Ⅰ. 서 론

산업기술의 발달로 인한 삶의 질 향상과 더불어 눈부신 현대의학의 발달에도 불구하고 여전히 암이나 AIDS를 비롯한 바이러스 질환 및 각종 성인병은 아직도 불치의 병으로 남아있다. 따라서 세계 유수의 제약회사 및 많은 연구소에서 이러한 질병을 치료할 수 있는 약물의 개발을 위하여 해마다 막대한 연구비를 투자하고 있는 실정이다. 그러나 대부분의 치료약물이 선택성의 결여로 인하여 정상세포에도 영향을 주어 부작용을 야기하고 있을 뿐 아니라 약물에 대한 내성[1,2] 이 증가되는 단점이 있다. 따라서 이러한 단점을 극복할 수 있는 새로운 약물의 탐색이 계속되고 있다. 이러한 시점에서 다양한 생리활성과 구조적 단서를 제공하는 성분 및 선도화합물 탐색에 중요한 자료를 제공하는 천연물로부터 새로운 활성물질을 탐색하려는 시도는 필연적 일 수 밖에 없다.

본 연구는 외부로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 자기 자신과 구별해 내어 이 침입자를 제거하는 면역 기능의 증강이 암을 비롯한 현대의 성인병이나 다른 질환의 치료에 기여할 수 있는 바가 크므로 면역기능을 증강시킬 수 있는 interleukin(IL)-6 생성을 촉진할 수 있는 물질을 탐색하기 위하여 시작되었다. 수없이 많은 독성물질이나 미생물에 노출되어있는 현대인의 생활에서 스스로를 보호하는 것이 개체의 생명을 유지해 나감에 있어서 가장 긴요한 일이라는 것은 AIDS를 포함한 각종 면역 결핍증의 경우에서처럼 일단 면역체계가 파괴되면 그 면역체계를 보완해 주지 않는 한 어떤 방법으로도 생존할 수 없음을 볼 때 자명해진다고 하겠다. 더욱이 면역체계는 개체 내에서 생기는 암세포 역시 제거할 수 있는 감시기능을 제공하고 있다.

그에 따라 면역조절물질에 대한 연구개발은 최근 30 년 동안 매우 활발히 이루어져 왔다. 면역에 대한 중요성이 처음 인지된 시점에서는 주로 면역억제 물질에 대한 연구가 진행되었으나 근래에는 면역기능을 항진시켜 암세포를 비롯한 질병에 대한 저항성을 높이기 위한 치료방법이 시도되고 있다.

Macrophage 가 활성화되면 항원의 흡수, 세포독성 기능이 현저히 항진 될 뿐 아니라 interleukins(IL)을 비롯한 각종 물질들을 분비하여 다른 면역세포의 활성화를 촉진하게 됨으로써 면역계 전반의 활성화를 유도하게 된다. interleukin 이란 생체내의 면역작용, 염증, 조직재생과 같은 면역 반응시 일반적으로 lymphocytes, monocytes/macrophages, fibroblasts, endothelium 과 그 밖의 세포들에서 분비되는 산물로서 면역반응을 조절하는 면역 조절 인자이다. 이들은 각각 고유의 수용체를 통해 생체의 발육성장이나 분화 및 방어 기작을 지배하고 있는데 이 중 interleukin(IL)-6 는 184 개의 아미노산으로 이루어진 monomer 로서 처음 발견되었을 당시의 기능에 따라 IFNβ_2, 26kDa protein, B-cell stimulatory factor 2, hybridoma/plasmacytoma growth factor, hepatocyte stimulating factor 그리고 monocyte-granulocyte inducer type 2등으로 명명되어 왔다.[3,4,5] IL-6 는 다양한 기관의 T 세포, B 세포 및 단핵구에서 분비되어 T 세포와 B 세포의 증식과 분화를 촉진시키며 인체에서 면역체계의 항상성 유지와 질병치료 및 예방에 중요한 역할을 하는 조절인자로서 인체 면역 체계를 이루는 여러 세포간의 성장, 분화, 활성화에 관여하는 신호전달물질과 염증반응의 조절에 중추적인 역할을 하고있다.[6] 이처럼 IL-6 는 세포의 활성, 증식 및 분화를 조절함으로써 정상인의 성장 및 발육에 관여할 뿐만 아니라 여러 질병의 병원성 전달자로 작용하여 질병의 발생 및 치유에 관여함이 알려지고 있다. 따라서 인체의 다양한 면역 기능을 담당하는 IL-6 의 생산이 억제되었을 경우 여러 종류의 interleukin 상호간에 영향을 주고 받으며 면역을 조절하는 기능이 소실되어 결과적으로

외부의 감염에 대한 저항성이 떨어지게 된다.[7,8,9] 또한 IL-6 는 골수를 자극하여 혈소판을 증가시키는 thrombopoietin 의 기능도 나타내는데 Okano 등은 화학요법제나 방사선 치료 후에 오는 hematoimmunological activity 의 장애를 IL-6 로 치료할 수 있다고 보고했다.[10] 따라서 IL-6 의 기능 및 생산조절은 인체내 면역체계의 항상성 유지와 질병치료 및 예방에도 매우 중요하다고 할 수 있다.

그간 cytokine 작용 조절물질에 대한 연구는 미국 일본 등이 중심이 되어 cytokine 항체나 수용체 길항제를 중심으로 연구되어져 왔으며, IL-6 의 경우는 주로 antibody 나 receptor antagonist 의 개발 및 작용기전의 연구 등에 치중하여져 왔으나 IL-1 과 TNF-α 생산억제제로서 SK&F86002 가 연구되었고, bisbenzylisoquinoline alkaloid 인 tetrandrine, Win 69694 등이 보고되었으며 천연물로부터 IL-6 조절물질을 분리하기위한 연구가 계속되고 있다. 국내에서도 human-IL-6-dependent MH60/BSF-2 세포주를 이용하여 수종 약용식물에 대한 IL-6 receptor antagonist 와 signal transduction inhibitor 로서의 가치를 평가하고있다.

본 연구에서는 전국에서 수집한 생약 또는 약용식물에 대하여 IL-6 생성을 저해 또는 증진하는 유용생약의 탐색을 실시하여 수선화과의 문주란이 IL-6 생산을 촉진시키는 작용을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 수선화과에서 분리되어진 알칼로이드들이 항암제 및 항 바이러스제의 후보물질로서 가치가 있음에 연구대상으로 선정하였다.

수선화과에 속한 알칼로이드들 중 lycorine 을 비롯한 16 종류의 알칼로이드들이 RNA 를 포함하는 flaviviruses, bunyaviruses, alphavirus 에 대하여 효과가 있음이 보고되었다.[11] 항 바이러스제의 개발은 다른 항 감염제에 비하여 늦어졌으며, 그나마 주로 AIDS 치료제, herpes 치료제에 국한되어 왔다. 세계적으로 항 바이러스제 개발에 관심이 집중되는 바이러스는 AIDS 의 원인이되는 human immunodefecency virus (HIV)와 herpes virus (HHV)들이며, 최근들어 hepatitis B

virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) 와 influenza virus 등에 대한 관심이 증가하고 있다. AIDS 치료제의 경우, 많은 치료제가 최근에 공인을 받았거나 곧 공인 받을 예정인데, 현재 핵산유도체 revers transcriptase (RT) 저해제가 5 종, proteinase 저해제 3 종, 비핵산계열 RT 저해제 (nonnucleoside RT inhibitor) 1 종 등 총 8 종이 미국에서 공인을 받았다. AIDS 환자 및 HIV 감염자에 대한 복합요법 (특히 RT 저해제와 proteinase 저해제를 이용한 triple combination)에 의한 치료효과와 생존기간연장 면에서의 성공사례가 많이 발표되고 있다. 복합요법으로 치료한 결과 약물의 유효농도가 생체 내에서 유지되는 한 단독요법에서는 관찰할 수 없었던, 최고 3 년동안 바이러스의 증식 억제가 관찰되어 단독요법시대의 종말이 선포되었다. 이 경우 많은 양의 약을 복용해야 하며 치료비가 과다해지는 문제는 있으나 효과는 매우 뚜렷하다. AIDS 치료제 개발에서의 경험이 다른 바이러스 치료제에도 적용되기 시작하여 치료제가 존재하는 바이러스에 대해서도 복합치료요법을 위한 새로운 약물을 개발하려는 추세이다. 특히 종래 치료제와 다른 작용기전을 가진 약물을 개발하려는 추세가 증가하고 있는데 바이러스 proteinase 저해제가 한 예이다. 그에 따라 천연물로부터의 신규 저해제 발견 및 RT 저해제, proteinase 저해제 합성 등에 관심이 집중되고 있다. 그러나 대다수의 경우 활성 물질의 선택성이 낮고, 안전역이 좁은 문제가 있었다. 문주란에서 분리된 알칼로이드들이 RNA 를 포함하는 바이러스인 flaviviruses, bunyaviruses, alphavirus 효과를 보였으므로 같은 계열에 속한 human immunodefeciency virus(HIV)와 hepatitis B virus(HBV), hepatitis C virus(HCV) 및 influenza virus 치료제로서의 약효검색에 있어 우선적으로 평가해볼 가치가 있다고 사료되었다. 시험에 사용된 바이러스는 RNA 를 포함하고 있는 enterovirus 인 poliovirus type 1 (PV-1) strain brunhilde, coxsackie B virus type 3 (CoxB-3) strain Nancy 그리고 rhabdovirus 에 속하는 vesicular stomatitis virus (VSV) strain

Indiana 이며 현재 전 세계적으로 항바이러스제 개발에 관심이 집중되고 있는 Human immunodeficency virus 에 대하여도 human immunodeficency virus type 1 (HIV-1) strain III_B 와 human immunodeficency virus type 2 (HIV-2) strain ROD 로서 각 하나의 strain 을 사용하여 분리된 물질의 효과를 평가하였다.

또한 murine cancer cell line 에 대한 항암활성이 보고된 바 있기 때문에 human cancer cell line 에 대한 항암활성을 평가하여 보았다.

문주란속(*Crinum*)은 수선화과에 속하며 열대와 아열대에 약 130 여종이 분포되어있다.[12] 우리나라에는 하나의 변종으로 문주란(*Crinum asiaticum* var *japonicum*)이 제주도 토끼섬 해변의 모래밭에서 자라고 있다. 형태학적 특성으로는 상록다년초로서 기둥모양의 근경이 있으며 비늘줄기의 밑동에서 굵은 수염뿌리가 많이 나오고 전체 키는 약 50cm 로 크다. 흰 색의 꽃이 7~8 월에 잎 사이에서 나온 길이 70cm 내외의 꽃줄기에서 산형화서를 이루며 좋은 향기가 난다. 화관은 통이 길고 화관 끝이 깊게 갈라져있으며 수술은 화관의 목에 붙어있다. 자방은 3 실로 이루어져 하위에 위치하고 열매는 삭과로서 일정하지 않게 갈라진다.

Fig. 1. ***Crinum asiaticum*** **var.** ***japonicum***

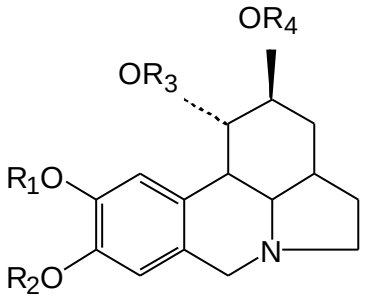
지난 이십년간 수선화과의 알칼로이드들은 생물학적 분야에서 폭넓게 연구되어져 있으며 여기에서 분리된 물질들의 항바이러스[11,13] 항말라리아[14], 항콜린(anticholinergic)작용 그리고 중추신경계[15,16] 에 관한 활성들과 그 밖에 항암에 관한 효과들이 보고되어 있다.[14,17] 또한 몇 가지 알칼로이드들의 항신생종양(antineoplastic) 효과[13,18,19,20,21,22] 에 관한 보고들이 나오고있다.

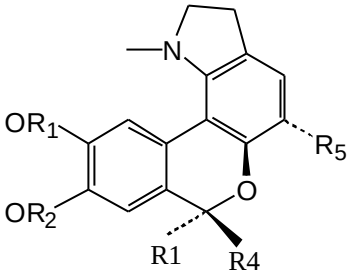
예를 들어 수선화과 알칼로이드의 대표적인 물질이라 할 수 있는 lycorine 의 항바이러스 효과는 이미 여러 차례 보고된 바가 있으며[13] 또한 pretazettine 은 몇가지 백혈구에 대한 활성과 펩티드 결합 형성의 저해로인한 진핵세포에서의 단백 합성 저해작용이 보고되어있다. 다른 한편으로 대다수의 수선화과 식물에 분포하는 galanthamine 은 마취효과와 항콜린작용, 그리고 anti-cholinesterase 효과를 가지고 있어 근육계질환은 물론 alzheimer disease 와 신경계질환에 사용되고있다.[23] 그 밖에 *Crinum* 속에서 분리보고된 성분은 crinamin, bulbispermine 이 *C. latifolium* 과 *C. bulbispermum* 에서[24] criwelline, 6-hydroxycrinamine, hamayne, ismine, trisphaeridine, 3-hydroxy-8,9-methyleneioyxyphenanthridine 이 *C. hygrophilum* 에서[25] 8α-ethoxy prectiwelline, N-desmethyl-8α-ethoxy pretazettine, N-desmethyl-8β-ethoxy pretazettine 이 *C. bulbispermum* 에서[26] 분리 보고되었다. *Crinum* 속에서 분리된 알칼로이드들을 구조별로 나누면 5 개의 군으로 나눌 수 있으며 요약하면 다음과 같다[27]

1. lycorine type ; lycorine (1), pseudolycorine (2), 2-O-acetyl-psudolycorine(3), sternbergine (4), and galanthine(5).
2. homolycorine-lycorine type : homolycorine(6), 8-O-demethylhomolycorine(7), 9-O-demethyl-2α-hydroxyhomolycorine(8), dubiusine(9), hippeastrine(10), 6-O-methyllycorenine(12)
3. galanthamine type : galanthamine (13), N-formylnorgalanthamine (14),

norgalanthamine (15)

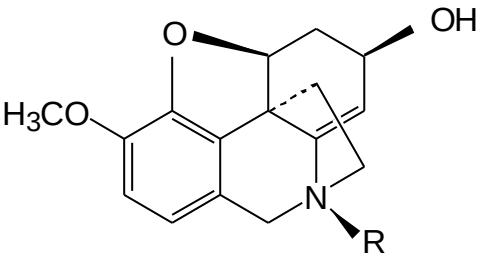
4. crinane type : crinamine (16), haemanthamine (17), papyramine (18), ambelline (19), buphanidrine (20)
5. tazettine type : tazettine (21), pretazettine (22), epimacronine (23)
6. dihydrobicolorine (24), mesembrenone (25)

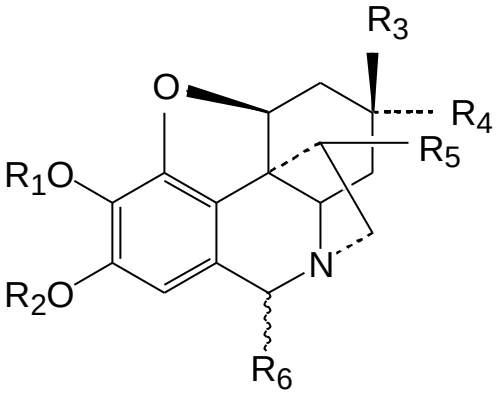




	R1	R2	R3	R4
1	-CH_2-		H	H
2	H	CH_3	H	H
3	H	CH_3	H	Ac
4	H	CH_3	H	H
5	CH_3	CH_3	H	CH_3

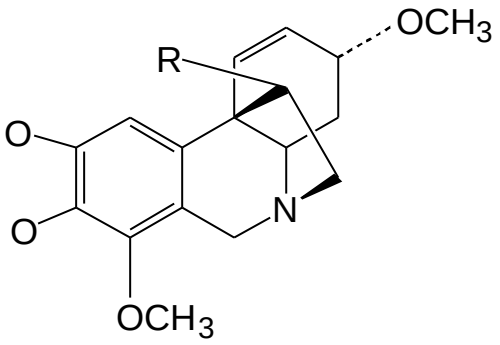
	R1	R2	R3	R4	R5
6	CH_3	CH_3	-O-		H
7	CH_3	H	-O-		H
8	H		-O-		OH
9	C=OCCOHCH$_3$		-O-		OAc
10	-CH_2-		-O-		OH
11	CH_3	CH_3	OH	H	H
12	CH_3	CH_3	OCH3	H	H

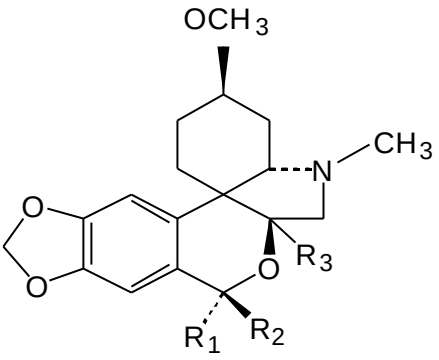




	R
13	CH_3
14	CHO
15	H

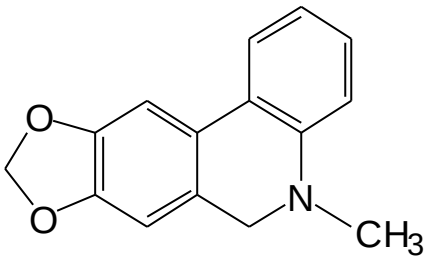
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
16	$-CH_2-$		H	OCH_3	OH	H
17	$-CH_2-$		OCH_3	H	OH	H
18	CH_3	CH_3	OCH_3	H	H	OH

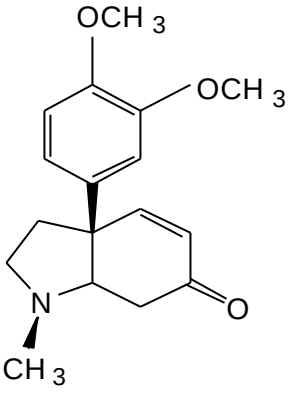




	R
19	OH
20	H

	R1	R2	R3
21	H	H	OH
22	H	OH	H
23	-O-		H





24

25

Ⅱ. 재료 및 실험방법

1. 재료

1.1 생약재료

실험에 사용된 문주란은 1999 년 2 월 제주도에서 채집하고 식물분류학적 동정을 거친 후 실험에 사용하였다. 채집한 시료는 즉시 음건한 후 세절하여 메탄올로 추출하였으며 표본은 충남대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

1.2 시약 및 기기

1) 시약

Column chromatography 용 고정상으로서 Kiesel gel 60 (230-400 mesh & 70-230 mesh, Merck)과 lipophilic sephadex LH-20 (bead size 25-100 μm, Sigma) 및 YMC gel ODS-A (YMCGEL), RP-18 (Merck)을 사용하였으며 TLC plate 는 Kiesel gel 60 F_{254} precoated plate (Merck)를 사용하였다. 사용한 용매로는 dichloromethane, n-hexane, ethyl acetate, acetone, methanol, acetic acid 등의 특급 또는 일급 시약을 사용하여 물질의 추출 및 분리를 실시하였다.

Cell culture 용 시약으로 penicillin-streptomycin (Sigma), gentamycin (Sigma), sodium hydrogen carbonate (Gibco), fetal bovine serum (Gibco), RPMI 1640 medium (Gibco), Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco), minimum Essential Medium

alpha medium(Gibco)을 이용하여 배지를 제조하였으며, 암세포 독성 시험 및 항바이러스시험용 시약으로 trypsin-EDTA (0.5% trypsin, 5.3mM EDTA, Gibco), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma), 50% trichloroacetic acid, 1% acetic acid 로 제조한 0.4%(w/v) sulforhodamine B(SRB), 10mM Tris base(Sigma), DMSO (Sigma) 등을 사용하였다.

IL-6 정량을 위한 assay용 시약으로는, dulbecco's phosphate buffer saline (PBS), Endogen mouse IL-6 ELISA kit (Endogen)을 사용하여 생성된 IL-6의 양을 정량하였다.

2) 기기

분리된 물질의 구조동정을 위한 분광학적 기기로 ^{1}H-NMR 과 ^{13}C-NMR 은 Bruker DRX300 spectrometer (Korean Basic Science Institute (KBSI))를 FAB-MS 와 EI-MS 는 Kratos Concept-1S mass spectrometer (KBSI)와 Hewlett-Packard MS Engine 5989A mass spectrometer (KBSI)를 각각 사용하여 측정하였다. BECKMAN UV/VIS spectrophotometer 를 이용하여 UV 를 측정하였으며, melting point 는 electrothermal melting point apparatus 를 polarimeter 는 JASCO DIP-370 digital polarimeter 를 사용하였다. 세포독성 측정을 위한 실험 기기로 microplate reader (Molecular Device), CO_2 incubator (Forma Scientific), centrifuge (Hanil MF550), Axiovert 25 inverted microscope(ZEISS) 이 사용되었다.

