

LPS로 유도한 대식세포에서 Nitric Oxide 생성을 저해하는 쉽사리 성분의 분리

박희준*

상지대학교 제약공학과, 교수

Isolation of the Constituent Inhibiting Nitric Oxide formation from *Lycopus lucidus* in LPS-induced Macrophage Cells

Hee-Juhn Park*

Professor, Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Abstract - This research was performed to identify the anti-inflammatory constituent from the herb of *Lycorus lucidus* (Lamiaceae). The MeOH extract of this plant material and its two fractions, the lipophilic- (CHCl₃ fraction) and the hydrophilic fraction (BuOH fraction), were prepared to test anti-inflammatory activity. For this purpose, the inhibition rate on inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity was assessed by determining nitric oxide (NO) formation in lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage 264.7 cells. The CHCl₃ fraction that greatly inhibited nitric NO formation was chromatographed to lead the isolation of ursolic acid. Since ursolic acid inhibited NO formation dose dependently in this study, this compound was considered as one of the active constituent responsible for anti-inflammation. However, the activity of rosmarinic acid isolated from the BuOH fraction was weak.

Key words - Anti-inflammatory, iNOS, Lamiaceae, *Lycorus lucidus*, Nitric oxide, Ursolic acid

서 언

NO는 염증의 발생에서 중요한 역할을 하는 신호전달을 위한 분자이다. NO는 생리적 조건에서 항염효과를 나타내지만, 이의 과도한 생산은 염증유발 매개체로 작용할 수 있다. NO는 대식세포에서 nitric oxide synthase의 작용에 의해 생산되어 혈관내피세포로 들어가서 혈관확장을 일으킬 뿐 아니라 cytokine으로 활성화된 대식세포의 면역반응을 일으킨다. 이러한 과정에 따라 관절, 장관, 폐 등에서 염증반응을 나타내게 된다(Sharma *et al.*, 2007). 그러므로 연구자들은 항염물질을 탐색하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS)로 유도한 대식세포의 NO 생산억제효과를 측정하고자 하였다.

쉽사리(*Lycopus lucidus*)는 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 초본식물로서 한국에 널리 분포하는 식물이다(Kim *et al.*, 2017).

이 식물은 어혈, 월경장애, 염증질환 등에 한방에서 사용되고 있다(Shin *et al.*, 2005). 이 식물의 뿌리로부터 caffeic acid oligomer, flavonoid, phenylethanoid glycoside에 속하는 성분이 알려져 있다(Murata *et al.*, 2010). 이 생약의 약리작용으로 항염러지작용(Shin *et al.*, 2005), 항산화작용(Slusarczyk *et al.*, 2009), hyaluronidase (Murata *et al.*, 2010)의 작용이 보고된 바 있다. 그러나 쉽사리의 염증을 억제하는 화합물의 규명은 이루어지지 않았으므로, 그것을 밝히기 위하여 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 쉽사리 전초로부터 MeOH 추출물과 그 분획물을 제조한 후 이들이 LPS로 유도한 대식세포에서 NO 생산 저해 효과가 있는지 측정하였다. 그리고 유효한 분획으로부터 주된 화합물을 분리하여 NO 저해효과를 일으키는 화합물을 찾고자 하였다. 분리된 화합물인 ursolic acid와 rosmarinic acid의 화학구조는 Fig. 1에 나타내었다.

