

## 칠황버섯으로부터 분리한 Lanostane-type Triterpenoid의 암세포성장 억제효과

김동화<sup>1</sup> · 이상국<sup>1</sup> · 박희준<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 약학대학, <sup>2</sup>상지대학교 제약공학과

### Cancer Cell Growth Inhibition of Lanostane-type Triterpenoids Isolated from *Ganoderma gibbosum*

Donghwa Kim<sup>1</sup>, Sang Kook Lee<sup>1</sup>, and Hee-Juhn Park<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

**Abstract** – The CHCl<sub>3</sub> fraction of the MeOH extract of *Ganoderma gibbosum* (Ganodermataceae) exhibited cytotoxic activity on five cancer cell lines (MDA-MB-231, SK-hep1, A549, HCT116, and SNU638). Six highly oxygenated lanostane-type triterpenoids (lanostanoids) were isolated by column chromatography to test cytotoxicity on cancer cells. The five known lanostanoids were identified as gibbolic acids A, B, D, G, and H by comparison of molecular ion peaks with the literature data. The structure of a new lanostanoid, gibbolic acids I, was identified to be 3β,8β,15β,20S-tetrahydroxy-7,12,23-trioxolanost-9(11)-en-26-oic acid on the basis of NMR and MS spectroscopy. The three lanostanoids of gibbolic acids A, H, and I of the six isolates significantly suppressed the growth of cancer cells. In particular, the IC<sub>50</sub> of gibbolic acid H was prominently low ranging from 2.64–6.56 μM.

**Keywords** – *Ganoderma gibbosum*, Ganodermataceae, Lanostanoids, Gibbolic acids, Cytotoxicity

칠황버섯(*Ganoderma gibbosum*, Ganodermataceae = Polyporaceae)은 썩거나 죽은 낙엽수의 그루터기에서 기생하여 자라는 버섯의 일종이다. 최근 한국에서는 칠황버섯을 울나무(*Rhus verniciflua*, Anacardiaceae)를 이용하여 재배하는데 성공하여 암 치료에 효과가 있다고 알려짐에 따라 민간에서 각광받고 있다. 저자들은 칠황버섯을 이용하여 백혈병을 치유했다는 사례에 주목하여 본 연구를 수행하게 됐다. 이 버섯은 그 외에도 소화기능증진, 면역강화, 노화방지 효과가 있다고 하며, 변비 및 고혈압에도 효과가 있다고 한다.<sup>1)</sup>

암 치료에 가장 효과가 있는 버섯으로는 상황버섯(*Phellinus linteus*)이 유명하다.<sup>2)</sup> 그리고 *Ganoderma*속에 속하는 버섯류인 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)도 암치료 이외에도 여러 가지 효능을 가지는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> 최근에는 한국의 민간에서 칠황버섯을 항암목적으로 사용하고 있으

로 그 활성성분을 찾기 위한 노력으로 본 연구를 수행하였다.

칠황버섯으로부터 메탄올 추출물을 얻은 후 분획물을 제조하여 그 추출물과 분획물에 대한 세포독성 실험을 수행한 결과 CHCl<sub>3</sub> 분획에서 높은 활성이 나타났으므로 이 분획을 컬럼크로마토그래피를 이용하여 물질 분리를 활성 성분을 탐색하는 실험을 수행하였다. 암세포성장 저해활성은 SRB assay법으로 5종의 암세포주인 MDA-MB-231(breast), SK-hep1(liver), A549(lung), HCT116(colon) 및 SNU638(stomach)를 이용하여 측정하였다.

### 재료 및 방법

**기기 및 시약** – Mass spectrum의 측정은 Agilent technologies사의 Single quadrupole LCMS spectrometer를 이용하여 secondary ion mass spectrometry(SIMS) 법으로 측정하였다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance(NMR)은 Bruker AM-600 spectrometer(Bruker, Rheinstetten, Germany)을 사용하였고 내부표준물질로 TMS(tetramethylsilane)으로

\*교신저자(E-mail): hjpark@sangji.ac.kr  
(Tel): +82-33-730-0564

하여 측정하였다. 화합물 분리를 위한 컬럼으로 Yamazen사의 prepacked column(30  $\mu$ m, Japan)을 사용하였다.

