



이 학 석 사 학 위 논 문

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 항당뇨와 항염증 활성



식품생명과학과



김언지

이 학 석 사 학 위 논 문

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 항당뇨와 항염증 활성

지도교수 최재수



식품생명과학과

김언지

김언지의 이학석사 학위논문을 인준함.

2014년 8월 22일



LIST OF SCHEMES	Ι
LIST OF TABLES	Π
LIST OF FIGURES	III
ABBREVIATIONS	IV
LIST OF SYMBOLS	V
ABSTRACT	1
I. 서론	4
Ⅱ. 재료 및 실험방법	10
1. 재료	10
2. 시약 및 기기	10
2-1. 시약	10
2-2. 7)7)	11
2-3. 실험 세포주	11
3. 실험방법	12
3-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 생성 및 분리	12
3-1-1. 반응 조건 및 분리	12
3-1-2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 분광학적 성질	14
3-2. RAW 264.7 세포주의 배양	16
3-3. 항당뇨 실험	16
3-3-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성 실험	16
3-3-1-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성에 대한 enzy	me

실험	16
3-3-1-2. Protein tyrosine phosphatase 1B에 대한 저해활성 kind	etic
실험	17
3-3-2. α-glucosidase 억제활성 실험	19
3-3-2-1. α-glucosidase 억제활성 실험에 대한 enzyme 실험	19
3-2-2-2. α-glucosidase에 대한 저해활성 kinetic 실험	20
3-4. RAW 264.7 세포에서의 항염증 실험	22
3-3-1. 세포독성 측정	22
3-2-2. LPS로 유도된 NO 측정	23
3-2-3. Western blot을 통한 iNOS 및 COX-2 발현 분석	24
3-5. ONOO ⁻ 소거 활성	25
3-5-1. ONOO ⁻ 소거 활성 실험	26
3-5-2. ONOO ⁻ 에 의한 tyrosine nitration 억제활성	28
4. 통계처리	29
Ⅲ. 결과	30
1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 구조 결정	30
2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 항당뇨 활성	33
2-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 PTP1B 억제활성과	α-
glucosidase 억제활성	33
2-2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 protein tyrosine phosphatase	1B
저해활성의 상관관계	35
2-3. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 α-glucosidase 저해활성]의
상관관계	38
3. RAW 264.7 세포에서 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 항염증 효	ī과
	42

	3-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 RAW 264.7 세포에 대	한
	세포독성 평가	42
	3-2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide가 RAW 264.7 세포에	서
	LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 효과	44
	3-3. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide가 RAW 264.7 세포에서 LPS	로
	유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향	45
4.	3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 ONOO ⁻ 소거활성	47
	4-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 ONOO ⁻ 소거활성	47
	4-2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 ONOO 에 의한 tyrosi	ne
	nitration 억제활성	49

LIST OF SCHEMES

Scheme

Page

Scheme 1. Isolation of 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide from reaction solution			
of ursolic acid with ONOO ⁻	13		
Scheme 2. Measurement of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity	18		
Scheme 3. Measurement of α-glucosidase inhibitory activity	21		



LIST OF TABLES

Table

Page

Table 1. Inhibitory effects of 3β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olideon protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase activity ------ 34 Table 2. Dissociation constants and inhibition mode of 3β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide for PTP1B and α -glucosidase based on kinetic plots ------ 41



LIST OF FIGURES

Figure

Page

Fig. 1. Chemical structures of ursolic acid (A) and 3 β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -
olide (B) 15
Fig. 2. ONOO ⁻ -mediated oxidation of DHR 123 27
Fig. 3. EI-MS spectrum of 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide31
Fig. 4. ¹ H-NMR spectrum of 3β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide in CDCl ₃ 32
Fig. 5. 13 C-NMR spectrum of 3 β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide in CDCl ₃ 32
Fig. 6. Dixon plot for inhibition of 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide on protein
tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate
36
Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for inhibition of 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide
on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of
sample 37
Fig. 8. Dixon plot for inhibition of 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olideα-
glucosidase in the presence of different concentrations of substrate 39
Fig. 9. Lineweaver-Burk plot for inhibition of 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide
on α -glucosidase in the presence of different concentrations of sample 40
Fig. 10. Effects of compounds on LPS-induced NO production and cell viability in
RAW 246.7 cells 43
Fig. 11. Effects of 3 β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide (UAL) on LPS-induced
iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 cells 46
Fig. 12. Peroxynitrite scavenging activity (%) of 3\beta-hydroxy-urs-11-en-28,13β-
olide 48
Fig. 13. Effects of 3 β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide and ursolic acid on the
nitration of BAS by ONOO ⁻ 50

ABBREVIATIONS

¹³ C-NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
¹ H-NMR	: proton nuclear magnetic resonance
EI-MS	: electron ionization mass spectrometry
TLC	: thin layer chromatography
UV	: Ultraviolet
CDCl ₃	: deuterium chloroform
CH_2Cl_2	: dichloromethane (methylene chloride)
DCF-DA	: 2,7-dichlorofluorescein diacetate
DMSO- d_6	: deuterium dimethyl sulfoxide
H_2O	: water
Fig.	: Figure
H ₂ O	: water
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
ONOO ⁻	: peroxynitrite
PTP1B	: protein tyrosine phosphatase 1B
LPS	: lipopolysaccharide
NO	: nitric oxide
BSA	: bovine serum albumin
	A STUDE W
	aum

LIST OF SYMBOLS

J	coupling constant (Hz)
δ	chemical shift
m/z	mass/charge ratio
M^+	molecular ion



Anti-diabetic and anti-inflammatory activities of 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide

Eon Ji Kim

Department of Food and Life science, The Graduate School, PukyongNationalUniversity

Abstract

Ursolic acid (UA), 3β-hydroxy-urs-12-en-28-oic-acid, is a pentacyclic triterpenoid compound that is widely distributed in higher plant kingdoms. UA belongs to the cyclosqualenoid family and naturally occurs in leaves and berries as medicinal plants and in the protective wax-like coatings of apples, pears, prunes and other fruits. Medicinal plants containing ursolic acid has been used as a folk medicine since ancient times. UA has been reported to have several pharmacological effects, including antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, anti-diabetic and neuroprotective properties. Chemical modifications of ursolic acid have been conducted to obtain new derivatives with enhanced biological activities as mentioned above.

In this respect, we have initiated chemical modification of UA with peroxynitrite (ONOO[–]), a reactive nitrogen species, which afforded an oxidized derivative of UA. The oxidized derivative of UA was identified as 3β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide (UAL) by EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR as well as by comparisons with spectral published data. Although UAL has been known to exert Ca²⁺ antagonist activity, neurotrophic factor-potentiating activity and cytotoxic effect on C6 rat glioma cell, A431 skin carcinoma cell, A2780 human ovarian cancer cell, however, its activity regarding anti-diabetic and anti-inflammatory has not been elucidated yet.

Therefore, the present study was undertaken to investigate the pharmacological activities of

i

UAL related to anti-diabetic activity via protein tyrosine phosphatase (PTP1B), α -glucosidase inhibition, anti-inflammatory activity through reduction of nitric oxide (NO) production, as well as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. UAL was also evaluated by ONOO⁻ scavenging activity assay and inhibitory activity against ONOO⁻ mediated tyrosine nitration for anti-diabetic and anti-inflammatory activities, compared to UA.

UAL demonstrated high and moderate inhibitory activities for PTP1B and α -glucosidase with IC₅₀ values of 5.11 ± 0.25 µM and 20.68 ± 0.11 µM, respectively. UAL was investigated using the enzyme kinetic assay, Dixon plot and Linweaver-Burk plot. It exhibited non-competitive inhibition against PTP1B with K_i value of 4.45 µM and mixed inhibition against α -glucosidase with K_i value of 10.87 µM. Furthermore, UAL did not exhibit cytotoxicity below 50 µM while UA was cytotoxic above 12.5µM and reduced NO production with IC₅₀ value of 39.78 ± 0.54 µM as well as iNOS and COX-2 protein inhibition in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Although UAL showed less ONOO⁻ scavenging activity than UA, it indicated inhibitory activity against 3-nitrotyrosine as well as UA via western blot analysis. It was worthy that inhibitory activities of UAL and UA on formation of 3-nitrotyrosine were found for the first time.

These findings indicate that UAL, an oxidized derivative of UA, exhibited potent biological activities including anti-diabetic and anti-inflammatory activities. We estimated that carboxyl group at C-28 of UA may be responsible for potent inhibitory activities against PTP1B and α -glucosidase of UA when compared with UAL. Likewise, UAL exhibited less cytotoxicity than UA due to epoxidation or condensation reaction taken place in between C-(12-13) and carboxyl group at C-28 regarding structure-activity relationship. In addition, a double bond at C-(12-13) and carboxyl group at C-28 of UA may be related to ONOO⁻ scavenging activity due to its electron donating ability.

Taken together these result, UAL may be considered as a useful therapeutic and preventive

ii

approach to prevent various diabetic and inflammatory diseases and a potential candidate as a substitute for UA.



iii

I. 서론

Ursolic acid (3β-hydroxy-urs-12-en-28-oic-acid, UA)는 pentacyclic triterpenoid 화 합물로서 cyclosqualenoid family에 속하고, 고등 식물계에서 널리 분포하며 천 연 약용 식물의 잎과 열매에서 주로 발견된다. UA를 함유하고 있는 식물로는 *Eriobotrya japonica* (Jung *et al.*, 1999), *Prunus serrulata var. spontanea* (Jung *et al.*, 2004), *Crataegus pinnatifida* (Jeong *et al.*, 1999), *Rosmarinus officinalis L.* (Huang *et al.*, 1994; Ngo *et al.*, 2011), *Ocimum sanctum* (Balanehru *et al.*, 1991) 등이 보고되어 있 고, 이러한 식물들에 대한 연구가 시작되기 이전에 많은 사람들이 민간요법으 로 사용해 왔다. Jung 등에 따르면 *Eriobotrya japonica*와 *Prunus serrulata var. spontanea*의 methanol 추출물의 ethyl acetate 분획물에서 silica gel column으로 ethyl acetate : methanol 용매를 사용하여 UA를 분리하였다 (Jung *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2004). 또한 UA는 항암 효과가 있는 cranberries, 사과, 배, prunes의 주요 한 triterpenoid이고, 특히, 껍질에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 (Kondo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Aggarwal and Shishodia, 2006; He *et al.*, 2012).

