

## 산층층이꽃 추출물로부터 성분 분리 및 암세포성장 및 NO 생성 억제활성

김동화<sup>1</sup> · 이상국<sup>1</sup> · 박경식<sup>2</sup> · 박희준<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 약학대학, <sup>2</sup>상지대학교 한의과대학, <sup>3</sup>상지대학교 제약공학과

### Isolation of the Constituents from *Clinopodium chinense* var. *shibetchense* and Inhibition Activity on Cancer Cell Growth and Nitric Oxide Production

Donghwa Kim<sup>1</sup>, Sang Kook Lee<sup>1</sup>, Kyoung-Sik Park<sup>2</sup>, and Hee-Juhn Park<sup>3\*</sup>

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

<sup>2</sup>College of Oriental Medicine, Sangji University, 26339, Korea

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

**Abstract** – This study was performed to find anti-inflammatory or antitumor compounds from the polar fraction obtained from the extract of *Clinopodium chinense* var. *shibetchense* (H. Lev) Koidz (Labiatae). Chromatography of the BuOH fraction yielded two flavonoid glycosides (compounds **1** and **2**) and two saponins (compounds **3** and **4**). On the basis of spectroscopic data, compounds **1** and **2** were identified to be ponciretin 7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (neoponcirin) and naringenin 7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (isonaringin). Compounds **3** and **4** were identified to be 3-*O*-{ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-fucopyranosyl}-saikogenin F (buddlejasaponin IV) and 3-*O*-{ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-fucopyranosyl}-21 $\beta$ -hydroxysaikogenin F (clinoposaponin XV). In addition, ursolic acid (**5**) was isolated and identified from the CHCl<sub>3</sub> fraction. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) assay and sulforhodamine B (SRB) assay were performed to lead a potential anti-inflammatory or anti-tumor compounds from *C. chinense* var. *shibetchense*. Of the four compounds (**1**–**4**), compound **3** considerably inhibited cancer cell growth and NO production (IC<sub>50</sub>s, 5.59  $\mu$ M in iNOS assay and 6.62–14.88  $\mu$ M in SRB assay).

**Keywords** – *Clinopodium chinense* var. *shibetchense*, Labiatae, Flavonoid glycoside, Saponin, iNOS assay, SRB assay

산층층이꽃(*Clinopodium chinense* var. *shibetchense* (H. Lev) Koidz)의 진초는 생약 풍륜채(風輪菜)의 기원식물의 하나로 약용으로 하고 있다. 이 생약은 여름감기로 열이 있을 때 사용할 수 있으며, 급성담낭염, 장염, 불거리염, 유선염, 급성결막염, 간염 등에 사용되어 왔다. 그 외에도 중기 치료, 과민성 피부염, 가려움증 등과 같은 곳에도 사용되어 왔다.<sup>1)</sup> 한방 풍륜채의 기원식물로는 산층층이꽃(*C. chinense* var. *shibetchense*) 외에도 층층이꽃(*C. chinense* var. *parviflorum*), 두메층층이(*C. micranthium* (Regel) Hara), 탑꽃(*C. multicaule* (Maxim) Kuntze), 애기탑꽃(*C. gracile* (Benth.) Kuntze)} 등도 유사식물이므로 풍륜채로 사용될 수 있다.<sup>1,2)</sup>

저자들은 강원도 원주시 귀래면에서 자생하고 있는 산층층이꽃을 채집할 수 있었으므로 본 연구에서는 그 성분을 동정하고 항염효과 혹은 항암효과를 가지는지 검정하고자 하였다. *C. vulgare* L. 식물로부터 clinoposaponin에 속하는 성분이 다수 밝혀져 있다.<sup>3)</sup> 또, Zhu 등은<sup>4)</sup> *C. chinense*에서 flavonoid와 triterpene이 결합한 flavonoid-triterpene 성분의 구조와 anti-apoptic effect를 밝힌 바 있다. 그 외에 *C. mexicanum*으로부터 neoponcirin을 분리한 항불안효과 및 진통효과가 보고되었다.<sup>5)</sup>

Saikosaponin은 시호에서 분리되어 항바이러스효과,<sup>6)</sup> 항염효과,<sup>7)</sup> 항암효과<sup>8)</sup> 등이 보고되고 있다. 이에 따라 저자들은 산층층이꽃으로부터 그러한 사포닌과 같은 배당체 성분을 분리하여 항암효과 혹은 항염효과가 있는지 테스트하기 위해 본 실험을 수행하였다. 항암효과는 5종의 암세포종(폐

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

암세포(A549), 대장암세포(HCT116), 위암세포(SNU638), 간암세포(SK-Hep-1), 유방암세포(MDA-MB-231)를 이용하여 SRB assay로 암세포 성장 억제효과를 측정하였고, 항염효과 테스트를 위하여 LPS로 유도한 대식세포(RAW 264.7)의 NO 생산에 대한 저해효과를 실험하였다.

## 재료 및 방법

**기기** - 선광도는 Atago사의 Polax-2L polarimeter를 이용하여 측정하였다. UV spectrum은 UV-160A UV-visible spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 그리고 IR spectrum은 JASCO 4200 FT-IR spectrometer를 이용하여 KBr disk 법으로 측정하였다.  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum은 내부표준물질로 tetrametylsilane(TMS)를 사용하여 Bruker AM-600 spectrometer로 측정하였다. NMR spectrum 측정의 해석을 위하여 이차원의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSY-NMR spectrum 외에도 HMBC spectrum을 측정하여 스펙트럼 해석을 원활히 하도록 하였다.

