로메탄 층으로부터 활성성분인 styroxlignolide F을 단리하여 HPLC 정량분석을 위한 내부 표준물질로 사용하였다.

내부 표준물질을 3 point calibration하여 디클로로메탄 가용부의 단리 화합물 함량을 계산한 결과 459  $\mu$ g/g이었다. 디클로로메탄층의 함유 수율은 27.1%이며 메탄을 조추출물 기준으로는 5.00%, 건조시료 중량 대비 수율은 1.31%로 나타났다.

**Table 1.** Quantity of solvent extracted from *S. japonica* bark

	Dry sample	MeOH ext.	Hexane sol.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> sol.	EtOAc sol.	Residue
Weight (g)	227.31	44.74	2.31	10.87	19.03	12.53
Yield of extracts (%)	100	14.91	0.77	3.62	6.34	4.18
Yield of isolated compound (%)	1.31	5.00	-	27.10	-	-

### 3.2. 단리화합물의 화학구조

단리화합물의 FAB-MS spectrum에서 분자 ion peak는  $m/z$  534 ( $[M]^+$ , base ion)이며, 분자식  $C_{27}H_{34}O_{11}Na$ 의 분자량은  $m/z$  557를 나타냈다.  $^1H$ -NMR spectrum에서 저자장측에서 나타나는 벤젠핵 영역(benzofuran의 기본형)인 6.5~7.5 ppm에서 나타나며 2~4 ppm에서 side chain의 signal을 볼 수 있다. 또한 고자장측의 3.71 ppm 부근의 3개의 single signal은 methoxyl group (-OCH<sub>3</sub>) proton으로 확인할 수 있으며 4.87 ppm에서 1개의 glucose의 anomer proton에 해당하는 피크를 확인할 수 있으며 결합정수가  $J = 7.1$  Hz이므로 당의 결합은  $\beta$  form에 해당하는 것으로 확인하였다. 3.0 ppm에서 4.0 ppm 사이에 D-glucose에 기인하는 proton을 확인하였다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서는 100~160 ppm에서 벤젠에 기인하는 signal을 확인하였으며 기본구조인 carbon signal과 10~70 ppm 사이에 side chain에 해당하는 5개의 carbon signal을 확인하였으며 176.7 ppm에서 carbonyl carbon에 기인하는 signal을 확인할 수 있다. 60 ppm에서 80 ppm에서 D-glucose에 기인하는 carbon 5개를 확인하였으며 57.3 ppm에서 C-6"의 carbon이 3급 탄소임을 확인할 수 있다. 3.71 ppm, 3.72 ppm, 3.74 ppm에서 -OCH<sub>3</sub>에 기인하는 methoxyl carbon 3개를 확인하였다. DEPT (45°, 90°, 135°)법에 의한 스펙트럼에서는 135°에서 2.54 ppm, 3.51 ppm, 3.45 ppm, 4.87 ppm이 각각 CH<sub>2</sub>임을 확인할 수 있으며 3.71 ppm, 3.72 ppm, 3.74 ppm가 CH<sub>3</sub>임을 확인할 수 있다. 따라서 primary carbon이 7개, secondary carbon이 13개, tertiary carbon이 4개, quaternary carbon이 3개로 총 carbon의 수는 27개임을 확인하였다. HMBC spectrum에서 carboxyl기가 붙어

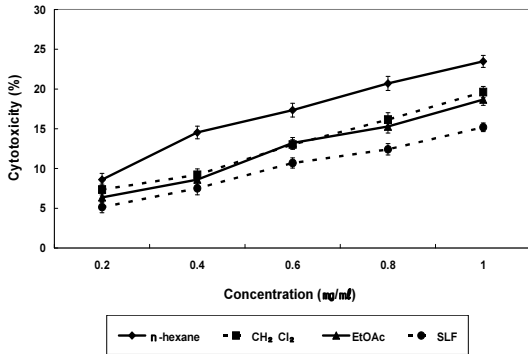
있는 C-9"는 이 spectrum을 통하여 H-9, H-8' H-7"와 의 교차피크로 확인하였으며 D-glucose의 anomer proton인 H-1"는 C-4에 연결된 glycoside임을 확인할 수 있다. 또한 H-9와 C-7, C-8, 과 C-8'와의 교차피크를 확인함으로써 D-glucose가 결합된 A benzene ring임을 명확히 하였다.

