



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

곰비늘고사리의 화학성분 및
전립선 암세포 증식 억제 활성

Chemical Constituents of *Dryopteris uniformis*
and their Anti-proliferation Activities on
Prostate Cancer Cells

2015 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 생약학전공

우 선 민

곰비늘고사리의 화학성분 및
전립선 암세포 증식 억제 활성

Chemical Constituents of *Dryopteris uniformis*
and their Anti-proliferation Activities on
Prostate Cancer Cells

지도교수 성 상 현

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함
2014 년 11 월

서울대학교 대학원
약학과 생약학전공
우 선 민

우선민의 석사 학위논문을 인준함
2014 년 12 월

위 원 장 김 진 응 (인)

부위원장 오 원 근 (인)

위 원 서 상 현 (인)

국문초록

곰비늘고사리 (*Dryopteris uniformis* (Makino) Makino)는 면마과 (Dryopteridaceae) 관중속 (*Dryopteris*)에 속하는 상록성 다년초로 온대성 양치식물이다. 중국, 일본 및 우리나라 중부 이남에 분포하고 있으며, 솟곰고사리 및 곰고사리라는 이명으로 불리기도 한다. 중국에서는 同形鱗毛蕨으로 불리기도 하는데, 『神華本草綱要』에는 그 근경은 지혈, 살충의 효과가 있으며 봉루, 토혈 등에 쓰인다고 하였다.

곰비늘고사리가 속한 관중속은 전 세계에 약 250종이 분포하고 있으며, 그 중 한국산으로는 약 30종이 알려져 있다. 곰비늘고사리의 화학성분 및 생리활성에 관한 연구는 SCI 논문에 보고된 바가 없다. 한편, 관중속 식물들에서는 phloroglucinols, flavonoids, triterpenoids, phenols 등이 분리되었다. 또한 관중속 식물에서 항바이러스, 항박테리아, 항암 등의 활성이 보고된 바가 있다. 본 연구에서는 처음으로 곰비늘고사리의 화학성분을 연구하고, 그 화학성분들의 활성을 연구하고자 하였다. 활성은 전립선 암세포주인 LNCaP와 PC-3 세포주의 증식억제 효과 및 호르몬 효과를 보았으며, 아직 이 세포주들을 기반으로 관중속 식물들의 화학성분에 대한 활성이 연구된 바가 없다. 이에 본 연구에서 처음으로 위 두 가지 전립선 암 세포주에 대한 활성을 연구해보고자 하였다.

관중속에서 phloroglucinol 계열의 물질들은 chemotaxonomic marker가 되는데, 본 연구에서도 이를 집중적으로 분리하고자 곰비늘고사리의 근경 및 인편을 100 % 에테르로 선택적 추출을 하였다. 이후 다시 80 % 에탄올로 추출하였으며, 용매의 극성에 따라 *n*-Hexane, CH₂Cl₂, *n*-BuOH 분획물로 나누었고, 이 중 전립선 암세포 증식억제 효과를 보인 총 에테르 추출물, CH₂Cl₂ 분획물을 집중적으로 분리 하였으며, 총 8종의 phloroglucinols (1-8), 1종의 acyclic diterpene (9)을 분리하였다. 또한 추가적으로 *n*-BuOH 분획물에서 1종의 flavonoid (10)를 분리하였다.

각각의 화합물은 UV, ESIMS, FABMS, EIMS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR,

^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC, DEPT spectrum과 선광도 등의 분광학적 데이터 등을 종합하여 desaspidin BB (1), phloropyrone BB (2), albaspidin BB (3), *para*-aspidin BB (4), methylene-bis-desaspidinol (5), phloraspidinol BB (6), aspidinol B (7), desaspidinol (8), (6*E*,10*E*)-geranyllinalool (9), astragalin (10)으로 동정하였다. 위 화합물들은 이 식물에서 처음으로 분리, 보고되는 물질들이다.

위에서 언급한 활성 연구 결과 phloroglucinol 계열인 desaspidin BB (1)와 acyclic diterpene의 일종인 (6*E*,10*E*)-geranyllinalool (9)은 저농도에서 antiandrogenic effect를 보였으며, desaspidin BB (1)의 경우 고농도에서 PC-3의 증식을 선택적으로 유의성 있게 억제 하였다.

keywords : 콤비늘고사리 (*Dryopteris uniformis*), 면마과 (Dryopteridaceae), acylphloroglucinol, 전립선암, LNCaP, PC-3

Student Number : 2013-21597

목 차

국문초록	i
목차	iii
List of Abbreviation	vi
List of Figures	viii
List of Tables	X
List of Schemes	X
 I . 서론	1
 II . 실험 재료 및 방법	10
1. 실험재료	10
2. 시약 및 기기	11
2-1. 시약	11
2-2. 기기	12
3. 곰비늘고사리로부터 화합물의 분리	14
3-1. 곰비늘고사리의 추출 및 분획	14
3-2. 에테르 추출물로부터 phloroglucinol 화합물의 분리	15
3-3. CH ₂ Cl ₂ 분획물로부터 phloroglucinol 화합물의 분리	16
3-4. phloroglucinol 계열 화합물의 분리	17
3-4-1. 화합물 1의 분리	17
3-4-2. 화합물 2의 분리	17
3-4-3. 화합물 3의 분리	18
3-4-4. 화합물 4의 분리	18

3-4-5. 화합물 5의 분리	19
3-4-6. 화합물 6의 분리	19
3-4-7. 화합물 7의 분리	20
3-4-8. 화합물 8의 분리	21
3-5. diterpene 계열 및 flavonoid 계열 화합물의 분리	24
3-5-1. 화합물 9의 분리	25
3-5-2. 화합물 10의 분리	26
 4. LNCap, PC-3 세포주의 증식 억제 활성	27
4-1. LNCaP, PC-3 세포주의 배양	27
4-2. 세포 증식 변화 측정	28
4-3. XTT assay	29
4-4. 통계처리	30
 III. 결과 및 고찰	31
1. 곰비늘고사리로의 성분 연구	31
1-1. 화합물 1 의 구조 분석	31
1-2. 화합물 2 의 구조 분석	39
1-3. 화합물 3 의 구조 분석	44
1-4. 화합물 4 의 구조 분석	46
1-5. 화합물 5 의 구조 분석	48
1-6. 화합물 6 의 구조 분석	50
1-7. 화합물 7 의 구조 분석	52
1-8. 화합물 8 의 구조 분석	53
1-9. 화합물 9 의 구조 분석	54
1-10. 화합물 10 의 구조 분석	56

2. 곰비늘고사리의 전립선 암세포 증식 억제 활성	59
2-1. 추출물, 분획물의 전립선암세포 증식 억제 활성	59
2-2. 화합물 1 의 전립선암세포 증식 억제 활성	61
2-3. 화합물 9 의 전립선암세포 증식 억제 활성	64
IV. 결론	68
V. 참고문헌	70
Abstract	74

List of Abbreviations

$[\alpha]_D$: specific rotation
ACN	: acetonitrile
br s	: broad singlet
C.C	: column chromatography
CD-FBS	: charcoal-dextran stripped fetal bovine serum
CH_2Cl_2	: dichloromethane(=DCM)
CHCl_3	: chloroform(=C)
COSY	: correlation spectroscopy
CTL	: control
d	: doublet
dd	: doublet of doublet
DMSO	: dimethylsulfoxide
EIMS	: electronic ionization mass spectroscopy
ESIMS	: electrospray ionization mass spectroscopy
Et_2O	: diethyl ether
EtOAc	: ethyl acetate(=EA)
EtOH	: ethanol
FABMS	: fast atom bombardment mass spectrometry
fr.	: fraction
GC	: gas chromatography
HEPES	: N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N''-(2-ethanesulfonic acid)
Hex	: <i>n</i> -hexane(=H)
HMBC	: heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	: heteronuclear multiple quantum correlation
HOAc	: acetic acid

HPLC	: high performance liquid chromatography
HRESIMS	: high resolution electrospray ionization mass spectroscopy
Hz	: hertz
LNCaP	: LNCaP Clone FGC
m	: multiplet
max	: maximum
MeOH(=M)	: methanol
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -butanol(=Bu)
NMR	: nuclear magnetic resonance
NP	: normal phase
PMS	: phenazine methosulfate
RP	: reverse phase
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
R _t	: retention time
s	: singlet
t	: triplet
TES	: testosterone
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet absorption spectroscopy
W	: water
XTT	: 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2 <i>H</i> - tetrazolium-5-carboxanilide inner salt

List of Figures

Figure 1. Androgen receptor pathway	3
Figure 2. Structures of chemical constituents known in <i>Dryopteris</i> species	8
Figure 3. <i>Dryopteris uniformis</i> rhizomes and scale (A), <i>Dryopteris uniformis</i> leaves (B)	10
Figure 4. Photomicrographs of LNCaP	27
Figure 5. Photomicrographs of PC-3	28
Figure 6. Positive and negative controls for experiments	29
Figure 7 Reaction process of XTT assay	29
Figure 8. Possible tautomeric structures of an acylfilicinic acid	33
Figure 9. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (in CDCl_3)	34
Figure 10. HMBC spectrum of compound 1 (in CDCl_3)	35
Figure 11. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (in acetone- d_6)	36
Figure 12. HMBC spectrum of compound 1 (in acetone- d_6)	37
Figure 13. Proposal for biosynthesis of compound 1	38
Figure 14. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (in acetone- d_6)	40
Figure 15. HMBC spectrum of compound 2 (in acetone- d_6)	41
Figure 16. HMBC spectrum of compound 2 (in acetone- d_6)	42
Figure 17. HMQC spectrum of compound 2 (in acetone- d_6)	43
Figure 18. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 3 (in CDCl_3)	45
Figure 19. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (in CDCl_3)	47
Figure 20. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 (in CDCl_3)	49
Figure 21. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 (in CDCl_3)	51
Figure 22. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 7 (in CDCl_3)	52
Figure 23. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 8 (in CDCl_3)	53
Figure 24. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 9 (in CDCl_3)	54

Figure 25. HMBC spectrum of compound 9 (in CDCl ₃)	55
Figure 26. ¹ H, ¹³ C-NMR spectrum of compound 10 (in CDCl ₃)	57
Figure 27. Structures of the compounds isolated from <i>D.uniformis</i> ..	58
Figure 28. The cell viability of the fractions of <i>D.uniformis</i> rhizomes and scales on LNCaP and PC-3 cell lines	59
Figure 29. The relative cell viability of the compound 1 on LNCaP	62
Figure 30. The relative cell viability of the compound 1 on PC-3	62
Figure 31. The cytotoxicity effect of the compound 1 on PC-3 cell lines	63
Figure 32. The relative cell viability of the compound 9 on LNCaP	64
Figure 33. The relative cell viability of the compound 9 on PC-3	65
Figure 34. The cytotoxicity and antiandrogenic effect of the compound 9 on LNCaP cell lines	65
Figure 35. The cytotoxicity effect of the compound 1 on AGS cell lines	66
Figure 36. The cytotoxicity effect of the compound 9 on AGS cell lines	67
Figure 37. The cell viability of the compound 1 and 9 on AGS cell lines	67

List of Tables

Table 1. Pharmacological studies reported in <i>Dryopteris</i> species	5
Table 2. ¹ H NMR data of compounds 1-6	22
Table 3. ¹³ C NMR data of compounds 1-6	23

List of Schemes

Scheme 1. Extration and fractionation of <i>D.uniformis</i> rhizomes and scales	14
Scheme 2. Isolation of phloroglucinols from the Et ₂ O extracts of <i>D.uniformis</i>	15
Scheme 3. Isolation of phloroglucinols from the CH ₂ Cl ₂ fraction of <i>D.uniformis</i>	16
Scheme 4. Isolation of other type compounds from <i>D.uniformis</i>	24

I. 서론

양치식물 중 관중속의 식물은 현재 우리나라의 산, 암석 사이에 무리를 지어 자라고 있다. 본초강목에 관중속의 대표적 식물인 관중은 구충, 이질, 열병성 발진, 지혈, 해독 등에 쓰여 진다고 나와 있다. 현대에 와서 관중뿐만 아니라 관중속 식물들의 생리활성은 phloroglucinol 계열과 관련이 있다고 보는 견해가 많다(Lee *et al.*, 2009; Dell' Aica *et al.*, 2007; McCue *et al.*, 2008). 지금까지 알려진 phloroglucinol 계열 물질들의 활성은 다양하다. 독감 바이러스에 대한 강력한 억제작용, 항우울, 항암, 구충의 작용, 항균의 효과, 피부 진균에 대한 억제작용, 항말라리아의 예방 효과가 보고된 바가 있다(Table 1).

본 연구에서 사용된 곰비늘고사리(*Dryopteris uniformis* (Makino) Makino)는 면마과(Dryopteriaceae), 관중속(*Dryopteris*)에 속하는 상록성 다년초로 온대성 양치식물이며, 우리나라 중부이남지역에 자생하고 있다. 그 이름은 밀생하는 비늘조각이 곰의 털과 비슷하다하여 붙여졌다. 기원 식물의 형태학적 특징을 살펴보면 우선 그 근경은 굽고 직립한다. 잎은 근경에 총생한다. 엽병 기부인 인편은 흑색이며 광택이 있다. 잎은 진한 녹색이고 비늘고사리처럼 끝이 가늘어지지 않는다. 또한 2회 우상 심열한다. 봄의 새싹은 새카맣고 익은 모습이 비늘고사리의 적갈색과 비교가 된다. 이번 연구에서는 이러한 형태학적 특징을 지니고 있는 곰비늘고사리의 근경과 인편의 성분분리 연구를 하였다.

연구에 앞서 곰비늘고사리의 알려진 화학성분에 관한 검색을 하였으나 SCI에 수록된 연구 결과가 없었다. 다만, 곰비늘고사리가 속한 관중속(*Dryopteris*)에 속한 양치식물에는 phloroglucinols, flavonoids, terpenoids, phenols 계열의 성분이 주로 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 이에 본 연구에서는 처음으로 곰비늘고사리의 성분을 분리하고 그 구조를 밝히고자 한다.

보통, 관중속 식물의 추출물 중의 phloroglucinol 유도체를 총칭하여 crude filicin이라고 부른다. 관중속 식물들의 phloroglucinol들은 두 개에

서 여섯 개의 고리가 메틸렌 브릿지로 연결된 형태가 많이 보고되고 있다(Widen *et al.*, 1994). 관중속에서 분리된 phloroglucinol들은 대개 다양한 acyl기를 치환체로 갖는 것이 특징으로 이러한 구조를 acylphloroglucinol이라고 하기도 한다. 이 구조는 extract 상태의 혼합물이라 하더라도 ^1H NMR spectrum의 12 에서 19 ppm의 downfield 영역에서 singlet의 시그널이 관찰되는 것이 특징이다(Socolsky *et al.*, 2012). 따라서, 혼합물에서의 1D ^1H NMR만으로도 이러한 phloroglucinol 계열의 초기 탐색이 가능하다.

관중속 식물들 외에도 phloroglucinol 계열의 물질은 Hypericum 속의 전초, Elaphoglossum 속의 근경 및 뿌리에서 분리되어 보고된 바가 있으며, 그 생리활성이 연구되어지기도 하였다. 다만 그 세포독성과 부작용 등이 보고되고 있기 때문에 인체에 직접적인 사용이 주의되고 있다. 하지만 2000년대 후반, 2010년대에 와서 몇 가지 강력한 활성을 지니는 unknown phenolic으로 남겨졌던 물질들이 phloroglucinol 계열임이 밝혀지는 등(Socolsky *et al.*, 2012) 그 연구가 좀 더 활발하게 되어 다시 분리 및 구조의 동정이 이루어지고 있는 추세이다.

한편, phloroglucinol 계열의 물질들은 유효한 항암효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 현재까지 유방암세포주인 MCF-7, 간암세포주인 HepG2, 폐암세포주인 A549, 전립선암세포주인 PC3-MM2 에 추출물 및 화학성분들의 유의성 있는 활성 및 그 기전이 밝혀진 바가 있다(Table 1). 본 연구에서는 곰비늘고사리에서 분리된 화합물들의 전립선암 세포주인 LNCaP와 PC-3 세포의 암세포 증식 억제 효과 및 호르몬 수용체에 경로에 미칠 수 있는 영향을 연구하였다.

두 세포주는 안드로겐에 대한 반응이 각각 다른데, LNCaP 세포의 경우 안드로겐에 특이적이며, PC-3 세포의 경우는 안드로겐에 비특이적인 특성을 가지고 있다. 이것은 PC-3 세포에는 안드로겐의 수용체가 발현되어 있지 않기 때문이다.

한편, PC-3 세포주에는 ER(estrogen receptor) 및 GR(glucocorticoid receptor)이 발현되어 있는데, 본 연구에서 사용한 LNCaP 세포의 경우

안드로겐 수용체의 바인딩 도메인의 868번 위치에 threonine 대신 alanine이 치환되는 변이 때문에 안드로겐 수용체가 안드로겐, 에스트로겐, 프로게스테론과 antiandrogen에 의해 activation 되는 특징을 가지고 있다. 이번 연구에서 사용된 안드로겐인 testosterone의 두 가지 세포주에 대한 활성을 보아도 이러한 세포주의 특징을 알 수 있었다. 즉, 안드로겐 수용체가 발현되어 있는 LNCaP에 testosterone을 처리시 LNCaP의 증식 효과를 볼 수 있지만, PC-3 세포주에 처리 시 증식의 변화에 거의 영향을 미치지 않은 것을 관찰 할 수 있었다.

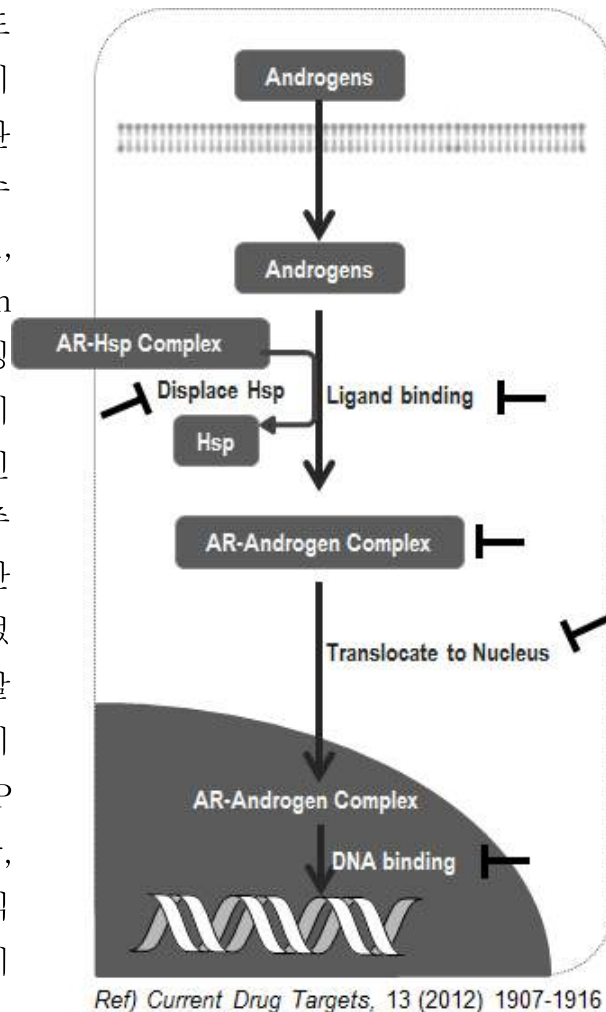


Figure 1. Androgen receptor pathway

따라서 LNCaP 와 PC-3 세포에 대한 활성평가가 동시에 이루어진다면 그 활성의 차이를 보아 해당 약물이나 화학물질의 세포 증식억제 효과뿐만 아니라 호르몬 수용체 경로에 미칠 수 있는 영향을 동시에 탐색할 수 있다. 전립선암의 경우 다른 암의 경우처럼 전이되거나 심해지면 항암제를 사용하는 것과 달리 호르몬 치료를 먼저 하는 것이 일반적이므로, 이 호르몬효과를 연구하는 것이 상당한 의미를 가질 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서는 관중속에 속한 곰비늘고사리의 화학물질들의 LNCaP와 PC-3 세포주에 대한 증식억제 효과 및 호르몬 효과를 보았다. 이전에 PC-3의 다른 subline 세포주의 일종인 PC3-MM2에 대한 관중

의 100 % 에탄올 추출물의 증식 억제 효과가 연구된 바는 있지만, 화합물에 대한 전립선 암세포의 증식 억제 효과 및 호르몬 수용체 경로에 미칠 수 있는 영향에 관한 연구는 본 연구에서 처음으로 연구하게 되었다.

