

Iridoid Compounds가 RNA 및 Protein 생합성에 미치는 영향

허 순 옥 · 김 제 훈* · 장 일 무*

동국대학교 화학과 · 서울대학교 생약연구소*

Effects of Iridoid Compounds on RNA and Protein Biosyntheses in Sarcoma 180 cells

S.O. HUH, J.H. KIM* and I.-M. CHANG*

Department of Chemistry, Dongguk University and Natural Products Research Institute,*
Seoul National University, Seoul 110, Korea

Abstract—To investigate a possible biological activity of iridoid glucosides, six compounds, aucubin, catalpol, gardenoside, geniposide, rehmannioside and swertiamarin, were studied in relation with their potential influences in RNA and protein biosyntheses in murine tumor cell, sarcoma 180, *in vitro*. Protein biosynthesis was slightly inhibited by aucubin, gardenoside and swertiamarin. Degree of inhibition of RNA biosynthesis by those iridoid appeared to be more sensitive than that of protein biosynthesis. When aucubin was pretreated with β -glucosidase to produce its genin form and the sarcoma 180 cells were exposed to this aucubigenin, the protein and RNA biosyntheses in the cells were profoundly inhibited. The results indicate that a biologically active form of iridoid compounds is the hydrolytic products of glycoside, *i.e.* genin form. It is also suggested that sarcoma 180 cells used in the experiments appear to lack of β -glucosidase, since the inhibitory actions of iridoid glucosides were so slight that those glucosides were not hydrolysed by the enzyme to their genin forms.

Keywords—Iridoid Glucosides · iridoid aglucon · inhibition of RNA and protein biosyntheses

Iridoid 화합물은 많은 종류의 식물에서 발견되는 천연물이다. 이들 천연물은 모두 Cyclopenta(C) pyran monoterpeneoid의 화학 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 하며, 대부분 glucose를 가지고 있는 배당체로 되어있다. 현재까지 300종이 넘는 Iridoid가 식물 및 곤충 등으로부터 분리 확인되어 그 화학 구조가 보고된 형편이다.¹⁾ 이들 천연물의 약리 작용 및 생물활성 작용에 관하여는 비교적 적은 연구가 보고되어있는 실정이다. 더구나 보고된 약리 작용들은 매우 광범위한 작용을 나타내고 있는 것을 특징으로 한

다. 중요한 작용을 살펴 보면, 항균 작용²⁾, 담즙 분비 작용³⁾, 완하 작용⁴⁾, 간 독성 방어^{5,6)} 작용, 성기능 항진 작용⁷⁾, 리보핵산 생합성 억제 작용^{8~10)} 그리고 혈압강하작용등이다.¹¹⁾

본 연구자는 iridoid glucoside인 aucubin을 차전자, *Plantago asiatica*(Plantaginaceae), 및 식나무, *Aucuba japonica*(Coranaceae) 등으로부터 분리하여 이들의 생물활성 작용 및 약리 작용을 검토 보고한 바 있고, 이 가운데 aucubin이 간세포 및 동물 암 세포(Leukemia SN 36 및 Sarcoma 180 cells)의 리보핵산 생합성을 억제함을

발견한 바 있다.^{12,13)} 이러한 생물활성 작용이 iridoid 화합물이 나타내는 일반적 작용인지의 여부와, 이러한 작용을 나타내는 것이 iridoid 화합물이 생체내에서 일단 genin의 형태로 변한 aglucone의 형태인가를 밝히는 것이 iridoid 화합물의 활성화 형태(active form)를 알 수 있는 것이므로 aucubin, catalpol, gardenoside, geniposide, rehmannioside 및 swertiamarin 등의 리보핵산 및 단백질 생합성에 미치는 영향을 동물 암 세포인 sarcoma 180 배양세포를 이용하여 검토하였다.

실 험

1. 실험 재료

iridoid 화합물 가운데에서 aucubin은 과거에 보고한 바와 같이 식나무(*A. japonica*)의 잎에서 순수 분리하였고 나머지는 K. Kishi 박사로부터 공급 받았다.

Cycloheximide 및 calf thymus DNA는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고, actinomycin D는 Merck사 제품을, fisher medium은 Gibco Lab. 으로부터 공급 받았다. 방사능 동위원소 L-[4,5(n)-³H]-Leucine 및 L-[5-³H] Uridine은 Amersham Co.로부터 공급받았다.