**식물재료** - 경상북도 문경시 산양면 소재의 (주) 원칠황(대표: 이원용)에서 재배한 칠황버섯(*G. gibbosum*)의 자실체를 공급받았다. 이 버섯은 상지대 원예조경학과 임상철 교수에 의해 칠황버섯으로 동정되었다. 이를 건조한 후 세절하여 추출을 위한 재료로 사용하였다. 또 이 칠황버섯의 표본(natchem-# 127)은 상지대학교 제약공학과 천연물화학 실험실에 보관 중이다.

**추출과 분획** - 칠황버섯 840 g을 플라스크에 넣고 5 L의 용매로 각 5시간씩 환류 하에 세 번 반복하여 추출하였다. 추출액을 여과한 후 rotatory evaporator를 이용하여 농축한 후 최종적으로 진공 오븐으로 건조하여 MeOH 추출물 92.0 g을 얻었다.

이를 분획하기 위하여 1.0 L의 H<sub>2</sub>O에 현탁시킨 후 먼저 1.0 L hexane으로 분획하는 과정을 3회 반복하였다. Hexane 가용부를 감압농축한 후 진공오븐에서 건조하여 8.9 g을 얻었다. H<sub>2</sub>O 분획을 더욱 1.0 L의 CHCl<sub>3</sub>로 분획하는 과정을 3회 반복하여 CHCl<sub>3</sub> 가용부를 얻었다. CHCl<sub>3</sub> 가용부를 동일한 방법으로 건조하여 CHCl<sub>3</sub> 분획 28 g을 얻었다. 남은 H<sub>2</sub>O 층에 대하여 EtOAc로 3회 분획하고 EtOAc 가용부를 건조하여 EtOAc 분획 6.8 g을 얻었다. 마지막으로 남은 수 층에 대해 BuOH로 분획하였고, BuOH 가용부를 얻은 후 건조하여 BuOH 분획 13 g을 얻었다.

**Lanostanoid의 분리** - CHCl<sub>3</sub> 분획으로부터 화합물을 분리하기 위하여 silica gel column(30  $\mu$ m,  $\Phi$  5 cm $\times$ 20 cm, Yamazen, Japan)을 사용하였다. 전개용매로 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(8:1:1, lower phase) 용매를 사용하였고, 이 전개용매 0.9 L를 사용한 후 0.9 L의 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(8:2:1, lower phase)로 변경하여 전개하였다. 약 50 mL씩 분취하면서 54 개의 소분획(#1-54)을 얻어서 각각을 TLC로 체크하여 7개의 그룹으로 분류한 후 농축하여 GG-1(#9-12), GG-2(#23-30), GG-3(#42-44), GG-4(#46-47), GG-5(#50-51), GG-6(#52-54)를 얻었다.

GG-1는 sephadex LH-20 column에서 MeOH로 용출하여 정제하여 compound 1를 얻었다. GG-2와 GG-3, GG-4의 MeOH 용액 중 재결정하여 compound 2, compound 3, compound 4를 각각 얻었다. GG-7, GG-8에 대해서도 Sephadex LH-20 column에서 더욱 정제하여 compound 5, 6을 각각 얻었다. 각 화합물에 대한 신속한 동정을 위해 질량스펙트럼을 측정하였다.

Compound 1(gibbolic acid A): White powder, ESI-MS m/z 549.1 [M + Na]<sup>+</sup>.

Compound 2(gibbolic acid B): White powder, ESI-MS m/z 551.2 [M + Na]<sup>+</sup>.

Compound 3(gibbolic acid D): White powder, ESI-MS m/z 553.2 [M + Na]<sup>+</sup>.

Compound 4 (gibbolic acid E): White powder, ESI-MS m/z 567.2 [M + Na]<sup>+</sup>.

Compound 5(gibbolic acid I): White powder, ESI-MS m/z 571.2 [M + Na]<sup>+</sup>.

Compound 6(gibbolic acid H): White powder, ESI-MS m/z 569.2 [M + Na]<sup>+</sup>.

**Compound 5의 NMR 측정** - 분자량에 근거하여 화합물 5의 화합물이 Pu 등이<sup>1)</sup> 발표한 lanostanoid 화합물 중에 없었으므로, 이 화합물의 구조를 결정하기 위하여 CDCl<sub>3</sub> 용매 중에서 <sup>1</sup>H-NMR spectrum과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 측정하였다.