Table 1. Pharmacological studies reported in *Dryopteris* species

Therapeutic Target	In vitro/vivo assay	Plants/their Constituents	reference	Year
Apoptosis	HepG2 cells	aspidin PB <i>Dryopteris fragrans</i> (L.)Schott, by modulating PI3K/Akt/GSK3b pathway	Sun et al.	2013
Antioxidant, Anticancer, Acetylcholinesterase inhibition	A549 cells.	flavonoids extd. <i>Dryopteris erythrosora</i>	Cao et al.	2013
Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication	Porcine alveolar macrophages	flavaspidic acid AB <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Yang et al.	2013
Antioxidant	DPPH, β -carotene linoleic acid, and reducing power assay	Solvent-free microwave extrn. (SFME) of the essential oil from <i>Dryopteris fragrans</i>	Li et al.	2012
Antioxidant, Antimicrobial	<i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Sarcina</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Aspergillus niger</i>	polyphenols content phenolic compds <i>Dryopteris filix-mas</i>	Soare et al.	2012
Viability, Growth Virulence properties	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Ban et al.	2012
Apoptosis	MCF-7 cells, ROS mediated mitochondrial pathway	Dryofragin, <i>Dryopteris fragrans</i> (L.)Schott.	Zhang et al.	2012

Antibacterial	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Dryopteris cochleata</i> (D.Don) C.Chr	Thomas et al.	2011
Cytotoxicity	Ontogeny of rice-moth	<i>Dryopteris filix-mas</i>	Shukla et al.	2011
Anticancer	PC3-MM2 cells Apoptosis	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Chang et al.	2010
Antibacterial	Gram-pos. bacteria, methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (aMRSA bacterium), <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	flavaspidic acid AB flavaspidic acid PB <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Lee et al.	2009
HIV-1protease inhibition	HIV-1 protease	dryopteris acid A dryopteris acid B <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Lee et al.	2008
Fatty acid synthase inhibition	in vitro FAS inhibitory assay	acylphloroglucinols <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Na et al.	2006
Blood biochemical studies	serum, plasma, erythrocyte, and erythrocyte membrane compn. and function	<i>Dryopteris juxtaoposita</i>	Bhure et al.	2006
Antioxidant	DPPH, radical scavengy	flavaspidic acid PB flavaspidic acidAB <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Lee et al.	2003

Human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibition	Human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase	kaempferol acetyl rhamnosides crassirhizomosides A, B and C sutchuenoside A, kaempferol	Min et al.	2001
Ichthyotoxicity against medaka	EBV-EA activation (in vivo) two-stage carcinogenesis on mouse skin	aspidin PB, dryofragin, aspidin AB and BB, aspidinol, and the sesquiterpenoids albicanol and albicanyl acetate	Ito et al.	2000
Melanogenesis inhibitor	Inhibition of mushroom tyrosinase	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Lee et al.	1997
Antiinflammatory	Inhibitors of cyclooxygenase I and II	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Lee et al.	1997
Antitumor	Antitumor effect on Epstein-Barr virus antigen activation / (in vivo) on two stage mouse skin carcinogenesis inhibition on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-TPA tumor promotion	aspidin, desaspidin phlorophenone	Kapadia et al.	1996

Figure 2. Structures of chemical constituents known in *Dryopteris* species (continued)

Figure 2. Structures of chemical constituents known in *Dryopteris* species

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 곰비늘고사리(건조중량 596.4 g)는 2013년 7월 16일 전라남도 광양시 옥룡면 백운산에서 채취되었으며, 서울대학교 남부학술림 박학기 선생님께서 감정을 받아 사용하였다. 80% MeOH 추출물은 서울대학교 생약학연구실의 양치식물 라이브러리에 코드 SNUPR-18R로 보관중이다.



Figure 3. *Dryopteris uniformis* rhizomes and scale (A),
Dryopteris uniformis leaves (B)

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

(1) 분석용 시약

컬럼크로마토그래피용 Silica gel

Kiesgel 60 (40-60 μ m, 230-400 mesh, Art. 9385, Merck, Germany)

Zeoprep 60 (60Å, 60-200 mesh, Zeochem, Switzerland)

컬럼크로마토그래피용 Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 (bead size 25-100 μ m, Pharmacia, Sweden)

TLC용 precoated plate

Kiesgel 60 F₂₅₄ (Art. 5715, Merck, Germany)

RP-18 F₂₅₄ (Art. 15389, Merck, Germany)

TLC용 발색시약

Anisaldehyde-H₂SO₄ 시약

(2) 추출 용매 및 기타 시약

식물재료의 추출, 분획, 분리에 사용된 용매는 시약용 용매(Daejung Chemical & Metals. Co., Ltd., Korea)를 사용하였고, HPLC 용 용매는 J.T. Baker[®]의 HPLC grade 용매(Avantor Performance Materials. Inc., U.S.A)를 사용하였다.

(3) LNCaP, PC-3 세포주 배양 및 증식 억제 활성 검색용 시약

세포배양에 필요한 RPMI 1640, penicillin/streptomycin solution, FBS(Characterized, US-sourced)는 Hyclone (Hyclone Laboratories. Inc., USA)제품을 사용하였다. Androgen으로 사용한 testosterone, 양성 대조군으로 사용한 bicalutamide, etoposide는 TCI(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Korea)에서 구입하여 사용하였다. 또한 DMSO, 양성 대조군인 finasteride, charcoal. dextran coated, XTT assay에 사용한 XTT sodium salt와 PMS는 Sigma(Sigma-Aldrich Co., LLC., Korea)에서 구입하였다. CD-FBS 제작을 위한 Filter unit receiver와 Bottle top filter는 Nalgene(Nalge Nunc International Corp., U.S.A)제품을 사용하였다. 그 밖에 Multiwell culture plate는 Nunc(Nunclon Δ Surface; Nalge Nunc International, U.S.A), cell culture dish는 Corning (New York, U.S.A)제품을 사용하였다.

2-2. 기기

Analytical balance: Mettler AE 50, Switzerland

Autoclave: Sanyo MLS 3020, Japan

Centrifuge : Eppendorf Centrifuge 5810-R, Germany

Clean bench : Hanbaek Scientific Co., HB-402, Korea

CO₂ incubator : Sanyo MCO-15AC, Japan

Cooler : EYELA CA-1111, Japan

Drying oven: CO-2D-1S, Wooju Sci. Co., Korea

Dry thermo bath : EYELA MG-2200, Japan

ELISA microplate reader : Molecular Devices SpectraMax 340PC,
USA

Evaporator: EYELA NE, Japan

Freeze dryer : OPERON FDU-8612, Korea

Hot plate : Corning PC-400D, USA

ESI-QTOF-MS: Waters Xevo G2 QTOF

Freeze-dryer: DURA-DRY, Fts system Inc., USA

HPLC system

-Gilson 321 pump, USA

-Gilson UV/VIS 151 detector, USA

HPLC column

-YMC J'sphere ODS-H80, 250 x 10 mm, 4 μ m, 8nm, Japan

-Chemcopak Chemcosorb 5Si-U, 250 x 10 mm, Japan

Microscope : Olympus CK-2, Tokyo, Japan

MS

-ESIMS : Agilent 1100 series LC/MSD Trap, USA

-FABMS : JEOL JMS AX 505 WA Spectrometer, Japan

-EIMS : JEOL JMS 700 Spectrometer, Japan

NMR

-JEOL LA 300 Spectrometer (300 MHz), Japan

-Bruker AVANCE digital 400 Spectrometer (400 MHz), Germany

-Bruker AVANCE digital 500 Spectrometer (500 MHz), Germany

-Bruker AVANCE digital 600 Spectrometer (600 MHz), Germany

Polarimeter: JASCO, DIP-100, Japan

Rotary evaporator: Shimadzu 2101, Japan

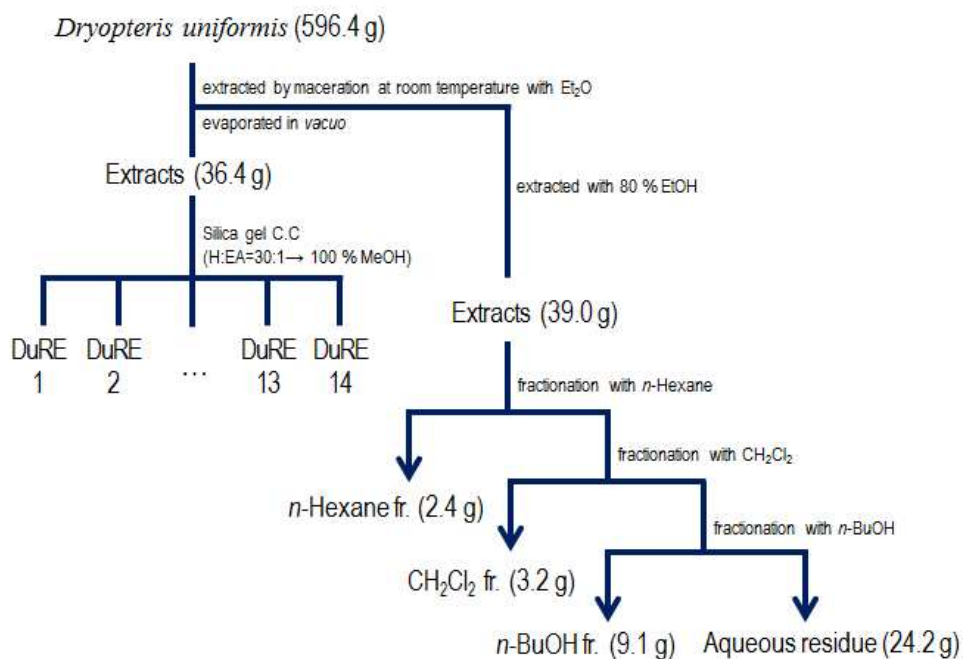
Sonicator: Branson 5200, 5210, UK

UV lamp : Vilber Lourmat VL-4.LC, France

3. 곰비늘고사리로부터 화합물의 분리

3-1. 곰비늘고사리의 추출 및 분획

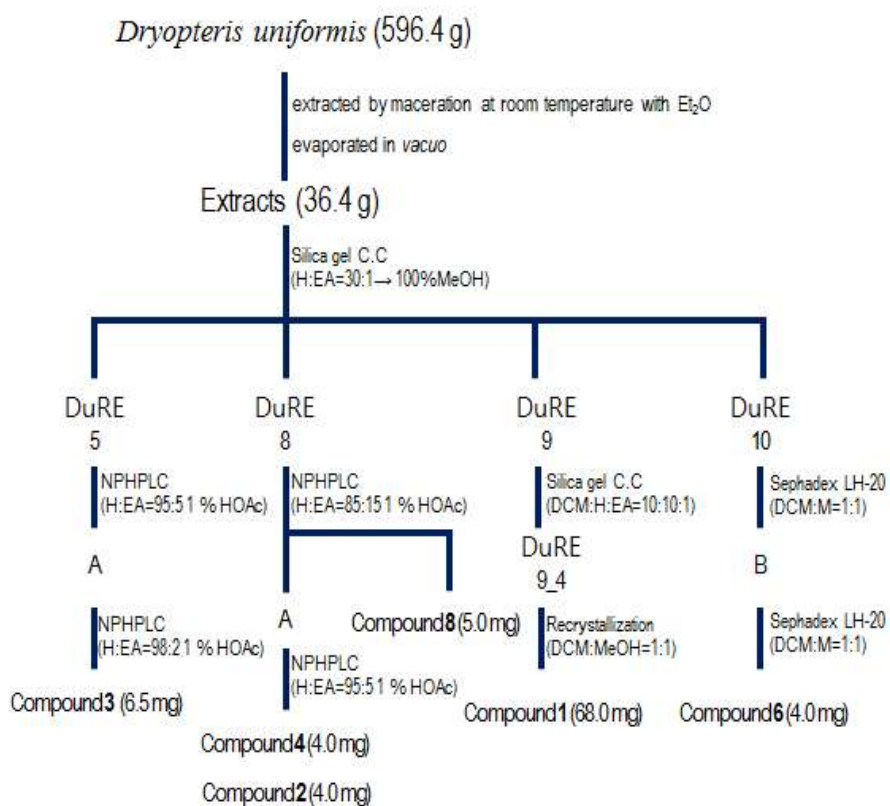
곰비늘고사리 근경 및 인편 596.4 g을 건조 후 100% Et₂O 4 L (2 L x 2)를 가하여 20 시간 동안 침윤하여 총 3 회 추출을 하였다. 용매는 감압농축하고 100 % Et₂O 추출물 36.4 g을 수득하였다(수율: 6.1 %). 이후 건조 후 80 % EtOH 4 L로 198 분 동안 초음파추출을 3 회하였다. 용매는 감압농축하고 80% EtOH 추출물 39.0 g을 수득하였다(수율: 6.5 %). 수득한 80 % EtOH 추출물을 증류수에 현탁한 후 극성 지향적 분리기법에 따라 *n*-Hexane, CH₂Cl₂, 및 *n*-BuOH로 분획하여 각각 2.4 g (수율: 0.4 %), 3.2 g(수율: 0.5%), 9.1 g(수율: 1.5 %)의 분획물을 얻었다 (Scheme 1).



Scheme 1. Extraction and fractionation of *D.uniformis* rhizomes and scales

3-2. 에테르 추출물로부터 phloroglucinol 화합물의 분리

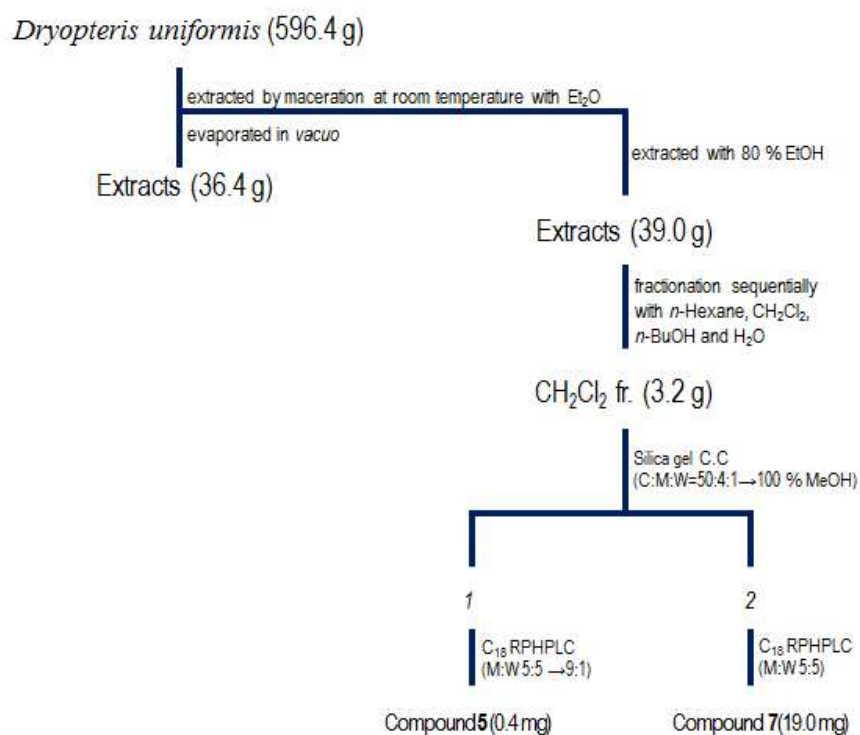
곰비늘고사리의 에테르 추출물을 대상으로 silica gel C.C(*n*-Hexane : EtOAc = 30:1 → 100 % MeOH)를 실시하여 극성에 따라 14개의 분획 (DuRE 1~DuRE 14)으로 나누었고, 소분획 DuRE 5, DuRE 8, DuRE 9, DuRE 10의 분리를 실시하여 화합물 **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **8** 을 얻었다(Scheme 2).



Scheme 2. Isolation of phloroglucinols from the Et₂O extracts of
D.uniformis

3-3. CH₂Cl₂ 분획물로부터 phloroglucinol 화합물의 분리

곰비늘고사리의 CH₂Cl₂ 분획물을 대상으로 silica gel C.C(CHCl₃ : MeOH : Water = 50:4:1 → 100 % MeOH)를 실시하여 극성에 따라 9 개의 분획 (C1~C9)으로 나누었고, 소분획 C1, C2의 분리를 실시하여 화합물 5, 7 을 얻었다(Scheme 3).



Scheme 3. Isolation of phloroglucinols from the CH₂Cl₂ fraction of *D.uniformis*

3-4. phloroglucinol 계열 화합물의 분리

3-4-1. 화합물 1의 분리

소분획 DuRE 9를 silica gel C.C(CH₂Cl₂ : *n*-Hexane : EtOAc = 10:10:1)를 실시하여 DuRE 9-1~DuRE 9-9의 9 개 소분획으로 나누었고, 이 중 소분획 DuRE 9-4에서 생긴 조 결정을 재결정(CH₂Cl₂ : MeOH = 1:1)하여 화합물 1(68.0 mg)을 분리하였다.

Pale yellow powder

C₂₄H₃₀O₈

FABMS(negative mode) : m/z 445[M-H]⁻

UV absorption : 227, 292nm

¹H NMR(CDCl₃, 600 MHz) Table 2 참조

¹³C NMR(CDCl₃, 150 MHz) Table 3 참조

¹H NMR(acetone-*d*₆, 500 MHz) Table 2 참조

¹³C NMR(acetone-*d*₆, 125 MHz) Table 3 참조

3-4-2. 화합물 2의 분리

소분획 DuRE 8을 NPHPLC(*n*-Hexane : EtOAc = 85:15 containing 1 % HOAc)를 실시하여 DuRE 8_A 소분획물을 얻었다. 얻은 소분획물을 NPHPLC(*n*-Hexane : EtOAc = 95:5 containing 1 % HOAc)를 실시하여 화합물 2(4.0 mg)를 얻었다.

Pale yellow powder

C₂₁H₂₆O₇

FABMS(negative mode) : m/z 389[M-H]⁻

UV absorption : 298, 356nm

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) Table 2 참조

¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) Table 3 참조

3-4-3. 화합물 3의 분리

소분획 DuRE 5를 NPHPLC(*n*-Hexane : EtOAc = 95:5 containing 1 % HOAc)를 실시하여 두 개의 소분획물 DuRE 8_A와 DuRE 8_B를 얻었다. 이 중 소분획물 DuRE 8_A를 NPHPLC(*n*-Hexane : EtOAc = 98:2 containing 1 % HOAc)를 실시하여 화합물 3(6.5 mg)을 얻었다.

Colorless needle

C₂₅H₃₂O₈

FABMS(negative mode) : m/z 459[M-H]⁻

UV absorption : 224, 338nm

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) Table 2 참조

¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) Table 3 참조

3-4-4. 화합물 4의 분리

소분획 DuRE 8을 NPHPLC(*n*-Hexane : EtOAc = 85:15 containing 1 % HOAc)를 실시하여 DuRE 8_A 소분획물을 얻었다. 얻은 소분획물을 NPHPLC(*n*-Hexane : EtOAc = 95:5 containing 1 % HOAc)를 실시하여 화합물 4(4.0 mg)를 얻었다.

Pale yellow powder

$C_{25}H_{32}O_8$

FABMS(negative mode) : m/z 459[M-H]⁻

UV absorption : 229, 294nm

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) Table 2 참조

¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) Table 3 참조

3-4-5. 화합물 5의 분리

소분획 C1을 HPLC C₁₈ RP(ACN-H₂O = 5:5 → 9:1)를 실시하여 화합물 5(0.4 mg)를 얻었다.

Pale yellow powder

$C_{23}H_{28}O_8$

FABMS(negative mode) : m/z 431[M-H]⁻

UV absorption : 229, 283nm

¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) Table 2 참조

¹³C NMR(CDCl₃, 100 MHz) Table 3 참조

3-4-6. 화합물 6의 분리

소분획 DuRE 10을 sephadex LH-20 C.C(CH₂Cl₂-MeOH = 1:1)를 실시하여 3개의 소분획물 DuRE 10_A, DuRE 10_B, DuRE 10_C를 얻었다. 이 중 DuRE 10_B 소분획물을 sephadex LH-20 C.C(CH₂Cl₂ : MeOH = 1:1)를 실시하여 화합물 6(4.0 mg)을 얻었다.

Pale yellow powder

$C_{24}H_{30}O_8$

FABMS(negative mode) : m/z 445[M-H]⁻

UV absorption : 238, 285nm

¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) Table 2 참조

¹³C NMR(CDCl₃, 100 MHz) Table 4 참조

3-4-7. 화합물 7의 분리

소분획 C2를 HPLC C₁₈ RP(ACN : H₂O = 5:5)를 실시하여 화합물 7(19.0 mg)을 얻었다

Yellow needles

$C_{12}H_{16}O_4$

ESI-QTOF-MS : m/z 225.1132[M+H]⁺
(calcd.225.1127, C₁₂H₁₇O₄)

UV absorption : 224, 284nm

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.90 (1H, s, H-3), 3.80 (3H, s, H-7),
3.04 (2H, t, J = 7.36 Hz, H-9), 1.99 (3H, s, H-12), 1.70 (2H,
m, J = 7.36 Hz, H-10), 0.97 (3H, t, J = 7.36 Hz, H-11)

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 206.12 (C-8), 163.09 (C-2), 161.20
(C-4), 159.67 (C-6), 104.66 (C-5), 103.32 (C-1), 91.46 (C-3),
55.63 (C-7), 46.09 (C-9), 18.13 (C-10), 13.98 (C-11), 7.08
(C-12)

3-4-8. 화합물 8의 분리

소분획 DuRE 8을 NPHPLC(*n*-Hexane : EtOAc = 85:15 containing 1 % HOAc)를 실시하여 화합물 8(5.0 mg)을 얻었다

Yellow needles

$C_{11}H_{14}O_4$

ESI-QTOF-MS : m/z 211.0972[M+H]⁺

(calcd. 211.0970, $C_{11}H_{15}O_4$)

UV absorption : 228, 282nm

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.91 (2H, s, H-1, H-3) 3.76 (3H, s, H-7), 3.03 (2H, t, J = 7.40 Hz, H-9) 1.71 (2H, m, J = 7.40 Hz, H-10), 0.97 (3H, t, J = 7.40 Hz, H-11)

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 206.18 (C-8), 165.47 (C-2), 163.33 (C-4, C-6), 104.89 (C-5), 94.33 (C-1, C-3), 55.46 (C-7), 45.90 (C-9), 18.09 (C-10), 13.95 (C-11)

Table 2. ¹H NMR data of compounds **1–6**

position	1^a	1^b	2^b	3^c	4^c	5^a	6^d
	δ H (J in Hz)						
5	18.57,s	18.63,s	18.71,s	18.59,s	18.55,s	13.68,s	13.66,s
4'	13.88,s	13.71,s	–	18.59,s	13.79,s	–	13.64,s
3	11.46,s	11.63,s	11.31,s	12.28,s	11.14,s	–	–
2'	–	–	–	12.28,s	–	–	–
6'	8.93,s	9.12,s	11.83,s	–	9.72,s	8.70,s	8.72,s
3'	6.05,s	6.11,s	–	–	–	6.12,s	6.19,s
5'	–	–	6.18,s	–	–	–	–
7'	3.97,s	4.06,s	2.52 t, <i>J</i> =7.45Hz	–	3.94,s	4.02,s	4.01,s
7	3.51,s	3.54,s	3.40,s	3.29,s	3.60,s	3.71,s	3.71,s
8'	–	–	1.68 ^e	–	–	–	–
9	3.15 ^e	3.13 ^e	3.16 t, <i>J</i> =7.30Hz	3.11 ^e	3.18 ^e	3.06, t, <i>J</i> =7.14Hz	3.06 t, <i>J</i> =7.40Hz
9'	3.15 ^e	3.13 ^e	0.96 ^e	3.11 ^e	3.18 ^e	3.06, t, <i>J</i> =7.14Hz	3.06 t, <i>J</i> =7.40Hz
10	1.68 ^e	1.69 ^e	1.70 ^e	1.68 ^e	1.70 ^e	1.70 m, <i>J</i> =7.14Hz	1.70 m, <i>J</i> =7.40Hz
10'	1.68 ^e	1.69 ^e	–	1.68 ^e	1.70 ^e	1.70 m, <i>J</i> =7.14Hz	1.70 m, <i>J</i> =7.40Hz
12	1.46 ^e	1.50 ^e	1.48 ^e	1.45 ^e	1.47,s	–	2.00,s
13	1.46 ^e	1.50 ^e	1.48 ^e	1.45 ^e	1.47,s	–	–
11	0.9 ^e	0.97 ^e	0.99 ^e	0.99 ^e	0.97 ^e	0.97 t, <i>J</i> =7.14Hz	0.97 t, <i>J</i> =7.40Hz
11'	0.9 ^e	0.97 ^e	–	0.99 ^e	0.97 ^e	0.97 t, <i>J</i> =7.14Hz	0.97 t, <i>J</i> =7.40Hz
12'	–	–	–	–	2.10,s	–	–

a. Spectra obtained at 300 MHz in CDCl₃. b. Spectra obtained at 500 MHz in acetone-*d*₆c. Spectra obtained at 500MHz in CDCl₃. d. Spectra obtained at 400MHz in CDCl₃.

e. overlapping signals.

