Journal of Environmental Science International
26(11); 1285~1295; November 2017

pISSN: 1225-4517 eISSN: 2287-3503
https://doi.org/10.5322/JESI.2017.26.11.1285

ORIGINAL ARTICLE

산국의 잎과 줄기에서 분리한 Sesquiterpene Lactone들의 구조규명 및 생리활성

이종록 · 박문기*
대구한의대학교 제약공학과

Structural Analysis and Biological Activities of Sesquiterpene Lactones Isolated from the Leaves and Stems of *Chrysanthemum boreale* Makino

Jong Rok Lee, Moon Ki Park*
Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongan 38610, Korea

Abstract

Chrysanthemum boreale Makino is widely distributed in Korea, China, Japan and Southeast Asian countries. *C. boreale* is one of the herbs used for treating various inflammatory diseases in oriental medicine. The present study was conducted to identify biologically active compounds from the leaves and stems of *C. boreale*. We isolated two sesquiterpene sactones from the leaves and stems of *C. boreale* using silica gel column chromatography and recyclic high perfomance liquid chromatography. The lactones were characterized by their spectroscopic data (NMR, IR, MASS). These compounds were subjected to Farnesyl Protein Transferase (FPTase) inhibition, Nitric Oxide (NO) release inhibition and apoptosis inhibition. The structur of the following isolated compound were elucidated 8,10-*o*-Acetyl-2-methoxy-10-hydroxy-3,11(13)-guaiadiene-12,6-olide and 4,10-dihydroxy-8-*o*-Acetyl-2,11(13)-guaiadiene-12,6-olide. In the NO release inhibition assay, compound 2 showed strong activities, with an IC_{50} value of 7 μg/mL, whereas compound 1 did not exhibit significant activity with an IC_{50} value of over 14 μg/mL against murine macrophage.

Key words : FPTase, Nitric oxid, Apoptosis, Sesquiterpene lactone, *Chrysanthemum boreale* Makino

1. 서 론

우리나라 중부 이남의 산간지역에 널리 분포하고 있는 산국은 감국 *C. indicum*에 비해 꽃이 약간 작다는 차이점이 있지만 생육 시기나 식물의 형태가 매우 유사하므로, 산국 꽃은 감국 꽃과 같이 한약재 야국으로 사용되었으리라 생각된다(Yoo et al., 2011).

산국 꽃의 성분으로는 에센셜 오일(Shin and Choi, 1986)과 배당체, sesquiterpenoids 그리고 chrysanthemin 등이 있으며(Lee, 2003), 정유 성분으로는 camphor, cis-chrysanthenol, α-thujone, 1,8-cineole, α-pinene, β-caryophyllene, germacrene, camphene, umbellulone

Received 24 October 2017; **Revised** 23 November, 2017; **Accepted** 27 November, 2017
***Corresponding author**: Moon Ki Park, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea
Phone : +82-53-819-1420
E-mail : moonki@dhu.ac.kr

ⓒ The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

및 β-pinene 등이 보고되어 있다(Hong, 2002). 다른 연구자들은 일부 항암 효과가 있다고 보고된 handelin을 분리하였으며(Kang et al., 1996), 그리고 DPPH 라디칼을 소거 활성을 갖는 apigenin과 linarin을 분리하여 보고한 연구도 있다(Han, 2003).

또한 산국 꽃의 효능에 대하여 꽃에서 분리한 sesquiterpene lactone은 인체암세포주인 UACC62, HCT15, UO-31, PC3 및 A549 cell에 비교적 강한 세포독성이 나타나는 것으로 보고하였으며, 항균 활성에 대하여 *S. aureus, B. subtilis, B. cereus E.coli, V. parahaemolyticus*에 항균작용이 나타나는 것으로 보고하였다(Jang et al., 1998a, 1998b). 일부 연구에서는 꽃에서 분리된 일부 성분이 L1210, K562, A549세포에 항암 효과가 나타나는 것으로 보고하였으며, 산국 꽃의 chloroform 분획물이 감국 꽃보다 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 강한 항균력이 있다고 보고하였다(Nam and Yang, 1995a, 1995b).

과학이 발달함에 따라 암에 대한 새로운 접근방법으로서 암의 발생 기전과 병태생리를 해명하여 암을 예방 또는 치료하고자 하는 노력이 경주되고 있는 가운데 가장 최근에 메카니즘 기반의 생물활성시험(Mechanism-based bioassay)이 항암제 개발에 있어서 매우 중요한 방법으로 부상하고 있다(Matthias and Kurt, 1991). 메카니즘 기반의 생물활성시험 방법은 높은 재현성을 가지며, 선택성과 감도가 좋아서 많은 검체의 screening test에 사용할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 가치 있는 방법으로 평가되고 있다. 그러나 확실한 기작을 갖지 않는 화합물은 감지할 수 없으며, 탄닌과 같이 비특이적으로 작용하는 화합물들에 의해 잘못된 결과를 얻을 수 있다는 단점을 갖고 있다.

최근 생화학분야에서 가장 열성적이고 집중적으로 연구되고 있는 분야중의 하나는 Nitric Oxide (NO)로서, NO는 잠재적으로 유독하고, 비교적 불안정하며, 몇몇 중추적인 regulatory pathway에 있어서 중요한 인자로서 부상되고 있는 자유라디칼 기체(Free radical gas)이다(Boyd, 1989). NO는 친유성이기 때문에 특별한 세포막 수송체(Membrane transpoter)의 도움 없이도 세포막을 통해 확산될 수 있으며 NO의 합성의 조절은 이 기체의 다양한 생리작용을 조절하는 열쇠인 것으로 알려져 있다(Venditti, 1981). NO는 중요한 전령분자(Messenger molecule)로서 면역기능, 혈관확장, 혈소판응고, 뇌와 말초신경에서의 신경전달, 돌연변이 생성, 종양세포의 성장 등을 조절하는 것으로 알려져 있어, 정상적인 농도에서는 생체 내에서 필수적인 역할을 담당하지만, NO는 양면성을 가지고 있으므로 고농도에서는 생체 내에서 심각한 독성작용을 나타내기 때문에 이를 억제하거나 촉진하는 물질이 탐색으로 연구가 진행되고 있다.