#### Compound 5

White powder, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.05-2.26 (3H $\times$ 8), 3.15 (1H, dd-like, H-3), 6.10 (1H, s); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 37.0 (C-1), 27.2 (C-2), 76.2 (C-3), 39.7 (C-4), 47.0 (C-5), 35.4 (C-6), 206.3 (C-7), 81.2 (C-8), 165.0 (C-9), 39.5 (C-10), 124.0 (C-11), 204.6 (C-12), 66.0 (C-13), 47.0 (C-14), 75.2 (C-15), 34.4 (C-16), 48.5 (C-17), 28.5 (C-18), 19.8 (C-19), 72.1 (C-20), 28.5 (C-21), 50.8 (C-22), 210.5 (C-23), 46.9 (C-24), 34.4 (C-25), 16.8 (C-26), 179.0 (C-27), 27.2 (C-28), 14.3 (C-28), 25.6 (C-30).

**세포배양** - 인체 암세포인 폐암 세포(A549), 대장암 세포(HCT116), 유방암 세포(MDA-MB-231), 간암 세포(SK-HEP-1) 등 4종의 암세포주를 American Type Culture Collection(ATCC, VA, USA)로부터 제공받았고, 나머지 한 종인 위암 세포주(SNU-638)는 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 제공받아 사용하였다. 세포주들은 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS) and antibiotics-antimycotics(PSF; 100 units/mL penicillin G sodium, 100 ng/mL streptomycin, and 250 ng/mL amphotericin B)를 추가한 배지를 사용하여 배양하였다. 여기서 SK-HEP-1 세포주에 대해서만 DMEM 배지로 배양하였고, 나머지 4종 세포주는 A549, HCT116, SNU-638, MDA-MB-231에 대해서는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 각 세포들 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 습윤 공기 중에서 37°C 온도로 유지하였다.

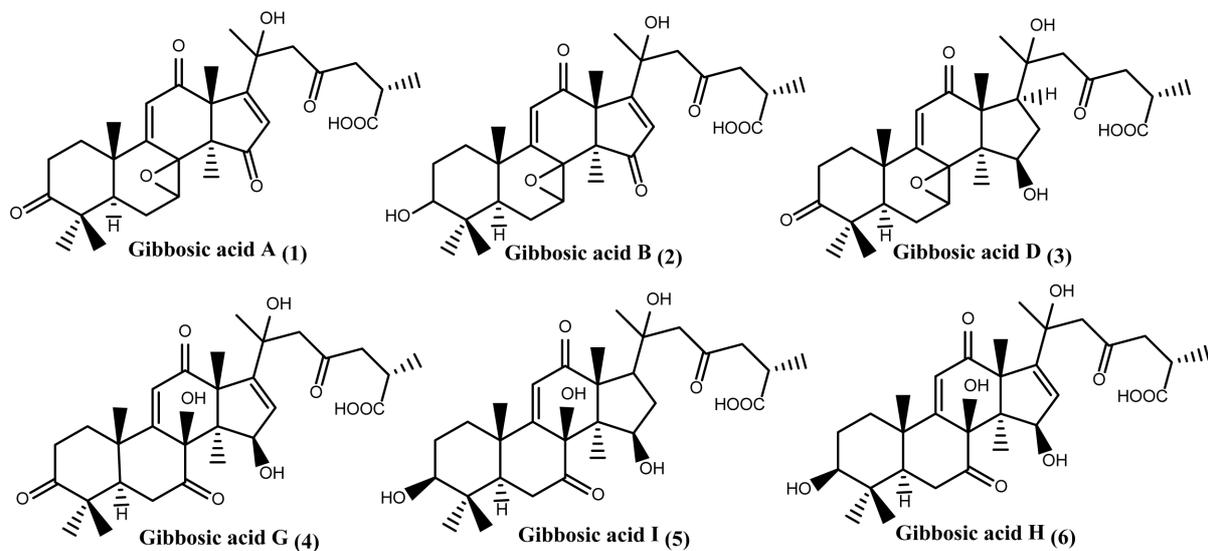
**세포증식 실험** - 세포의 증식에 대한 시료의 억제효과는 5종의 세포주에 대해서 모두 sulforhodamine B(SRB) assay로 수행하였다. 여러 농도의 시료를 넣은 96-well plate에 세포를 접종하고 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 습윤 공기 중에서 37°C에서 72시간 인큐베이션하였다. SRB assay에서 10% trichloroacetic acid로 고정하였다. 세포 단백질은 1% acetic