**식물재료** - 한국의 강원도 원주시 귀래면에 자생하고 있는 산층층이꽃(*C. chinense* var. *shibetchense* (H. Lev) Koidz, Labiatae)의 지상부 및 지하부를 포함하는 전초를 채집하여 햇볕에서 건조한 후 세절하여 추출을 위한 식물재료로 사용하였다. 산층층이꽃의 식물은 상지대학교 산림과학과 송병민 교수에 의해 동정되었다. 이 식물의 표본(natchem-#119)은 상지대학교 제약공학과 천연물화학 실험실에 보관 중이다.

**추출 및 분획** - 건조한 후 세절한 산층층이꽃 550 g을 16.0 L의 MeOH에 넣고 환류 하에 3회 반복하여 추출하였다. 이를 여과하여 얻은 추출액을 진공농축기로 감압 하에 농축한 후 이를 동결건조하여 MeOH 추출물 57.5 g을 얻었다. 이 MeOH 추출물 중 46.0 g을 취한 후 이를 분획하기 위하여 증류수 1.0 L에 현탁시킨 후 hexane으로 분배추출하는 과정을 3회 반복하였다. Hexane 가용부는 농축하여 hexane 분획 18.9 g을 얻었다. 수층은 계속하여 같은 방법으로  $\text{CHCl}_3$  1.0 L로 분획하는 과정을 3회 반복하였다.  $\text{CHCl}_3$  가용부를 농축하여 6.8 g의  $\text{CHCl}_3$  분획을 얻었다. 남은 수층에 대하여 같은 방법으로 BuOH 1.0 L로 분획하는 과정을 3회 반복하였고, BuOH 가용부를 농축한 후 동결건조하여 BuOH 분획 19.2 g을 얻었다. 18.0 g의 BuOH 분획으로부터 유리당과 무기이온을 제거하기 위하여 diaion HP-20 column을 이용하는 컬럼분획을 실시하였다. 이 컬럼에서 먼저  $\text{H}_2\text{O}$  1.0 L로 용출한 후 40% MeOH 2.0 L로 용출하였다. 40% MeOH로 용출한 용액을 농축하여 얻은 분획을 40% MeOH 분획(12.6 g)이라 하였다.

**분리** - 40% MeOH 분획으로부터 성분을 분리하기 위하여 silica gel column chromatography를 실시하였다. 컬럼으

로는 Yamazen사(Japan)의 silica gel column(30  $\mu\text{m}$ ,  $\text{SiO}_2$ , 5.2 $\times$ 23 cm)을 사용하였고, 전개용매로는  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (67 : 33 : 10, 하층)을 사용하여 50 mL씩 수집하였다. 수집된 액을 TLC 체크하여 동일한 화합물군을 포함하는 용액을 모아서 농축하였다.

용리액 7-12번의 분획을 모아서 농축한 CC-1, 17-36번을 농축한 CC-2, 47-56을 농축한 것을 CC-3라 하였다. MeOH에 녹인 CC-1으로부터 침전하는 화합물 1을 얻었다. CC-2는 Sephadex LH-20에서 전개한 후 농축하여 화합물 2와 화합물 3을 얻었다. 그리고 CC-3를 농축하여 화합물 4를 얻었다.

**화합물 1 (Neoponcirin)** - White powder,  $[\alpha]_D^{7.8} = +148.0^\circ$  ( $c=0.0025$ , MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (absorbance) : 230.4 (4.22), 282.8 (4.11), 326.0 (3.77); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3478 (broad, OH), 2935, 2910 (aliphatic C-H), 1648 ( $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone), 1608 (C=C), 1519, 1446 ( $\text{CH}_2$ ), 1354 ( $\text{CH}_3$ ), 1299, 1185 C-O), 1092 (glycoside C-O), 982, 833;  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 5.50 (1H, dd,  $J=13.2$ , 3.0 Hz, H-2), 3.19 (1H, dd,  $J=16.8$  and 13.2 Hz, Ha-3), 2.82 (1H, dd,  $J=16.8$  and 3.0 Hz), 6.61 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 6.51 (1H, s,  $J=1.8$  Hz, H-8), 7.03 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-2',6'), 7.19 (overlapped with pyridine- $d_5$ , H-3',5'), 3.67(3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); 7-O-Glc - 5.62 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1''); 6''-O-rha - 5.46 (1H, brs, H-1'''), 1.56 (1H, d,  $J=6.0$  Hz,  $\text{CH}_3$  of L-rhmanose);  $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : aglycone - 79.0 (C-2), 42.8 (C-3), 196.7 (C-4), 164.3 (C-5), 97.6 (C-6), 166.3 (C-7), 96.2 (C-8), 131.1 (C-1'), 128.4 (C-2', 6'), 114.3 (C-3', 5'), 160.2 (C-4); 7-O-glc - 101.3 (C-1''), 74.4 (C-2''), 77.6 (C-3''), 71.1 (C-4''), 78.2 (C-5''), 67.2 (C-6''); 6''-O-rha - 102.3 (C-1'''), 71.9 (C-2'''), 72.5 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 69.5 (C-5'''), 18.3 (C-6''').

**화합물 2 (Isonaringin)** - Amorphous powder,  $[\alpha]_D^{6.8} = -84.0^\circ$  ( $c=0.005$ , MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (absorbance) : 230.4 (4.20), 282.6 (4.17), 329.6 (3.73); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3377 (broad, O-H), 2918 (aliphatic C-H), 1702 (carboxylic acid), 1641 ( $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone), 1579, 1520 (C=C), 1448 ( $\text{CH}_2$ ), 1370 ( $\text{CH}_3$ ), 1272, 1175 (C-O), 1065 (glycoside C-O), 836, 811;  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 5.40 (1H, dd,  $J = 13.0$  and 3.0 Hz, H-2), 3.16 (1H, dd,  $J=17.4$  and 3.0 Hz, H-3a), 2.77 (1H, dd,  $J=17.4$  and 3.0 Hz, H-3b), 6.22 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-6), 6.18 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-8), 7.34 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-2', 6'), 6.85 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3', 5'); 7-O-Glc - 4.97 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1'' of D-glc); 6''-O-rha - 4.73 (1H, brs, H-1'''), 1.22 (3H, d,  $J=5.4$  Hz,  $\text{CH}_3$  of L-rha);  $^{13}\text{C}$ -NMR