NO의 유해작용에 대한 연구로는 박테리아에 의해 유발된 위궤양의 발달에 관여한다는 보고가 있으며(Sun et al., 1995), 헤모글로빈을 메트헤모글로빈으로 전환시켜 산소와의 결합능력을 저하시키고 guanyl cyclase와 같은 중요한 효소의 Fe-S cluster를 공격함으로서 세포에 손상을 줄 수 있다는 보고가 있다(Nagava et al., 1997). 또한, 염증성 질환과 함께 NO 생성이 증가되어 NO Synthase (NOS) 저해제를 투여하면 염증성 관절염의 강도를 저하시킬 수 있으며, 인슐린 의존성 당뇨병이 NOS-Ⅱ 활성과 관계가 있다는 보고도 있다(Pickmam, 1986).

따라서 NO의 과잉방출은 여러 가지 생리학적인 문제를 유발할 수 있으며, NO의 방출을 억제하는 인자들을 발견하는 것은 NO의 독성으로 유발되는 질병 치료제의 개발을 위한 중요한 연구로 판단된다.

세포사멸(Apoptosis)은 다세포 동물의 배 발생, 조직의 유지, 조직의 손상 이후에 세포의 재생과정 등에서 일어나며 유전자 단계에서 계획되어진 자발적인 생리 과정이다. 이러한 세포사의 특징으로는 형태학적으로 세포막의 수포화(Blebbing), 세포질과 핵의 응축, 세포가 조각나면서 세포사멸 분체(Apoptotic body)가 형성되는 등의 변화가 발생하고, 생화학적으로는 염색체 DNA가 우선 50-300 kbp정도의 큰 조각으로 잘라진 이후에 200 bp의 정수배 크기의 절편으로 잘려져 세포사멸의 전형적인 특징으로 쓰이는 DNA 단편현상이 일어난다(Kinloch et al., 1999). 또 다른 특징으로는 SPG-2라고 알려진 클루스테린이 증가되고 세포사멸 분체의 표면에 단백질들을 붙이는 트랜스글루타미나제(Transglutaminase)의 활성이 증가된다. 세포사멸에서는 세포괴사(necrosis)와는 달리 죽어 가는 세포의 내용물이 세포 외로 유리되지 않아

다른 세포들에 손상을 주지 않는다. 지금까지 알려진 바로는 세포사의 유도조절에는 몇 가지 단백질이 관련되어 있는 것으로 보고되어 있는데 이 중에는 세포사멸을 억제하는 역할을 가진 BCl2와 유도하는 것으로 알려진 Bax가 있어 이들이 서로 호모다이머(Homodimer) 또는 헤테로다이머(Heterodimer)를 이루고 있다. 또한 caspase (Cysteinyl aspartate-specific proteinases)라고 칭하는 시스테인 단백질분해효소(cysteine protease)들이 세포사의 유도에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다(Burow et al., 1999). 최근에는 심장병이나 뇌졸중으로 인한 세포의 죽음을 막고자 세포의 죽음에 중요한 caspase의 반응과 세포사멸 기작을 이해하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러므로 세포사멸을 조절하는 화학물들이 천연물화학에서 분리하려는 중요한 목표화합물로 두각을 나타내고 있다.

따라서 본 연구에서는 국화과 식물인 산국에서 약효성분으로 예상되는 sesquiterpene lactone을 분리하여 그 구조를 규명하고, 생물학적 활성을 평가함으로써 새로운 천연물 유래 생리활성물질의 개발에 그 목적이 있다. 즉, 산국에서 sesquiterpene lactone을 분리한 후 물리화학적 성상 및 FT-NMR, Mass, IR X-ray 등을 비롯한 각종 분광기기를 이용하여 이들의 화학적 구조를 규명하고, 분리 · 동정된 화합물을 대상으로 FPTase (Farnesyl Protein Transferase) 저해활성 실험과 NO 생성 저해활성실험 및 세포사멸 저해활성 실험을 실시하여 암이나 염증성질환과 같은 질병치료제로서의 개발 가능성을 연구하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 시약

2.1.1. 식물체 재료

본 실험에서 사용한 산국(*Chrysanthemum boreale* M.)의 메탄올 추출물은 국가지정 대구한의대학교 향장소재은행에서 분양받아 FPTase 저해활성과 Nitric Oxide 방출저해활성 및 세포사멸(Apoptosis) 저해활성 실험과 유효성분의 분리에 사용하였다.

2.1.2. 시약 및 기기

Tris-Chloride, EGTA, EDTA, ammonium sulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride, Leupetin, $ZnCl_2$은 Sigma 사, Anion exchange Q-Sepharose Amersharm은 Pharmacia Biotec 사의 것을 사용하였다. Rotary evaporator (BUCHI, R-114), Heating mantle (미성과학, E106) UV/VIS spectrophotometer (Beckman, DU-70), UV lamp (Mineralight, UVGL-58), Ploarimeter (JASCO), IR (Mattson, Genesis series) MS (JMS, DX300), NMR (Bruker, AW500). MPLC (Yemazen) 등의 기기를 사용하였다.