UA가 함유된 천연물들은 오래 전부터 민간요법으로 널리 사용되었고, 현재 UA에 대해 지속적으로 연구되고 있으며 항산화 (Tsai and Yin, 2008; Yin and Chan, 2007), 항염증 (Tsai and Yin, 2008; Chen *et al.*, 2013), 항종양 (Kassi *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2010), 간 보호 (Jin *et al.*, 2011), 항당뇨 (Lee *et al.*, 2010), 그리고 신경보호 (Hong *et al.*, 2012) 등의 효과가 보고되었다. UA는 LPS로 유도된 마우 스의 급성 폐 손상을 감소시켰고 (Chen *et al.*, 2013), 간암세포 HepG2, Hep3B, Huh7 그리고 HA22T cell의 cell viabilliy 감소, DNA fragmentation을 증가시켰으 며 (Yan *et al.*, 2010) streptozotocin-nicotinamide로 유도한 당뇨 마우스의 고혈당 증을 개선시켰다 (Lee *et al.*, 2010). 또한, UA는 β-amyloid로 유도된 PC12 cell의 신경 독성에 대한 신경보호 효과를 보였고 (Hong *et al.*, 2012), UA를 PC12 cell 에 처리했을 경우 hydrogen peroxide (H₂O₂)에 대한 cell viabilliy가 증가되었다 (Tsai and Yin, 2008).

UA는 백색 무정형 형태로 화학식 구조는 C30H48O3이며 C3에 hydroxyl group

(-OH), C12와 C13 사이에 이중결합, C17에 carboxyl group (-COOH)를 가진다. C3 의 hydroxyl group과 C17의 carboxyl group은 pentacyclic triterpenes의 약리적 활 성의 기본적인 작용기이고 (Kashiwada *et al.*, 2000), UA의 C3과 C28에 hydrogen donor group이 위치한 것은 UA의 세포독성을 나타내며 UA의 C3 위치에 본래 의 β-OH 결합 형태는 α-OH 결합으로 변형된 형태보다 더 강한 세포독성을 보인다 (Ma *et al.*, 2005). 이러한 UA의 구조적 특성을 기본으로 하여 UA의 효 능과 유사하되 용해성을 높이거나 더 강한 활성을 가진 UA 유도체를 발견하 기 위해 *Alternaria alternate* (Wang *et al.*, 2012), *Syncephalastrum racemosum* (Haung *et al.*, 2012), *Huperzia serrata* (Fu *et al.*, 2011) 등 미생물을 이용한 구조적 변형에 대한 연구도 지속적으로 진행되고 있다. 게다가 UA는 화학적 변형에 있어 활 성 부위가 제한되어 있으므로 다양한 유도체를 얻는 것이 쉽지 않지만, 미생 물을 이용한 구조적 변형은 여러 가지 유토체를 생성할 수 있는 방법으로 UA의 구조-활성 상관관계 (structure-activity relationship) 분석에 도움이 될 것이 다 (Fu *et al.*, 2011).

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)는 *Eriobotrya japonica* (Banno *et al.*, 2005), *Eucalyptus globules* (Pereira *et al.*, 2004), *Eucalyptus camaldulensis* (Topcu *et al.*, 2011), *Eucalyptus camaldulensis var. obtusa* leaves (Begum *et al.*, 2000)에서 천연물로 분리되었고, UA의 'Ru'-porphyrin에 의한 화학적 변형으로 UAL이 생성되어 분 리된 것으로 보고되었다 (Tanaka *et al.*, 2012). UAL의 생물학적 활성으로는 Ca²⁺ 길항 작용과, C6 rat glioma cells, A431 skin carcinoma cells, A2780 human ovarian cancer cells에서 항암 효과가 보고되었고 (Begum *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2012; Topcu *et al.*, 2011), 신경영양인자에 대한 증진 활성을 가지는 것으로 보고 되었다 (Li and Ohizumi, 2004).

당뇨병은 만성적 대사 질환으로 인슐린 저항성에 의해 나타나고, 대게 1형, 2형 두가지 형태로 분류된다. 1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨 질환으로 유 전 혹은 췌장 β세포의 인슐린 생성 및 방출 부족으로 나타나고, 2형 당뇨병은

인슐린 활성과 2차적 반응 결함에서 발생한다 (Wild *et al.*, 2000). 특히, 2형 당 뇨병은 전세계적으로 높은 발병률을 보이고, 만성적 당뇨 합병증으로 이어지 면서 심각한 질환으로 고려되고 있다 (Groot *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2010). 식후 고혈당 조절은 당뇨병과 그 합병증을 예방하고 치료하는 데에 중요하므로 여 러 가지의 치료적 접근 방법이 모색되었고, 그 중 2형 당뇨병과 관련된 효소 인 탄수화물 소화와 흡수를 지연시키는 α-glucosidase (Bhandari *et al.*, 2008)와 인 슐린 수용체의 인산화를 조절하는 Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)을 사 용하는 것이다 (Zhang and Zhang, 2007).

Protein tyrosine phosphatase (PTPs)는 세포의 성장, 증식, 분화, 대사 작용, 면 역 반응 등과 같은 다양한 세포 작용을 조절하는 역할을 한다 (Fisher *et al.*, 1991; Hunte., 1995). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)는 사람 조직 세포에서 발견되는 주요 비막전위 phosphotyrosine phosphatase이고, 인슐린으로 유도된 신호 전달 기전에 대해 부정적 조절자로 알려져 있다 (Saltiel and Kahn, 2001). 많은 유전학, 생물학 연구에서 PTP1B는 인슐린 수용체 신호에 주요 부정적 조절자로 보고되고, 최근 연구에서 leptin의 신호전달 기전이 PTP1B를 포함한 PTPs에 의해 약화될 것이라 제시하였다 (Elchebly *et al.*, 1999; Klaman *et al.*, 2000; Koren and Fantus, 2007). 따라서 PTP1B는 2형 당뇨병과 대사적 증후군과 관련 된 질환을 치료하기 위해 주목받고 있다.

또한, α-glucosidase는 소장의 융모에 존재하는 효소이고, 이당류와 소당류에 서 최종 단당류로 가수 분해하는 소화 효소이다. 이런 효소는 이당류와 소당 류에서 포도당으로 빠르게 분해, 흡수시켜 혈당을 증가시킨다. 따라서 탄수화 물 소화를 지연시킬 수 있는 α-glucosidase의 억제제 개발이 당뇨병 치료에 있 어 중요하다 (Ali *et al.*, 2002; Bischoff, 1994).

염증은 손상된 조직에 대한 일반적인 면역 반응이고, 우리의 몸에 침입하는 박테리아나 바이러스, 병원균과 같은 잠재적 유해 인자들에 대해 방어할 때 발생한다 (Henderson *et al.*, 1996). 이런 염증의 과정은 면역 체계와 연관되어

있고, 주로 면역 세포가 혈관벽을 통하여 조직으로 이동하는 것과 동시에 염 증 매개자들이 방출되면서 시작된다 (Pan *et al.*, 2009; Medzhitov, 2008). 염증 매 개자인 nitric oxide (NO)와 PGE₂는 활성 대식세포에 의해 생성되고 염증 질환 에 중요한 역할을 한다. NO는 섬유소 분해 조절과 근육 완화, 혈압 조절, 면 역 방어 등과 관련된 중요한 신호 분자이다 (Napoli and Ignarro, 2001). 하지만, 과도한 NO생성이 지속되면 이러한 신호 기전을 방해하여 혈관염, 관절염, 천 식과 같은 다양한 염증 질환이 유발된다. 따라서 NO생성은 염증 진행에 대한 측정 수단이 될 수 있고, NO생성의 억제하는 것은 염증과 관련된 질환을 치 료하는 가치를 가질 것 이다 (Mulligan *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1992; Hamid *et al.*, 1993).

이러한 NO는 활성 산소 중 하나이고 짝없는 전자를 가진 free radical로서 nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 1-arginine을 기질로 하여 합성되고, 반응성이 크며 반감기가 아주 짧은 특징을 갖는다 (Sawa et al., 2000; Balavoine and Geletii, 1999). NO는 세포막에 쉽게 확산할 수 있어서 다른 활성산소종들과 반응할 수 있고, 특히, 내피세포혈관, 대식세포 내에서 superoxide ('O₂)와 쉽게 결합하여 반응성이 매우 높은 peroxynitrite (ONOO)을 생성한다 (Chung et al., 1998; Beckman et al., 1990). ONOO 는 대표적인 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)으로서 체내에 들어온 미생물을 산화시키는 형태로 면역 반응에 관여하 는 이로운 특성을 가지고 있는 반면, ONOO 가 과도하게 생성되거나 조절되 지 않을 경우에는 단백질, DNA와 지질을 포함한 세포 내 구성 성분들을 손상 시킨다 (Klotz et al., 2003). 즉, ONOO 는 free tyrosine과 단백질 tyrosine 잔기의 방향족 고리에 nitration을 일으키고, 저밀도 지질단백질 (Low-density lipoprotein, LDL) 산화와 지질 과산화, DNA 가닥 변형과 같은 다양한 산화적 손상의 원 인이 된다. 또한 ONOO⁻는 죽상동맥경화증, 급성호흡부전, 만성 염증에 관련 된 것으로 보고되어 있고 (Ho et al., 2008; Darley-Usmar et al., 1995; Kooy et al., 1995), 중추 신경계 조직을 손상시켜 신경 염증 과정에 영향을 주며 (Negre-

Salvayre *et al.*, 2008), 당뇨병 또한 산화적 스트레스에 의해 발병되므로 당뇨병 과 당뇨 합병증에 ONOO⁻와 같은 RNS가 끼치는 영향에 대한 증거들이 늘어 나고 있다 (Rosen *et al.*, 2001). In vitro 실험에서 ONOO⁻의 농도가 높을수록 insulin으로 자극된 insulin recptor (IR)의 autophosphorylation과 tyrosine kinase activity가 낮아진다는 보고를 통해 ONOO⁻가 IR에 영향을 끼쳐 당뇨병을 유 발하는 것으로 볼 수 있다 (Zhou *et al.*, 2009).