3) 세포주

항암효과를 측정하기위한 A549 (human lung cancer cell), HCT-15(human colon

cancer), MDA-MB-231(human breast cancer), LOX-IMVI(human amelanotic melanoma), PC3(human prostatic cancer)는 생명공학연구소에서 분양 받아 사용하였으며 IL-6 생성 조절효과를 측정하기 위한 MC3T3-E1(cloned-derived murine osteoblast –like cell)세포는 일본 Toyama 의과약과대학에서, Raw 264.7 세포는 생명공학연구에서 분양 받아 사용하였다. 항바이러스 효과를 측정하기 위한 HeLa (human cervix epitheloid carcinoma cell), HuT 78 (human cutaneous T-cell lymphoma), CCRF-CEM (human peripheral blood, acute lymphoblastic leukemia), MOLT-4 (human peripheral blood, acute lymphoblastic leukemia), 그리고 HEL 299 (humna embryonic lung fibroblast) 세포들은 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하여 사용하였으며 MT-4(human T-cell transformed by co-cultivating with leukemia lymphocytes harbouring HTLV-1)세포는 일본 동경의과치과대학교의 N. Yamamoto 교수로부터 기증받아 사용하였다. H9(human cutaneous T-cell)은 'MRC AIDS Reagent Project'에 의하여 영국의 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)로부터 기증받았는데 원 제공자는 R. Gallo 교수로서 'the NIH NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program'에 의하여 제공되었다.

4) 바이러스

실험에 사용된 RNA virus 로서 enterovirus 들은 poliovirus type 1 (PV-1) strain brunhilde, coxsackie B virus type 3 (CoxB-3) strain Nancy 를 사용하였으며 rhabdovirus 에 속하는 vesicular stomatitis virus (VSV) strain Indiana 도 시험에 사용되었다. Human cytomegalovirus(HCMV)는 human cytomegalovirus strain A-169 와 human cytomegalovirus strain Davis 로 두 개의 strain 을 사용하였다. Human immunodeficency virus 는 human immunodeficency virus type 1 (HIV-1) strain III_B 와

human immunodeficency virus type 2 (HIV-2) strain ROD 로서 각 하나의 strain 을 사용하였으며 'MRC AIDS Reagent Project'에 의하여 영국의 NIBSC 로부터 분양 받았다. 각 바이러스를 H9 세포와 HuT 78 세포, CEM, MOLT-4 에 만성 감염시킨 후 3~4 일 간격으로 계대 배양하였고, 세포를 제거한 원심분리 상등액을 바이러스 종균액으로 취하여 액체질소통이나 -70°C 에 보존하였으며, 실험직전에 37℃ 에 녹여 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 수종 식물의 MeOH 엑스의 제조

본 실험의 screening 을 위하여 사용한 생약은 1996 년과 1998 년에 걸쳐 전국각지에서 채집하여 식물 분류학적인 동정을 거친 후 음건하여 세절한 후 MeOH 로 추출하였다. 추출액은 감압농축한 후 엑스의 일정량을 평량하여 최종농도가 20 ㎎/㎖이 되도록 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해하여 제조된 것을 실험에 사용하였다.

2.2. 시료에 대한 IL-6 생성효과의 검색

2.2.1. MC3T3-E1 세포의 배양

Cloned-derived murine osteoblast–like cell 세포인 MC3T3-E1 세포는 37°C, 5% CO_2 배양기에서 주 2 회 계대 배양 하였다. 배양액은 3 차증류수 900ml 에

minimum essential medium alpha (MEM-α) medium, $NaHCO_3$ 2.2g, penicillin-streptomycin (100unit/㎖), L-gluthamine 2mM 을 넣어 용해시키고 pH 를 7.2 로 조절하여 전체량이 1ℓ가 되도록 하였다. 조제한 배지는 세균여과기로 여과한 후 최종농도가 10%가 되도록 fetal bovine serum 을 첨가하여 사용하였다. 세포는 cell culture flask 에 monolayer 상태를 유지하도록 세포 농도를 조절하면서 성장시켰다.

2.2.2. MC3T3-E1 세포에 대한 IL-6 생성 효과의 측정

바닥에 붙어있는 세포를 떼어 내기위해 trypsin-EDTA 2㎖을 가한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 5~10 분간 방치하여 기벽에 붙은 세포를 떨어뜨리고 다시 PBS buffer 10㎖을 가하여 원심분리(1200rpm, 5min)를 하여 남아있는 trypsin-EDTA 를 제거하였다. 모아진 세포를 MEM-α medium(10% FBS)에 현탁시켜 1.5×10^5 cells/㎖로 세포수를 조절한 후에 96 well plat 에 100㎕씩 분주하고 24 시간 배양한 후 남아있는 배지를 제거하고 시료 5㎕와 10% DCC treated RPMI 배지를 100㎕씩 가하여 24 시간 배양하였다. 이때 표준물질로서 IL-6 생성을 증가시킨다고 알려진 mouse IL-1α를 비교물질로 사용하였다. 배양이 끝나면 96 well plat 를 1200rpm, 5min 로 원심분리하여 상등액을 취하고 생성된 IL-6 의 양은 ELISA (enzyme linked- immunosorbent assay)방법을 이용하여 정량하였다.

2.1.3. ELISA 법을 이용한 IL-6 의 정량

MC3T3-E1 세포에서 생성된 IL-6 가 유리되어있는 상등액을 MEM-α 배지를 이용하여 1/10 로 희석하여 시료로 사용하였다. Anti-mouse IL-6 precoated 96

well strip well에 시료 및 lyophylized E. coli derived recombinant mouse IL-6 standard를 1250, 250, 50pg/ml의 농도로 50 μℓ씩 가하고 anti-mouse IL-6 biotin detection antibody가 포함된 plate reagent 50 μℓ를 가한 후 plate를 호일로 싸서 37°C, humidified 배양기에서 두 시간 동안 배양하였다. Wash buffer를 이용하여 5회 세척한 다음 HRP-conjugated Streptavidin이 희석된 conjugated reagent 100 μℓ를 가하고 plate를 호일로 싸서 37°C, humidified 배양기에서 한 시간 동안 배양하였다. 다시 wash buffer를 이용하여 5회 세척한 다음 미리 섞여진 TMB-substrate 용액 100 μℓ를 가하고 plate를 호일로 싸서 어두운 서랍속에서 30분동안 발색 시킨 후 0.18M 황산 100 μℓ를 가하여 반응을 종결시켰다. 청녹색으로 발색된 시료는 plate reader를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다 (Scheme 1).

Incubate MC3T3-E1 cells in MEM-α for 3days

(10% FBS, penicilline-streptomycin)

↓

prepare cell culture to 1.5×10^5 cells/ml

seed cell suspention culture 100 μℓ on each well of 96 well plate

↓ incubate for 24hours at 37°C, 5% CO_2 incubator

change medium with RPMI 1640

(10% DCC treated FBS, penicilline-streptomycin)

↓ incubate for 24hours at 37°C, 5% CO_2 incubator

add samples and IL-1α

↓ incubate for 24hours at 37°C, 5% CO_2 incubator

↓ centrifugation 1200rpm, 5min

dilute culture supernatant 1/10 with RPMI1640 (FBS free)

add diluted culture supernatant, IL-6 standard 50 μℓ in each and

plate reagent 50 μℓ to ELISA plate

↓ incubate for 2 hours at 37°C humidified incubator

aspirate and wash 5 times

add IL-6 conjugate reagent 100 μℓ

↓ incubate for 1 hours at 37°C humidified incubator

aspirate and wash 5 times

Add premixed TBM-substrate solution 100 μℓ

↓ incubate for 30 min at room temperature in dark place

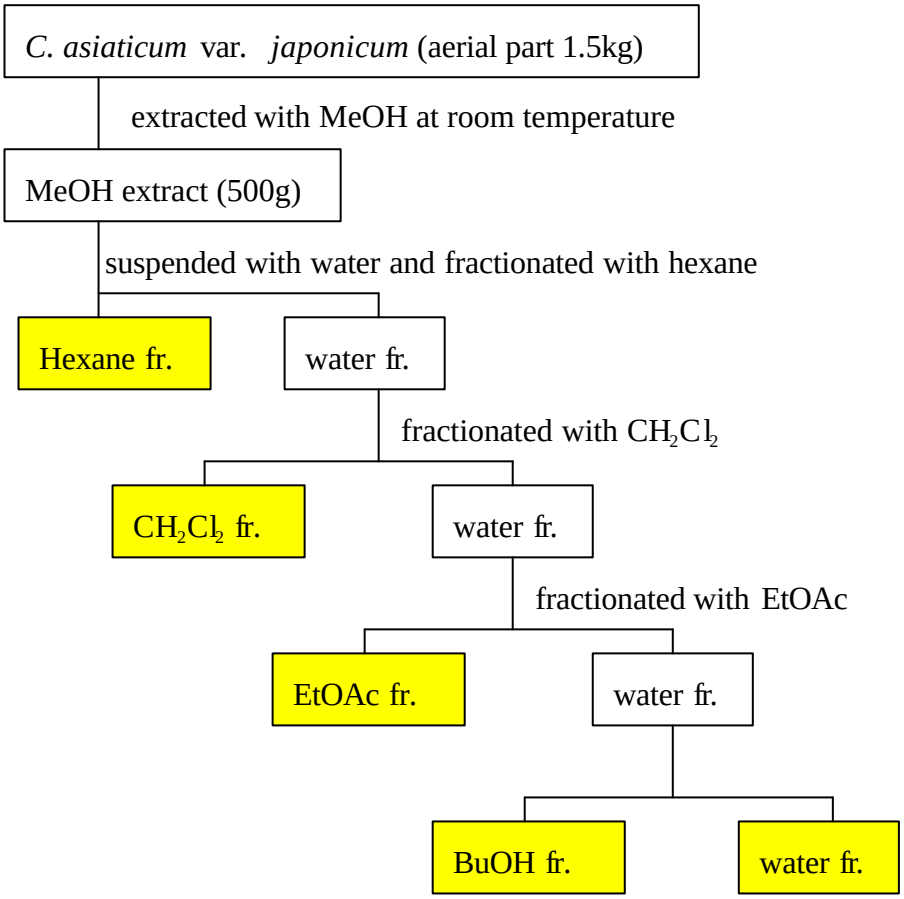
add stop solution 100 μℓ

read the OD at 520nm

Scheme 1. ELISA of IL-6 with MC3T3-E1

2.3. 추출, 분획 및 분리

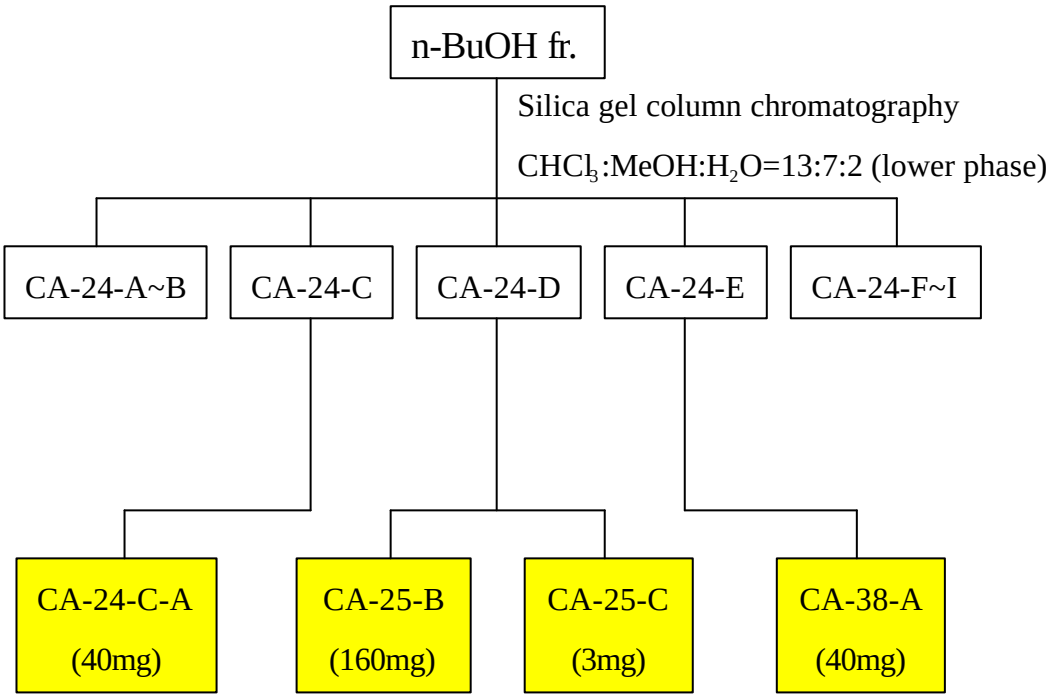
음건한 문주란 지상부 1.5kg 을 세절하여 실온에서 MeOH 로 3 회 추출하였다. 여과 하여 얻은 추출액을 감압농축하여 MeOH 엑스를 얻었고 이를 증류수로 현탁하여 Hexane, CH_2Cl_2, EtOAc, BuOH 로 분획하였다 (Scheme 2).



Sheme 2. Fractionation of MeOH ex. of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*

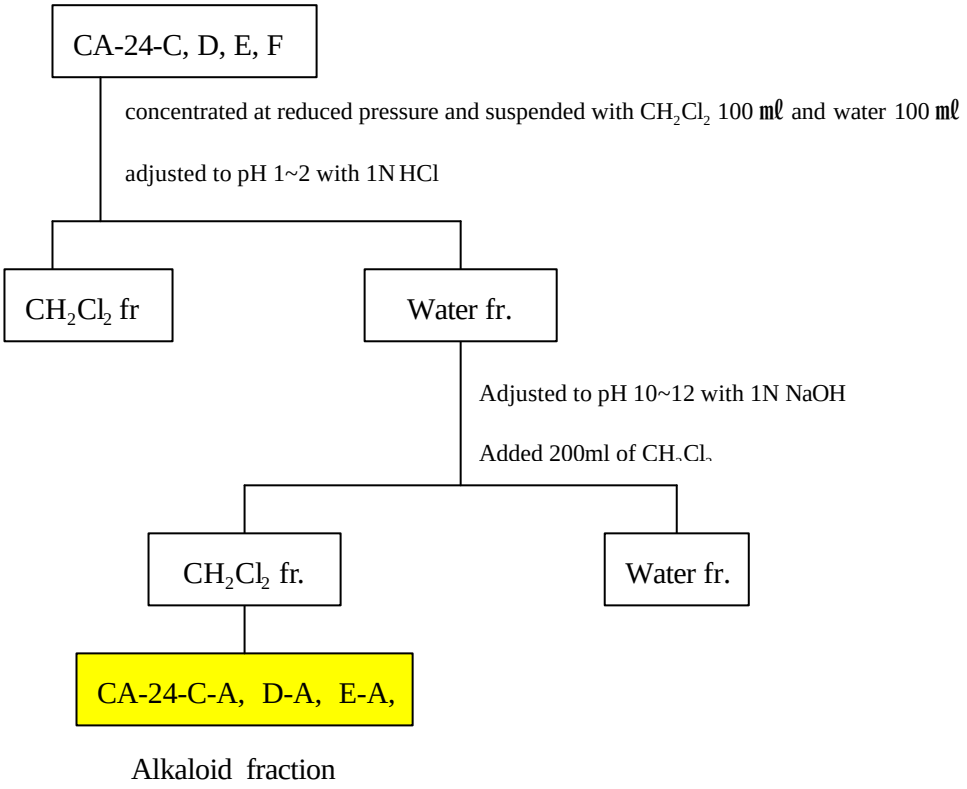
2.3.1. BuOH 분획으로부터의 화합물 분리

문주란의 BuOH 엑스를 silica gel(70~230mesh)로 균일하게 충진된 직경 45 ㎜의 칼럼에 가하여 column chromatography 를 실시하였다. 이동상으로 $CHCl_3$: MeOH: H_2O =13:7:2 (1ower phase) 4 ℓ를 사용하여 9 개의 분획을 얻었으며 마지막은 MeOH 100%로 용출시켰다 (Scheme 3).



Scheme 3. Isolation of compounds from BuOH fraction

Column chromatography 하여 얻은 9 개의 분획에 대한 TLC 를 실시하여 dragendorff 시약으로 발색시켜 알칼로이드가 존재하는 분획을 확인하였으며 알칼로이드가 존재하는 분획은 우선적으로 알칼로이드 추출법에 의해 추출하여 구분하였다 (Sheme 4).



Scheme 4 . Acid-base extraction for alkaloids from BuOH fraction

1) Compound 1

BuOH 분획을 column chromatography 하여 얻은 CA-24-C 분획에서 추출한 알칼로이드 분획 CA-24-C-A 를 농축하여 acetone 및 MeOH 에서 재결정하여 백색 침상 결정으로 compound 1 을 분리하였다.

White niddle crystal

Mp : 196~197°C

$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH, c 0.03) : +33.33°

UV λ_{MAX} : 212, 294 ㎚

FAB(+) –mass : 302 $[M+H]^+$

EI-mass (m/z) : 300, 269, 240, 181

^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) : δ 6.27 (H, dd, J=2.4, 10.2 ㎐, H-1), 6.07 (H, d, J=10.2 ㎐, H-2), 3.34 (H, m, H-3), 2.08 (2H, m, H-4), 3.44 (H, m, H-4a), 4.27 (H, d, J=16.8 ㎐, H-6), 3.72 (H, d, J=16.8 ㎐, H-6), 6.52 (H, s, H-7), 6.84 (H, s, H-10), 4.03 (H, m, H-11), 3.20 (2H, m, H-12), 5.87 (2H, s, methylenedioxy group)

^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD) :δ 125.94 (C-1), 134.12 (C-2), 77.69 (C-3), 30.75 (C-4), 67.35 (c-4a), 63.55 (C-6), 126.55 (C-6a), 107.82 (C-7), 147.71 (C-8), 148.15 (C-9), 104.23 (C-10), 137.32 (C-10a), 51.72 (C-10b), 81.13 (C-11), 61.57 (C-12), 102.21 (methylenedioxy group)

2) Compound 2

BuOH 분획을 column chromatography 하여 얻은 분획 CA-24-D 에서 알칼로이

드 분획 CA-24-D-A 를 얻은 후 고정상으로 silica gel(230~400mesh)을 충진한 직경 30 ㎜의 칼럼에 loading 하고 acetone : MeOH = 2 :1 을 용매로 하여 column chromatography 를 실시하였다. 비교적 순수하게 분리되어진 분획을 농축한 후 acetone 및 MeOH 에서 재결정하여 백색 침상 결정으로 compound 2 를 얻었다.

White niddle crystal

Mp : 179~181°C

$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH, c 0.29) : -65.52°

UV λ_{max} : 278, 288 ㎚

FAB(+)-mass : 274 $[M+H]^+$

^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) : δ 2.52 (H, d, J=15.9 ㎐, H-1), 2.18 (H, d, 15.9 ㎐, H-1), 4.21 (H, m, H-2), 6.02 (H, d, J=10.3 ㎐, H-3), 6.16 (H, d, J=10.3 ㎐, H-4), 2.08 (2H, m, H-6), 3.65 (H, d, J=15.0 ㎐, H-7), 3.63 (H, d, J=15.0 ㎐, H-7), 4.34 (H, d, J=15.0 ㎐, H-9), 4.54 (H, d, J=15.0 ㎐, H-9), 6.83 (H, d, J=8.3 ㎐, H-11), 6.86 (H, d, J=8.3, H-12), 4.63 (H, m, H-16), 3.83 (3H, s, OCH_3)

^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD) :δ 31.40 (C-1), 62.08 (C-2), 129.99 (C-3), 127.00 (C-4), 49.28 (C-5), 35.94 (C-6), 46.62 (C-7), 51.74 (C-9), 123.04 (C-10), 123.55 (C-11), 113.60 (C-12), 148.43 (C-13), 147.04 (C-14), 134.20 (C-15), 88.57 (C-16), 56.66 (OCH_3)

3) Compound 3

BuOH 분획을 column chromatography 하여 얻은 분획 CA-24-D 를 산-염기 추

출에 의해 분리한 CA-24-D-A의 분획을 직경 30㎜의 칼럼에서 silica gel (230~400mesh) column chromatography를 실시하였다. 비교적 순수하게 분리된 분획을 모아 MeOH에서 재결정하여 백색 침전으로 compound 3을 얻었다.