Table 3. ^{13}C -NMR data of compounds **1**–**6**

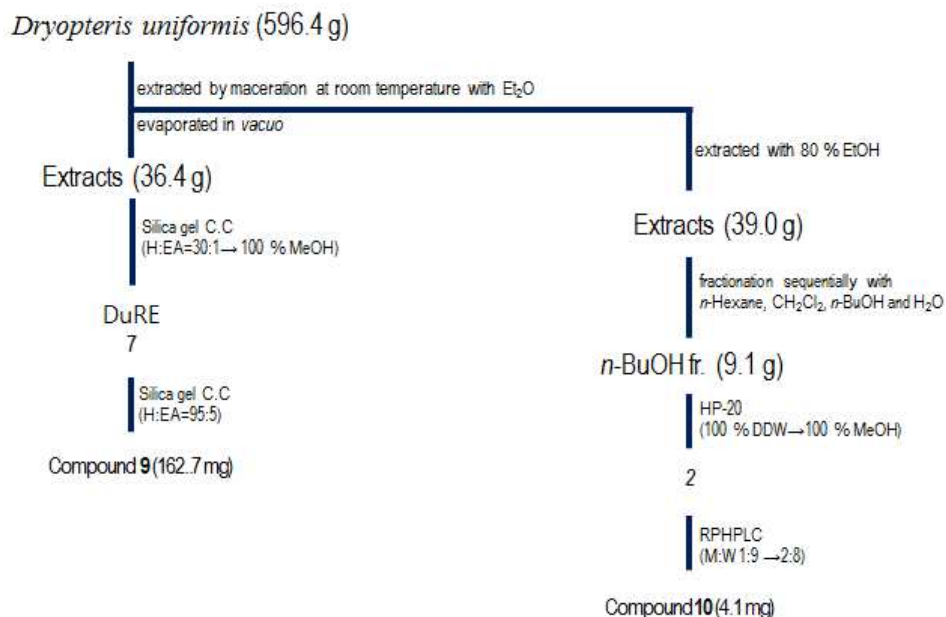
	1^a	1^b	2^b	3^c	4^c	5^a	6^d
position	δ C						
1	187.40	188.36	188.43	187.57	187.37	160,13	160.04
2	111.22	112.03	111.90	110.74	111.14	113.54	106.38
3	171.02	171.96	173.75	173.28	171.51	159.04	158.19
4	44.03	44.92	45.29	44.39	42.92	92.12	92.53
5	199.34	199.57	200.48	199.17	198.53	164.53	163.18
6	108.00	108.94	108.89	108.04	109.00	112.84	104.54
1'	104.78	106.17	102.59	110.74	108.03	113.54	106.38
2'	160.67	162.78	170.89	173.28	159.64	159.04	158.19
3'	91.80	92.95	–	44.39	44.23	92.12	92.53
4'	165.38	166.47	165.95	199.17	162.78	164.53	163.18
5'	107.03	107.41	102.73	108.04	180.86	112.84	104.54
6'	160.04	160.68	169.43	187.57	157.82	160,13	160.04
7	16.77	17.42	18.92	18.01	17.79	15.76	15.78
7'	56.33	57.20	35.74	–	61.67	57.34	56.37
7''	–	–	–	–	–	57.34	56.37
8	207.42	207.75	207.09	206.22	208.26	208.52	206.92
9	42.86	43.55	43.35	42.83	46.76	46.24	46.31
10	18.14	18.83	18.85	18.12	18.14	17.82	17.95
11	13.95	14.36	14.21	13.92	13.97	13.85	13.98
12	24.56	25.07	25.00	25.31	29.70	–	7.89
13	24.56	25.07	23.42	24.18	29.70	–	–
8'	206.53	207.44	20.93	206.22	206.55	208.52	206.92
9'	46.32	46.97	13.70	42.83	46.76	46.24	46.31
10'	18.03	18.90	–	18.12	18.00	17.82	17.95
11'	13.87	14.24	–	13.92	13.92	13.85	13.98
12'	–	–	–	25.31	8.92	–	–
13'	–	–	–	24.18	–	–	–

a. Spectra obtained at 300 MHz in CDCl_3 . b. Spectra obtained at 500 MHz in acetone- d_6 c. Spectra obtained at 500MHz in CDCl_3 . d. Spectra obtained at 400MHz in CDCl_3 .

3-5. diterpene 계열 및 flavonoid 계열 화합물의 분리

곰비늘고사리의 에테르 추출물을 대상으로 silica gel C.C(*n*-Hexane : EtOAc = 30:1 → 100 % MeOH)를 실시하여 극성에 따라 14개의 분획 (DuRE 1~DuRE14)으로 나누었고, 소분획 DuRE 7의 분리를 실시하여 화합물 **9** 를 얻었다(Scheme 4).

n-BuOH 분획물을 대상으로 HP-20(100 % Water → 100 % MeOH)를 실시하여 4 개의 분획 (B1~B4)으로 나누었고, 소분획 B3의 분리를 실시하여 화합물 **10** 을 얻었다(Scheme 3).



Scheme 4. Isolation of other type compounds from *D. uniformis*

3-5-1. 화합물 9의 분리

소분획 DuRE 7를 silica gel C.C(*n*-Hexane : EtOAc = 95:5)를 실시하여 화합물 9(162.7 mg)을 분리하였다.

Yellow oil

C₂₀H₃₄O

EIMS : *m/z* 290[M]⁺

[α]_D²⁰ : +15.4 (*c* 0.5 in CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz) δ 1.24 (3H, s), 1.56 (3H, s), 1.56 (3H, s), 1.57 (3H, s), 1.64 (3H, s), 1.93–2.06 (12H, 6 × m), 5.02 (1H, bd, *J* = 10.7 Hz), 5.07 (2H, bt, *J* = 6.6 Hz), 5.11 (1H, bt, *J* = 6.6 Hz), 5.19 (1H, bd, *J* = 17.4 Hz), 5.88 (1H, dd, *J* = 10.7 Hz, 17.4 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃, 125MHz) δ 15.91 (C-19), 15.93 (C-20), 17.59 (C-17), 22.63 (C-5), 25.60 (C-16), 26.48 (C-9), 26.68 (C-13), 27.75 (C-18), 39.62 (C-8), 39.64 (C-12), 42.03 (C-4), 73.34 (C-3), 111.57 (C-1), 124.05 (C-10), 124.18 (C-14), 124.33 (C-6), 131.08 (C-15), 134.89 (C-11), 135.40 (C-7), 145.00 (C-2)

3-5-2. 화합물 **10**의 분리

소분획 B2를 HPLC C₁₈ RP(ACN : H₂O = 1:9 → 2:8)를 실시하여 화합물 **10**(4.1 mg)을 분리하였다.

Pale yellow needle

C₂₁H₂₀O₁₀

ESI-MS : *m/z* 447.0[M-H]⁻

UV absorption : 266, 352 nm

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ 5.46 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 6.20 and 6.43 (1H each, d, J = 2.0 Hz, H-6, -8), 6.89 and 8.04 (2H each, d, J = 8.7 Hz, H-3', 5', and -2', 6'), 12.60 (1H, br s, OH).

¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz) δ 177.51 (C-4), 164.26 (C-7), 161.26 (C-5), 159.98 (C-4'), 156.46 (C-9), 156.34 (C-2), 133.26 (C-3), 130.93 (C-2' 6'), 121.00 (C-1'), 115.17 (C-3' 5'), 104.04 (C-10), 100.96 (C-1''), 98.78 (C-6), 93.74 (C-8), 77.50 (C-5''), 76.47 (C-3''), 74.27 (C-2''), 69.96 (C-4''), 60.9 (C-6'')

4. LNCaP, PC-3 세포주의 증식 억제 활성

4-1. LNCaP, PC-3 세포주의 배양

LNCaP 세포는 RPMI 1640배지에 10 % FBS, 50 units/mL penicillin과 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator(5 % CO₂/95 % air)에서 배양하였다. 세포가 80 % 정도 배양접시를 덮으면 DPBS(pH 7.4)로 세포 단층을 씻어낸 후 0.25 % trypsin-2.05mM EDTA로 처리하여 계대배양 하였고 배지는 3일마다 교환하였다.

LNCaP

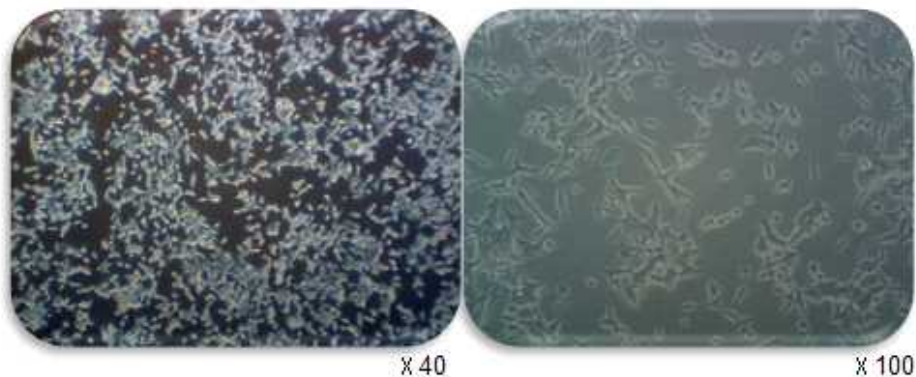


Figure 4. Photomicrographs of LNCaP

PC-3 세포는 RPMI 1640배지에 10 % FBS, 50 units/mL penicillin과 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator(5 % CO₂/95 % air)에서 배양하였다. 세포가 80 % 정도 배양접시를 덮으면 0.25 % trypsin-2.05mM EDTA로 처리하여 계대배양 하였고 배지는 2~3일마다 교환하였다.

PC-3

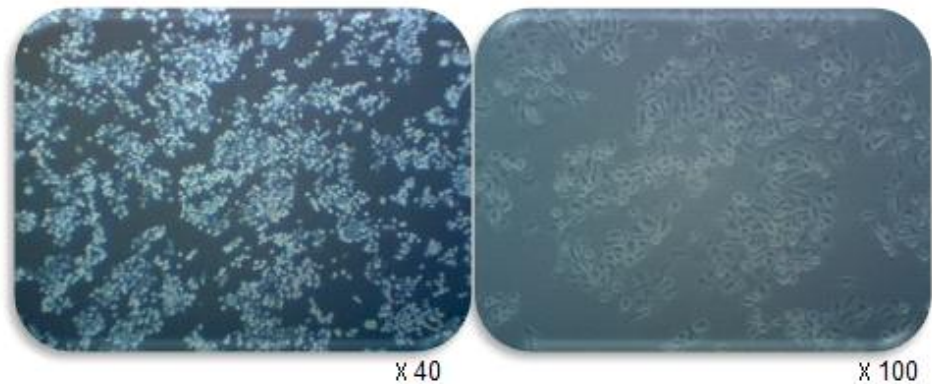


Figure 5. Photomicrographs of PC-3

4-2. 세포 증식 변화 측정

곰비늘고사리의 에테르 추출물, 80 % 에탄올 추출물, 헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 부탄올 분획물, 수용액 분획물과 화합물이 LNCaP 와 PC-3 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포를 10 % charcoal dextran stripped FBS가 포함된 phenol red free RPMI 1640 배지로 희석하여 각각 $8 \times 10^3/\text{well}$, $4 \times 10^3/\text{well}$ 의 밀도로 96 well-plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후 100 μL 의 위와 같은 배지에 에테르 추출물, 80 % 에탄올 추출물, 헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 부탄올 분획물, 수용액 분획물과 화합물을 여러 농도로 첨가한 후 세포를 배양하였다. 72시간이 경과한 뒤 XTT assay로 살아있는 세포수를 측정하였다. 이 때 사용한 대조군의 시약 및 약물들은 다음과 같다(Fig. 6).

Negative control		
DMSO (0.5%, final v/v)		
Positive control		
group A	group B	group C
Androgen testosterone 10nM	Finasteride, Bicalutamide 5μM (antiandrogenic compounds)	Docetaxel 1nM, Etoposide 10μM (cytotoxic drugs)
Stimulation of LNCaP cell proliferation	Inhibition of TES-stimulated LNCaP cell proliferation	Inhibition of LNCaP, TES-stimulated LNCaP and PC-3 cell proliferation

Figure 6. Positive and negative controls for experiments

4-3. XTT assay

배양 중인 세포의 배양액에 XTT를 배양액의 25 %가 되도록 가하고 계속하여 4 시간 더 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존률을 판단하였다.

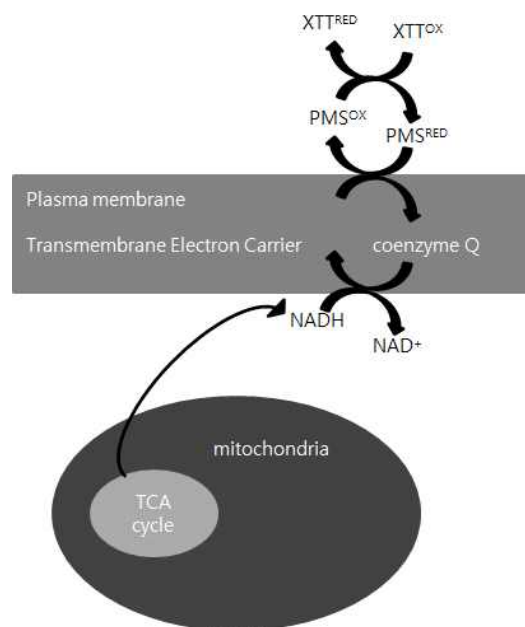


Figure 7. Reaction process of XTT assay

$$\text{Proliferation in \%} = \frac{\text{abs}(\text{test well})}{\text{abs}(\text{DMSO control})} \times 100 - 100\%$$

(Absorbance $\lambda_{\text{max}}=450\text{nm}$, $\lambda_{\text{reference}}= 630\text{nm}$ (Control - DMSO))

4-4. 통계 처리

통계적 유의성을 검토하기 위해 Student's t test를 사용하였다. p value 가 0.05 이하일 때 별 1 개, p value가 0.01 이하일 때 별 2 개를 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 성분 연구

1-1. 화합물 1의 구조 분석

본 연구에서는 다양한 고리 조합을 다지는 phloroglucinol 계열의 물질들을 분리할 수 있었다. 즉, filicinic acid 고리와 pyronone 고리의 조합, filicinic acid 고리와 aromatic phloroglucinol 고리의 조합, 두 개의 동일한 filicinic acid 고리의 조합, 두 개일 동일하거나 다른 aromatic phloroglucinol 고리의 조합이 methylene bridge 로 연결된 형태의 dimer phloroglucinol 계열의 물질들이 분리되었다. 또한 monomer phloroglucinol도 추가적으로 분리할 수 있었다.

Phloroglucinol 계열을 연구함에 있어서는 ^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들을 유심히 살펴 볼 필요가 있다. 특히, *Dryopteris* 속에 속한 화합물에서 주로 분리되었던 dimer 형태의 phloroglucinol의 구조해석에서 ^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들은 큰 의미를 가진다. 이 영역의 시그널들로 기본 골격 구조를 예상할 수 있기 때문이다. 화합물 1의 경우 가장 ^1H NMR spectrum의 downfield인 영역의 δ 18.57의 singlet으로 나타나는 시그널에서 enolizable β -triketonic system 을 관찰할 수 있었다. 이외에도 8 ppm 이상의 downfield 영역에서 보여지는 δ 13.88, δ 11.46, δ 8.93 각각의 시그널의 위치를 보았을 때 filicinic acid 고리와 aromatic phloroglucinol 고리의 조합을 예상할 수 있었다.

이 화합물의 경우, downfield 영역의 시그널로 보아 aromatic phloroglucinol 고리에 filicinic acid의 카르보닐기와 수소결합을 이룰 수 있는 free hydroxyl기를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. aromatic phloroglucinol 고리의 경우 뒤에서 소개할 aspidinol B (7)와 메틸기 치환체가 있다는 것을 제외하고는 그 ^{13}C NMR spectrum 상의 수치가 매

우 유사한 것을 볼 수 있었다. Aspidinol B의 경우 두 개의 hydroxyl기가 acyl side chain의 카르보닐기와 서로 결합을 이루려고 한다. 하지만 이 물질의 경우에는 aromatic phloroglucinol 고리에 있는 두 개의 hydroxyl기는 서로 다른 수소결합을 이룰 수 있다. 하나는 카르보닐기의 탄소와 이루며 다른 하나는 filicinic 고리의 카르보닐기와 수소결합을 이룰 수 있다. 이것은 ^1H NMR spectrum을 살펴보아도 알 수 있었다. Aspidinol B의 경우 10 ppm 부근에서 broad한 단일한 시그널이 관찰되었지만, 화합물 **1**의 경우 δ 13.88, δ 11.46의 단일한 시그널이 관찰되었다.

또한 gem-dimethyl기가 acylfilicinic 고리의 존재를 확인시켜주었다. 3.5 ppm부근에서 methylene bridge가 있어 filicinic ring과 aromatic phloroglucinol 고리를 연결시킬 것으로 예상하였다. 이것은 HMBC spectrum에서 메틸렌 브릿지의 수소와 두 고리의 인접한 탄소간의 correlation을 확인해보면 알 수 있는데 CDCl_3 용매로 측정시에는 관찰할 수 없었다. 이러한 문제를 해결하기 위해 아래와 같은 방법을 시도해보았다.

다만, 화합물 **1**의 경우, minor tautomer라고 생각되어지는 시그널들을 연결하여 메틸렌 브릿지의 수소와 양 옆의 고리의 인접한 탄소간의 HMBC correlation을 통하여, 다음과 같은 minor tautomer 구조를 예측할 수 있었다. 이 구조를 보면, filicinic 고리가 처음 예측하였던 구조와 tautomer 구조임을 알 수 있다. 본래 filicinic acid monomer의 경우 CDCl_3 NMR용 용매에서 가장 안정한 형태로 주로 존재하는 형태가 이 구조와 같다. 비록 화합물 **1**은 다이머 형태이고, 더 많은 minor tautomer구조들이 존재하겠지만, 비교적 잘 관찰되는 minor tautomer 구조의 filicinic acid가 단량체로 존재할 때의 안정한 구조를 다이머에서도 가질 수 있음을 예상해 볼 수 있었다.

Phloroglucinol의 NMR 데이터에 영향을 미치는 인자가 많다. 온도, 용매등이 대표적인데, 이것은 phloroglucinol의 enol-keto tautomerism에 의해 minor한 tautomer 구조들이 주 구조와 같이 존재하기 때문이다. 화

합물 **1**의 경우에는 우선 용매에 의한 영향이 있을 것으로 보아, 용매 조건을 다르게 하여 NMR 측정을 시도해보았다.

Figure 8. Possible tautomeric structures of an acylfilicinic acid

위에서 언급한 예상한 구조 외에 major tautomer 구조를 좀 더 정확히 동정하기 위해 NMR 용매를 아세톤으로 바꿔 측정을 보았다. 아세톤 NMR 용매를 사용시 OH기와 인접탄소간의 HMBC correlation이 관측되는데 그것은 아세톤 용매와 OH기간의 분자간 수소결합으로 인해 tautomer 구조의 교환률을 줄일 수 있기 때문이다. 또한 ^1H NMR spectrum의 낮은 자장의 영역에서 확연하게 minor tautomer의 시그널이 감소됨을 알 수 있었다. CDCl_3 NMR용 용매에서 측정의 또 다른 문제점인 메틸렌 브릿지의 수소와 양옆의 고리의 인접한 탄소간의 HMBC correlation도 연결시킬 수 있었다.

molecular ion peak 는 FABMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 **1**을 desaspidin BB로 동정하였다(Widén *et al.*, 1973).