(150 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : aglycone - 79.2 (C-2), 42.7 (C-3), 197.1 (C-4), 163.5 (C-5), 96.6 (C-6), 165.4 (C-7), 95.8 (C-8), 163.1 (C-9), 103.6 (C-10), 129.8 (C-1'), 129.5 (C-2', 6'), 116.0 (C-3', 5'), 157.6 (C-4'); 7-*O*-glc- 99.8 (C-1''), 75.7 (C-2''), 76.5 (C-3''), 71.0 (C-4''), 79.1 (C-5''), 66.0 (C-6''); 6''-*O*-rha - 100.6 (C-1'''), 73.4 (C-2'''), 72.7 (C-3'''), 69.9 (C-4'''), 68.4 (C-5'''), 16.6 (C-6''').

**화합물 3 (Buddlejasaponin IV)** - Amorphous powder,  $[\alpha]_D^{6.8} = -21.4^\circ$  ( $c = 0.007$ , MeOH); IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3388 (broad, O-H), 2940 (aliphatic C-H), 1646 ( $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone), 1452 ( $\text{CH}_2$ ), 1385 ( $\text{CH}_3$ ), 1076 (glycoside C-O), 905, 767;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : triterpene - 3.65 (1H, dd,  $J=11.4, 4.2$  Hz, H-3), 1.81 (1H, d,  $J=3.0$  Hz, H-9), 5.41 (1H, dd,  $J=10.8, 3.0$  Hz, H-11), 5.97 (1H, d,  $J=10.8$  Hz, H-12), 4.20 (1H, dd,  $J=11.4, 6.0$  Hz, H-16), 1.80 (1H, brs, H-18), 3.82 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, H<sub>a</sub>-23), 3.31 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, H<sub>b</sub>-23), 0.75 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-24), 1.12 (3H, s, H-26), 1.07 (3H, s, H-27), 3.92 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, Ha-28), 0.95 (3H, s, H-29), 1.01 (3H, s, H-30); 3-*O*-fucose - 4.98 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1'), 1.29 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-6'); 2'-*O*-glc - 4.50 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1''); 3'-*O*-glc - 4.63 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, H-1''');  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : aglycone - 37.9 (C-1), 25.0 (C-2), 82.9 (C-3), 43.0 (C-4), 48.5 (C-5), 16.8 (C-6), 30.9 (C-7), 41.6 (C-8), 52.9 (C-9), 34.6 (C-10), 129.2 (C-11), 132.8 (C-12), 84.2 (C-13), 45.1 (C-14), 35.6 (C-15), 64.0 (C-16), 46.7 (C-17), 51.7 (C-18), 37.2 (C-19), 30.7 (C-20), 33.9 (C-21), 24.7 (C-22), 63.1 (C-23), 11.2 (C-24), 17.5 (C-25), 18.8 (C-26), 19.9 (C-27), 72.0 (C-28), 22.7 (C-29), 32.6 (C-30); 3-*O*-fucose - 102.1 (C-1'), 75.0 (C-2'), 84.3 (C-3'), 71.1 (C-4'), 69.9 (C-5'), 15.5 (C-6'); 2'-*O*-glc - 103.3 (C-1''), 75.0 (C-2''), 77.0 (C-3''), 71.3 (C-4''), 76.7 (C-5''), 62.2 (C-6''); 3'-*O*-glc - 103.9 (C-1'''), 74.7 (C-2'''), 76.8 (C-3'''), 69.9 (C-4'''), 76.9 (C-5'''), 61.1 (C-6''').

**화합물 4 (Clinoposaponin XV)** - Amorphous powder,  $[\alpha]_D^{6.8} = -13.5^\circ$  ( $c = 0.004$ , MeOH); IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3379 (broad, OH), 2927 (C-H), 1704 (carboxylic acid), 1645 ( $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone), 1606 (C=C), 1448 ( $\text{CH}_2$ ), 1368 ( $\text{CH}_3$ ), 1262, 1172 (C-O), 1073 (glycoside C-O), 905, 812;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 3.65 (1H, dd,  $J=11.4, 4.2$  Hz, H-3), 5.41 (1H, dd,  $J=10.8, 3.0$  Hz, H-11), 5.97 (1H, d,  $J=10.8$  Hz, H-12), 4.20 (1H, dd,  $J=11.4, 6.0$  Hz, H-16), 3.82 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, Ha-23), 3.31 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, Hb-23), 0.75 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-25), 1.13 (3H, s, H-26), 1.10 (3H, s, H-27),

0.95 (3H, s, H-29), 1.05 (3H, s, H-30); 3-*O*-fucose - 4.89 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1'), 1.29 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-6'); 2'-*O*-glc - 4.50 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1''); 3'-*O*-glc - 4.63 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, H-1''');  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : aglycone - 37.9 (C-1), 25.0 (C-2), 82.9 (C-3), 43.0 (C-4), 48.5 (C-5), 17.5 (C-6), 31.7 (C-7), 41.5 (C-8), 52.8 (C-9), 34.7 (C-10), 129.0 (C-11), 132.8 (C-12), 84.2 (C-13), 45.2 (C-14), 35.6 (C-15), 65.0 (C-16), 48.5 (C-17), 51.0 (C-18), 37.9 (C-19), 27.1 (C-20), 73.4 (C-21), 34.7 (C-22); 3-*O*-fucose - 102.1 (C-1'), 75.0 (C-2'), 84.4 (C-3'), 71.0 (C-4'), 69.0 (C-5'), 15.5 (C-6'); 2'-*O*-glc - 103.3 (C-1''), 73.9 (C-2''), 77.0 (C-3''), 71.3 (C-4''), 76.8 (C-5''), 62.2 (C-6''); 3'-*O*-glc - 103.9 (C-1'''), 74.7 (C-2'''), 76.9 (C-3'''), 69.9 (C-4'''), 76.9 (C-5'''), 61.0 (C-6''').