Tyrosine nitration에 대한 연구 역시 끊임없이 실행되고 있으며 tyrosine을 nitration 시키는 원인들 중 하나로 ONOO 가 꼽힌다. Tyrosine은 주로 단백질의 표면에 노출되어 있어 ONOO⁻을 포함한 여러 가지 요인들로 인해 nitration과 같은 변형이 일어나고, 그 결과, 3-nitrotyrosine (3-NT) 또는 tyrosine이 nitration 된 단백질이 형성된다 (Souza et al., 1999; Ischiropoulos, 2003; Kyte and Doolittle, 1982). ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration은 단백질 기능과 관련되어 있는데, 그 예로는 이것이 glutamine synthetase, prostacyclin synthase, cytochrome P450, tyrosine hydoxylase, sarcoplasmic reticulum Ca-APTase와 같은 효소를 불활성화 시킨다는 것이다 (Zhou et al., 2009). 또한 3-NT은 단백질 내 post-translational modification 형태로서 nitrating agent의 활성에 의해 -NO2 group가 첨가되어 protein tyrosine nitration된 것이다 (Abello et al., 2009). 여러 병리학적 상태에서 3-NT이 존재한 다는 보고가 많으며 특히, 죽상동맥경화, 다발성 경화증, 알츠하이머, 파킨슨 질환에서 3-NT가 증가되고, 낭포성 섬유증, 천식, 폐 질환, 심근 기능 장애, 만성 간염, 간경변, 당뇨 등의 동물 실험군에서도 증가된다 (Duncan, 2003). 따 라서 ONOO 의 퇴행성 질환에 대한 병리학적 관련성과 불활성화 효소 부족 때문에 ONOO⁻와 관련된 장애들을 치료하고 예방하기 위해서 효과적인 ONOO⁻ 소거제를 개발하는 것이 중요하다. 강력한 ONOO⁻ 소거제를 개발하 는 데에 다양한 방법들이 이용되고, 합성된 ONOO⁻ 소거제는 selenomethionine 과 selenocystine, ebselen가 대표적이다 (Sies and Masunoto, 1997). 또한 천연물에 서 발견된 ascorbic acid (Sandoval et al., 1997), flavonoids (Pollard et al., 2006),

isoflavonoids (Boersma *et al.*, 1999), ergothioneine (Aruoma *et al.*, 1999), 그리고 polyhydroxyphenols (Tipoe *et al.*, 2007)과 같은 화합물들이 주목 받고 있다. 게다 가 연구자들은 천연물에서 분리한 화합물과 ONOO⁻를 반응시켜 생성된 반응 생성물들을 분리하고, 그 반응 생성물들과 본래 화합물의 생물학적 활성을 비 교하여 보고하였다. ONOO⁻과 반응 시켜 생성된 화합물로는 nitrocapsanthin과 nitro-fucoxanthin, nitroastaxanthin, nitrolutein 등이 보고되었고 (Makoto *et al.*, 2011; Takashi *et al.*, 2012), 그 중에서도 15-nitroastaxanthin은 astaxanthin보다 Epstein-Barr virus와 발암 억제 효과가 더 뛰어난 것으로 밝혀 졌다 (Takashi *et al.*, 2012).

최근 다양한 생리활성을 가진 UA와 그의 유도체를 통해 UA의 구조-활성 상관관계 (structure-activity relationship) 분석과 유도체들의 생리활성 분석에 대 한 연구들이 보고되었고, 많은 연구자들이 UA의 새로운 유도체 발견과 그 유 도체들의 약리학적 활성에 대한 연구에 많은 관심을 가지고 있다는 것을 알 수 있다. 이에 본 연구는 UA의 새로운 유도체를 발견하기 위해 시작되었고, UA에서 산화제인 ONOO⁻를 처리하여 새로운 유도체는 아니지만 UA의 유도 체 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide를 생성 및 분리하였다. 3β-Hydroxy-urs-11en-28,13β-olide의 항당뇨와 항염증 활성에 대해 아직 보고되지 않았으므로 PTP1B, α-glucosidase 억제활성과 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NO 생성 억 제활성, ONOO⁻ 소거 활성과 ONOO⁻로 유도된 nitrotyrosine 억제활성을 통해 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 생물학적 효과를 평가하였다. 따라서 항당 뇨와 항염증 활성을 가지는 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide는 UA를 대신할 수 있는 잠재적인 후보자로서 당뇨병과 염증 질환의 예방과 치료에 이용될 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

1. 재료

본 실험에서 사용한 ursolic acid는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다 (Fig. 1).

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Column packing materials은 Kieselgel 60 (Si gel, 70~230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였고, Thin layer chromatography는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plates (20 × 20 cm, 0.25 mm. Merck, Art. 5715)를 사용하였으며, 발색시약은 50% H₂SO₄을 사용하였다. 추출 및 column chromatography에는 1급시약을 사용하였으며, NMR 측정에는 CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95%)를 사용하였다.

Yeast a-glucosidase, acarbose, p-nitrophenyl phosphate (pNPP), p-nitrophenyl a-Dglucopyranoside (pNPG), L-ascorbic acid, Lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli, Griess reagent, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), fetal bovine serum (FBS), antibiotics (streptomycin, penicillin)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B, human recombinant)는 Biomol[®]International LP (Plymouth Meeting, PA, USA) 에서, peroxynitrite(ONOO)는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, polyvinylidenefluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P)는 Millipore Co. (Billerica, MA, USA)에서, Primary antibodies (iNOS, COX-2, β-actin monoclonal antibodies)는 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, antinitrotyrosine (clone 1A6, mouse-monoclonal primary antibody, IgG2b)과 horseradish peroxide (HRP)-conjugated anti-rabbit, anti-mouse antibodies - Millipore Co. USA)에서 구입하였다. X-ray film은 GE (Temecula, MA, Healthcare

(Buckinghamshire, UK)에서, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다.

2-2. 7]7]

EI-MS는 JEOL JMS-700 specrometer로 측정하였고, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 JNM ECP-400 spectrometer (400 MHz for ¹H-NMR and 100 MHz for ¹³C-NMR, JEOL, Japan)로 측정하였다. TLC상의 화합물은 장파장 (365 nm)과 단파장 (245 nm) 겸용 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, U.S.A)를 사용하여 검색하였다. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성, α-glucosidase 억제활성, RAW 264.7 세포에서의 cell viability 그리고 NO 생성은 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 하였다.

2-3. 실험 세포주

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다.

3. 실험방법

3-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 생성 및 분리

3-1-1. 반응 조건 및 분리

Ursolic acid을 10 mM이 되도록 methanol에 녹이고, peroxynitrite (ONOO⁻, final concentration, 6.8mM)를 첨가하여 10분간 반응시킨다. 반응시킨 용액을 농축시키고, 150 ml 물을 넣어 용해시킨 다음 동량의 CH₂Cl₂를 넣어 organic phase와 aqueous phase로 분획시켰다. Organic phase를 농축시켜 312.8 mg을 얻었고, 이것을 Si gel column chromatography (CH₂Cl₂ : MeOH = 500:1 → 50:1, gradient)하여 15개의 subfraction (Fr. 1-15)으로 나누었다. 이들 중 Fr. 3 (80.3 mg)을 반복적으로 Si gel column chromatography (Hexane : EtOAc = 15:1 → 1:1, gradient)하여 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (15 mg)을 분리하였다. 분리과정은 Scheme 1에 나타내었고, 본 화합물은 분광학적 기기분석에 의해 구조를 확인하였다.



ot u



Scheme 1. Isolation of 3 β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide from reaction solution of ursolic acid with ONOO⁻

3-1-2. 분리된 화합물의 분광학적 성질

분리된 화합물의 화학적 구조 결정을 위하여 EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, TLC 등의 여러가지 분광학적 분석을 통하여 구조를 동정하였으며, 문헌치와 비교 하였다 (Topcu *et al.*, 2011).

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide: Positive EI-MS *m/z*:454 [M]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.96 (1H, dd, J = 10.4, 1.3 Hz,H-12), 5.53 (1H, dd, J = 10.4, 3.2 Hz,H-11), 3.22 (1H, dd, J = 11.4, 4.8 Hz,H-3), 2.13 (2H, ddd, J = 13.2, 13.2, 5.9 Hz,H-16), 1.95 (1H, s, H-9), 1.16 (3H, s, H-27), 1.05 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, d, J = 5.9 Hz, H-29), 0.98 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, d, J = 6.2 Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-24); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃Cl₃) δ: 179.9 (C-28), 133.4 (C-12), 128.8 (C-11), 89.7 (C-13), 78.8 (C-3), 60.5 (C-18), 54.7 (C-5), 53.0 (C-9), 45.1 (C-17), 42.0 (C-8), 41.6 (C-14), 40.2 (C-20), 38.9 (C-4), 38.2 (C-1), 38.1 (C-19), 36.3 (C-10), 31.3 (C-22), 31.2 (C-7), 30.8 (C-21), 27.7 (C-24), 27.0 (C-2), 25.5 (C-15), 22.8 (C-16), 19.1 (C-30), 18.9 (C-26), 17.9 (C-25), 17.8 (C-29), 17.7 (C-6), 16.1 (C-27), 14.9 (C-23).