동물 암세포는 본 실험실에서 계대 이식하여 온 것으로서 흰 마우스(Charles River)의 복강내에 1×10^6 개의 암세포를 이식한 후 필요에 따라 채취하여 사용하였다. 실험 동물은 서울대학교 동물사육장으로부터 공급받았다.

2. 실험 방법

(1) Iridoid 배당체가 Protein 및 RNA 생합성에 미치는 영향

실험에 사용한 iridoid 배당체인 aucubin, catalpol, geniposide, gardenoside, swertiamarin 및 rehmannioside 등이 미치는 영향을 시간의 변화에 따라 관찰하기 위하여 방사성 표지물질인 ³H-Leucine 및 ³H-Uridine을 사용하여 이들 표지물질이 sarcoma 180 세포에 도입되는 정도를 측정하였다. 이들의 도입 정도를 protein 및 RNA 생합성의 지표로 삼았다. 자세한 방법은 이미 보고한 방법을 따랐으며 간략하게 서술하면, 암세포가 이식된 마우스의 복강에서 암세포를 분리

채취한 후 이를 $1490 \times g$ 에서 3분간 원심분리한 후 침전된 세포의 부피의 4배에 해당하는 Fisher 배양액을 가하여 잘 저은 후 일정액을 취하여 수욕상에서(37°C) 배양하였다.^{9,10,14)} 이때 각각의 배양 플라스크에는 각 iridoid를 1mM의 농도로 첨가하였고, 양성 대조군(positive control)으로는 protein 생합성의 경우 cycloheximide 1 μ M을, RNA생합성 실험의 경우 actinomycin D 1.5 μ g을 가하였다. 음성 대조군(negative control)에는 상기의 약물대신에 Fisher 배양액만을 첨가하였다. 각 배양액에는 1ml당 1×10^7 개의 sarcoma 180세포가 되도록 하였으며, iridoid 또는 양성 대조군의 약품을 가한 후 15분 동안 배양한 후에 방사성 표지물질인 ³H-Leucine 10 μ Ci 또는 ³H-Uridine 10 μ Ci를 각각의 배양 플라스크에 넣은 후 배양시키면서 10분 간격으로 0.5ml씩 분취하여 냉 50% TCA(0.2ml)에 넣어 반응을 종결시킨 후 다시 4배 용량의 냉 5% TCA로 4회 반복 세척한 후에 다시 95% ethyl alcohol로 1회 세척후 침전 잔사를 건조시켰다. 이들 침전 잔사를 soluene® 조직용해액에서 잠게 용해될 때까지 55°C로 가온하였다. 이 용액을 toluene기제(PPO 4g+POPOP 0.1g/1l toluene)용액에 잘 섞은 후, liquid scintillation spectrometer로 방사능을 측정하였다.

(2) DNA의 정량

상기 실험을 통하여 얻은 방사능 양은 ³H-Leucine 또는 ³H-Uridine이 단백질 또는 RNA에 도입된 총량이므로 specific activity를 구하기 위하여, 각각의 총 세포중의 DNA 함량을 측정하였다. 세포배양액을 분취한 후 이를 0.5M perchloric acid와 잘 섞은 후, 원심분리하여 상등액을 제거하고 다시 0.5M perchloric acid로 1회

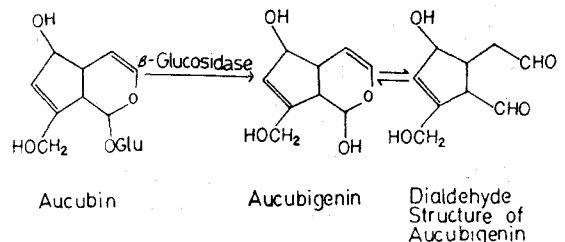


Fig. 1. A typical iridoid, aucubin structure and its hydrolytic aglucone by β -glucosidase.

