

수종의 국화과 식물에서 분리한 Sesquiterpene Lactone들의 생리활성(제1보)

암세포주에 대한 세포독성

장대식, 박기훈, 김환묵¹, 홍동호¹, 전효곤¹, 고영희¹, 양민석*

경상대학교 농화학과, ¹생명공학연구소

Biological Activities of Sesquiterpene Lactones isolated from Several Compositae Plants. Part 1 Cytotoxicity against Cancer Cell Lines

Dae Sik Jang, Ki Hun Park, Hwan Mook Kim¹, Dong Ho Hong¹,
Hyo Kon Chun¹, Yung Hee Kho¹ and Min Suk Yang*

Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University,
Chinju 660-701, Korea; ¹Korea Research Institute of Bioscience &
Biotechnology(KRIBB), P.O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea

Abstracts—A diverse panel of human tumor cell lines and a mouse melanoma cell line (B16-F1) were used for the cytotoxicity test of the nine sesquiterpene lactones with α -methylene- γ -lactone group isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. In the cell adhesion inhibitory activity test against B16-F1 mouse melanoma cell, hemistepcin B, cumambrin B, costunolide and tulpinolide were shown significant activities with IC₅₀ range of 2.2, 4.1, 0.9 and 0.3 μ g/ml, respectively. In the cytotoxicity test against human tumor cells, the most active compound was costunolide having IC₅₀ values of below 0.3 μ g/ml against all the tested cell lines except for UACC62. Cumambrin A, hendelin and costunolide exhibited more strong activity against HCT15 and UO-31 cell lines than a positive control, adriamycin. All tested compounds showed an IC₅₀ values of below 5.0 μ g/ml against all the tested cell lines.

Key words—Compositae: *Hemisteptia lyrata*: *Chrysanthemum zawadskii*: *Chrysanthemum boreale*: sesquiterpene lactone: cytotoxicity.

우리나라에서는 예로부터 민간이나 한방에서 수 많은 식물들이 약용으로 사용되어 왔으며, 최근에 들어 여러 가지 생약에 대한 다양한 약리학적 조사와 유효성분들의 분리에 대한 연구가 가속화되고 있다. 이러한 연구의 일환으로, 본 연구자 등은 국내

에 자생하는 200여종의 야생식물에 대한 세포독성과 항균성검색을 실시하여 국화과(compositae) 식물인 지칭개(*Hemisteptia lyrata* Bunge), 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura) 및 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)으로부터 9종의 sesquiterpene lactone을 분리하여 그 구조를 규

*교신저자 : Fax 0591-757-0178

명한 바 있다.¹⁻⁴⁾

Sesquiterpene lactone은 intramolecular ester bond를 가지고 있으면서 탄소수 15개의 sesquiterpene을 모체로 하는 terpenoid 화합물으로써 민간 치료약으로 이용되어온 수많은 국화과 식물과 쓴맛을 가지는 식물들로부터 분리되어 지금까지 7,000종 이상의 구조가 알려진 가장 큰 식물대사산물군의 하나이다.⁵⁾ Sesquiterpene lactone의 가장 특징적인 functional group은 α -methylene- γ -butyrolactone group으로, 이들 작용기들은 생물학적 친핵체에 대한 receptor site로서의 역할을 하기 때문에, phosphofructokinase, glycogen synthase, DNA polymerase 및 thymidylate synthase와 같은 함황효소(thiol-containing enzyme)를 저해할 뿐만 아니라, 때로는 glycolytic pathway와 단백질합성에 동반되는 thiol-containing enzyme의 활성도 억제한다는 사실이 입증되었다.⁶⁾ 따라서, sesquiterpene lactone들은 antitumoral activity, cytotoxicity, phytotoxicity, antimicrobial activity, insecticidal activity 및 antiinflammatory activity를 비롯한 매우 다양한 생물학적 활성을 보여준다.⁷⁾ 이 중에서 sesquiterpene lactone의 가장 대표적인 생물학적 활성은 세포독성과 항종양활성으로서, helenalin, eupatoriopicrin, melampodin A, parthenin, xanthatin, parthenolide, artemisinin 등 다양한 골격을 가지는 sesquiterpene lactone들의 세포독성이나 항종양활성이 보고되었다.⁶⁾