11



Fig. 1. Chemical structures of ursolic acid (A) and 3 β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide (B)

12

3-2. RAW 264.7 세포주의 배양

RAW 264.7 세포를 10% heat-inactivated FBS와 100 Unit/ml streptomycin, 100 µg/ml penicillin을 포함하고 있는 DMEM을 사용하여 37℃, 5% CO₂/air mixture 조건에서 배양하였다.

3-3. 항당뇨 실험

3-3-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성 실험

3-3-1-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성에 대한 enzyme 실험

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP 1B)의 억제활성을 평가하는 방법은 Na 등 (2006)의 방법을 변형하여 실험하였다. PTP1B (human, recombinant) 효소는 BIOMOL International LP로부터 구입하였다. 효소의 활성은 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP)을 기질로서 사용하여 측정하였다. 96 well microtiter plate에 반 응 혼합물의 총 부피를 100 μ L로 한다. 먼저 여러 농도의 sample 10 μ L와 효소 10 μ L, 그리고 PTP1B buffer [50 mM citrate buffer (pH 6.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid), 1 mM DTT (dithiothreitol)] 30 μ L를 넣어 35 °C, 5~10분간 preincubation을 시킨다. 그리고 기질 (*p*-NPP) 50 μ L를 첨가하여 35 °C, 20분간 incubation을 시킨 후 10 M NaOH를 10 μ L를 넣어 반응을 종결시킨다. 이후 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA) 로 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 positive control로는 ursolic acid를 사용 하였다. PTP1B 억제활성은 아래의 식을 이용하여 구한 후, IC₅₀ 값으로 환산하 였다.

Inhibition (%) = 1 - (시료의흡광도 - 대조군의흡광도) / 표준흡광도× 100

3-3-1-2. Protein tyrosine phosphatase 1B에 대한 저해활성 kinetic 실험

Kinetic mechanism을 결정하기 위해 Dixon plot과 Lineweaver-Burk plot 방법을 사용하였다 (Lineweaver and Burk, 1934; Dixon, 1953). PTP1B 효소의 저해활성에 대한 상관관계를 결정하기 위하여 다양한 sample 농도 [3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (50 μM, 10 μM, 2 μM)]와 기질인 *p*-nitrophenyl phosphate를 0.5 mM, 1 mM 그리고 2 mM의 농도로 준비한다. 여러가지 농도의 sample와 *p*-nitrophenyl phosphate를 위와 동일한 방법으로 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 저해제의 inhibition constant (*K*i)는 Dixon plot으로 구하였다.







3-3-2. α-Glucosidase 억제활성 실험

3-3-2-1. α-Glucosidase 억제활성에 대한 enzyme 실험

α-Glucosidase효소의 억제활성을 측정하기 위해서 Li *et al.* (2005) 방법을 수정 하여 실시하였다. 각각의 well에 100 mM phosphate buffer (pH 6.8) 20 µL와 10% DMSO에 녹인 여러 농도의 sample 20 µL를 넣는다. 그리고 기질로 사용된 100 mM phosphate buffer (pH6.8)에 녹인 2.5 mM *p*-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (pNPG) 20 µL 넣은 후, 효소인 0.2 unit/mL α-glucosidase를 10 mM phosphate buffer (pH6.8)에 녹여 20 µL를 넣는다. 37℃에서 15분동안 incubation을 시킨 후 반응을 종결시키기위해 0.2 M sodium carbonate solution 80 µL를 넣는다. 이후 405 nm 에서 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며 이 실험에서 acarbose는 positive control로 사용되었다. α-Glucosidase 억제활성은 아래의 식을 이용하여 억제율 을 구한 후, IC₅₀ 값으로 환산하였다.

Inhibition (%) = $\{1-(A_{Sam}-A_{Sam-C}) / A_{Cont}\} \times 100$

A_{Sam}: 측정시료를 넣었을 때의 흡광도

Asam-C: 측정시료를 넣고 pNPG를 넣지 않았을 때의 흡광도

A_{Cont}: 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도

3-3-2-2. α-Glucosidase에 대한 저해활성 kinetic 실험

Kinetic mechanism을 결정하기 위해 Dixon plot과 Lineweaver-Burk plot 방법을 사용하였다 (Lineweaver and Burk, 1934; Dixon, 1953). α-Glucosidase 효소의 저해 활성에 대한 상관관계를 결정하기 위하여 다양한 sample 농도 [3β-Hydroxyurs-11-en-28,13β-olide(50 μM, 10 μM, 2 μM)]와 기질인 *p*-nitrophenyl α-*D*glucopyranoside를 0.625 mM, 1.25 mM 그리고 2.5 mM의 농도로 준비한다. 여러 가지 농도의 sample와 *p*-nitrophenyl α-D-glucopyranoside를 위와 동일한 방법으로 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 저해제의 inhibition constant (*K*i)는 Dixon plot으 로 구하였다.



100 mM phosphate buffer 20 μ L + Sample 20 μ L

+ 2.5 mM pNPG 20 μ L + α -glucosidase enzyme 20 μ L

Ţ

 37° C incubation for 15 min

Ļ

0.2 M Na₂CO₃ 80 μL

ſ

Measurement of absorbance at 405 nm



3-3-1. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정은 MTT assay 방법으로 분석하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1.0 × 10⁴ 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하고, FBS-free DMEM으로 교환한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, 100 μl의 MTT 용액 (0.5 mg/ml in PBS)을 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 100 μl의 DMSO를 첨가하여 생성된 결정을 용해시키고 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 100 %로하여 상대적인 세포독성을 평가하였으며, 결과는 mean ± standard deviation (n=3)으로 나타내었다.



3-3-2. LPS로 유도된 NO 측정

RAW 264.7세포를 96-well plate에 well당 1.0 ×10⁵ 세포가 되도록 분주한 후, 24시간 배양하였다. FBS-free DMEM으로 교환하고, 다양한 농도의 시료를 2시간 동안 전처리한 후, LPS (1.0 μg/ml)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. NO는 Griess reagent를 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 μl를 취하여 96-well plate로 옮긴 후 Griess reagent 100 μl를 첨가하여 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite로 표준검량곡선을 작성하여 nitrite의 농도를 계산하고, iNOS 억제제인 AMT를 대조군으로 사용하였다. 결과는 mean ± standard deviation (*n*=3)으로 나타내었다.


3-3-3. Western blot을 통한 iNOS 및 COX-2 발현 분석

LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 양을 측정하기 위해서 RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 화합물을 2시간 동안 전처리 한 후, LPS (1.0 µg/ml)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 그 후 차가운 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하고 긁어낸 후 lysis buffer를 4℃에서 30분 동안 가하여 세포를 lysis 시켰다. 4℃에서 14,000 ×g로 20분간 원심분리하여 세포 내 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 Bradford 방법으로 정량하였다.

단백질을 gel buffer (Bio-Rad)와 혼합하고 5분간 끓여 변성시킨 후, 동량의 단백질을 10 % SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝나면 wet transfer system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 PVDF membrane으로 옮기고, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해서 membrane을 blocking solution (5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20, pH 7.4 (TBST buffer))으로 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 membrane에 iNOS와 COX-2 발현 양은 HRP가 부착되어 있는 anti-rabbit IgG (1:2000 in TBST buffer)로 실온에서 1시간 반응 후 Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 확인하였다. 분자량은 full-range rainbow molecular weight markers (Amersham)을 이용하여 확인하였다. Western blotting data는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하였다.

3-5. ONOO⁻ 소거 활성

Peroxynitrite (ONOO)는 NO·와 ·O2 가 반응하여 생성되는 것으로, NO·와 유 사한 생리작용을 가지며, 주요 생리 작용으로는 혈관 평활근 세포의 이완, 혈 소판 응집 저해 및 guanyl cyclase의 자극, tyrosine nitrarion 외에 lysine, protein의 methionine 잔기의 산화 및 지질 과산화 유도에 의한 세포독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아에 의한 호흡 억제, membrane pump 억제, GSH의 고갈, ADP ribose synthase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해와 여러 만성 질환의 병변과 관련됨이 보고되어 있다 (Althaus et al., 1994; Haenen et al., 1997; Lin et al., 1997). ONOO⁻는 다른 free radical에 비해 상대적으로 안정하지만, 생리적 pH에서 쉽 게 proton화 되어 반응성이 매우 높은 peroxynitrous acid (ONOOH)로 전환되는 데, 이 물질은 반감기 (1.9 s)가 매우 짧고, 여러 세포독성물질인 nitrogen dioxide, nitronium ion 및 hydroxyl radical의 전구체로 작용하여 oxidation, nitration, hydroxylation 반응을 유발한다 (Nonoyama et al., 1999). 그러나 세포내에서 ONOO⁻ 소거 활성에 관여하는 효소계가 없으므로, 그 소거활성물질을 찾는 것이 더욱 중요하다 (Choi et al., 2002). 지금까지 보고된 천연 또는 합성의 ONOO⁻ 소거능을 갖는 물질로는 flavonoid (Choi et al., 2002), catechin, polyphenol (Van Dyke et al., 2000, Chung et al., 1998), ergothioneine (Auroma et al., 1999), defroxamine, urate, glutathione (Menconi et al., 1998), melatonin (Cuzzocrea et al., 1999) 그리고 D-(-)-penicillamine (Fici et al., 1997)이 있다.