White powder

$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH, c 0.03) : -133.33°

UV λ_{max} : 210㎚

FAB(+)- mass : 274 $[M+H]^+$

^{1}H-NMR (300㎒, CD_3OD) : δ 2.13 (H, m, H-1), 2.50 (H, dt, J=15.78㎐, 1.67, H-1), 4.16 (H, m, H-2), 5.93 (H, dd, J=10.28, 3.73㎐, H-3), 6.14 (H, d, J=10.28㎐, H-4), 1.84 (2H, m, H-6), 3.23 (H, m, H-7), 3.87 (H, d, J=15.33㎐, H-9), 4.04 (H, d, J=15.33㎐, H-9), 6.63 (H, d, J=8.2㎐, H-11), 6.72 (H, d, J=8.2㎐, H-12), 4.54 (H, m, H-16), 3.80 (3H, s, OCH_3)

^{13}C-NMR (75㎒, CD_3OD) :δ 31.46 (C-1), 62.60(C-2), 129.03 (C-3), 133.47 (C-4), 49.28 (C-5), 40.74 (C-6), 47.82 (C-7), 54.34 (C-9), 121.74 (C-10), 128.10 (C-11), 112.95 (C-12), 148.15 (C-13), 145.36 (C-14), 134.50 (C-15), 89.04 (C-16), 56.68 (OCH_3)

4) Compound 4

BuOH 분획을 column chromatography 하여 얻은 CA-24-E 분획을 산-염기 추출하여 알칼로이드가 함유된 CA-24-E-A를 분리하고 직경 30㎜의 칼럼에서 $CHCl_3$: MeOH = 9 :1 을 이동상으로 하여 silica gel column chromatography를 실시하였다. TLC 결과 dragendorff 시약으로 발색되는 Rf = 0.3 의 비교적 순수한 물

질을 모아 $CHCl_3$ 과 MeOH 의 혼합용매에서 재결정하여 백색의 침상결정으로 compound 4 를 얻었다.

White niddle crystal

Mp : 223~228°C

$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH, c 0.03) : +233.33°

UV λ_{max} : 290, 228 ㎚

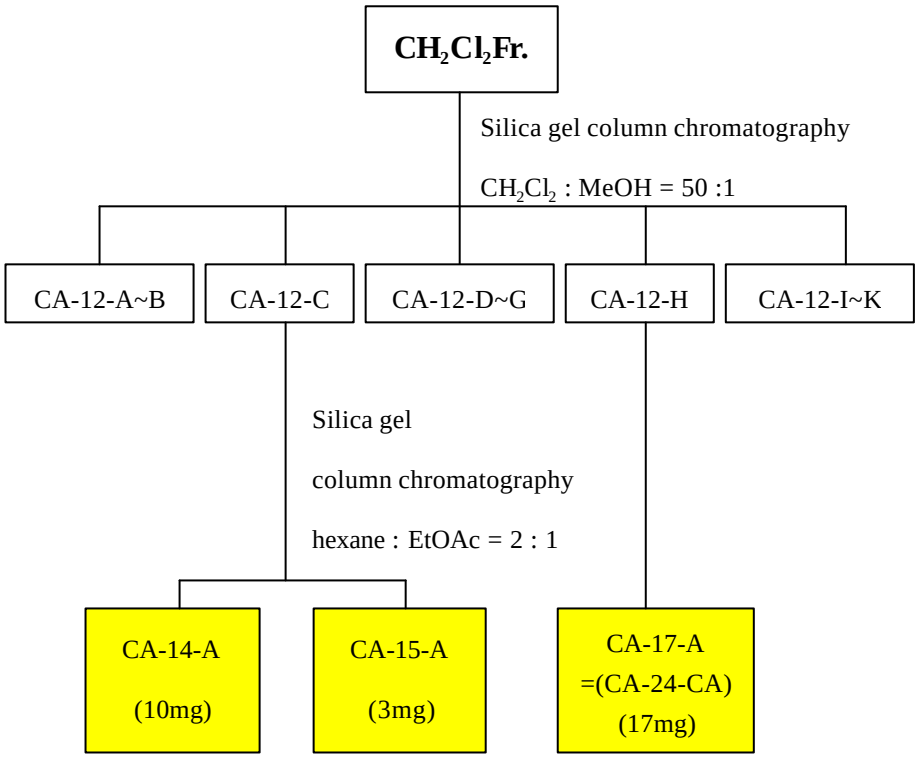
FAB(+)- mass : 288 $[M+H]^+$

^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) : δ 4.37 (H, br s, H-1) 4.06 (H, m, H-2), 5.44 (H, br s, H-3), 2.76 (H, d, J=10.83 ㎐, H-4a), 4.01 (H, d, J=14.1 ㎐, H-6), 3.43 (H, d, J=14.1 ㎐, H-6), 6.77 (H, s, H-7), 6.54 (H, s, H-10), 2.53 (3H, m, H-10, 11), 2.32 (H, m, H-12), 3.2 (H, m, H-12), 5.81 (2H, s, methylenedioxy group)

^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD) :δ 71.99 (C-1), 73.16 (C-2), 119.11 (C-3), 143.79 (C-4), 62.45 (C-4a), 57.85 (C-6), 131.20 (C-6a), 108.21 (C-7), 147.68 (C-8), 145.65 (C-9), 105.06 (C-10), 129.75 (C-10a), 100.57 (methylenedioxy group)

2.1.2. CH_2Cl_2 분획으로부터의 화합물 분리

직경 30 ㎜의 칼럼에 silica gel(230~400mesh)로 균일하게 충진한 후 이동상으로 $CHCl_3$: MeOH: H_2O =13:7:2 (1ower phase) 을 흘려 기포를 제거하고 여기에 silica gel (70~230 mesh) 30g 에 CH_2Cl_2 엑스를 가한 후 감압 농축하여 미리 coating 해 놓은 시료를 가하였다. 이동상 약 4 ℓ를 사용하여 11 개의 분획을 얻었으며 마지막은 MeOH 100%로 용출시켰다 (Scheme 5). Column chromatography 하여 얻은 11 개의 분획에 대한 TLC 를 실시하여 발색시약으로 10% 황산과 함께 dragendorrf 시약을 사용하여 CA-12-H 에서 알칼로이드의 존재를 확인하였다. 이 분획은 우선적으로 알칼로이드 추출법에 의해 추출하여 구분하였다.



Scheme 5. Isolation of compounds from CH_2Cl_2 fraction

1) Compound 5

CH_2Cl_2 분획을 column chromatogrphy 하여 얻은 분획 중 CA-12-C 의 분획을 hexane : EtOAc = 2:1 을 이동상으로 하여 silica gel column chromatography 를 실시하였다. TLC 결과 Rf = 0.3 으로 분리된 비교적 순수한 물질을 다시 직경 15 ㎜의 칼럼에 sephadex LH-20 을 충진하고 100% MeOH 을 이동상으로 column chromatography 를 실시하였다. 순수하게 분리된 물질을 모아 감압 농축하여 흰색의 가루로 compound 5 를 얻었다.

White powder

Mp : 186~187°C

$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH, c 0.05) : +60.00°

UV λ_{max} : 222, 280 ㎚

EI-mass : 242$[M]^+$ (72), 120(100), 65(73)

FAB(+) : 242 $[M]^+$

^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) : δ 4.96 (H, d, J=2.7 ㎐, H-2), 1.96 (H, m, H-3), 2.11 (H, m, H-3), 2.65 (H, m, H-4), 2.85 (H, m, H-4), 6.85 (H, d, J=8 ㎐, H-5), 6.30 (H, dd, J=2.7, 8 ㎐, H-6), 6.24 (H, d, J=2.7 ㎐, H-8), 7.21 (2H, dd, J=2.7, 8.7 ㎐, H-2′, 6′), 6.77 (2H, dd, J=2.7 ,8.7 ㎐, H-3′ ,5′)

^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD) : δ 79.02 (C-2), 31.32(C-3), 25.51 (C-4), 130.94 (C-5), 109.07 (C-6), 157.56 (C-7), 104.05 (C-8), 158.14 (C-9), 114.27 (C-10), 134.23 (C-1′), 128.44 (C-2′), 116.07 (C-3′), 157.19 (C-4′), 116.07 (C-5′), 128.44 (C-6′)

2) Compound 6

CH_2Cl_2 분획을 column chromatography 하여 얻은 분획 중 CA-12-C 의 분획을 농축하여 직경 15 ㎜의 칼럼으로 silica gel column chromatography 를 실시하였다. 이동상으로서 hexane : EtOAc = 2:1 을 사용하였으며 Rf =0.25 로 TLC 상에서 노란 색으로 발색되는 물질을 모아 sephadex LH-20 을 사용하여 column chromatography 를 실시하고 다시 이동상으로 CH_2Cl_2 : EtOAc = 10 :1 을 사용하여 silica gel cloumn chromatography 를 행하여 적색의 유상물질로 compound 6을 분리하였다.

Red oil

$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH, c 0.05) : +200.00°

UV λ_{MAX} : 212, 280 ㎚

FAB(+)-mass : 274 $[M+H]^+$

^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) :δ 6.82 (2H, d, J=8.84 ㎐, H-2, H-6), 7.89 (2H, d, J=8.84 ㎐, H-3, H-5), 6.36 (H, d, 2.45 ㎐, H-3′), 6.32 (H, dd, J=8.23, 2.51 ㎐, H-5′), 3.71 (3H, s, H-OCH_3), 3.16 (H, m, H-α), 2.87 (2H, m, H-α, β), 1.29 (H, m, H-β)

^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD) δ 129.93 (C-1), 131.94 (C-2), 116.22 (C-3), 163.88 (C-4), 116.22 (C-5), 131.94 (C-6), 121.20 (C-1′), 160.73 (C-2′), 131.50 (C-3′), 157.18 (C-4′), 102. 44 (C-5′), 105.61 (C-6′), 55.57 (OCH_3), 26.62 (C-α), 39.82 (C-β), 202.00 (C=O)

2.4. IL-6 생성효과의 측정

2.4.1. Raw 264.7 세포의 배양

Raw 264.7 cell line 은 murine macrophage model cell line 으로 37°C, 5% CO_2 배양기에서 주 2 회 계대 배양 하였다. 배양액은 3 차증류수 900ml 에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), $NaHCO_3$ 3.7g, penicillin-streptomycin (100unit/ml), L-gluthamine 2mM 을 넣어 용해시키고 pH 를 7.2 로 조절하여 전체량이 1ℓ가 되도록 하였다. 조제한 배지는 세균여과기로 여과한 후 최종농도가 10%가 되도록 fetal bovine serum 을 첨가하여 사용하였고 cell culture flask 에 monolayer 상태를 유지하도록 세포 농도를 조절하면서 성장시켰다.

2.4.2. Raw 264.7 세포에 대한 IL-6 생성 효과의 측정

실험 바로 전 cell scraper 를 이용하여 기벽에 붙은 세포를 떼어내어 DMEM(10% FBS)배지에 현탁시켜 1.0×10^6 cells/ml 로 세포수를 조절한 후에 96 well plate 에 100 μℓ씩 분주하고 3 시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DMEM (10% FBS) 100 μℓ와 배지에 희석된 시료 100 μℓ를 가하여 24 시간 배양하였다. 이때 표준물질로서 IL-6 생성을 증가 시킨다고 알려진 LPS 를 비교물질로 사용하였다. 배양이 끝나면 상등액 100 μℓ를 취하여 생성된 IL-6 의 양을 ELISA (Enzyme linked- immunosorbent assay)방법을 이용하여 정량하였다.

2.5. 암세포 독성 시험

2.5.1. 세포배양

A549 (human lung cancer cell), HCT-15(human colon cancer), MDA-MB-231(human breast cancer), LOX-IMVI(human amelanotic melanoma), PC3(human prostatic cancer)는 생명공학연구소에서 분양 받아 사용하였다. 배양액은 3 차증류수 900ml 에 RPMI medium, $NaHCO_3$ 2g, penicillin-streptomycin (100unit/ml)을 넣어 용해시키고 pH 를 7.2 로 조절하여 전체량이 1ℓ가 되도록 하였다. 조제한 배지는 세균여과기로 여과한 후 최종농도가 10%가 되도록 fetal bovine serum 을 첨가하여 사용하였으며 각 세포는 37°C, 5% CO_2 배양기에서 주 2 회 계대 배양하였다.

2.5.2. 세포독성 시험

배양한 세포를 PBS buffer 로 세척하여 죽은 세포를 제거한 후 trypsin-EDTA 2ml 을 가한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 5~10 분간 방치하여 기벽에 붙은 세포를 떨어뜨리고 다시 PBS buffer 를 10ml 가하여 원심분리(1200rpm, 5min)를 하여 남아있는 trypsin-EDTA 를 제거하였다. 모아진 세포를 RPMI 1640 배지로 희석하여 2×10^4cells/ml 로 조절하고 이 희석세포액을 96 well plate 에 100 μℓ씩 분주하여 24 시간 배양하였다. 그 후 시료는 최종농도가 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 μg/㎖이 되도록 RPMI1640 (FBS free) 100 μℓ에 현탁하여 가한 후에 48 시간 더 배양한 후 배양액에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 50 μℓ를 가하여 2 시간 동안 cell 을 고정시키고 증류수로 세척하였다. Plate 를 건조시킨 후 0.4% (W/V) sulforhodamine B (in 1% acetic acid) 50 μℓ를 가하여 15~30 분간 부착된 cells 을 염

색하였다. 염색시약은 1% acetic acid 로 세척하여 제거하고 plate 를 다시 건조시켰다. 세포에 결합하여 있는 염색시약은 10mM tris base (pH 10.5) 50 ㎕를 가하여 용해하였으며, microplate reader 570 ㎚에서 흡광도를 측정하여 세포 독성을 측정하였다. 실험은 3 회 이상 반복하여 각각의 평균을 구하여 ED_{50} 값을 산출하였다.

1) ED_{50} 값의 결정과 세포독성의 판단

ED_{50} 값은 대조군의 50 % 수준으로 각 세포의 성장을 억제하는 시료의 농도로 주어지며, Thayer [28] 등의 방법에 의해 결정하였다. 시험군의 각 농도에 대한 성장률 Y(%)는 다음과 같이 계산하였다.

$Y(\%) = [(T-C_0)/(C-C_0)]\times 100$;

T : 시험군의 48 시간 배양 후 평균세포수 (cells/ml)

C : 대조군의 48 시간 배양 후 평균세포수 (cells/ml)

C_0 : 배양시작시 평균세포수 (cells/ml)

각각 농도의 Y(%)값과 $\log_{10}$ dose 를 도식화하고 다음과 같은 식에 의해 회기선을 구했다.

$$B\ (slope) = \frac{N\Sigma(Xi\times Yi)-(\Sigma Xi)\times(\Sigma Yi)}{N\Sigma(Xi)^2\times(\Sigma Xi)^2}$$

$$A\ (\text{intercept}) = \frac{\Sigma Yi}{N} \times B \quad \frac{\Sigma Yi}{N}$$

N = number of points selected [1≤ number of dose level ≥2]

Xi = $\log_{10}$ dose i

Yi =growth ratio calculated dose I

이렇게 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 Y = A + BX **를 얻었다. 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터** ED_{50} **값을 계산하였다.**

50 = A + B($\log_{10}$ ED_{50})

$\log_{10}$ ED_{50} = (50-A)/B

ED_{50} =10 $^{\log 10\ ED50}$

2.6. 항바이러스 효과의 측정

2.6.1. 세포배양

HeLa (human cervix epitheloid carcinoma cell), HuT 78 (human cutaneous T-cell lymphoma), CCRF-CEM (human peripheral blood, acute lymphoblastic leukemia), MOLT-4 (human peripheral blood, acute lymphoblastic leukemia), MT-4 (human T-cell transformed by co-cultivating with leukemia lymphocytes harbouring HTLV-1), H9 (human cutaneous T-cell), HEL 299 (human embtyonic lung fibroblast cell) 세포는 37°C, 5% CO_2 배양기에서 증식시켰다.

HuT 78 (human cutaneous T-cell lymphoma), CCRF-CEM (human peripheral blood, acute lymphoblastic leukemia), MOLT-4 (human peripheral blood, acute lymphoblastic leukemia) MT-4(human T-cell transformed by co-cultivating with leukemia lymphocytes harbouring HTLV-1), H9 (human cutaneous T-cell) 세포의 배양액은 3 차증류수 900ml 에 RPMI medium, $NaHCO_3$ 2g, 4㎍/㎖ gentamycin(Gm)을 넣어 용해시키고 pH 를 7.2 로 조절하여 전체량이 1 ℓ 가 되도록 조제하였다.

HeLa (human cervix epitheloid carcinoma cell)세포의 배양액은 3 차증류수 900 ㎖에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), $NaHCO_3$ 3.7g, 4 ㎍/㎖ gentamycin(Gm)을 넣어 용해시키고 pH 를 7.2 로 조절하여 전체량이 1 ℓ 가 되도록 조제하였으며 HEL 299 (human embtyonic lung fibroblast cell)세포의 배양액은 3 차증류수 900 ㎖에 불필수 아미노산이 포함된 Earle's minimun essential medium (MEM), $NaHCO_3$ 2.2g, 4 ㎍/㎖ gentamycin(Gm)을 넣어 용해시키고 pH 를 7.2 로 조절하여 전체량이 1 ℓ 가 되도록 조제하였다. 각각 조제한 배지는 세균여과기로 여과한 후 최종농도가 10%가 되도록 fetal bovine serum 을 첨가하여 사용하

였으며 세포배양 후 3~4 일 간격으로 세포를 원심분리 시킨 다음, 세포수가 3×10^5cells/㎖이되도록 희석하여 계대하였고, HEL 299 세포의 경우는 일주일 간격으로 trypsin 처리하여 계대하였으며 계대회수가 20 번이 지나면 폐기하였다.

2.4.2. 바이러스의 증식

RNA 바이러스들은 HeLa 세포에서, HCMV 는 HEL 299 세포에서 증식되어 숙주세포단층이 형성되면 배양액을 제거하였다. 바이러스를 Dulbecco's modified Eagle (DME)배지/2% FBS 에 희석하여 1.5 ㎖ 바이러스 희석액에 세포 한 개마다 0.1 M.O.I (multiplicity of infection)이 되도록 접종하였다. 37°C, 5% CO_2 배양기에서 RNA 바이러스들은 30 분, HCMV 의 경우 2 시간 동안 흡착시킨 후 배양액을 제거함으로서 세포에 흡착되지 못한 바이러스들을 제거하였다. DME/2% FBS 를 6 ㎖ 첨가한 후 70%의 세포가 CPE (cytopathic effect)를 나타낼 때까지 계속 배양한 후 세포와 배양액을 회수하여 시험관에 넣었다. -70°C 에서 얼리고 37°C 에서 녹이는 작업을 세번 시행한 후 4°C, 5000rpm 으로 20 분간 원심분리하였다. 상등액을 소량씩 용기에 분주한 후 -70°C 에 바이러스 종균액으로 보관하였고, 실험직전에 바이러스를 37°C 에서 신속히 녹여 사용하였다.

HIV 는 배양된 H9, Hut 78 등의 여러 가지 세포에 영구 감염시켜 증식시켰다. 세포를 원심 분리시켜 상등액을 제거한 후 바이러스를 세포에 접종시켜 세포수가 3×10^5cells/㎖이 되도록 배양액을 첨가한 다음 필요에 따라 계속 계대하였다. 바이러스 회수는 세포배양액을 4°C, 2000rpm 으로 10 분간 원심분리 시킨 다음 상등액을 1 ㎖씩 나누어 분주한 후 액체질소 또는 -70°C 에 바이러스 종균액으로서 보관하였고, 실험직전에 바이러스를 37°C 에서 신속히 녹여 사용하였다.

2.4.3. 바이러스 역가 측정

바이러스 종균액의 역가를 알기 위하여 RPMI/10%FBS 로 종균액을 1:10 으로 연속 희석하였다. RNA 바이러스는 96 well plate 에 confluent 하게 배양된 세포단층에 well 당 100 ㎕씩 희석된 종균액을 접종하고 30 분동안 흡착시킨 후 100 ㎕의 배양액을 첨가하였다. 37°C, 5% CO_2 배양기에서 2 일간 배양한 후 MTT 방법을 이용하여 $CCID_{50}$(50% cell culture inhibitory dose)을 측정하였다.

HIV 는 96 well plate 에 well 당 100 ㎕씩 희석된 종균액을 가하고 1.5×10^5cells/㎖로 희석된 MT-4 세포 100 ㎕를 첨가하였다. 5 일간 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양한 다음 현미경관찰과 MTT 시험법을 병행하여 $CCID_{50}$ 값을 구하였다.

HCMV 는 96 well plate 에 배양된 세포단층에 well 당 100 ㎕씩 희석된 종균액을 접종하고 2 시간 동안 흡착시킨 후 100 ㎕의 배양액을 첨가하였다. 37°C, 5% CO_2 배양기에서 7 일간 배양한 후 Giemsa 염색한 다음 현미경으로 CPE 를 관찰하거나, FDA 를 첨가한 후 형광측정방법을 이용하여 $CCID_{50}$ 를 측정하였다.

2.4.4. 항 poliovirus 약효검색

약물의 항 poliovirus 약효는 virus induced cytopathic effect (CPE) 저해법으로 평가하였다. 즉 96 well plate 에 HeLa 세포를 증식시킨 다음 DME/2% FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well 에 접종량이 $100\times CCID_{50}$ 가 되도록 100 ㎕씩 접종하고 1 시간 동안 37°C 에서 흡착시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate 로 각 well 에 100 ㎕씩 첨가하고 37°C, 5% CO_2 배양기

에서 2일 배양한 후 MTT 검색법으로 50%의 세포를 살아 남도록 한 약물의 농도를 결정하였다. 약효평가 결과에 미치는 약물의 독성에 의한 영향을 알 수 있도록 바이러스 접종시 바이러스가 첨가되지 않은 배양액을 세포에 가하여 (mock-infected) 바이러스로 접종된 세포와 같은 방법으로 처리하였다. 즉, 한 시간 배양 후 배지를 제거하였고 배양액에 희석된 약물을 duplicate 로 첨가하였다. 3일 배양 후 MTT 검색법으로 약물이 첨가된 각 well 의 살아 남은 세포수를 약물이 첨가되지 않은 세포 control 과 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 약물의 농도를 CC_{50}(50% cytotoxic concentration)으로 결정하였다.