*교신저자 : E-mail hjpark@sangji.ac.kr

Tel. +82-33-730-0564

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

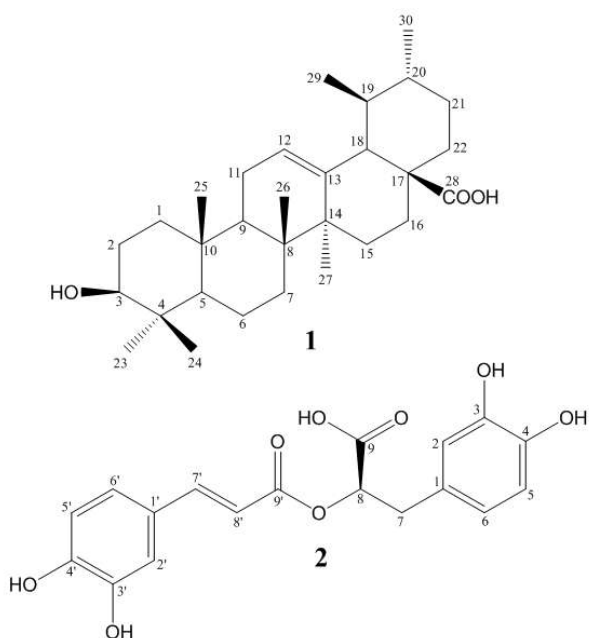


Fig. 1. Structure of compounds 1 (ursolic acid) and 2 (rosmarinic acid) isolated from *L. lucidus*.

재료 및 방법

기기 및 시약

IR spectrum은 JASCO 4200 FT-IR spectrometer를 사용하여 KBr disk 법으로 측정하였다. ¹H 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker AM-600 spectrometer에서 tetramethylsilane (TMS)를 내부표준물질로 하여 측정하였다. 분리를 위해 사용한 silica gel column은 일본 Yamazen사의 제품(particle size, 30 μm)을 사용하였다. 그리고, diaion HP-20 column의 정지상은 Mitsubishi Chemical사의 제품을 사용하였다. 생리활성 실험을 위해 사용한 caffeic acid는 Sigma사 제품을 사용하였고, salvianolic acid는 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)에서 분리한 화합물을 사용하였다.

식물재료

강원도 고성군에서 9월경 채취한 십싸리 전초를 채집하여 말린 후 세절하여 식물재료로 사용하였다. 이 식물은 상지대학교 송병민 교수의 감정으로 십싸리(*Lycopus lucidus*, Lamiaceae)로 동정되었다. 이 식물의 표본(natchem#78)은 현재 상지대학교 제약공학과 천연물화학 실험실에 보관 중이다.

십싸리 추출물 제조 및 분획

십싸리 전초를 건조하여 세절한 식물재료 960 g을 라운드 플라스크에 메탄올 10L로 환류 하에 5시간 추출하였다. 이를 3회 반복하여 추출액을 얻어서 여과한 후 진공농축기를 이용하여 농축하여 MeOH 추출물 189.6 g을 얻었다. 이 메탄올 추출물(180 g)을 증류수 2.0 L에 현탁시키고 CHCl₃ 1.8 L로 분배추출하였다. 이와 같은 과정을 3회 반복한 후 CHCl₃ 가용부를 농축하여 CHCl₃ 분획물 38.5 g을 얻었다. 남은 H₂O 층으로부터 BuOH 분획을 제조하기 위하여 BuOH 1.5 L를 가하여 BuOH 가용부를 얻었다. 이와 같은 조작을 3회 반복하여 얻은 BuOH 가용부를 농축하여 BuOH 분획물(28.3 g)을 얻었다.

CHCl₃ 분획물로부터 ursolic acid의 분리

CHCl₃ 분획물(10.0 g)로부터 화합물을 분리하기 위하여 silica gel column (φ5.2 × 23.0 cm, 200 g)에서 전개용매 CHCl₃-MeOH-H₂O (8:1.2:1, 하층) 용액으로 전개하였다. 용리액은 50 mL씩 수집하여 550 - 859 mL의 retention volume에 해당하는 소분획들을 합쳐서 농축한 후 MeOH에서 침전한 화합물 1을 얻었다.

화합물 1 (Ursolic acid)