2.2. 재료 및 방법

2.2.1. FPTase 저해활성

2.2.1.1. FPTase의 분리 정제

실험에 사용된 FPTase는 Yokoyama and Gelb (1993)의 방법에 따라 부분 정제하였다. 효소원으로는 흰쥐 (Male Sprague-Dowley, 100～150 g)의 뇌를 분리하여 생리 식염수로 세척하고 100 mL의 냉각 완충용액 A (50 mM Tris-Chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.1 mM Leupetin)를 가한 후 얼음 중탕에서 waring blender로 균질화하였다. 균질액을 60,000 g에서 70분동안 원심분리하여 얻은 상등액을 30% ammonium sulfate로 4℃에서 30분간 염석한 후 12,000 g에서 10분동안 원심분리하였다. 원심분리한 상등액을 50% ammonium sulfate로 4℃에서 30분간 염석한 후 12,000 g에서 10분동안 원심분리하였다. 침전물을 20 mL의 완충액 B (20 mM Tris-chloride, 1 mM DTT and 20 μM $ZnCl_2$, pH 7.5)에 녹여 투석막에 담아 4 L의 완충액 B에서 4시간동안 투석한 후 4 L의 새로운 완충액 B로 12시간동안 다시 투석하였다. 투석이 끝난 용액은 -70℃에 보관하면서 이온교환크로마토그래피 칼럼을 이용하여 다음과 같이 부분 정제하였다.

Anion exchange Q-Sepharose (Pharmacia Biotec.)를 칼럼에 채운 후 증류수로 충분히 씻어내고 완충액 C (완충액 B + 50 mM NaCl)를 가하여 평형을 이루게 한 후 정제하고자 하는 단백질을 칼럼에 넣고 분당 1 mL의 용리 속도로 NaCl의 농도 기울기(50 mM → 500 mM)를 이용하여 정제하였다. 정제된 조단백질은 효소활성을 측정하여 0.5～1 mg/mL의 농도로 부분 정제된 FPTase를 얻어 -70℃에서 보관하면서 사용하였다.

2.2.1.2. FTPase의 활성 측정

FPTase의 활성은 Scintillation Proximity Assay (SPA) 방법에 의해 측정하였다. 20 μL의 3H-FPP (Farnesyl Pyrophosphate), 20 μL biotin lamin B peptide, 10 μL 시료용액, 10 μL의 assay 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM $MgCl_2$, 2 mM KCl, 5 mM Na_2HPO_4, 0.01% Triton X-100)을 넣고 3분동안 pre-incubation한 후 40 μL의 FPTase를 넣어주고 37℃에서 1시간동안 incubation한다. 150 μL의 SPA bead/ stop reagent solution을 넣어 반응을 정지시키고 vortex한 다음, 30분간 상온에서 방치한 후 LSC (Liquid Scintillation Counter)로 측정하였다.

2.2.2. Nitric Oxide (NO)의 방출저해실험

NO 방출저해활성은 macrophage에 의해 배양액으로 방출되는 NO_2의 농도를 Griess reagent를 이용한 흡광도법으로 측정하였다. 세포주는 murine macrophage인 RAW 264.7 cell을 사용하였다. 배양액은 glucose 4.5 g/mL, 2 mM L-glutamine, antibiotics (Penicillin-streptomycin) 100 μg/mL 및 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 5~10×105 cell/mL이 되도록 10 mL petri dish에 10 mL씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

실험하기 하루 전에 세포를 현미경을 이용하여 1×10^6 cell/mL의 농도로 조정한 후 96 well microplate의 각 well에 200 μL씩 분주하여 2시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 진공 흡입법으로 상등액을 제거한 후 새로운 배지로 교환한 다음 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)에 다양한 농도로 녹인 시료액 5 μL와 LPS(1 μg/mL) 5 μL를 차례로 처리하여 다시 20시간동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양 후 각 well에서 100 μL씩 상등액을 취하고 여기에 Gries reagent [A; 0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine 2HCL(in DW), B; 1% sulfanilamide in 5% H_3PO_4(in DW)] 100 μL를 가한 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. Apoptosis 저해실험

2.3.1. Caspase 3의 발현 및 부분 정제

Caspase 3의 대량생산은 U937 leukemia 세포주를 15 mL의 R10 배지(RPMI 1640 + serum 10%)를 함유한 T75 culture flask에 접종 후 CO_2 incubator에서 48시간 배양하였다. Etoposide를 100 μM 농도로 투여하고 4시간 동안 더 배양한 다음 현미경으로 apoptosis 여부를 판별하였다. 세포주를 원심분리(3000 rpm, 10분)한 후 lysis buffer를 처리하여 얻은 cell lysate를 얼음에 30분간 방치한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 caspase 조효소액으로 사용하였다.

2.3.2. Caspase활성 발현유도 및 저해 실험

U937 세포와 96well microplate를 이용한 세포사멸 저해활성 실험은 etoposide의 농도와 처리시간을 각기 달리 하여 U937 세포의 세포사멸을 유도하고, cell lysate와 caspase 3 활성과 세포의 세포사멸을 현미경으로 관찰하였다. 이러한 조건을 바탕으로 시료를 정리하고 etoposide로 세포사멸을 유도한 후 4시간 후에 현미경으로 세포의 모양을 관찰하여 세포사멸 여부를 1차 판정하였으며, 세포를 수합한 후 얻은 lysate를 이용하여 caspase 3의 활성을 DEVE-AFC를 기질로 측정하였다. Etoposide를 투여한 경우 유도된 caspase의 활성과 비 투여시의 활성을 기준으로 각 시료의 저해 활성을 환산하였으며, PDTC (Pyrrolidine Dithiocarbamate)를 표준 caspase 3 유도 저해제로 사용하였다. PDTC는 human thymocytes에서 etoposide에 의해 유도된 세포사멸을 1-10 μM의 농도로 저해하였다고 보고되었다(Gurtu et al., 1997; Lee et al., 1999).