2.4.5. 항 coxsackie B virus 약효검색

앞서 기술된 항 polio virus 약효검색방법과 동일하게 시험하였다.

2.4.6. 항 vesicular stomatitis virus 약효검색

앞서 기술된 항 polio virus 약효검색방법과 동일하게 시험하였다.

2.6.7. 항 HIV 약효검색

약효검색은 polio virus 와 같이 96 well plate 를 이용한 CPE 저해법을 이용하였다. 시료를 RPMI/10% FBS 에 시험농도의 2배로 희석시키고, plate 의 각 well 당 100 ㎕씩 세로로 6개의 well 에 넣었다 (2 well 은 항 HIV-1(IIIb) 검색용, 2 well 은 항 HIV-2 (ROD)검색용, 2 well mock-infected 용). 테두리 well 들은 blank 로서 이용하였고 cell control, virus control 과 blank 를 위한 well 에는 배양액만을 넣었다. 10^6 cells/㎖로 자란 MT-4 세포를 항 HIV 검색용과 mock-infected 용으로 분리하여 시험관에 넣은 다음 1200rpm 에서 3분간 원심분리 시켰다. 침전된

세포들을 mock-infected 는 그대로, 항 HIV 검색용에는 100×$CCID_{50}$ 의 바이러스 종균액을 넣어준 다음 RPMI/10% FBS 를 더하여 세포수가 1.5×10^5cells/㎖ 되도록 희석하였다. blank 를 제외한 모든 well 에 세포만, 또는 HIV 에 감염된 세포들을 100 ㎕씩 넣어준 다음 37°C, 5% CO_2 배양기에서 5 일간 배양하고 MTT 검색법으로 항 바이러스 약효와 약물의 독성을 평가하였다.

2.6.8. 항 HCMV 약효검색

약물의 항 HCMV 약효는 앞서와 같이 96 well plate 를 이용한 CPE 저해법으로 평가하였다. 성장이 멈춘 HEL 299 세포에 희석된 바이러스를 96 well plate 의 well 당 2~4×$CCID_{50}$ 가 되도록 100 ㎕씩 접종시키고 2 시간동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 흡착시켰다. 바이러스액을 제거하고 RNA 바이러스와 같이 약물을 100 ㎕씩 duplicate 로 첨가한 후 일주일동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 세포를 고정시키고 Giemsa 염색액으로 세포를 염색한 후 FDA 를 이용한 형광분석법으로 관찰하여 50%의 세포가 바이러스에 의한 CPE 를 나타내지 않는 약물의 농도를 EC_{50} 으로 산출하였다.

2.6.9. 세포독성 평가

약물의 cytostatic effect 를 알기 위하여 96 well plate 에 2.5×10^5 cells/㎖로 희석된 세포를 각각 100 ㎕씩 넣고 1 일간 배양한 배양액에 각 농도로 희석된 시료를 첨가한 다음 3 일간 더 배양하고 MTT 검색법을 이용하여 CC_{50} 을 결정하여 약물의 독성을 조사하였다. Cytocidal effect 관찰을 위해서는 동량의 세포를 넣고 3 일간 배양하여 완벽한 세포단층을 이루게 한 다음 약물을 첨가하고 3

일간 더 배양하여 이미 성장이 멈춘 세포에 주는 CPE 효과를 평가하였다.

2.6.10. MTT 검색법

MTT 검색법은 살아남은 세포의 mitochondrial dehydrogenase 가 노란색을 띤 MTT 를 보라색을 지닌 formazan 으로 환원시키고, 이 생성물을 유기용매로 녹여 흡광도를 측정하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 상대적으로 비교하는 것이다.[29] 배양이 끝난 후, 침전된 세포는 바닥에 남아 있도록 세포의 배양액을 50 ㎕만 남기며 상등액을 조심스럽게 제거한다. PBS 에 7.5 ㎎/㎖로 희석된 MTT 액을 96 well plate 의 well 당 20 ㎕씩 넣어준 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 1 시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100 액을 100 ㎕씩 각 well 에 넣어준 후 교반기를 이용하여 formazan 결정들을 완전히 녹이고 microplate reader 를 이용하여 540nm 와 690nm 에서의 흡광도를 읽었다. A_{540} 과 A_{690} 의 흡광 편차에서 blank 값을 뺀 다음 cell control 과 virus control 을 비교하고 % survival 을 구하여 약물이 끼치는 세포독성 Y(%)와 항바이러스 효과 Z(%)는 다음과 같은 식에 의하여 계산하였다.

$$Y(\%) = \frac{A_{con} - A_{sam}}{A_{con} - A_{bla}} \times 100$$

$$Z(\%) = \frac{A_{vsa} - A_{vco}}{A_{con} - A_{vco}} \times 100$$

A_{con} = absorbance of cell control

A_{sam} = absorbance of sample only

A_{bla} = absorbance of blank

A_{vsa} = absorbance of sample and virus

A_{vco} = absorbance of virus control

이상과 같은 방법으로 구한 항바이러스 효과 값으로부터 EC_{50} (50% effective concentration)**과 세포독성 값으로부터** CC_{50} (50% cytotoxic concentration)**을 구한 후** selectivity index (SI = CC_{50}/EC_{50})**를 구하였다**.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1.수종식물의 IL-6 생성 촉진 효과

무작위로 선별한 약 60 여종의 MeOH 엑스가 IL-6 를 생성하는 MC3T3-E1(cloned-derived murine osteoblast –like cell) cell 에서 IL-6 의 생성을 증가시키는 정도를 IL-1α를 기준물질로 하여 측정하였다(Table 1). 시료를 처리하여 24 시간 배양 후에 상등액 중 일부를 취하여 생성된 IL-6 를 ELISA 법으로 정량한 결과, 문주란의 MeOH 엑스가 다른 식물의 MeOH 엑스보다 월등한 IL-6 생성 촉진 효과를 나타내었으며, 세포내 신호전달과정에서 IL-6 생성을 촉진시킨다고 알려진 IL-1α(100pg/㎖)의 5197 pg/㎖ 에 비하여도 유의성있는 IL-6 생성 촉진 효과를 보였다.

Table 1. Activity of MeOH extracts on production of IL-6 with MC3T3-E1

Scientific Name	Korean name	Family	Part	IL-6 (pg/ml)
Achylanthes japonica	우슬	Amaranthaceae	뿌리	98.9
Adonis amrensis	복수초	Ranunculaceae	전초	1624.6
Agrimonia pilosa	짚신나물	Rosaceae	전초	242.5
Ajuga multiflora	조개나물	Labiatae	전초	-
Akebia quinata	으름덩굴	Lardizabalaceae	자상부	-
amelampyrum roseum	꽃며느리밥풀	Scropulariaceae	전초	-
Angelica tenuissima	고본	Umbelliferae	뿌리	-
Aralia cordata	독활	Araliaceae	줄기	-
Arisaema amurense	천남성	Araceae	열매	1732.3
Artemisia capillaris	사철쑥	Compositae	지상부	-
Asarum sieboldii	족도리풀	Aristolochiaceae	전초	-
Atractylodes japonica	큰삽주	Compositae	뿌리	-
Broussonetia kazinoki	닥나무	Moraceae	줄기, 잎	-
Broussonetia kazinoki	닥나무	Maraceae	잎	-
Callicarpa japonica	작살나무	Umbelliferae	잎	-
Carpesium abrotanoides	담배풀	Compositae	전초	-
Carpesium divaricatum	긴담배풀	Compositae	지상부	-
Catalpa ovata	개오동나무	Bignoniaceae	열매	1786.2
Chelidonium majus var. asiaticum	애기똥풀	Papaverceae	지상부	-
Citrus unshiu	청피	Rutaceae	껍질	-
Clematis heracleifolia	조희풀	Ranunculaceae	지상부	9.1
Cnidium officinale	천궁	Umbelliferae	뿌리	-
Cocculus trlobus	댕댕이덩굴	Menispermaceae	줄기	-
Cornus walteri	말채나무	Cornaceae	지상부	439.9
Corus kousa	산딸나무	Cornaceae	줄기, 잎	-
Crinum asiaticum var. japonicum	문주란	Amarylidaceae	지하부	19449.0
Disporium smilacinum	애기나리	Liliaceae	전초	-

Table 1. (continued)

Scientific Name	Korean name	Family	Part	IL-6 (pg/ml)
Eupatorium chinense var. simplicifolium	등골나물	Compositae	전초	-
Eupatorium lindleyanum	골등골나물	Compositae	지상부	-
Euscaphis japonica	말오줌대	Buxaceae	줄기	1122.0
Gardenia jasminoides	치자	Rubiaceae	열매	-
Heracleum moellendorffii	어수리	Umbelliferae	뿌리	-
Hydrocharis asiatica	자라풀	Hydrocharitaceae	전초	-
Juglans mandshurica	가래나무	Juglandaceae	잎	-
Ledebouriella seseloides	방풍	Umbelliferae	뿌리	-
Lespedeza maritima	해변싸리	Leguminosae	전초	-
Lindera obtusiloba	생강나무	Lauraceae	줄기, 잎	-
Lycopus lucidus	쉽싸리	Labiatae	전초	-
Magnolia kobus	목련	Magnoliaceae	종자	-
Meehania urticifolia	벌깨덩굴	Labiatae	전초	-
Mosla puntulata	들깨풀	Labiata	전초	-
Pedicubiris resupinata	송이풀	Scrophulariaceae	전초	-
Peucedanum terebinthareum	기름나물	Labiatae	지상부	-
Philadelphus schrenckii	고광나무	Saxiferagaceae	잎	-
Physaliastrum japonicum	가시꽈리	Solanaceae	지상부	-
Pittosporum tobira	돈나무	Pittosporaceae	열매	4263.3
Pleuropterus cilinervis	나도하수오	Polygonaceae	뿌리	-
Polygonatum odoratum var. pluriforum	둥글레	Liliaceae	전초	-
Pyrola japonica	노루발	Pyrolaceae	전초	1570.8

Table 1. (continued)

Scientific Name	Korean name	Family	Part	IL-6 (pg/ml)
Rubia akane	꼭두서니	Rubiaceae	전초	-
Salvinia natans	생이가래	Salviniaceae	전초	1409.2
Sauaaurea pulchella	각시취	Compositae	전초	-
Scirpus flaviatilis	삼릉	Cyperaceae	뿌리	-
Senecio argunensis	쑥방망이	Compositae	전초	-
Sinomenium acutum	방기	Menispermaceae	뿌리	-
Smilax china	청미래덩굴	Liliaceae	지상부	-
Sorbaria sirbifolia	쉬땅나무	Rosaceae	지상부	-
Staphylea bumalda	고추나무	Celastraceae	잎	-
Thalictrum aquilegifolium	꿩의다리	Ranunculaceae	지상부	-
Thea sinensis	차나무	Theaceae	잎	-
Trapa japonica	마름	Lythraceae	전초	-
Trichosanthes kirilowii	하늘타리	Cucurbitaceae	전초	-
Tripterygium regelii	메역순나무	Celastraceae	줄기, 잎	-

* sample concentration : 100㎍/㎖

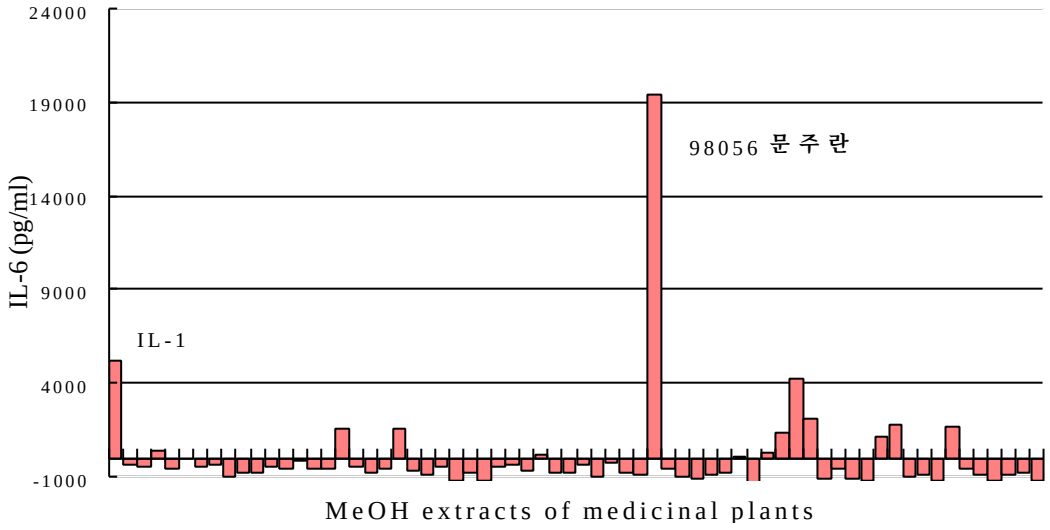


Chart 1.Activity of MeOH extracts on production of IL-6 with MC3T3-E1

2. 문주란으로부터 활성물질의 분리정제

2.1. Compound 1

이 화합물은 BuOH 분획을 C. C.하여 얻은 분획 중 CA-24-C 분획을 산-알칼리 추출하여 얻은 알칼로이드 분획 CA-24-C-A 에서 분리되어진 화합물로 100% acetone 에서 재결정하여 백색의 광택이 있는 침상 결정으로 얻어졌다. Compound 1 은 mp 196~197 ℃, $[\alpha]_D^{20}$ +33.3° 를 나타내었으며 UV λ_{max} 212, 294 ㎚에서 최대 흡수 극대를 나타내었다. ESI(+)-mass spectrum 에서 m/z 302 $[M+H]^+$의 peak 이 관찰되므로 분자량은 301 임을 알 수 있었다. ^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) 에서 δ 6.52 와 6.84 에서 각각 singlet 으로 보이는 두 개의 H 은 aromatic ring 에 존재하는 *para* 위치의 protons 으로 예상하였으며, δ 6.27 에 나타난 하나의 proton 은 δ 6.07 에 위치한 proton 에 인접하여 10.2 ㎐의 coupling constant 를 갖는 doublet 으로 서로 *cis* 위치에 있음을 알 수 있었다. δ 5.37 에서는 강한 singlet 으로 methylenedioxy group(-OCH_2O-)의 두개의 protons 이 관찰되었다. 또 하나의 강한 singlet 이 δ 3.38 에서 관찰되어지는데 이는 aliphatic methoxy group (-OCH_3)에 있는 세 개의 protons 으로 생각되어졌다. 또한 δ 3.72 와 δ 4.27 에서는 coupling constant 가 16.8 ㎐로 매우 큰 한 쌍의 proton 이 나타나는데, 이는 짝 지움 상수에 근거해 germinal coupling 을 하는 methylene group (-CH_2)으로 예상하였다. ^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD)에서는 17 개의 탄소가 관찰되며 δ 100 이상에서 관찰되는 8 개의 탄소는 1 개의 aromatic ring 과 한 쌍의 이중결합으로 예상하였다. DEPT spectrum 에서 는 4 개의 – CH_2, 1 개의 –CH_3 를 확인 할 수 있었으며, δ 55.79 에 나타난 methoxy group (-OCH_3)을 확인할 수 있었다. 이상의 data 를 종합하여 Compound 1 의 구조를 추정하고 문헌의[30] data 와 비교하여 볼 때 Compound 1 은 (+)-crinamine 으로 동정하였다.

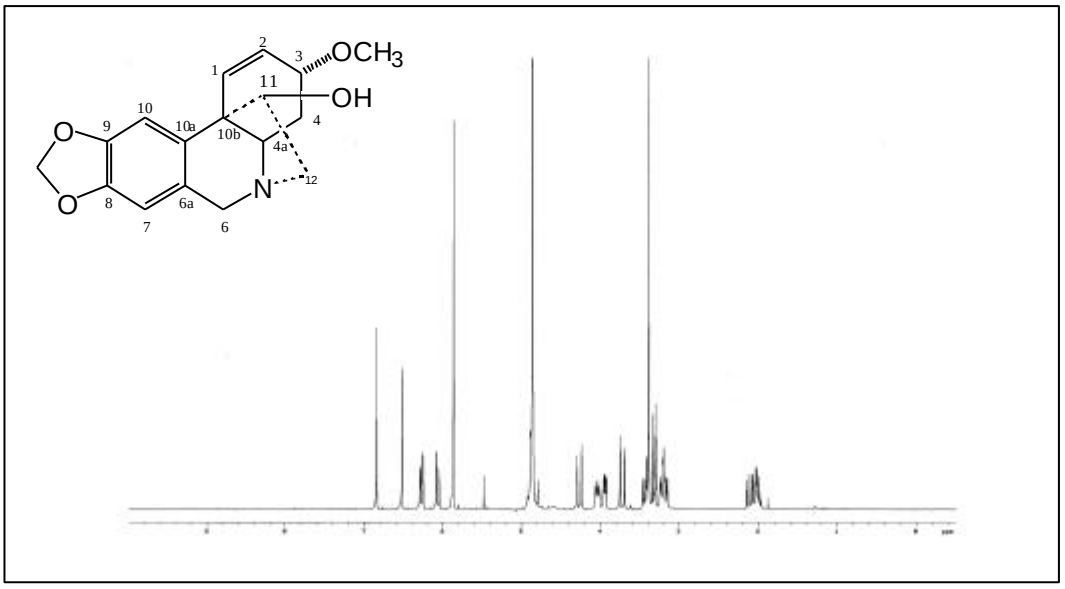


Fig. 2. ^{1}H-NMR spectrum of compound 1 (300 ㎒, CD_3OD).

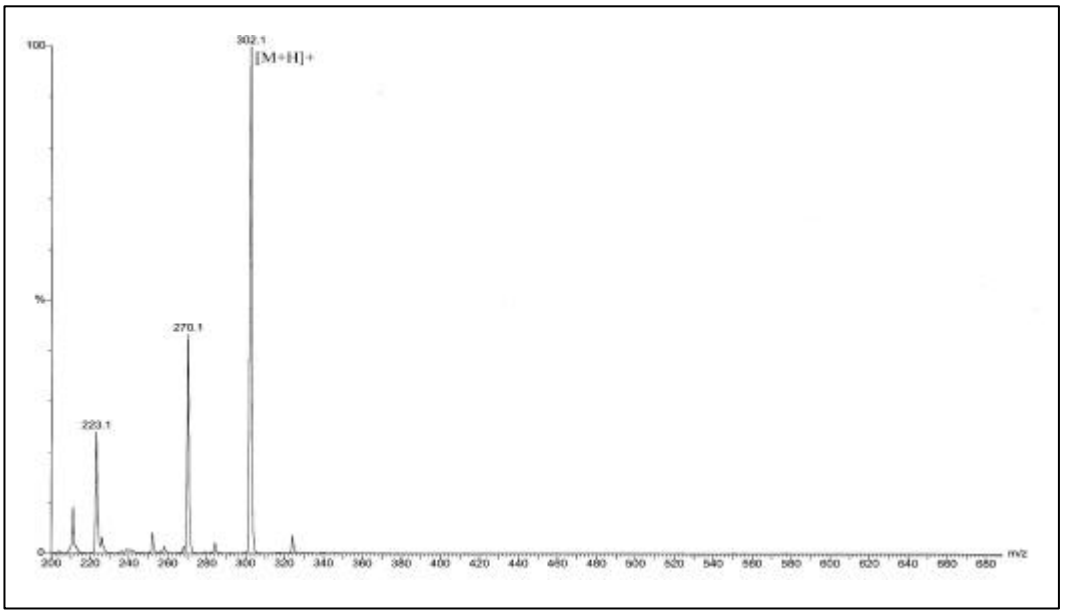


Fig. 3. Positive ESI-mass spectrum of compound 1.