입체구조에 있어서는 dibenzylbutyrolactones에서 확인할 수 있는 *cis*-와 *trans*-형태는 H-9번 위치의 methylene group 의해 확인할 수 있음을 Lopes *et al*[15]에 의해 제시되었다. H-9번 위치 메틸렌 그룹의  $^1H$ -NMR chemical shift 값이  $\delta$  4.0~4.1 정도의 근접한 값을 나타내면 *cis*-형태,  $\delta$  3.9와 4.2 정도로 차이가 나면 *trans*-형태라고 보고하였다. 실험에서 단리된 화합물의 경우, 3.9 ppm과 4.12 ppm에서의 proton을 H-9번 위치의 methylene group proton으로 귀속하였으며, *trans* 형태의 특징적인 chemical shift 임을 확인하였다. 이로써 단리화합물은 phenylpropane 류 2분자가 축합한 lignan 구조로 C-9의 carboxyl기가 결합하고 C-4에 D-glucose가  $\beta$  결합한 8'-[(3',4'-dimethoxyphenyl)methyl]-8-[(4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3-methoxyphenyl]oxolan-9-one인 styraxlignolide F로 동정하였다(Fig. 1).

### 3.3. 항암 활성

#### 3.3.1. 인간 정상세포의 세포독성 실험

분획물과 단리물질에 대한 정상세포에 대한 세포독성과 각 암세포에 대한 성장 효과를 검토한 결과, Fig. 2은 인간 정상 신장세포 HEK293에 대한 세포독성을 나타낸 것으로 sample의 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 n-hexane에서 23.5%로 가장 높은 세포독성을 나타내었고, 단리물질인 styraxlignolide F가 가장 낮은 세포



**Fig. 2.** Cytotoxicity of the fractions from *S. japonica* on normal cell line, HEK293 (SLF: Styraxlignolide F). Mean values  $\pm$  S.D. from three separate experiments are shown.

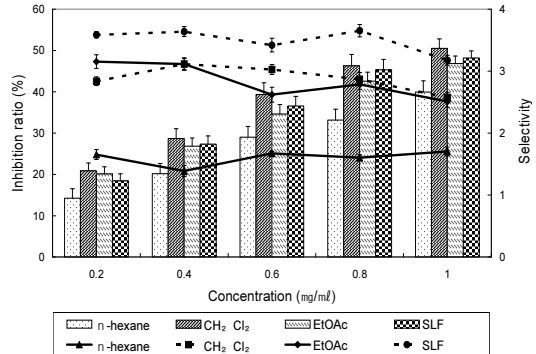
독성인 15.2%의 낮은 세포독성을 나타내었다.

### 3.3.2. SRB assay를 이용한 항암 활성

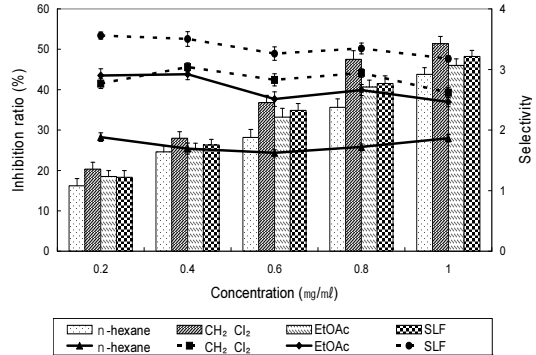
Fig. 3은 인간간암세포인 AGS에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으며, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층이 50.5%로 가장 높은 항암 효과를 나타내었다. 그 다음으로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층에서 분리한 단리물질인 Styraxlignolide F가 높은 활성을 나타내었으며, 다른 분획층에 비해 낮은 세포독성으로 인해 모든 농도에서 3 이상의 가장 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

Fig. 4은 유방암 세포인 MCF-7에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였고, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층에서 51.4%로 가장 높은 항암 효과를 나타내었다. 그러나 선택적 사멸도는 Styraxlignolide F가 모든 농도에서 3 이상으로 가장 높았고, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층과 에틸아세테이트 분획층이 2~3 사이였고, 헥산 분획층은 2 이하로 가장 낮은 선택적 사멸도를 나타내었다.