**CHCl<sub>3</sub> 분획으로부터 Ursolic Acid의 분리** - CHCl<sub>3</sub> 분획이 암세포 성장 억제작용을 보였기 때문에 이 분획이 함유하는 주성분을 알기 위한 실험을 하였다. CHCl<sub>3</sub> 분획 4g을 취하여 silica gel column{Yamazen column(SiO<sub>2</sub> 30  $\mu\text{m}$ , 110 g, 3.0 cm $\times$ 40 cm)}에서 전개용매 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (8 : 1 : 1, 하층)으로 전개하여 25 mL씩 수집하였다. 분획의 번호 11-16 번을 농축한 후 이를 Sephadex LH-20 column에서 더욱 정제하여 화합물 5를 얻었다.

**화합물 5 (Ursolic Acid)** - amorphous powder, mp 282 - 283°C;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 3.46 (1H, t-like), 5.49 (1H, t,  $J=5.4$  Hz, H-12), 2.64 (1H, d,  $J=10.8$  Hz, H-18), 0.97 (3H, s, 23-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 24-CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, 25-CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, 26-CH<sub>3</sub>), 0.98 (3H, s, 27-CH<sub>3</sub>), 0.89 (3H, d,  $J = 5.4$  Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 1.23 (3H, d,  $J = 7.8$  Hz, 30-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 39.2 (C-1), 23.7 (C-2), 77.9 (C-3), 39.8 (C-4), 55.6 (C-5), 18.6 (C-6), 33.4 (C-7), 39.3 (C-8), 47.8 (C-9), 39.1 (C-10), 23.7 (C-11), 125.4 (C-12), 139.1 (C-13), 42.3 (C-14), 27.9 (C-15), 21.2 (C-16), 47.9 (C-17), 53.4 (C-18), 37.1 (C-19), 37.2 (C-20), 30.9 (C-21), 38.9 (C-22), 16.3 (C-23), 17.3 (C-24), 17.2 (C-25), 15.5 (C-26), 23.4 (C-27), 179.6 (C-28), 21.2 (C-29), 23.7 (C-30).

**세포배양** - 암세포 성장 억제효과를 위해 사용한 인체 암세포는 폐암 세포(A549), 대장암 세포(HCT116), 간암세포(SK-Hep-1), 유방암 세포(MDA-MB-231) 등의 암세포와 마우스 대식세포(RAW 264.7)을 American Type Collection (ATCC, VA, USA)로부터 제공받았다. 5종의 암세포 중 위암 세포(SNU-638)는 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 제공받아 사용하였다. 세포주들의 배양을 위해 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotics-antimycotics(PSF; 100 units/mL penicillin G sodium, 100 ng/mL streptomycin과 amphotericin B)를 추가한 배지를 사

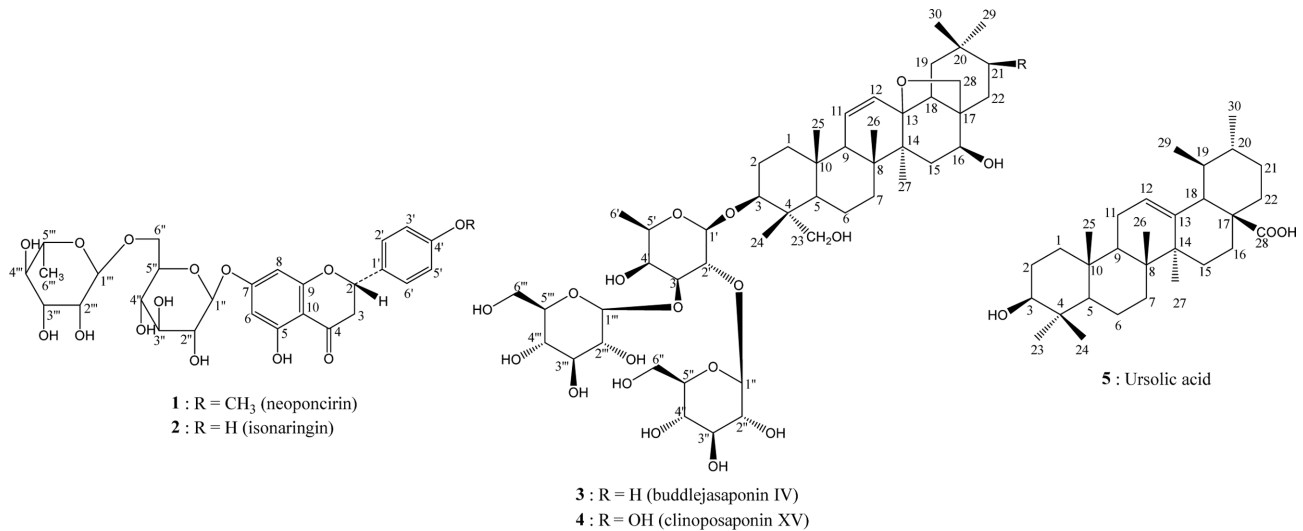


Fig. 1. Structure of compounds 1 - 5 isolated from *C. chinense* var. *shibetchense*.

용하였다. 여기서 SK-Hep-1), MDA-MB-231, RAW 264.7 세포주는 DMEM 배지로 배양하였고, A549, HCT116, SNU-638에 대해서는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 각 세포들은 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 습윤 공기 중에서 37°C 온도를 유지하였다.

