

천련자로부터 분리한 Limonoid 성분의 세포독성

김영호 · 황방연* · 김세은 · 김환목 · 오구택 · 노재섭* · 이경순* · 이정준#

KIST, 유전공학연구소, *충북대학교 약학대학

(Received November 16, 1993)

The Cytotoxic Limonoid From the Fruits of *Melia Toosendan*

Young Ho Km, Bang Yeon Hwang*, Se Eun Kim, Hwan Mook Kim, Goo Taeg Oh,

Jai Seup Ro*, Kyong Soon Lee*, and Jung Joon Lee#

KIST, Genetic Engineering Research Institute, Taejon, 305-606, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Chongju, 360-763, Korea

Abstract—The MeOH extract of the fruits of *Melia toosendan* was selected for further study by its cytotoxicity and effect on the human breast cancer cell line, MCF-7. The active principle obtained by activity guided fractionation followed by purification gave rise to a needle crystal. The structure was deduced by employing NMR and was determined to be identical with 28-deacetyl sendanin by comparison with published data. This compound induced morphological change of MCF-7 to be rounded with tubule at concentrations between 50 $\mu\text{g/ml}$ and 0.025 $\mu\text{g/ml}$. This compound, however, showed strong cytotoxic effect on Hepa1c1c7 and HepG2, and their GI_{50} on the hepatoma cell lines were 0.238 $\mu\text{g/ml}$ and 0.805 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Its effect on lymphocyte of mouse was stronger than hepatoma cell lines, and their ED_{50} of polyclonal antibody response was 0.011 $\mu\text{g/ml}$, and ED_{50} of cell viability was 0.039 $\mu\text{g/ml}$.

Keyword □ *Melia toosendan*, Meliaceae, MCF-7, antitumor, 28-deacetyl sendanin.

천련자(川楝子)는 멀구슬과(Meliaceae)에 속하는 당멀구슬나무 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.(=*Melia azedarach* var. *toosendan*)의 열매로서 橢圓形 또는 圓形이며 황색으로 익는다. 韓方에서 濕熱을 除去하여 肝火를 淸解하고 止痛, 殺蟲의 效能이 있다고 알려져 있다.¹⁾ 지금까지 Meliaceae에 속하는 많은 식물로부터 여러 limonoids와 triterpenoids 등이 보고되었으나,²⁾ 천련자의 성분에 관한 연구는 apotirucallane-type triterpene 인 21-O-acetyl toosendantriol³⁾과 tirucallane type의 lipomelianol, melianone⁴⁾ 등이 보고되었을 뿐이다. Limonoid 화합물은 살충작용, 성장조절작용, 항암, 항균, 항바이러스 작용 및 동식물에서의 다양한 생리활성을 갖는 화합물로 알려져 왔으나,⁵⁾ 천련자의

생리활성에 관하여는 최근 천련자 추출물이 간기능에 미치는 영향⁶⁾ 등을 제외하고는 별로 연구가 되어있지 않다. 본 실험에서는 한방에서 널리 사용되고 있는 생약에 대하여 인체유암세포주인 MCF-7 세포주를 이용하여 세포의 형태변화를 유도하며 세포성장을 저해하는 수종 생약을 스크리닝한 결과, 천련자의 MeOH extract가 가장 강력한 활성을 보였으므로, activity guided fractionation 방법에 따라서 천련자로부터 세포독성이 있는 화합물을 분리정제 하였고, 이 화합물에 대하여 mouse hepatoma cell line 인 Hepa1c1c7과 human hepatoma cell line인 HepG2 세포 및 rat의 normal hepatocyte에 대한 영향 등을 조사하여 보았다.

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

실험방법

시약 및 기기—세포주의 배양을 위해 사용한 배지는 GIBCO(MD, USA)사의 제품을 사용하였고, fetal calf serum은 Hyclone(Utah, USA)에서 구입하였다. 화합물의 분리를 위한 HPLC는 Waters system(501 pump, 745B Data Module, Automated Gradient Controller)를 사용하였다. 기기분석을 위해서 UV absorption는 Milton Roy Spectronic 3000 array Spectrophotometer를, IR은 Laser Precision Analytical RFX-65 FT-IR Spectrophotometer를, NMR은 Varian 300 NMR Spectrometer를, MS는 HP 5989A Spectrometer를 사용하였다.