White powder, Mp 282-283, IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3400 (OH), 1690 (COOH), ¹H-NMR (600 MHz, pyridine-d₅): 0.90 (3H, s, CH₃), 0.96 (3H, d, J = 5.7 Hz, sec-CH₃), 1.01 (3H, d, J = 6.5 Hz, sec-CH₃), 1.02 (3H, s, CH₃), 1.06 (3H, s, CH₃), 1.24 (6H, s, 2 x CH₃), 2.62 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-18), 3.45 (1H, t, J = 6.9 Hz, H-3), 5.48 (1H, t, J = 3.4 Hz, H-12); ¹³C-NMR (150 MHz, pyridine-d₅): 39.4 (C-1)*, 23.7 (C-2), 78.2 (C-3), 40.1 (C-4), 53.6 (C-5), 16.6 (C-6), 33.0 (C-7), 39.6 (C-8), 48.1 (C-9), 39.2 (C-10)*, 23.9 (C-11), 125.7 (C-12), 139.3 (C-13), 42.6 (C-14), 28.2 (C-15), 21.4 (C-16), 48.2 (C-17), 55.9 (C-18), 37.4 (C-19)**, 37.5 (C-20)**, 31.1 (C-21), 39.4 (C-22), 28.8 (C-23), 17.5 (C-24), 17.5 (C-25), 15.7 (C-26), 24.0 (C-27), 179.8 (C-28), 18.9 (C-29), 25.0 (C-30). * ** Values may be interconvertible; EIMS m/z (rel. int., %): 456 M⁺ (13, 3), 438 [M-H₂O]⁺ (1, 1), 410 [M-HCOOH]⁺ (13, 5), 248 (100), 207 (15), 203 (33), 189 (8, 6).

BuOH 분획물로부터 rosmarinic acid의 분리

BuOH 분획물 20.0 g을 diaion HP-20 column에서 2.0 L의

H₂O로 용리한 후 25% MeOH 1.0L로 용리하였다. 25% MeOH로 용리한 용액을 농축하여 25% MeOH 분획물(5.4 g)을 얻었다. 이 25% MeOH 분획물을 Sephadex LH-20 column에서 MeOH로 용출하여 주요 화합물인 compound 2을 얻었다.

화합물 2 (rosmarinic acid)

Yellowish powder, $[\alpha]_D^{22} + 78.0$ (*c* 0.40, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3176 (broad, OH), 2913 (CH), 1709 (COOH) 1645 (α, β -unsaturated ester), 1617, 1517 (aromatic C=C), 1397, 1348 (C-H), 1285, 1260, 1232, 1201 (C-O); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): 7.05 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.80 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5'), 6.94 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, H-6'), 7.53 (1H, dd, *J* = 15.6 Hz, H-7'), 6.29 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-8'), 6.80 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.70 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5), 6.66 (1H, dd, *J* = 8.4 and 1.8 Hz, H-6), 3.13 (1H, dd, *J* = 14.4 and 3.6 Hz, H_a-7), 2.96 (1H, dd, *J* = 14.4 and 9.6 Hz, H_b-7), 5.10 (1H, dd, *J* = 9.6, 3.6 Hz, H-8); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): 128.6 (C-1'), 115.7 (C-2'), 147.0 (C-3'), 149.8 (C-4'), 117.0 (C-5'), 123.0 (C-6'), 147.2 (C-7'), 116.3 (C-8'), 170.0 (C-9'), 131.8 (C-1), 118.0 (C-2), 146.4 (C-3), 145.3 (C-4), 116.7 (C-5), 122.3 (C-6), 38.0 (C-7), 77.5 (C-8), 178.1 (C-9); FAB-MS *m/z* 361 [M + H]⁺.

세포배양

American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입한 mouse macrophage RAW 264.7 cell은 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)와 antibiotics-antimycotics (PSF; 100 units/mL penicillin G sodium, 100 ng/mL streptomycin, 250 ng/mL amphotericin B)를 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 5% CO₂를 포함하는 습한 공기 중에서 37°C로 유지하였다.

Cell viability assay

각 well에 MTT solution (최종농도 500 $\mu\text{g/mL}$)을 가하고 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하였다. 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율(%)를 control group (LPS+)와 비교하여 결정하였다. 실험에 사용한 시료는 MeOH 추출물, CHCl₃ 분획물, BuOH 분획물, 그리고 분리한 ursolic acid와 rosmarinic acid이었다. 그리고 caffeic acid의 dimer인 rosmarinic acid 구

조를 고려하여 caffeic acid와 trimer 구조인 salvianolic acid를 추가하여 실험에 사용하였다.

