

돼지감자로부터 분리된 Sesquiterpene Lactone의 세포독성

최현규¹ · 강연복¹ · 유시용² · 나민균¹ · 이승호^{1*}

¹영남대학교 약학대학, ²한국화학연구원

Cytotoxicity of Sesquiterpene Lactones from Leaves of *Helianthus tuberosus* L.

Hyun Gyu Choi¹, Yanfu Jiang¹, Shi Yong Ryu², MinKyun Na¹ and Seung Ho Lee^{1*}

¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea,

²Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343, Korea

Abstract – The CH₂Cl₂ soluble part of the leaves of *Helianthus tuberosus* L. (Compositae) exhibited a potent cytotoxic activity against the cultured human tumor cell lines including A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 and HCT-15 *in vitro*. Bioassay-directed fractionation of the CH₂Cl₂ soluble part of this plant led to the isolation of four cytotoxic sesquiterpene lactones having α -methylene- γ -lactone ring in the molecule. On the basis of physical and spectral evidences, their structures were characterized as $\Delta^{4,15}$ -isotripliciolide tiglate (**1**), $\Delta^{4,15}$ -isotripliciolide methacrylate (**2**), budlein A isobutylate (**3**) and budlein A tiglate (**4**). The $\Delta^{4,15}$ -isotripliciolide tiglate (**1**) showed the most potent cytotoxic activity (0.26 μ M < ED₅₀ < 2.16 μ M) against all of the cell lines tested.

Key words – *Helianthus tuberosus*, Sesquiterpene, $\Delta^{4,15}$ -Isotripliciolide tiglate, Cytotoxicity, Tumor cell lines

국화과 (Compositae, 90 %)와 목련과 (Magnoliaceae, 10 %) 식물로부터 분리된 sesquiterpene lactone 화합물들이 세포독성을 나타내고 있으며, 그들중 일부는 p-388 leukemia와 같은 tumor system에서도 강한 세포독성을 나타내고 있다. Sesquiterpene lactone 계열의 화합물은 *trans*-farnesyl pyrophosphate(*t*-FPP)로부터 생합성되고 구조적으로는 탄소 골격에 따라서 germacranolide, guaianolide, pseudoguaianolide, eudesmanolide, elemanolide 등 크게 다섯 개의 group으로 분류할 수 있다.¹⁾

국내 자생식물로부터 항암작용을 나타내는 물질을 개발할 목적으로 약 200여 종의 국내 자생식물의 MeOH 추출물의 배양세포주에 대한 세포독성을 *in vitro*에서 측정하고 돼지감자의 (Compositae) 잎이 강한 세포독성을 나타내었다. 돼지감자는 우리나라의 각지에 자생하는 1년초로, 유럽에서는 Jerusalem Artichoke 또는 Canada Potato로 불리고 있다. HPLC 분석에 의하여 20여 종의 sesquiterpene이 확인되었으며,²⁾ 이 식물의 주성분인 heliangine은 식물성장 억제제로 알려져 있다.³⁾

현재까지 이 식물의 세포독성에 대한 연구가 이루어지지 않고 있으며, 국내 자생식물로부터 항암 활성을 갖는 물질을 탐색하는 연구의 일환으로 이 식물 잎의 methylene chloride (MC) 가용부에 대하여 활성물질의 분리를 하였다. 그 결과 *in vitro*에서 배양된 인간 세포주인 lungcarcinoma (A-549), adenocarcinoma (SK-OV-3), malignant melanoma (SK-MEL-2), central nerve system tumor (XF-498)과 colon adenocarcinoma (HCT-15)에 대하여 세포독성을 나타내는 4종의 sesquiterpene lactone 화합물을 분리하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 실험에 사용된 돼지감자의 잎은 충북대학교의 약초원에서 2010년 6월에 채취하여 충북대학교 황방연 교수에게 감정 받았으며 표본 (SH10-16)은 영남대학교 천연물화학 연구실에 보관하고 있다.

시약 및 기기 – Human tumor cell lines는 미국의 National Cancer Institute (NCI)로부터 분양 받았으며, 이 cell lines는 미국의 NCI에서 *in vitro*에서 항암작용을 screening하는 standard cell line로 사용하고 있다.