세포배양—MCF-7 세포는 RPMI 1640 medium(100 μ l, 10% FCS함유)에서 96 well plate의 한well당 log phase에 있는 세포수가 5000 cells/well이 되도록 plating한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하고, 시료의 최종농도가 10 μ g/ml이 되도록 시료를 medium으로 희석하여 한 well당 최종 volume이 200 μ l가 되도록 하였다. Mouse hepatoma cell line인 Hepa1c1c7과 human hepatoma cell line인 HepG2의 경우는 10% fetal calf serum이 함유된 Alpha-MEM 배지를 이용하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Rat hepatocyte는 collagenase perfusion 방법에 의해 180~200 g의 Sprague-Dawley rat로부터 분리하였다.⁷⁾ 분리된 hepatocyte는 collagen이 coating 된 6-well microplate에서 0.4 \times 10⁶ cells/ml의 농도로 well당 2 ml씩 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며 이때 사용된 배지는 modified Waymouth배지였다.⁸⁾ Lymphocyte는 female B₆C₃F₁ hybrid mouse의 spleen으로 부터 분리하였으며, 10% FCS를 함유한 RPMI 1640 medium에서 0.5 \times 10⁷ cell/ml의 농도로 10% CO₂, 7% O₂, 83% N₂의 혼합가스를 5 psig의 압력으로 채워 7~8 rev/min 의 속도로 rocking하여 배양하였다.⁹⁾

활성물질의 추출 및 분리정제—본 실험에 사용한 천련자는 대전의 신흥건재약품사에서 구입하였다. 천련자 3 kg을 잘게 부순후에 MeOH 5 l로 2회 반복추출하고 감압농축하여 MeOH Ex. 376 g 을 얻었다. 이 MeOH Ex.를 dichloromethane과 H₂O로 분획한 결과 MCF-7 세포주에 대한 세포독성은 dichloromethane층으로 이행하였다. 계속해서 dichloromethane

층을 hexane:ethylacetate (100 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 100% EtOAc)의 gradient로 silicagel column chromatography를 행하여 활성분획을 얻고, 이를 preparative HPLC(column : Prep. Pak^R cartridge, elution solvent : MeOH-H₂O(60-40), flow rate : 20 ml/min, detect : UV 210 nm)를 실시한 후에, 최종적으로 dichloromethane과 MeOH의 혼합용매에서 재결정하여 MCB-203 15.6 mg을 얻었다.

MCB-203 : M.P. 261~262°C (decomposed), IR (KBr) cm⁻¹: 1712. FAB-MS: 574[M⁺], 556[M⁺-18], 538[M⁺-36], 514[M⁺-60], 496[M⁺-60-18], 454[M⁺-60-60]. ¹H-NMR (300 MHz, pyridine-d₅) δ : 1.18(3H, Me), 1.34(3H, Me), 1.85(3H, Me), 1.89(3H, OAc), 2.00(3H, OAc), 3.93(1H, m, H-7), 4.02(1H, s, H-15), 4.66(1H, d, J=12.6, H-19), 4.82(1H, d, J=12.6, H-19), 5.15(1H, m, H-1), 5.40(1H, d, J=3.9, H-3), 5.47(1H, s, H-12), 5.69(1H, s, H-9), 6.02(1H, s, H-28), 6.15(1H, d, J=4.2, C1-OH), 6.31(1H, s, H-22), 6.75(1H, d, J=3.0, C7-OH), 7.39(1H, s, H-21), 7.53(1H, s, H-23). ¹³C-NMR: Table I.