iNOS assay

RAW 264.7 cell을 10% FBS-DMEM에서 배양하고 24-well plate (2 × 10⁵ cells/mL)에 접종하였다. 다음날 배지를 1% FBS-DMEM으로 교환하고 시료를 처리하였다. NO 생산을 유도하기 위하여 1시간 뒤 control group (LPS-)만 제외하고 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 가하였다. 세포를 추가 18시간 동안 배양하고 배지의 NO 생산은 Griess 반응으로 결정하였다. 요약하여, 180 μL Griess reagent {0.1% *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in H₂O와 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄}를 배지 100 μL 에 가했다. 이 과정을 거친 후 nitrite 농도는 540 nm 흡광도를 측정하여 sodium nitrite의 검량선을 이용하여 결정하였다. [1-(NO level of test samples/NO levels of vehicle-treated control) × 100]의 공식을 이용하여 저해율(%)를 계산하였다. NO 생산을 50%로 낮추는 농도를 IC₅₀치로 하였다. 이것은 Table Curve 2D v5.01 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 non-linear regression 분석을 통해 계산하였다.

결과 및 고찰

NO 생산을 저해하는 화합물을 검색하기 위한 목적으로 썬싸리의 MeOH 추출물로부터 비극성 분획인 CHCl₃ 분획물과 극성 분획인 BuOH 분획물로 나누었다. 비극성 분획물은 주로 지용성 화합물을, 그리고 극성 분획물에는 주로 수용성 화합물을 포함하므로 이와 같은 분획과정으로 수행하였다.

썬싸리 MeOH 추출물과 그 분획물인 CHCl₃ 분획물과 BuOH 분획물을 시료로 이용하여 대식세포가 생산하는 NO 생산을 억제하는 효과에 관한 실험을 하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. LPS는 대식세포의 NO 생산을 크게 증가시켰으나 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 MeOH 추출물은 이를 유의하게 감소시켰다. 그 분획물의 효과를 보면 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 CHCl₃ 분획물은 매우 현저히 감소시켰으나 BuOH 분획물은 매우 약한 효과를 나타내었다. CHCl₃ 분획물은 농도의존적으로 NO 생성을 현저히 억제하는 현상도 확인하였다. 한편 같은 농도에서 이 실험에 사용된 시료들은 세포생존율에 큰 변화가 없었다.

CHCl₃ 분획을 silica gel column chromatography로 분리하여 주요 화합물인 화합물 1을 얻을 수 있었다. 이 화합물은 Liebermann-Burchard 반응에서 양성이었으므로 triterpene

