

미역줄나무의 항암활성에 관한 연구

박완수*

국군백제병원 한방과

Study on the Antitumor Activity of *Tripterygium Regelii* Sprague

Wan Su Park*

Department of Oriental medicine, The Armed Forces Byukje Hospital

Tripterygium regelii has been used as an oriental medicine, especially antiparasitic, anti-inflammatory and detoxifying agents in East asia. During our research to develop new antitumor agents from natural products, MeOH ext. and CH₂Cl₂ ext. of *Tripterygium regelii* showed the potent antitumor activity. In order to purify active compounds from *Tripterygium regelii*, activity-guided fractionation was carried out. Silica gel and RP-18 column chromatography for the active fraction led to the isolation of two compounds and their antitumor activities were studied. Those two compounds didn't show potent antitumor activity against human tumor cell lines. The structure of two compounds were determined by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹³C COSY and IR spectrum. Compound I and Compound II were turned out to be Celastrol, and β-sitosteryl-3-o-β-D-glucopyranoside respectively.

Key words : *Tripterygium regelii*, antitumor activity, celastrol, Pristimerin, β-sitosteryl-3-o-β-D-gulcopyranoside

서 론

미역줄나무(*Tripterygium regelii*)¹⁾는 山地에 자라는 노박덩굴과(Celastraceae)의 여러해살이 落葉蔓莖나무이다. 나무의 길이는 2m에 달하고 가지는 붉은 갈색이며 '옴'같은 돌기가 촘촘히 분포하고 털은 없으나 5줄의 稜線이 있으며 2년째가 되는 가지는 흑갈색을 띤다. 잎은 어긋나며, 넓은 계란형이고 밝은 녹색이며 그 끝이 뾰족한 尖頭形이다. 꽃은 圓錐花序로 6~7월에 피며 頂生 혹은 腋生으로서 백색이다. 중국에서는 본 식물을 '東北雷公藤'²⁾이라 하고 同屬 식물인 '*Tripterygium wilfordii*'를 '雷公藤'³⁾이라 하여 이 두 식물의 性味와 효능을 유사한 것으로 설명하고 있다. 한의학에서는 苦味를 가지고 있는 '祛風除濕藥'으로 분류하고 있으며 '風濕'으로 인한 '積聚'와 '癰' 등의 치료에 사용되어 왔다. 또한 大毒하므로 사용 시 유의할 것과 殺蟲, 消炎, 解毒작용이 보고되어 있다⁴⁾. 분리된 성분으로는 triptoquinone-A⁵⁾, triptofordin-A⁶⁾, triptogerlin A-1⁷⁾ 등이 있으며 regelin과 regelinol⁸⁾은 항암작용이 있는 성분으로 알려져 있다.

본 논문에서는 항암효과가 있다고 보고된 '미역줄나무'를 선

택하여 여러 가지 용매를 이용한 계통적 분획추출과 'Column Chromatography'를 통한 성분분리, 그리고 분리된 성분으로 항암세포실험을 하여 항암활성이 뛰어난 유효성분을 찾고자 하였으며 이를 통하여 '한약제로부터의 항암치료제 개발' 가능성을 모색하고 아울러 '한의학적 치료효능'과 '약물의 유효성분'의 연관관계에 대하여서 고찰하였다.

실 험

1. 실험재료

1994년 8월 강원도 사명산에 자생하는 미역줄나무(*Tripterygium regelii* Sprague)의 줄기와 잎을 채집하여 정확히 감정한 후 사용하였다.

2. 시약 및 기기

1) 시약

추출 및 분획용 시약은 1급 시약을 사용하였고 분취용 column chromatography에 사용한 흡착제로는 Kieselgel 60(230-400mesh, ASTM, Art. 9385, Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography 용 plate는 precoated silica gel 60F254 plate(layer thickness 0.25mm, 20×20cm, Art. 5715, Merck)와

* 교신저자 : 박완수, 경기도 고양시 벽제동 산57 국군백제병원 한방과

· E-mail : han-gl@hanmail.net, · Tel : 031-963-6657

· 접수 : 2005/01/05 · 수정 : 2005/02/02 · 채택 : 2005/02/28

precoated RP-18F₂₅₄S(layer thickness 0.25mm, 20×20cm, Art. 15423, Merck), precoated silica gel 60F₂₅₄ plate(layer thickness 1mm, 20×20cm, Art. 13895, Merck)를 사용하였다.

2) 실험 기기

본 실험에서 사용된 기기는 다음과 같다.