*교신저자(E-mail): seungho@yu.ac.kr
(Tel): +82-53-810-2818

Melting points는 Haake Buchler melting point apparatus (U.K)를 사용하였고 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO DIP 140 digital polarimeter로 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz) spectra는 Bruker AM-300 spectrometer로 측정하였고, tetramethylsilane (TMS)을 내부표준 물질로 하였으며 chemical shifts는 δ (ppm)로 하였다. EI-MS는 JMS DX-303 instrument로 측정하였다. UV는 UV-265 (Shimadzu)로 측정하였다. Column chromatography는 silicagel 60 (40~63 μ and or 63~200 μ , Merck), Lichroprep RP-18 (40~63 μ , Merck) 등을 사용하였다. HPLC는 Senshu Pak (ODS-3301-N, 8 mm \times 300 mm)를 사용하였으며, 용출액은 45% aqueous MeOH을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 precoated silicagel 60 F₂₅₄ plates, precoated RP-18 F₂₅₄ plates를 사용하여 실시하였다. 반점은 UV illumination과 10% sulfuric acid spray를 사용하여 확인하였다.

세포독성의 측정 - 모든 실험은 sulforhodamine (SRB)-smear method⁷⁾에 의한 미국의 NCI protocol에 따라서 수행하였다. Stock cell cultures의 관리와 자세한 실험 내용은 앞에 보고한 문헌⁸⁾과 같다. 사용된 실험물질은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹이고 medium 용액으로 희석하였으며, 최종 DMSO의 농도는 0.5%를 넘지 않도록 하였다.

활성물질의 분리 및 구조 결정 - 돼지감자의 MeOH 추출물은 용매분획을 실시하고, 활성분획인 methylene chloride (MC) 가용부에 대하여 각종 column chromatography를 실시하여 cultured human tumor cell lines에 대하여 세포독성을 나타내는 활성물질을 분리하였다. 돼지감자 (15 kg)의 신선한 잎을 잘게 썰어 상온에서 7일간 MeOH로 추출하였다. 추출액은 냉각 여과하고 진공상태에서 농축 건조하여 진한 녹색의 추출물 (292 g)을 얻었다. 이 추출물은 3 L의 증류수에 현탁시키고 동량의 MC로 색깔이 보이지 않을 때까지 반복하여 추출하고, 추출물을 농축 건조하여 MC 가용부로 하였다. MC 가용부는 silicagel column (15 cm \times 80 cm)에 loading하고 ethyl acetate, methylenechloride (1:9 to 1:0)로 용출시켜 TLC pattern에 따라서 4개의 분획물을 얻었다. 그 중에서 Fr. 2 (32 g)를 silicagel column (7 cm \times 50 cm)으로 ethyl acetate와 *n*-hexane (1:4 to 1:0)을 용매로 하여 용출시켜 6개의 분획을 얻었다. 그 중에서 Fr. 2-2 (4 g)을 80% MeOH을 용매로 하여 RP-18 column (5 cm \times 40 cm)으로 chromatography를 실시하여 3개의 분획을 얻었다. 여기서 얻은 Fr. 2-2-1 (0.8 g)을 반복해서 정제하여 active compound **1** (40 mg)을 얻고 또한 Fr. 2-2-2 (0.6 g)를 prep TLC (5% acetone in *n*-hexane)와 prep RP-18 (45% MeOH)에 의한 HPTLC를 실시하여 active compound **2** (18 mg)를 얻었다. Fr. 3 (28 g)은 silicagel column (7 cm \times 40 cm)에 ethyl acetate와 *n*-hexane (3:7 to 1:0)을 용매로 하여 chromatography를 실시하여 3개의 분획을 얻고 그 중에서 Fr. 3-1 (3.7 g)은

acetone과 methylene chloride (1:4 to 1:0)를 용매로 하여 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 분획을 얻었다. 그 중에서 Fr 3-1-3은 RP-18 (80% MeOH) column chromatography를 실시하고 silica gel의 prep TLC (5% acetone in benzene)를 실시하여 active compounds **3** (20 mg) **4** (9 mg)를 얻었다. 분리된 화합물의 구조는 각종 spectral data의 검토와 물리항수를 문헌치와 비교하여 각각 $\Delta^{4,15}$ -isotripliolide tiglate (**1**),⁴⁾ $\Delta^{4,15}$ -isotripliolide methacrylate (**2**),²⁾ budlein A isobutylate (**3**),⁵⁾ budlein A tiglate (**4**)⁶⁾이라 동정 하였다.