따라서 암세포의 생육억제는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층이 가장 높았지만, 선택적 사멸도를 따져보았을 때 단리물질인 styraxlignolide F가 더 높아 항암 소재로서의 가치는 단리물질이 높은 것으로 생각된다.



**Fig. 3.** Inhibition ratio of growth AGS (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the fractions of *S. japonica* (SLF: Styraxlignolide F). Mean values  $\pm$  S.D. from three separate experiments are shown.



**Fig. 4.** Inhibition ratio of growth MCF-7 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the fractions of *S. japonica* (SLF: Styraxlignolide F). Mean values  $\pm$  S.D. from three separate experiments are shown.

### 3.3.3. Bcl-2 단백질 정량을 통한 항암 활성

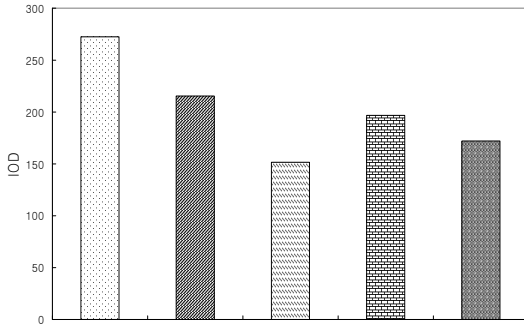
Bcl-2는 18번 염색체에 위치하는 원형 발암 유전자(proto-oncogene)로 apoptosis를 방해하여 세포의 생존을 연장시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있고 [16] 이 유전자의 산물인 bcl-2 단백질은 분자량이 26kDa으로 미토콘드리아의 내막에 위치한다고 하는데[16] 최근 연구에서 bcl-2 단백질의 발현은 여러 종양 발생에 억제적 특성과 자극적 특성을 함께 가지는 것으로 나타나고 있다.

따라서, 인간 정상 신장세포인 HEK293을 이용하여 각 시료에 대한 Bcl-2의 발현에 미치는 영향을 검



Con n-hexane CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> EtOAc SLF

(A)



(B)

**Fig. 5.** The representative (A) western blotting and (B) densitometric analysis of Bcl-2, through adding the fractions of *S. japonica* (SLF: Styraclignolide F).

토하였으며 Bcl-2의 발현량을 나타내기 위해 Densitometer를 이용하여 IOD 값을 측정하여 발현량을 비교하였다. 매죽나무 추출물의 Bcl-2 발현량을 살펴본 결과는 Fig. 5에서 나타내었다. 매죽나무 추출물의 IOD 값을 비교한 결과 디클로로메탄에서 IOD 값이 가장 낮게 나타났으며, styraclignolide F, 에틸아세테이트, 헥산의 순으로 나타났다. 이것은 정상 세포에서의 Bcl-2의 이상 혹은 과잉 발현을 막아 apoptosis를 유도함으로써, 비정상 세포로의 변이를 막음으로써 암 발생을 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 매죽나무의 수피 추출물에서 가장 낮은 Bcl-2 발현은 인간 정상세포에서 암세포로의 변이의 확률이 낮추어 암 발생율을 낮출 것으로 추정할 수 있다.

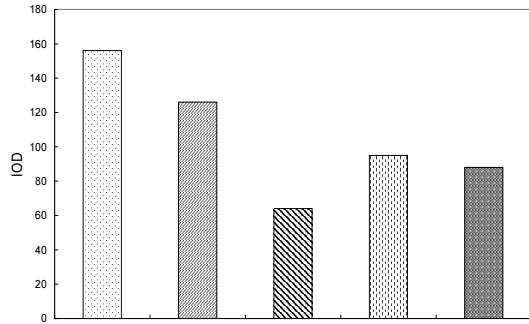
### 3.3.4. p53 단백질 정량을 통한 항암 활성

p53단백질은 유방암 이외에도 대장암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 폐암, 뇌종양 등 여러 암에서 그 발현이 증가되며 특히 유방암에서 p53 단백질의 발현율이 높다고 한다. 인간 유방암 세포인 MCF-7에서의 p53의 이상 혹은 과잉 발현을 막아 apoptosis를



Con n-hexane CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> EtOAc SLF

(A)



(B)

**Fig. 6.** The representative (A) western blotting and (B) densitometric analysis of p53, through adding the fractions of *S. japonica* (SLF: Styraclignolide F).