- (1) MP : Gallenkamp melting point apparatus (uncorrected)
- (2) IR : Perkin - Elmer 16F PC FT/IR
- (3) ¹H-NMR : Varian Gemini 300 spectrometer (300MHz)
Varian Unity 600 spectrometer (600MHz)
- (4) ¹³C-NMR : Varian Unity 300 spectrometer (75.5MHz)
- (5) GC/MS : Hewlett Packard 5890 Gas Chromatography /
Hewlett Packard 5972 Mass Selective Detector

3. 항암 효능 검색

'Human Tumor disease-oriented screening test'의 방법중의 하나인 'MTT assay'에 의하여 항암 효능을 검색하였다. 이 실험은 서울대학교 천연물과학연구소와 한국과학기술연구원 스크리닝실에 의뢰하여 실시하였다. 여기서 'MTT assay'란 살아있는 암세포 내의 미토콘드리아에 있는 succinate dehydrogenase라는 효소에 의하여 MTT시약(노란색)이 formazan으로 환원되는 것을 이용하는 것으로서 이 'formazan'이 진한 보라색으로 발색하는 점에 착안하여 'microplate reader'를 이용, 540nm에서의 OD(Optical Density:흡광도)를 측정하고 그 흡광도에 따라 암세포의 생존율을 추정하는 것이며 여기서 약물로 처리한 암세포와 약물처리하지 않은 암세포와의 OD수치를 비교하여 항암효과를 계산해낸다. ('EC50'수치는 암세포가 50%소멸될 때의 약물의 농도를 의미한다.) 실험에 사용된 Tumor Cell line은 SNU-1(위암), A-549(폐암), SKOV-3(난소암), SKMEL-2(흑색종), HELA-S3(자궁경부암) 등이다.

4. 화합물의 분리

1) 추출 및 분획

미역줄나무(fresh weight : 5kg)의 전초를 그늘에서 말려 작은 조각으로 자른 후 MeOH에 침전시켜 실온에서 3-4일 동안 추출하였다. 추출은 3회에 걸쳐 하였는데 1회에 MeOH 9ℓ씩 사용하였다. 추출액을 여과하여 40℃ 이하에서 감압농축하여 MeOH ext.을 153g 얻었다. 이 MeOH ext.을 증류수로 현탁시키고 CH₂Cl₂, EtOAc, 그리고 n-BuOH로 단계적 추출법에 의해 분획을 나누어 활성 test를 의뢰하였다.

2) CH₂Cl₂ ext.의 분획 및 Compound의 분리

미역줄나무의 CH₂Cl₂ 분획이 초기단계의 항암효능실험에서 높은 활성을 나타내었으므로 CH₂Cl₂ 분획들을 silica gel 및 flash, RP-18 column chromatography를 반복 실시하여 화합물들을 단리하였다.

(1) CH₂Cl₂ 분획으로부터 Compound I의 분리

항암효능 실험결과 활성이 나타나는 CH₂Cl₂ 분획을 silica gel을 사용하여 column chromatography를 실시하였다. 이때 사용한 용매는 Hexane:CH₂Cl₂ = 1:4이며 이 혼합용매에서 MeOH

을 가하여 극성을 점차로 높여서 화합물을 용출시켰다. TLC pattern에 따라 유사한 것들을 서로 합쳐 7개의 분획(A1-A7)으로 나누었고 계속적으로 항암효능실험을 의뢰하였다. 이 활성분획들을 같은 방법으로 silica gel을 이용한 column chromatography를 반복 실시하여 Compound I (Celastrol)을 얻을 수 있었다.

(2) Compound I의 methylation

위에서 얻은 Compound I 10mg을 무수CH₂Cl₂로 녹이고 CH₂N₂를 서서히 첨가하여 1시간동안 교반하였다. 이를 농축하여 silica gel을 사용한 column chromatography를 실시하였다. 이때 사용한 용매는 Hexane:EtOAc = 2:1이었고 이 실험을 통하여 Compound I a (Pristimerin)을 6mg 얻을 수 있었다.

