

호장으로부터 분리한 스틸벤류의 Nitric Oxide 저해활성

주시몽 · 홍윤정 · 양기숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received November 12, 2013; Revised February 12, 2014; Accepted February 17, 2014)

Inhibition of Nitric Oxide Production by Stilbenes from *Polygonum cuspidatum*

Si Mong Joo, Yun Jung Hong and Ki Sook Yang[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — *Polygonum cuspidatum* which is widely distributed in Korea has been used as treatments of dermatitis, gonorrhoea, favus athlete's foot, hyperlipidemia and inflammation in traditional medicine. We examined anti-oxidant and anti-inflammatory activity by measuring DPPH radical scavenging activity and the inhibition of IFN- γ and LPS-induced NO production in RAW 264.7 murine macrophage cells. We isolated and characterized resveratrol (1), *trans*-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside (2). Compounds 1 and 2 showed potent activities compared with L-NMMA (N^G -monomethyl-L-arginine). These results suggested that the stilbene compounds isolated from *Polygonum cuspidatum* might be used as anti-inflammatory agents.

Keywords □ *Polygonum cuspidatum*, resveratrol, *trans*-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside, anti-inflammatory agents

호장(*Polygonum cuspidatum* Sied. et Zucc.)은 동아시아 지역에서 완하, 이뇨, 통경 및 화농성 피부염, 요도염, 방광염 등의 치료에 사용되어 왔다.¹⁾ 성분에 관한 연구로는 Yang 등²⁾이 resveratrol과 anthraglycoside를 분리하였고, Zhao 등³⁾이 emodin, resveratrol, polydatin을, Matsuda 등⁴⁾이 emodin을 분리하고, 이러한 hydroxyanthraquinone의 estrogenic 효과를 보고하였다. Xiao 등⁵⁾은 호장근에서 stilbene glycoside sulfate 등을 분리 보고하였다. 생리활성으로는 항균작용,⁶⁾ in vitro에서의 세균과 진균의 발육억제작용,⁷⁾ kinase inhibitor로서의 활성,⁸⁾ NF- κ B 활성억제작용,⁹⁾ 중앙 신생억제효과,^{10,11)} 지질과산화 억제작용,^{12,13)} 항염 및 항산화효과 등¹⁴⁻¹⁷⁾이 보고된 바 있다. 본 연구에서는 호장의 생리활성을 규명하기 위하여 스틸벤류 화합물 2종을 분리하고 resveratrol과 그 배당체 성분에 대하여 DPPH법을 이용한 항산화작용과 RAW 264.7 murine macrophage cell을 이용한 염증 매개인자인 Nitric Oxide(NO) 생성에 미치는 영향을 평가하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에서 사용한 호장은 숙명여자대학교 약초원에서 채취하여 뿌리를 사용하였다. 확증표본(SM05-1)은 본 대학 생약표본실에 보관하였다.

추출 및 분리

메탄올 추출물로부터 스틸벤류 화합물의 단리 - 뿌리를 음건, 세절 후 2 kg을 취하여 환류 냉각하면서 MeOH로 가온 추출하여 여과하였다. 추출액을 감압농축 후 물에 현탁하여 여과 후 이온수지 MCI-gel CHP-20P chromatography(gradient, H₂O → MeOH)를 실시하였다. 용매는 물에서부터 메탄올을 10%씩 올려 100%까지 농도를 증가시켰으며 TLC를 실시하여 6개의 subfraction(Fr. 1-6)으로 나누었다. Fr. 3을 sephadex LH-20 chromatography(gradient, H₂O → MeOH) 및 low pressure chromatography(gradient, H₂O → MeOH)를 반복 실시하여 화합물 1(92 mg), 화합물 2(2.9 g)를 분리하였다.