ONOO⁻를 측정하는 방법에는 ONOO⁻에 의한 tyrosine 잔기의 nitration을 측 정하는 방법이 있으며, UV-vis spectroscopy, GC-MS spectroscopy, amino acid analysis, HPLC analysis 및 nitrotyrosine에 특이적인 polyclonal 또는 monoclonal antibody를 이용한 방법 들이 있다. 이 외에도 형광광도법, 화학발광법, 분광광 도법 등이 있다. 본 실험에서는 ONOO⁻로 유도된 tyrosine nitration의 억제활성 을 Western blot 방법으로 평가하였다.

3-5-1. ONOO⁻ 소거 활성 실험

ONOO⁻ 소거능은 Kooy *et al.* (1994)의 방법을 약간 변형하여 DHR 123의 산화를 측정하였다 (Fig. 2). Dimethylformamide로 녹인 DHR 123 (5 mM)는 질소 충진하여 -80℃에서 stock solution으로 저장하였다. 90 mm sodium chloride, 50 mM sodium phosphate, 5 mM potassium chloride로 조제한 buffer (pH 7.4)를 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M과 섞어, DHR 123의 최종 농도가 5 mM이 되도록 한다. 이 working solution에 시료와 authentic ONOO⁻를 첨가하면 5분 후, 비형광성의 DHR 123이 형광성의 rhodamine 123으로 바뀌게 된다 (Fig. 2). 이 형광물질을 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 excitation과 emission 파장 각각 480와 530 nm에서 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 DHR 123 산화 저해 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC₅₀)를 계산하였다. 결과는 mean ± S.E.M (*n*=3)로 나타내었다.





3-5-2. ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration 억제활성

3-Nitrotyrosine의 형성을 억제하는 능력은 Western blot 방법을 이용하여 평가 하였다. 10% DMSO에 녹인 시료 2.5 µl를 BSA (0.5 mg of protein/ml) 95 µl와 상온에서 10분간 배양한 뒤, 2.5 µl의 ONOO⁻ (200 µM)를 첨가하여 상온에서 10분간 배양하였다. 준비된 시료 용액을 gel buffer (Bio-Rad)와 혼합하고 5분간 끊여 단백질을 변성시킨 후 동량의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝나면 wet transfer system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 PVDF membrane으로 옮기고, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해서 membrane을 blocking solution으로 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 membrane에 3-nitrotyrosine에 대한 항체 (1:2000 in TBST buffer)를 4℃에서 밤새 반응시켰다. 3-Nitrotyrosine의 발현 양은 HRP가 부착되어 있는 anti-mouse IgG (1:2500 in TBST buffer)로 실온에서 1시간 반응 후 Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 확인하였다. Western blotting data는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하였다.



4. 통계처리

모든 결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, 대조군과 실험군의 통계적 유의성은 SPSS를 이용하여 Student *t*-test로 검정하였다.



Ⅲ. 결과

1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 구조 결정

Ursolic acid (UA)를 methanol로 녹인 용액에 ONOO⁻를 처리하여 생성된 Ursolic acid의 유도체를 분리, 정제하였다. 분리된 화합물은 흰색 무정형 가루로 얻어졌고, 구조 분석을 위해 EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR의 분광학적 방법으로 측정되었다.

EI-MS 분석 시 분자이온 $[M]^+$ 가 m/z 454를 나타내었으며 분자식 $C_{30}H_{46}O_3$ 에 상응하였습니다. ¹H-NMR spectrum에서 UA는 한 개의 olefinic proton을 가지는 반면, 분리된 화합물은 두개의 cis-vinyl protons (δ_H 5.96, dd, J = 10.4, 1.3 Hz; δ_H 5.53, dd, J = 10.4, 3.2 Hz)을 나타냈고, ¹³C-NMR spectrum에서 2개의 sp² methine signals이 $\delta_{128.8}$ 과 $\delta_{133.4}$ 로 나타냈으므로 UA의 이중결합이 이동되었음을 추정할 수 있었다.

따라서 분리된 화합물은 EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 결과 data와 문헌치 (Topcu *et al.*, 2011) 비교를 통해 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide라 동정되었다.







Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide in CDCl₃



Fig. 5. ¹³C-NMR spectrum of 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide in CDCl₃

2.3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 항당뇨 활성

2-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 PTP1B 억제활성과 α-glucosidase 억제활성

Ursolic acid (UA)의 유도체인 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)에 대한 PTP1B 억제활성과 α-glucosidase 억제활성을 측정하여 각각 50% PTP1B와 αglucosidase 억제활성을 나타내는 IC₅₀ 값 (μM)으로 나타내었으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다.

UAL은 PTP1B와 α-glucosidase 억제활성에서 IC₅₀ 값이 5.11 ± 0.25 μ M 와 20.68 ± 0.11 μ M로 각각 나타났다. UAL의 PTP1B 억제활성은 대조군인 UA보다 낮았지만, IC₅₀ 값이 5.11 ± 0.25 μ M로 높지 않은 농도에서 50% 억제활성을 보 였으므로 UAL는 PTP1B 억제활성이 높다고 볼 수 있다. UAL의 α-glucosidase 억제활성을 측정하기 위해서 사용된 대조 약물로는 α-glucosidase 억제제로 알 려져있는 acarbose (Hui *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Lekshmi *et al.*, 2011)을 사용하 였다. α-Glucosidase 억제활성 실험에서 UAL는 IC₅₀ 값이 20.68 ± 0.11 μ M로 대 조군 acarbose의 IC₅₀ 값인 138.78 ± 4.15 μ M보다 높은 활성을 나타냈다. 반면, UA의 IC₅₀ 값이 9.49 ± 0.05 μ M로 UAL의 α-glucosidase 억제활성보다 더 높은 것으로 나타냈다.

따라서 UAL의 PTP1B와 α-glucosidase에 대한 억제활성이 높은 것으로 나타 났지만, UA가 각각의 효소에 대해 50배, 2배 더 높은 활성을 나타내는 것은 UA의 28-COOH group에 의한 것이라 추측할 수 있다.

	$PTP1B^{a}$	α -Glucosidase ^{<i>a</i>}
Samples	IC ₅₀ (µM)	IC_{50} (μM)
	Mean \pm S.E.M.	Mean \pm S.E.M.
3β-Hydroxy-urs-11-en- 28,13β-olide	5.11 ± 0.25	20.68 ± 0.11
Ursolic acid ^b	0.1 ± 0.01	9.49 ± 0.05
Acarbose ^c		138.78 ± 4.15

Table 1. Inhibitory effects of 3β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide on protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase activity

PTP1B : protein tyrosine phosphatase 1B.

^{*a*}The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by regression analyses and expressed as mean \pm S.E.M of triplicate experiments. ^{*b*}Ursolic acid was used as a positive control on the PTP1B inhibitory activity. ^{*c*}Acarbose was used as a positive control on the α-glucosidase inhibitory activity.



2-2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 protein tyrosine phosphatase 1B 저해활 성의 상관관계

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)의 PTP1B 효소에 대한 저해제와 기질 과의 상관관계를 Dixon plot과 Lineweaver-Burk plot을 통하여 알아보았으며, Fig. 6, 7에 나타냈다.

UAL은 Lineweaver-Burk plot 분석을 통해 비경쟁적 저해제 (noncompetitive)로 나타냈고, Dixon plot 분석을 통해 K_i 값을 4.45를 나타냈다 (Table. 2). 비경쟁적 저해제는 Dixon plot에서 각각의 기질 농도별 그래프선이 X축에서 서로 교차 하는 곳을 가지며, 이교차점은 저해상수 (inhibition constant, K_i)를 의미한다. 효 소의 기질 결합부위와 다른 곳에 결합하여 효소와 기질의 결합에 영향을 주 지 않으며, 기질 또한 효소와 저해제의 결합부위가 아닌 다른 곳에 결합하여 영향을 주지 않는다. 기질 (S)과 저해제 (I)는 가역적 저해 반응이며, 독립적으 로 그리고 무작위적으로 다른 부위에 결합한다. 다시 말하면, 저해제는 효소 (E) 또는 효소-기질복합체 (ES)와 결합하고, 기질은 효소 (E) 또는 효소-저해제 복합체 (EI)와 결합한다 (Segel, 1976).

따라서 UAL는 PTP1B 효소와 기질인 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP)의 결합 에 영향을 주지 않고, PTP1B 효소 또는 PTP1B-pNPP의 복합체에 결합한다는 것을 알 수 있다. 화합물에 대한 *K*_i 값은 IC₅₀ 값과 비교할 수 있으며, 기질에 대한 결합상수 (binding constant)인 *K*_m과의 상대적인 저해제 효과를 비교할 수 있다. 이 parameter는 특히 효소 촉매반응에 있어서 강력한 치료제로서의 저해 제 값을 측정하는데 중요하고 유용하게 쓰인다. 일반적으로 *K_i* 값이 낮으면 낮을수록 결합력이 더 강하여 저해제로서 더 효과적이다.

PTP1B 효소의 활성부위 (His214-Arg221)에 기질인 tyrosine이결합한다. 게다 가 높은 전하를 띄는 PTP1B catalytic site인 WDP loop (Thr 177-Pro185)와 이차적 aryl phosphate-binding site에 tyrosine의 phenyl ring이 결합함으로써 활성부위로 전환된다 (Koren and Fantus, 2007; Comeau *et al.*, 2010).



Fig. 6. Dixon plot for inhibition of 3β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate: 0.5 mM ($\mathbf{\nabla}$); 1 mM (\bigcirc); and 2 mM ($\mathbf{\Phi}$).