in vitro 세포독성측정—MCF-7 세포의 형태변화의 유무는 24시간 후에 현미경으로 관찰하였으며, MCF-7 세포의 성장저해 활성은 48시간 배양한 후 SRB assay 법에 따라 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hepa1c1c7과 Hep G2의 *in vitro* growth에 관한 실험에서는 각각 4 \times 10⁴ cells/ml, 2 \times 10⁵ cells/ml의 세포농도로 시작하여 검체를 처리하고, 4일후에 최종 세포 농도를 SRB assay에 의하여 control과 비교 분석하였다.¹⁰⁾ 사용한 검체는 DMSO에 녹여 검체의 최종 농도를 0.1, 0.5, 1.0 μ g/ml가 되도록 하였으며, DMSO의 최종농도는 0.1%(v/v)로 하였다. Rat hepatocyte는 24시간 배양후 검체를 1.0 μ g/ml로 처리한 후 24시간 더 배양하여 세포독성 여부를 형태학적으로 관찰하였다. Mouse lymphocyte는 polyclonal activator인 lipopolysaccharide(LPS, 25 μ g/ml) 존재하에서 검체를 0.1, 0.05, 0.01 μ g/ml의 농도로 처리한 후 48시간 배양하고, TNP haptenated SRBC에 대한 항체생성정도와 세포수를 측정하여 검체에 대한 영향을 분석하였다.¹¹⁾

실험결과 및 고찰

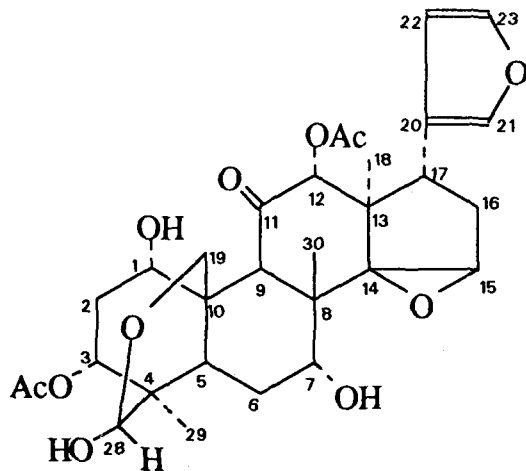
MCB-203의 구조동정—이 화합물은 백색의 needle

Table I—Comparison of ^{13}C -NMR spectra of sendanin and MCB-203

Carbon atom	Sendanin ¹⁾	MCB-203 ²⁾
1	70.1	70.7
2	36.6	37.9
3	74.0	74.8
4	39.8	41.2
5	29.0	29.6
6	26.5	26.8
7	69.5	70.3
8	42.2	43.1
9	49.8	50.2
10	43.2	43.7
11	208.7	208.9
12	79.1	79.5
13	46.5	46.8
14	73.2	73.8
15	59.1	59.7
16	34.2	34.7
17	39.2	39.6
19	66.0	65.4
20	124.0	124.5
21	143.2	143.4
22	112.8	113.1
23	141.6	141.8
28	95.6	97.5
COCH ₃	170.9	171.2
	170.9	—
	170.0	171.0
COCH ₃	22.8	23.6
	21.1	21.8
	20.7	—
CCH ₃	20.7	21.4
	19.2	20.8
	15.7	16.2

1) CDCl₃, 25 MHz2) Pyridine-d₅, 75 MHz

crystal로서 M.P. 261~262°C 를 나타내었다. ^1H -NMR에서 δ 6.31, δ 7.39, δ 7.53에서 3개의 aromatic proton과, δ 1.18, δ 1.34, δ 1.85에서 3개의 quaternary methyl에 의한 peak를 관찰할 수 있었다. EI-MS spectrum에서 m/z 574에서 molecular ion peak가 나타났으며, 556($\text{M}^+ - 18$), 538($\text{M}^+ - 36$), 514($\text{M}^+ - 60$), 496($\text{M}^+ - 60 - 18$), 454($\text{M}^+ - 60 - 60$) 등의 fragmentation pattern을 관찰할 수 있었다. ^{13}C -NMR에서 총 30개의