**세포증식 실험** - 암세포 성장 억제효과를 위한 실험으로 sulforhodamine(SRB) assay로 수행하였다.<sup>9)</sup> 여러 농도의 시료를 넣은 96-well plate에 세포를 접종하고, 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 습윤 공기 중에서 37°C에서 72시간 배양한 후 10% trichloroacetic acid로 고정하였다. 고정된 세포 단백질을 1% acetic acid 용액을 포함하는 SRB로 염색한 후 10 mM Tris buffer(pH 10.0)에 녹였다. 세포증식 백분율 계산을 위해 cell proliferation(%) =  $100 \times [(A_{\text{treated}} - A_{\text{zero day}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{zero day}})]$ 의 계산식을 이용하였다. 이 식에서 A는 흡광도를 뜻한다. IC<sub>50</sub> 값의 계산을 위해 TableCurve 2D v5.01(SySTAT Software Inc., San Jose, CA, USA)를 이용한 비직선 회귀분석을 수행하였다.

**iNOS Assay** - 마우스 대식세포주(RAW 264.7 cell)를 10% FBS-DMEM에서 배양하고 24-well plate( $2 \times 10^5$  cells/mL)에 접종하였다.<sup>10)</sup> 그 다음 날 1% FBS-DMEM으로 교체하고 시료를 처리하였다. 1시간이 지난 뒤 NO 생성을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide(LPS)-control을 제외하고 1 µg/mL LPS를 첨가하였다. 이를 18시간동안 배양한 후 Griess 반응으로 배지의 NO 생성을 측정하였다. 간략히 설명하면, 180 µL의 Griess reagent{0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in H<sub>2</sub>O and 1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>}를 100 µL 배지에 첨가하였다. 흡광도 측정은 540 nm 파장을 이용하였다. iNOS 억제율 계산은  $100 \times [(A_{\text{treated}} - A_{\text{LPS}}) / (A_{\text{LPS+}} - A_{\text{LPS}})]$ 의 식을 이용하였다. 그

IC<sub>50</sub>의 계산도 세포증식 실험에서와 같이 TableCurve 2D v5.01(SySTAT Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용한 비직선 회귀분석법에 의거하였다. 계산된 IC<sub>50</sub>의 단위는 MeOH 추출물과 분획물(hexane 분획, CHCl<sub>3</sub> 분획, BuOH 분획)에서는 µg/mL로, 분리된 성분(화합물 1-4)은 µM로 나타내었다.

**세포생존율 실험** - 세포생존율을 시험하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. iNOS assay에서 사용한 상기 24-well plate에 최종농도를 500 µg/mL로 한 MTT 용액을 각 well에 넣고 37°C에서 4시간 배양하였다. 배지 제거 후에 dimethylsulfoxide(DMSO)를 가하였다. 세포생존율 평가는 570 nm에서 측정된 흡광도를 컨트롤 그룹(LPS+)와 비교하여 결정하였다.

## 결과 및 고찰

산층층이꽃 MeOH 추출물로부터 순차적으로 분획하여 hexane 분획, CHCl<sub>3</sub> 분획, BuOH 분획을 얻었다. 본 연구에서는 주로 clinposaponin 유사체 성분의 수득에 관심이 있었으므로 BuOH 분획으로부터 크로마토그래피를 이용하여 성분을 분리하고자 하였다. 이 BuOH 분획으로부터 당과 무기이온을 제거하기 위하여 diaion HP-20 column chromatography에서 H<sub>2</sub>O로 용출하였고, 계속하여 40%-MeOH로 용출하여 얻은 용출액을 농축하여 40%-MeOH 분획을 얻었다. 이것으로부터 각종의 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 1-4를 얻었다.

화합물 1은 UV spectrum에서 flavonoid 특유의 band에서 그 흡수극대파장( $\lambda_{\text{max}}$ )이 282.8 nm와 326 nm에서 나타나 flavonoid에 속하는 것으로 예상되었다. 이 화합물은 백색의

**Table I.** Inhibition activity (IC<sub>50</sub>) of the MeOH extract, its fractions, and isolated compounds from *C. chinense* var. *shibetchese* on LPS-induced NO production and cell viability in RAW 264.7 cells

Treatment	iNOS assay	MTT assay
MeOH extract	> 40	> 40
Hexane fraction	37.94	> 40
CHCl <sub>3</sub> fraction	> 40	> 40
BuOH fraction	> 40	> 40
Neoponcirin (1)	> 40	> 40
Isonaringin (2)	> 40	> 40
buddlejasaponin IV (3)	5.59	8.59
Clinoposaponin XV (4)	> 40	> 40

분말로 얻어지며 IR spectrum에서 OH기(3478 cm<sup>-1</sup>), 지방족 C-H(2935 cm<sup>-1</sup>, 2910 cm<sup>-1</sup>), α,β-unsaturated ketone(1648 cm<sup>-1</sup>), glycoside bond C-O(1092 cm<sup>-1</sup>)가 나타나, 이 화합물은 flavonoid glycoside로 예상되었다. 화합물 1의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 H-6과 H-8이 δ 6.61과 δ 6.51에서 나타나고 *J*치가 1.8 Hz였으므로 *meta*-coupling하고 있었다. 또 H-2',6'와 H-3',5'가 각각 δ 7.03과 δ 7.19에서 *J*치가 8.4 Hz로서 서로 *ortho*-coupling하므로 δ 3.67에서 나타나는 3H의 피크는 4'-OCH<sub>3</sub>에 의한 것임을 알 수 있다. 한편 두 개의 당은 β-D-glucopyranose와 α-L-rhamnopyranose임을 재료 및 방법항에 그 데이터를 나타낸 바와 같다. 이러한 두 당의 결합은 통상의 flavonoid glycoside에서 α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranose(neohesperidose)와 α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranose(hesperidose) 두 종류가 주로 나타나는데<sup>11)</sup>, D-glucose의 C-6이 δ<sub>C</sub> 67.1에서 나타나므로 이것은 (1→6) 결합을 하는 후자에 속하는 이당류임을