**Table I.** Cytotoxic activity (IC<sub>50</sub>, µg/ml) of the MeOH extract of *G. gibbosum* and its fractions on five cancer cell growth *in vitro*

Sample	MDA-MB-231	SKhep1	A549	HCT116	SNU638
MeOH ext.	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Hexane fr.	> 50	47.55	> 50	> 50	47.59
CHCl <sub>3</sub> fr.	19.02	32.60	46.51	24.57	36.62
EtOAc fr.	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BuOH fr.	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

1) Cancer cell line: MDA-MB-231 (breast), SK-hep1 (liver), A549 (lung), HCT116 (colon), SNU638 (stomach).

2) This alue (unit: µM) represents the mean of three independent experiments.

**Fig. 1.** Structure of lanostane-type triterpenoids (1 – 6) isolated from *G. gibbosum*.

acid solution를 포함하는 0.4% SRB로 염색한 후 10 mM Tris buffer(pH 10.0)에 녹였다. 흡광도는 515 nm 파장으로 측정하였다. 세포증식 백분율(%)은 cell proliferation(%) =  $100 \times [(A_{\text{treated}} - A_{\text{zero day}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{zero day}})]$ 의 계산식을 이용해서 얻었다. 여기서, A는 평균 흡광도를 말한다. IC<sub>50</sub>치는 TableCurve 2D v5.01(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 비직선 회귀분석을 통하여 계산하였다. 그리고, 데이터는 3회 반복실험한 평균치를 기록하였다.

### 결과 및 고찰

저자들은 칠황버섯에서 항암활성을 나타내는 화합물을 찾기 위한 노력의 일환으로 본 연구를 수행하였다. 칠황버섯으로부터 얻은 MeOH 추출물과 이로부터 용매분획하여 얻은 hexane 분획, CHCl<sub>3</sub> 분획, EtOAc 분획, 그리고 BuOH 분획을 얻어서 세포독성 실험을 수행하였다. 암세포주로서는 유방암 세포주(MDA-MB-231), 간암 세포주(SK-hep1), 폐암 세포주(A549), 대장암 세포주(HCT116), 그리고 위암

세포주(SNU638)를 사용하였다.

Table I에 나타내었듯이, MeOH 추출물과 EtOAc 분획 및 BuOH 분획에서는 50 µg/ml 이하에서는 효과가 나타나지 않으나 CHCl<sub>3</sub> 분획은 5종 암세포주에 대해 높은 세포독성을 나타내었다. CHCl<sub>3</sub> 분획은 MDA-MB-231 유방암 세포주에 대해 IC<sub>50</sub>가 19.02 µg/ml로 확인되어 가장 높은 세포독성 효과를 나타냄을 알 수 있었다. Hexane 분획은 SKhep1과 SNU638 세포주에서 그 IC<sub>50</sub>가 47.55 µg/ml, 47.59 µg/ml로 세포독성 효과를 나타내나 나머지 3종 세포주에 대해서는 50 µg/ml 이하에서 효과를 나타내지 않았다.

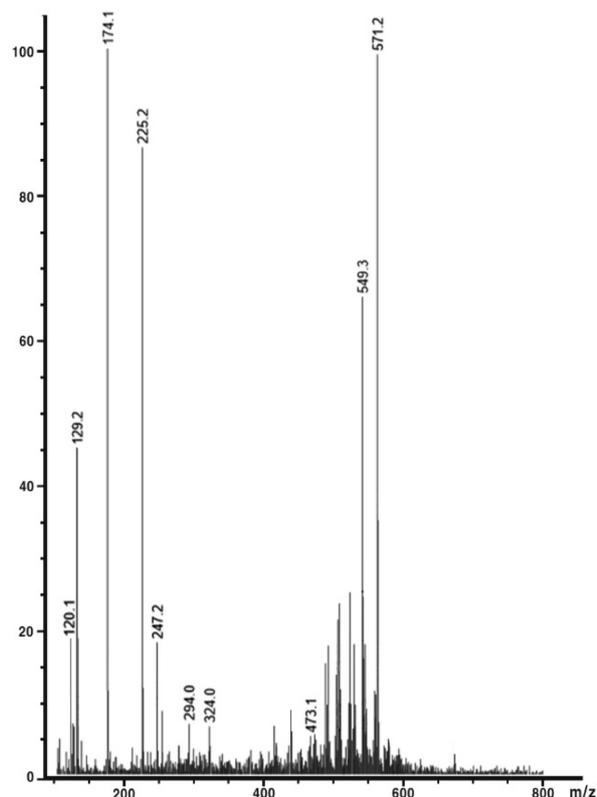
이에 따라 CHCl<sub>3</sub> 분획에 암세포 증식을 억제하는 화합물이 존재할 것으로 예견되었으므로 silica gel column chromatography로 화합물 분리를 시도하였다. 그 결과 6종의 화합물이 분리되었다. 칠황버섯으로부터 highly oxygenated lanostane-type triterpenoid가 Pu 등에<sup>1)</sup> 의해 알려졌기 때문에 본 연구에서는 신속한 동정을 위해 SIMS법으로 mass spectrum을 얻어서 동정하고자 하였다. Mass spectrum에서 얻은 pseudomolecular ion([M + Na]<sup>+</sup>)을 문헌치와 비교하여