2.4. 재료 및 시료의 추출

국가지정 대구한의대학교 향장소재은행에서 분양받은 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)은 경상북도 영천시 유곡동 일대에서 2012년 10월 15일부터 25일까지 4차례에 걸쳐서 3 kg(dry weight)을 자생지에서 채집하였으며, 클로로포름을 사용하여 추출하였다. 추출 방법으로는 산국의 꽃을 제외한 전초 3 kg을 상온에서 $CHCl_3$ 40 L로 3회 반복하여 추출한 후 감압회전농축기로 감압, 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 -20℃에 보관하면서 유효성분의 분리에 이용하였다.

2.5. 생리활성물질의 분리

산국의 꽃을 제외한 전초 3 kg을 상온에서 $CHCl_3$

40 L로 3회 반복하여 추출한 후 감압회전농축기로 감압, 농축하여 $CHCl_3$ 조추출물 145 g을 얻었다.

2.5.1. 화합물 1의 분리

화합물 CB-1은 산국의 잎과 줄기 3 kg을 클로로포름으로 추출하여 얻은 조추출물 145 g을 silica column (70～230 mesh, 8×13 cm)에 loading하여 클로로포름/메탄올의 혼합용매에서 메탄올의 비율을 점진적으로 높여가며(1/0→0/1) 1차 칼럼크로마토그래피를 실시하여 18개의 분획물로 나누었다. 분획물의 분류 기준은 precoated TLC plate를 사용하여 상승 1차원법으로 전개시킨 후, UV_{254nm}, UV_{366nm} 조사와 10% 황산에 발색되는 반점의 색깔과 Rf (Rate flow) 값의 차이에 따라 분류하였다. 18개의 분획물 중에서 UV_{254nm}에서 약하게 형광을 나타내며 Rf 값이 0.7～0.9 ($CHCl_3$ / MeOH=19/1)이고, 10% 황산에서 푸른색으로 발색되어 sesquiterpene lactone으로 추정되는 분획물 Fr.10을 silica column (230～400 mesh, 5×16 cm)에 loading하여 클로로포름/아세톤의 용매조합에서 아세톤의 비율을 순차적으로 높여가며(49/1～1/1) 2차 칼럼크로마토그래피를 시행하여 다시 8개의 분획물로 나누었다. 이중에서 Rf 값이 클로로포름/아세톤=1/1에서 0.9인 Fr.3을 sesquiterpene lactone으로 추정하고 silica column (230～400 mesh, 2×17 cm)에 loading하여 핵산/에틸아세테이트의 혼합용매에서 에틸아세테이트의 비율을 점진적으로 높여가며(19/1→1/1) 칼럼크로마토그래피를 실시하고, sesquiterpene lactone으로 추정되는 물질이 많은 분획물을 클로로포름/메탄올(49/1)의 용매조합으로 MPLC와 Recyclic HPLC를 반복적으로 실시하여 유상의 화합물 1을 10 mg을 얻었다.

2.5.2. 화합물 2의 분리

화합물 CB-1은 산국 잎과 줄기 3 kg을 클로로포름으로 추출하여 얻은 조추출물 145 g을 silica column (70～230 mesh, 8×13 cm)에 올려 클로로포름/메탄올의 혼합용매에서 메탄올의 비율을 점진적으로 높여가며(1/0→0/1) 1차 칼럼크로마토그래피를 실시하여 18개의 분획물로 나누었다. 분획물의 분류 기준은 precoated TLC plate를 사용하여 상승 1차원법으로 전개시킨 후, UV_{254nm}, UV_{366nm} 조사와 10% 황산에 발색되는 반점의 색깔과 Rf 값의 차이에 따라 분류하였다. 18개의 분획물 중에서 UV_{254nm}에서 약하게 형광을 나타내며 Rf 값이 0.7～0.9 ($CHCl_3$ / MeOH=19/1)이고, 10% 황산에서 푸른색으로 발색되어 sesquiterpene lactone으로 추정되는 분획물 Fr.10을 silica column (230～400 mesh, 5×16 cm)에 올려 클로로포름/아세톤의 용매조합에서 아세톤의 비율을 순차적으로 높여가며(49/1～1/1) 2차 칼럼크로마토그래피를 시행하여 다시 8개의 분획물로 나누었다. 이중에서 Rf 값이 클로로포름/아세톤=1/1에서 0.7인 Fr.5를 sesquiterpene lactone으로 추정하고 silica column (230～400 mesh, 2×15 cm)에 loading하여 핵산/에틸아세테이트의 혼합용매에서 에틸아세테이트의 비율을 점진적으로 높여가며(19/1→1/1) 칼럼크로마토그래피를 실시하고, sesquiterpene lactone으로 추정되는 물질이 많은 분획물을 클로로포름/메탄올(49/1)의 용매조합으로 MPLC와 Recyclic HPLC를 반복적으로 실시한 다음 클로로포름/아세톤(3/2), 에테르/에틸아세테이트(4/1)의 전개용매 조합으로 preparative TLC를 순차적으로 실시하여 유상의 화합물 2를 12 mg을 얻었다.