(3) CH₂Cl₂ 분획으로부터 Compound II의 분리

CH₂Cl₂ ext. 5g을 위와 같은 방법으로 silica gel을 이용한 column chromatography를 실시하여 Compound II를 얻었다. 이때 사용한 용매는 Hexane:CH₂Cl₂ = 1:4(→6:1)이며 MeOH의 양을 증가시켜 극성을 높여가며 화합물을 용출시켜 소분획으로 나누었다. 이 소분획을 다시 silica gel을 이용하여 CH₂Cl₂:MeOH = 10:0.7의 혼합용매를 전개용매로 하여 column chromatography를 실시하였다. 이때 전개용매에 MeOH의 양을 증가시켜 극성을 높여서 실시한 결과 Compound II (β-sitosteryl-3-o-β-D-gulcopyranoside)를 15mg 얻었다.

3) Compound의 NMR 및 IR spectrum data

분리된 Compound들의 정확한 구조구명을 위하여 ¹H-NMR spectrum, ¹³C-NMR spectrum, DEPT spectrum, ¹H-¹³C COSY spectrum과 IR spectrum data를 분석하였다.

(1) Compound I

적색 powder인 Compound I의 data는 다음과 같다.

- ① mp 205℃
- ② IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 3266, 2938, 2362, 1702, 1580, 1508, 1446, 1376, 1224, 1112, 1092, 878, 754
- ③ ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃)δ: 7.06(1H, dd, J=7 and 1Hz H-6), 6.50(1H, s, J=1Hz, H-1), 6.32(1H, d, J=7Hz, H-7), 2.21(3H, s, 4-CH₃), 1.43(3H, s, 13-CH₃), 1.25(3H, s, 14-CH₃), 1.09(3H, s, 17-CH₃), 0.58(3H, s, 20-CH₃)
- ④ ¹³C-NMR(75.5MHz, CDCl₃)δ: 120.6(C-1), 178.3(C-2), 147.0(C-3), 120.4(C-4), 127.5(C-5), 135.4(C-6), 118.3(C-7), 172.7(C-8), 43.1(C-9), 165.1(C-10), 33.8(C-11), 29.5(C-12), 39.3(C-13), 45.3(C-14), 28.7(C-15), 36.4(C-16), 30.7(C-17), 44.3(C-18), 31.1(C-19), 40.0(C-20), 29.3(C-21), 34.5(C-22), 10.5(C-23), 38.4(C-25), 21.5(C-26), 18.7(C-27), 31.5(C-28), 182.6(C-29), 32.4(C-30)

(2) Compound I a

Compound I을 CH₂N₂로 상온에서 반응시켜 '-COOH'가 '-CO₂Me'로 Methylation되도록하여 Compound I a를 얻을 수 있었다. Compound I a 또한 적색의 분말이었다.

- ① IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 2926, 2837, 1734, 1596, 1560, 1438, 1376, 1220
- ② ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃)δ: 7.00(1H, dd, J=7 and 1Hz, H-6),

6.54(1H, s, J=1Hz, H-1), 6.35(1H, d, J=7Hz, H-7), 2.18(3H, s, 4-CH₃), 1.46(3H, s, 13-CH₃), 1.27(3H, s, 14-CH₃), 1.10(3H, s, 17-CH₃), 0.54(3H, s, 20-CH₃)

(3) Compound II

Subfraction을 CHCl₃:MeOH=14:1(→13:1)의 용매로 Silica cc.를 실시하여 백색 반투명성의 분말인 Compound II를 얻었다.

① mp 219℃

② ¹³C-NMR(75.5MHz, Pyridine-d₅): 37.47(C-1), 29.49(C-2), 78.13(C-3), 39.66(C-4), 140.92(C-5), 121.86(C-6), 32.05(C-7), 30.23(C-8), 50.34(C-9), 36.35(C-10), 19.93(C-11), 56.26(C-14), 23.40(C-15), 26.44(C-16), 56.82(C-17), 19.12(C-19), 34.21(C-20), 19.36(C-21), 32.14(C-22), 24.46(C-23), 46.06(C-25), 28.50(C-25), 19.20(C-26), 19.38(C-27), 21.27(C-28), 11.95(C-29), 102.57(C-1'), 75.30(C-2'), 78.40(C-3'), 71.72(C-4'), 78.57(C-5'), 62.85(C-6')

결과 및 고찰

미역줄나무의 용매추출물(사용용매: MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH, H₂O) 및 그 분획들에 대한 항암실험을 한 결과 높은 항암효능을 나타내는 분획들이 있음을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 더 나아가 이러한 항암효능을 나타내는 분획들로부터 두가지의 성분을 분리해내었으나 분리한 성분들은 뚜렷한 항암효능을 나타내지 않았다. 즉 초기단계의 단순용매분획들이 항암효능을 나타내는 반면 더욱더 세분된 분리성분들은 항암효능을 잘 나타내지 않는 실험결과는 한의학을 이용한 새로운 항암제 개발에 있어서 그 최종목표를 '한약' 자체로 할 것인지 아니면 '한약에 포함되어 있는 유효성분'으로 할 것인지에 대하여 보다 깊은 고찰을 요구한다고 할 수 있을 것이다. 분리된 성분들의 구조는 ¹H-NMR spectrum과 ¹³C-NMR spectrum, DEPT spectrum, ¹H-¹³C COSY spectrum, IR spectrum data와 참고문헌 비교를 통하여 알 수 있었다.