**Fig. 1**—The structure of 28-deacetyl sendanin.

carbon signal이 나타났고 각 peak의 chemical shift를 비교하여 본 결과, 이 화합물은 limonoid계통의 화합물로서, hemiacetal ring을 가지고 있으며 β -substituted furan ring과 ketone을 각각 1개, acetate group이 2개, secondary hydroxyl group과 tertiary methyl을 3개씩 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 이 화합물은 12-hydroxy amorastaton 및 sendanin과 유사하게 solution에서 C-28의 epimeric mixture로 존재하는 것으로 추정되었으며¹²⁾, 이러한 epimer는 TLC에 의하여 쉽게 관찰되었고, ^{13}C -NMR에 의해서도 *exo* isomer의 C-28의 carbon이 97.46에서 major 화합물로, *endo* isomer의 C-28의 carbon이 97.02에서 minor 화합물로 나타났으며, 약 5 : 1의 비율을 나타내었다.¹³⁾ 이상의 물리화학적 성질을 문헌에 보고된 sendanin 등의 data와 비교하여 본 결과,¹⁴⁾ 이 화합물은 sendanin의 C-28 위치의 acetyl group이 hydroxyl group으로 치환된 28-deacetyl sendanin (Fig. 1)으로 동정할 수 있었다.

MCB-203의 세포독성—인체유암세포주인 MCF-7 세포주를 이용하여 이 세포의 형태변화와 성장저해를 유도하는 화합물을 천연물로부터 스크리닝하는 과정에서, MCF-7 세포주의 형태변화를 강력하게 유도하는 생약으로서 천연자를 선별하였다.

Hartwell 등에 의하면 Meliaceae에 속하는 여러 종의 식물들이 암의 치료를 위하여 민간에서 이용되었다고 하였으며,⁵⁾ 실제로 P-388 mouse lymphocyte

leukemia cell line을 이용한 bioassay-guided fractionation 방법에 의하여 *Aphanamixus frandifolia*로부터 amoorastaton과 *Guarea guidona*로부터 14,15-epoxy-priurianin 등이 보고되었다.¹²⁾ 실제로 이러한 화합물들에 대하여 P-388 cell line 이외의 다른 cancer cell line에 대한 항암활성 등에 대해서는 잘 보고되어 있지 않다. Pettit 등은 P-388 lymphocyte leukemia cell line을 이용하여 meliaceous와 lutaceous limonoids 38종에 대한 bioassay를 실시하여 amoorastatin, 12-hydroxyamoorastatin, sendanin, aphanastatin 등이 높은 활성을 가지고 있는 것으로 보고하였는데,¹⁵⁾ 이러한 높은 활성을 나타내기 위해서는 14,15-epoxy D ring과, 19-28 lactol bridge 등의 구조가 요구된다고 하였다.

본 연구에서는 인체유암세포주 MCF-7을 이용하여 천련자의 세포독성 성분을 추적하여 구조를 동정한 결과 활성을 나타내는데 필요한 functional group을 모두 가지고 있는 28-deacetyl sendanin으로 밝혀졌다. 이 화합물은 천련자에서는 보고된 적이 없고, *Melia toosendan*의 bark에서 분리되어 chauliansu 등으로 보고되어졌으며, 이 화합물의 항암활성보다는 anthelmintic activity와 antibotulism 활성 등이 보고된 화합물이다.¹⁶⁾ 이 화합물에 대하여 *in vitro* 세포독성을 실험한 결과 이 화합물은 25 ng/ml 부터 50 µg/ml의 농도에서 인체 유암세포주인 MCF-7 세포의 형태를 polygonal한 형태에서 가는 관 모양의 돌기가 있는 둥근모양으로 형태변화를 유도하였고, GI₅₀는 80 µg/ml이었다(Fig. 2 및 Fig. 3). 이 화합물에 대한 MCF-7 세포의 형태변화가 어떠한 작용기전에 의한 것인지 분명치 않다. 그러나 MCF-7 세포의 형태변화를 고찰한 보고를 보면, 동세포를 phobol ester로 처리했을 경우 100 nM에서 세포가 커지고 둥글어지며 vacuole이 많은 형태로 변하는데, bryostatin에 의해 이 형태변화 효과가 차단된다고 하였으며, 이는 protein kinase C α isozyme의 발현 및 세포막으로의 이동성과 관련이 있다고 하였다.¹⁷⁾ 한편 protein phosphatase 1 및 2A의 저해제인 okadaic acid를 MCF-7에 처리하면 형태학적 분화가 일어나며, 이때 많은 세포들이 밀크 생산과 관련된 세포들의 분화지표인 β-casein과 α-lactalbumin의 단일항체와 반응한다고 보고되었다.¹⁸⁾ 이 두 경우는 PKC 활성이나 phosphatase 활성과 관련되어 일어나는 현상으로 28-deacetyl sen-