알 수 있다. 또, HMBC spectrum에서 L-rhamnose의 H-1"에 기인한 δ 5.46이 δ<sub>C</sub> 67.1 (C-6")과 correlation하고 있었으므로 그 사실을 확정하였다. HMBC spectrum에서 D-glucose의 H-1"에 기인한 δ 5.62가 C-7의 δ<sub>C</sub> 166.3과 correlation하고 있었으므로 첫 당인 D-glucose의 당은 비당체의 C-7에 결합하고 있음을 알 수 있다. 이상과 같은 사실로부터 화합물 1은 ponciretin 7-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside의 화합물인 neoponcirin임을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR 데이터가 neoponcirin의 문헌치와<sup>5,12)</sup> 일치하였으므로 화합물 1은 neoponcirin이다.

화합물 2도 화합물 1과 유사한 UV 및 IR data를 보여서 이 화합물은 flavonoid glycoside에 속하는 화합물로 보였다. 그러나 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR data로서 OCH<sub>3</sub>의 피크가 나타나지 않으므로 이 화합물의 비당체는 naringenin으로 예상되었다. 화합물 2의 <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 비당체 부분이 naringenin의 문헌치와<sup>13)</sup> 잘 일치하였다. L-rhamnose의 H-1의 피크인 δ 4.73이 D-glucose의 H-6에 correlation하였으므로 이당류의 구조는 화합물 1의 경우와 같이 α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranose이었으며, D-glucose의 H-1"의 피크인 δ 4.97은 비당체인 naringenin의 C-7에 correlation하므로 첫 당인 D-glucose는 naringenin의 C-7에 결합하고 있음을 알 수 있다. 그러므로 이 화합물은 naringenin 7-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside 구조를 가지는 isonaringin 화합물인 것으로 동정하였다.

화합물 3과 4는 각각 Liebermann-Burchard 반응에서 양성을 보였을 뿐 아니라, 재료 및 방법항에 IR data를 나타내었듯이 이 두 화합물은 방향족 고리에 따른 피크를 보이지 않는 대신 배당체 결합의 C-O가 1076 cm<sup>-1</sup>에서 큰 흡수 띠를 나타내어 triterpene glycoside 구조를 가지는 사포닌 화

**Table II.** Inhibition activity (IC<sub>50</sub>) of the MeOH extract, its fractions, and isolated compounds from *C. chinense* var. *shibetchese* on cancer cell growth *in vitro*

Treatment	A549 <sup>1)</sup>	HCT116	SNU638	SK-Hep-1	MDA-MB-231
MeOH extract	> 100 <sup>2)</sup>	> 100	> 100	> 100	> 100
Hexane fraction	80.93	> 100	> 100	> 100	> 100
CHCl <sub>3</sub> fraction	24.20	35.24	32.44	54.24	79.45
BuOH fraction	26.94	65.74	26.96	> 100	> 100
Neoponcirin	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Isonaringin	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Buddlejasaponin IV	6.62	7.94	8.08	7.44	14.88
Clinoposaponin XV	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Etoposide <sup>3)</sup>	0.24	0.85	0.16	0.17	2.74

<sup>1)</sup>Cancer cell line: A549 (lung), HCT116 (colon), MDA-MB-231 (breast), SNU638 (stomach), SK-HeP-1 (liver)

<sup>2)</sup>Unit: μg/mL in the extract and fractions, μM in the isolated compounds. The value represents the mean of three independent experiments.

<sup>3)</sup>Positive control.

합물로 예상되었다. 화합물 3은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 이 화합물은 oleanane 구조에 따른 피크가  $\delta$  0.75 (H-24), 0.96 (H-25), 1.81 (H-26), 1.07 (H-27), 0.95 (H-29), 1.01 (H-30)에 해당하는 singlet로 나타나 6개의 methyl기가 모두 tertiary methyl기였으므로 이 화합물은 oleanane계의 triterpene 구조를 가지고 있음을 알 수 있었다. saikosaponin-type 사포닌에서 확인되는 특징적인 H-28의 두 수소의  $\delta$  3.92와  $\delta$  3.07이  $J$ 치가 7.2 Hz의 doublet로 나타나며 C-28은  $\delta_c$  72.0에서 나타났다. 그리고 이중결합의 H-11과 H-12가 각각  $\delta$  5.41 (1H, dd,  $J=10.8, 3.0$  Hz)과  $\delta$  5.97 (1H, d,  $J=10.8$  Hz)에서 확인된다. 한편 23- $\text{CH}_2\text{OH}$ 의 두 수소가  $J=16.2$  Hz로 geminal coupling하여  $\delta$  3.82와  $\delta$  3.31에서 나타난다. H-16이  $J=11.4, 6.0$  Hz로서 double doublet로 분열하여 나타나는 수소가  $\delta$  4.20에서 나타나 16-OH는  $\beta$ -결합을 하고 있음을 알 수 있었다. 그러므로 이 화합물의 비당체는 saikogenin F의 구조를 가지고 있음을 알 수 있다.<sup>3)</sup> 한편 saikosaponin-type의 사포닌에서는 나타나는 삼당류는  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-fucopyranosyl가 비당체의 3-위치에 결합한다. 많은 clinoposaponin에서 나타나는 이 구조의 당부에 기인한 NMR data와 잘 일치하였다.<sup>3)</sup> 그러므로 화합물 3은 3-O-{ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-fucopyranosyl}-saikogenin F의 구조를 가지는 buddlejasaponin IV로 동정할 수 있었다.  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  data를 buddlejassaponin IV의 문헌치와<sup>14)</sup> 비교한 결과 잘 일치하였다.