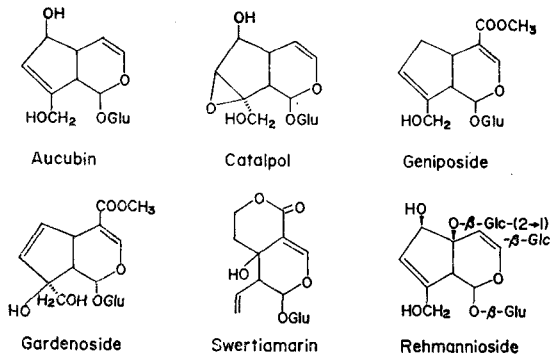


Fig. 2. Six iridoidal glucosides tested in experiment.

세척하였다. 세척한 침전물을 0.5M perchloric acid 용액에 섞은 후에 70°C에서 15분간 incubation한 후에 원심분리하여 상등액을 취하였다. 잔사를 다시 앞에서와 같이 perchloric acid로 추출하여 얻은 상등액을 합하였다. 이 상등액을 diphenylamine 용액과 섞은 후, 20시간동안 20°C에서 incubation하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 DNA량을 구하였다.¹⁵⁾

(3) β -glucosidase에 의한 aucubin의 분해

aucubigenin을 얻기 위하여 aucubin(5.19mg)과 β -glucosidase 1.34mg을 0.1M sodium acetate 완충액 용액 (pH 5.0) 0.5ml에 가하여 37°C에서 2시간동안 incubation하였다. 이때 aucubin은 genin형태로 효소분해됨을 TLC상에서 확인할 수 있었다.

실험 결과

1. Iridoid 배당체가 Protein 생합성에 미치는 영향

그림 3에서 보는 바와 같이 양성 대조군인 cycloheximide를 가한 실험에서는 단백질 합성이 현저히 억제됨을 볼 수 있었다. iridoid배당체의 경우 gardenoside 및 swertiamarin과 aucubin은 음성 대조군에 비하여 매우 적게 억제됨을 관찰할 수 있었고 기타의 iridoid 배당체는 별로 단백질 생합성을 억제하지 않았다. 이는 aucubin의 경우에 whole animal을 대상으로한 실험의 경우와는 달리 배양세포(in vitro, Leukemia SN 36 또는 Sarcoma 180)에서는 단백질 생합성 억제능

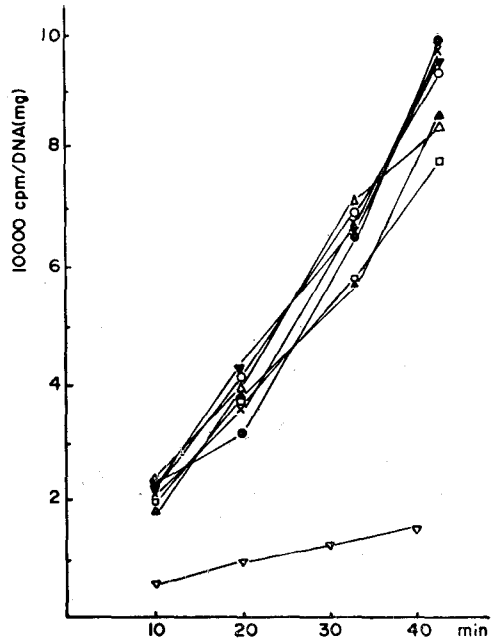


Fig. 3. Effects of iridoids on protein biosynthesis in sarcoma 180 cells.

- : gardenoside.
 - ×-× : geniposide.
 - ▼-▼ : catalpol
 - : control
 - △-△ : rehamannioside
 - : swertiamarin
 - ▲-▲ : aucubin
 - ▽-▽ : cycloheximide
- Concentration of each drug is 1mM.

력이 매우 적음을 보고한 바와 동일한 결과이며, 특히 catalpol, geniposide, gardenoside, swertiamarin, 및 rehmannioside 역시 배양세포에서는 별로 억제작용을 나타내지 않은 경향을 보여준다.

2. Iridoid 배당체가 RNA 생합성에 미치는 영향

그림 4에 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용한 actinomycin D 처리군은 RNA 생합성이 음성 대조군에 비하여 매우 적은 생합성정도, 즉 RNA 생합성이 대단히 억제되었음을 볼 수 있었다. iridoid 배당체의 경우 catalpol, geniposide, gardenoside 및 swertiamarin 등이 20분 경과 후에 약 60~70% 정도 즉 30~40%의 억제작용을 보여주었고 aucubin의 경우 약 25%정도의 억제를 보여주었다.