3. 결과 및 고찰

지금까지 개발된 메카니즘 기반의 생물활성시험 (Mechanism-based bioassay) 방법 중 본 실험에서는 FPTase (Farnesyl-Protein Transferase) 저해제 탐색법을 사용하였다. 먼저 FPTase는 세포의 증식과 분화를 조절하는 신호전달 과정에 관여하는 효소중의 하나로서 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 ras 단백질에 전달하는 역할을 한다. 한편, ras 단백질은 성장조절인자를 통한 신호전달과정에서 가장 중요한 역할을 하는 단백질로서 분자량이 21 kDa이고 188-189개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 뉴클레오타이드 (Nucleotide)들(GDP 와 GTP)과 결합할 수 있다. Ras 단백질은 ras protooncogenes에 의해 발현되는데 이 ras 유전자는 다양한 사람의 종양에서 암유전자 (Oncogenic gene)로서 처음 발견되었고 악성종양과 관련이 있다고 알려져 있다. 이 유전자는 크게 harvey-ras(H-ras), kirsten-ras(K-ras) 및 N-ras로 분류되는데 사람에서 발견되는 대부분의 암에서 ras 단백질

(H-ras, K-ras 및 N-ras)의 생물학적 활성이 30%이상 비정상적으로 변이된 ras 유전자를 갖고 있다는 것이 증명되었다. 특히 췌장암(90%), 폐암(50%), 갑상선암(30%) 등은 높은 빈도로 변이된 ras 유전자를 갖고 있음이 확인되었다. Ras 단백질은 G protein과 마찬가지로 GTP-bound form (switch "on")일 때 신호전달자(Signal transducer)로 작용하며 GTP가 본래의 GTPase activity 또는 GTP 가수분해를 도와주는 단백질인 GAP (GTPase Activating Protein)에 의해서 GDP로 가수분해될 때 비활성화(switch "off") 되게 된다.

그러므로 GAP은 정상적인 ras 신호에서 비활성화(switch "off")가 되게 하는 억제조절자(Negative regulator)이다. 그러나, oncogenic ras 변이에 의해서 12, 13, 59, 또는 61번째의 아미노산이 변화된 ras 단백질에서는 본래의 GTP 가수분해 능력이 200배 정도 감소되어 있을 뿐만 아니라, GAP에 의한 GTPase 활성화 능력이 상실되어서 oncogenic ras 단백질은 정상적인 ras보다 아주 오랫동안 switch "on"(GTP-bound) 상태로 남아 있게 된다. 따라서 ras에 GTP가 결합된 상태로 존재하는 세포는 외부의 신호 없이 계속적으로 신호내의 신호전달 단백질들에 신호를 보내어 세포의 분열과 증식을 촉진시키게 된다(Janice et al., 1995). 이런 비정상적인 분열과 성장은 carcinogenesis에 필수적인 요소이다.

이에 따라 본 연구에서 FPTase (Farnesyl-Protein Transferase)의 저해제 탐색을 통해 산국의 항암활성에 대하여 알아보고자 하였다.

3.1. 화합물 1과 2의 구조 규명

3.1.1. 화합물 1의 구조동정

화합물 1은 무색유상의 물질로서 적외선 스펙트럼에서 1759 cm^{-1}과 1645 cm^{-1}에서 3개의 카르보닐기(-CO)의 피크가 존재하고 있음을 알 수 있었고, 질량스펙트럼에서는 분자이온 (M^+)의 피크가 m/e=378에서 관찰되었고, m/e=318 (M^+-60)의 fragment와 m/e=258 (M^+-120)의 fragment로부터 acetyl기가 2개 존재하고 있다는 정보를 얻을 수 있었다.

Table 1에서와 같이 ^{13}C-NMR 스펙트럼에서는 탄소 수가 20개라는 것을 알 수 있었으며, 화학적 이동값 δ 170.1 ppm, 169.41 ppm의 피크로부터 3개의 카르보닐기가 존재한다는 사실을 알 수 있었고, DEPT 90과 135 스펙트럼에서는 5개의 CH_3 (3H×5=15H), 2개의 CH_2 (2H×2=4H), 7개의 CH (^{1}H×7=7H), 그리고 6개의 4차탄소가 존재하고 있음을 알 수 있었고, 또 ^{1}H-NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 26개의 수소가 존재함을 알 수 있었다. 이러한 분광학적인 자료를 종합하여 볼 때, 화합물 1의 분자식은 $C_{20}H_{26}O_7$로 추정할 수 있었다.

^{13}C-1H COSY (HMQC) 스펙트럼에서 endo methylene 1개와 exo methylene 1개가 분자 내에 존재함을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 DEPT스펙트럼의 결과들과 잘 일치하였다. ^{1}H-^{1}H COSY 스펙트럼에서 H13a/b(6.18, 5.49 ppm)의 vinyl양성자는 allylic위치 H7(3.78 ppm)과 교차 피크가 관찰되고 H7은 H8(5.49 ppm), H6(4.24 ppm)과 교차 피크가 각각 관찰되었고, H8은 H9a/b와 연결되어 있고 H9a/b는 더 이상의 교차 피크를 관찰할 수 없었다. 또한 H6은 H5(2.78 ppm)와 H7(3.78 ppm)과 교차 피크가 관찰되었으며 H5는 H1(2.31 ppm), H6(4.24 ppm)과 H1은 H2(4.03 ppm), H2는 H3(5.91 ppm)과 교차 피크를 각각 찾을 수 있으며, H3은 더 이상 교차 피크를 관찰할 수 없었다.

보다 구체적인 구조동정을 위하여 HMBC로 분석해 본 결과 C10 탄소는 격리된 H14(1.94 ppm)와 H1(2.49 ppm), H9a/b(2.30, 1.90 ppm)교차 피크가 관찰되었고, 그리고 C4 탄소는 H3(5.71 ppm), H5(3.05 ppm), H15(1.30 ppm)의 교차 피크가 관찰되었고, C2 탄소는 H3′(3.21 ppm) 양성자, C11 탄소는 H13a/b (6.21, 5.59 ppm)과의 교차 피크가 관찰되었고, C1′탄소는 H8(5.11 ppm), H2′(1.94 ppm)과 교차 피크를 관찰할 수 있었다.

이상의 분광학적 결과와 문헌자료를 비교해 본 결과 화합물 1은 5고리 + 7고리 + 5고리의 기본골격을 가지고 있는 sesquiterpene lactone인 guaianolide 중에서 2번 위치에 methoxy 그룹, 8,10번 위치에 2개의 *o*-Acetyl 그룹, 11번 위치에 exomethylene 그룹을 가지고 있는 8,10-*o*-Acetyl-2-methoxy-10-hydroxy-3,11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정 되었다(Fig. 1).