**Table II.** Identification of gibbolic acids isolated from *Ganoderma gibbosum* by SIMS-MS

Compound	$m/z$ [M + Na] <sup>+</sup>	Molecular formula	Exact mass
1 (Gibbolic acid A)	549.1	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	526.27
2 (Gibbolic acid B)	551.2	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	528.27
3 (Gibbolic acid D)	553.2	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>8</sub>	530.29
4 (Gibbolic acid G)	567.2	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	544.27
5 (Gibbolic acid I)	571.2	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	548.30
6 (Gibbolic acid H)	569.2	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	546.28

각 화합물을 동정할 수 있었으므로 그 분자량은 Table II에 나타내었고, 그 구조는 Fig. 1에 나타내었다. 분리된 6종 화합물은 tetracyclic triterpenoid인 side chain을 갖는 lanostane-type triterpenoid로서 ketone group을 2-4개를 가지며, hydroxyl group를 1-4개를 가지고 있다. 그러나, 화합물 5는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 pseudomolecular ion이  $m/z$  571.2에서 나타나 미지의 lanostanoid이었다.

그러므로 화합물 5는 Pu 등이 *G. gibbosum*에서 분리한 lanostanoid나 유사버섯인 *Elfvvingia applanata*에서 밝혀진 elfvingic acids A-H의 8종 lanostanoid<sup>4)</sup> 및 *Ganoderma orbiforme*에서 밝혀진 triterpenoid에도<sup>5)</sup> 해당하지 않는 lanostanoid였다. 이들 lanostanoid들은 16-위치가 이중결합 혹은 단일결합의 양상으로 나타난다. 화합물 5는 pseudomolecular ion이  $m/z$  571.2로서 compound 6에 비해 분자량이 2amu만큼 더 크므로 16 위치가 수소화된 3 $\beta$ ,8 $\beta$ ,15 $\beta$ ,20S-tetrahydroxy-7,12,23-trioxolanost-9(11)-en-26-oic acid (5) 구조로 예상되었다. 그러므로 이 화합물의 구조를 확정하기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 측정하였다. 그 결과, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 8개의 methyl기가  $\delta$  1.05-2.26에서 확인되며,  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone 구조에 기인한 H-11의 피크가 singlet로 나타났을 뿐 아니라 H-3의 피크가  $\delta$  3.15에서 나타났다. 또, <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 나타난 피크들을 유사구조의 gibbolic acid D(3)와 gibbolic acid H(6)와 비교하여 잘 assignment할 수 있었다.<sup>4,5)</sup> 4개의 수산기가

**Fig. 2.** Mass spectrum of compound 5.

$\delta_c$  76.2(C-3), 81.2(C-8), 75.2(C-15), 72.1(C-20)에서 확인되고, 이중결합의 탄소 피크가 165.0과 124.0에서 확인되며, 또 27-COOH가 179.0에서 나타났다. 그러므로, 이 화합물은 3 $\beta$ ,8 $\beta$ ,15 $\beta$ ,20S-tetrahydroxy-7,12,23-trioxolanost-9(11)-en-26-oic acid (gibbolic acid I)구조를 가지는 lanostanoid임을 알 수 있었다. 이상과 같이 compound 1-6의 6종 lanostanoid 화합물을 *G. gibbosum*에서 분리하였으며 구조를 확인할 수 있었다.

