

## 조구등의 Hyaluronidase 저해물질

정세준, 고용석, 안년형, 김윤철\*

원광대학교 약학대학

### Hyaluronidase Inhibitor from *Uncariae Ramulus et Uncus*

Sei Joon Jeong, Yong Seok Ko, Nyeon Hyung Ahn and Youn Chul Kim\*

*College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea*

**Abstract**—Hyaluronidase is one of the mucopolysaccharide-splitting enzyme and is related to the permeability of the vascular system and inflammation. An anti-hyaluronidase assay guided fractionation of the methanolic extract of *Uncariae Ramulus et Uncus* has furnished a pentacyclic triterpene, ursolic acid (compound I). Compound I exhibited hyaluronidase inhibitory activity with  $IC_{50}$  value of 0.15 mM, and disodium cromoglycate showed the inhibitory activity with  $IC_{50}$  value of 1.78 mM as a positive control.

**Key words**—*Uncariae Ramulus et Uncus*; Rubiaceae; ursolic acid; hyaluronidase.

조구등은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 *Uncaria rhynchophylla* 및 동속식물의 가시가 달린 줄기를 사용하는 생약으로 한방에서 진경 및 진경효능을 가지고 있는 것으로 알려지고 있으며, 고혈압에 의하여 유발된 현기증과 두통 등에 널리 사용되어져 왔다.<sup>1)</sup> 조구등의 주성분 균은 oxindole alkaloid로서 최초로 분리된 성분은 rhynchophylline이다.<sup>2)</sup> 생리활성은 alkaloids에 의한 혈압강하 및 중추신경 억제작용 등이 보고되어져 있다.<sup>3,4)</sup>

Hyaluronidase는 mucopolysaccharide-splitting 효소 중의 하나로서 혈관투과성과 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며,<sup>5)</sup> 본 실험에 사용한 hyaluronidase(EC 3.2.1.35)는 hyaluronic acid의 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine의  $\beta(1\rightarrow4)$  결합을 가수분해하는 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> Hyaluronidase는 알레르기 반응 모델 중의 하나인 passive cutaneous an-

aphylaxis(PCA)반응 시에 그 활성이 증가되어진다고 보고되었으며, 항알레르기 약물인 disodium cromoglycate(DSCG), Tranilast, Traxanox 등에 의해서 그 활성이 억제된다고 보고되었다.<sup>7-10)</sup> 이와 같이 hyaluronidase 활성 저해와 항알레르기 및 항염증작용과의 관련성이 인정되고 있으며, hyaluronidase 저해활성 검색법은 현재 항알레르기 활성의 검색을 위한 *in vitro* 검색법 중의 하나로 이용되고 있다. 저자 등은 전보에서 microplate assay를 통하여 100여종 생약의 MeOH 추출물에 대하여 저해활성 예비검색을 시행하고, 목단피의 MeOH 추출물로부터 hyaluronidase 저해활성을 나타내는 paeoniflorin 및 oxypaeoniflorin을 분리, 보고하였다.<sup>11,12)</sup> 본 연구에서는 예비검색을 통하여 활성물질의 존재가 예상되는 조구등의 MeOH 추출물로부터 hyaluronidase 저해활성을 나타내는 triterpenoid계 화합물인 ursolic acid(1)를 분리 동정하여 보고하고자 한다.

\*교신저자 : Fax 0653-52-8837

## 실험방법

**실험재료 및 기기**-조구등(WP No. 380)은 익산 시 한약 건재상에서 구입하여 감별한 후 세절하여 사용하였으며 증거표본은 원광대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다. Hyaluronidase(Type VI-S:from bovine testis), compound 48/80, hyaluronic acid potassium salt(from human umbilical cord), cetylpyridinium chloride, agarose(Type I-A:Low EEO), disodium cromoglycate(DSCG), *p*-dimethylamino-benzaldehyde(DMAB) 및 동정용 ursolic acid 표준품은 Sigma사의 제품을 사용하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel(70~230 mesh, Merck)을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plate(0.2 mm, Merck), Silica gel with 100% octadecylsilanization and 254 nm fluorescent indicator on glass(Sigma)를 사용하였다. 기타 시약과 용매는 1급 또는 특급시약을 사용하였다. 또한 사용한 기기는 다음과 같다. NMR:JEOL EX-400, MS:JEOL SX-102A. 기타 흡광도 측정을 위하여 ELISA Reader(Molecular Devices) 및 HP 8452A(Hewlett Packard)를 사용하였다.