$\Delta^{4,15}$ -Isotripliolide tiglate (**1**) - $[\alpha]_D^{25} = +27.4^\circ$ (c = 0.8, CHCl₃); UV γ_{\max} (MeOH) 400, 268 nm; EI-MS *m/z*: 358 [M]⁺, 314[M-CO₂]⁺; $^1\text{H-NMR}$ (pyridine-*d*₅): δ 1.47 (3H, s, H-14), 1.57 (3H, dd, *J* = 1.0, 7.0 Hz, H-20), 1.69 (3H, t, *J* = 1.9 Hz, H-19), 2.52 (1H, dd, *J* = 2.5, 15.0 Hz, H-9), 2.78 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.0 Hz, H-9), 2.95 (1H, d, *J* = 14.5 Hz, H-5), 3.16 (1H, m, H-5), 3.84 (1H, dd, *J* = 2.0, 5.5 Hz, H-7), 4.51 (1H, dd, *J* = 5.5, 9.5 Hz, H-6), 5.37 (1H, m, H-8), 5.53 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-15), 5.75 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-15), 5.91 (1H, d, *J* = 3.0Hz, H-13), 6.10 (1H, s, H-2), 6.46 (1H, d, *J* = 3.0Hz, H-13), 6.85 (1H, ddd, *J* = 1.0, 7.0, 14.0 Hz, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine-*d*₅): δ 11.8 (C-20), 14.2 (C-19), 22.2 (C-14), 41.7 (C-5), 43.4 (C-9), 51.3 (C-7), 75.5 (C-8), 78.0 (C-6), 86.7 (C-10), 104.2 (C-2), 121.4 (C-13), 121.8 (C-18), 121.9 (C-15), 136.7 (C-4), 139.2 (C-17), 140.9 (C-11), 166.7 (C-16), 168.4 (C-12), 184.8 (C-3), 205.1 (C-1).

$\Delta^{4,15}$ -Isotripliolide methacrylate (**2**) - UV γ_{\max} (MeOH) 215, 266 nm; EI-MS *m/z*: 344 [M]⁺; $^1\text{H-NMR}$ (pyridine-*d*₅): δ 1.41 (3H, s, H-19), 1.78 (3H, t, *J* = 1.0 Hz, H-14), 2.43 (1H, m, H-9), 2.74 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.0 Hz, H-9), 2.95 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.0, H-5), 3.16 (1H, m, H-5), 3.79 (1H, m, H-7), 4.54 (1H, m, H-6), 5.36 (1H, m, H-8), 5.48, 5.68 (each 1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-15), 5.80, 6.42 (each 1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-13), 5.58, 5.92 (each 1H, br s, H-18), 6.00 (1H, s, H-2); $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine-*d*₅): δ 18.2 (C-18), 22.2 (C-14), 42.0 (C-5), 43.4 (C-9), 52.4 (C-7), 73.1 (C-8), 74.3 (C-6), 86.7 (C-10), 73.1 (C-8), 104.9 (C-2), 120.3 (C-15), 122.6 (C-13), 127.1 (C-17), 136.2 (C-4), 139.4 (C-19), 140.1 (C-11), 165.8 (C-16), 184.3 (C-3), 205.1 (C-1).

Budlein A isobutylate (**3**) - $^1\text{H-NMR}$ (pyridine-*d*₅): δ 1.08 (6H in total, m, H-18, 19), 1.40 (3H, s, H-14), 2.36 (1H, dd, *J* = 3.0, 15.0 Hz, H-9), 2.43 (1H, m, H-17), 2.61 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.0 Hz, H-9), 3.89 (1H, m, H-7), 4.64 (2H, br s, H-15), 5.43 (1H, m, H-6), 5.63 (1H, m,

H-8), 5.80 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-13), 5.96 (1H, s, H-2), 6.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-13), 6.46 (1H, m, H-5).

Budlein A tiglate (4) – $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5): δ 1.41 (3H, s, H-14), 1.55 (3H, dd, $J = 1.0$ Hz, 7.0 Hz, H-20), 1.72 (3H, t, $J = 1.0$ Hz, H-19), 2.42 (1H, dd, $J = 3.0$, 15.0 Hz, H-9), 2.62 (1H, dd, $J = 5.0$, 15.0 Hz, H-9), 3.87 (1H, dd, $J = 2.5$, 4.5 Hz, H-7), 4.64 (2H in total, m, H-15), 5.37 (1H, m, H-6), 5.55 (1H in total, m, H-8), 5.79 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-13), 5.96 (1H, s, H-2), 6.42 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-13), 6.47 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-5), 6.91 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H-18), 7.28 (1H, t, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5): δ 11.9 (C-19), 14.3 (C-20), 21.3 (C-14), 42.7 (C-9), 48.6 (C-7), 62.1 (C-15), 75.7 (C-6), 76.1 (C-8), 88.1 (C-10), 105.4 (C-2), 122.7 (C-13), 128.0 (C-18), 133.2 (C-5), 137.9 (C-17), 140.5 (C-4), 166.7 (C-16), 169.2 (C-12), 183.7 (C-3), 206.5 (C-1).