Ot J



Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for inhibition of 3 β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of sample: 0 mM ($\mathbf{\nabla}$); 2 mM (\bigcirc); and 10 mM ($\mathbf{\Phi}$).

ot n

34

2-3. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 α-glucosidase 저해활성의 상관관계

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)의 α-glucosidase 효소에 대한 저해제 와 기질과의 상관관계를 Dixon plot과 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 분석하 였으며, 그에 대한 결과는 Fig. 8,9에 나타냈다.

효소와 저해제의 저해활성 상관관계를 알아보기 위해 사용된 Dixon plot은 효소-저해제 복합체에 대한 효소억제와 inhibitor constant (*K*_i)의 저해형태 [저해 제 농도에 따른 1/enzyme velocity (1/*V*)의 plot]를 알아보기 위한 graphical 방법 이며, 쉽게 효소와 저해제의 관계를 알아볼 수 있다. 경쟁적 저해제일 경우, 1/*V*이 1/*V*_{max}이면 x축의 값은 *K*_i값을 의미하고 반대로 비경쟁적 저해제일 경우, 1/*V*가 0일때 x축의 값이 *K*_i값을 나타낸다 (Cornish-Bowden, 1974; Dixon, 1953). Lineweaver-Burk plot은 [S]를 기질의 농도로 하여 1/*V*를 1/[S]에 대해 plot한 double reciprocal graphical 방법이며, 기울기가 *K*_m/*V*_{max}이고 x절편이 -1/*K*_m, y절편 이 1/*V*_{max}로 나타낸다.

α-Glucosidase의 저해 상관관계에 있어서 UAL은 PTP1B의 저해 상관관계와 는 다른 저해형태를 나타냈다. Table. 2를 보면 UAL의 α-Glucosidase 저해에 대 한 K_i 값은 10.81 μM로 혼합형 저해제로 나타났다. 혼합형 저해제는 비경쟁적 저해형태와 경쟁적 저해형태가 혼합되어 있는 것을 말한다. 혼합형 저해제의 경우 효소나 효소-기질복합체에 모두 결합하지만 기질이 결합하는 활성자리와 다른 곳에 결합한다. 따라서 기질의 결합 비율을 감소시키고 동시에 전환 속 도를 감소시킬 수 있다 (Segel, 1976; Abdulaziz, 1996).



Fig. 8. Dixon plot for inhibition of 3β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate: 0.625 mM (\checkmark); 1.25 mM (\bigcirc); and 2.5 mM (\bigcirc).



Fig. 9. Lineweaver-Burk plot for inhibition of 3 β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide on α -glucosidase in the presence of different concentrations of sample: 0 mM (\checkmark); 2 mM (\bigcirc); and 10 mM (\bigcirc).

Table 2.	Dissociation	constants	and	inhibition	mode	of	3β -Hydroxy-urs-11-en-28,13 β -
olide for	PTP1B and α	-glucosida	se ba	ased on kin	etic plo	ots	

Enzyme type	$K_{\mathrm{i}}\left(\mu\mathrm{M} ight)^{\mathrm{a}}$	Inhibition mode ^b
PTP1B	4.45	Noncompetitive
α-Glucosidase	10.87	Mixed

PTP1B : protein tyrosine phosphatase 1B

^a Determined by the Dixon plot.

^b Determined by Lineweaver-Burk plots



3. RAW 264.7 세포에서 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 항염증 효과

3-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 평가 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)의 세포독성은 Fig. 10에 나타냈다. UA는 12.5 μM의 농도에서 67.18 ± 1.89%의 세포 생존율로 세포독성이 나타났으나, UAL는 50 μM의 농도에서도 96.57 ± 4.84%의 세포 생존율을 보였다. UAL의 50 μM 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않는 것으로 평가하였고, 추후 실험에서 세포 생존에 영향을 미치지 않는 농도 내로 이용하였다.





Fig. 10. Effects of compounds on LPS-induced NO production and cell viability in RAW 246.7 cells

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of (A) 3 β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide, (B) ursolic acid for 2 h and LPS (1.0 µg/ml). After 18 h incubation, the amount of nitrite in the culture supernatants was measured by the Griess reaction assay, as described in the materials and methods. Cell viability was determined using MTT method. The data represent mean ± STDEV of triplicate experiments. [#]*P*< 0.05 indicates significant differences from the unstimulated control group.**P*< 0.05, ***P*< 0.01, ****P*< 0.001 indicates significant differences from the LPS-treated group. 3-2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide가 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO생성에 미치는 효과

그람음성세균의 내독소로 알려진 LPS를 대식세포에 처리하면 NO, PGs, 염증성 cytokines과 같은 다양한 물질들이 생성되어 염증반응을 조절하는 다양한 병리학적 반응이 유도된다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 실험 계에서 대식세포의 염증반응을 유도하기 위해 LPS (1.0 µg/ml)를 RAW 264.7 세포에 첨가하여 이하의 실험을 진행하였으며, 생성된 NO는 Griess reagent을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태를 측정하였다.

Fig. 9에 나타낸 것처럼, RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 증가된 NO의 생성은 세포독성이 없는 농도 12.5, 25, 50 μM의 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13βolide (UAL)의 전처리에 의해서 LPS 단독처리 군에 비해 각각 13.82 ± 2.53, 32.42 ± 0.60, 62.26 ± 1.51%씩 농도의존적으로 억제되었다 (IC₅₀ = 39.77 ± 0.54 μM). UAL은 UA의 NO생성 억제 효과 (IC₅₀ = 4.50 ± 0.05 μM)에 비해 비교적 낮은 활성을 보이지만, UA가 세포독성을 가지는 농도에서 세포독성 없이 NO생성을 억제하였다는 것을 확인할 수 있었다.



3-3. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide가 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)의 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 억제 활성이 어떤 경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 iNOS 및 COX-2의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다.

RAW 264.7 세포에 LPS (1.0 μg/ml)를 처리함으로써 iNOS와 COX-2의 발현이 증가되었고, LPS를 처리하지 않은 세포에서는 이들 단백질이 발현되지 않았으므로 UAL을 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도 이하로 2시간 동안 전처리 한 후 LPS로 iNOS와 COX-2의 생성을 유도하여 이들 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, Fig. 11에서 UAL는 50 μM에서 iNOS의 발현을 저해하고, 25와 50 μM에서 COX-2의 발현을 저해하는 것을 볼 수 있다. 즉, UAL은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 발현 모두 저해 함으로써 NO 억제 활성을 가지는 것이라 판단된다.





Fig. 11. Effects of 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL) on LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration (12.5, 25 and 50 μ M) of 3 β -hydroxy-urs-11-en-28,13 β -olide (UAL) for 2 hours and LPS (1.0 μ g/ml) for 18 hours. Cytosolic lysates were separated on SDS-PAGE. iNOS, COX-2, and β -actin were detected by western blot analysis.



4. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 ONOO⁻ 소거 활성

4-1. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 ONOO⁻ 소거 활성

Ursolic acid (UA)의 ONOO⁻ 소거 활성은 50% ONOO⁻ 소거 활성을 나타내는 IC₅₀ 값 140.00 ± 4.39로 나타났고, 반면, 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)는 625 μM에서 23.60 ± 1.39 % 소거율로 낮은 ONOO⁻ 소거 활성을 나타냈다. 그 결과는 Fig. 12에 제시하였다.





Fig. 12. Peroxynitrite scavenging activity (%) of 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide Peroxynitrite scavenging activity (%) of 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (A) at 625 µM, ursolic acid (B) at 156.25 µM, and L-penicillamine (C) at 13.40 µM. The data represent mean \pm S.E.M of triplicate experiments. ot n

Η

4-2. 3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide의 ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration 억제활성

ONOO⁻ 소거는 electron donation과 nitration 억제에 의한 두 가지 메커니즘이 있다. 따라서 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)의 ONOO⁻ 소거 활성이 어떤 메커니즘에 의해 나타난 것인지 확인하기 위하여 tyrosine nitration에 대한 억제 효과를 Western blot 방법을 통해 평가하였다. Protein (BSA)과 ONOO⁻의 반응으로 3-nitrotyrosine이 생성되었으며, UAL의 312.5, 625, 1250, 2500 µM 농도 중 2500 µM 에 의해 3-nitrotyrosine의 생성이 억제하는 것으로 나타냈고, UA는 312.5, 625, 1250, 2500 µM 농도 실험에서 312.5 µM부터 농도 의존적 형태로 억제하는 것을 나타냈다 (Fig. 13).





Fig. 13. Effects of 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide and ursolic acidon the nitration of BAS by ONOO⁻

A mixture of compound and BSA was incubated at 25 $^{\circ}$ C for 10 min. After ONOO⁻ was incubated at 25 $^{\circ}$ C for 10 min; this reactant was resolved by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gel.

Ⅳ. 고찰

Ursolic acid (UA)는 항산화 (Tsai and Yin, 2008; Yin and Chan, 2007), 항염증 (Tsai and Yin, 2008; Chen *et al.*, 2013), 항종양 (Kassi *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2010), 간 보호 (Jin *et al.*, 2011), 항당뇨 (Lee *et al.*, 2010), 그리고 신경보호 (Hong *et al.*, 2012)와 같은 다양한 생리활성을 가지고 있고, 많은 연구자들이 UA의 낮은 용해성과 독성에 대하여 UA를 대체할 만한 새로운 유도체 개발에 주목하고 있다. UA의 새로운 유도체를 발견하고, 그 유도체의 생리활성을 평가하기 위해 본 연구는 시도되었다. UA에 산화제인 ONOO⁻를 처리하여 반응시켜 UA 유도체를 생성하였고, 그 중 EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR과 같은 분광학적 방법을 통해 흰색 무정형 파우더의 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide를 분리, 동정하였다.