한편, 다이머 형태의 phloroglucinol의 생합성 과정은 아직 밝혀지지 않았다. 하지만 다음과 같이 두 개의 monomer가 메틸렌 브릿지를 이룰 것이라고 예상하였다.

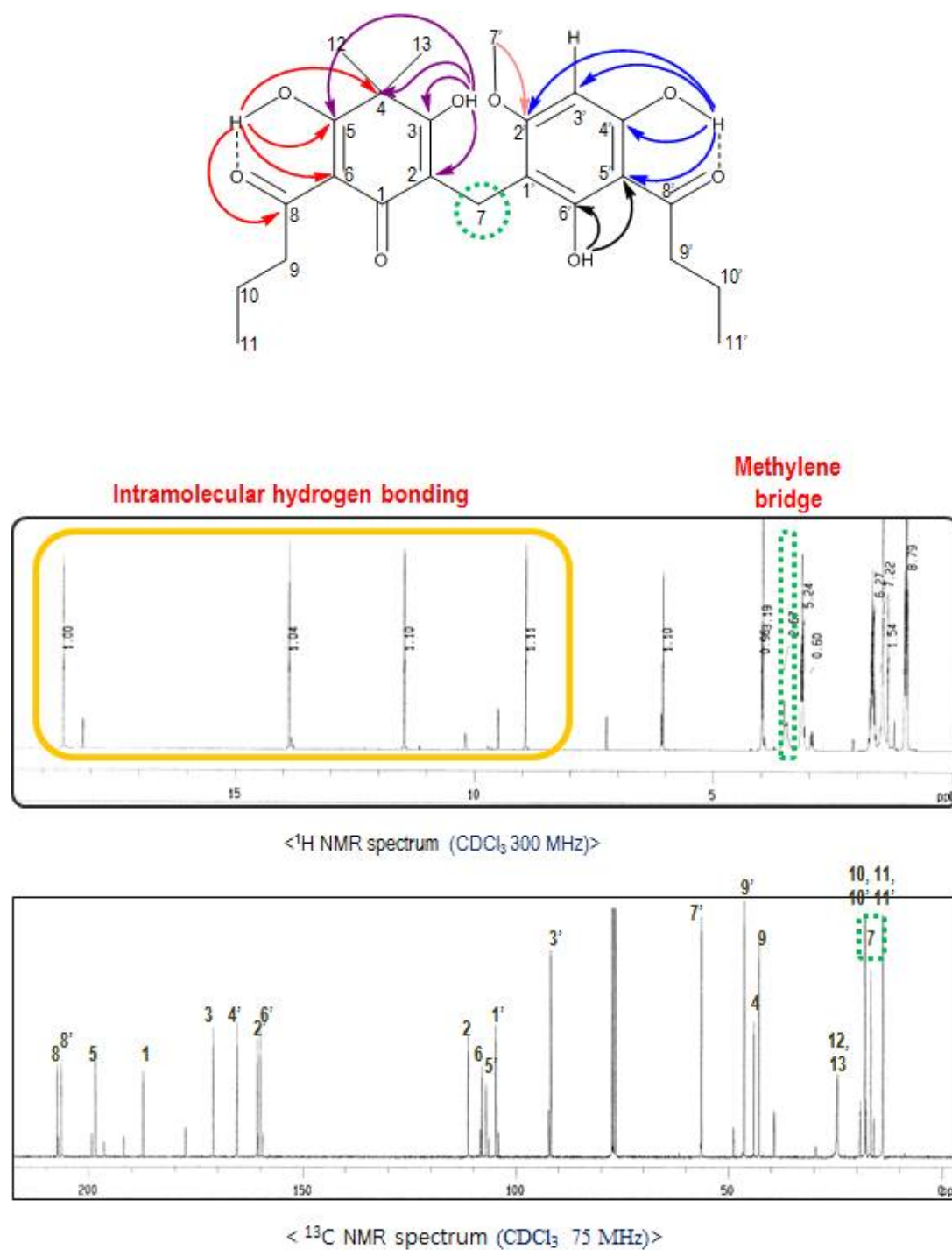


Figure 9. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (in CDCl_3)

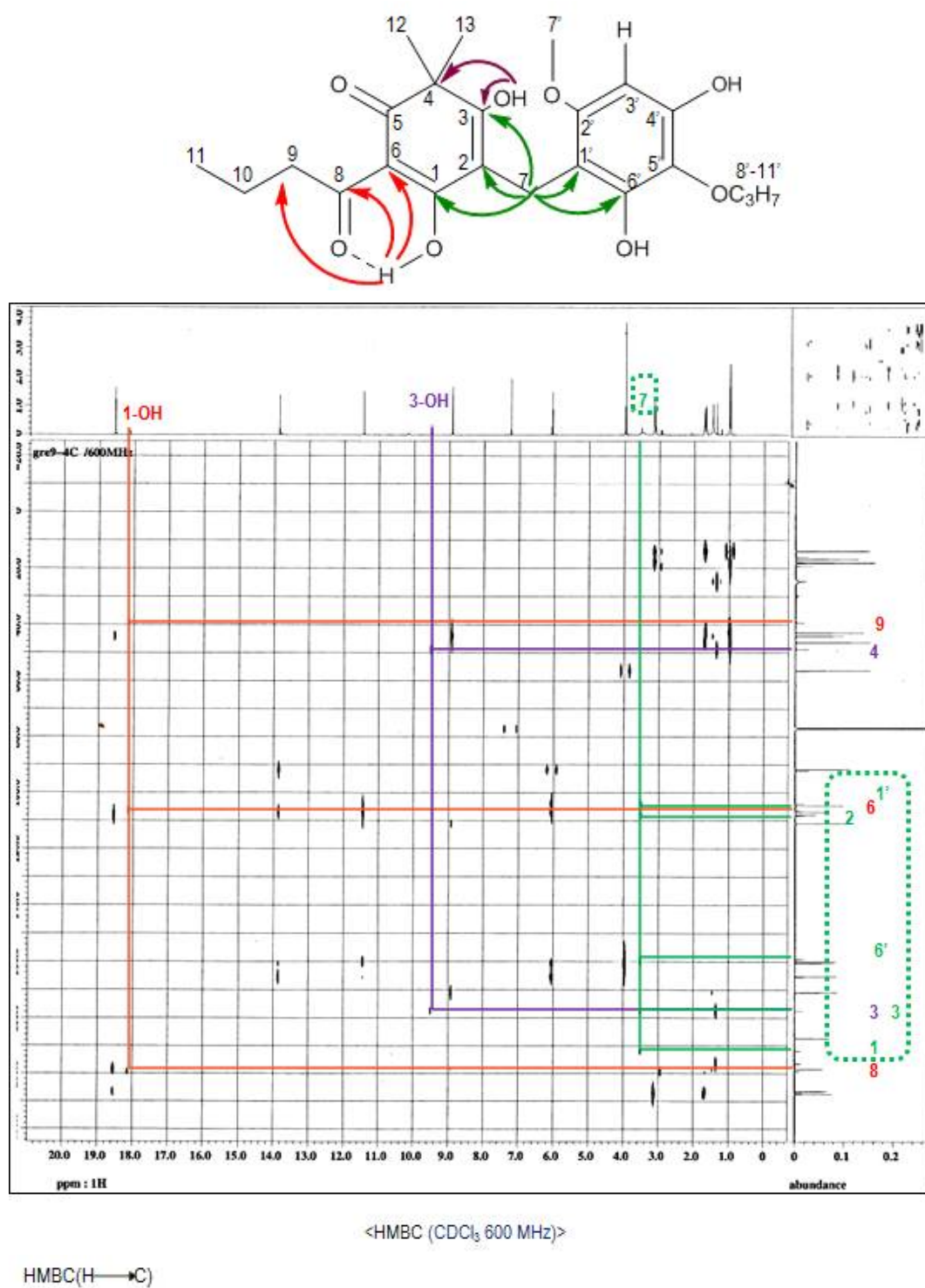


Figure 10. HMBC spectrum of compound1 (in CDCl₃)

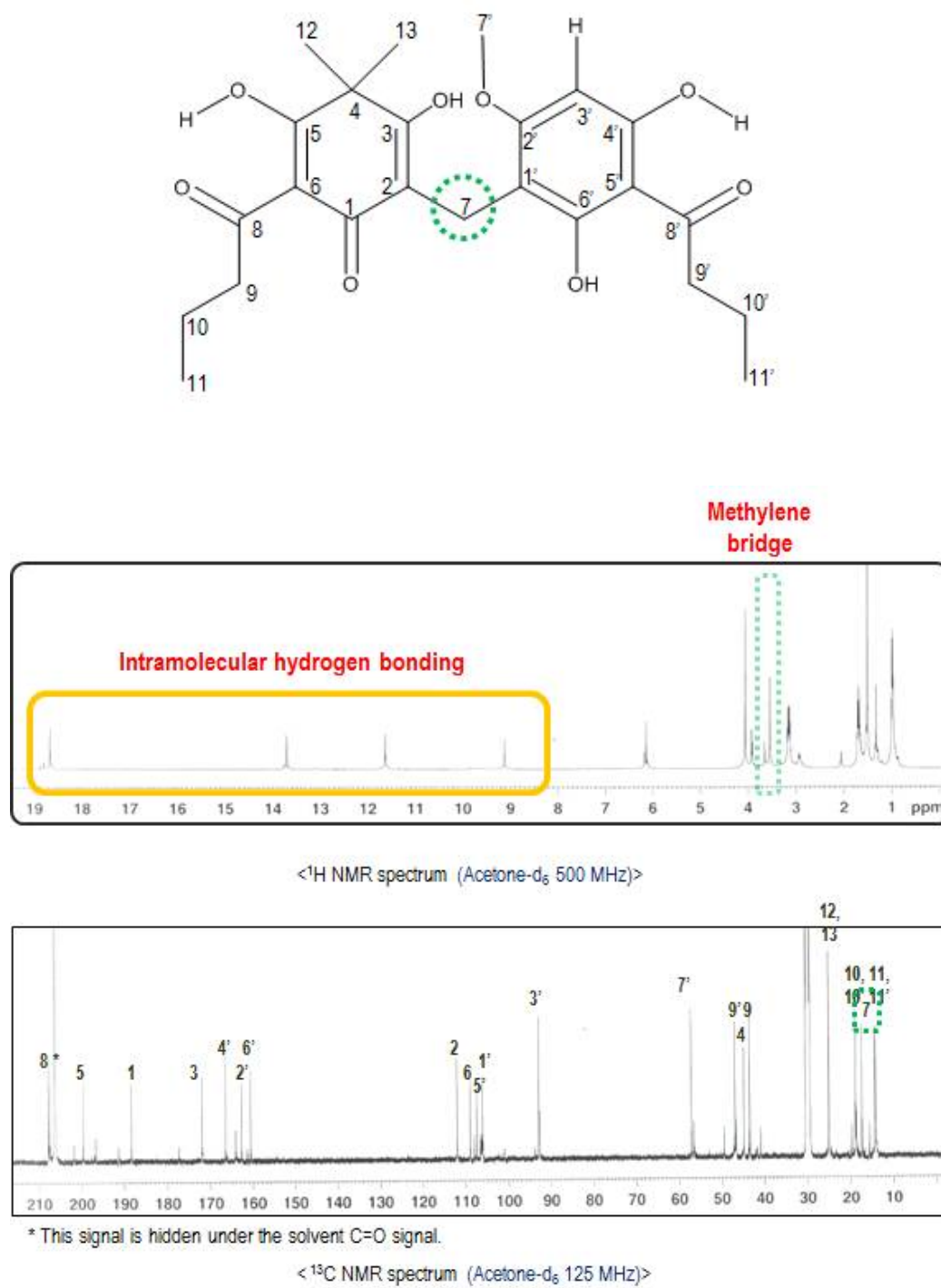


Figure 11. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** (in acetone- d_6)

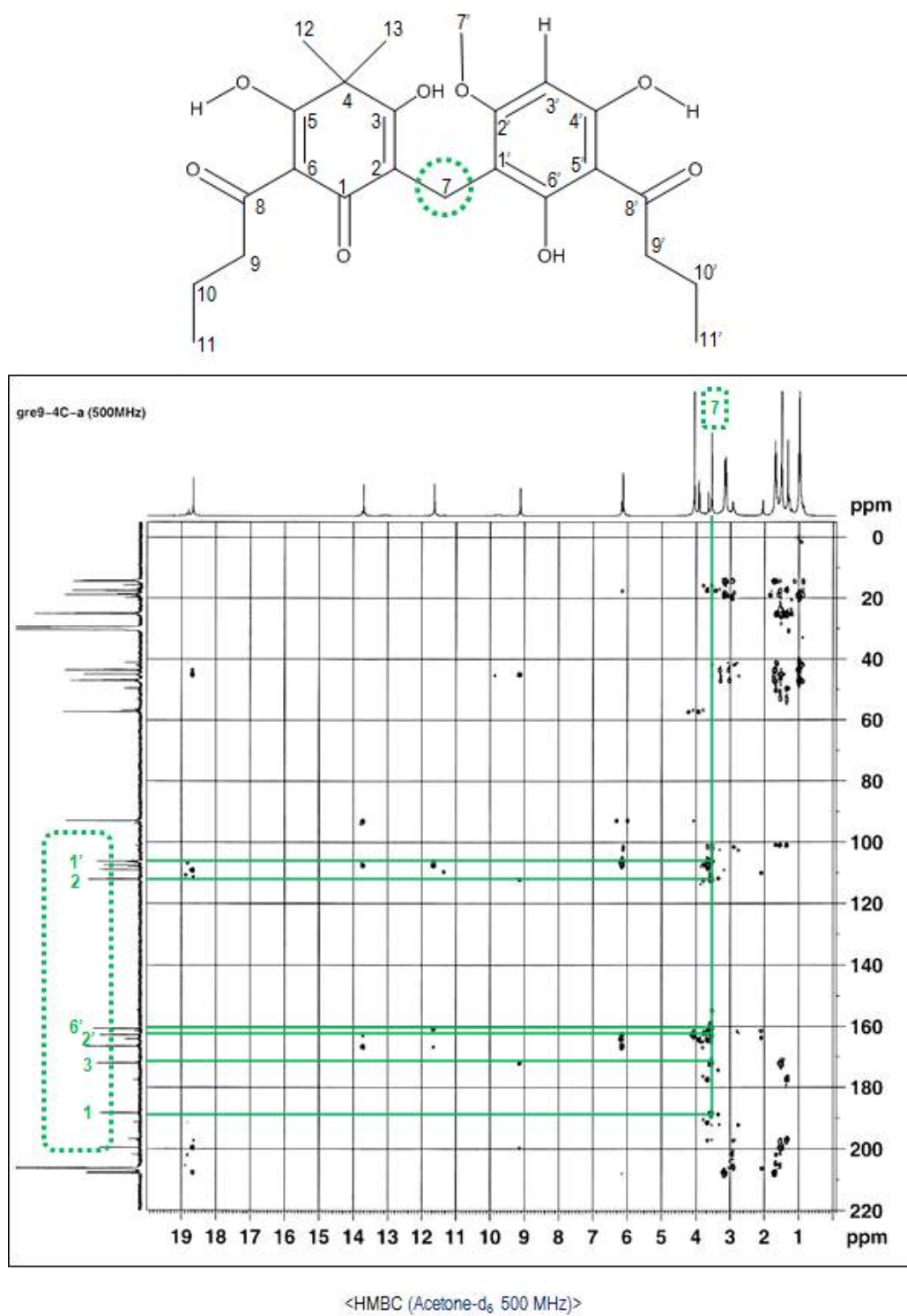


Figure 12. HMBC spectrum of compound 1 (in acetone-*d*₆)

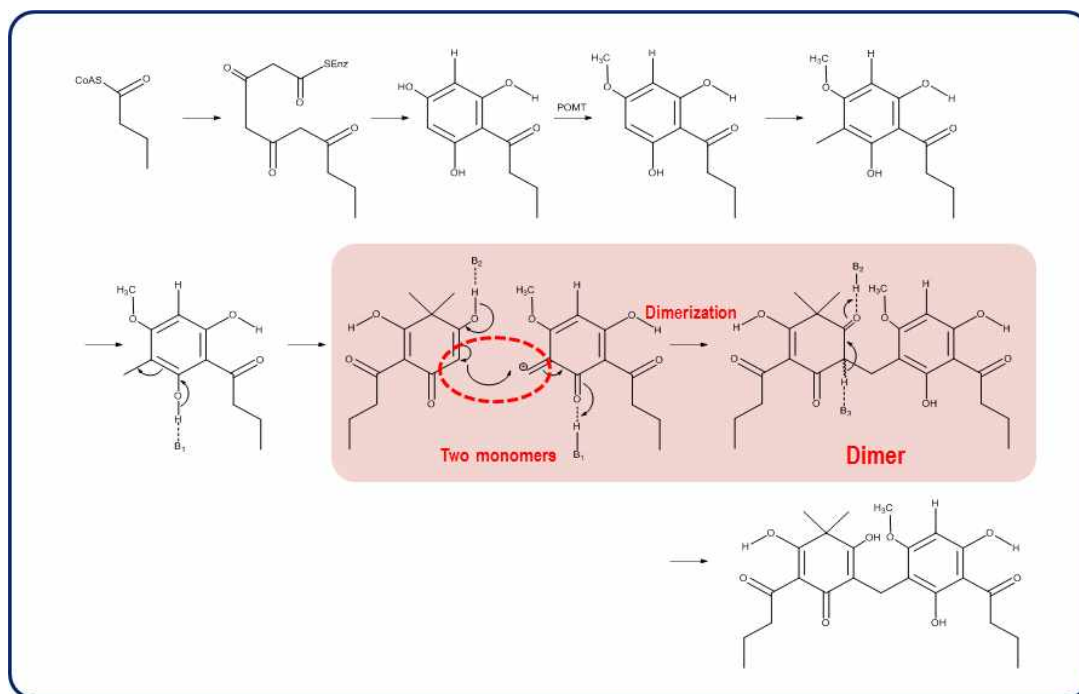


Figure 13. Proposal for biosynthesis of compound 1

1-2. 화합물 2의 구조 분석

이번 연구에서는 주로 filicinic acid 고리나 aromatic phloroglucinol 고리의 phloroglucinol 구조가 주로 분리되었지만 화합물 2의 경우 유일하게 6-methyl-2,3-dihydro-2,4-pyran-2-one (pyronone) 고리를 가지고 있는 구조였다. 반대편의 filicinic acid ring의 경우 단일체의 경우 클로로포름이나 아세톤의 NMR 용매상에서 가장 안정한 tautomer 구조는 다음과 같다 (Figure 8). 그러나 이 단일체의 ^{13}C NMR spectrum과 dimer의 ^{13}C NMR spectrum상의 수치는 약간의 차이를 보인다. 이것은 두 구조가 다른 tautomer의 구조를 가지거나 비슷한 관점에서 다른 hydrogen bonding을 이루고 있기 때문으로 설명이 된다.

^1H NMR spectrum의 가장 downfield의 시그널은 filicinic ring의 hydrogen bonded OH 그룹을 뜻한다. 그 다음의 11 ppm부근의 시그널은 pyronone 고리의 hydrogen bonded OH의 수소를 가르킨다. 마지막으로 좀 넓게 나타나는 10 ppm부근의 시그널의 경우 남은 filicinic 고리의 OH기의 수소를 나타내는 것이다. 이 세 번째의 OH의 경우에는 다른 OH기들과는 달리 강력한 수소결합을 이루지는 않는다. 따라서 좀 더 넓은 시그널이 관측되는 것으로 보인다.

또한, gem-dimethyl의 치환체로 acylfilicinic 고리의 존재를 확인할 수 있었다. 3.5 ppm부근에서 methylene bridge가 있어 filicinic ring과 pyronone 고리를 연결시킬 것으로 예상하였다. 이것은 HMBC spectrum에서 메틸렌 브릿지의 수소와 두 고리의 인접한 탄소간의 correlation을 확인하여 알 수 있었다.

molecular ion peak 는 FABMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 2을 phloropyrone BB로 동정하였다(Widén *et al.*, 1976).