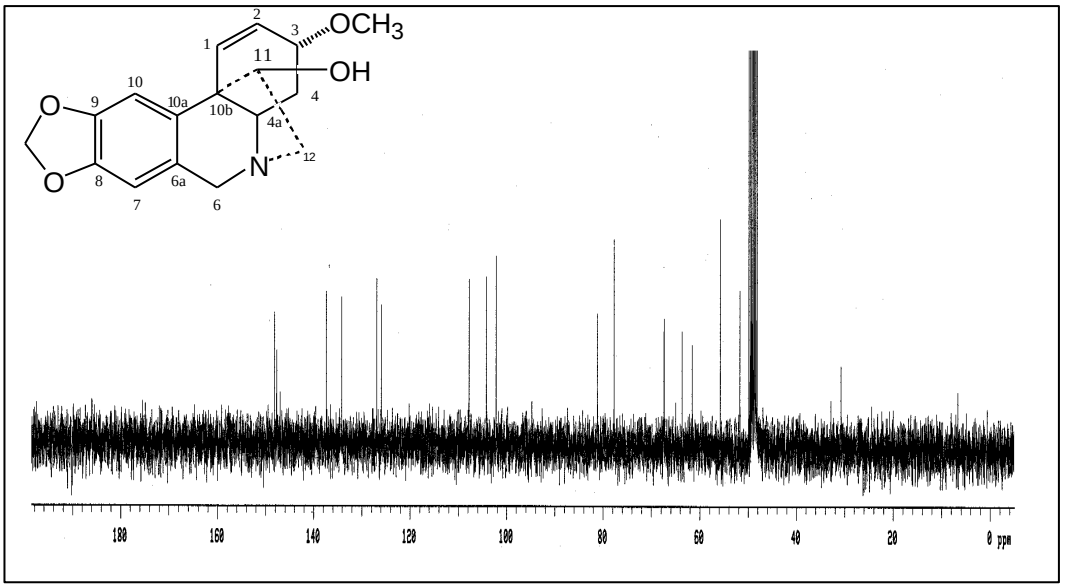


Fig. 4. ^{13}C-NMR spectrum of compound 1 (75 MHz, CD_3OD).

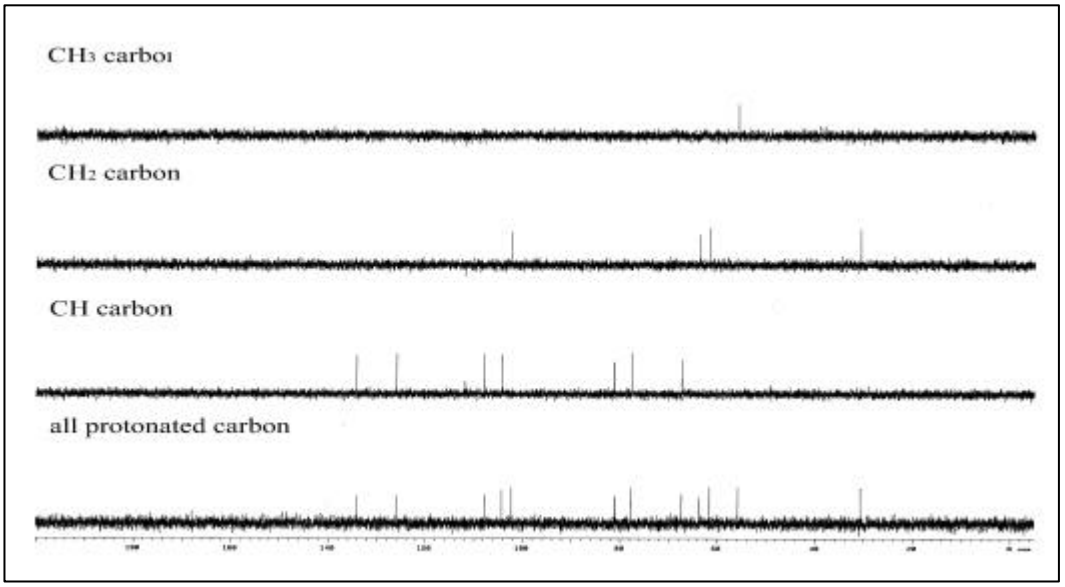


Fig. 5. DEPT spectrum of compound 1 (75 MHz, CD_3OD).

2.2. Compound 2

이 물질은 BuOH 분획을 C. C.하여 얻은 CA-24-D 분획을 산-염기 추출에 의해 얻어진 알칼로이드 분획 CA-24-D-A 로부터 분리된 화합물로 acetone 및 MeOH 에서 재결정하여 백색의 광택이 나는 침상 결정을 얻었다. Mp 179~181°C 이며 $[\alpha]_D^{20}$ –65.5°, UV λ_{max} 278, 288 ㎚ 로 측정되었으며 FAB(+)-mass spectrum 에서 m/z 274 $[M+H]^+$의 peak 이 관찰되므로 분자량은 273 임을 알 수 있었다. ^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) 에서 δ 2.52 와 δ 2.18 에서 coupling constant 가 15.8 ㎐인 germinal coupling 을 하는 2 개의 protons 이 관찰되며 δ 3.83 에서 강한 singlet 으로 나타나는 세개의 protons 은 methoxy group (-OCH_3)으로 예상하였다. δ 6.02 와 δ 6.16 에서 각각 10.3 ㎐의 coupling constant 가 관찰되는 것으로 보아 *cis* 관계에 있는 이중결합 한 쌍이 있음을 예상할 수 있었다. δ 6.83 과 δ 6.86 에서 나타나는 8.3 ㎐의 coupling constant 는 aromatic ring 에 존재하는 *ortho* 관계의 두 개의 protons 에 의한 것으로 생각하였다. ^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD)에서는 16 개의 탄소가 관찰되었으며 δ 100 이상에서 관찰되는 8 개의 탄소는 ^{1}H-NMR 의 data 에 근거하여 한 개의 aromatic ring 과 한 쌍의 이중결합으로 예상하였으며 δ 56.66 에 위치한 methoxy group 임을 관찰할 수 있었다. DEPT spectrum 에서는 4 개의 사급탄소와 4 개의 CH_2, 2 개의 CH 가 있는 물질임을 알 수 있었다. 이상의 data 를 종합하여 Compound 2 의 구조를 추정하고 문헌의[31] data 와 비교하여 본 결과 Compound 2 는 N-demethyl galanthamine 으로 동정하였다.

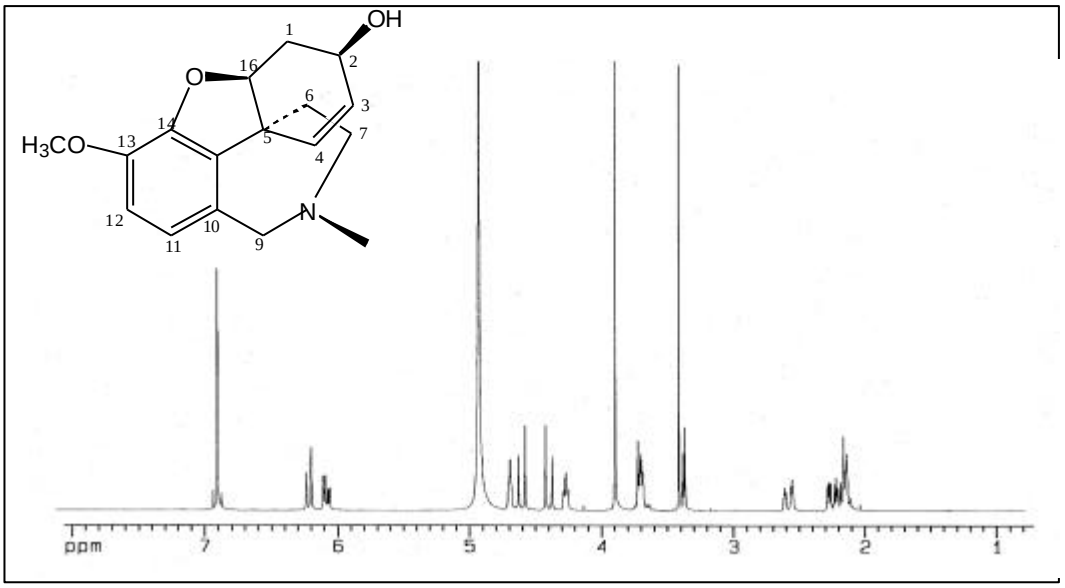


Fig. 6. ^{1}H-NMR spectrum of compound 2 (300 ㎒, CD_3OD).

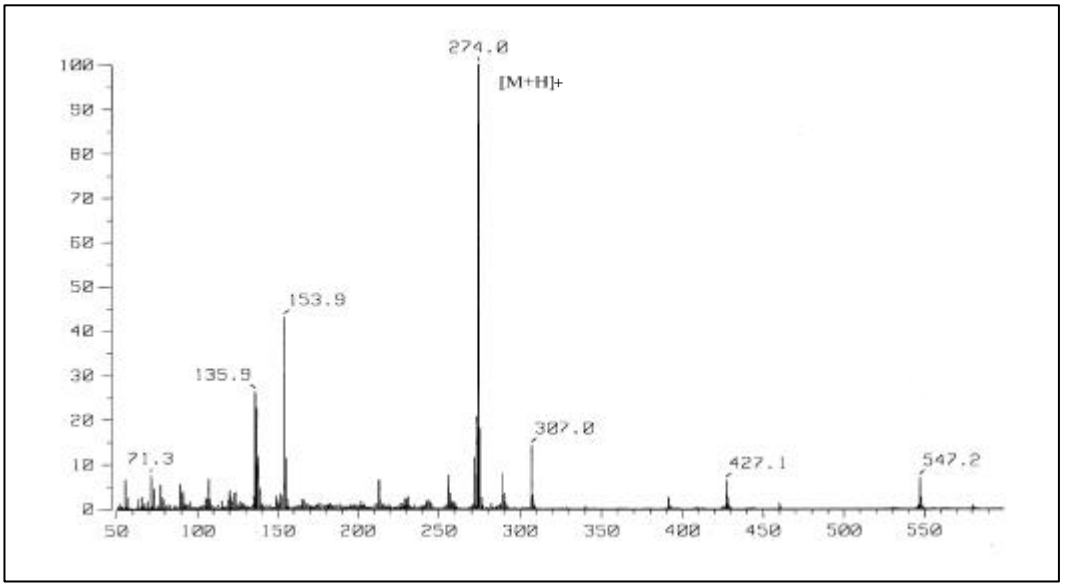


Fig. 7. Positive FAB-mass spectrum of compound 2.

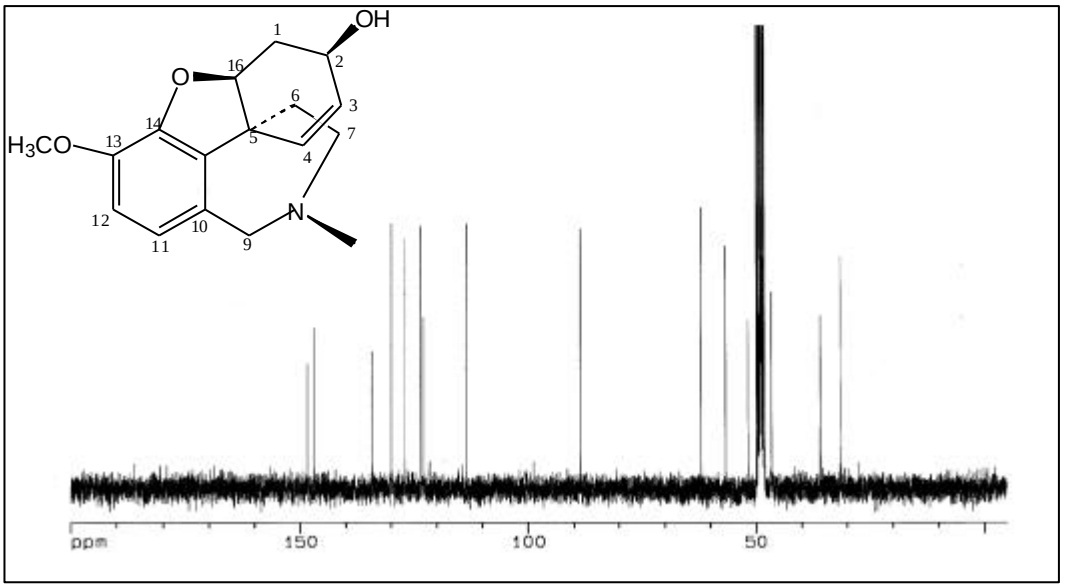


Fig. 8. ^{13}C-NMR spectrum of compound 2 (75 MHz, CD_3OD).

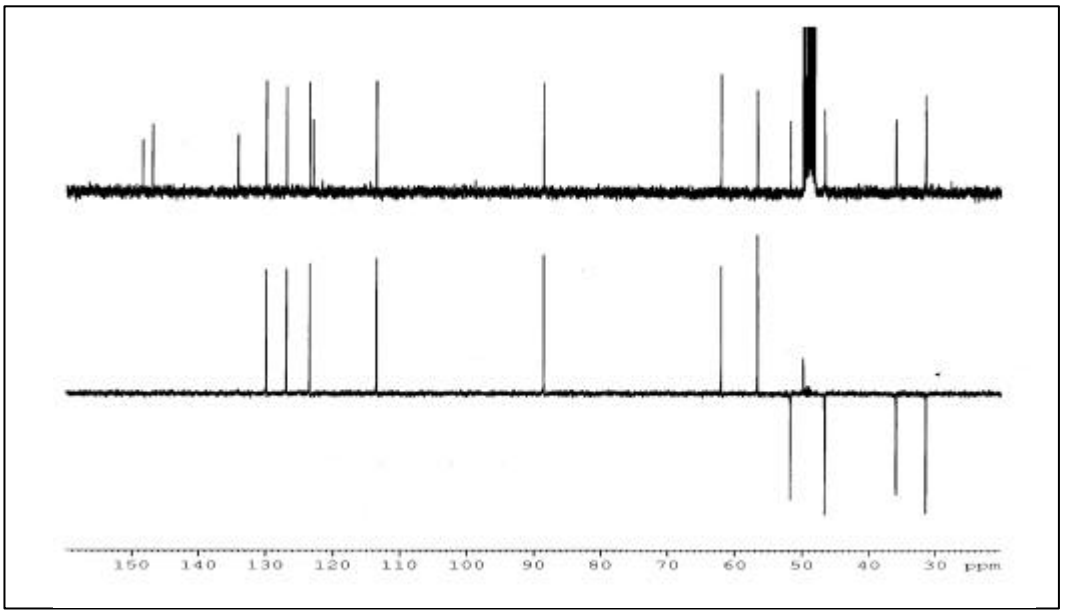


Fig. 9. DEPT spectrum of compound 2.

2.3. Compound 3

이 물질은 BuOH 분획을 C. C.하여 얻은 CA-24-D 분획을 산-염기 추출하여 얻은 알칼로이드 분획인 CA-24-D-A 로부터 분리된 화합물로 MeOH 에서 재결정하여 백색의 무정형 물질을 얻었다. $[\alpha]_D^{20}$ -133.3°, UV λ_{max} 210 ㎚ 로 측정되었으며 positive ESI-mass spectrum 에서 m/z 274 $[M+H]^+$의 peak 이 관찰되므로 분자량은 273 임을 알 수 있었다. ^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) 은 δ 4.04 와 δ 3.87 에서 dd 로 나타나는 9 번 proton 을 제외한 모든 peak 의 splitting 경향과 갯수가 compound 2와 일치하였다. ^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD)에서도 compound 2와 마찬가지로 16 개의 탄소가 관찰되었으며 그 갯수와 급수의 대응관계를 관찰할 수 있었다. 그러나 4, 6, 9, 11, 14 번 탄소가 compound 2와 비교하여 약 2~7ppm 정도의 차이를 보였다. 분자량의 일치 및 ^{1}H-,^{13}C-NMR spectrum 의 유사성과 물리적 data 의 상이성 그리고 compound 2와 차이를 보이는 탄소들의 전반적인 위치를 종합하여볼 때 compound 3 은 compound 2(5S,16S-N-demethylgalanthamine)와 epimer 관계에 있는 5S,16R-N-demethylgalanthamine 으로 추정하고 현재 정확한 입체배치를 확인중에 있다.

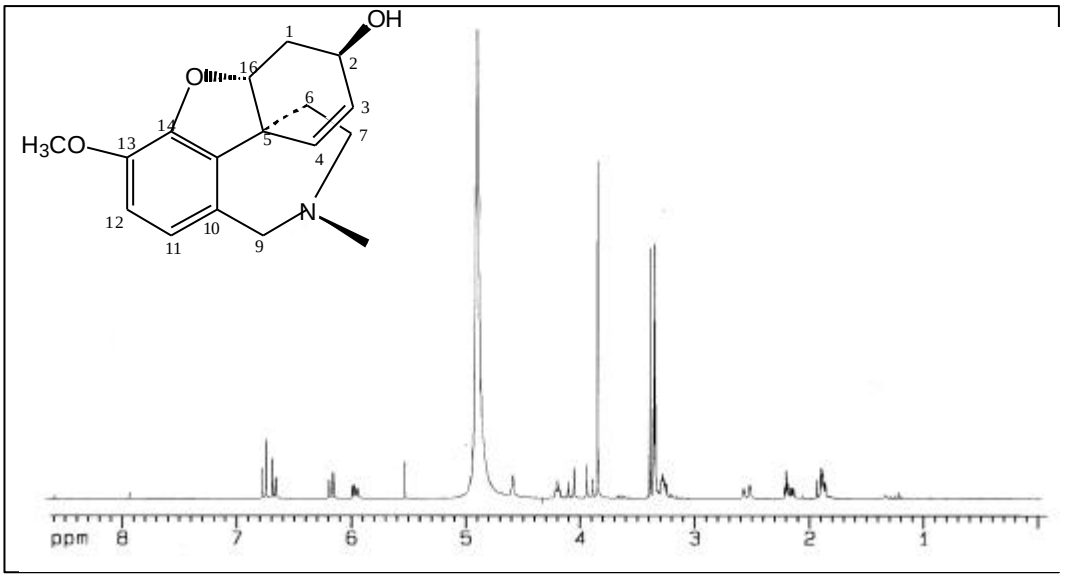


Fig. 10. ^{1}H-NMR spectrum of compound 3 (300 MHz, CD_3OD).

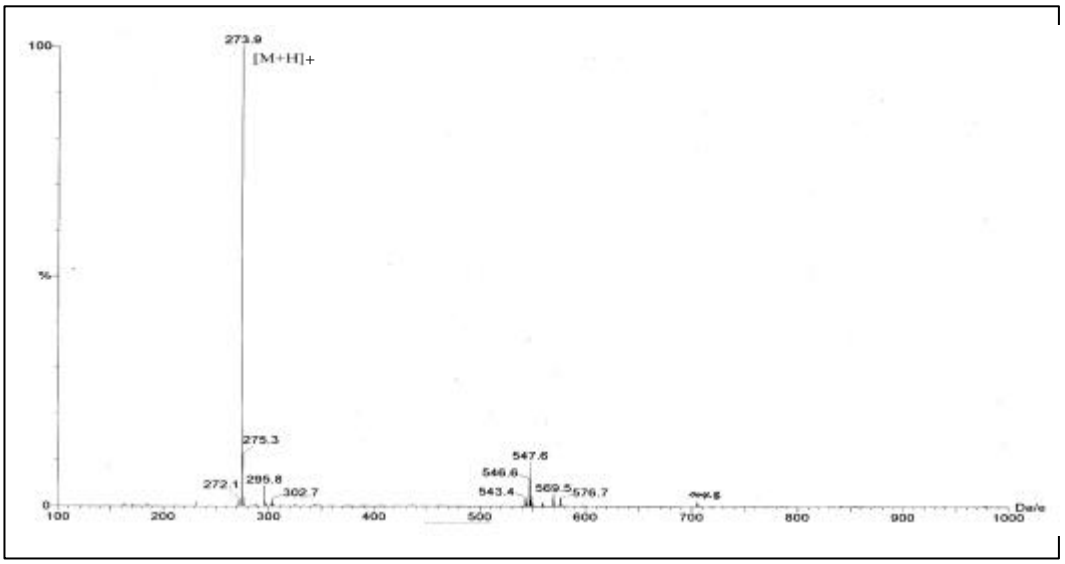


Fig. 11. Positive ESI-mass spectrum of compound 3.

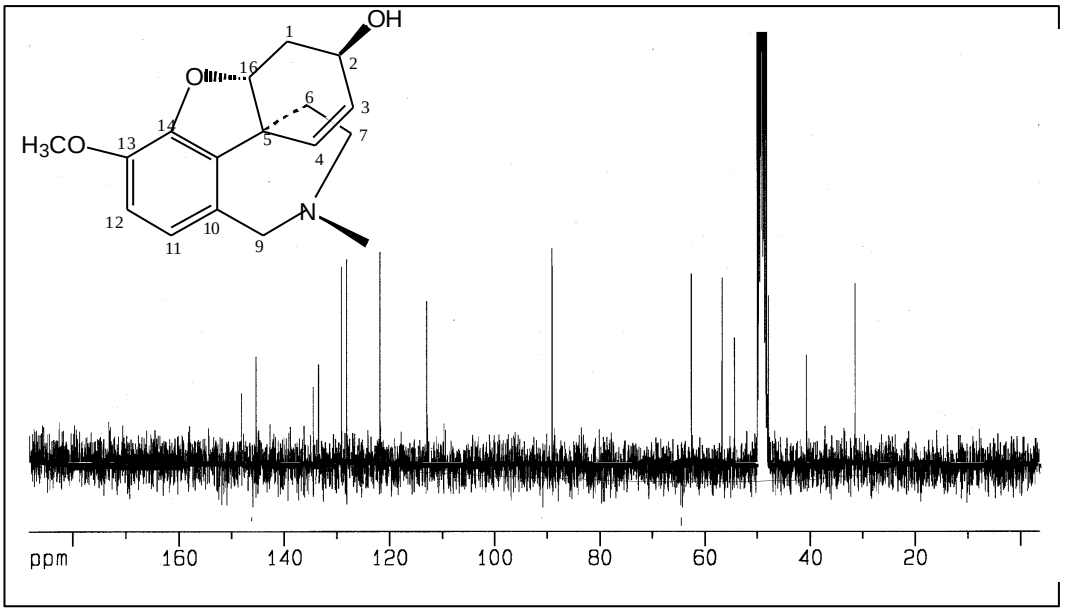


Fig. 12. ^{13}C-NMR spectrum of compound 3 (75 MHz, CD_3OD).