1. Compound I 과 Compound I a의 구조

Compound I (mp 205℃)은 red color의 결정체이며 Compound I 에 CH₂N₂를 반응시켜 methylation시킨 Compound I a를 얻었다. Compound I 의 ¹H-NMR spectrum에서는 δ1.27ppm(3H, s, 13-CH₃), 1.24ppm(3H, s, 14-CH₃), 1.09ppm(3H, s, 17-CH₃), 0.58ppm(3H, s, 20-CH₃)에서 4개의 tertiary methyl group에 기인한 peak가 각각 나타나고 있으며 δ1.43ppm(3H, s, 9-CH₃)에서는 한 개의 vinylic methyl group에서 기인한 peak가 나타나고 있다. Down field에서는 δ7.06ppm에서 6번 proton이 7번 proton과 coupling을 하며 doublet(J=7Hz)으로 나타나고 있으며 δ6.32ppm에서는 7번 proton에서 기인한 peak가 6번 proton과 coupling을 하며 doublet(J=7.0 Hz)으로 나타나고 있다. ¹³C-NMR에서는 29개의 peak가 나타나 tritene임을 예상할 수 있었으며 가장 down field에서 나타나는 δ182.6ppm의 peak는 free acid의 carbonyl peak임을 예상할 수 있었다. DEPT spectra로부터 angular methyl peak가 5개, 4급 탄소가 13개이며,

3급 탄소가 4개, 2급 탄소가 7개임을 알 수 있었다. ¹H-¹³C COSY spectra로부터 25번의 vinylic methyl 탄소에서 기인한 peak가 δ38.4ppm에서 나타나고, aromatic ring에서 기인한 이중결합의 1번 탄소가 δ120.6ppm에서 나타남을 알 수 있었다. 또한 6번 탄소의 peak가 δ135.4ppm에서 나타나고 δ118.3ppm의 correlation peak로부터 7번 탄소에서 기인한 peak임을 알 수 있었다. 한편 δ18.7ppm의 correlation peak는 27번의 angular methyl에서 기인한 peak임을 알 수 있었고, δ21.5, 31.5, 그리고 32.4ppm의 correlation peak는 각각 C-26, 28, 그리고 30에 해당하는 methyl peak임을 알 수 있었다. IR spectrum에서는 3266cm⁻¹에서 hydroxyl group과 free acid에서 기인한 peak가 broad하고 강하게 나타나며, 2938cm⁻¹에서는 C-H stretching peak가 나타나고 있으며, 1702cm⁻¹에서는 carbonyl group에서 기인한 peak가 나타나고 있으며, 1580cm⁻¹에서는 aromatic ring에서 기인한 peak가 나타나고 있다. 1224cm⁻¹에서는 C-O bond에서 기인한 peak가 각각 나타나고 있어 다른 spectral data와 일치함을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 Compound I 은 Celastrol(C₂₉H₃₈O₄)로 추정할 수 있었으며 이를 문헌비교⁹를 통하여 확정하였다(Fig.1).