따라서, 본 연구자 등은 지칭개, 구절초 및 산국으로부터 분리된 9종의 sesquiterpene lactone에 대한 생물학적 활성을 검증하기 위해서, 우선적으로 sesquiterpene lactone의 가장 대표적인 생리활성인 암세포에 대한 세포독성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험물질 및 재료-지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 9종의 sesquiterpene lactone을 사용하였다. 즉, 지칭개의 전초에서 분리한 hemistepcin A와 hemistepcin B, 구절초의 전초에서 분리한 angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin

B, cumambrin A, cumambrin B 및 hendelin 그리고 산국의 꽃에서 분리한 costunolide와 tulipinolide를 실험재료로 사용하였다.¹⁻⁴⁾

세포접착저해활성실험에 사용된 cell line은 B16-F1 mouse melanoma cell이며 10% FCS를 함유한 MEM에서 유지시켰다. 인체암세포에 대한 세포독성실험에 사용된 cell line은 A549(lung carcinoma), HCT15(colon adenocarcinoma), UACC62(melanoma), PC-3(prostate adenocarcinoma) 및 UO-31(renal carcinoma)이며 생명공학연구소에서 계대배양하였다.

Minimum essential medium(MEM, with Hank's salt), fetal calf serum(FCS), bovine serum albumin(BSA), RPMI 1640 medium (Cat. No. 31800; with L-glutamine, without NaHCO_3), fetal calf serum(FCS), penicillin G(1×10^5 units/l) 및 streptomycin(0.1 g/l)은 GIBCO, DMSO, sulforhodamine B(SRB), PBS(phosphate buffer with saline, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, NaHPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g/l), laminin, glutaraldehyde, NaHCO_3 , 1,2-cyclohexane diamine tetraacetic acid(CDTA), Tris(hydroxy methyl)-aminomethane 및 adriamycin 등의 시약은 Sigma, 그리고 HCl은 Junsei에서 구입하였다.

B16 melanoma cell 접착저해활성⁸⁾-Laminin-coated plate는 laminin 1 mg을 PBS 2 ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서 필요시에 laminin의 농도(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 결정하여 찬 PBS 용액으로 희석하고 이 용액을 96 well microplate의 각 well에 50 μl 씩 분주하여 하룻밤 동안 건조시켜 사용하였다. 세포현탁액의 제조는 T-25 culture flask에 80% confluence로 성장한 B16-F1세포를 3 ml의 2 mM EDTA 용액으로 떼어낸 다음 serum-free MEM 5 ml를 가하여 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 세포를 1% serum-free MEM(with BSA)에 현탁하여 세포수가 2×10^6 이 되도록 조절하였으며, 이 현탁액 50 μl 를 사용하였다.

활성의 측정은 laminin-coated well을 100 μl 의 PBS로 세 번 세척한 후 다시 1% BSA 용액(in PBS) 100 μl 를 첨가하였고, BSA를 aspirater로

제거하였다. plate를 0.1% BSA 100 μ l와 PBS 100 μ l로 각각 세척한 다음 부착되어 있는 세포를 2.5% glutaraldehyde 40 μ l로 실온에서 30분 동안 고정화 시켰다. 세포가 고정화된 plate를 수도수로 세척하고 60 $^{\circ}$ C에서 건조시켜 0.4% crystal violet(in 20% MeOH)으로 실내에서 20분 동안 염색시킨 후 수도수로 세척하고 건조시켰다. 1 mM HCl 100 μ l(in 30% EtOH)를 첨가하여 가볍게 교반시킨 후 microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포부착저해율을 아래의 공식에 의하여 계산하여 IC₅₀ 값을 결정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(\text{대조구의 흡광도} - \text{시료의 흡광도})}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

인체암 세포주에 대한 세포독성 - 세포독성실험은 1989년 미국의 National Cancer Institute(NCI)에서 개발한 SRB 방법을 사용하였다.⁹⁾ 인체암 세포주는 10% FCS가 포함된 RPMI 1640배지를 사용하

여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 1주일에 2회 계대배양하였다. 세포들을 부착면으로부터 분리할 때는 0.25% trypsin 및 3 mM EDTA를 PBS에 녹인 용액을 사용하였다. 검색용 시료는 소량의 DMSO에 녹여 실험에 필요한 농도까지 실험용 배지로 희석하여 최종 DMSO의 농도가 0.5% 이하가 되도록 하였고, 몇 단계(최종농도: 30, 10, 3, 1, 0.3 μ g/ml)로 희석된 시료용액은 암세포에 가하기 전에 milipore filter(0.22 μ m)로 여과하여 무균상태로 하였다.