억제 정도를 비교하여 볼 때, iridoid 배당체들은 단백질 생합성보다 RNA 생합성 억제 작용이 더욱 예민한 것으로 나타났다.

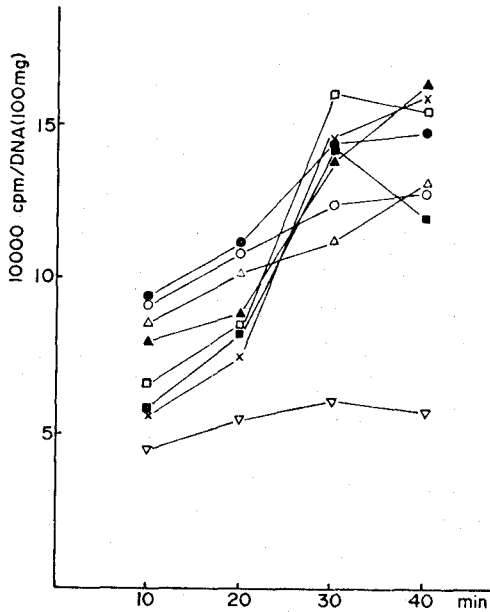


Fig. 4. Effects of Iridoids on RNA biosynthesis in sarcoma 180 cells.

▲—▲ : aucubin ×—× : geniposide
 □—□ : swertiamarin ●—● : rehmannioside
 △—△ : catalpol ■—■ : gardenoside
 ○—○ : control ▽—▽ : actinomycin D
 Concentration of each drug is 1mM.

3. Aucubigenin의 Protein 생합성에 미치는 영향

In vitro 배양세포의 경우 aucubin의 단백질 합성 억제작용이 매우 적은 점은 앞에서 관찰한 바와 같고, 만약 aucubin이 genin형태로 분해되었을 때의 영향은 어떠한지를 살피기 위해 β-glucosidase로 aucubin을 처리하여 genin 형태로 만든 후에 단백질 생합성에 대한 억제 영향을 실험한 결과는 그림 5에 나타나 있다.

이 때에도 양성 대조군으로는 cycloheximide를 처리하였고, β-glucosidase가 후시 단백질 생합성에 영향을 미치는지의 여부를 파악하여 β-glucosidase만 처리한 실험군도 조사하였다. 그 결과 β-glucosidase는 그림 5에서와 같이 단백질 생합성에 영향을 미치지 않았고, aucubin만 처리한 실험군 역시 그림 3의 결과와 같이 별로 억제 작용을 보여주지 않은 반면에 aucubigenin의 경우 단백질 생합성 억제작용은 매우 크게 나타났으며 그 정도는 거의 cycloheximide만 처리한 것

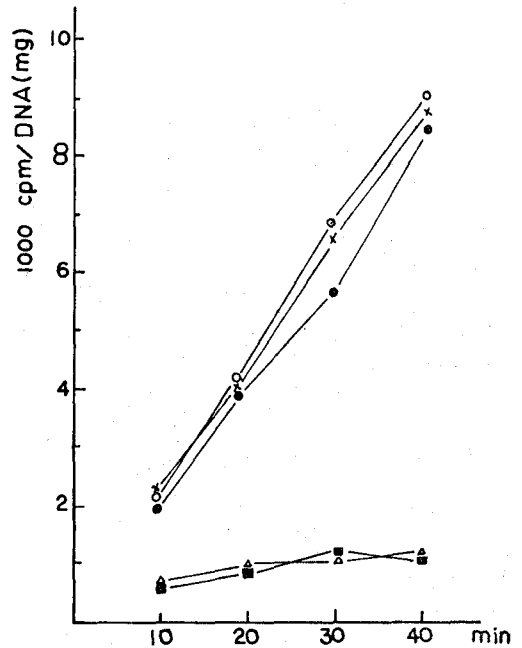


Fig. 5. Effects of aucubin and its genin(aucubigenin) on protein biosynthesis in sarcoma 180 cells.

●—● : aucubin ×—× : β-glucosidase
 ■—■ : aucubin + β-glucosidase
 △—△ : cycloheximide ○—○ : control

In aucubin plus β-glucosidase treated group, aucubin (1mM) was treated with β-glucosidase in 0.1M sodium acetate buffer at pH 5.0 to form its genin. Then this hydrolytic product was added into reaction flask containing sarcoma 180 cells.