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)는 천연물로서 Eriobotrya japonica (Banno et al., 2005), Eucalyptus globules (Pereira et al., 2004), Eucalyptus camaldulensis (Topcu et al., 2011), Eucalyptus camaldulensis var. obtusa leaves (Begum et al., 2000)에서 분리된 바가 있고, 'Ru'-porphyrin에 의한 UA의 화학적 변형에 의해 생성되어 분리된 보고도 있다 (Tanaka et al., 2012). 현재까지 보고된 UAL 의 활성은 Ca²⁺ 길항 작용과, C6 rat glioma cells, A431 skin carcinoma cells, A2780 human ovarian cancer cells에서 항암 효과가 있고 (Begum et al., 2000; Tanaka et al., 2012; Topcu et al., 2011), 그 외 다른 생리활성에 대해 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 ONOO⁻에 의해 변형된 UA의 유도체인 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)를 PTP1B, α-glucosidase 효소를 통해 항당뇨 효과를, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 NO생성 억제를 통해 항염증을 평가하였으며, ONOO⁻ 소거능과 Western blot을 통한 ONOO⁻로 유도된 nitrotyrosine 억제활성 을 평가하여 항당뇨와 항염증 활성을 평가하였다.

3β-Hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide (UAL)는 PTP1B 억제활성을 5.11 ± 0.25 μM 의 IC₅₀ 값으로, α-glucosidase 억제활성을 20.68 ± 0.11 μM의 IC₅₀ 값으로 보였다.

또한, UAL는 kinetic 분석을 통해 PTP1B 효소에 대하여 비경쟁적 (noncompetitive) 저해를 보였고, *K*_i 값 4.45를 나타냈으며 α-glucosidase 효소에 대하여 혼합형 (mixed) 저해로 *K*_i 값 10.87을 나타냈다. UAL의 PTP1B와 αglucosidase 효소에 대한 억제활성이 높지만, UA가 더 높은 활성을 보이는 것 은 구조적으로 UA의 C-28에 있는 carboxyl (-COOH) group이 그 역할을 하는 것으로 추론된다.

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 NO생성 억제활성을 측정하기 전에 RAW 264.7 세포에서 UAL의 세포독성을 MTT assay를 통해 확인하였고, UA는 12.5 µM 농도에서부터 독성이 있는 반면, UAL은 50 µM까지 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통하여 구조적으로 UA의 28-COOH group과 C-12, 13이 lactone으로 변형 됨으로써 UAL의 독성은 UA보다 더 낮은 것이라 생각된다. UAL는 독성이 없는 것으로 확인된 12.5, 25, 50 µM 농도에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 NO생성 억제활성을 평가하였고, 39.77 ± 0.54 µM의 IC₅₀ 값을 나타내었다. 더 나아가 UAL의 NO 억제 활성이 어떤 경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 iNOS 및 COX-2 발현 억제를 Western blot 방법 으로 확인하였고, 그 결과, UAL은 iNOS 및 COX-2 발현을 각각 50 µM과 25 µM에서 모두 저해하였다. 따라서 UAL은 iNOS 및 COX-2 발현 억제를 통해 NO 생성을 억제하고, iNOS 및 COX-2와 같은 유전자 수준에서 염증을 억제하 는 것으로 유추할 수 있다.

ONOO⁻는 과도하게 생성되거나 조절되지 않을 경우에는 세포 내 구성 성 분들을 손상시켜 염증을 일으키고, 췌장의 β cell을 공격하여 인슐린 저항성을 유발하므로 항당뇨와 항염증 활성 평가에 사용되어 UAL의 ONOO⁻ 소거 활 성 실험을 실시하였다. 또한 단백질의 nitration은 산화적 스트레스에 대한 생 물학적 마커로서 중요한 역할을 하며 3-nitrotyrosine은 단백질 (BSA)과 ONOO⁻의 반응에 의해 생성되기 때문에, ONOO⁻로 매개된 tyrosine nitration에 대한 UAL의 억제활성을 3-nitrotyrosine 항체를 이용해 Western blot 방법으로

평가하였다. 그 결과, UAL은 625 μM에서 23.60 ± 1.39 %로 낮은 ONOO⁻ 소거 활성을 보인 반면, UA의 ONOO⁻ 소거 활성은 50 % ONOO⁻ 소거 활성을 나타 내는 IC₅₀ 값 140.00 ± 4.39로 UAL보다 훨씬 높은 소거 활성을 나타냈다. Western blot을 이용한 tyrosine nitration 억제 활성을 살펴본 결과, UA가 농도 의 존적으로 nitrotyrosine을 억제하는 것으로 나타났고, UAL 또한 2500 μM에서 UA와 유사하게 nitrotyrosine을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 UAL는 tyrosine nitration을 억제하였지만 electron donation은 하지 않는 반면 UA는 electron donation과 tyrosine nitration을 억제 함으로써 ONOO⁻를 소거한다는 것 을 나타내었다. 즉, UA의 electron donation은 C12, 13의 이중결합과 28-COOH group에서 일어났을 것이라 유추할 수 있다.

따라서, 본 연구 결과를 통해 UAL의 3-OH group이 PTP1B, α-glucosidase 효 소 억제활성, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 NO생성 억제활성, ONOO⁻ 로 유도된 nitrotyrosine 억제활성에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 동시 에 UA의 3-OH group은 항당뇨, 항염증, ONOO⁻ 소거능에 중요한 작용기임을 확인할 수 있었고, UA의 3-OH group과 28-COOH group이 함께 존재함으로써 세포독성은 높아지지만 두 작용기에 의해 UA가 다양한 생리활성을 나타내는 것을 증명하였다.

종합하여, 본 연구는 ursolic acid의 유도체인 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide 의 항당뇨와 항염증 활성을 처음으로 밝혀냈고, 이러한 결과는 3β-hydroxy-urs-11-en-28,13β-olide가 ursolic acid를 대체할 만한 물질임을 증명하였으며 당뇨병 과 염증 질환을 예방하고 치료하기 위해 이용될 수 있는 가능성을 제시하였 다.

- Abdulaziz, A. A. J., Fareeda, A. K., Mohammad, A. K., and Abdullah, S. A., Kinetics for Camel (*Camelus dromedaries*) retina acetylcholinesterase inhibition by methotrexate *in vitro*, *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**, 49-55 (1996).
- Ali, M. S., Jahangir, M., Hussan, S. S., and Choudhary, M. I., Inhibition of αglucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives, *Phytochemistry*, **60**, 295-299 (2002).
- Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. J., Scherch, H. M., Sethy, V. H., and Von Voigtlander, P. F., Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **83**, 243–254 (1994).
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P., and Mahmood, N., Protection against oxidative damage andcell death by the natural antioxidant ergothioneine, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1043-1053 (1999).
- Balanehru, S. and Nagarajan, B., Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation, *Biochem. Int.*, 24, 981-990 (1991).
- Balavoine, G. G. and Genleti, Y. V., Peroxynitrite scavenging by different antioxidants, Part I : convenient assay, *Nitric oxide*, **3**, 40-54 (1999).
- Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Suzuki, T., and Nishino, H., Anti-inflammatory and antitumorpromoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 1995-1999 (2005).
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshell, P. A., and Freeman, B. A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1620-1624 (1990).
- Begum, S., Farhat, Sultana, I., Siddiqui, B. S., Shaheen, F., and Gilani, A. H., Spasmolytic constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. obtuse leaves, *J. Nat.*
 - 51

Prod., 63, 1265-1268 (2000).

- Bhandari, M. R., Anurakkun, N. J., Hong, G., and Kawabata, J., α-Glucosidase and aamylaseinhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (Bergenia ciliata, Haw.), *Food Chem.*, **106**, 247–252 (2008).
- Bischoff, H., Pharmacology of α -glucosidase inhibition, *Eur. J. Clin. Invest.*, **24**, 3-10 (1994).
- Boersma, B. J., Patel, R. P., Kirk, M., Jackson, P. L., Muccio, D., Darley-Usmar, V. M., and Barnes, S., Chlorination and nitration of soy isoflavones, *Arch. Biochem. Biophys.*, 368, 265-275 (1999).
- Choi, J. S., Chung, H. Y., Kang, S. S., Jung, M. J., Kim, J. W., No, J. K., Jung, H. A., The structure-activity relationship of flavonoid as scavenging of peroxinitrite, *Phytother*. *Res.*, 16, 232–235 (2002).
- Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y., Kye, I. S., No, J. K., and Baek, B. S., Peroxynitrite-scavenging acitivity of green tea tannin, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4484-4486 (1998).
- Comeau, A. B., Critton, D. A., Paqe, R., and Seto, C.T., A focused library of protein tyrosine phosphatase inhibitors, *J. Med. Chem.*, **53**, 6768-6772 (2010).
- Cornish-Bowden, A., Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods, *Biochem. J.*, **137**, 143-144 (1974).
- Dixon, M., The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.*, **55**, 170-171 (1953).
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L.,Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L., and Kennedy, B.P., Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene, *Science*, 283, 1544–1548 (1999).
- Farrell, A. J., Blake, D. R., Palmer, R. M., and Moncada, S., Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease, *Annals of the Rheumatic Diseases*, **51**, 1219–1222 (1992).