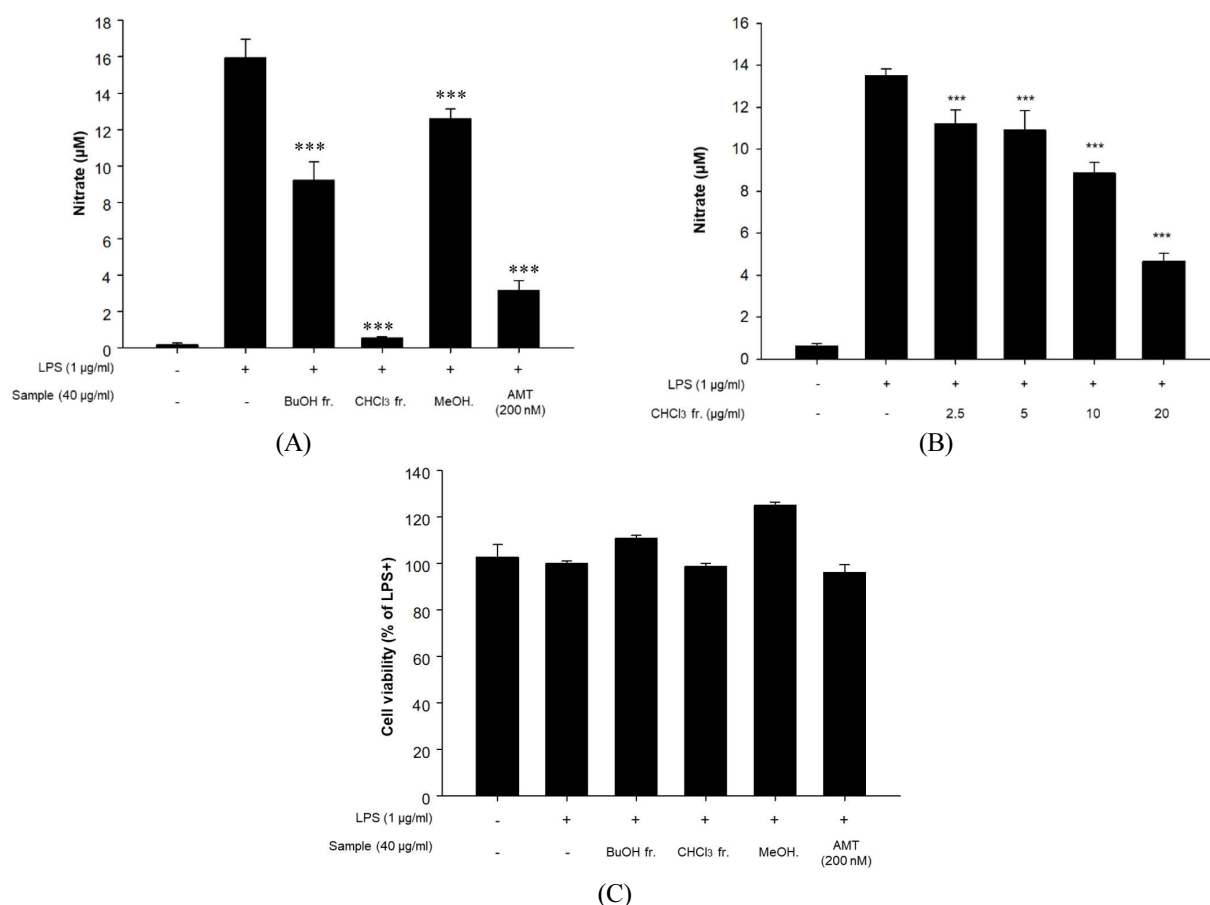


Fig. 2. Effect of the MeOH extract of *L. lucidus* and its two fractions (CHCl₃- and BuOH fraction) on NO formation [(A) and (B)] and on cell viability (C) in LPS-activated macrophage 264.7 cells. The data are presented as the means ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.005 by *t*-test. The amount of nitrate was measured by Griess reaction. The cell viability was measured using MTT. Cells were pretreated with different concentrations of ursolic acid and stimulated with LPS (1 µg/mL).

화합물로 추측되었다. IR spectrum에서 이 화합물로부터 3400 cm⁻¹에서 OH기의 존재와 1690 cm⁻¹에서 COOH기를 확인할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 0.96와 δ 1.01에서 두 개의 doublet로 나타나는 secondary methyl기와 singlet의 5개 methyl기가 나타났다. 고리 밖의 탄소 하나는 IR spectrum에서 확인한 COOH에 따른 것임을 예상할 수 있다. 또, 이 탄소는 ¹³C-NMR spectrum의 δ_C 179.8의 피크로부터 알 수 있다. 그러므로 이 화합물은 ursane계의 triterpene인 것으로 예상되었다. 그리고 H-3의 triplet의 피크에 따른 δ 5.48과 이중결합에 따른 H-12의 δ 5.48에서 피크가 나타나므로 Δ¹²-ursene-3-ol-28-oic acid의 구조를 가지는 ursolic acid로 추정되었다. ¹³C-NMR spectrum의 데이터를 예상되는 화합물인 ursolic acid의 문헌치 (Seebacher *et al.*, 2003)와 비교한 결과 일치하였으므로 화합물 1은 ursolic acid로 동정하였다. 이 화합물을 직접 표준품 ursolic

acid와 co-TLC를 했을 때도 서로 일치하였다.