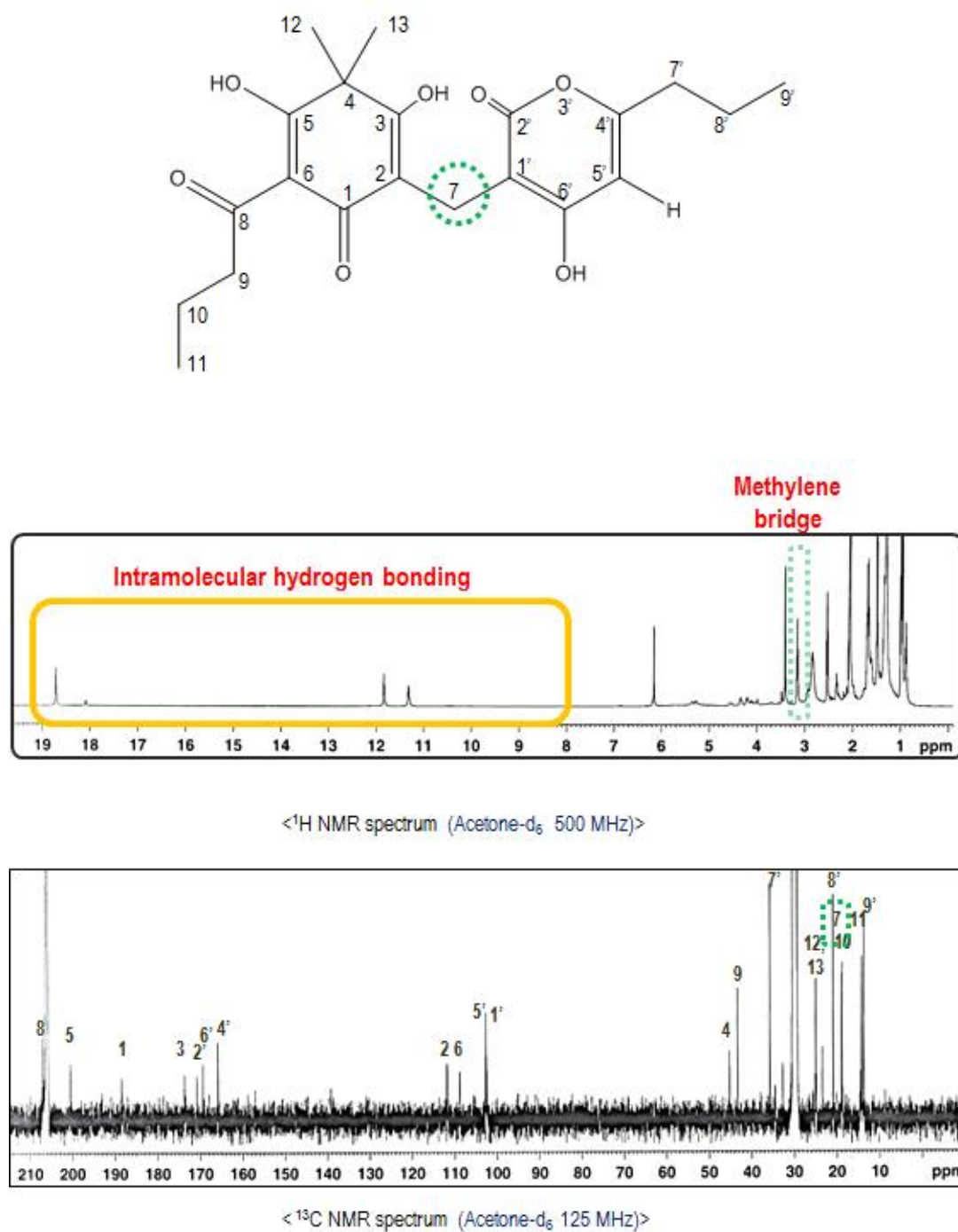


Figure 14. ¹H, ¹³C-NMR spectrum of compound 2 (in acetone-*d*₆)

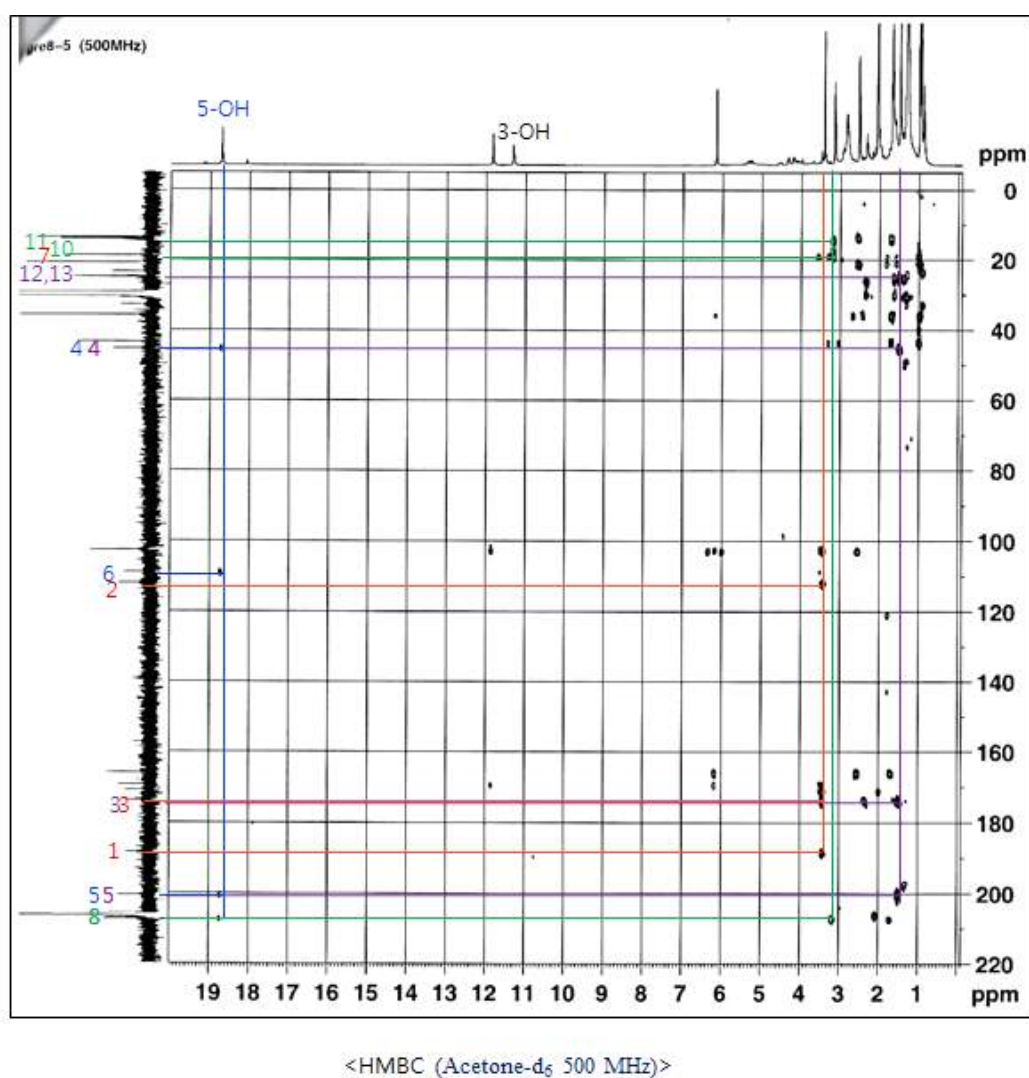
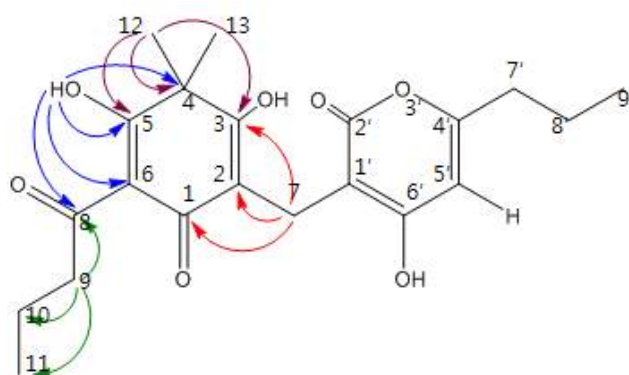


Figure 15. HMBC spectrum of compound 2 (in acetone- d_6)

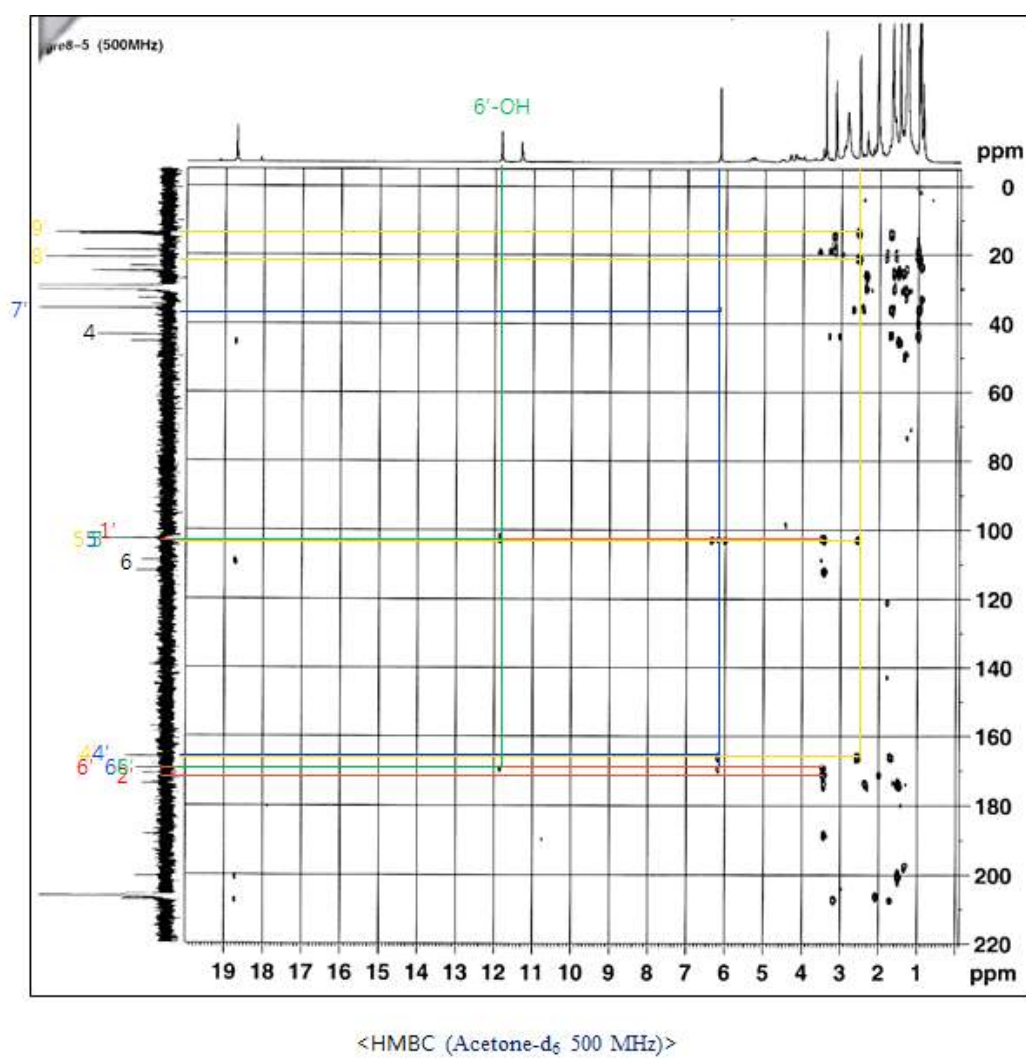
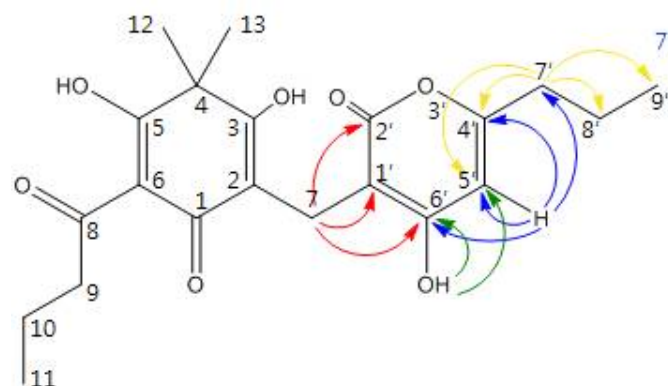
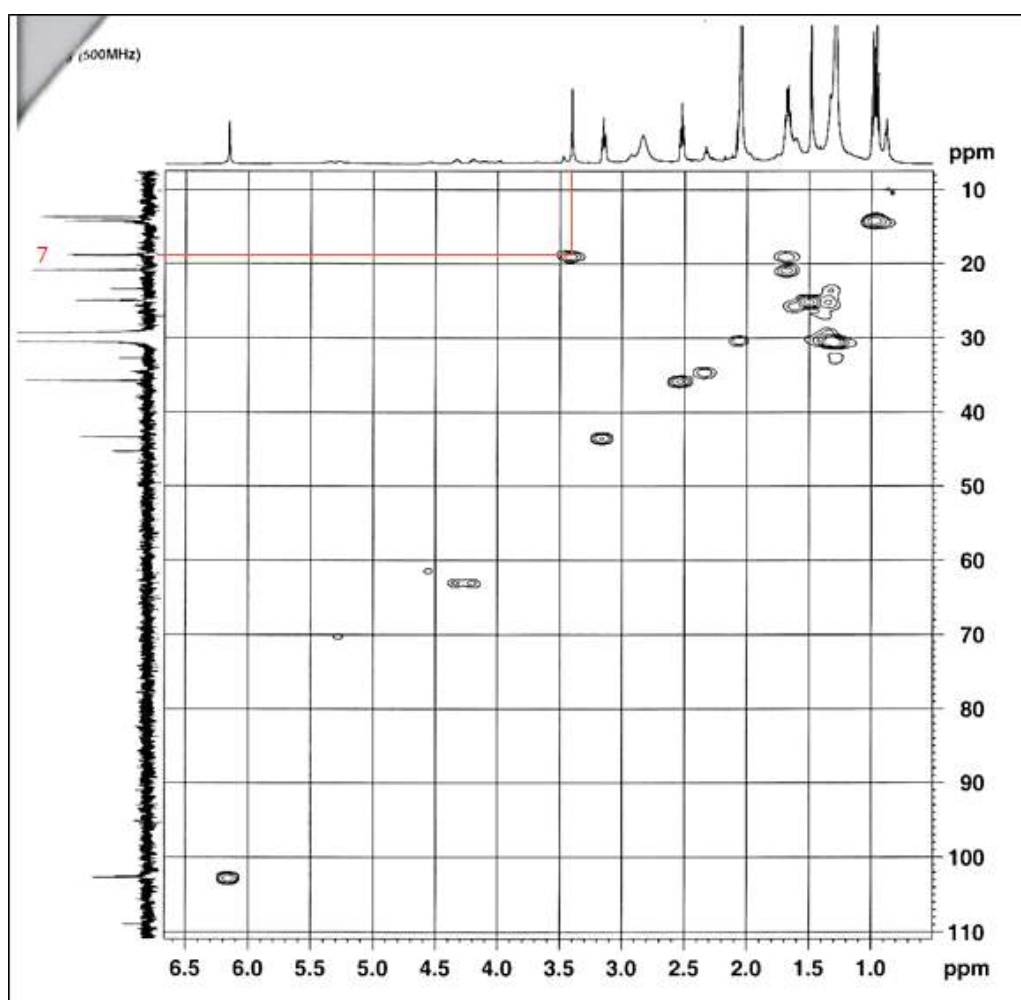
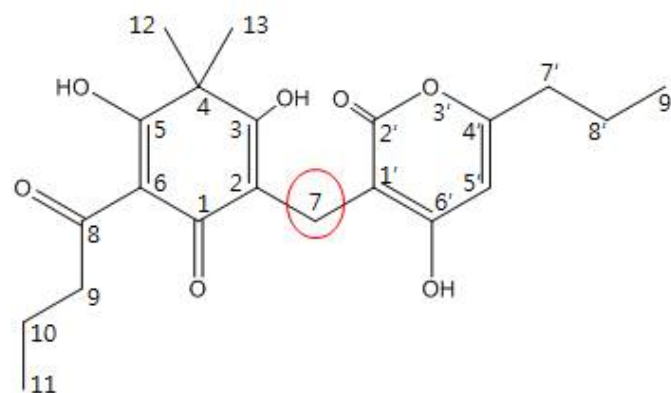


Figure 16. HMBC spectrum of compound 2 (in acetone- d_6)



<HMBC (Acetone- d_6 500 MHz)>

Figure 17. HMBC spectrum of compound 2 (in acetone- d_6)

1-3. 화합물 3의 구조 분석

화합물 3의 경우, 이번 연구에서 분리된 다양한 고리 조합을 다지는 phloroglucinol 계열의 물질들 중에서 두 개의 동일한 filicinic acid 고리의 조합이 methylene bridge 로 연결된 형태의 dimer phloroglucinol 계열의 물질이었다.

앞의 구조 분석과 유사하게 ^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들을 살펴 본 결과 filicinic acid 고리의 기본골격을 가지는 것을 예상할 수 있었다. 화합물 3의 경우 가장 ^1H NMR spectrum의 downfield인 영역의 δ 18.59의 singlet으로 나타나는 시그널에서 enolizable β -triketonic system 을 관찰할 수 있었다. 이외에도 8 ppm 이상의 downfield 영역에서 보여지는 δ 12.28 각각의 시그널의 위치를 보았을 때 filicinic acid 고리의 존재를 예상할 수 있었다.

또한 gem-dimethyl기가 acylfilicinic 고리의 존재를 확인시켜주었다. 3.11 ppm부근에서 methylene bridge가 있어 filicinic acid 고리와 filicinic acid 고리를 연결시킬 것으로 예상하였다. 이것은 HMBC spectrum에서 메틸렌 브릿지의 수소와 두 고리의 인접한 탄소간의 correlation을 확인해보면 알 수 있었다.

molecular ion peak 는 FABMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 3을 albaspidin BB로 동정하였다(Widén *et al.*, 1973).

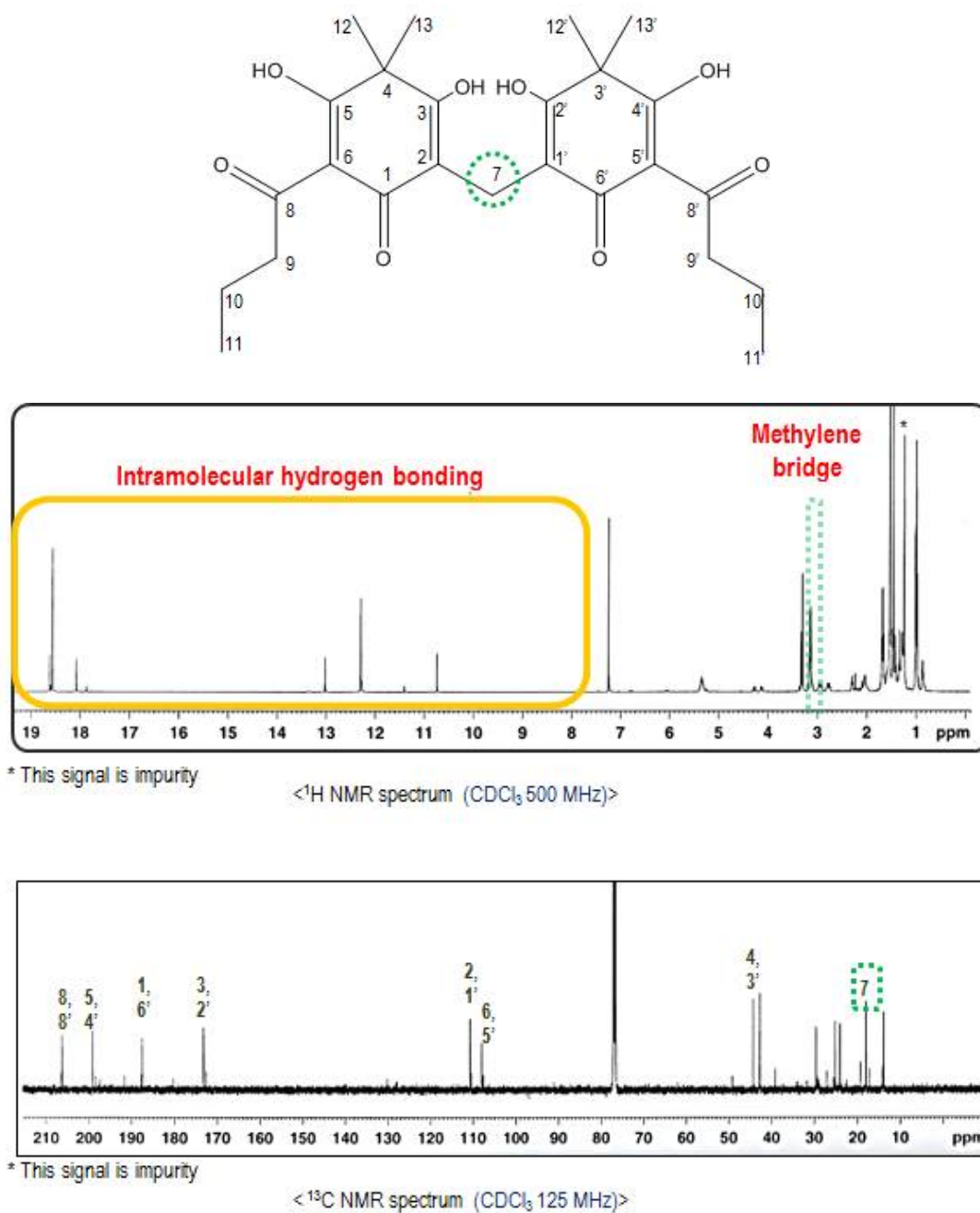


Figure 18. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** (in CDCl_3)

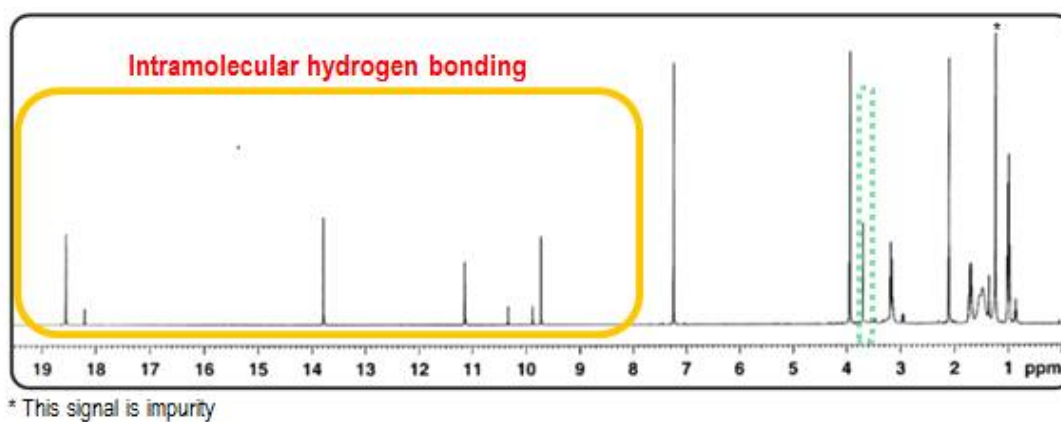
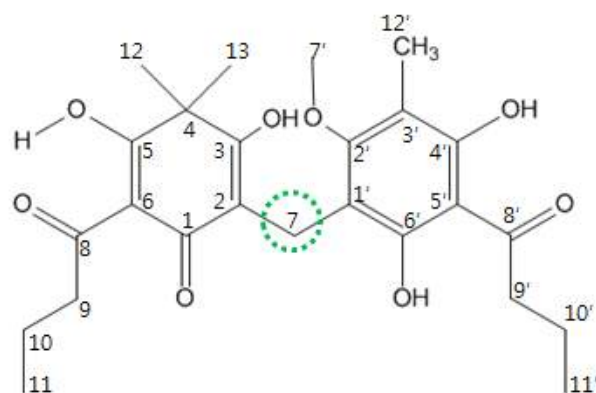
1-4. 화합물 4의 구조 분석

화합물 4의 경우, 하나의 filicinic acid 고리와 하나의 aromatic phloroglucinol 고리 조합이 methylene bridge 로 연결된 형태의 dimer phloroglucinol 계열의 물질이었다.