과 유사하였다. 즉 genin형태가 월등히 높은 억제작용을 나타냄을 관찰할 수 있었다.

4. Aucubigenin의 RNA 생합성에 미치는 영향

RNA의 생합성에 iridoid의 genin 형태가 미치는 영향을 실험한 결과는 그림 6에 보여준다. 0.1mM의 aucubin 및 1mM의 aucubin 농도에서는 음성대조군 보다 낮은 생합성 정도 즉 억제 작용을 보여주고 있다. 1mM의 aucubin을 β-glucosidase로 전처리하여 aglucone형태의 genin은 양성대조군인 actinomycin D를 처리한 것보다도 월등한 억제효과를 보여주고 있다. 이때 β-glucosidase만 처리한 실험군은 RNA 생합성이 이 효소가 별 영향을 못미쳐 거의 음성대조군의 생합성 정도를 나타냄을 알수 있다. 이로써

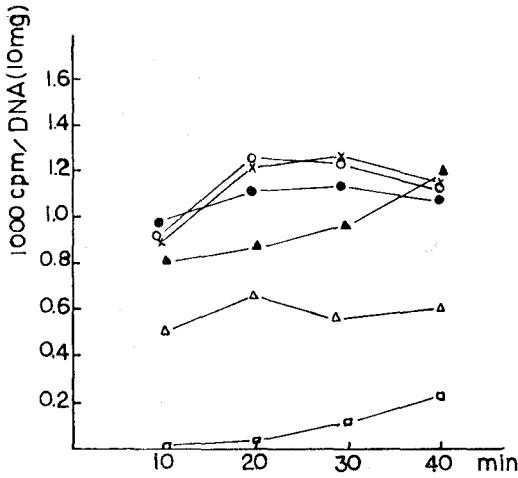


Fig. 6. Effects of aucubin and its genin (aucubigenin) on RNA biosynthesis in sarcoma 180 cells.
 ●—● : 0.1mM aucubin
 ▲—▲ : 1mM aucubin
 □—□ : aucubin + β-glucosidase
 △—△ : actinomycin D
 ○—○ : control
 ×—× : β-glucosidase

iridoid배당체는 당이 분해되어 얻어지는 genin 형태라 생체내에서 RNA 및 단백질 생합성을 억제하는 효과를 나타낼수 있는 활성화형인 것으로 사료되며 aucubin의 경우에서와 같이 다른 iridoid의 배당체 역시 일단 효소 즉 β-glucosidase 혹은 산성에서 genin으로 분해 흡수된 것이 약리작용을 나타내는 것으로 미루어 짐작할 수 있다고 하겠다.

고 찰

Iridoid 배당체인 aucubin이 whole animal 실험에 있어 mouse 간의 단백질 및 RNA 생합성 억제효과를 나타냄을 이미 보고 한 바 있고, 또한 동물 암세포(leukemia SN 36 및 sarcoma 180세포)의 *in vitro* 배양액에서는 그 억제 정도가 훨씬 저하된다는 사실 역시 보고한 바가 있다. 이에 근거하여 다른 iridoid 배당체 역시 aucubin과 동일한 단백질 및 RNA 생합성을 억제하는 작용이 있는지의 여부를 동물 암세포인 sarcoma 180 배양액에서 실험한 결과 catalpol, geniposide, gardenoside, rehmannioside 및 swe-