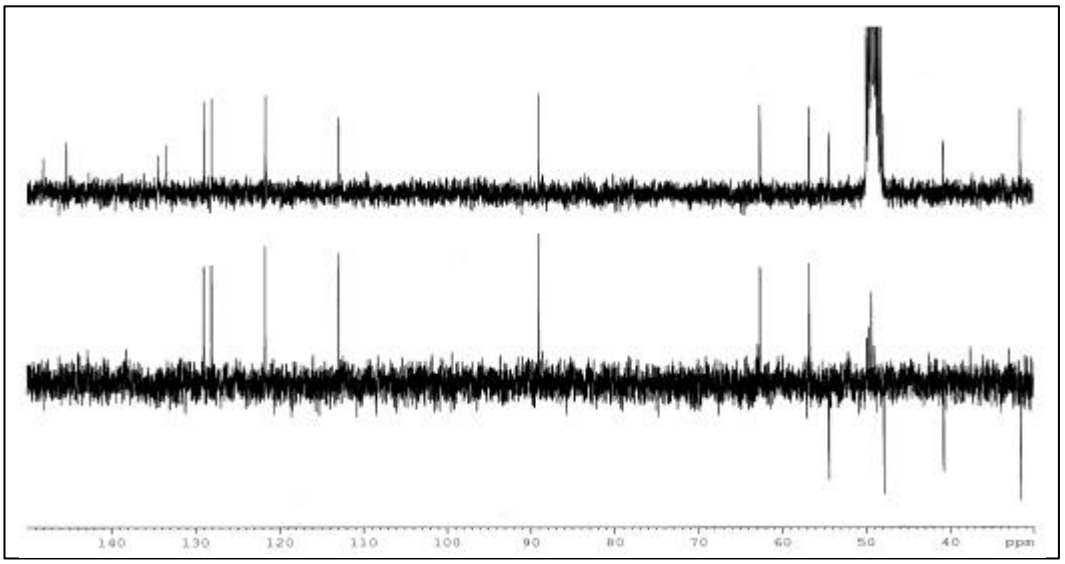


Fig. 13. DEPT spectrum of compound 3 (75 MHz, CD_3OD).

2.4. Compound 4

이 화합물은 BuOH 분획을 C. C.하여 얻은 CA-24-E 분획을 산-염기 추출하여 얻은 CA-24-E-A 에서 분리된 화합물로 $CHCl_3$ 및 MeOH 에서 재결정 된 백색의 침상물질로서 mp 223~228 °C 이며 $[\alpha]_D^{20}$ +233.3°, UV λ_{max} 228, 290 ㎚ 로 측정되었다. Positive FAB--mass spectrum 에서 m/z 288 $[M+H]^+$의 peak 이 관찰되므로 분자량은 287 임을 알 수 있었다. ^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) 에서 δ 4.01 과 δ 3.43 에서 관찰되는 coupling constant 10.83 ㎐인 두개의 protons 은 germinal coupling 을 하는 $-CH_2$ 로서 일반적인 $-CH_2$ 보다 downfield 에서 나타난 것으로 보아 N 또는 O 에 연결되었다고 예상하였다. δ 5.81 에서 metylenedioxy group(-OCH_2O-)의 2 개의 protons 을 관찰하였으며 δ 2.32~δ 2.53 에서는 H-10,11,12 의 다중피크가 중첩되어 나타나는 것을 확인하였다. H-1, 2, 10b 의 stereochemistry 는 Kittisak Likhitwitayawuid 등에 의한 보고치와 비교하여 확정하였다.[32] ^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD)에서는 16 개의 탄소가 관찰되었으며 CH_2 지역에서 관찰되는 8 개의 탄소에서 한 개의 aromatic ring 과 한 쌍의 이중결합 그리고 102.28 에서 나타나는 metylenedioxy group(-OCH_2O-)의 존재를 확인할 수 있었다. DEPT spectrum 에서 보여지는 δ 57.85 와 δ 54.70 에 위치한 CH_2 는 N 또는 O 에 연결되었다고 생각되었다. 이상의 data 를 종합하여 Compound 4 의 구조를 추정하고 문헌의[33] data 와 비교하여 본 결과 Compound 2 는 (+)lycorine 으로 동정하였다.

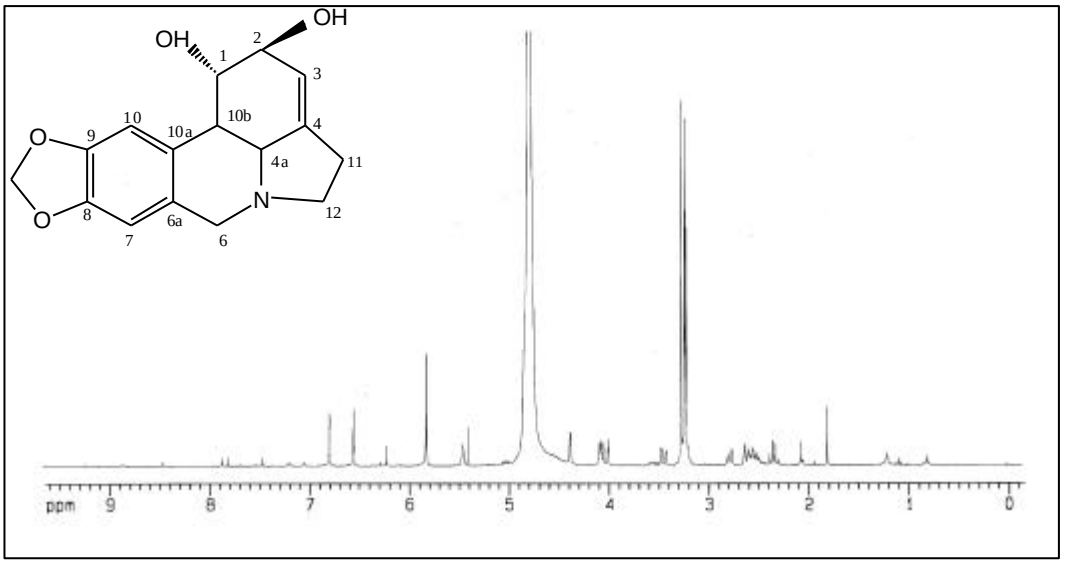


Fig. 14. ^{1}H-NMR spectrum of compound 4 (75 ㎒, CD_3OD).

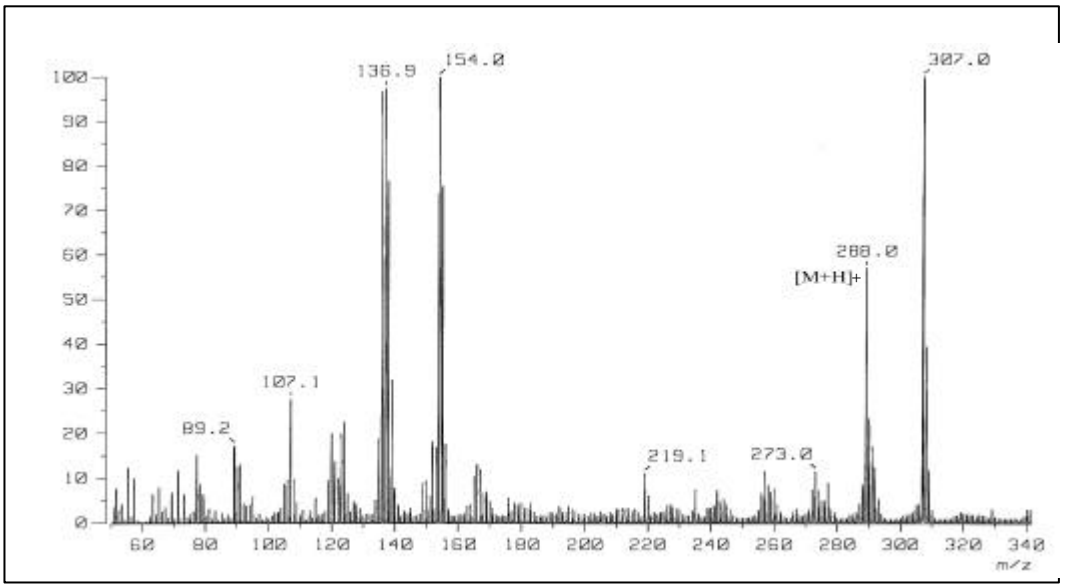


Fig. 15. Positive FAB-mass of compound 4.

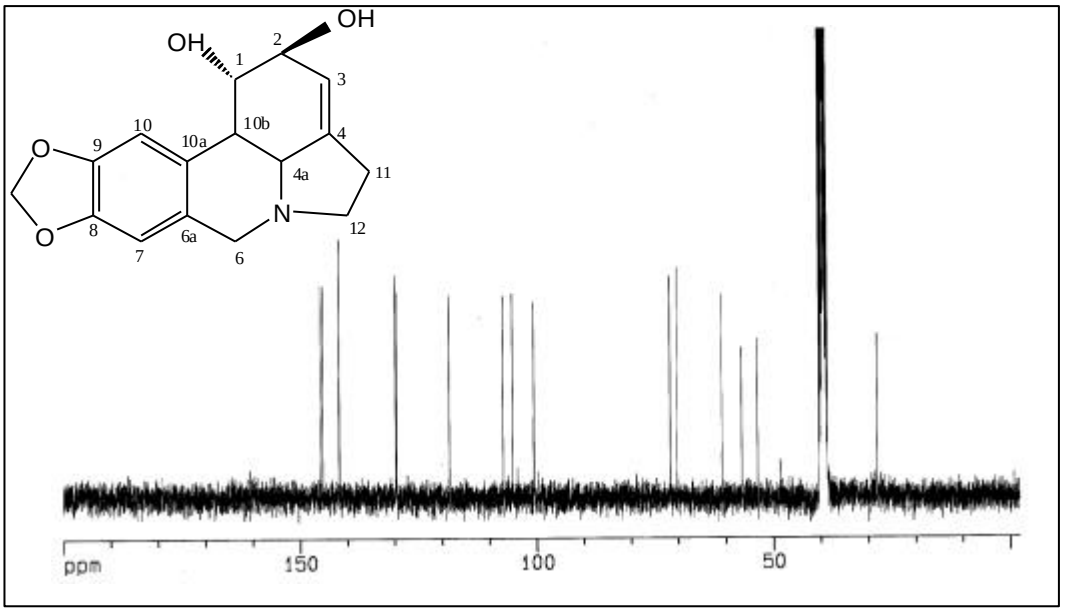


Fig. 16. ^{13}C-NMR spectrum of compound 4 (75 MHz, CD_3OD).

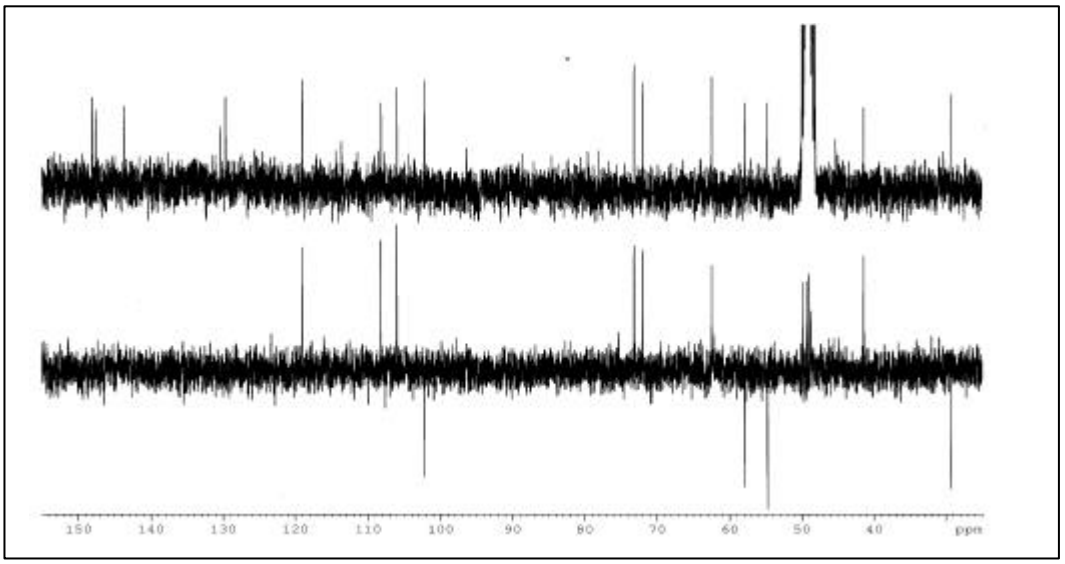


Fig. 17. DEPT spectrum of compound 4.

2.5. Compound 5

이 물질은 CH_2Cl_2 분획을 C. C.하여 얻은 CA-12-C 분획을 다시 hexane 과 EtOAc 를 이용하여 C. C.를 실시한 후에 Sepahdex LH-20 을 이용하여 정제한 화합물로 백색의 침상물질이다. Mp 186~187 ℃ 이며 $[\alpha]_D^{20}$ +60.0 º, UV λ_{max} 222, 280 ㎚ 로 측정되었으며 EI-mass 및 positive FAB-mass spectrum 의 결과 m/z 242 에서 $[M]^+$의 peak 이 관찰되므로 분자량은 242 임을 알 수 있었다. EI-mass spectrum 에서는 ring A 로부터 Retro-Diels-Alder(RDA) fragments 가 123(m/z)에서 관찰되어지며 ring B 로부터의 RDA fragments 는 120(m/z)에서 관찰되어지므로 A-ring 에서의 –OH 와 B-ring 에서의 –OH 의 존재를 확인할 수 있었다.[34] ^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) spectrum 에서 δ 7.21 과 δ 6.77 에서 관찰되는 doublet 은 각각 2 개 protons 의 peak 로서 aromatic ring 의 *ortho* 관계에 해당하는 8.7 ㎐와 *meta* 에 해당하는 2.7 ㎐를 coupling constant 를 가지고 있어 B-ring 에 4′-OH 를 중심으로 네 개의 H 이 2′, 3′, 5′, 6′ 에 위치하고 있는 대칭구조(A_2B_2)를 예상하였다. δ 6.85 에 나타나는 proton 은 coupling constant 가 8.0 ㎐로서 그로부터 *ortho* 관계에 있는 또 하나의 proton 의 존재를 예상하였으며 δ 6.3 에 나타난 dd 의 peak 가 8.0, 2.7 ㎐의 coupling constant 를 가진 것을 확인 할 수 있었다. 또한 δ 6.24 에 위치한 proton 에서 2.7 ㎐의 coupling constant 가 나타나므로 *meta* 관계에 위치하여 있다고 생각하였고 δ 4.96 에 downfield shift 하여 나타난 하나의 proton 은 O 에 인접하여 있음을 예상하였다. ^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD)에서는 13 개의 탄소가 관찰되었으며 –OH 로 치환된 C-4′은 δ 157.19 에서, C-7 은 δ 157.56 에서 나타나며 O 에 인접한 C-2 는 δ 79.02 에서 관찰되었다. DEPT spectrum 에서는 5 개의 사급탄소와 2 개의 CH_3, 8 개의 CH 가 존재하는 물질임을 알 수 있었다. 이상의 물리화학적 data 를 종합하여 compound 5 의 구조를 추정하고 문헌의[33] data 와 비교하여 본 결과 4′,7-dihydroxy flavan 으로 동정하였다.

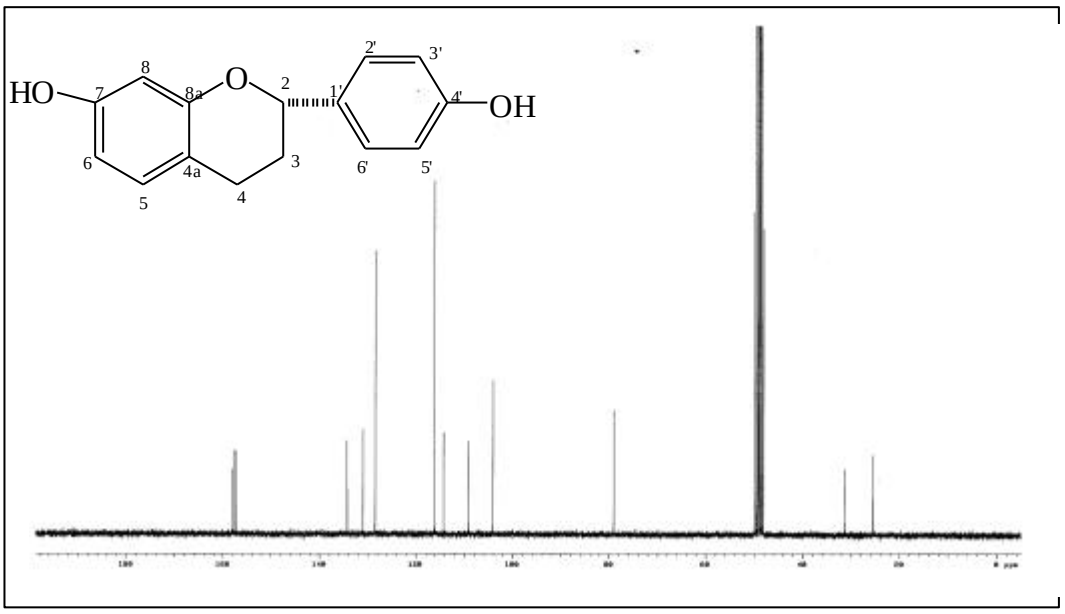


Fig. 18. ^{1}H-NMR spectrum of compound 5 (300 MHz, CD_3OD).

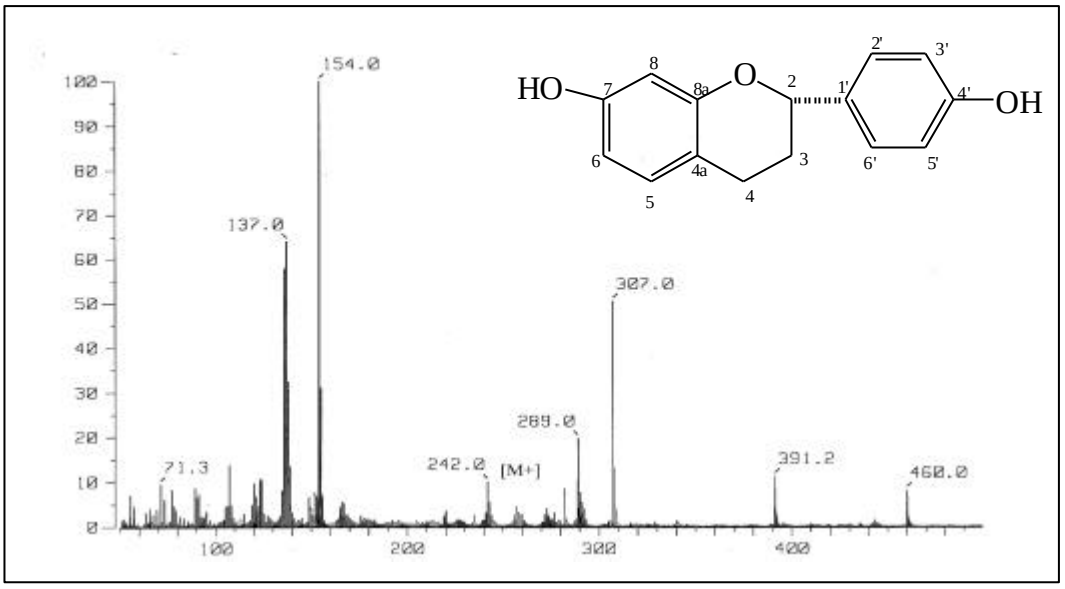


Fig. 19. Positive FAB-mass spectrum of compound 5.