BuOH 분획물로부터 주요물질인 화합물 2를 분리하였다. IR spectrum에서 OH기(broad, 3400 cm⁻¹), carbonyl기(1709 cm⁻¹), α,β-unsaturated carbonyl기(1645 cm⁻¹), aromatic C=C(1617, 1517 cm⁻¹) 결합의 존재를 알 수 있었으므로 이 화합물은 페놀성 화합물로 예상되었다. ¹H-NMR spectrum에서 *trans*-olefinic proton에 의한 두 개의 피크가 서로 *J* = 15.6 Hz로 커플링하여 δ 7.53과 δ 6.29에서 나타났다. 그리고 ¹H-¹H COSY NMR spectrum에서 확인하여 한 개의 catechol ring에 기인한 피크 3개의 proton이 δ 7.05 (d, *J* = 1.8 Hz), δ 6.94 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz), δ 6.80 (d, *J* = 7.8 Hz)에서 각각 나타났으며, 또 다른 catechol ring에 의한 3개의 피크가 δ 6.80 (d, *J* = 1.8 Hz), δ 6.70 (d, *J* = 7.8 Hz), δ 6.66 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz)에 나타나 이 화합물은 caffeic acid 두 분자가 축합한 rosmarinic acid로 예

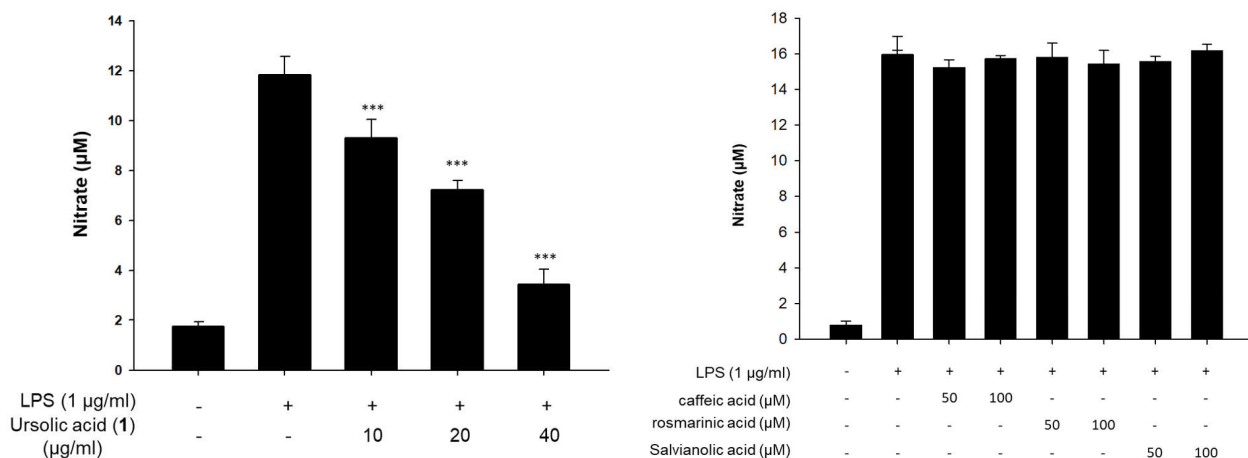


Fig. 3. Effect of compound ursolic acid, rosmarinic acid, caffeic acid and salvianolic acid on NO formation in LPS-activated macrophage 264.7 cells.

상되었다. 더욱이 rosmarinic acid에 나타나는 H_a-7과 H_b-7에 기인한 두 개의 피크가 δ 3.13과 δ 2.96에서 나타나며, H-8이 doublet of doublet로 커플링하여(J = 9.6, 3.6 Hz) δ 5.10에서 나타났다. 그리고 ¹³C-NMR spectrum에서 δ_C 178.1에서 나타나는 피크는 COOH기에 따른 것임을 알 수 있으므로 rosmarinic acid로 예상되었다. ¹³C-NMR spectrum의 데이터가 rosmarinic acid의 문헌치(Woo and Piao, 2004)와 일치하였으므로 화합물 2는 rosmarinic acid임을 알 수 있었다. 직접 표준품과 co-TLC했을 때도 일치하였으므로 화합물 2를 rosmarinic acid로 동정하였다.