앞의 화합물 1의 구조 분석과 유사하게 ^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들을 살펴 본 결과 filicinic acid 고리의 기본골격을 가지는 것을 예상할 수 있었다. 화합물 4의 경우 가장 ^1H NMR spectrum의 downfield인 영역의 δ 18.55의 singlet으로 나타나는 시그널에서 enolizable β -triketonic system 을 관찰할 수 있었다. 이외에도 8 ppm 이상의 downfield 영역에서 보여지는 δ 13.79, δ 11.14, δ 9.72 각각의 시그널의 위치를 보았을 때 filicinic acid 고리의 존재를 예상할 수 있었다.

또한 gem-dimethyl기가 acylfilicinic 고리의 존재를 확인시켜주었다. 3.5 ppm부근에서 methylene bridge가 있어 filicinic acid 고리와 filicinic acid 고리를 연결시킬 것으로 예상하였다. 이것은 HMBC spectrum에서 메틸렌 브릿지의 수소와 두 고리의 인접한 탄소간의 correlation을 확인해보면 알 수 있었다. 다만, 화합물 1과 달리 12' 위치에 메틸 치환체가 있음을 알 수 있었다.

molecular ion peak 는 FABMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 4를 *para*-aspidin BB로 동정하였다(Widén *et al.*, 1970).



< ^1H NMR spectrum (CDCl_3 500 MHz)>

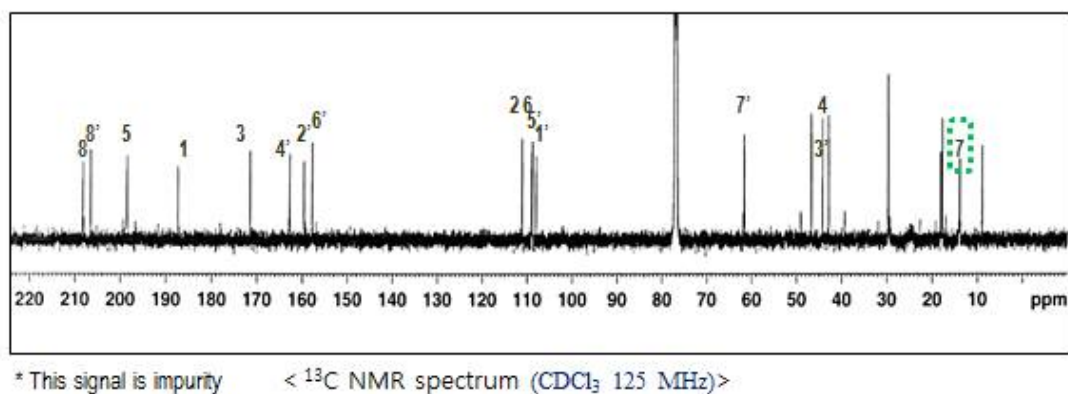


Figure 19. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (in CDCl_3)

1-5. 화합물 5의 구조 분석

화합물 5의 경우, 이번 연구에서 분리된 다양한 고리 조합을 다지는 phloroglucinol 계열의 물질들 중에서 두개의 동일한 aromatic phloroglucinol 고리 조합이 methylene bridge 로 연결된 형태의 dimer phloroglucinol 계열의 물질이었다.

앞의 화합물 1의 구조 분석과 유사하게 ^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들을 살펴 본 결과 filicinic acid 고리의 기본골격을 가지는 것을 예상할 수 있었다.

3.5 ppm부근에서 methylene bridge가 있어 두개의 서로 같은 aromatic phloroglucinol 고리를 연결시킬 것으로 예상하였다. 이것은 HMBC spectrum에서 메틸렌 브릿지의 수소와 두 고리의 인접한 탄소간의 correlation을 확인해보면 알 수 있었다.

molecular ion peak 는 FABMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 5를 methylene-bis-desaspidinol로 동정하였다(Zuo *et al.*, 2005).

1-6. 화합물 6의 구조 분석

화합물 6의 경우, 이번 연구에서 분리된 다양한 고리 조합을 다지는 phloroglucinol 계열의 물질들 중에서 두개의 서로 다른 aromatic phloroglucinol 고리 조합이 methylene bridge 로 연결된 형태의 dimer phloroglucinol 계열의 물질이었다.

앞의 화합물 1의 구조 분석과 유사하게 ^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들을 살펴 본 결과 filicinic acid 고리의 기본골격을 가지는 것을 예상할 수 있었다.

3.5 ppm부근에서 methylene bridge가 있어 두개의 서로 다른 aromatic phloroglucinol 고리를 연결시킬 것으로 예상하였다. 이것은 HMBC spectrum에서 메틸렌 브릿지의 수소와 두 고리의 인접한 탄소간의 correlation을 확인해보면 알 수 있었다.

molecular ion peak 는 FABMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 6를 phloraspidinol BB로 동정하였다(Widén *et al.*, 1976).

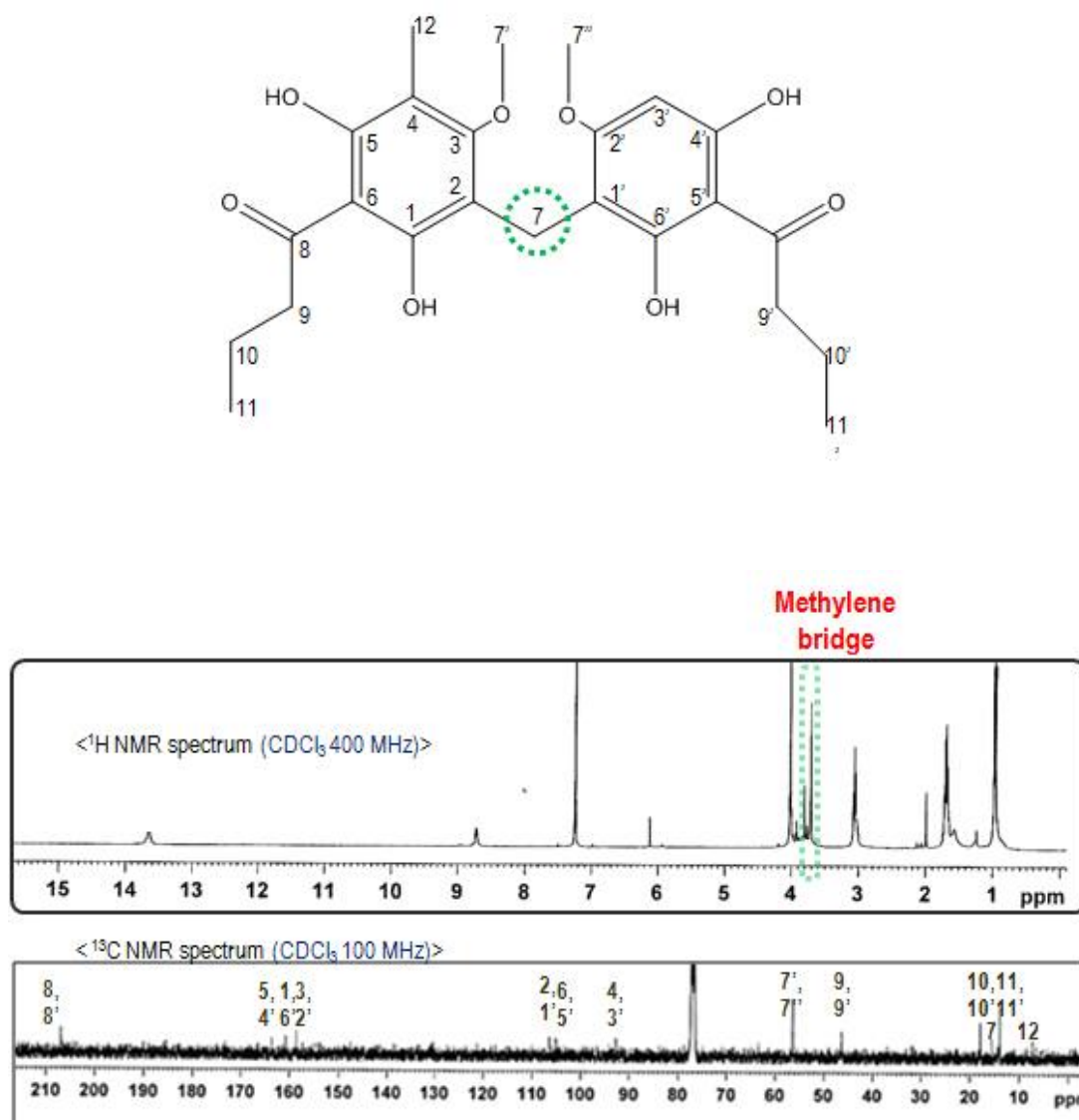


Figure 21. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 (in CDCl_3)

1-7. 화합물 7의 구조 분석

화합물 7의 경우, 앞에서 분리한 구조들과 달리 단량체의 phloroglucinol 물질이었다. 이것은 ^1H NMR spectrum의 3.5ppm 부근의 메틸렌 브릿지를 확인할 수 없다는 것과도 일치하는 결과였다.

^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들을 살펴 본 결과 filicinic acid 고리의 기본골격이 아닌 aromatic phloroglucinol 고리 구조를 가짐을 예상할 수 있었다. 치환체의 위치는 HMBC correlation의 연결을 통하여 결정할 수 있었다.

molecular ion peak 는 ESIMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 7을 aspidinol B로 동정하였다(Widén *et al.*, 1970).

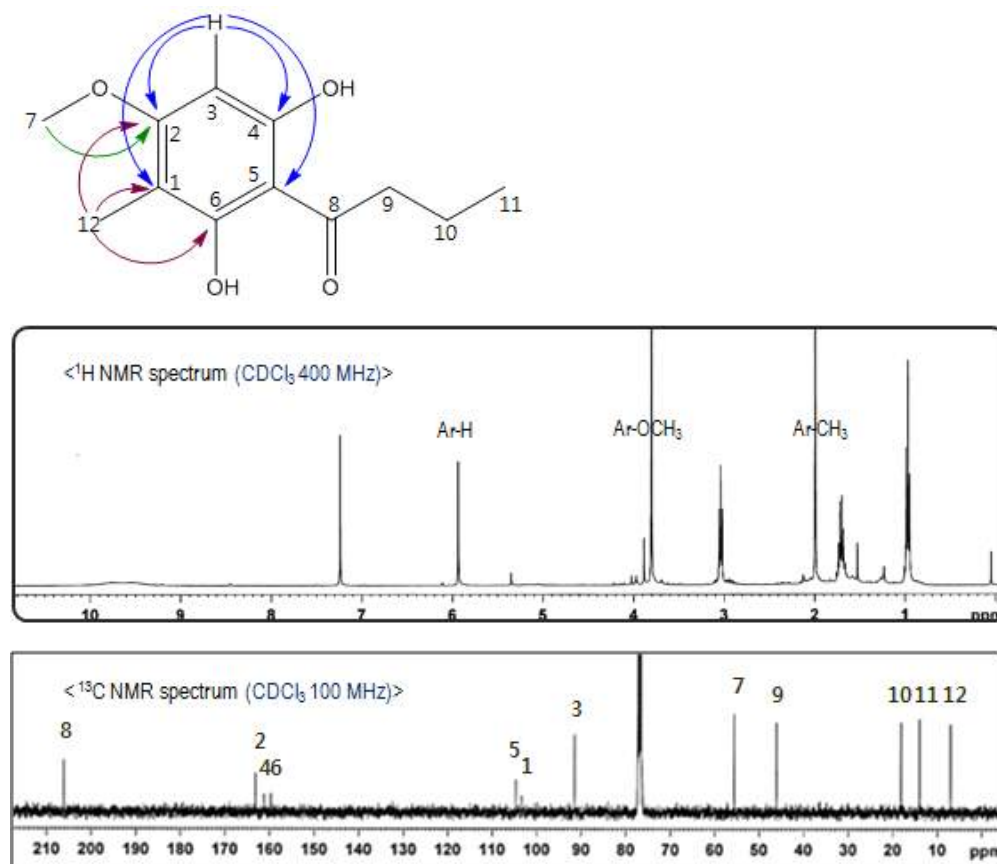


Figure 22. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 7 (in CDCl₃)

1-8. 화합물 8의 구조 분석

화합물 8의 경우, 화합물 7과 유사하게 단량체의 phloroglucinol 물질이었다. 이것은 마찬가지로 ^1H NMR spectrum의 3.5ppm 부근의 메틸렌 브릿지를 확인할 수 없다는 것과도 일치하는 결과였다.

^1H NMR spectrum의 downfield 영역의 시그널들을 살펴 본 결과 filicinic acid 고리의 기본골격이 아닌 aromatic phloroglucinol 고리 구조를 가짐을 예상할 수 있었다. 치환체의 위치는 HMBC correlation의 연결을 통하여 결정할 수 있었다.

molecular ion peak 는 ESIMS를 통해 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 화합물 8을 desaspidinol 로 동정하였다(Zuo *et al.*, 2005).

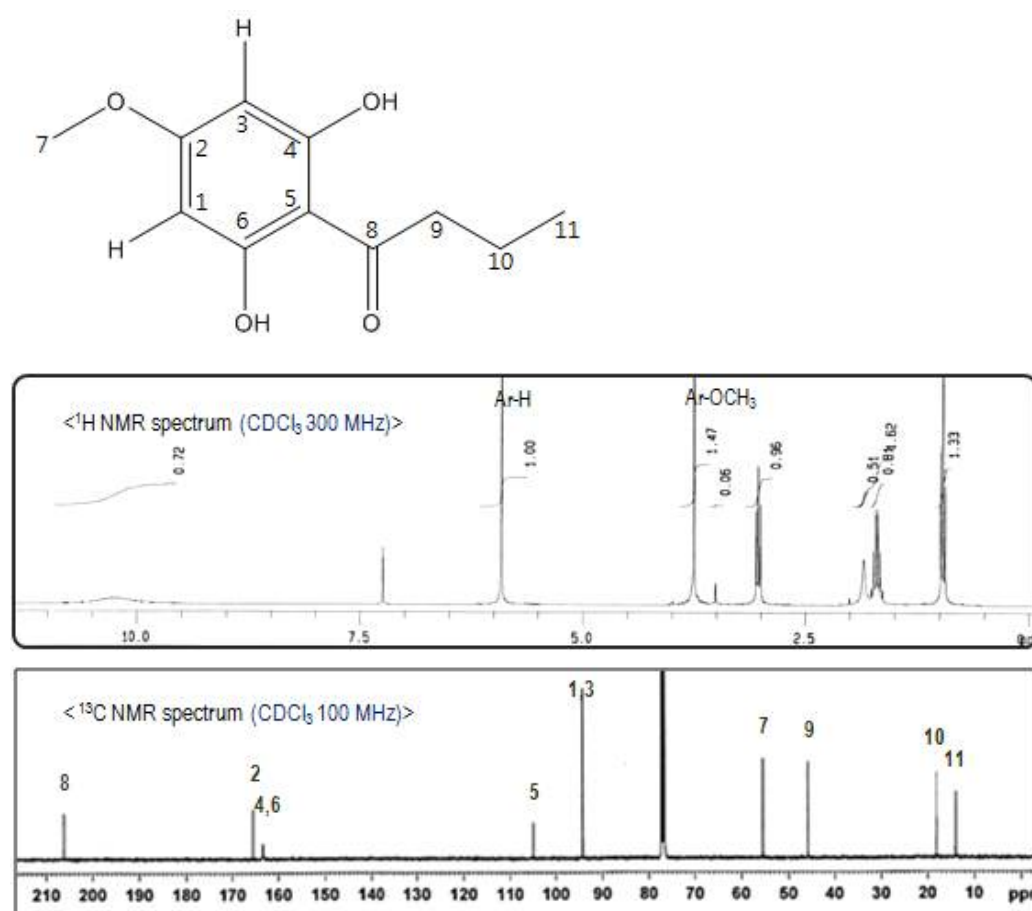


Figure 23. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 8 (in CDCl₃)

1-9. 화합물 9의 구조 분석

화합물 9의 경우 노란색 오일상의 물질로 분리되었다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개의 탄소를 확인할 수 있었고 DEPT spectrum을 측정하여 각각의 탄소성질을 확인하였다. ^1H NMR spectrum에서는 6번 위치의 수소는 5.11ppm ($J = 6.6$ Hz), 10번과 14번 위치의 수소는 5.07ppm ($J = 6.6$ Hz)에서 나타나는데 각각은 $J = 6.6$ Hz를 가짐으로 cis coupling을 가짐을 확인할 수 있었으며, 1번 위치의 수소를 나타내는 5.02ppm ($J = 10.7$ Hz), 5.19ppm ($J = 17.4$ Hz)의 시그널과 2번 위치의 수소를 나타내는 5.88 ($J = 10.7$ Hz, 17.4 Hz) 시그널을 통해 trans, cis coupling을 관찰 할 수 있었다. 3번 위치의 chiral center의 configuration은 선광도를 통하여 이전 문헌자료와 비교하여 결정하였다(Svatos *et al.*, 2002).