화합물 4는 화합물 3과 유사한 NMR data를 나타내었다. 이 화합물의  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서 비당체에서 산소가 결합한 탄소인 oxycarbon의 피크가  $\delta$  63.1, (C-23),  $\delta$  65.0 (C-16),  $\delta$  73.0 (C-28),  $\delta$  73.9 (C-21)에서 4개 나타났다. 그러므로 이 화합물은 화합물 3에 비해 OH기를 하나 더 가지고 있어서 그 비당체가 21 $\beta$ -OH를 가지는 21 $\beta$ -hydroxysaikogenin F의 문헌치와 일치하였다.<sup>3)</sup> 그리고 당부도  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-fucopyranosyl의 삼당류가 비당체의 3-위치에 결합하고 있는 것은 화합물 3과 동일하였다. 이에 따라 화합물 4는 3-O-{ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-fucopyranosyl}-21 $\beta$ -hydroxysaikogenin F의 구조를 가지는 clinoposaponin XV이었다. 화합물 4의  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  data를 clinoposaponin XV의 문헌치와<sup>3)</sup> 비교한 결과 잘 일치하였다.

이상과 같이 BuOH 분획에서 4종의 화합물을 얻었으나 본 실험 중  $\text{CHCl}_3$  분획에서 암세포 성장 억제효과가 나타났으므로, 추가적으로 그 활성물질을 동정하기 위한 차원에서 분리를 수행하여  $\text{CHCl}_3$  분획으로부터 화합물 5를 얻었다. 이 화합물은 우선  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 탄소 30개의 피크가 나타났으므로 triterpene 화합물로 예상되었다.  $^1\text{H-NMR}$

spectrum에서는  $\delta$  0.85(C-26), 0.98(C-27), 1.00(C-25), 1.01(C-23), 1.02(C-24)에서 5개의 3차 메틸기가 나타나고  $\delta$  0.89(C-29), 1.23(C-30)에서 2차 메틸기가 두 개 나타났으므로 이 화합물은 ursane계의 triterpenoid이었다. H-3이  $\delta$  3.46에서, 그리고 12-olefinic proton이  $\delta$  5.49에서 나타나며, 17-COOH가  $\delta_c$  179.6에서 확인되므로, 이 화합물은 ursolic acid로 판단되었다. 이 화합물의  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  data를 ursolic acid의 문헌치와 비교하여 잘 일치하였으므로 화합물 5를 ursolic acid로 동정하였다.

계속하여 약리효과 실험으로 항염효과를 테스트하기 위하여 대식세포를 이용한 iNOS assay 외에도 항암효과를 검색하기 위한 SRB assay를 수행하였다. 본 연구에서는 BuOH 분획에 함유된 배당체 화합물에 관심이 있었으므로 이 분획으로부터 상기와 같이 4종의 화합물을 분리한 후 iNOS assay 및 SRB assay를 수행하였다. iNOS assay에서는 buddlejasaponin IV만이 강한 효과를 나타내었고, 분획 중에서는 hexane 분획이 효과를 나타내었다. 특히 buddlejasaponin IV는 iNOS assay에서 그  $\text{IC}_{50}$ 가 5.59  $\mu\text{M}$ 에서 효능을 보였으며, 이 결과는 세포독성을 나타내는 농도 이하에서 나타나므로 이것은 세포독성 효과에 따른 것이 아니라 iNOS의 활성을 저해한 결과에 따른 것이다. 한편 hexane 분획은 그  $\text{IC}_{50}$ 가 37.94  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 효과가 있었으므로 iNOS 저해 물질을 포함할 것으로 예상된다.

암질환에 대한 유효성을 검증하기 위하여 폐암세포(A549), 대장암세포(HCT116), 위암세포(SNU638), 간암세포(SK-Hep-1) 및 유방암세포(MDA-MB-231)를 사용하여 SRB assay로 검색하였다. MeOH 추출물과 3종의 분획에 대해 테스트했을 때  $\text{CHCl}_3$  분획과 BuOH 분획에서 유효한 효과가 나타났으나, BuOH 분획은 두 암세포인 간암세포(SK-Hep-1)와 유방암세포(MDA-MB-231)에서는 효과가 없었다. 분리한 4종(화합물 1-4)의 화합물 중 buddlejasaponin IV만이 5종의 암세포 성장을 유효하게 저해한 반면, 다른 3종의 화합물은 그 효과를 나타내지 못했다. 특이하게 21 $\beta$ -hydroxysaikogenin F를 비당체로 갖는 clinoposaponin XV는 효과를 나타내지 않았으므로 21-OH의 존재 때문인 것으로 보인다. Zhu 등은<sup>15)</sup> *C. chinense* (Benth.)에서 분리한, clinoposaponin의 ursane계라 할 수 있는 많은 종의 clinoposaponin 화합물이 암세포성장 억제효과가 없다는 사실을 보고한 바 있다. 그러나 buddlejasaponin IV는 항암 효과가 보고되고 있기 때문에<sup>16)</sup> 그 구조화학적 측면에서 이 화합물은 항암제로서의 가능성이 있다. 한편,  $\text{CHCl}_3$  분획이 뚜렷한 암세포성장 저해작용을 나타냈기 때문에 이의 구성 성분을 분리하기 위한 실험을 했을 때 그 주성분 화합물은 ursolic acid로 확인되었다. Ursolic acid는 세포독성 및 항암 작용 등이 잘 알려졌으므로,<sup>17)</sup>  $\text{CHCl}_3$  분획의 활성성분은 ursolic acid임을 잘 판단할 수 있음에 따라 추가적인 세포

독성 테스트는 수행하지 않았다.