Compound I a의 ¹H-NMR spectrum은 Compound I 과 유사하게 나타났다. δ1.27ppm(3H, s, 14-CH₃), 1.18ppm(3H, s, 14-CH₃), 1.10ppm(3H, s, 17-CH₃), 0.54ppm(3H, s, 20-CH₃)의 4개의 tertiary methyl group에서 기인한 peak가 각각 나타나고 있으며 δ1.46ppm(3H, s, 9-CH₃)에서는 한 개의 vinylic methyl group에서 기인한 peak가 나타나고 있다. Down field에서는 δ7.00ppm에서 6번 proton이 7번 proton과 coupling을 하며 doublet(J=7.0 Hz)으로 나타나고 있으며 δ6.35ppm에서는 7번 proton에서 기인한 peak가 6번 proton과 coupling을 하며 doublet(J=7.0, Hz)으로 나타나고 있다. 특히 δ3.56ppm에서는 3개에 해당하는 proton이 singlet으로 나타나고 있는데 이는 free carboxyl group이 methylation으로 인한 methyl peak임을 알 수 있었다. 또한 IR spectrum에서도 알 수 있는데 Compound I 의 IR spectrum과 비교해보면 3200cm⁻¹근처의 peak가 그 intensity가 줄어 free acid가 methylation되었음을 알 수 있었다. ¹³C-NMR에서는 Compound I 과 비교하였을 때 δ52.2ppm에서의 methyl ester에서 기인한 '-OCH₃'가 나타나고 있으며 다른 peak는 유사하였다. 이 결과로부터 Compound I a는 'Pristimerin (Celastrol이 methylation된 것: C₃₀H₄₀O₄)'임을 문헌과 비교¹⁰하여 확인할 수 있었다(Fig.1).

2. Compound II의 구조

Compound II는 백색의 결정체이며 ¹H-NMR spectrum에서 δ5.43ppm의 broad한 peak는 이중결합에서 오는 peak임을 예상할 수 있었고, 5.05ppm의 doublet(J=7.5Hz)과 4.7ppm, 4.0ppm의 peak형태는 compound에 당이 하나 결합되었음을 예상하게 하였다. 즉 5.05ppm의 doublet는 당의 anomeric proton으로 coupling constant가 8.1Hz로 당이 β-configuration되었음을 의미하였다. 또한 4.64ppm의 doublet of doublet(J=2, 11.7Hz)은 2개의 proton에 해당하는 것으로 methylene proton에 해당하며

4.48ppm의 doublet of doublet peaks($J=5, 11.7$)은 methine proton으로 methylene proton과 coupling함을 알 수 있었다. 0.7ppm~1.2ppm의 angular methyl groups에서 기인하는 peak들로 미루어 methyl group이 6개 있음을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 $\delta 102.57\text{ppm}$ 에서의 anomeric 탄소와 $78.57\text{ppm}\sim 62.85\text{ppm}$ 의 sugar 탄소는 문헌과 비교하여 glucose임을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 Compound II가 ' β -sitosteryl-3-o- β -D-glucopyranoside'임을 추정하였으며 이를 참고문헌¹¹⁾을 통하여 확인하였다(Fig.1).

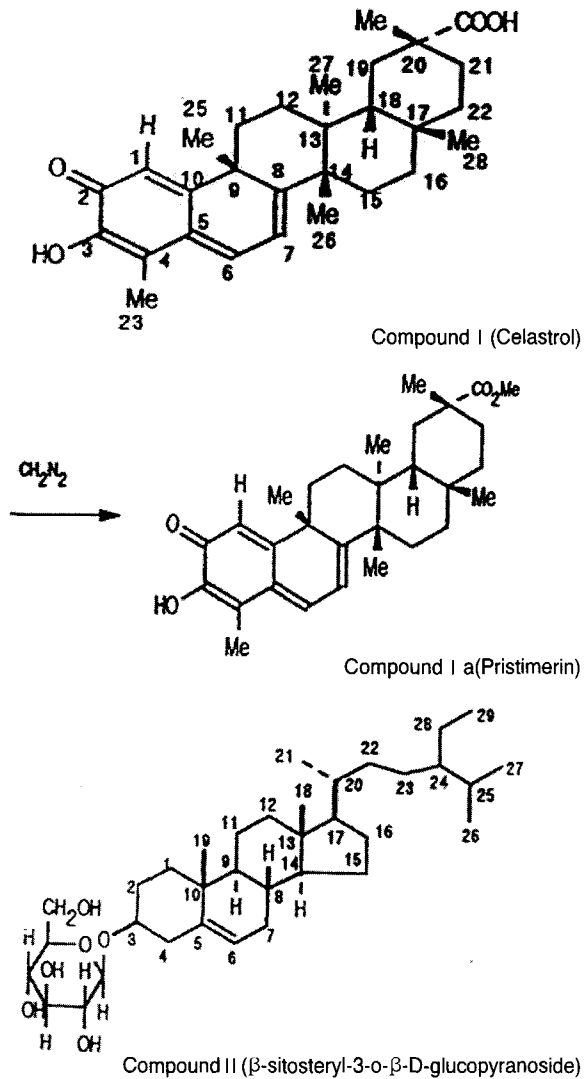


Fig. 1. Compound I, Compound I a, Compound II

3. 항암효과에 대한 고찰

항암실험결과에 대하여 각 cell line에 대한 항암효과는 다음과 같다.