결과 및 고찰

B16 melanoma cell 접착저해활성 - 9종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 *in vitro*에서 B16-F1 mouse melanoma cell의 세포 외 matrix의 일종인 laminin에의 접착을 얼마나 저해하는가를 조사한 결과, Table I에서 보는 바와 같이

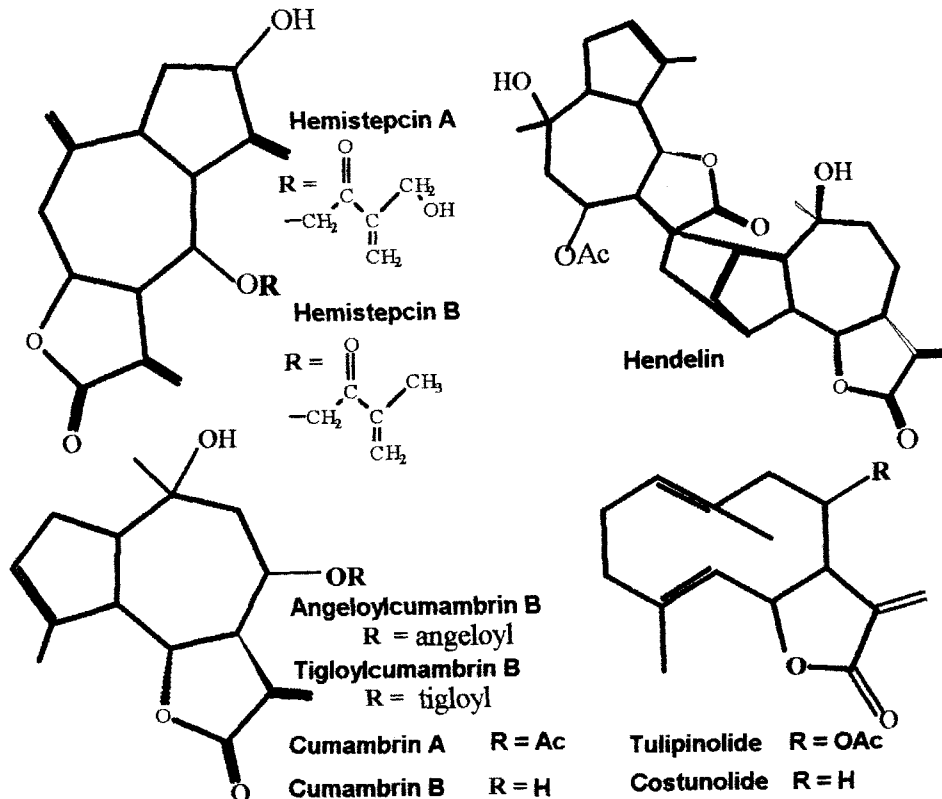


Fig. 1. The nine sesquiterpene lactones isolated from *H. lyrata*, *C. zawadskii* and *C. boreale*.

hemistepcin B, cumambrin B, tulipinolide 및 costunolide가 각각 IC₅₀ 값 2.2, 4.1, 0.3 및 0.9 µg/ml의 강한 활성을 보였다. 접착저해활성과 화합물의 구조사이의 어떤 일정한 경향성은 찾아보기 어려웠지만, 같은 골격일지라도 hydroxy group이 존재하지 않는 hemistepcin B가 hemistepcin A보다 약 8배, 그리고 costunolide의 H₈이 -OAc로 치환된 화합물인 tulipinolide가 costunolide보다 3배 더 강한 활성을 보여주었다. 또한 5종의 cumambrin B 유도체만 살펴볼 때, 이들의 모체인 cumambrin B가 가장 높은 활성을 보였고 angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin B 그리고 cumambrin A는 서로 유사하였으며 cumambrin A의 dimer 형태인 hendelin은 유의성 있는 활성을 보여주지 않았다. 그리고 전반적으로 guaianolide인 cumambrin B 유도체들보다 germacranolide인 tulipinolide와 costunolide가 활성이 더 강한 경향을 보였다.