## 결 론

한약 풍류채의 약용자원으로 이용되고 있는 산층층이꽃의 항염 및 항암효능을 갖는 활성물질을 검출하기 위하여 식물화학적 연구 및 약리적 연구를 수행하였다. 그 결과 산층층이꽃으로부터 neoponcirin, isonaringin, buddlejasaponin IV, clinoposaponin XV 및 ursolic acid의 화합물을 분리하여 분광학적 데이터를 얻은 후 동정하였다. 항염활성 검정을 위해서는 LPS로 유도한 macrophage RAW 264.7 세포가 생산하는 NO의 양을 측정하였고, 암세포 성장억제 효과 검사를 위해서는 5종의 암세포를 이용하여 SRB assay로 그 효능을 측정하였다. 산층층이꽃 추출물의 BuOH 분획에서 얻어진 buddlejasaponin IV의 IC<sub>50</sub>치가 iNOS assay에서는 5.59 µM이었으며 SRB assay에서는 6.62–14.88 µM 범위에서 나타났으므로, buddlejasaponin IV은 산층층이꽃의 항염 및 항암물질로 중요하게 작용할 것으로 예상된다.

## 사 사

이 논문은 2019년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임.

## 인용문헌

- Kim, T. J. (1996) Korean Resources Plants IV, Publishing Center of Seoul National University, pp. 62-63, Seoul.
- Ko, K. S. and Jeon, E. S. (2003) Korean Wild Plants, p. 577, Iljinsa, Seoul.
- Miyase, T. and Matsushima, Y. (1997) Saikosaponin homologues from Clinopodium spp. The structures of clinoposaponin XII-XX. *Chem. Pharm. Bull.* **45**: 1493-1497.
- Zhu, Y. D., Chen, R. C., Wang, H., Jiang, H., Huang, X. L., Zhang, M. L., Li, L. Y., Hu, Z., Xu, X. D., Wang, C. J. and Yang, J. S. (2018) Two new flavonoid-triterpene saponin meroterpenoids from *Clinopodium chinense* and their protective effects against anxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2cells. *Fitoterapia* **128**: 180-186.
- Cassani, J., Araujo A. G. E., Martinez-Vázquez, M., Manjarrez, N., Moreno, J. and Estrada-Reyes, R. (2013) Anxiolytic-like and antinociceptive effects of 2(S)-neoponcirin in mice. *Molecules* **18**: 7584-7599.
- Fang, W., Yang, Y. J., Guo, B. L. and Cen, S. (2017) Anti-influenza triterpenoid saponins (saikosaponins) from the roots of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**: 1654-1659.
- Yamamoto, M., Kumagai, A. and Yamamura, Y. (1975) Structure and actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. I. Anti-inflammatory action of saikosaponins. *Arzneimittelforschung.* **25**:1021-1023.
- Zhong, D., Zhang, H. J., Jiang, Y. D., Huan, P. W., Qi, H., Cai, C., Zheng, S. B. and Dang, Q. (2016) Saikosaponin-d: A potential chemotherapeutics in castration resistant prostate cancer by suppressing cancer metastases and cancer cell stem cell phenotypes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **474**: 722-729.
- Pyee, Y., Chung, H., Vhoi, T. J., Park, H. J., Hong, J., Kim, J. S., Kang, S. S. and Lee, S. K. (2014) Suppression of inflammatory responses by handelina, a quaianolide dimer from *Chrysanthemum boreale*, via down regulation of NF-κB signaling and pro-inflammatory cytokine production. *J. Nat. Prod.* **77**: 917-924.
- Kim, D., Lee, S. K., Park, Y., Kwon, N. and Park, H. J. (2019) Isolation of constituents with nitric oxide synthase inhibition activity from *Phryma leptostachya* var. *asiatica*. *Nat. Prod. Sci.* **25**: 34-37.
- Shin, K. C., Nam, H. K. and Oh, D. K. (2013) Hydrolysis of flavanone glycosides by β-glucosidase from *Pyrococcus furiosus* and its application to the production of flavanone aglycones from citrus extracts. *J. Agric. Food Chem.* **61**: 11532-11540.
- Tang, K. S. C., Konczak, T. I. and Zhao, J. (2016) Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.). *Food Chem.* **192**: 698-705.
- Olsen, H. T., Stafford, G. I., Staden, J., Christensen, S. B. and Jäger, A. K. (2008) Isolation of the MAO-inhibitor anringtonin from *Mentha aquatic* L.. *J. Ethnopharmacol.* **117**: 500-502.
- Yamamoto, A., Miyase, T., Ueno, A. and Maeda, T. (1991) Buddlejasaponin I-IV, four new oleanane-triterpene saponins from the aerial parts of *Buddleja japonica* Hemsl. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 2764-2766 (1991).
- Zhu, Y. D., Hong, J. Y., Bao, F. D., Xing, N., Wang, L. T., Sun, Z. H., Luo, Y., Jiang, H., Xu, X. D., Zhu, N. L., Wu, H. F., Sun, G. B. and Yang, J. S. (2018) Triterpenoid saponins from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and their biological activity. *Arch. Pharm. Res.* **41**: 1117-1130.
- Kim, J. E., Vhung, W. Y., Chun, K. S., Lee, C. K., Park, H. J., Kim, W. B. and Park, K. K. (2010) *Pleurospermum kamtsaticum* extract induces apoptosis via Mitochondrial pathway and NAG-1 expression in colon cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 788-792.
- Chi, K. Q., Wei, Z. Y., Wang, K. S., Wu, J., Chen, W. Q., Jin, X. J., Piao, H. R. (2017) Design, synthesis and evaluation of novel ursolic acid derivatives as HIF-1α inhibitors with anti-cancer potential. *Bioorg. Chem.* **75**: 157-169.

(2020. 4. 14 접수; 2020. 5. 18 심사; 2020. 5. 28 게재확정)