**Microplate assay**-전보<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 시행하였다.

**Morgan-Elson assay**<sup>13)</sup>-Hyaluronic acid가 hyaluronidase에 의해서 분해되어 생성되는 *N*-acetylglucosamine을 DMAB를 이용하여 585 nm에서 비색정량하였다. 자세히 설명하면 다음과 같다. 먼저 시험관에 인산완충액(pH 7.0)에 녹인 hyaluronidase 50  $\mu$ l(in 5 units)와 DMSO(최종농도 2%)에 녹인 생약 시료용액 100  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 20분간 배양한다. 배양한 후에 2.4 mg/ml의 compound 48/80용액 100  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 20분간 배양한다. 배양이 끝나면 4 mg/ml의 hyaluronic acid 250  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 40분간 배양한다. 효소반응을 중지시키기 위하여 0.4 N NaOH 100  $\mu$ l를 가한 후 K<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100  $\mu$ l를 넣고 열탕에서 3분간 가열한다. 냉각 후에 DMAB시약 3 ml를 가한 다음 37°C에서 20분간 방치하고 3000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 585 nm에서 흡광

도를 측정한다. 각 실험은 3회 실시한 후 평균치를 구하였다.

**추출 및 분리**-건조한 조구등 3 kg을 세절한 후 메탄올로 환류시키면서 3시간씩 2회 반복 추출한 다음 온시에 여과한 후 여액을 감압농축하여 메탄올 추출물(176.6 g)을 얻었다. 얻어진 메탄올 추출물을 증류수로 현탁하고 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-BuOH을 사용하여 순차적으로 용매분획하여 CHCl<sub>3</sub> 분획(34.14 g), EtOAc 분획(21.98 g), *n*-BuOH 분획(38.13 g) 및 물 가용부를 얻었다. 각각의 분획에 대하여 활성을 검색한 결과 EtOAc 분획에서 hyaluronidase 저해 활성(IC<sub>50</sub>=1.19 mg/ml)이 인정되었다. 활성이 나타난 EtOAc 분획 1 g을 silica gel column chromatography(CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 20:1→7:3)를 시행하여 TLC의 양상에 따라 5개의 소분획으로 나누었으며 활성이 나타난 소분획 1(340 mg, IC<sub>50</sub>=300  $\mu$ g/ml)에 대하여 silica gel column chromatography(CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 40:1→10:1)를 반복 실시하여 활성물질인 화합물 1(48.2 mg, ursolic acid)을 얻었다. 화합물 1은 Liebermann-Burchard반응 및 antimony chloride(III) 시약에 의하여 triterpenoid 양성반응이 나타남을 확인하였다.

**화합물 1**-화합물 1은 백색분말로서 mp 278~280°; FAB-MS, *m/z*(rel. int.) 455 [M-H]<sup>-</sup>(45), 255(17), 209(20), 179(15); <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)δ:5.47(1 H, brs, 12-H), 3.44(1 H, ddd, *J*=6.34, 7.67 and 9.27 Hz, 3-H), 2.62(1H, d, *J*=11.23 Hz), 2.31(1H, m), 2.07(1H, m), 1.22(3H, d, *J*=5.37 Hz), 1.03(3H, s), 1.009(3H, s), 1.001(3H, s), 0.98(3H, s), 0.94(3H, d, *J*=5.85 Hz), 0.87(3H, s); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)δ: 15.67, 16.57, 17.44, 17.52, 18.78, 21.41, 23.62, 23.91, 24.90, 28.10, 28.68, 28.81, 31.06, 33.57, 37.72, 37.43, 39.07, 39.36, 39.39, 39.48, 39.95, 42.48, 48.02, 53.53, 55.81, 78.10, 125.63, 139.24, 179.86.

## 결과 및 고찰

**화합물 1의 구조**-화합물 1은 백색 분말로 Liebermann-Burchard 반응 및 antimony chloride(III) 시약에 의하여 triterpenoid 양성반응을 나타

났다.  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) spectrum에서  $\delta 0.87$ (3H, s),  $0.98$ (3H, s),  $1.001$ (3H, s),  $1.009$ (3H, s),  $1.03$ (3H, s)에서 5개의 singlet methyl signal이 나타났으며  $\delta 0.94$ (3H, d,  $J=5.85$  Hz),  $1.22$ (3H, d,  $J=5.37$  Hz)에서 2개의 doublet methyl signal을 나타냈다. 또한,  $\delta 5.47$ (1H, brs)에서 olefine proton peak를 확인하였으며  $\delta 3.44$ (1H, ddd,  $J=6.34, 7.67, 9.27$  Hz)에서 OH기가 치환된 proton peak를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )로부터  $\delta 179.86$ 에서 carboxylic carbon에 유래하는 peak가 나타났고  $\delta 125.63, 139.24$ 에서 olefinic carbon에 유래하는 peak를 확인하였다. 또한  $\delta 78.10$ 에서 OH기가 치환된 carbon peak를 확인하였다. 이러한 결과로부터 화합물의 구조를 ursane계열의  $3\beta$ -hydroxyurs-12-en-28-oic acid(ursolic acid)로 그 구조를 추정하였으며 표준품의 NMR spectrum과 순상 TLC( $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 40:1,  $R_f=0.3$ )와 비교하여 일치하였으므로 화합물 1을 ursolic acid로 동정하였다.