화합물 1의 단리

Light brown amorphous powder - Positive FAB MS: m/z 229[M+H]⁺, ¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆ +D₂O): δ 7.39

[#]Corresponding Author

Ki Sook Yang

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Tel.: 02-710-9578 Fax.: 02-715-9498

E-mail: ksyang@sookmyung.ac.kr

(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.93(1H, d, $J=16.3$ Hz, H-8), 6.81 (1H, d, $J=16.3$ Hz, H-7), 6.75(2H, d, $J=8.56$ Hz, H-3', 5'), 6.39(2H, d, $J=2.0$ Hz, H-2, 6), 6.11(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-4), $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): 128.3(C-1), 104.7(C-2), 158.8 (C-3), 102.0(C-4), 158.8(C-5), 104.7(C-6), 126.0(C-7), 128.5 (C-8), 139.7(C-1'), 128.2(C-2'), 115.9(C-3'), 157.5(C-4'), 115.9 (C-5'), 128.2(C-6').

화합물 2의 단리

White brown amorphous powder – Positive FAB MS: m/z 391[M+H] $^+$, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6 + D_2O): δ 7.39 2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2', 6'), 7.02(1H, d, $J=16.3$ Hz, H-8), 6.86 (1H, d, $J=16.3$ Hz, H-7), 6.75(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.72 (1H, br s, H-2), 6.57(1H, br s, H-6), 6.33(1H, br s, H-4), 4.80(1H, d, $J=7.7$ Hz, anomeric H), $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): 129.7(C-1), 108.7(C-2), 160.5(C-3), 104.4(C-4), 159.9(C-5), 106.5(C-6), 126.9(C-7), 130.3(C-8), 141.1(C-1'), 129.7(C-2'), 117.2(C-3'), 158.9(C-4'), 117.2(C-5'), 129.7(C-6'), 102.2(C-1''), 74.8(C-2''), 78.7(C-3''), 71.4(C-4''), 78.2(C-5''), 62.3(C-6'').

DPPH를 이용한 항산화능 측정 – Hatano의 방법¹⁸⁾에 의하여 시료를 각 농도별로 조제한 용액 0.1 ml(control: 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액 1.9 ml을 가하였다. 각 시료를 농도별로 조제하여 시험관 진탕기로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 반응시키고 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 ascorbic acid를 이용하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 IC₅₀(DPPH radical 형성을 50%로 억제하는 데 필요한 농도)로 나타내었다.

RAW 264.7 세포에서의 NO생성 저해 작용 측정

세포주의 배양 – Mouse macrophage RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 동결상태로 구입하였으며 실험실에서 재빨리 녹여 10% FBS(fetal bovine serum), penicillin G(100 IU/ml), streptomycin(100 µg/ml)을 포함한 RPMI 1640 배지를 이용, 온도 37°C와 5%의 CO₂를 유지하면서 배양기에서 배양하였다.

MTT 시험법을 이용한 세포 독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 화합물 1, 2의 세포독성 및 실험시 처리농도를 결정하기 위해 MTT 시험법을 사용하였다. 세포를 m^2 당 1.5×10^5 개로 희석하여 24시간 배양하고, IFN- γ (200 IU/ml) 10 µl와 LPS(40 µg/ml) 10 µl 및 (+) control을 포함한 각각의 시료 20 µl씩 넣고 20시간 배양시킨 후, MTT 용액(0.5 mg/ml)을 함유한 새로운 배지로 교환하고 4시간 더 배양하였다. 생성된 MTT-formazan은 DMSO에 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측

정하였다.

IFN- γ 및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 저해 작용의 측정

RAW 264.7 세포를 RPMI 1640 medium(10% fetal bovine serum, 5% antibiotics)으로 충분한 세포 수가 될 만큼 배양시킨 다음 세포를 m^2 당 1.5×10^5 개로 희석하여 96 well에 160 µl씩 넣고 약 20시간 배양해서 cell이 부착되도록 한 다음 LPS(40 µg/ml) 10 µl 및 costimulator로서 IFN- γ (200 IU/ml) 10 µl와 (+) control을 포함한 각각의 시료 20 µl씩 넣고 20시간 배양시킨 후 배양액에 생성되어 있는 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 정량하였다. Griess reagent(1% sulfanilamine, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄)는 NO를 산화시켜 NO₂로 변화시키며 생성된 NO₂는 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

자료의 통계적 처리

실험결과에서 얻은 모든 값은 평균±표준편차로 나타내었다. 통계적 유의적 차이의 정도는 Student's t-test를 사용하여 $p < 0.01$, $p < 0.001$ 인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