이 6종 화합물에 대한 세포독성 실험 결과를 Table III에 나타내었다. 이 중 gibbolic acid A, gibbolic acid H, gibbolic acid I 화합물이 활성을 나타내었다. 특히 가장 강

**Table III.** Cytotoxic activity (IC<sub>50</sub>) of the six compounds on five cancer cell growth *in vitro*

Compound	MDA-MB-231 <sup>1)</sup>	SKhep1	A549	HCT116	SNU638
Gibbolic acid A (1)	> 50 <sup>2)</sup>	30.07	35.05	33.36	46.54
Gibbolic acid B (2)	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Gibbolic acid D (3)	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Gibbolic acid G (4)	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Gibbolic acid I (5)	7.92	5.36	9.42	7.12	18.09
Gibbolic acid H (6)	5.13	2.64	4.40	6.56	6.14

3) Cancer cell line: MDA-MB-231 (breast), SK-hep1 (liver), A549 (lung), HCT116 (colon), SNU638 (stomach).

4) This alue (unit:  $\mu$ M) represents the mean of three independent experiments.

한 효과를 나타내었던 gibbolic acid H는  $IC_{50}$ 치가 2.64 – 6.56  $\mu$ M 수준의 효과를 나타내어 암세포주 성장에 대한 현저한 저해효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이 화합물의 암세포에 대한 효과는 간암 세포주인 Skhep1에 대한 활성이 가장 높아 그  $IC_{50}$ 가 2.64  $\mu$ M로 확인되어 유망하다.

## 결 론

칠황버섯 추출물과 그 분획물에 대한 암세포성장 저해효과에 관한 실험을 하여 lanostanoid를 함유하는  $CHCl_3$  분획이 그 효과를 크게 나타내었다. 각종의 크로마토그래피의 방법을 이용하여  $CHCl_3$  분획으로부터 6종의 gibbolic acid를 분리하고 SIMS법에 의해 질량스펙트럼을 측정하여 pseudomolecular ion으로부터 그 구조를 신속히 동정할 수 있었다. 이 중 gibbolic acid H는 그 NMR spectrum을 해석하여 3 $\beta$ ,8 $\beta$ ,15 $\beta$ ,20S-tetrahydroxy-7,12,23-trioxolanost-9(11)-en-26-oic acid 구조로 나타났으며, 이 화합물은 아직 알려지지 않은 lanostanoid 화합물이었다. 6종 화합물 중 gibbolic acid A, H, I가 암세포 성장을 현저히 억제하는 효과를 보였으므로, 이들 화합물이 칠황버섯의 항암효과에 기여할 것으로 예상되었다. 특히, gibbolic acid H는 그  $IC_{50}$ 치가 2.64 – 6.56  $\mu$ M 범위에서 나타나 항암효과 연구를 위한 소재로 유망하다.

## 사 사

이 논문은 2019년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임.

## 인용문헌

1. Pu, D. B., Zheng, X., Gao, J. B., Zhang, X. J., Qi, Y., Li, X. L., Wang, Y. M., Li, X. N., Wan, X. P. and Xiao, W. L. (2017) Highly oxygenated lanostane-type triterpenoids and their bioactivity from the fruiting body of *Ganoderma gibbosum*. *Fitoterapia* **119**: 1-7.
2. Chen, H., Tian, T., Miao, H. and Zhao, Y. Y. (2016) Traditional uses, fermentation, phytochemistry and pharmacology of *Phellinus linteus*: A review. *Fitoterapia* **113**: 6-26.
3. Yue, Q. X., Song, X. Y., Ma, C., Feng, L. X., Guan, S. H., Wu, W. Y., Yang, M., Jiang, B. H., Liu, X., Cui, Y. J. and Guo, D. A. (2010) Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytochemistry* **17**: 606-613.
4. Yoshikawa, K., Nishimura, N., Bando, S., Arihara, S., Matsumura, E. and Katayama, S. (2002) New lanostanoids, elfvingic acids A-H, from the fruit body of *Elfvigia applanata*. *J. Nat. Prod.* **65**: 548-552.
5. Isaka, M., Chinthanom, P., Kongthong, S., Srichomthong, K. and Choeyklin, R. (2013) Lanostane triterpenes from cultures of the Basidiomycete *Ganoderma orbiforme* BCC 22324. *Phytochemistry* **87**: 133-139.

(2020. 1. 23 접수; 2020. 3. 2 심사; 2020. 3. 17 게재확정)