

목향에서 분리한 sesquiterpenes 화합물에 의한 mouse hepatoma 세포의 apoptosis 유도

경북대학교 동물공학과 : 임현애, 장찬호, 김장훈, 하영란, 김병규, 김정삼, 김주령*
 국민대학교 임산공학과 : 김영균

Induction of Apoptosis of Mouse Hepatoma Cells by Sesquiterpenes Isolated from *Inula helenium*

Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University

1Department of Forest products, Kookmin University

Hyun-Ae Lim, Chan-Ho Jang, Jang-Hoon Kim, Young-Ran Ha, Byung-Gyu Kim, Young Kyoon Kim,
Jong-Sang Kim, Ju-Ryoung Kim*

실험목적

본 연구에서는 예비연구에서 항암효소계 유도활성이 높았던 목향추출물로부터 분리한 7종류의 sesquiterpenes 화합물의 암세포생육억제 활성 및 그 작용기전으로서 apoptosis 유도 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

○ 실험재료

· 본 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용된 α -MEM 배지와 supplement는 Gibco BRL (Rockville, MD, USA)에서, 그리고 fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하여 사용하였다. 한편 본 실험에 사용한 7종의 sesquiterpenes은 Kyoto Pharmaceutical University의 Dr. Konishi로부터 제공받았다.

○ 암세포생육 억제 시험

본 연구에서 사용한 암세포모델계는 생쥐 간암세포주인 hepalc1c7과 변이세포주인 BPRc1이 있으며, 10% FBS를 함유한 α -MEM medium을 이용해 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 한편 배지는 2-3일 간격으로 교환하였다. 시료의 암세포생육 억제 활성은 MTT assay (Mosaman, 1980)를 이용하여 수행하였다.

○ Apoptosis 및 세포주기 분석

세포를 직경이 60 mm인 culture dish에 최종 1×10^6 개의 농도를 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 즉시, 최종농도가 5, 10 μ M이 되도록 sesquiterpenes 화합물을 배지에 가하고, 24시간 동안 배양하였다. Apoptosis 분석은 Annexin V-FITC 키트(R&D systems Inc. Minneapolis, USA)를 사용하였으며, flow cytometer

주저자 연락처 : 김정삼 E-mail : vision@knu.ac.kr Tel : 053-950-5752

(Becton Dickinson, FACS Calibur, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다. 한 편 세포주기에 미치는 영향을 분석하기 위하여 세포를 60 mm dish에 1×10^6 이 되게 분주하고 일정시간 배양한 후, sesquiterpenes을 5, 10 μM 의 농도가 되도록 투여한 다음, 24시간 동안 배양하였다. Plate에 trypsin를 처리하여 세포를 수집하고, 70% ethanol을 넣어 4°C에서 세포를 고정시켰다. 4시간 후 차가운 PBS로 세척을 하고 250 μL RNaseA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 넣어 실온에서 30분 동안 처리하였다. 동량의 propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 넣고 어두운 상태에서 20분 동안 반응시키고, flow cytometry (Becton Dickinson, FACS Calibur)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

결과 및 고찰

목향 (*Inula helenium*)에서 분리한 sesquiterpenes 화합물은 hepalc1c7 과 BPRc1 세포주의 생육을 현저히 억제하는 것으로 나타났다. 특히 5-epoxyalantolactone과 alantolactone은 본 실험에서 사용한 두 가지 세포주 모두에서 다른 성분들에 비해 높은 세포생육억제활성을 보였으며, 이들의 IC_{50} 값은 약 5 μM 정도로 나타났다. 한편 flow cytometry를 이용한 apoptosis 여부평가 실험에서 5-epoxyalantolactone과 alantolactone을 처리한 세포에서 농도 의존적으로 sub-G₁ phase가 축적되는 것이 관찰되었으며, 초기 apoptosis를 보여주는 annexin V-FITC 실험에서도 두 성분이 농도 의존적으로 apoptosis가 유도되는 것으로 나타났다. 이러한 결과들로부터 목향에서 분리한 두 가지 성분이 apoptosis를 유도함으로써 암세포생육억제 또는 사멸을 유도하는 것으로 추정된다. 따라서 이들 화합물은 항암제 또는 항암보조제로서 가능성이 있는 것으로 판단된다. 현재 동물 모델계를 이용한 효능평가 및 독성 실험을 진행하고 있다.

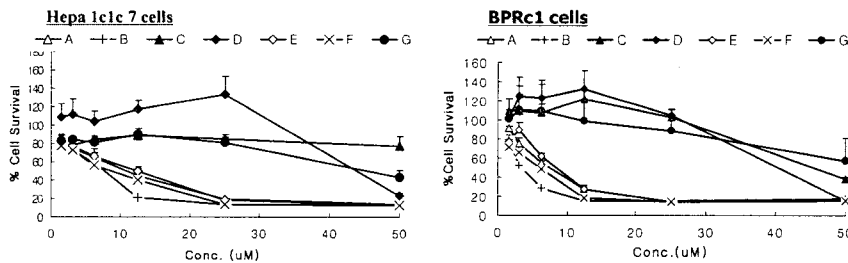


Fig. 1. The cytotoxicity of samples against Hepa 1c1c7 cells and BPRc cells

A: Igalane B: 5 α -epoxyalantolactone C: 4 β ,5 α -epoxy-1(10),11(13)-germacradiene-8,12-olide
D: 11 α ,13-dihydro-alantolactone E: Isoalantolactone F: Alantolactone G: 11 α ,13-dihydro-isoalantolactone

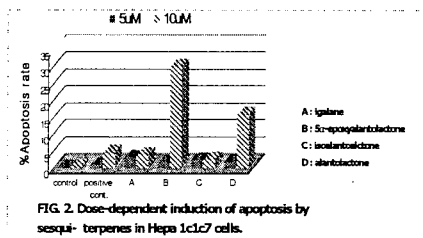


FIG. 2. Dose-dependent induction of apoptosis by sesquiterpenes in Hepa 1c1c7 cells.

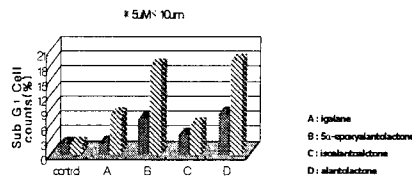


FIG. 3. Cell cycle arrest of hepa1c1c7 cells by sesquiterpenes in a dose-dependent manner.