유도함으로써, 유방암 세포로의 전이를 막음으로써 암 발생을 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 매죽나무의 수피 추출물에서 가장 낮은 p53 발현은 유방암 세포의 진행 및 종양형성 확률을 낮추어 암 발생율을 낮출 것으로 추정할 수 있다[5].

매죽나무 추출물의 p53 발현량을 살펴본 결과는 Fig. 6에서 나타내었다. 매죽나무 추출물의 IOD 값을 비교한 결과 디클로로메탄에서 IOD 값이 가장 낮게 나타났으며, styraclignolide F, 에틸아세테이트, 헥산의 순으로 나타났다.

### 3.3.5. Apoptosis 측정

사용된 세포주로는 인간 폐암세포(A549)가 사용되었다. Fig. 7은 시료 투여 3일부터 사멸이 시작되는 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 추출물의 생육 저해에 의한 것으로 보이며 necrosis에 의한 사멸도 확인할 수 있었지만 대부분의 세포 사멸 형태는 apoptosis를 취하고 있음을 확인할 수 있었다. 이것으로 시료의 세포에 대한 영향이 3일째부터 작용하는 것으로 보인다. 디클로로메탄 분획층에서 46.9%로 가장 높은 생육억제를 나타냈으며, styraclignolide F



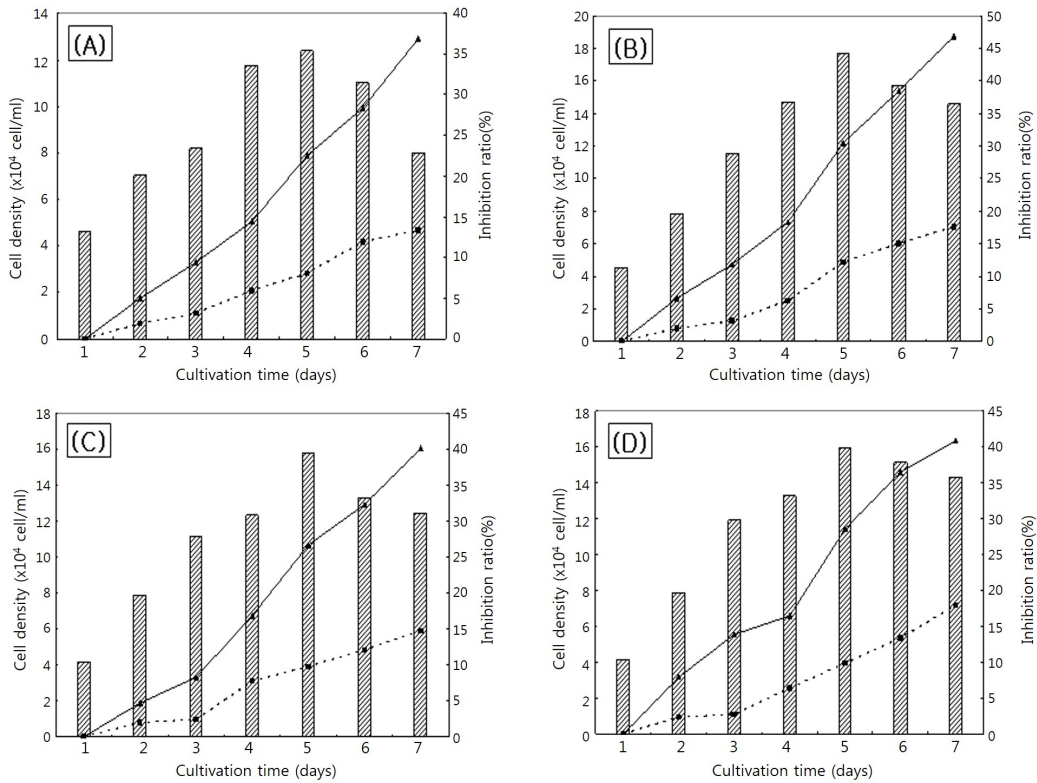


Fig. 7. The pattern of A549 cell density (bar chart) and death (necrosis: ■, apoptosis: ▲) in adding the fractions of *S. japonica*.