실험결과 및 고찰

분리한 안트라퀴논류 화합물의 구조결정

화합물 1의 구조결정 – 화합물 1은 옅은 갈색 분말로 TLC에서 FeCl₃ 분무에 의해서 양성이고, 10% H₂SO₄(EtOH)을 분무하고 가열시 옅은 적자색으로 발색하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 δ 6.86, δ 7.02에서 large coupling constant를 가진 *trans* olefinic proton system을 확인할 수 있었고, 수소가 *trans* 형태로 되어 있음을 확인할 수 있었다. δ 7.39, δ 6.75에서 1, 4 disubstituted aromatic ring의 A₂B₂ 시스템을 확인할 수 있었고, δ 6.11, δ 6.39에서 1, 3, 5 치환 aromatic ring의 proton 관계에서 stilbene 화합물인 resveratrol로 추정되었으며, 문헌^{19,20)}과 비교하여 일치함을 확인하여 resveratrol로 동정하였다.

화합물 2의 구조결정 – 화합물 2는 매우 옅은 갈색 분말로 TLC에서 FeCl₃ 분무에 의해서 양성이고, 10% H₂SO₄(EtOH)을 분무하고 가열시 옅은 적자색으로 발색하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 δ 6.86, δ 7.02에서 large coupling constant를 가진 *trans* olefinic proton system을 확인할 수 있었으며, δ 7.39, δ 6.75에서 1, 4 disubstituted aromatic ring의 A₂B₂ 시스템을 확인할 수 있었고, δ 6.33, δ 6.57, δ 6.72에서 1, 3, 5 치환 aromatic ring의 proton 관계를 확인할 수 있었다. 또한 δ 4.80 signal은 에 결합한 methly signal 수소가 singlet으로 나타나고 있으며, 4개의 방향족 수소 중 H-4, H-2의 protonanomeric proton 으로서 1 몰의 당이 β 결

합하고 있음을 보여주고 있다. ^{13}C -NMR에서도 δ 102.2, 78.7, 78.2, 74.8, 71.4, 62.3 ppm의 signal로부터 glucose임을 확인 할 수 있었다. 한편, HMBC correlation을 조사하여 anomeric proton 과 C-3 사이의 correlation을 확인하였고, 5는 resveratrol의 3번 OH 위치에 glucose가 결합한 것을 알 수 있었다. 최종적으로 문헌^{19,20}과 비교하여 일치함을 확인하여 이 화합물을 *trans*-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside로 확인, 동정하였다.

DPPH를 이용한 항산화능 측정

분리된 스틸벤류화합물의 DPPH를 이용한 항산화능을 측정할 결과 화합물 1인 resveratrol은 IC_{50} 90.4 μM 로 나타났으며, 그 배당체 형태인 화합물 2는 IC_{50} 103.8 μM 로 측정되었다. 양성 대조약물인 ascorbic acid는 IC_{50} 36.4 μM 로 측정되었다(Table I).

MTT 시험법에 의한 세포 독성

분리된 스틸벤류화합물 1, 2의 RAW 264.7 cell에 대한 세포 독성을 MTT 분석법으로 측정한 결과 화합물 1, 2 모두 25~200 μM 의 농도에서 모두 80% 이상의 생존율을 나타내어 정상 세포에는 독성이 나타나지 않음을 알 수 있었다(Fig. 1).

NO 생성 저해 활성

분리된 스틸벤류에 대해 IFN- γ 와 LPS로 활성화한 대식세포주

Table I – Antioxidative activities of compounds 1 and 2

Compounds	IC_{50} (μM)
Compound 1	90.4
Compound 2	103.8
Ascorbic acid	36.4

Compound 1: resveratrol.

Compound 2: resveratrol 3-O- β -D glucopyranoside.