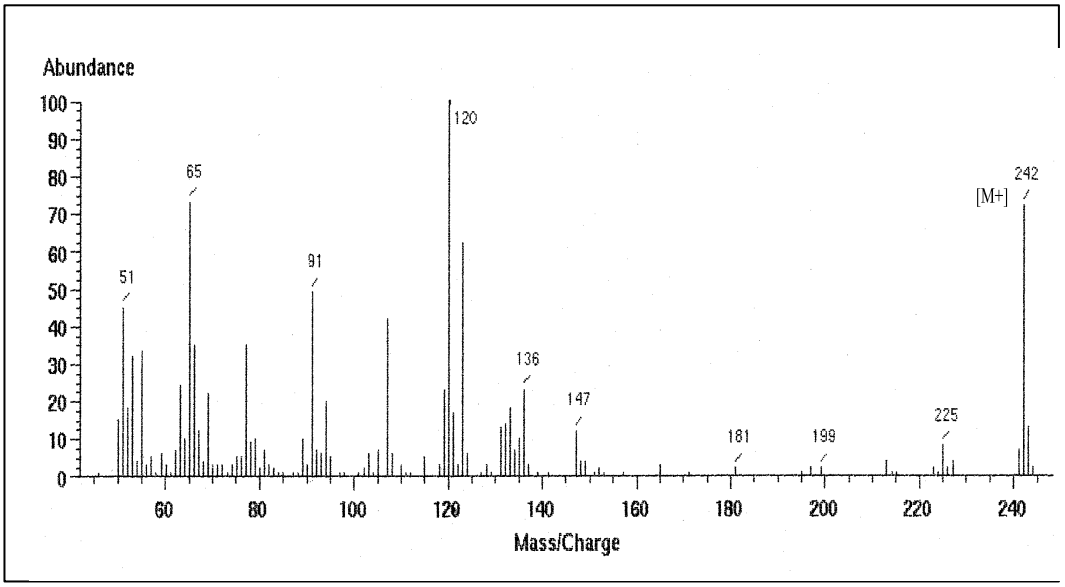


Fig. 20. EI-mass spectrum of compound 5.

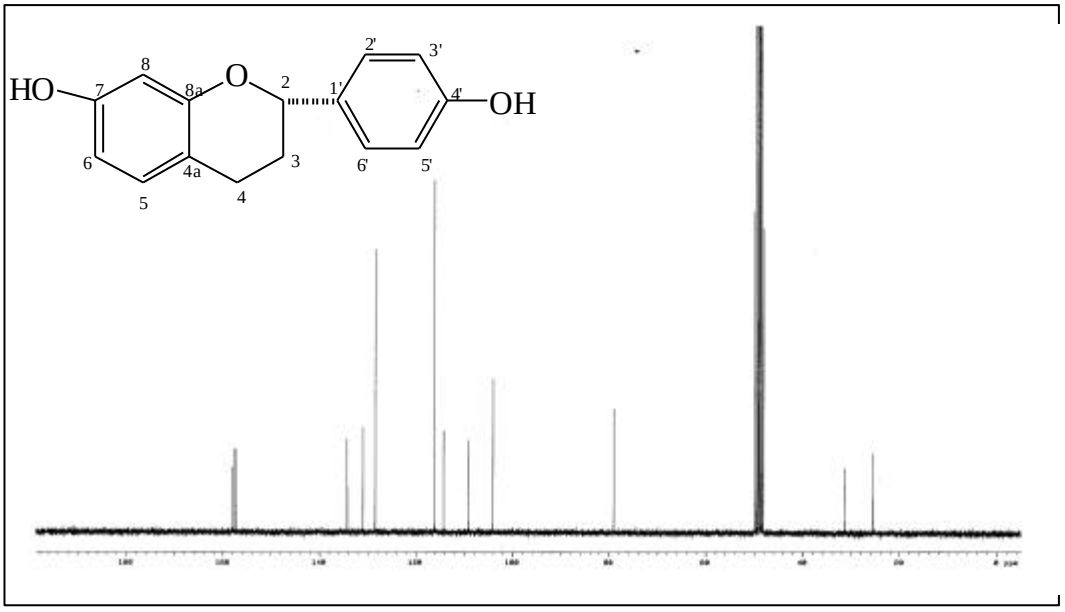


Fig. 21. ^{13}C-NMR spectrum of compound 5 (75 MHz, CD_3OD).

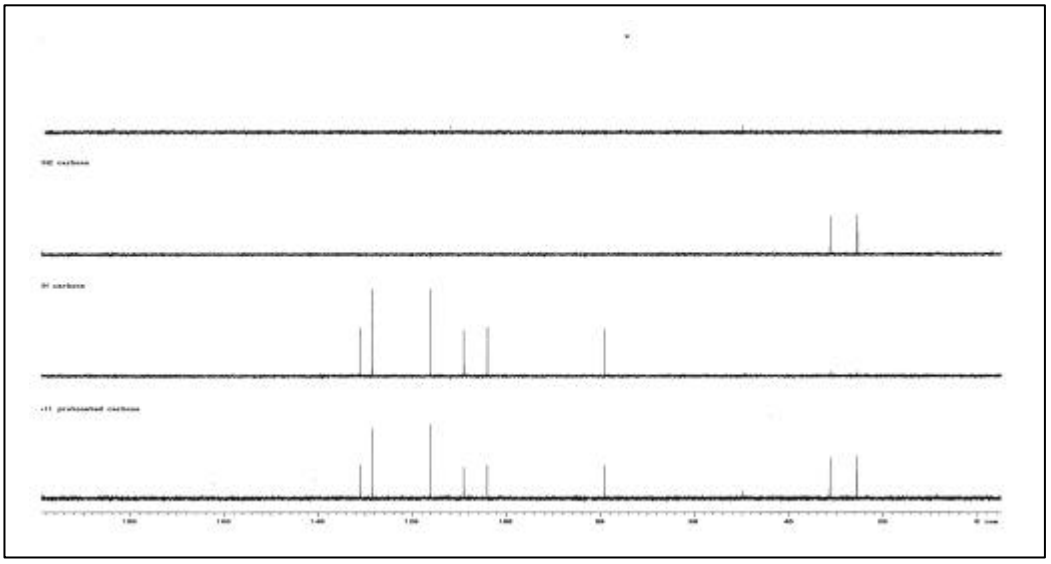


Fig. 22. DEPT spectrum of compound 5 (75 MHz, CD_3OD).

2.6. Compound 6

이 물질은 CH_2Cl_2 분획을 C C.하여 얻은 CA-12-C 분획을 CH_2Cl_2와 EtOAc 을 이용하여 C. C.하여 정제한 유상물질로 $[\alpha]_D^{20}$: +200.00° UV λ_{max} 212, 280 ㎚로 측정되었으며 positive FAB-mass spectrum 의 결과 m/z 274 에서 $[M+H]^+$의 peak 이 관찰되므로 분자량은 273 임을 알 수 있었으며 2,4-dinitrophenylhydrazine 에 의해 붉은색으로 발색되어 나타나므로 ketone 이나 aldehyde 의 존재를 예상하였다. ^{1}H-NMR (300 ㎒, CD_3OD) spectrum 에서 δ 6.82 와 δ 7.89 에 나타나는 각각 2 개의 proton 에 해당하는 doublet 은 A_2B_2 system 이므로 B-ring 에서 4-OH 의 존재를 예상하였다. δ 6.36 에 나타나는 proton 은 coupling constant 가 2.5 ㎐이며 그와 동일한 coupling constant 가 δ 6.32 (J=2.5 ㎐, 8.0 ㎐)에 나타나므로 서로 *meta* 관계를 예상하였으며 coupling constant 8.0 ㎐로부터 *ortho* 관계에 존재할 또 하나의 proton 은 δ 7.89 (J=8.0 ㎐)에서 확인하였다. 또한 δ 3.7 에서 나타나는 강한 singlet 은 OCH_3 라고 예상하였다. ^{13}C-NMR (75 ㎒, CD_3OD)에서는 14 개의 탄소가 관찰되었으며 δ 202.00 에서 ketone 으로 생각되는 한 개의 탄소와 δ 55.56 에 관찰된 -OCH_3 를 확인하였다. DEPT spectrum 에서는 5 개의 사급탄소와 2 개의 CH_2, 6 개의 CH, 한 개의 CH_3가 존재하는 물질임을 알 수 있었다. 이상의 물리화학적 data 를 종합하여 Compound 6 의 구조를 2′,4-dihydroxy-4′-methoxy chalcone 으로 동정하였다.

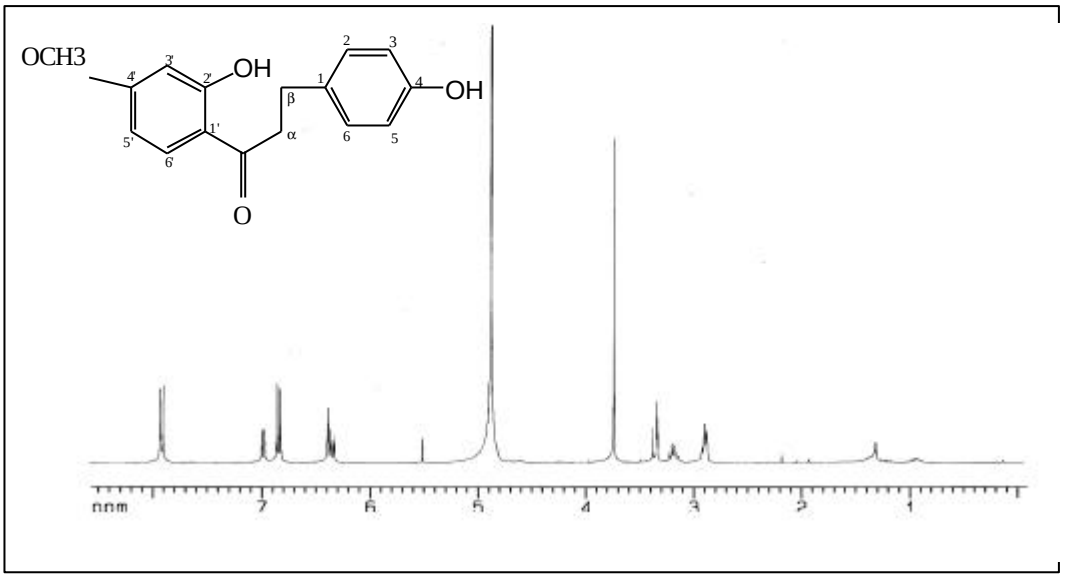


Fig. 23. ^{1}H-NMR spectrum of compound 6 (300 ㎒, CD_3OD).

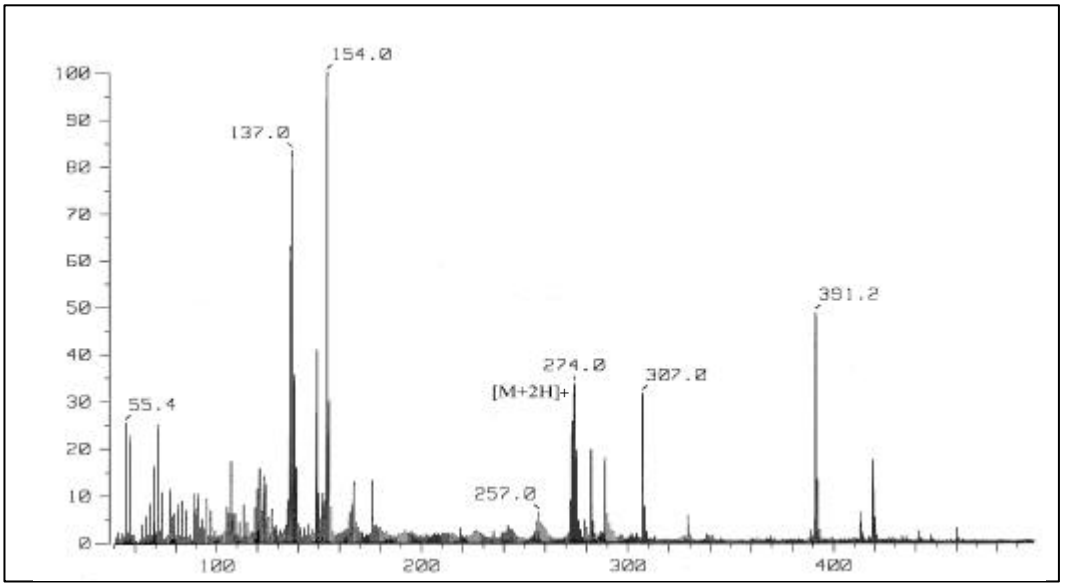


Fig. 24. Positive FAB-mass spectrum of compound 6.

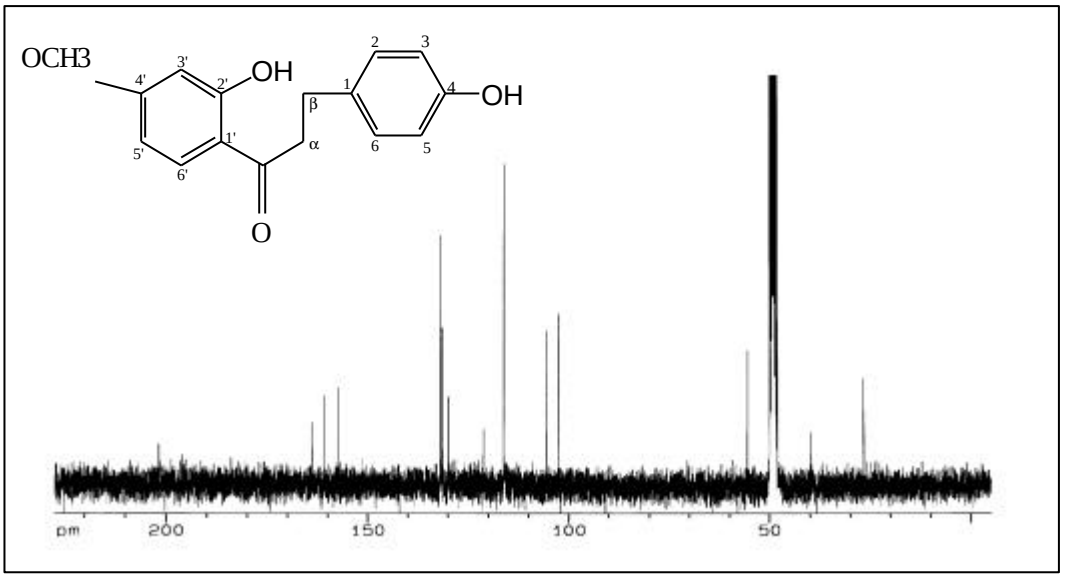


Fig. 25. ^{13}C-NMR spectrum of compound 6 (75 MHz, CD_3OD).

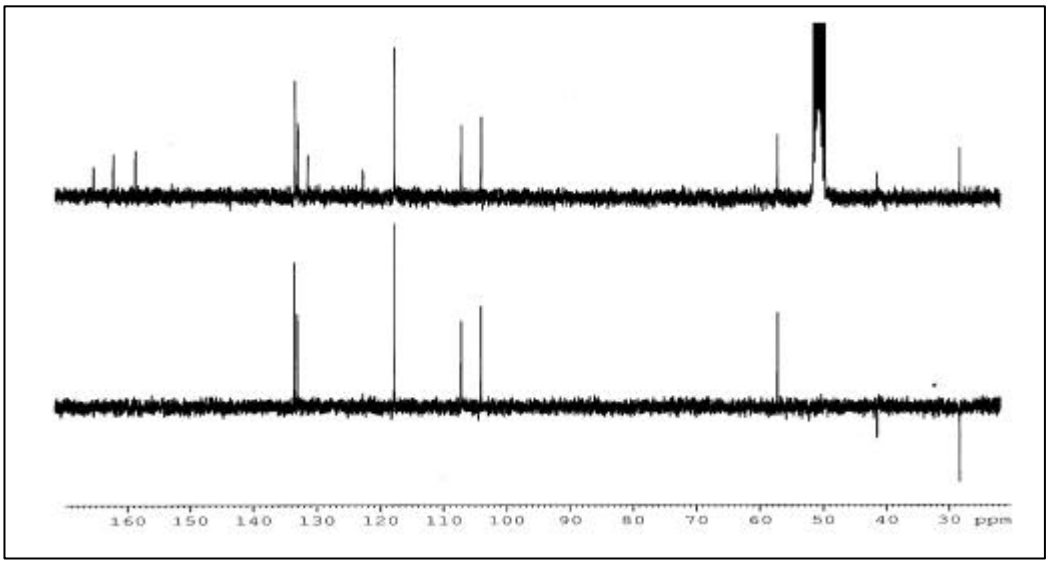


Fig. 26. DEPT spectrum of compound 6 (75 MHz, CD_3OD).

3. IL-6 생성효과의 측정

문주란의 각 용매분획에 대한 IL-6 생성 촉진 활성의 검색결과 가장 활성이 높은 BuOH 분획에서 분리된 compound 1~4 및 CH_2Cl_2 분획에서 분리된 compound 5, 6 이 murine macrophage 인 Raw 264.7 에서 생성되는 IL-6 의 양에 미치는 영향을 ELISA 법을 이용하여 측정하였으나 기대한 효과는 보이지 않았다(Table 2). 초기 MeOH 엑스와 각 분획 그리고 단리된 물질의 효과를 살펴볼 때 MeOH 엑스상태의 효과가 가장 높고 분리를 진행함에 따라 점점 그 효과가 감소됨을 관찰할 수 있었다.

Table 2. Activity on production of IL-6

Sample	Final conc. (μg/㎖)	IL-6 (pg/㎖)
IL-1α	0.1	5197
MeOH Ex.	100	19449
Hexane Fr.	20	379
CH_2Cl_2 Fr.	20	173
EtOAc Fr.	20	524
BuOH Fr.	20	909
H_2O Fr.	20	849
Com. 1	5	-
Com. 2	5	73
Com. 3	5	-
Com. 4	5	-
Com. 5	5	-
Com. 6	5	-

4. 암세포 독성 평가

Winiger 등[35]이 Amarylidaceae 에 속한 알칼로이드들에 대하여 한 종류의 murine non-tumoral cell line(LMTK)과 두 종류의 human tumoral cell line (Molt4 lymphoid cell, HepG 2 hepatoma)에 대한 세포독성을 측정하여 Pretazettine 의 세포독성을 확인한 바 있으며 또한 문주란속에서 분리된 flavan 의 Molt4 lymphoid cell 에 대한 세포독성도 보고되었다.[36] 문주란에서 분리된 6 개의 compounds 에 대하여 5 종류의 human tumoral cell line 에 대하여 세포독성을 측정한 결과 compound 1 및 4 는 A549 (human lung cancer cell), HCT-15(human colon cancer), MDA-MB-231(human breast cancer), LOX-IMVI(human amelanotic melanoma), PC3(human prostatic cancer)의 cancer cell line 에 대하여 ED_{50} 값이 compound 1 은 5 ~ 30μM, compound 4 는 4 ~ 24μM 로 전반적인 성장저해 작용을 나타내었다 (Table 3).

Table 3. Antiproliferative activity of compound 1~6 on human tumoral cell line *in vitro*

Compounds	$ED_{50}(\mu M)$ Cell lines				
	A549	HCT-15	LOX-IMVI	MDA-MB-231	PC-3
1	18.48	30.88	16.24	10.99	5.14
2	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
3	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
4	4.66	> 40	13.46	6.78	23.93
5	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
6	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40

* A549 (Human lung cancer ell), HCT-15 (human colon cancer), LOX-IMVI (human amelanotic melanoma cancer), MDA-MB-231 (human breast cancer), PC-3 (human prostatic cancer), Cytotoxicity of these compounds were evaluated by SRB and MTT method and RPMI1640 medium with 5% FBS was used in assay.

5. 항 바이러스 효과의 측정

Amarylidaceae 에 속한 알칼로이드들 중 lycorine 을 비롯한 16 종류의 알칼로이드들이 RNA 를 포함하는 flaviviruses, bunyaviruses, alphavirus 에 대하여 효과가 있음이 알려져 있다.[11] 그에 따라 문주란에서 분리된 4 개의 알칼로이드들과 두개의 플라보노이드들에 대하여 RNA 를 포함하고 있는 enterovirus 인 poliovirus type 1 (PV-1) strain brunhilde, coxsackie B virus type 3 (CoxB-3) strain Nancy 그리고 rhabdovirus 에 속하는 vesicular stomatitis virus (VSV) strain Indiana 와 human immunodeficency virus type 1 (HIV-1) strain III_B 와 human immunodeficency virus type 2 (HIV-2) strain ROD 및 human cytomegalovirus strain AD-169, human cytomegalovirus strain Davis 2 종류의 human cytomegalo virus(HCMV)에 대한 효과를 평가하였다. Table 4, 6 에 표기된 바와 같이 compound 1과 compound 4는 시험에 사용된 3 종류의 RNA virus 와 human cytomegalovirus (HCMV)들에 대하여 강한 효과를 보였다. 그러나 현재 항바이러스제로 사용되는 약물에 비하여 selective index 가 작고 CC_{50} 값에 근접한 농도에서 효과를 보이는 반면 그 이하가 되면 활성이 감소하는 경향으로 보아 직접적인 항 바이러스 효과가 있기보다는 세포의 기능저하로 인한 간접적인 효과로 사료되나 앞으로 더욱 정밀한 검증이 요구된다. 또한 human immunodeficency virus 에 대한 효과를 평가한 결과 분리된 모든 물질에서 효과가 보이지 않았다 (Table 5).