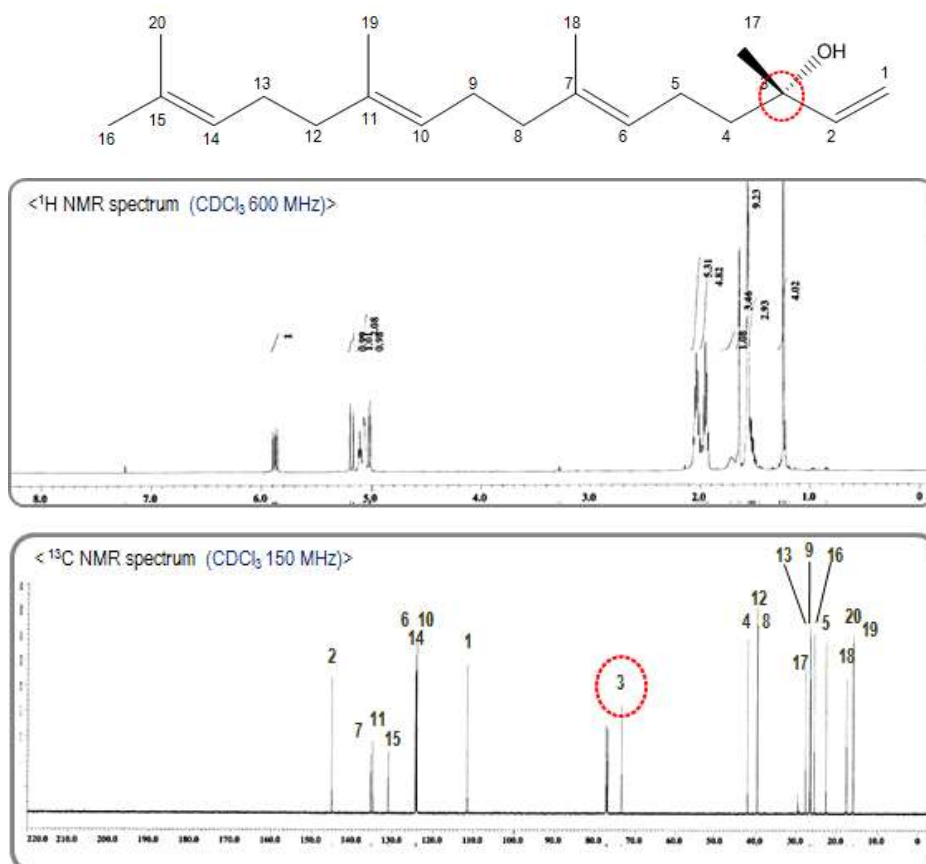
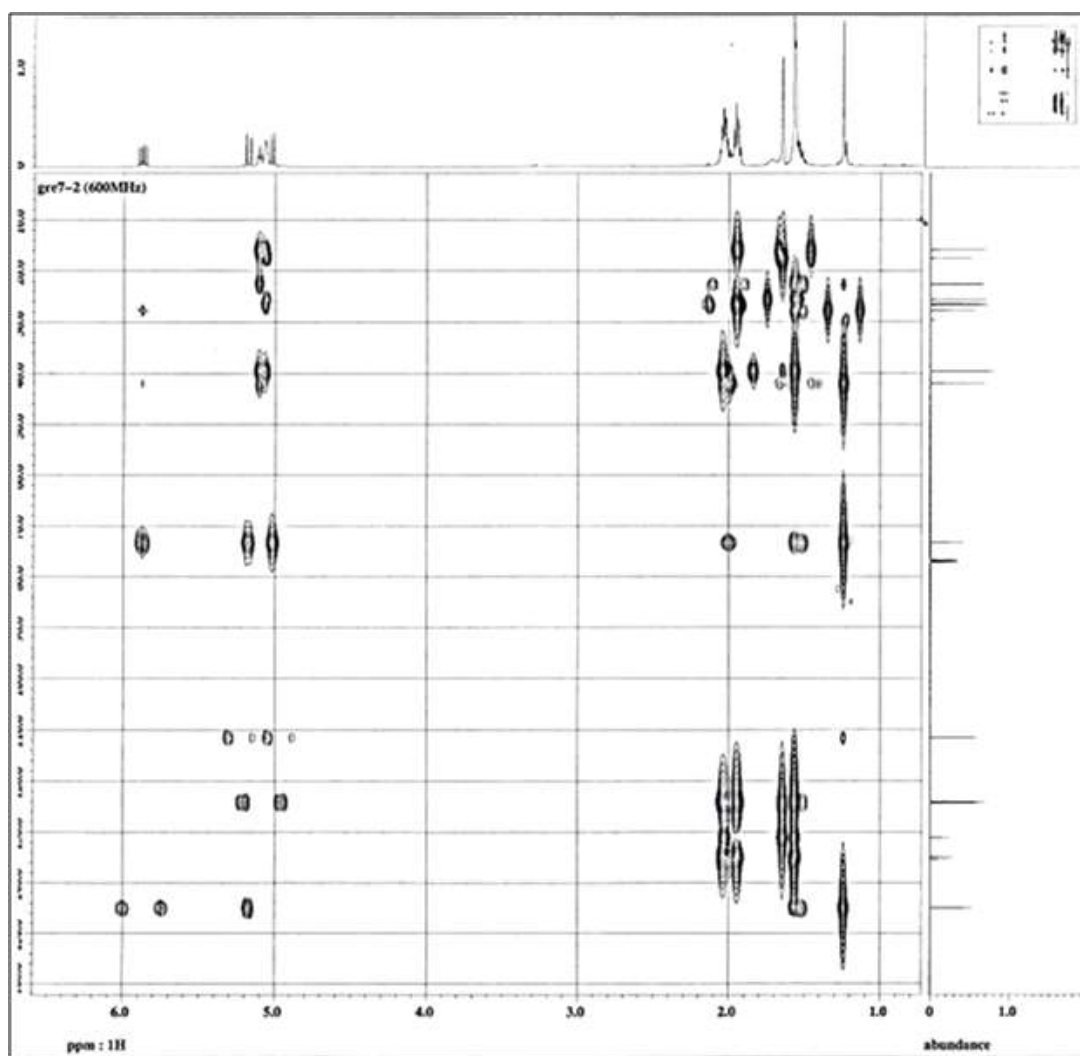


Figure 24. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound 9 (in CDCl_3)



– 55 –

1-10. 화합물 10의 구조 분석

화합물 10은 미황색의 침상의 결정을 이루는 단일물질로 분리되었다. ^1H NMR spectrum에서는 aromatic 영역에서 aglycone인 kaempferol에 상응하는 H-6 및 H-8은 각각 6.18 및 6.42ppm에서 $J = 2.0$ Hz로 meta-coupling하고, 6.87 ppm과 8.02 ppm에서 $J = 8.7$ Hz로 H-2', 6'과 H-3', 5'이 ortho-coupling하여 나타났고, 1개의 anomeric proton에 의한 doublet이 $J = 7.4$ Hz로 나타났으므로 화합물 4는 1 분자의 glucose가 β 결합하고 있음을 알 수 있었다. (Mahato et al., 1982). UV spectrum에서는 MeOH 용액에서 band I이 352nm, band II가 266nm에서 각각 흡수극대를 나타내므로 이 화합물은 3번 OH기에 glucose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었다 (Mabry et al., 1970). ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 glucose에 해당하는 δ 62.6의 methylene peak를 비롯하여 100.96 (C-1''), 77.50 (C-5''), 76.47 (C-3''), 74.27 (C-2''), 69.96 (C-4''), 60.9 (C-6'')의 5개의 peak가 관찰되었다.

이상의 결과로서 화합물 10의 화학구조는 kaempferol glycoside로 추정하고 기존 문헌에 발표된 자료 (Yun et al., 2000)와 비교하여 kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside인 astragalin으로 확인하였다.

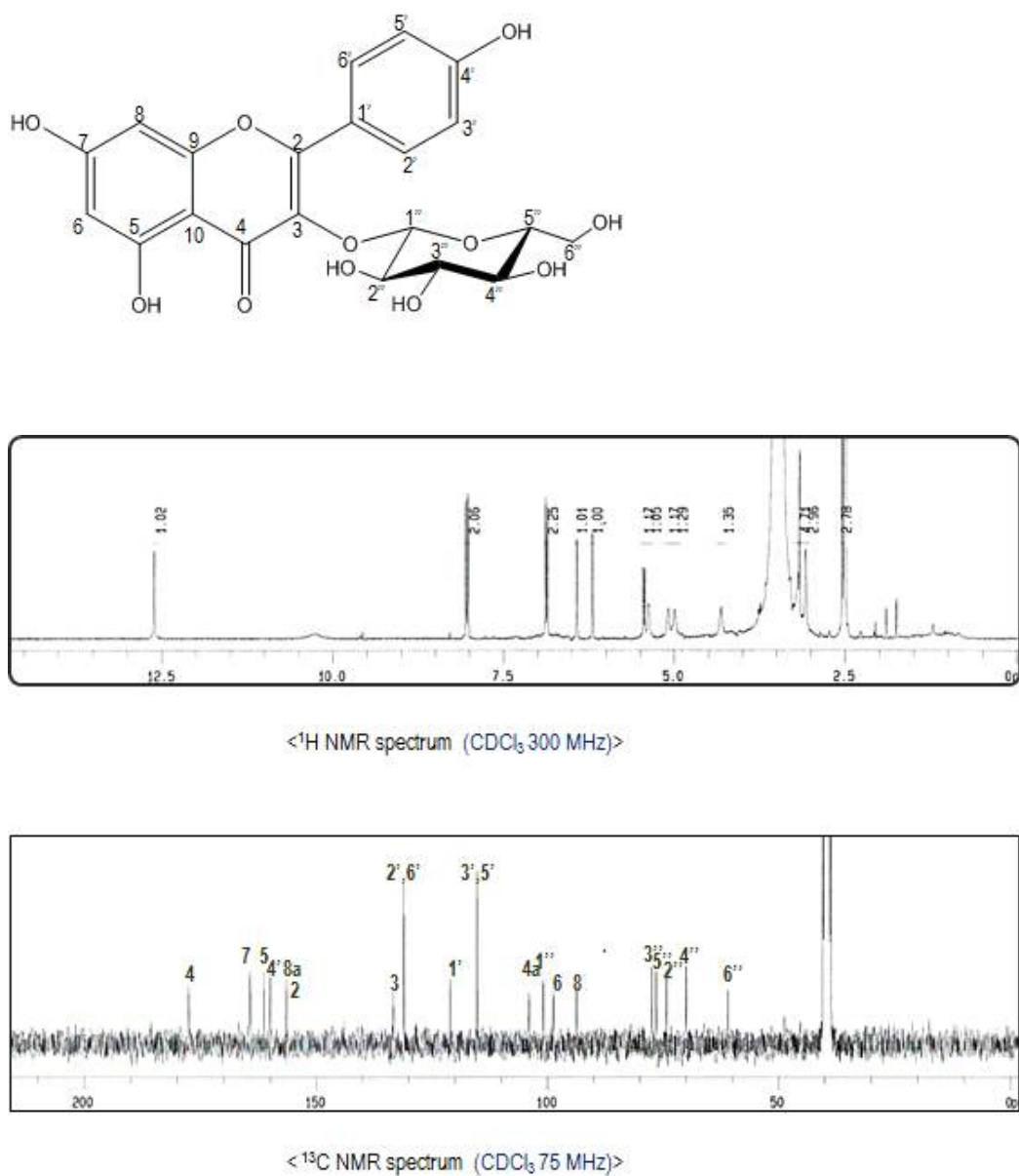


Figure 26. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum of compound **10** (in CDCl₃)

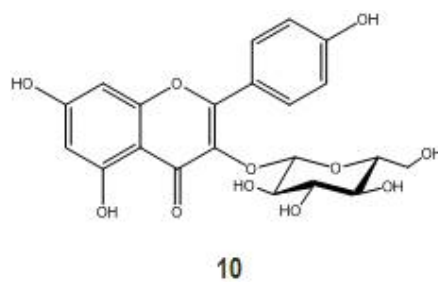
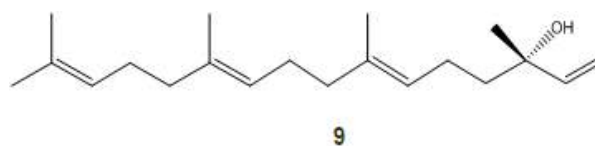
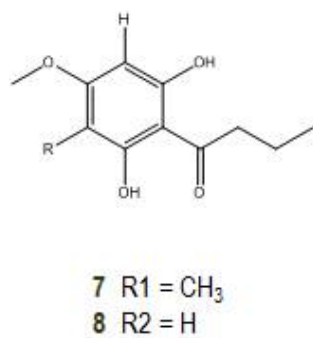
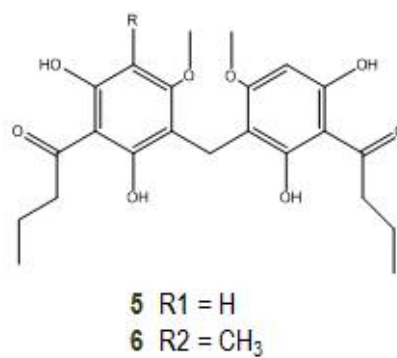
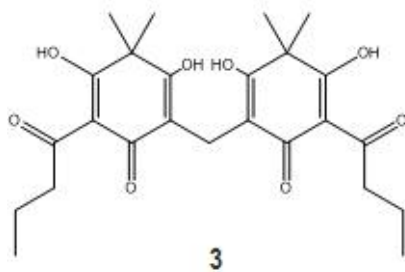
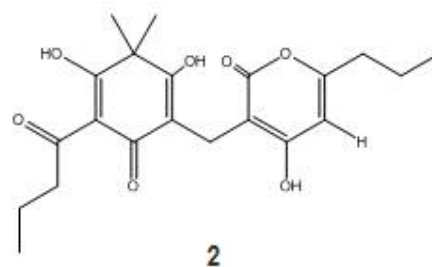
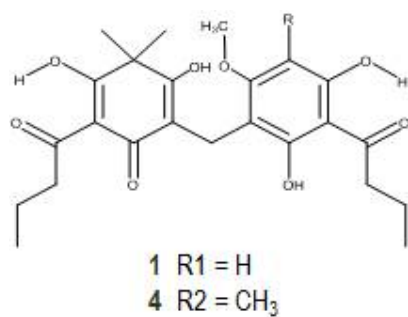


Figure 27. Structures of the compounds isolated from *D.uniformis*

2. 곰비늘고사리의 전립선 암세포 증식 억제 활성

2-1. 추출물, 분획물의 전립선 암세포 증식 억제 활성

곰비늘고사리의 에테르 추출물, 80 % 에탄올 추출물, 헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 부탄올 분획물, 수용액 분획물이 인간의 전립선에서 유래한 LNCaP와 PC-3 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 배양액에 100 μ g/mL, 50 μ g/mL의 각 추출물 및 분획물을 첨가하고, 72시간이 지난 후 XTT assay 방법으로 살아있는 세포수를 측정하였다. 에테르 추출물, 헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물의 경우 LNCaP 및 PC-3 세포 증식이 감소하였다.(Fig. 27)

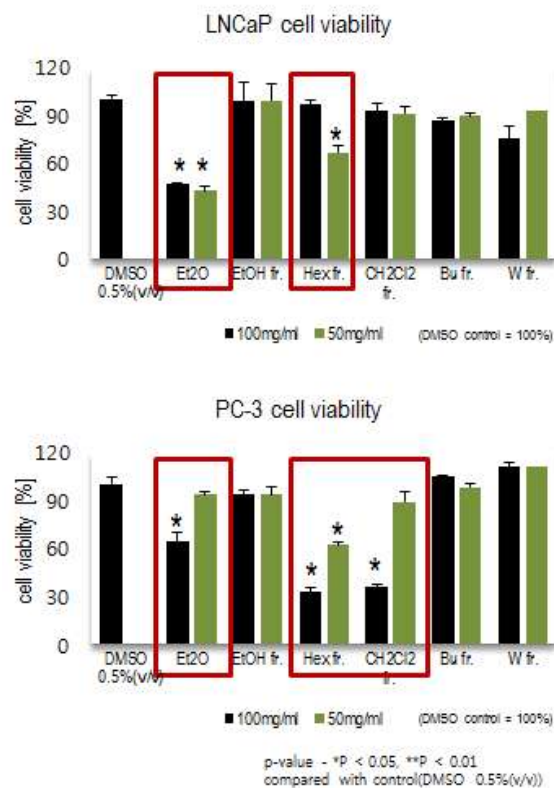


Figure 28. The cell viability of the fractions of *D.uniformis* rhizomes and scales on LNCaP and PC-3 cell lines

Sun등은 주저리고사리 *D. fragrans*에서 분리한 aspidin PB 성분이 인간의 간암세포인 HepG2 세포의 세포증식을 억제한다고 보고하였고, Chang등은 관중 *D. crassirhizoma*의 메탄올 추출물이 인간의 전립선 암세포인 PC-3 MML의 세포증식을 억제한다고 보고하였고, Zhang등은 주저리고사리 *D. fragrans*에서 분리한 Dryofragin 성분이 인간의 유방암세포인 MCF-7의 세포증식을 억제한다고 보고하였다. 또한 Cao등은 홍지네고사리 *D. erythrosora*의 flavonoid를 주성분으로 함유한 추출물이 A549 폐암세포주의 세포증식을 현저히 억제한다고 보고하였다. 이러한 결과를 통해 관중속의 식물은 간암세포, 폐암세포, 유방암세포 뿐만아니라 전립선암세포의 증식도 억제하여 항암제로 개발할 수 있는 하나의 소재가 될 수 있음을 제시한다.

곰비늘고사리는 면마과의 관중속에 속하는 상록성 다년초로 온대성 양치식물이다. 현재까지 곰비늘고사리의 활성연구와 화학성분에 관한 것은 연구된 바가 없다. 다만 곰비늘고사리가 속한 관중속 식물인 관중은 한의학에서 구충, 이질, 열병성발진, 지혈, 해독 등에 사용되고 있다. 본 연구에서는 곰비늘고사리가 전립선암세포에 미치는 영향을 조사하기 위해 인간의 전립선에서 유래한 암세포인 LNCaP와 PC-3 세포의 증식에 대한 영향을 조사하였다. 곰비늘고사리 추출물, 분획물, 성분을 LNCaP와 PC-3 세포 배양액에 여러농도 (100 µg/ml, 50 µg/ml)로 첨가하여, 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. LNCaP 세포에서 에테르 추출물이 두가지농도 모두에서 그 증식을 현저하게 억제하였으며, 헥산추출물의 저농도에서도 약간의 증식 억제 효과를 보였다. 한편, PC-3에는 총 에테르추출물의 고농도에서 증식 억제 효과를 보였으며, 헥산과 클로로메탄의 추출물에서 농도가 증가함에 따라 그 증식 억제 효과가 커진 것을 관찰할 수 있었다.

앞으로 곰비늘고사리의 추출물, 분획물, 성분의 apoptosis와 그 기전을 좀 더 연구한다면 화학적 암 예방 물질이나 치료제로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

2-2. 화합물 1의 전립선암세포 증식 억제 활성

화학성분들의 평가가 추출물 및 분획물에 이어 진행되었다. 그 중 1번 화합물은 phloroglucinol 계열의 물질로 저농도인 10 μ M, 5 μ M에서 PC-3에는 영향이 미미하며, positive control인 androgen으로 사용된 testosterone의 복합처리 결과 양성대조군인 testosterone의 결과에 비해 antiandrogenic 효과를 보이는 것으로 나타났다. 하지만 antiandrogenic drug로 사용된 P1 (bicalutamide) 및 P2 (finasteride) 경우와 비교 했을 때는 그 효과가 뚜렷하지는 않았으므로 좀 더 저농도에서 그 효과를 기대할 만하다.

반면, 상대적으로 고농도인 100 μ M, 50 μ M 의 농도에서는 LNCaP 세포주의 증식에는 거의 영향을 미치지 않았으나, PC-3 세포주에 대하여 cytotoxic drug로 사용된 C2 (etoposide)와 같이 PC-3에 대한 증식 억제 효과가 뚜렷하게 있음을 관찰할 수 있었다. 이것은 해당 화합물이 PC-3와 LNCaP의 세포증식을 억제하는 사멸 경로에 대해 차이를 보이기 때문일 것으로 생각된다. 두 가지 세포주가 안드로겐의 수용체, p53의 발현 등에서 차이를 보인다고 보고되어 있고, 이 두 가지 세포주에 대한 연구를 좀 더하여, 그 기전을 밝히는 것이 추후 연구과제가 될 것이다.

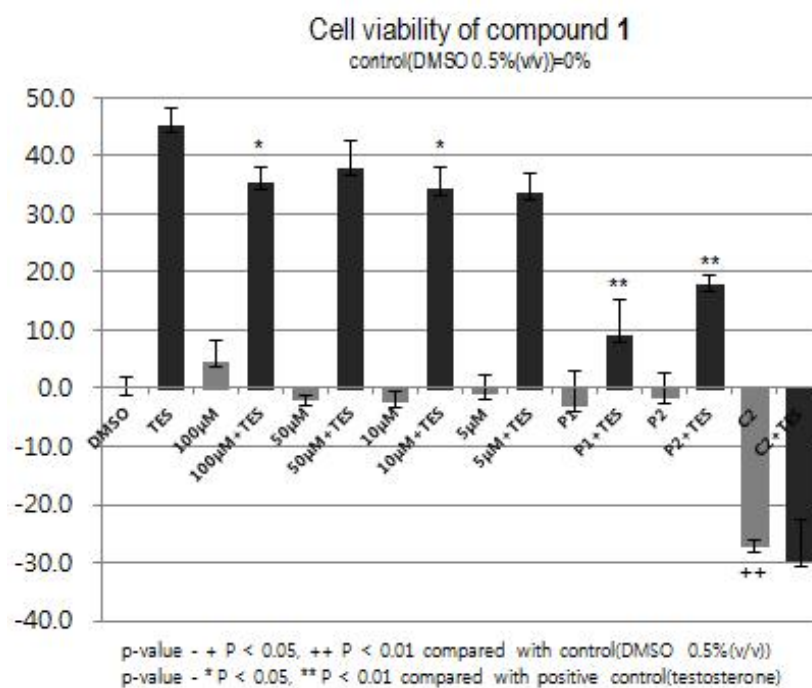


Figure 29. The relative cell viability of the compound 1 on LNCaP

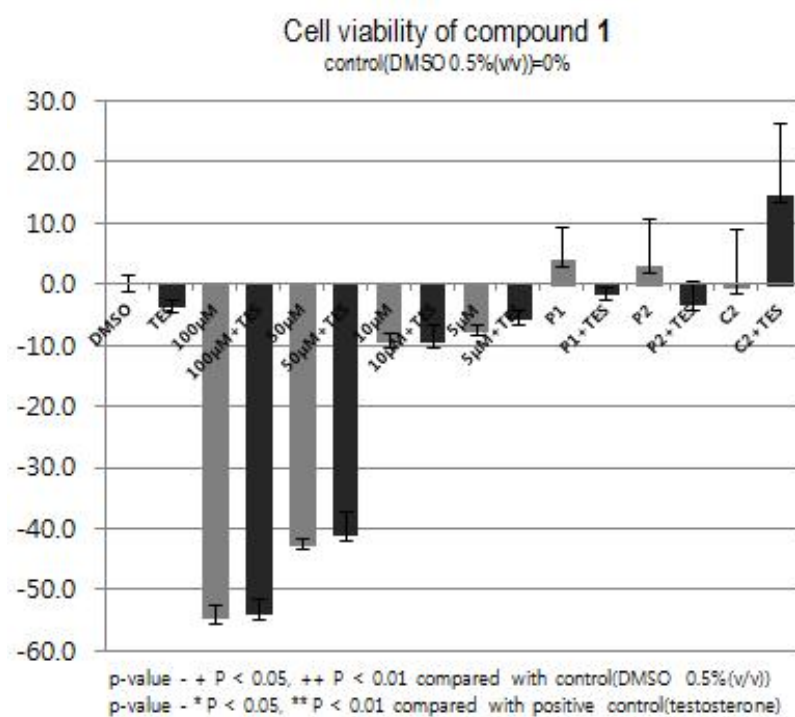


Figure 30. The relative cell viability of the compound 1 on PC-3

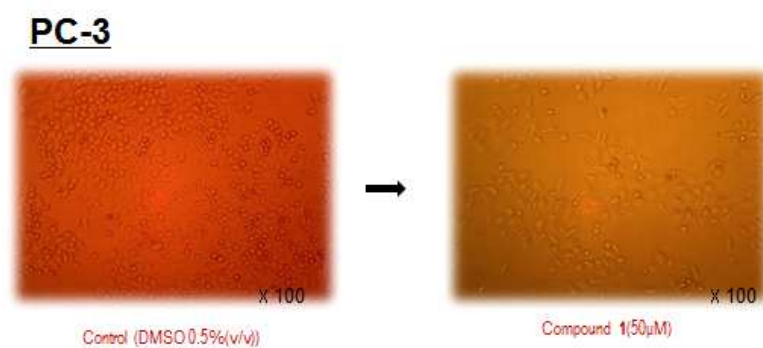


Figure 31. The cytotoxicity effect of the compound **1** on PC-3 cell lines

2-2. 화합물 9의 전립선암세포 증식 억제 활성

화합물 9는 곰비늘고사리의 에테르 추출물에서 분리한 acyclic diterpene의 물질이었다. 이 화합물의 경우도 저 농도 10 μ M, 5 μ M에서 antiandrogenic 효과를 보였다.