와 에틸아세테이트 분획층은 40% 정도의 세포사멸 비율을 나타내었다. 이것은 시료가 A549의 생육을 억제하였으며 apoptosis 및 necrosis를 일으켜 항암 작용이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

#### 4. 결 론

매죽나무(*Styrax japonica*) 수피를 메탄올로 추출하였고, 수피 추출물은 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc의 순으로 분획물을 얻었으며, 이 중 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부에 대해 silica gel column chromatography를 수행하고 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FAB-MS, DEPT, COSY, HMQC, HMBC 스펙트럼 등이 기기분석을 통하여 styroxlignolide F를 분리할 수 있었다.

매죽나무의 각 부위별 추출물의 항암 활성에 대한

비교실험에서 수피 추출물에서 여러 암세포에 대한 강한 성장 저해활성이 높게 나타난 결과를 통해[5] 항암 활성이 높은 수피 추출물에 대해 분획한 분획물과 단리물질인 styroxlignolide F와의 항암 활성 실험에서는 분획물들 중 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부가 높은 항암 활성을 나타내었는데, 이는 단리물질인 styroxlignolide F의 함량차이 및 기타 성분들의 차이로 나타난 것으로 생각되고, 그 다음으로 styroxlignolide F가 높은 활성을 나타내었다. 하지만 세포독성에서는 오히려 styroxlignolide F가 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부보다 낮은 독성을 나타내었다. 이를 바탕으로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부가 단리물질인 styroxlignolide F보다 높은 활성을 나타낸 이유는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부가 세포독성이 styroxlignolide F보다 높은 것과, 여러 가지 물질의 시너지 효과를 통해 활성이 상승작용을 한 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. 한상섭. 산림식물을 이용한 약제, 건강음료 및 분재용 수목 개발에 관한 연구. p.26 (2000).
2. Davis, P. H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 4. University of Edinburgh Press, Edinburgh, p.432 (1972).
3. Costa, A. F. Farmacognosia, second ed., vol. 1. Fundacao Calouste Gulbenkian, Lisboa, p.737 (1968).
4. Vardar, V. and Oflas, S. Preliminary studies on the *Styrax* oil. *Qualitas Plantarum Materiae Vegetales*. 22: 145-151 (1973).
5. Oh Woung Kwon, Cheol Hee Kim, Hyo Sung Kim, Min CHul Kwon, Ju Hee Ahn, Hak Ju Lee, Ha Young Kang, Hyeon Yong Lee. Comparison of Immuno modulatory and Anticancer activities according to the Part of the *Styrax japonica* Sieb. et Zucc. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 15(3): 170-176 (2007).
6. Dyle A, Griffiths JB and Newell DG. *Cell & Tissue Culture, Laboratory Procedures*, Wiley (1993).
7. Chung WT, Lee SH, Cha MS, Sung NS, Hwang B, Lee HY. Biological Activities in Roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci*. 9(1): 45-54 (2001).
8. TJ Lee, JS Lee, JE Choi, JJ Bae, TY Lee. The Effect of Mycolactone on the Expressino of Bcl-2 family genes in Hep 3B Hepatoma Cells. *Journal of Bacteriology and Virology*. 32(1): 55-61 (2002).
9. Frebourg T, Friend SH. Cancer risks from germ-line p53 mutation. *J Clin Invest* 91: 1637-1641 (1992).
10. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, et al. Bcl-2 family proteins : regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem*. 60: 23-32 (1996).
11. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croe CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*. 54: 2095-2097 (1994).
12. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 55: 237-241 (1995).
13. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6 (1994).
14. May A, A Maghrebi, FA Mulla and LT Benov. Glycolaldehyde induces apoptosis in a human breast cancer cell line, *Archives of Biochemistry and Biophysies* 417(1): 123-127 (2003).
15. Pratima Sur., E. A. Sribnick, J. M. Wingrave, M. W. Nowak, S. K. Ray and N. L. Banik. Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells, *Brain Research* 971: 178-188 (2003).
16. Lopes, L. M. X.; Yoshida,M.; Gottlieb,O.R. *Phytochemistry*, 22, 1516-1518 (1983).