5.1. 항 PV-1, Cox. B3, VSV 효과

바이러스는 종류에 따라 숙주 및 증식기작등이 다르기 때문에 광범위 효과를 가진 약물을 발견하기 어렵다. 따라서 1 차적으로 DNA 를 포함하는 바이러스와 RNA 를 포함하는 바이러스군으로 나누고 각각에 대한 효과를 상호 비교하는 것이 바람직하다. 소아마비를 유발하는 polio virus type 1(PV-1), 감기 및 열성질환이나 간혹 무균성 수막염과 심장질환을 유발하는 coxackie B virus type 3 (Cox B3) 그리고 소나 말에 수포성 구내염을 일으키는 vesicular stomatitis virus (VSV)는 모두 RNA 를 포함하는 바이러스이다. PV-1 과 Cox. B3 는 작으면서 외피가 없는 positive-single-stranded RNA 바이러스인 picornaviridae 에 속하는 enterovirus 속에 포함된다. 이들은 주로 구강으로 전염되며 주로 중추신경계 질병을 유발하나 심장질환을 유발하기도 한다. 백신에 의한 예방이 거의 완벽한 poliovirus (PV)를 제외한 나머지 종류의 바이러스에 대한 백신이나 화학치료제, 예방제등이 전혀 개발되어 있지않다. VSV 는 외피를 가진 negative single-stranded RNA virus 인 rhabdoiridae 에 속하며 rabies virus (광견병 유발) 도 이에 포함된다.

문주란에서 분리된 6 개의 compound 들에 대한 항바이러스 효과는 Table 4 에 표기된 것과 같이 서 보는 것과 compound 1 과 4 가 EC_{50} 값으로 보면 1 ~ 5μg/ml 로 표준물질인 Ribavirin 보다 강하지만 독성이 강하므로 직접적인 항바이러스 효과에 의한 결과인지는 더욱 정밀한 실험이 요구된다.

Table 4. Antiviral activity of compound 1~6 against poliovirus type 1 ,

coxsackie B virus type 3 and vesicular stomatitis virus *in vitro*.

Compound	Toxicity CC_{50}(μg/ml)	Antiviral activity EC_{50} (μg/ml)			Selective index		
		PV-1	Cox. B3	VSV	PV-1	Cox. B3	VSV
1	23.97	1.83	1.01	4.45	13.09	23.73	5.39
2	>200.00	>200.00	>200.00	>200.00	<1	<1	<1
3	-	-	-	-	-	-	-
4	8.66	2.84	1.13	4.43	3.05	7.69	1.95
5	60.31	>60.31	>60.31	>60.31	<1	<1	<1
6	22.59	>22.59	>22.59	>22.59	<1	<1	<1
Ribavirin	>300	70.41	33.98	18.44	>4.26	>8.83	>16.27

* PV-1 (poliovirus type 1 strain brunhilde), CoxB-3 (coxsackie B virus type 3 strain Nancy), VSV (vesicular stomatitis virus strain Indiana) Antiviral activity of these compounds were evaluated by CPE/MTT method. and HeLa(HH) cell was used as host cell.

5.2. 항 Human immunodeficency virus 효과

20 세기 인류 최대의 전염병으로 간주되는 AIDS (acquired immunodeficency syndrome)라는 질병이 소개된지 수년 후 원인균이 HIV (human immunoeficency virus)로 불리우게 된 바이러스임이 밝혀졌고 그 후 10 년이 지났지만 현재 HIV reverse transcriptase (RT)저해제로서 치료제 4 가지와 올해 두 가지의 HIV protease 저해제들이 공인을 받았을 뿐이다. 그러나 개발된 치료제들도 단독투여를 할 경우 부작용이나 내성균주의 발현 또는 치료효과가 낮은 문제가 있어 두가지 이상의 약물을 투여하는 복합요법이 시도되고 있는데 뚜렷한 약효를 나타내기 위해서는 세가지 이상의 약물이용이 권장되고 있는 형편이다. 따라서 새로운 약물을 찾아내는 일이 시급하다. 바이러스는 종류마다 증식방법이 다르고 숙주세포 대사의 이용정도나 세포에 끼치는 영향들이 다르기 때문에 원인 바이러스인 HIV 를 검색대상 바이러스로 이용하는 것이 가장 바람직하다.

문주란에서 분리된 알칼로이드들이 RNA 를 포함하는 바이러스에 효과가 있다는 점은 무엇보다 HIV 치료제로서의 가능성을 제시하는 것으로 사료되어 human immunodeficency virus type 1 (HIV-1) strain III_B 와 human immunodeficency virus type 2 (HIV-2) strain ROD 에 대한 항바이러스효과를 평가하여 보았으나 기대한 효과는 보이지 않았다 (Table 6).

Table 6. Antiviral activity of compound 1~6 against human immunodeficency virus type 1 and human immunodeficency virus type 2 *in vitro*.

Compound	Toxicity CC_{50}(μg/ml)	Antiviral activity EC_{50} (μg/ml)		Selective index	
		HIV-1(III_B)	HIV-2(ROD)	HIV-1 (III_B)	HIV-2 (ROD)
1	0.15	>0.15	>0.15	<1	<1
2	128.38	>128.38	>128.38	<1	<1
3	-	-	-	-	-
4	0.21	>0.21	>0.21	<1	<1
5	92.10	>92.10	>92.10	<1	<1
6	23.00	>23.00	>23.00	<1	<1
Didanosine	>100.00	2.56	6.87	>39	>14
Zalcitabine	3.32	0.06	<0.03	53	>103
Zidovudine	2.52	0.002	0.002	1351	1224
DS5000	>1000.00	0.54	10.30	>1847	>97
PS	>1000.00	0.59	1.15	>1686	>869
Heparin	>1000.00	0.67	63.71	>1487	>15

* HIV-1 (human immunodeficency virus type 1 strain III_B), HIV-2 (human immunodeficency virus type 2 strain ROD) Antiviral activity of these compounds were evaluated by CPE/MTT method. and MT-4 cell was used as host cell.

5.3. 항 HCMV 효과

human cytomegalo virus(HCMV)는 사람에게 감염되는 human herpes virus 의 일종으로 면역이 저하된 환자들에게 중추신경계 질환이나 수막염, 망막염, 폐렴과 같은 급성 염증질환을 일으켜 사망하게 하는 주요 원인이 되고있다. 더욱이 HCMV 는 AIDS 환자의 바이러스에 의한 기회감염의 주원인균으로 죽음의 직접적인 원인이 된기도 한다. HCMV 치료제로 공인된 Foscarnet (phosphono-formic acid sodium salt)나 Ganciclovir(GCV)의 경우 독성 때문에 AIDS 나 면역저하 환자에게만 치료하도록 허가되어 있고 치료효과도 일시적일 뿐이다. 따라서 광범위 효과를 지니면서도 부작용이 적고 지속적인 치료효과를 지닌 물질의 개발이 큰 관심을 끌고 있다.

문주란에서 분리된 6 개의 compound 들에대한 항 HCMV 효과는 Table 7 에 표기된 바와 같이 GCV 보다 독성은 약하지만 다른 항바이러스제에 비하면 독성이 강하면서 EC_{50} 값으로 보아 2 ~ 8 μg/ml 로 효과를 보이고 있다.

Table 7. Antiviral activity of compound 1~6 against human cytomegalovirus *in vitro*.

Compound	Toxicity		Anti-HCMV activity EC_{50} (μg/ml)		Seletive index	
	CC_{50}(μg/ml)	CS_{50}(ug/ml)	AD-169	Davis	AD-169	Davis
1	52.68	68.24	2.87	3.62	18.36	14.55
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	21.48	68.08	6.42	7.78	3.35	2.76
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
GCV	>10	>10	1.15	9.16	>8.70	>1.09
PFA	>300	>300	51.43	106.78	>5.83	>2.81

* HCMV (human cytomegalovirus), AD-169 (human cytomegalovirus strain AD-169), Davis (human cytomegalovirus strain Davis) Antiviral activity of these compounds were evaluated by CPE/fluorometric assay and HEL299 cell was used as host cell.

Ⅳ. 결 론

1. 60 여종의 약용 식물 MeOH 엑스를 사용하여 MC3T3-E1 세포로부터 생성되는 interleukine-6 의 양을 증가시키는 효과를 검색하였으며, 그 중 문주란(*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)의 MeOH 엑스가 유의성있는 효과가 있음을 관찰하였다.

2. 문주란의 각 용매 분획에 대한 활성 검색 결과 BuOH 및 H_2O 분획에서 IL-6 생성촉진 효과가 있음을 확인하였다.

3. BuOH 분획에서 4 종의 알칼로이드(compound 1~4)를 분리하였으며, CH_2Cl_2 분획에서 2 종의 플라보노이드(compound 5~6)를 분리하여 ^1H, ^{13}C-NMR, Mass spectroscopy 에 근거하여 구조를 추정하였다. 4 종의 알칼로이드는 각각 (+)-crinamine, (5S,16S)-N-demethylgalanthamine, (5S,16R)-N-demethylgalanthamin -e , lycorine 으로 동정되었으며 2 종의 플라보노이드는 4′,7-dihydroxy flavan, 4′,7-dihydroxy- 4- methoxy chalcone 으로 동정하였다.

4. Compound 1~6 는 Raw 264.7 세포에서 IL-6 생성 촉진 효과를 보이지 않았다.

5. Compound 1~6 에 대하여 5 종의 human cancer cell lines 에 대하여 암세포 성장저해 활성을 평가하였다. 그 중 compound 1 은 A549 (Human lung cancer ell), HCT-15 (human colon cancer), LOX-IMVI (human amelanotic melanoma cancer), MDA-MB-231 (human breast cancer)과 PC-3 (human prostatic cancer) 세포주에 대하여 ED_{50} 값이 18.48μM, 30.88μM, 16.24μM, 10.99μM, 5.14μM 의 암세포 성장저해활성을 나타내었으며 compound 4 는 4.66μM, 40.55μM,

13.46μM, 6.775μM, 23.93μM 을 나타내었다. 그 밖에 compound 2, 3, 5, 6 는 ED_{50} 값이 40μM 이상으로 나타나 활성은 관찰되지 않았다.

6. Compound 1~6 에 대하여 3 종류의 RNA virus 에 대한 항 바이러스 약효를 평가한 결과 그 중 compound 1 이 PV-1 (poliovirus type 1 strain brunhilde), CoxB-3 (coxsackie B virus type 3 strain Nancy), VSV (vesicular stomatitis virus strain Indiana) 3 종류의 RNA virus 에 대하여 EC_{50} 값으로 보아 1.83 ㎍/㎖, 1.01 ㎍/㎖, 4.45 ㎍/㎖의 항 바이러스 효과를 나타냈으며 compound 4가 2.84 ㎍/㎖, 1.13 ㎍/㎖, 4.43 ㎍/㎖ 로 활성을 보였다. 그 밖에 compound 2,3,5,6 모두 CC_{50} 이하의 독성이 없는 농도에서 활성이 관찰되지 않았다.

Compound 1~6 에 대하여 2 종류의 human immunodeficency virus 에 대한 항 바이러스 약효를 평가한 결과 compound 1, 2, 3, 4, 5, 6모두 CC_{50} 이하의 독성이 없는 농도에서 활성이 관찰되지 않았다.

Compound 1~6 에 대하여 2 종류의 human cytomegalovirus (HCMV)에 대한 항 바이러스 효과를 평가한 결과 compound 1 이 HCMV strain AD-169, HCMV strain Davis 각 strain 에 대하여 EC_{50} 값으로 보아 2.87 ㎍/㎖, 3.62 ㎍/㎖로 효과를 나타내었으며 이었으며 compound 4가 21.48 ㎍/㎖, 68.08 ㎍/㎖ 로 활성을 보였다.

참 고 문 헌

1. Alt, F. W., Kellems, R. E., Bertino, J. R., Schimke, R. T. : Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1357-1370, (1978)
2. Biedler, J. L., Spengler, B. A., : Metaphase chromosome anomaly: Association with drug resistance and cell-specific products, *Science*, **191**, 185-187 (1976)
3. Kishimoto, T., Hirano T. : Molecular regulation of B lymphocyte response, *Ann Rev. Immunol*. **6**, 485-512 (1988).
4. Hirano, T., Tasukawa, K., Harada, H : Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature*, **324**, 73-76 (1986).
5. Namen, A. E., Schmierer, A. E., March, C. J. : B cell precursor growth promoting activity: purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precutsors, *J. Exp. Med.*, **167**, 988-1002 (1988).-----
6. Akira, S., Taga, T., Kishimoto, T. : Interleukin-6 in biology and medicine, *Adv. Immunol.*, **54,**1 (1993).
7. Duffy, L. C., Zielezny, M. A., Riepenhoff-Talty, M., Dryja, D., Sayahtaheri-Altaie, S., Griffiths, E., Ruffin, D., Barrett, H., Rossman, J., Ogra. P. L : Effectiveness of Bifidobacterium bifidum in experimentally induced MRV injection : dietary implications in formulas for newborns, *Endocr. Regul.*, **27**, 223 (1993).
8. Tojo, M., Oikawa, T., Yamashita, N., Iwata, S., Satoh, Y., Hanada, J., Tanaka, R. : The effects of Bifidobacterium breve administration on Campylobacter enteritis, *Acta Paediatr. Jpn.*, **29**, 160 (1987).
9. Tomoda, T., Yasua, N., Kageyama., T. : Intestinal Candida overgrowth and Candida infection in patients with leukemia: effect of Bifidobacterium administration,

Bifidobacteria Microflora., **7**, 71 (1988).

10. Okano, M. : Cytokine regulation of proligeration gemopoietic stem cells on vitro, *J. Cell Biochem*, Supplement 15F abstract, 20th Annual Keystone Symposia, 32 (1991).
11. Gabrielsen B., Monath T. P., Huggins J. W., Kefauver D. F., Pettit G. R., and Groszik G. : antiviral(RNA) activity of selected amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances, *Journal of Natural Products*, **55**(11), 1569-1581 (1992)
12. Dahlgren, R., Clifford, M. T., Yeo, P. F. : In the Families of the Monocotyledons, Springer-Berlag, Berlin (1985).
13. Leven, M., Totte, J., Van den Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., *planta Medica*, **33**, 284 (1978).
14. Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C. K., Chai, H., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., *J. Nat. Prod*., **56**, 1331-1338 (1993).
15. Marinova, V., Kirov, M., Grigorov, M., Kotsev, P., *J. Nat. Prod*., **56**, 1423-1425 (1993).
16. Thomson, T., Kewitz, H., *Life Sciences*, **46**, 1553-1557 (1990).
17. Antoun, M. C., Mendoza, N. T., Rios, Y. R., Proctor, G. R., Wickramaratne, D. B. M., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., *J. Nat. Prod*., **56**, 1423-1425 (1993).
18. pettit, G. R., Gaddamidi, V., Goswami, A., Cragg, G. M. (1984) J. Nat. Prod. 47, 796-801
19. pettit, G. R., Gaddamidi, V., Cragg, G. M., *J. Nat. Prod*., **47**, 1018-1026 (1984).
20. pettit, G. R., Cragg, G. M., Singh, S. B., Duke, J. A., Doubek, D. L., *J. Nat. Prod.*, **53**, 176-178 (1990).
21. Furusawa, E., Irie, H., Combs, D., Wildmanm W. C., *Chemotherapy*., **26**, 36-45

(1980).

22. Furusawa,E., Rurusawa, S. *Oncology*., **45**, 180-186 (1998).
23. Cordell, G. A., Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach, John Willey & Sons, New york. (1981)
24. Kobayashi, S., Tokumoto, T., Kigara, M., Imakura, Y., Shingu, T., Taira, Z. : Alkaloidal constituents of Crinum latifolium and Crinum bulbispermum (Amarylidaceae), *Chemical and Pahrmaceutical Bulletin*, **32**(8), 3015-3022 (1984).
25. Judith, R., Marta, A., Genevieve, B., Francois, T. : alkaloids from crinum firmifolium var. hygrophilum., *Planta medica*, **41**(1), 323-326 (1996).
26. Esameldin, E. E., Siegfried, E. D., Johannes, V. S. : Alkaloids from Crinum bulbispermum, *Phytochemistry*, **52**, 533-536 (1999).
27. Weniger, B., Italiano, L., Beck, J., Bastida, P., Bergonon, S., Codina, C., Lobstein, A., Anton, R. : Cytotoxic activity of Amarylidaceae alkaloids, *Planta Medica*, **61**, 77-79 (1995).
28. Thayer, P. S., Himmelfarb, P., Watts, G. L.: Cytotoxicity assay with L1210 cells in vitro and KB cells in vitro . *Cancer Rep*., (part 2)**2**, 1 (1971).
29. Pauwels RJ, et al. *J Virol Methods* **20**, 309, 1988)
30. Mason, L. H., *J. Am. Chem. Soc*., **77**, 1253 (1955).
31. Kobbayashi, S., Ishikawa, H., Kihara, M., Shing, T., Uyeo, S., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2533 (1976).
32. Kittisak, L., Cindy, K., Angerhofer, H. C., John, M. P., Geoffrey A. C. : Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of crinum amabile, *Journal of Natural products*, **56**(8), 1331-1338 (1993).
33. Djerassi, C., et al, Dictionary of Natural Products , CHARMAN & HALL, London,

UK, (1992).

34. Hesse, M., Meiner, H., Zeeh, B., Spektroskoische Methoden in der Organischen Chemie, Germerny, (1984).
35. Winiger, B., Italiano, L., Beck, J. P., Bastida, J., Bergonon, S., Codina, C., Lobstein, A., Anton, R. : Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids, *Planta Medica*, **61**, 77-79 (1995).
36. AbdElHagiz, M. A., Ramadan, M. A., Jung, M. L., Beck, J. P., Anton, R. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids from Crinum augustum and Crinum bulbispermum, *Planta Medica*, **57**, 437-439 (1991).

ABSTRACT*

Chemical Constituents and Biological Activity of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*

Mi-hyoun Park

Department of Pharmacy, Graduated School

Chungnam National University

Taejon, Korea

(Supervised by Professor Young-Ho Kim)

Crinum asiaticum var. *japonicum* is a plant distributed in Cheju island and belongs to the Amarylidaceae. The genus *Crinum* is known to contain numerous alkaloids which have cytotoxic, antimalarial and antiviral activities.

---

* A thesis submitted to the committee of Graduated School, chungnam National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Pharmaceutical Science Conferred in February 2000.

In a screening for medicinal plants having stimulatory activities on production of interleukin-6, we discovered that the MeOH extract of C*rinum asiaticum* var. *japonicum* showed the strong effect in our bioassay system.

In order to isolate of biological active compounds from *C. asiaticum* var. *japonicum*, we extracted the aerial part with MeOH. The MeOH extract was suspended in distilled water and fractionated with n-hexane, ethyl acetate, BuOH, and water successively. The BuOH fraction showed the effect on production of interleukin-6 with Raw264.7 cells.

Repeated column chromatography on silica gel, LH-20, reverse phase C-18 and prep. TLC afforded four alkaloids from BuOH fraction and two flavonoids from CH_2Cl_2 fraction. Structures were elucidated by ^{1}H,^{13}C-NMR and mass spectroscopy and identified as (+)-crinamine, (5S,16S)-N-demethylgalanthamine, (5S,16R)-N-demethylgalanthamine, lycor-ine. Two flavonoids were identified as 4′,7-dihydroxy flavan and 4′,7-dihydroxy-4 methoxy chalcone .

The compound 1~6 showed weak activity on production of IL-6 with Raw 264.7 cell line. But compound 1 and 4 showed strong antiproliferative activity against all of tested cell lines, such as A549 (human lung cancer ell), HCT-15 (human colon cancer), LOX-IMVI (human amelanotic melanoma cancer), MDA-MB-231 (human breast cancer) and PC-3 (human prostatic cancer) cells. The ED_{50} values were 18.48μM and 4.66μM against A549, 30.88μM and 40.55μM against HCT-15, 16.24μM and 13.46μM against LOX-IMVI, 10.99μM and 6.775μM against MDA-MB-231 and 5.14μM and 23.93μM against PC-3. The other compounds exhibited ED_{50} values more than 40μM.

It was evaluated antiviral activity of compound 1~6 against RNA containing virus such as poliovirus type 1 strain brunhilde (PV-1), coxsackie B virus type 3 strain Nancy (CoxB-3) and vesicular stomatitis virus strain Indiana (VSV). Also it was checked human

immunodeficency virus (HIV type1 and HIV type 2) and human cytomegalovirus (HCMV strain AD-169 and HCMV strain Davis). Among them compound 1 and 4 showed strong activities against RNA containing virus and HCMV. Compound 1 and 4 exhibited with EC_{50} values of 1.83 ㎍/㎖, 1.01 ㎍/㎖, 4.45 ㎍/㎖ and 2.84 ㎍/㎖, 1.13 ㎍/㎖, 4.43 ㎍/㎖ against PV-1, CoxB-3, VSV. Compound 1 and 4 exhibited with EC_{50} values of 2.87 ㎍/㎖, 3.62 ㎍/㎖ and 21.48 ㎍/㎖, 68.08 ㎍/㎖ against HCMV strain AD-169 and HCMV strain Davis respectively. EC_{50} values of compound 2, 3, 5, and 6 were more than CC_{50} values. All compounds did not showed activities against HIV-1 and HIV-2.