**화합물 1의 생리활성** - 화합물 1에 대하여 microplate assay를 이용하여 hyaluronidase저해활성을 측정된 결과, 화합물 1의 50% 저해활성은 0.15 mM로 나타났으며 양성 대조약물인 DSCG( $\text{IC}_{50}=1.78$  mM)에 비하여 강한 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 Morgan-Elson법에 따라 측정된 결과 화합물 1의 50% 저해활성은 0.3 mM이었다. 지금까지 ursolic acid의 약리작용에 관한 보고가 다수 이루어져있으며, 이 중 ursolic acid는 흰쥐의 비만세포에서 compound 48/80에 의하여 유발된 histamine의 유리를 억제하는 것으로 보고되어져 있으며 lipoxxygenase, cyclooxygenase, human leukocyte elastase를 억제함으로써 각각 항알레르기 및 항염증 작용에 관계가 있는 것으로 보고되어졌다.<sup>14-16)</sup> 이상의 보고는 hyaluronidase를 이용하여 항알레르기 및 항염증 작용을 가지는 선도물질을 얻고자 시행한 본 실험의 결과와 상관성 있는 것으로 생각되어진다.

## 결 론

조구동의 MeOH 추출물로부터 1종의 hyaluronidase 저해물질(화합물 1)을 분리하고 기기분

석 결과 및 표준품의 NMR spectra와 비교함으로써 그 구조를 ursolic acid로 동정하였다. 화합물 1은 microplate assay를 이용한 hyaluronidase 저해활성 검정에서 0.15 mM의 50% 저해율을 나타내었으며, 양성 대조약물인 DSCG( $\text{IC}_{50}=1.78$  mM)에 비하여 강한 활성을 나타내었다. 또한, Morgan-Elson법을 이용한 hyaluronidase 저해활성 검정에서는 0.3 mM의 50% 저해율을 나타내었다.

## 사 사

본 연구는 1997년 교육부지원 학술진흥재단의 신진교수과제의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한, Mass spectrum을 측정해 주신 일본九州大學 약학부 Higuchi교수님께 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese drugs of plant origin. 997. Springer-Verlag, Berlin.
2. Kondo, H., Fukuda, T. and Tomita, M. (1928) Alkaloids of *Ouronparia rhynchophylla* Matsum. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 48: 321-337.
3. Endo, K., Oshima, Y., Kikuchi, H., Koshima, Y. and Hikino, H. (1983) Series on the validity of the oriental medicines. Hypotensive principles of *Uncaria hooks*. *Planta Med.* 49: 188-190.
4. Ozaki, Y. (1989) Pharmacological studies of indole alkaloids obtained from domestic plants. *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 94: 17-26.
5. Meyer, K. (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* 27: 335-359.
6. Fiszer-Szafaraz, B. (1984) Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidase from bacteria, slime molds, bee and venoms, bovine testis, rat liver lysosomes and human serum. *Anal. Biochem.* 143: 76-81.
7. Sakamoto, K., Nagai, H. and Koda, A. (1980) Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. *Immunopharmacology* 2: 139-146.

8. Kakegawa, H., Masumoto, H. and Satoh, T. (1985) Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 642-646.
9. Kakegawa, H., Mitsuo, N., Masumoto, H., Satoh, T., Akagi, M. and Tasaka, K. (1985) Hyaluronidase-inhibitory and anti-allergic activities of the photo-irradiated products of tranilast. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3738-3744.
10. Goto, K., Terasawa, M. and Maruyama, Y. (1979) Anti-allergic activities of a new benzopyranopyridine derivative. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 59: 13-19.
11. Jeong, S. J., Kim, N. Y., Ahn, N. H. and Kim, Y. C. (1997) Screening of hyaluronidase inhibitory activity using a microplate assay. *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 131-137.
12. Jeong, S. J., Ahn, N. H. and Kim, Y. C. (1998) Hyaluronidase inhibitors from Moutan Cortex Radicis. *Kor. J. Pharmacogn.* 29: 44-47.
13. Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217: 959-966.
14. Tsuruga, T., Chun, Y. T., Ebizuka, Y. and San-kawa, U. (1991) Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: Inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem. Pharm. Bull.* 39: 3276-3278.
15. Simon, A., Najid, A., Chulia, A. J., Delage, C. and Rigaud, M. (1992) Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta* 1125: 668-72.
16. Ying, Q. L., Rinehart, A. R., Simon, S. R. and Cheronis, J. C. (1991) Inhibition of human leukocyte elastase by ursolic acid. *Biochem. J.* 277: 521-526.

(1998년 6월 29일 접수)