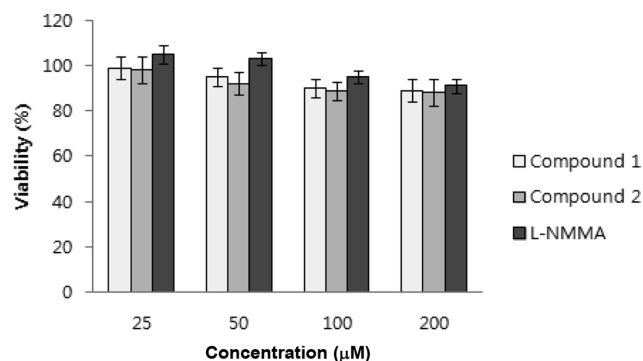


Fig. 1 – Effect of compounds 1 and 2 on the viability of RAW 264.7 cells with IFN- γ and LPS. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance. Compound 1: resveratrol. Compound 2: resveratrol 3-O- β -D glucopyranoside. L-NMMA: N^{G} -monomethyl-L-arginine.

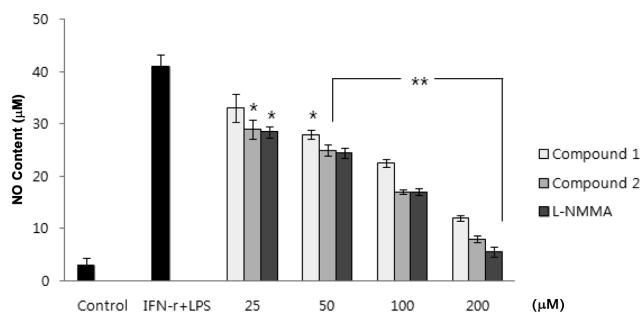


Fig. 2 – Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by compounds 1 and 2. Macrophage cells were treated with IFN- γ and LPS and cotreated with L-NMMA and each compounds (25–200 μM) for 20 hrs. NO released into the cell culture medium was measured in the nitrite form by the Griess reagent. Each bar shows the mean \pm S.D. of three experiments. * Indicates a significant difference from control, * p < 0.01, ** p < 0.001. Compound 1: resveratrol. Compound 2: resveratrol 3-O- β -D glucopyranoside. L-NMMA: N^{G} -monomethyl-L-arginine.

Table II – NO production inhibitory activity of compounds 1 and 2

Compounds	IC_{50} (μM)
Compound 1	109.2
Compound 2	73.3
L-NMMA	70.9

RAW 264.7 cells were treated with IFN- γ and LPS with various concentrations of compounds for 20 hrs, and the amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent. Compound 1: resveratrol. Compound 2: resveratrol 3-O- β -D glucopyranoside. L-NMMA: N^{G} -monomethyl-L-arginine.

인 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성 저해 작용을 관찰한 결과 분리된 화합물 모두 농도의존적으로 NO 생성을 저해하였으며(Fig. 2), 화합물 1인 resveratrol은 IC_{50} 109.2 μM 로 나타났고, 화합물 1의 3번 위치에 당이 결합된 화합물 2인 *trans*-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside의 NO생성 저해활성은 IC_{50} 73.3 μM 로 나타나, 유리형보다 우수한 활성을 나타냈으며 양성대조 약물인 L-NMMA²¹의 IC_{50} 70.9 μM 과 비슷한 NO 생성저해 작용을 나타내었다(Table II).

결론

호장의 뿌리를 MeOH로 추출한 후 물에 현탁시켜 여과한 수용성 분획에서 각종 chromatography를 이용하여 phenol계 화합물 2종을 분리, 정제하였으며 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 그리고 각종 기기분석 결과와 문헌을 통해서 스틸벤류인 resveratrol(1), *trans*-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside(2)임을 확인하였다. 이 화합물들의 항산화 활성을 확인하고자 DPPH를 이용한 유리기소거작용을 측정할 결과 배당체 보다는 유리형에서 더 강한 항산화 활성을 나타내었다. 화합물들의 RAW 264.7 cell에 대한 세

포독성을 평가하기 위한 MTT 분석 결과 처리 농도에서 독성을 나타내지 않는 것을 확인 하였다. IFN- γ 및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 억제 활성 측정결과 화합물 모두 농도 의존적으로 효과가 있었으며, 이는 호장의 물 추출물이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 cell에서 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 결과와 일치하였고,²²⁾ 그 활성성분이 수용성 분획에서 분리한 resveratrol 및 그 배당체임을 알 수 있었다. 특히, 배당체인 화합물 2가 유리형보다 우수한 활성을 보였으며, 양성대조군인 L-NMMA와 비슷한 활성을 나타내었다.