rtiamarin 등은 aucubin과 비슷하게 단백질 생합성과 RNA 생합성을 약간 억제하는 효과가 있음이 관찰되었고 특히 RNA 생합성 억제효과가 단백질 생합성억제효과보다 좀 더 iridoid 배당체에 예민함을 알 수 있었다. 그러나 이들 iridoid 배당체들은 sarcoma 180 세포의 배양조건, 즉 *in vitro* 조건에서 나타낸 것으로 이 암세포에 β-glucosidase가 없거나 매우 적은 경우에 이들 iridoid 배당체가 세포내로 들어갔더라도 분해되어 genin 형태로 쉽게 변화되지는 않은 것이므로, 만약 배당체 형태가 아닌 genin형태가 단백질 및 RNA 생합성에 더 영향을 줄 수도 있으므로 aucubin을 일단 β-glucosidase로 전처리한 후 이 genin용액을 세포 배양액에 가해 주었을 때를 관찰한 결과 RNA 및 단백질 생합성에 미치는 억제 작용은 매우 크게 나타났다. 이는 iridoid 배당체가 일단 생체내에 또는 세포내에 들어간 후 다시 β-glucosidase 등으로 분해되어 genin 형태로 바뀌어야 RNA나 단백질 생합성 억제효과를 나타낼 수 있고 또한 여러가지 생물활성 및 약리작용을 발현할 수 있음을 시사한다. 즉 iridoid의 생물활성화 형태는 배당체 구조보다는 genin 형태임을 뜻한다고 하겠다. 이러한 관찰은 여러 약리작용중에서 iridoid의 항균 작용 및 담즙분비촉진 작용등에서 genin 형태가 활성화 형태이며 약리 효과를 나타낼 수 있는 구조라는 보고와 유사한 결과라고 할 수 있다.

결 론

Iridoid 배당체 중 aucubin, gardenoside, geniposide, catalpol, swertiamarin 및 rehmannioside 등 6종류의 생물활성작용 중 RNA 및 단백질 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. sarcoma 180 동물 암세포 배양액에 상기 iridoid 배당체를 각각 가하였을 때 동물암 세포의 단백질 및 RNA 생합성은 약간 억제 되었다. aucubin을 β-glucosidase로 전처리 하여 genin형태인 aucubigenin을 동물 암세포 배양액에 가하였을 때는 동물 암세포의 단백질 및 RNA합성은 매우 크게 억제되었다. 그러므로 iridoid 배당체는 일단 생체 또는 세포속에서 분해되어 genin 형태로 되었을때 생

물활성작용을 나타내는 것으로 사료된다. 6종의 iridoid 배당체를 β -glucosidase로 처리하지 않았을 때는 동물 암세포의 단백질 및 RNA생합성이 약간만 억제된 것으로 보아 동물 암세포인 sarcoma 180 세포는 β -glucosidase의 활성이 없거나 매우 낮은 것으로 보여 진다.

감사의 말씀—본 연구(1984년)를 위하여 지원하여주신 한국과학재단에 감사드리며, 아울러 Dr.K.Kishi 및 민태진 교수의 협조에 감사드린다.

(1985년 3월 20일 접수 : 4월 15일 수리)

문헌

1. El-Naggar, L.J. and Beal, J.L.: *J. Nat. Prod.*, **48**, 649(1980)
2. Ishiguro, K., Yamaki, M. and Takagi, S.: *J. Nat. Prod.*, **46**, 532(1983)
3. Takeda S., Yuasa, K., Endo, T. and Aburada, M.: *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 485(1980)
4. Inoue, H., Takeda, Y., Uobe, K., Yamaguchi, K., Yabuuchi, N. and Kuwano, S.: *Planta Med.*, **25**, 285(1974)
5. Chang, I.-M., Ryu, J.C., Park, Y.C., Yun, H.S. and Yang, K.W.: *Drug and Chem. Tox.*, **6**, 443 (1983)
6. Chang, I.-M., Yun, H.S., Kim, Y.S. and Ahn, J.W.: *J. Tox.-Clin. Tox.*, **22**, 77(1984)
7. unpublished
8. Chang, I.-M., Yun, H.S. and Yang, K. W.: *Yakhak Hoeji*, **28**, 35(1985)
9. Chang, I.-M., Park, Y.C. and Yun, H.S.: *Korean Biochem. J.*, **16**, 200(1982)
10. Chang, K.S., Yun, H.S. and Chang I.-M.: *Korean Biochem. J.*, **16**, 322(1983)
11. Takeda, S. and Aburada, M.: *Shoyagugaku Zasshi*, **34**, 200(1983)
12. Chang, I.-M. and Yun H.S.: in proceeding of the International Symposium on Chinese Medicinal Materials Research, World Publishing Co., (Singapore), in press.
13. Chang, I.M., Chang K.S. and Yun-Choi, H.S.: *Kor. J. Pharmacogn.*, **14**, 95(1983)
14. Erck, A., Rainen, L., Wileyman, J., Chang, I.-M., Kimball, A. P. and Bear, J.L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**, 1278(1974)
15. David, M.P.: in *Method Cell. Biol.* **XII**, 122 (1975)