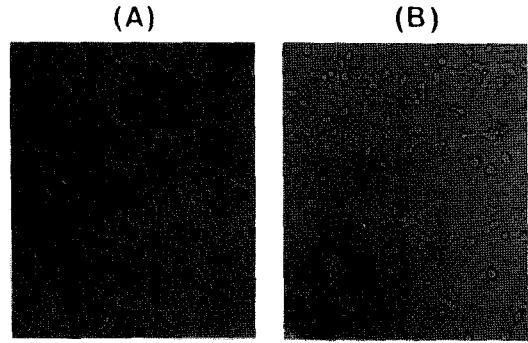


Fig. 2—Morphological change of MCF-7 cell line by MCB-203.

(A) control (B) MCB-203 0.5 ug/ml

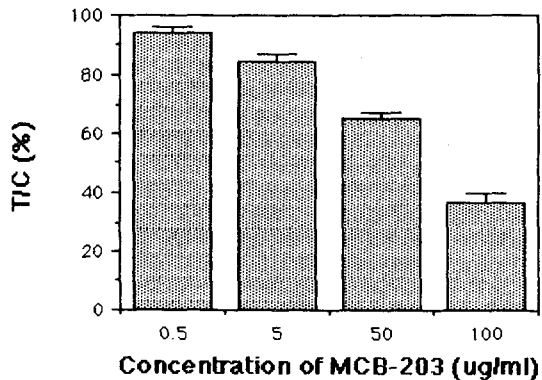


Fig. 3—Inhibition of *in vitro* growth of MCF-7 cell lines. Cells were treated with 28-deacetyl sendanin at concentrations of 0.5, 5.0, 50 and 100 µg/ml. After 48 hrs, viability of the cells was determined by SRB assay.

danin의 경우 유사한 실험을 통하여 PKC나 phosphatase 활성과 관련된 세포분화인자 아닌지를 실험해 볼 필요성이 제기되었다.

이 화합물의 hepatoma 세포주에 대한 활성은 Fig. 4에서와 같이 mouse hepatoma cell line인 Hepa1c1c7에 대한 성장저해효과는 0.1에서 1.0 µg/ml의 농도 범위에서 명확한 dose-response를 나타내었으며, 0.1 µg/ml에서는 약 36%, 1.0 µg/ml에서는 68%의 성장저해효과를 관찰할 수 있었다. Human hepatoma cell line인 HepG2의 경우는 Hepa1c1c7보다 다소 약하였으나 비슷한 양상의 dose-response가 관찰되었으며, 0.1 µg/ml에서는 약 18%, 1.0 µg/ml에서는 53%의 성장저해효과를 관찰할 수 있었다. 두 세포에 대한 성

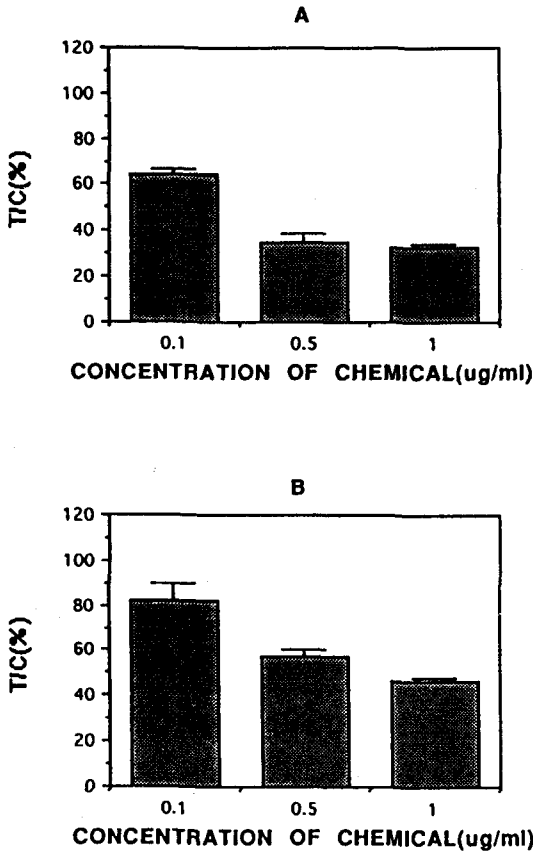


Fig. 4—Inhibition of in vitro growth of hepatoma cell lines. Cells were treated with 28-deacetyl sendanin at concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0 µg/ml. After 4 days, viability of the cells was determined by SRB assay. A; Hepa1c1c7, B; HepG2.