- 1) 'SNU-1'에 대하여 활성을 나타내는 분획들은 MeOH ext., CH_2Cl_2 ext., EtOAc ext., A-3, A-4, A-5, A-6, 3a, 6a, 14a, B2, B3, B4, B5, B6, 20a, O-4, q-1, q-2, C-12, C-14, K-4 등이다.
- 2) 'HELA-S3'와 'SKOV-3'에 대하여 활성을 나타낸 분획은

CH_2Cl_2 ext.이다.

- 3) 'A-549'와 'SKMEL-2'에 대하여 활성을 나타낸 분획은 CH_2Cl_2 ext., n-BuOH ext.이다.

4) 'Compound I'과 'Compound II'는 'SNU-1'에 대한 항암실험결과 활성을 보이지 않았다. ('Celastrol'과 'Pristimerin'은 모두 'antitumor activity'가 있는 것으로 보고되었으므로 이에 대한 보다 자세한 연구도 필요한 것으로 보인다)

결 론

미역줄나무(*Tripterygium regelii*)는 중국 등에서 '동북뇌공등(東北雷公藤)'으로 불리우며 '뇌공등(雷公藤)'과 성미·효능·주치 등이 유사한 것으로 분류되어 항암제로 연구, 개발되어 사용되고 있다. 이러한 미역줄나무에 대하여 다양한 용매를 이용한 계통적 분획추출과 column chromatography를 통한 성분분리, 그리고 추출한 분획들과 분리한 성분으로 항암효능 검색실험(Antitumor Screening Test)를 실시하고 그 결과를 비교, 고찰하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

MeOH ext.은 'SNU-1', CH_2Cl_2 ext.은 'SNU-1'·'HELA-S3'·'SKOV-3'·'A-549'·'SKMEL-2', n-BuOH ext.은 'A-549'와 'SKMEL-2'에 항암활성을 나타내었다. 본 식물로부터 이미 알려진 두 개의 성분, ① Compound I (Celastrol: $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_4$)과 ② Compound II (β -sitosteryl-3-o- β -D-glucopyranoside)을 분리해내었으나 이 두 성분은 항암활성을 나타내지 않았다. 분리해낸 성분 중 Compound I에 ' CH_2N_2 '를 반응시켜 'Celastrol'의 '-COOH'기를 methylation시킴으로써 methyl ester인 'Pristimerin(Compound I a: $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_4$)'을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. 이창복. 대한식물도감. 서울. 향문사. 521, 1989.
2. R. Chen. Zhong Guo Shu Mu Fen Lei Xue. 692, 1957.
3. 낙화생. 번역과 한방(안력균 역). 서울. 열린 책들. 107-119, 1992.
4. 新文豊出版社. 중약대사전. 타이완. 新文豊出版社. 5349, 1991.
5. Moritoki, H., Hisayama, T., Kida, K., Kondoh, W., Inoue, S., Takaishi, Y. Inhibition by triptogonin-A of LPS- and IL-1 beta-primed induction of NO synthase in rat thoracic aorta. Life Sci. 59(3), 1996
6. Hayashi K, Hayashi T, Ujita K, Takaishi Y. Characterization of antiviral activity of a sesquiterpene, triptofordin C-2. J Antimicrob Chemother. 37(4):759-768, 1996.
7. Ujita, K., Takaishi, Y., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Fujita, T. Inhibitory effects of triptogonin A-1 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin tumor promotion. Cancer Lett. 68(2-3):129-133, 1993.
8. Hori, H., Pang, G.M., Harimaya, K., Itaka, Y., Inayama, S. Isolation and structure of regelin and regelinol, new antitumor ursene-type triterpenoids from *Tripterygium*

- regelii. Chem Pharm Bull. 35(5):2125-2128, 1987.
9. Ngassapa, O., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Farnsworth, N.R. Quinone-methide triterpenes and salaspermic acid from *Kokoona ochracea*. J Nat Prod. 57(1):1-8, 1994.
10. Sassa, H., Kogure, K., Takaishi, Y., Terada, H. Structural basis of potent antiperoxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation. Free Radic Biol Med. 17(3):201-207, 1994
11. Lai, J.S., Kuo, Y.H., Lee, S.M. Constituents of the Whole Herb of *Clinoponium laxiflorum*. J chin chem soci. 47(1):241-246, 2000.