- Fici, G. J., Althaus, J. S. and Von Voigtlander, P. F., Effects of lazaroids and a peroxynitrite scavenger in a cell model of peroxynitrite toxicity, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 223–228 (1997).
- Fisher, E. H., Charbonneau, H., Tonks, N. K., Protein tyrosine phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes, *Science*, **253**, 401–406 (1991).
- Groot, M., Anderson, R., Freedland, K. E., Clouse, R. E., and Lustman, P. J., Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis, *Psychosom. Med.*, 63, 619–630 (2001).
- Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E., and Bast, A., Peroxynitrite scavenging by flavonoids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 591–593 (1997).
- Hamid, Q., Springall, D. R., Riveros-Moreno, V., Chanez, P., Howarth, P., Redington, A., Bousquet, J., Godard, P., Holgate, S., and Polak, J.M., Induction of nitric oxide synthase in asthma, *Lancet*, **342**, 1510–1513 (1993).
- Henderson, B., Poole, S., and Wilson, M., Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokinesynthesis, *Microbiol. Rev.*, **60**, 316–341 (1996).
- Hong, S. Y., Jeong, W. S., and Jun, M., Protective effects of the key compounds isolated from Corni fructus against β-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells, *Molecules*, 17, 10831-10845 (2012).
- Ho, S. C., Tsai, T. H., Tsai, P. J., and Lin, C. C., Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage, *Food Chem. Toxicol.*, 46, 920-928 (2008).
- Huang, M. T., Ho, C. T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Lou, Y. R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J. D., and Conney, A. H., Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid, *Cancer Res.*, 54, 701-708 (1994).
- Hui, Z., Junpeng, X., Shu, L., Fengrui, S., Zongwei, C., Zifeng, P., Zhiqiang, L., and Shuying, L., Screening and determination for potential α-glucosidase Inhibitors from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by using UF-LC/MS and ESI-MSn,

Phytochem. Anal., 23, 315-323 (2011).

- Hunter, T., Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell*, **80**, 225–236 (1995).
- Jeong, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Bae, K. H., Bok, S. H., and Kim, S. U., Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from Crataegus pinnatifida, *Planta Med.*, 65, 261-263 (1999).
- Jun, Z., Xingmu, H., and Kaixun, H., Bidirectional regulation of insulin receptor autophosphorylation and kinase activity by peroxynitrite, *Arch. Biochem.Biophys.*, 488, 1-8 (2009).
- Jung, H. A., Chung, H. Y., Jung, J. H., and Choi, J. S., A new pentacyclic triterpenoid glucoside from Prunus serrulata var. spontanea, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 157-159 (2004).
- Jung, H. A., Park, J. C., Chung, H. Y., Kim, J., and Choi, J. S., Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of Eriobotrya japonica, *Arch. Pharm. Res.*, 22, 213-218 (1999).
- Kassi, E., Papoutsi, Z., Pratsinis, H., Aligiannis, N., Manoussakis, M., and Moutsatsou, P., Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **133**, 293-500 (2007).
- Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y. B., Sharpe, A. H., Stricker-Krongrad, A., Shulman, G. I., Neel, B. G., and Kahn, B. B., Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1Bdeficient mice, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 5479-5489 (2000).
- Klotz, L. O. and Sies, H., Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids, *Toxicol. Lett.*, **140**, 125-132 (2003).
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ye, Y. Z., Kelly, D. R., and Beckman, J. S., Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human acute lung injury, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**, 1250-1254 (1995).
- Koren, S. and Fantus, I. G., Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: Potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus, *Best*
 - 54

Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 21, 621–640 (2007).

- Lee, J., Yee, S. T., Kim, J. J., Choi, M. S., Kwon, E. Y., Seo, K. I., and Lee, M. K., Ursolic acid ameliorates thymic atrophy and hyperglycemia in streptozotocinnicotinamide-induced diabetic mice, *Chem. Biol. Interact.*, **188**, 635-642 (2010).
- Lekshmi, P. C., Ranjith, A., Raghu, K. G., and Menon, N. A., Turmerin, the antioxidant protein from turmeric (Curcuma longa) exhibits anti-hyperglycemic effects, *Natural Product Research*, **1**, 1-5 (2011).
- Li, Y., Ohizumi, Y., Search for constituents with neurotrophic factor-potentiating activity from the medicinal plants of paraguay and Thailand, *The Pharmaceutical Society of Japan*, 124, 417-424 (2004).
- Lin, K. T., Xue, J. Y., Sun, F. F., and Wong, P. Y., Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 115–119 (1997).
- Lin, S. D., Wang, J. S., Hsu, S. R., Sheu, W. H., Tu, S. T., Lee, I. T., Su, S. L., Lin, S. Y., Wang, S. Y., and Hsieh, M. C., The beneficial effect of α-glucosidase inhibitor on glucose variability compared with sulfonylurea in Taiwanese type 2 diabetic patients inadequately controlled with metformin: preliminary data, *Journal of Diabetes and Its Complications*, **25**, 332–338 (2011).
- Lineweaver, H., and Burk, D., The determination of enzyme dissociation constants, Journal of the American Chemical Society, 56, 658-666 (1934).
- Makoto, T., Hideo, E., Kyuki, K., Hiroki, N., Hideki, K., Yasunori, M., Gaku, M., Hironobu, M., Masashi, H., Kazuo, M., Harukuni, T., Nobukuni, S., and Takashi M., Nitrocapsanthin and nitrofucoxanthin reaction with peroxynitrite, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 10572-10578 (2011).
- Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation, *Nature*, **454**, 428-435 (2008).
- Menconi, M. J., Unno, N., Smith, M., Aguirre, D. E., and Fink, M. P., Nitric oxide donorinduced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1425, 189–203 (1998).
 - 55

- Mulligan, M. S., Warren, J. S., Smith, C. W., Anderson, D. C., Yeh, C. G., Rudolph, A. R., and Ward, P. A., Lung injury after deposition of IgA immune complexes. Requirements for CD18 and L-arginine, *Journal of Immunology*, **148**, 3086-3092 (1992).
- Na, M. K., Jang, J. P., Dieudonne, N., Joseph, T. M., Zacharias, T. F., Kim, B. Y., Oh, W. K., and Ahn, J. S., Protein Tyrosine Phosphatase-1B inhitory Activity of isoprenylated flavonoids isolated from *Erythrina mildraedii*, *J. Nat. Prod.*, **69**, 1572-1576 (2006).
- Napoli, C. and Ignarro, L.J., Nitric oxide and atherosclerosis, *Nitric Oxide*, **5**, 88-97 (2001).
- Ngo, S. N., Williams, D. B., and Head, R. J., Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **51**, 946-954 (2011).
- Nonoyama, N., Chibaa, K., Hisatomea, K., Suzuki, H., and Shintani, F., Nitration and hydroxylation of substituted phenols by peroxynitrite. Kinetic feature and an alternative mechanistic view, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6933–6937 (1999).
- Pan, M. H., Lai, C. S., Dushenkov, S., and Ho, C. T., Modulation of inflammatory genesby dietary flavonoids, J. Agric. Food Chem., 57, 4467-4477 (2009).
- Pereira, S. I., Freire, C. S. R., Neto, C. P., Silvestre, A. J. D., and Silva, A. M. S., Chemical composition of the epicuticular wax from the fruits of *Eucalyptus* globules, *Phytochem. Anal.*, 16, 364-369 (2005).
- Pollard, S. E., Kuhnle, G. G., Vauzour, D., Vafeiadou, K., Tzounis, X., Whiteman, M., Rice-Evans, C., and Spencer, J. P., The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350, 960-968 (2006).
- Saltiel, A. R., and Kahn, C. R., Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, **414**, 799-806 (2001).
- Sandoval, M., Zhang, X. J., Liu, X., Mannick, E. E., Clark, D. A., and Miller, M. J., Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: attenuation by Lascorbic acid, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 489-495 (1997).
- Sawa, T., Akaike, T., and Maeda, H., Tyrosine nitration by peroxynitrite formed nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **275**, 32467-
 - 56
32474 (2000).

- Shaw, J. E., Sicree, R. A., and Zimmet, P. Z., Global estimates of the prevalence of diabetes for 2030, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 87, 4–14 (2010).
- Segel, I. H., Enzymes.In Biochemical calculations 2nd ed.; John Wiley & Sons Inc.; New York, pp.246-260 (1976).
- Sies, H. and Masumoto, H., Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavengerof peroxynitrite, *Adv. Pharmacol.*, **38**, 229-246 (1997).
- Takashi, M., Harukuni, T., Nobutaka, S., Hideaki, K., and Hideo, E., Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogensis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxynitrite, *Mar. Drugs*, **10**, 1391-1399 (2012).
- Tanaka, K., Mazumder, K., Siwu, E. R. O., Nozaki, S., Watanabe, Y., and Fukase, K., Auxiliary-directed oxidation of ursolic acid by 'Ru'-porphyrins: chemical modulation of cytotoxicity against tumor cell lines, *Tetrahedron Letters*, **53**, 1756-1759 (2012).
- Tipoe, G. L., Leung, T. M., Hung, M. W., and Fung, M. L., Green tea polyphenols as an antioxidantand anti-inflammatory agent for cardiovascular protection, *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.*, 7, 135-144 (2007).
- Topcu, G., Yapar, G., Turkmen, Z., Goren, A. C., Oksuz, S., Schilling, J. K., and Kingston, D. G. I., Ovarian antiproliferative activity directed isolation of triterpenoids from fruits of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, *Phytochemistry Letters*, 4, 421-425 (2011).
- Tsai, S. J. and Yin, M. C., Anti-oxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells, *J. Food Sci.*, **73**, 174-178 (2008).
- Van Dyke, K., McConnell, P., and Marquardt, L., Green tea extract and it polyphenols markedly inhibit luminal-dependent chemiluminescense activated by peroxynitrite or SIN-1, *Luminescence*, **15**, 37–43 (2000).
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H., Global prevalence of diabetes: estimates for the year, and projections for 2030, *Diabetes Care*, **27**, 1047–1053

57

(2004).

- Yan, S. L., Huang, C. Y., Wu, S. T., and Yin, M. C., Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicol. In Vitro*, 24, 842-848 (2010).
- Yin, M. C. and Chan, K. C., Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid, J. Agric. Food Chem., 55, 7177-7181 (2007).
- Zhang, S. and Zhang, Z. Y., PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery, *Drug Discov. Today*, **12**, 373–381 (2007).