장억제효과에 대한 GI₅₀을 계산하여보면 Hepa1c1c7은 0.238 µg/ml, HepG2는 0.805 µg/ml이어서 Hepa1c1c7이 좀더 예민하게 반응함을 알 수 있었다. 정상 쥐의 hepatocyte에 대한 실험결과 비처리군의 hepatocyte는 정상적인 세포형태를 보인 반면, 처리군의 hepatocyte는 1.0 µg/ml의 농도에서 세포독성을 보였으며, 그 이하의 농도에서는 약한 세포독성을 보였다. 이는 정상상태의 hepatocyte와 hepatoma cell line 모두에서 비슷하게 이 화합물의 독성이 표현되고 있음을 나타낸다. 또 이 화합물은 mouse lymphocyte의 polyclonal activation process에 대하여 강한 억제효과를 나타내었으며, 0.01 µg/ml에서 53%의 저해효과를 보

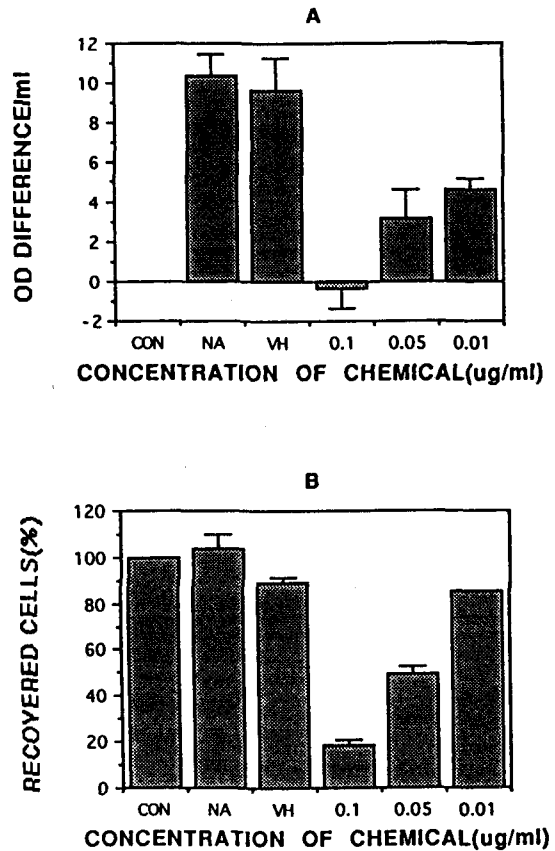


Fig. 5—Immunocytotoxicity induced by 28-deacetyl sendanin. Mouse lymphocytes were incubated for 2 days in the presence of 28-deacetyl sendanin and lipopolysaccharide. A; antibody formation, B; recovered cell number.

이고 0.1 µg/ml에서는 거의 완벽한 저해를 나타내었다 (Fig. 5). 이 효과는 lymphocyte의 세포수의 감소에서도 명확하였는데, 2일 배양후 살아 남아 있는 세포수가 0.01, 0.05, 0.1 µg/ml에서 각각 85.9, 49.8, 18.9%로 나타났다. Polyclonal antibody response에 대한 ED₅₀치는 0.011 µg/ml, cell viability에 대한 ED₅₀은 0.039 µg/ml로 산출되었다. Lymphocyte에 대한 ED₅₀는 hepatoma cell line에 대한 GI₅₀의 약 10배정도 낮았다. 이상의 결과로부터 이 화합물이 정상적인 생체내로 노출되었을 경우 liver 보다는 immune system이 더욱 예민하게 반응함을 알 수 있었으며, lymphocyte의 배양후 recovered cell의 농도, hepatocyte의 형태 변화, in vitro cytotoxicity assay의 결과