Table 1. NMR data for compound 1

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	55.6	2.31(m, 1H)
2	83.7	4.02(m, 1H)
3	126.6	5.91(s, 1H)
4	151.1 (Quaternary)	
5	54.6	3.05(dd, J_1=10.6 Hz, J_2=7.1 Hz, 1H)
6	82.1	4.22(dd, J_1=10.7 Hz, J_2=9.3 Hz, 1H)
7	47.0	3.78(m, 1H)
8	73.9	5.19(m, J_1=9.4 Hz, J_2=5.7 Hz, J_3=1.4 Hz, 1H)
9	41.7	3.04(dd, J_1=17.0 Hz, J_2=6.1 Hz, 1H) 1.93(d, J=17.0 Hz, 1H)
10	74.0 (Quaternary)	
11	138.7 (Quaternary)	
12	169.4 (C=O)	
13	121.1	6.18(d, J=3.5 Hz, 1H) 5.49(d, J=3.1 Hz, 1H)
14	18.4	1.36(s, 3H)
15	32.7	2.00(s, 3H)
1'	170.1 (C=O)	
2'	21.5	2.17(s, 3H)
3'	170.1 (C=O)	
4'	30.7	2.15(s, 3H)
5'	55.8	3.21(s, 3H)

3.1.2. 화합물 2의 구조동정

화합물 2는 무색유상의 물질로서 적외선 스펙트럼에서 3500 cm^{-1}에서 전형적인 알콜(-OH) 흡수띠와 1759 cm^{-1} 부근의 2개의 카르보닐기(-CO), 1645 cm^{-1} 부근에서 C=C의 피크가 존재하고 있다는 것을 알았다. 질량 스펙트럼에서는 분자이온(M^+)의 피크가 m/e=322에서 나타났고, m/e=304에서 hydroxy기, m/e=262에서 acethyl기의 특징적인 fragment 이온 피크가 각각 관찰되었다.

Table 2에서와 같이 ^{13}C-NMR 스펙트럼에서는 17개의 탄소 피크가 관찰되었고, DEPT 90과 135 스펙트럼에서 3개의 CH_3 (3H×3=9H), 2개의 CH_2 (2H×2=4H), 7개의 CH (1H×7=7H), 4차 탄소가 5개 존재함을 알 수 있었으며, 화학적 이동값 100 ppm이상의 모든 탄소는 이중결합을 가지고 있음을 알 수 있고, 170.4 ppm과 170.5 ppm의 피크로부터 2개의 카르보닐기가 존재함을 알 수 있었다.

^{1}H-NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 수소가 22개 존재하고 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 분광학적인 자료를 종합하여 볼 때, 화합물 2의 분자식은 $C_{17}H_{22}O_6$로 추정할 수 있었다.

^{13}C-1H COSY (HMQC) 스펙트럼의 교차 피크로부터 endo methylene 1개와 exo methylene 1개가 분자 내에 존재한다는 것을 알 수 있고, 이상의 결과들은 DEPT 스펙트럼의 결과와 일치하였다. ^{1}H-^{1}H COSY 스펙트럼에서 H13a/b(6.23, 5.89 ppm)의 vinyl 양성자는 allylic 위치의 H7(3.24 ppm)과 coupling을 하고, H7은 H6(4.60 ppm), H8(5.10 ppm)과 coupling을 하고 있는 것이 관찰되었다. H8은 H7(3.24 ppm), H9a/b(2.28, 1.82 ppm)와 coupling하고 있었으나, H9는 H8을 제외하고는 coupling을 관찰할 수 없었다. 그리고 H6은 H7(3.24 ppm), H5(2.68 ppm)과 coupling

Table 2. NMR data for compound 2

Position	δ_C(ppm)	δ_H(ppm)
1	58.16	3.26(m, 1H)
2	131.2	5.92(dd, J_1=5.85 Hz, J_2=2.55 Hz, 1H)
3	139.5	5.76(dd, J_1=5.83 Hz, J_2=2.0 Hz, 1H)
4	84.2 (Quaternary)	
5	54.9	2.68(dd, J_1=11.95 Hz, J_2=10.15 Hz, 1H)
6	78.7	4.60(dd, J_1=11.95 Hz, J_2=9.3 Hz, 1H)
7	47.4	3.24(m, 1H)
8	72.0	5.10(m, 1H)
9	50.6	2.28(dd, J_1=12.9 Hz, J_2=4.25 Hz, 1H) 1.89(dd, J_1=24.0 Hz, J_2=11.6 Hz, 1H)
10	71.9 (Quaternary)	
11	137.0 (Quaternary)	
12	170.5 (C=O)	
13	123.5	6.23(d, J_1=3.3 Hz, 1H) 5.89(d, J_1=2.90 Hz, 1H)
14	23.2	1.13(s, 3H)
15	23.6	1.42(s, 3H)
1'	170.5 (C=O)	
2'	20.0	2.12(s, 3H)

하고 있었으며, H5는 H1(3.26 ppm), H6(4.60 ppm)과 coupling하고, 또한 H1은 H2(5.92 ppm)과 교차 피크를 관찰할 수 있었으며, H2는 H3(5.76 ppm)과 coupling이 관찰되었고, H3은 더 이상 교차 피크를 관찰할 수 없었다. 보다 구체적인 동정을 위하여 HMBC로 분석해 본 결과 C10 탄소는 격리된 H14(1.13 ppm)와 H1(3.26 ppm), H9a/b(2.28, 1.82 ppm)교차 피크가 관찰되었고, 그리고 C4 탄소는 H3(5.76 ppm), H5 (2.68 ppm), H15(1.42 ppm)의 교차 피크가 관찰되었고, C11 탄소는 H13a/b (6.23, 5.89 ppm)과의 교차 피크가 관찰되었고, C1′ 탄소는 H8(5.10 ppm), H2′(2.12 ppm)과 교차 피크를 관찰 할 수 있었다. 따라서 화합물