결과 및 고찰

돼지감자의 신선한 잎의 MeOH 추출물을 MC로 분획하여 얻은 분획물로부터 활성지향적 column chromatography를 실시하여 4개의 활성물질을 얻었다. 이 화합물은 각종 spectral data의 검토에 의하여 각각 $\Delta^{4,15}$ -isotripliciolide tiglate (**1**), $\Delta^{4,15}$ -isotripliciolide methacrylate (**2**), budlein A isobutylate (**3**), budlein A tiglate (**4**)로 결정하였다(Fig. 1). 분리된 4개의 화합물은 모두 분자 안에 α -methylene- γ -lactone ring을 갖는 germacranolide sesquiterpene lactones 구조를 하고 있다. 또한 분리된 화합물들은 A-549, SK-OV-3, SK-NEL-2, XF-498, HCT15와 같은 5종의 배양된 인간 tumor cell lines에 대하여 *in vitro*에서 대조물질인 antimycin보다 강하거나 같은 정도의 세포독성을 나타내었다(Table I). 분리된 4종의 화합물 중에서 compound **1**이 가장 강한 세포독성 ($0.26 \mu\text{M} < \text{ED}_{50} < 2.16 \mu\text{M}$)을 나타내었고, compounds **2**, **3**, **4**는 서로 비슷한 세포독성을 나타내었다. 구조적으로 compounds **1**, **2**는 germacranolide 골격의 C-4 위치에 *exo*-

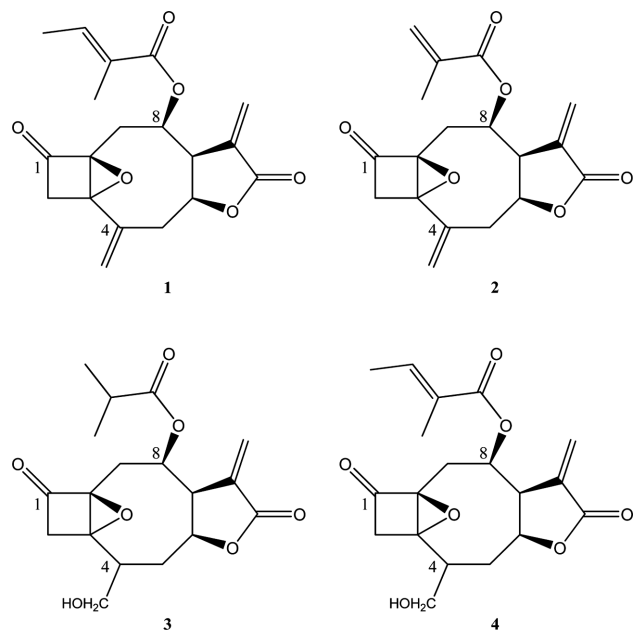


Fig. 1. Structure of compounds isolated from the fresh leaves of *H. tuberosus*.

methylene group을 가지고 있고, compounds **3**, **4**는 C-4, 5 위치에 double bond를 가지고 있다. 또한 compounds **1**, **4**는 C-8 위치에 tigloyl group을 side chain으로 갖고 있다. Germacranolide sesquiterpene의 C-4 위치의 *exo*-methylene group과 sesquiterpene 분자내의 α -methylene- γ -lactone group은 cytotoxicity와 관련이 있다. α -methylene- γ -lactone group을 가지고 있는 많은 sesquiterpene류들이 Walker-256 carcinosarcoma와 Ehlich ascites tumor growth에 대하여 강력한 inhibitor로 작용하고 있고, p-388 lymphocytic leukemia, Lewis lung tumor growth에 대한 marginal inhibitor라는 것은 잘 알려져 있다. 또한 이러한 sesquiterpene lactones와 그 유도체들에 대한 세포독성을 비교했을 때 electrophilic α -methylene- γ -lactone group은 세포독성을 나타내는데 반드시 필요하다라는 사실은 이미 알려진 사실이다.⁹⁾