CHCl₃ 분획물에서 분리한 ursolic acid, BuOH 분획물에서 얻은 rosmarinic acid가 NO 생산에 미치는 효과를 측정하기 위해 시료로 사용하였다. Rosmarinic acid는 caffeic acid 두 분자가 축합한 dimer의 형태이다. 그리고 caffeic acid의 trimer로 salvianolic acid가 있다. 저자들은 본 실험에서 저자들의 흥미와 관심에 따라 rosmarinic acid 이외에 caffeic acid, salvianolic acid를 실험에 사용하였다. 이 중 caffeic acid는 Sigma사 제품을, salvianolic acid는 단삼에서 분리하여 본 연구실에서 보유 중인 화합물을 사용하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 caffeic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid는 거의 효과를 나타내지 않았다. 그러나 ursolic acid는 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL 농도에서 LPS로 유도한 대식세포의 NO 생산을 농도의존적으로 저해함을 알 수 있다. 그러므로 썩싸리에 존재하는 ursolic acid가 NO 생산을 저해한 결과에 따라 민간에서 사용되는 썩싸리의 항염증 효과는 이 화합물에 따른 것임을 알 수 있었다.

적 요

썩싸리(*L. lucidus*)가 가지는 효능의 하나로 알려진 항염증 효과의 활성물질을 파악하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 항염 효과는 LPS로 활성화한 macrophage 264.7이 생산하는 NO의 감소효과를 측정함으로써 평가하였다. 썩싸리 추출물에서 얻은 비극성 분획물인 CHCl₃ 분획물은 농도의존적으로 현저히 NO 생산을 감소시켰다. 이에 비해 극성 분획물인 BuOH 분획물은 그 효과가 약하였다. Silica gel column chromatography에 의해 이 CHCl₃ 분획물로부터 주요 화합물인 ursolic acid를 분리하고 분광학적 방법으로 동정할 수 있었다. 효과가 약하였던 BuOH 분획물로부터 diaion HP-20 column chromatography와 sephadex LH-20 column chromatography로 이 분획의 주요 화합물인 rosmarinic acid를 분리하고 역시 분광학적 방법으로 동정하였다. Ursolic acid는 농도의존적으로 NO 생산을 억제하였으나 rosmarinic acid는 그 효과가 상대적으로 약하였다. 이러한 사실로부터 썩싸리의 항염증 효과는 주로 ursolic acid의 존재 때문임을 알 수 있었다.

사 사

이 논문은 2018년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임을 밝힙니다. 그리고, 항염활성 평가 실험에 도움을 주신 서울대학교 약학대학 이상국 교수님과 김동화 박사님께 감사드립니다.

References

- Kim, S.J., H.T. Shin, J.B. An, J.W. Yoon, J.W. Lee, S.Y. Jung and T.I. Heo. 2017. Flora of Mt. Samyeong (Yanggu-gun, Gangwon-do) in DMZ area of Korea, Korean J. Plant Res. 30:191-212.
- Murata, T., M. Watahiki, Y. Tanaka, T. Miyase and F. Yoshizaki. 2010. Hyaluronidase Inhibitors from Takuran, *Lycopus lucidus*. Chem. Pharm. Bull. 58:394-397.
- Seebacher, W., N. Simic, R. Weis, R. Saf and O. Kunert. 2003. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. Magn. Reson. Chem. 41:636-638.
- Sharma, J.N., A. Al-Omran and S.S. Parvathy. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. 2007. Inflammopharmacol. 15:252-259.
- Shin, T.Y., S.H. Kim, K. Suk, J.H. Ha, I. Kim, M.G. Lee, C.D. Jun, S.Y. Kim, J.P. Lim, J.S. Eun, H.Y. Shin and H.M. Kim. 2005. Anti-allergic effect of *Lycopus lucidus* on mast cell-mediated allergy model. Toxicol. Appl. Pharmacol. 209: 255-262.
- Slusarczyk, S., M. Hajnos, K. Skalicka-Wozniak and A. Matkowski. 2009. Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. Food Chem. 113:134-138.
- Woo, E.R. and M.S. Piao. 2004. Antioxidative constituents from *Lycopus lucidus*, Arch. Pharm. Res. 27:173-176.

(Received 11 April 2019 ; Revised 1 July 2019 ; Accepted 10 July 2019)