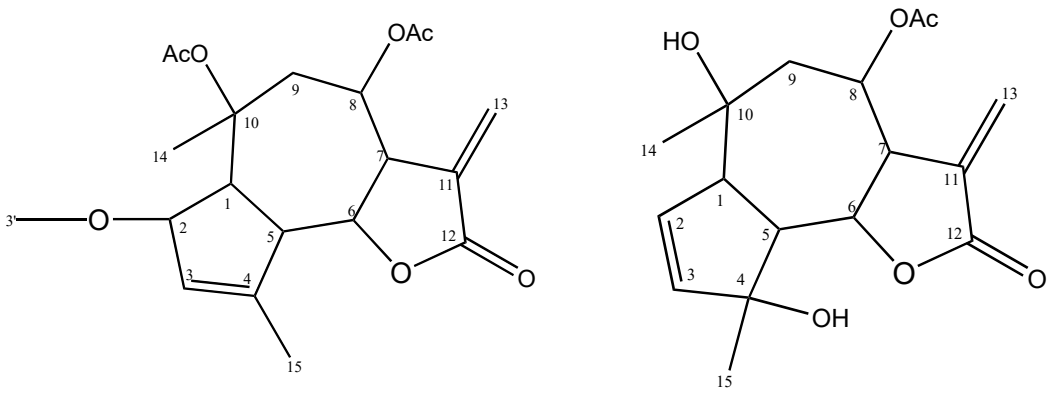

Fig. 1. Chemical structure of compounds 1 and 2.

2는 17개 탄소를 갖는 sesquiterpene lactone 골격에 2개의 탄소를 갖는 acetyl기가 붙어있음을 알 수 있었다.

이상의 분광학적 결과와 문헌자료를 비교해 본 결과 화합물 2는 5고리 + 7고리 + 5고리의 기본골격을 가지고 있는 sesquiterpene lactone인 guaianolide 중에서 4번 위치와 10번 위치에 hydroxy 그룹, 8번 위치에 *o*-Acetyl 그룹, 11번 위치에 exomethylene 그룹을 가지고 있는 4,10-dihydroxy-8-*o*-Acetyl-2,11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정 되었다(Fig. 1).

3.2. 화합물 1과 2의 생리활성

3.2.1. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 화합물들의 FPTase 저해활성

산국의 잎과 줄기에서 분리한 2종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 FPTase에 대한 억제 효과를 알아보기 위하여 scintillation proximity assay를 실시하였다. 그 결과 Table 3에 나타낸 바와 같이 100 μg/mL의 농도에서 화합물 1은 59%, 화합물 2는 43%의 저해율을 보였다.

Table 3. FPTase (Farnesyl Protein Transferase) inhibitor activities of compounds 1 and 2 by scintillation proximity assay

Compounds	Inhibition ratio (%) 100 μg/mL
1	59
2	43

3.2.2. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 화합물들의 Nitric Oxide (NO) 방출 저해활성

산국의 잎과 줄기에서 분리한 2종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 murin macrophage에 의해 배지내로 방출되는 NO의 량이 얼마나 감소시키는가를 알아보기 위하여 Griess reagent를 이용한 NO 방출 저해활성실험을 실시하였다. 그 결과 Table 4에 나타낸 바와 같이 화합물 1은 IC_{50} 값이 14 μg/mL이며, 화합물 2는 IC_{50} 값이 7 μg/mL로 비교적 강한 활성을 보였다.

Table 4. NO production inhibitory activities of compounds 1 and 2 against murine macrophage

Compounds	Inhibition ratio (μg/mL) IC_{50}
1	14
2	7

3.2.3. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 화합물들의 세포사멸 저해활성

산국의 잎과 줄기에서 분리한 2종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 세포사멸 저해제로서의 개발가능성을 조사하기 위하여 세포사멸을 유도하는 것으로 알려진 caspase 3의 활성을 저해하여 세포사멸을 저해하는 실험을 하였다. 그 결과 Table 5에 나타낸 바와 같이 화합물 1은 100 μg/mL의 농도에서 94%를 저해하였고, 화합물 2는 100 μg/mL의 농도에서 91%를 저해하여 강한 활성을 보였다.

Table 5. Inhibition effect of apoptotic caspase 3 of compounds 1 and 2 isolated from *Chrysanthemum boreale* Makino

Compounds	Inhibition ratio (%)	
	100 μg/mL	20 μg/mL
1	94	71
2	91	65

4. 결 론

본 연구는 국화과 식물인 산국에서 약효성분으로 예상되는 sesquiterpene lactone을 분리하여 그 구조를 규명하고, 생물학적 활성을 평가함으로써 새로운 천연물 유래 생리활성물질을 탐색하였다. 즉, 산국에서 생리활성을 가지는 물질을 분리한 후 물리화학적 성상 및 FT-NMR, Mass, IR X-ray 등을 비롯한 각종 분광기기를 이용하여 이들의 화학적 구조를 규명하였다. 그리고 분리 · 동정된 화합물을 대상으로 FPTase 저해활성 실험과 NO 생성 저해활성실험 및 세포사멸 저해활성실험을 실시하여 암이나 염증성질환과 같은 질병치료제로서의 개발 가능성을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 2가지 화합물 1과 2에 대한 구조동정 결과, 모두 5고리 + 7고리 + 5고리의 기본골격과 α-exomethylene-γ-lactone moiety를

가지고 있는 sesquiterpene lactone인 것으로 밝혀졌다. 즉 화합물 1은 sesquiterpene lactone인 guaianolide 중에서 2번 위치에 methoxy 그룹, 8, 10번 위치에 2개의 *o*-Acetyl 그룹, 11번 위치에 exomethylene 그룹을 가지고 있는 8,10-*o*-Acetyl-2-methoxy-10-hydroxy-3,11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정 되었고, 화합물 2는 5고리 + 7고리 + 5고리의 기본골격을 가지고 있는 sesquiterpene lactone인 guaianolide 중에서 4번 위치와 10번 위치에 Hydroxy 그룹, 8번 위치에 o-Acetyl 그룹, 11번 위치에 exomethylene 그룹을 가지고 있는 4,10-dihydroxy-8-*o*-Acetyl-2,11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정 되었다.

2. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 2가지 화합물 1과 2를 대상으로 FPTase 저해활성 실험과 NO 방출 저해활성실험 및 세포사멸 저해활성 실험을 실시하여 암이나 염증성 질환과 같은 질병치료제로서의 개발 가능성을 조사한 결과 화합물 1은 100 μg/mL의 농도에서 59%의 FPTase 저해활성과, 94%의 세포사멸 저해활성을 보였으며, NO 방출 저해활성실험 결과 IC_{50} 값이 14 μg/mL으로 나타났다. 화합물 2는 100 μg/mL의 농도에서 43%의 FPTase 저해활성과, 91%의 apoptosis 저해활성을 보였으며, NO 방출 저해활성실험 결과 IC_{50} 값이 7 μg/mL으로 나타났다.

감사의 글

본 논문은 2013년 대구한의대학교 기린연구년제의 지원결과로 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Boyd, M. R., 1989, Status of implementation of the NCI human tumor cell line in vitro primary drug screen, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 30, 652.

Burow, J. C., Tang, Y., Collins-Burow, B. M., Krajewski, S., Reed, J. C., Mclachlan, J. A., 1999, Effect of environmental estrogen on tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in MCF-7 cells, Carcinogenes, 20, 2057-2061.

Gurtu, V., Kain, S. R., Zhang, G., 1997, Flurometric and colorimetric detection of caspase activity associate whith apoptosis, Analytical Biochem., 251, 98-102.

Han, W. S., 2003, Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Chrysanthemum boreale* Makino, Korean J. Medicinal Crop Sci., 11(1), 1-4.

Hong, C. U., 2002, Essential oil composition of *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum*, J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 45(2), 108-113.

Jang, D. S., Park, K. H., Ko, H. L., Lee, H. S., Kwon, B. M., Yang, M. S., 1998, Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several compositae plants, Part 3, Inhibitory activity on nitric oxide release and ACAT, Kor. J. Pharmacogn., 29(3), 243-247.

Jang, D. S., Park, K. H., Yang, M. S., 1998, Germacranolides from flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino, Kor. J. Pharmacogn., 29(2), 67-70.

Janice, E. B., James, C. M., 1995, Farnesyl transferase inhibitor ; the successes and surprises of a new class of potential cancer chemotherapeutics, Chemistry and Biology, 2(12), 789-791.

Kang, S. S., Kim, J. S., Son, K. H., Lee, C. O., Kim, Y. H., 1996, Isolation of handelin from *Chrysanthemum boreale*, Arch. Pharm. Res., 19(5), 406-410.

Kinloch, R. A., Treherne, J. M., Furness, L. M., Hajimohamadreza, I., 1999, The phamacology of apoptosis, Trend in Phamacological Science, 20, 35-42.

Lee, H. J., Lee, C. C., Chung, H. H., Rhee, J. S., Kho, Y. H., 1999, Dykellic acid, a novel apoptosis inhibitor from *Westerdykella multispora* F50733, Tetrahedron Letter, 40, 6940-6950.

Lee, T. B., 2003, Illustrated flora of Korea, Hyangmoonsa, 379.

Matthias, H., Kurt, H., 1991, Bioactivity in plant: The link between phytochemistry and medicine, Phytochemistry, 30(12), 3864-3874.

Nagava, H., Tobita, Y., Nagae, T., Itokawq, H., Takeya, K., Halium, A. M., Osama, B. A. H., 1997, Cytotoxic triterpenes from Cleome africana, Phytochemistry, 44(6), 1115-1119.

Nam, S. H., Yang, M. S., 1995, Antibacterial activities of extracts from *Chrysanthemun boreale* M., Agri. Chem. and Biotech., 38(3), 269-272.

Nam, S. H., Yang, M. S., 1995, Isolation of cytotoxic

substances from *Chrysanthemum boreale* M., Agri. Chem. and Biotech., 38(3), 273-277.

Pickmam, A. K., 1986, Biochem. System. Ecol., 14, 255-281.

Shin, S. H., Choi, Y. I., 1986, Analysis of essential oil from *Chrysanthemum sibiricum* and the comparison with essential oils from some *chrysanthemum spp*., Kor. J. Pharmacognosy, 3(153), 153-156.

Sun, H.-D., Lin, Z.-W., Niu, F.-D., Lin, L.-Z., Chai, H.-B., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., 1995, Cytotoxicent -Kaurene diterpenoids from three Isodon species. Phytochemisry, 38(2), 437-442.

Venditti, J. M., 1981, Pre-clinical drug evaluation, Rationale and methods, Semin. Oncol., 8, 349-361.

Yokoyama, K., Gelb, M. H., 1993, J. Biol. Chem., 268, 4055-4060.

Yoo, K. S., Bang, C. S., Lee, K. J., Ham, I. H., Choi, H. Y., 2011, Anti-inflammatory effects of *Chrysanthemum boreale* flower, Kor. J. Herbology, 26(4), 31-37.