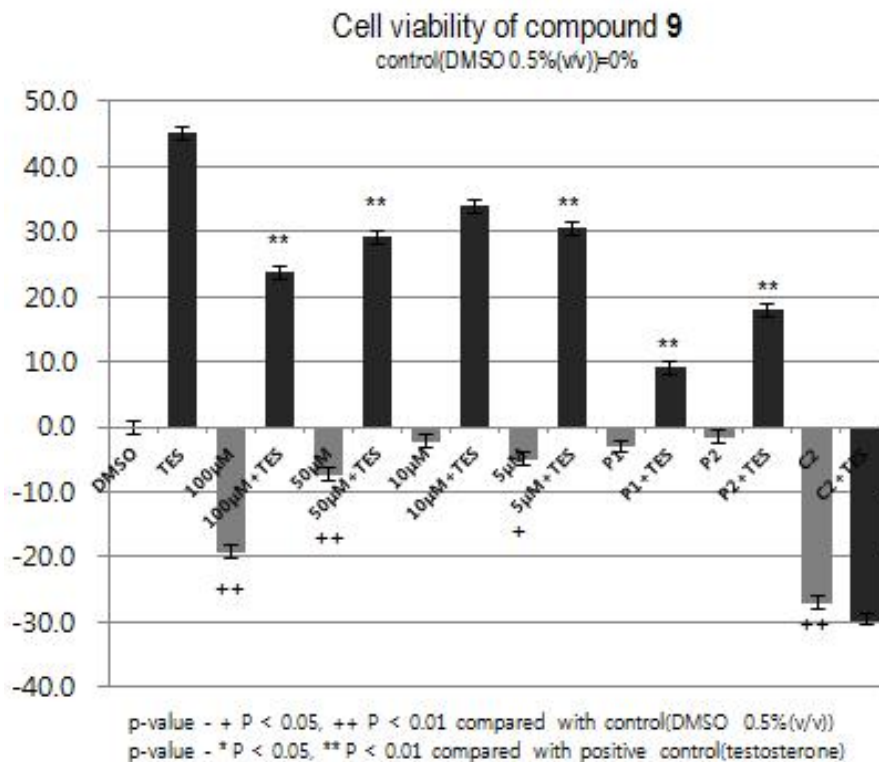


Figure 32. The relative cell viability of the compound 9 on LNCaP

한편, 상대적으로 고농도인 100 μ M에서 LNCaP와 PC-3에서 세포독성을 보였다. 아래 그림에서 보듯 고농도에서는 DMSO 대조군에 비해 셀의 형태가 바뀐 것을 알 수 있었다.

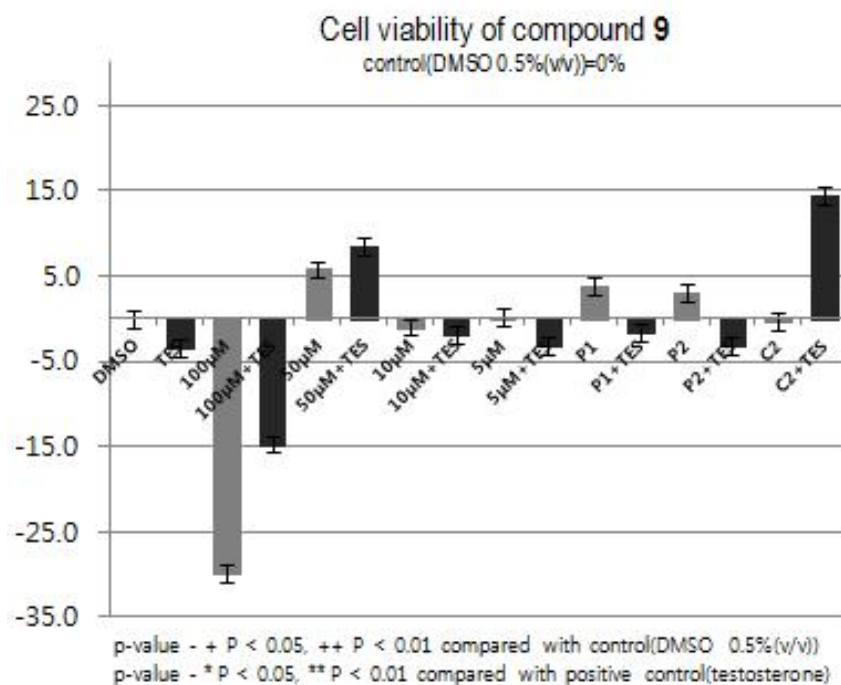


Figure 33. The relative cell viability of the compound 9 on PC-3

LNCaP

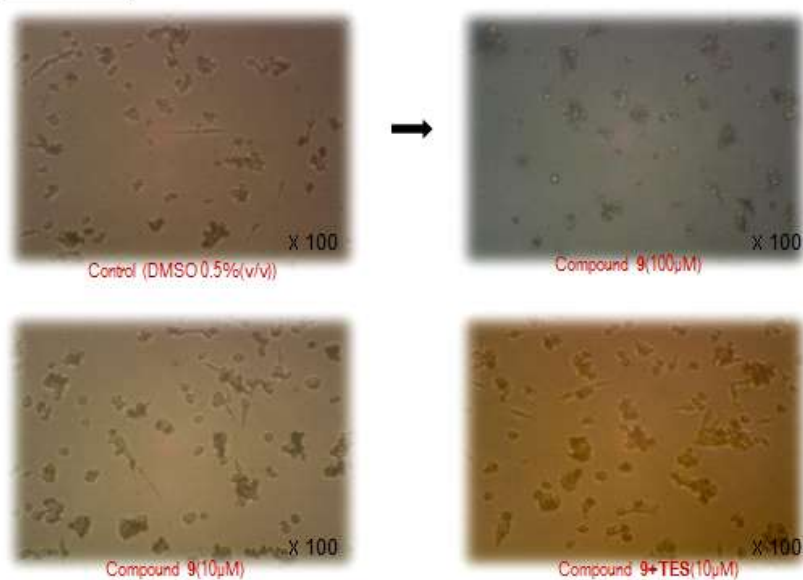


Figure 34. The cytotoxicity and antiandrogenic effect of the compound 9 on LNCaP cell lines

앞서 말한 두 가지 화합물에 대하여 다른 암세포의 증식효과 연구를 추가적으로 진행하였다. 다른 암세포로 채택한 인간의 gastric cell line 인 AGS에 대한 증식억제 연구를 해 본 결과 화합물 **1**의 경우에는 주목할 만한 증식 억제 효과가 없었다. 또 다른 암세포에 대한 활성연구가 진행되어야 하긴 하겠지만 PC-3 세포주에 대해 선택적으로 증식 억제 효과가 있을 수 있음을 시사한다. 아래에 화합물 **1**의 AGS 세포주의 증식 억제 활성 평가에 대한 결과가 그래프와 사진으로 나와 있다.

화합물 **9** 또한 AGS 세포주에 대한 증식억제 활성을 보았는데, 화합물 **1**과는 달리 상대적으로 고농도인 100 μ M, 50 μ M에서 세포 증식억제 효과를 보였다. 따라서 화합물 **9**은 특정 세포주의 증식을 억제하는 것이 아니라 광범위하게 증식 억제 효과를 보일 것으로 사료된다.

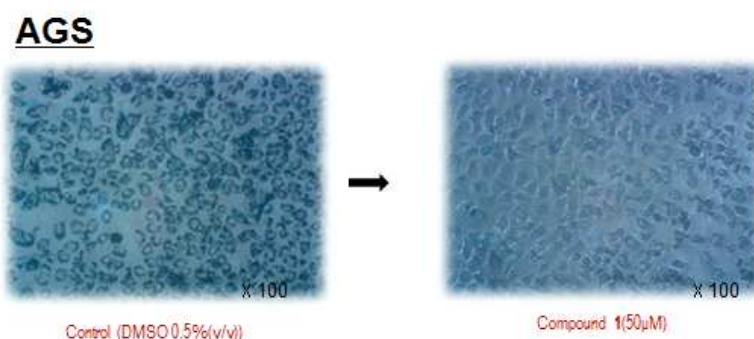


Figure 35. The cytotoxicity effect of the compound **1** on AGS cell lines

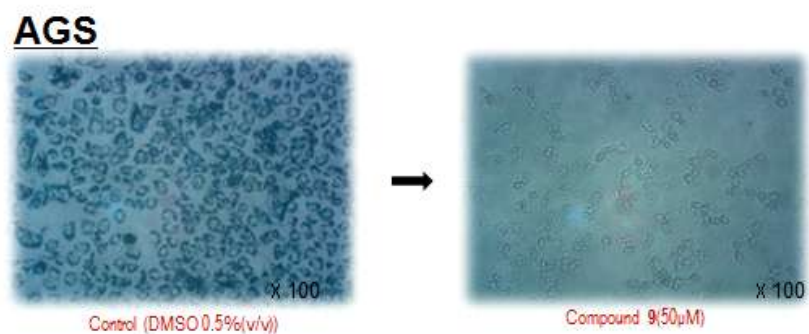


Figure 36. The cytotoxicity effect of the compound **9** on AGS cell lines

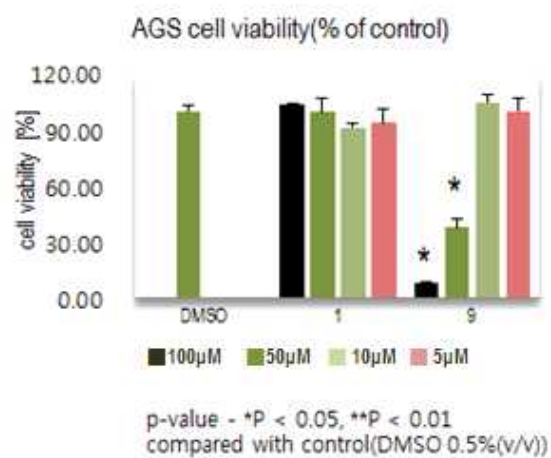


Figure 37. The cell viability of the compound **1** and **9** on AGS cell lines

IV. 결론

1. 곰비늘고사리의 근경 및 인편의 에테르 추출물과 *n*-hexane, CH₂Cl₂ 분획물은 인간에서 유래한 전립선 암세포주인 LNCaP와 PC-3 세포주에서 유의성 있는 증식 억제활성을 나타내었다.
2. 전립선 암세포 증식 억제활성을 유의성 있게 나타낸 에테르 추출물과 *n*-hexane, CH₂Cl₂ 분획물로부터 활성 지향적 분리기법과 각종 크로마토그래피법을 이용하여 총 10종의 화합물을 분리하였다. 각각의 화합물은 분광학적 데이터를 종합하여 desaspidin BB (1), phloropyrone BB (2), albaspidin BB (3), *para*-aspidin BB (4), methylene-bis-desaspidinol (5), phloraspidinol BB (6), aspidinol B (7), desaspidinol (8), (6*E*,10*E*)-geranyllinalool (9), astragalin (10)으로 동정하였다. 총 8종의 phloroglucinols (1-8), 1종의 acyclic diterpene (9)을 분리 하였다. 또한 추가적으로 *n*-BuOH 분획물에서 1종의 flavonoid (10)를 분리하였다.
3. 위 화합물들은 이 식물에서 처음으로 분리, 보고되는 물질들이다.
4. 활성 연구 결과 phloroglucinol 계열인 desaspidin BB (1)와 acyclic diterpene의 일종인 (6*E*,10*E*)-geranyllinalool (9)은 저농도에서 antiandrogenic effect를 보였다.
5. desaspidin BB (1)의 경우 고농도에서 PC-3를 선택적으로 유의성 있게 증식을 억제 하였다.
6. 화합물 (6*E*,10*E*)-geranyllinalool (9) 고농도인 100 μ M, 50 μ M에서 LNCaP, PC-3세포 증식억제 활성을 보였으며, 추가적으로 실험한 AGS세포의 증식도 억제하였다. 따라서 화합물 9은 특정 세포주의 증

식을 억제하는 것이 아니라 광범위하게 증식억제 효과를 보일 것으로
사료된다.

V. 참고문헌

Ales, Svatos., Klara, Urbanova and Irena, Valterova (2002). " The first synthesis of geranyllinalool enantiomers." Czech, Chem. Commun 67:83-90

Ban, S. H., J. E. Kim, S. Pandit and J. G. Jeon (2012). "Influences of *Dryopteris crassirhizoma* Extract on the Viability, Growth and Virulence Properties of *Streptococcus mutans*." Molecules 17(8):9231-9244.

Bhure, S. K., M. Kataria and R. Somvanshi (2006). "Blood biochemical studies of bracken and dryopteris fern fed hill heifer calves." Indian Journal of Animal Sciences 76(11):912-914.

Cao, J. G., X. Xia, X. F. Chen, J. B. Xiao and Q. X. Wang (2013). "Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities." Food and Chemical Toxicology 51:242-250.

Chang, S. H., J. H. Bae, D. P. Hong, K. D. Choi, S. C. Kim, E. Her, S. H. Kim and C. D. Kang (2010). "*Dryopteris crassirhizoma* has anti-cancer effects through both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways and G0/G1 phase arrest in human prostate cancer cells." Journal of Ethnopharmacology 130(2):248-254.

Dell'Aica, I., R. Caniato, S. Biggin and S. Garbisa (2007). "Matrix proteases, green tea, and St. John's wort: biomedical research catches up with folk medicine." Clin Chim Acta 381(1):69-77.

Lee, H. B., J. C. Kim and S. M. Lee (2009). "Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspidic acids AB and PB, from *Dryopteris crassirhizoma*." Archives of Pharmacal Research 32(5):655-659.

Lee, J. S., H. Miyashiro, N. Nakamura and M. Hattori (2008). "Two new triterpenes from the Rhizome of *Dryopteris crassirhizoma*, and inhibitory activities of its constituents on human immunodeficiency virus-1 protease." Chem Pharm Bull (Tokyo) 56(5):711-714.

Lee, S. M., M. K. Na, R. B. An, B. S. Min and H. K. Lee (2003). "Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma*." Biological & Pharmaceutical Bulletin 26(9):1354-1356.

Li, X. J., W. Wang, M. Luo, C. Y. Li, Y. G. Zu, P. S. Mu and Y. J. Fu (2012). "Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity." Food Chemistry 133(2):437-444.

McCue, P. P. and J. M. Phang (2008). "Identification of human intracellular targets of the medicinal Herb St. John's Wort by chemical-genetic profiling in yeast." J Agric Food Chem 56(22):11011-11017.

Na, M., J. Jang, B. S. Min, S. J. Lee, M. S. Lee, B. Y. Kim, W. K. Oh and J. S. Ahn (2006). "Fatty acid synthase inhibitory activity of acylphloroglucinols isolated from *Dryopteris crassirhizoma*." Bioorg Med Chem Lett 16(18):4738-4742.

Soare, L. C., M. Ferdes, S. Stefanov, Z. Denkova, R. Nicolova, P.

Denev, C. Bejan and A. Paunescu (2012). "Antioxidant Activity, Polyphenols Content and Antimicrobial Activity of Several Native Pteridophytes of Romania." *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40(1):53-57.

Socolsky, C., S. M. K. Rates, A. C. Stein, Y. Asakawa and A. Bardon (2012). "Acylphloroglucinols from *Elaphoglossum crassipes*: Antidepressant-like Activity of Crassipin A." *Journal of Natural Products* 75(6):1007-1017.

Sun, Y., C. Gao, M. Luo, W. Wang, C. B. Gu, Y. G. Zu, J. Li, T. Efferth and Y. J. Fu (2013). "Aspidin PB, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 cells by modulating PI3K/Akt/GSK3 beta pathway." *Chemico-Biological Interactions* 201(1-3):1-8.

Widen, C. J., von Euw., T. Reichstein (1970). "Trispara-aspidin, ein neues Phloroglucid aus dem Farn *Dryopteris remota* (A. Br.) Hayek." *Helvetica Chemica Acta* 53(8):2176-2188

Widen, C. J., C. R. Fraser-Jenkins., M. Lounasmaa., J. v. Euw., T. Reichstein (1973). "Die Phloroglucide von *Dryopteris caucasica* (A. Br.) Fraser-Jenkins et Corley." *Helvetica Chemica Acta* 56(3):831-838

Widen, C. J., Mauri Lounasmaa., Gabor Vida., Tadeus Reichstein (1975). "Die Phloroglucide von drei *Dryopteris*-Arten von den Azoren sowie zwei Arten von Madeira und den Kanarischen Inseln zum Vergleich." *Helvetica Chemica Acta* 58(3):880-904

Widen, C. J., Mauri Lounasmaa, A. Clive Jermy., Josef V. Euw., Tadeus Reichstein (1976). "Die Phloroglucide von zwei Farnhybriden aus England und Schottland, von authentischem «*Aspidium remotum*» A. BRAUN und von *Dryopteris aemula* (AITON) O. KUNTZE aus Irland." Helvetica Chemica Acta 59(5):1725-1744

Widen, C. J., H. Pyysalo and T. Reichstein (1994). "Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectra of Phloroglucinols from *Dryopteris* Ferns." Helvetica Chimica Acta 77(7):1985-1998.

Yang, Q., L. Gao, J. Y. Si, Y. P. Sun, J. H. Liu, L. Cao and W. H. Feng (2013). "Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by flavaspodic acid AB." Antiviral Research 97(1):66-73.

Yun, Lian. Lin., Wan, Yi. Wang., Yueh, Hsiung. Kuo and Chieh, Fu. Chen (2000). "Nonsteroidal Constituents from *Solanum incanum* L." Journal of the Chinese Chemical Society 47:247-251

Zuo. Li., Wang. Hongqing., Chen. Ruoyun (2005). "Chemical constituents in roots of *Dryopteris championii*." Zhongcaoyao 36(2): 177-179

Abstract

Chemical Constituents of *Dryopteris uniformis* and their Anti-proliferation Activities on Prostate Cancer Cells

Sunmin Woo

Department of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

Dryopteris uniformis (Makino) Makino is a warm-climate fern that is in the genus *Dryopteris*, evergreen herbaceous perennial. It is distributed in China, Japan, and mid-southern part of Korea. In China, it also referred as 同形鱗毛蕨, and in 『神華本草綱要』 it's rhizoma is used for possible effects for hemostasis, insecticide, metrorrhagia, metrostaxis and hemoptysis.

The genus *Dryopteris* which contains *D.uniformis*, has over about 250 species over the world and 30 species comes from Korea. There were no reported chemical constituents and bioactivities in the SCI journals regarding *D.uniformis*. However, in the genus *Dryopteris*, it is isolated to phloroglucinols, flavonoids, triterpenoids, phenols etc. Also, in the genus *Dryopteris* it has been reported of bioactivities of antiviral, antibacterial, and anticancer. In this research, the chemical constituents and their bioactivities of *D.uniformis* was studied for the first time. The purpose of this research was to see repression of proliferation activities on prostate cancer cells LNCaP and PC-3.

There is no research regarding bioactivities for chemical constituents of plants in genus *Dryopteris* on these two cell lines. Therefore in this research, there were efforts to study the bioactivities on these two cell lines for the first time.

In genus *Dryopteris*, type of phloroglucinol constituents becomes chemotaxonomic marker. In this research, there are efforts to concentrate to isolate this type of chemical constituents. The rhizoma and scales of *D.uniformis* were selectively extracted from 100 % diethyl ether solution. The residues were extracted from 80 % ethanol aqueous solution. The extracts from 80 % ethanol aqueous solution were suspended with water, and continuously partitioned by *n*-Hexane, CH₂Cl₂, *n*-BuOH. The diethyl ether extracts and CH₂Cl₂ fractions showed significant anti proliferation activity on LNCaP and PC-3 cell lines. Thus, nine compounds, eight phloroglucinols (1-8) and one acyclic diterpene (9) were isolated from the diethyl ether extracts, *n*-Hexane and CH₂Cl₂ fractions using bioactivity-guided fractionation and various chromatographic techniques. Additionally one flavonoid (10) was isolated in *n*-BuOH fraction.

Chemical structures of ten compounds were characterized by spectroscopic methods that is UV, ESIMS, FABMS, EIMS ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC, DEPT spectrum. It was elucidated to desaspidin BB (1), phloropyrone BB (2), albaspidin BB (3), *para*-aspidin BB (4), methylene-bis-desaspidinol (5), phloraspidinol BB (6), aspidinol B (7), desaspidinol (8), (6*E*,10*E*)-geranyllinalool (9), astragalin (10). These ten compounds (1-10) were reported for the first time from *D.uniformis*.

According to the result of the bioactivity research above, phloroglucinol type desaspidin BB (1) and acyclic diterpene type (6*E*,10*E*)-geranyllinalool has an antiandrogenic effect in low

concentration. Also in high concentration of desaspidin BB (1), it selectively repressed the proliferation of PC-3 cells.