Elephantopin, vernolepin과 같은 천연 sesquiterpene lactone

Table I. Cytotoxic effect of some sesquiterpene lactones isolated from the fresh leaves of *H. tuberosus* against cultured human tumor cell lines *in vitro*

Compounds	*ED ₅₀ (μM)				
	A-549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT-15
1	1.47	2.16	0.57	0.72	0.26
2	4.21	1.20	0.90	3.01	5.42
3	3.46	>10	0.53	4.34	0.91
4	6.62	3.93	0.63	4.21	0.77
Antimycin	0.87	>10	0.49	0.71	0.74

*ED₅₀ value was defined as a concentration (μM) that caused 50% inhibition of cell growth *in vitro*

류는 tumor cell lines에 대하여 *in vitro*¹⁰⁾와 *in vivo*¹¹⁾에서 cytostatic 효과와 cytotoxicity를 나타내고 있다. 이런 sesquiterpenes의 세포독성은 분자내의 α -methylene- γ -lactone group과 세포의 essential -SH group과의 반응에 의한다는 것은 잘 알려진 사실이다. 그러나 많은 sesquiterpene lactone의 상당수가 *in vitro*에서 세포독성과 antileukemic effect를 나타낸다고 알려져 있지만, α -methylene- γ -lactone group과 같은 active site 만으로 그런 작용을 충분히 설명할 수는 없다.¹⁾

결 론

본 연구를 통하여 돼지감자의 앞으로부터 세포독성 물질로 4종의 sesquiterpene lactons를 분리하였으며, 그 구조는 $\Delta^{4,15}$ -isotripliolide tiglate, $\Delta^{4,15}$ -isotripliolide methacrylate, budlein A isobutylate 및 budlein A tiglate로 확인 하였다. 분리된 물질 중에서 $\Delta^{4,15}$ -isotripliolide tiglate가 실험에 사용된 5개의 세포주에 대하여 $0.26 \mu\text{M} < \text{ED}_{50} < 2.16 \mu\text{M}$ 로 가장 강한 세포독성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 이제까지 알려진 바와 같이 분자내의 α -methylene- γ -lactone group이 세포독성과 밀접한 관계가 있다는 것을 확인 시켜주고 있다. 본 논문에서 얻어진 결과는 향후 천연물로부터 세포독성물질을 개발하고자 하는 연구에 기초자료로 이용될 수 있다.

인용문헌

1. Oriental Healing Arts Institute (1985) Structure activity relationship analysis of chinese anticancer drugs and related plants, 10. Keats publing, Taiwan, R.O.C.

2. Spring, O. (1991) Sesquiterpene lactones from *Helianthus tuberosus*. *Phytochemistry* **2**: 519-522.
3. Morimoto, H., Sanno, Y. and Oshio, H. (1966) The X-ray analysis of dihydroheliangine monochloroacetate. *Tetrahedron* **22**: 3173-3179.
4. Gershenzon, J. and Mabry, T. J. (1984) Furanoheliangolides from *Helianthus schweinitzii*. *Phytochemistry* **23**: 2557-2559.
5. Delgado, G., Vivar, A. R. and Herz, W. (1982) Sesquiterpene lactones from *Viguiera* species. *Phytochemistry* **21**: 1305-1308.
6. Herz, W. and Kuma, N. (1980) Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *C. urticifolia*. *Phytochemistry* **19**: 593-597.
7. Skehan, P., Streng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
8. Ryu, S. Y., Choi, S. U., Lee, C. O. and Zee, O. P. (1992) Anti-tumor activity of *Psoralea corylifolia*, *Arch. Pharm. Res.* **4**: 356-359.
9. Doskotch, R. W., Hufford, C. D. and Ei-Ferale, F. S. (1972) Further studies on the sesquiterpene lactones Tulipinolide and Eptulipinolide from *Liriodendron tulipifera*. *J. Org. Chem.* **37**: 2740-2744.
10. Kupchan, S. M., Eakin, M. A. and Thomas, A. M. (1971) Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* **12**: 1147-1152.
11. Woerdenberg, H., Edwards, A., Bude, E. J., Malingre, T. M. and Konings, A. W. T. (1987) Eupatoriopicrin-induced lipid peroxidation in liver and tumor tissue of the mouse. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 3115-3118.

(2011. 12. 12 접수; 2012. 3. 2 심사; 2012. 3. 6 게재확정)