호장에서 추출한 스틸벤류 화합물들의 생리활성을 검색한 결과 in vitro에서 강한 항산화활성을 나타내지는 못하였으나, IFN- γ 및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 억제 활성에서는 우수한 효과를 보여주어 염증에 대하여 강한 억제 활성이 있음을 확인하였다.

참고문헌

- 1) 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울 p. 303 (1980).
- 2) Yang, F., Zhang, T. and Ito, Y. : Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A* **919**, 443 (2001).
- 3) Zhao, R. Z., Liu, S. and Zhou, L. I. : Rapid quantitative HPTLC analysis, on one plate, of emodin, resveratrol, and polydatin in the Chinese herb *Polygonum cuspidatum*. *Chromatographia* **61**, 311 (2005).
- 4) Matsuda, H., Shimoda, H., Morikawa, T. and Yoshikawa, M. : Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorgan. Medicin. Chem. Lett.* **11**, 1839 (2001).
- 5) Xiao, K., Xuan, L., Xu, Y. and Bai, D. : Stilbene glycoside sulfates from *Polygonum cuspidatum*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1373 (2000).
- 6) Liu, X., Wu, L., Song, G., Liu, K., Zhang, X. and Zhang, Y. : Study on the chemical constituents of *Polygonum cuspidatum* Sieb. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao.* **16**, 17 (1999).
- 7) Agarwal, S. K., Singh, S. S., Verma, S. and Kumar, S. : Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 43 (2000).
- 8) Jayatilake, G. S., Jayasuriya, H., Lee, E. S., Koonchanok, N. M., Geahien, R. L., Ashendel, C. L., McLaughlin, J. L. and Chang, C. J. : Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. *J. Natur. Produc.* **56**, 1805 (1993).
- 9) Manna, S. K., Mukhopadhyay, A. and Aggarwal, B. B. : Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of Immunology.* **164**, 6509 (2000).
- 10) Kimura, Y. and Okuda, H. : Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in lewis lung carcinoma-bearing mice. *J. Nutr.* **131**, 1844 (2001).
- 11) Wang, S., Zheng, Z., Weng, Y., Yu, Y., Zhang, D., Fan, D. R. and Hu, Z. : Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herb extracts. *Life Scien.* **74**, 2467 (2004).
- 12) 김지연, 양기숙 : 호장근의 사염화탄소로 유도된 지질과산화 저해 활성. *약학회지* **43**, 572 (1999).
- 13) 주시몽, 이민원, 양기숙 : 호장으로부터 분리한 안트라퀴논 및 스틸벤 화합물의 지질과산화 저해활성. *약학회지* **51**, 140 (2007).
- 14) Meng, J. and Hang, H. : Study on the antioxidative activity and stability of *Polygonum cuspidatum* extract. *Huaxue Shijie* **41**, 418 (2000).
- 15) 주시몽, 양기숙 : 호장으로부터 분리한 안트라퀴논류의 Nitric Oxide 저해활성. *약학회지* **54**, 387 (2010).
- 16) Ghanim, H., Sia, C. L., Abuaysheh, S., Korzeniewski, K., Patnaik, P., Marumganti, A., Chaudhuri, A. and Dandona, P. : An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **95**, 1 (2010).
- 17) Zhu, W., Tao, J. P., Xin, P., Liu, M. Y., Li, J. B. and Wei, M. : Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **438**, 270 (2013).
- 18) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatus, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshita, T. and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
- 19) Vastano, B. C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C. T., Zhou, Z. and Rosen, R. T. : Isolation and Identification of Stilbenes in Two Varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 253 (2000).
- 20) Pierre, W., Alain, T., Joseph, D., Gerard, D. and Jean, M. : Trans-resveratrol-3-O- β -glucoside (PICEID) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* **42**, 1591 (1996).
- 21) Jain, R., Mukherjee, K. and Mohan, D. : Effects of nitric oxide synthase inhibitors in attenuating nicotine withdrawal in rats. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* **88**, 473 (2008).
- 22) Kim, K. W., Ha, K. T., Park, C. S., Jin, U. H., Chang, H. W., Lee, I. S. and Kim, C. H. : *Polygonum cuspidatum*, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. *Vascular Pharmacol.* **47**, 99 (2007).