로서 28-deacetyl sendanin는 세포에 독성을 유발하는 화학물질로써 조직에 따라 선택적 반응성을 표현하는 것으로 생각되어 암세포에 대한 선택적인 성장저해제나 면역기능억제제로의 개발가능성에 대한 검증이 요구된다고 할 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 과기처 특정 연구개발 사업에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 鄭普燮, 辛民教: 鄉藥(生藥)大事典, 永林社, 서울, p 773 (1990).
- 2) Taylor: The chemistry of the limonoids from Meliaceae. Fortschritt/rogress in the Chemistry of organic natural products. Springer-Verlag, Wien New York, Vol 45, p1 (1984).
- 3) Nakanishi T., Inada A., Nishi M., Miki T., Hino R., and Fujihara T.: The structure of a new natural apotirucallan-type triterpene and the stereochemistry of the related terpenes. *Chem. Lett.*, 69 (1986).
- 4) Nakanishi T., Inada A. and Lavie D.: A new tirucallane-type triterpenoid derivative, lipomelianol from fruits of *Melia toosendan* Sieb. *et Zucc. Chem. Pharm. Bull.* 34, 100 (1986).
- 5) Champagne D. E., Koul O., Isman M. B., Scudder G. G. E. and Towers G. H. N.: Biological activity of limonoids from the rutaes. *Phytochemistry* 31, 377 (1992).
- 6) Kim B., Choi J-W, and Lee C.K.: Effects of *Meliae toosendan* Fructus on Liver Function(I) *Kor. J. Pharmacogn.* 24, 63 (1993).
- 7) Oh, G. T., Hyun, B. H., Choi, J. Y. and Kim, H. M.: Enzymatic application for UDS determination in isolated hepatocytes. *Environmental Mutagens Carcinogens*, 12(2), 163-172 (1992).
- 8) Decad, G. M., Heish, D. P. H., Byard, J. L.: Maintenance of cytochrome P-450 and metabolism of Aflatoxin B1 in primary hepatocyte cultures. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 78, 279-287 (1977).
- 9) Holsapple, M. P., Tucker, A. N., Mc Nerney, J. P., and White, Jr. K.L.: Effects of N-nitrosodimethylamine on humoral immunity. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 229(2), 493-500 (1984).
- 10) Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., and Boyd, M. R.: Feasibility of high-flux anticancer agent drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 757 (1991).
- 11) Kim, H. M., Han, S. B., Chang, W. I., Hyun, B. H., Ahn, C. J., and Oh, G. T.: Development of simple and sensitive method to determine *in vivo* and *in vitro* antibody responses. submitted to *J. Immunol. Methods* (1993).
- 12) Polonsky J., Varon Z., Marazano C., Arnoux B., Pettit G. R., Schmid J. M., Ochi M., and Kotsuki H.: The structure of amoorastatone and the cytotoxic limonoid 12-hydroxyamoorastatin. *Experientia* 35, 987 (1979).
- 13) Ochi M., Kotsuki H. and Ishida H.: Limonoids from *Melia azedarach* Linn. var *Japonica* Makino. II. The natural hydroxyl precursor of sendanin. *Chem. Lett.* 99 (1978).
- 14) Ochi M. and Kotsuki H.: Sendanin, a new limonoid from *Melia azedarach* Linn. var. *japonica* Makino. *Tetrah. Lett.* 2877 (1976).
- 15) Pettit G. G., Barton D. H. R., Herald C. L., Polonsky J., Schmidt J. M. and Connolly J. D.: Evaluation of limonoids against the murine P388 lymphocytic leukemia cell line. *J. Nat. Prod.* 46, 379 (1983).
- 16) Tang W., Eisenbrand G.: Chinese Drugs of Plant Origin. Springer-Verlag. Publ. Co., Berlin Heidelberg, p. 647 (1992).
- 17) Kennedy M. J., Prestigiacomo L. J., Tyler G., May W. S., Davidson N. E.: *Cancer Reseach.* 52, 1278-1283 (1992).
- 18) Kiguchi K., Giometti C., Chubb C. H., Fujiki H., Huberman E.: *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 189, 1261-1267 (1992).