인체암 세포주에 대한 세포독성 - 9종의 sesquiterpene lactone들의 인체암 세포주인 UACC62, HCT15, UO-31, PC-3 및 A549 cell에 대한 *in vitro* cytotoxicity를 조사한 결과, Table I에서 보는 바와 같이 실험에 사용된 전 cell line에 대해서 모두 IC₅₀ 값 5 µg/ml 이하의 비교적 강한 세포독성을 보였으며, 특히, HCT15 cell line에 대해서는 모든

화합물이 0.55 µg/ml 이하의 IC₅₀ 값을 가져 positive control로 사용한 adriamycin(0.73 µg/ml)보다 강한 세포독성을 보였다. 전반적으로 볼 때, 9종의 sesquiterpene lactone들은 결장암세포주인 HCT15와 신장암세포주인 UO-31 cell line에 대해 상대적으로 강한 활성을 보였으며, 화합물별로는 cumambrin A, cumambrin B 및 costunolide가 강한 활성을 나타내었다.

본 실험에 사용된 화합물과 같은 α -methylene- γ -lactone group을 함유하는 sesquiterpene lactone의 강한 세포독성은 α,β -unsaturated ketone group에 기인하며, 이 group이 Michael acceptor¹⁰⁾로 작용하여 생체 내 nucleophile(DNA, enzyme, receptor)과 결합함으로써 세포독성을 나타내는 것으로 추정된다. 그러나 *in vivo* 항암실험에서 별다른 독성을 보이지 않았다는 보고^{11,12)}들이 있기 때문에 sesquiterpene lactone들의 독성에 대한 재검토와 세포접착저해활성이나 세포독성의 정확한 mechanism에 대해 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

지칭개, 구절초 및 산국에서 분리된 9종류의 sesquiterpene lactone의 세포접착저해활성과 세포

Table I. *In vitro* cell adhesion inhibitory activity against mouse melanoma cell and cytotoxicity against various human cancer cell lines of nine sesquiterpene lactones isolated from *H. lyrata*, *C. zawadskii* and *C. boreale*

Compounds	IC ₅₀ (µg/ml)*					
	B16-F1**	UACC62***	HCT15	UO-31	PC-3	A549
Hemistepcin A	19	2.53	0.25	1.56	2.17	4.37
Hemistepcin B	2.2	2.30	0.55	3.35	2.81	3.52
Angeloylcumambrin B	32	3.26	<0.30	3.93	3.82	3.67
Tigloylcumambrin B	35	2.61	<0.30	2.55	3.02	4.97
Cumambrin A	37	4.94	<0.30	<0.30	1.08	0.70
Cumambrin B	4.1	3.23	<0.30	3.37	4.54	3.69
Hendelin	86	4.78	<0.30	<0.30	1.71	1.60
Tulipinolide	0.3	1.14	<0.30	1.54	1.27	3.69
Costunolide	0.9	2.11	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30
Adriamycin	-	0.19	0.73	0.89	0.26	0.30

*Each compound was examined with five concentrations (30.0, 10.0, 3.00, 1.00 and 0.30 µg/ml). IC₅₀ values of compounds represents the concentration that caused 50% inhibition of cell growth.

**Cell adhesion inhibitory activity against mouse melanoma cell B16-F1

***UACC62: melanoma, HCT15: colon adenocarcinoma, UO-31: renal carcinoma, PC-3: prostate adenocarcinoma, A549: lung carcinoma

독성을 실험하였다. B16-F1 mouse melanoma cell line에 대한 세포접착저해실험 결과, hemistepcin B, cumambrin B, costunolide 그리고 tulipinolide가 각각 IC₅₀ 값 2.2, 4.1, 0.9 및 0.3 µg/ml의 높은 활성을 나타내었다. 그리고 A549 lung carcinoma를 비롯한 5종의 인체 암세포주에 대한 세포독성실험 결과, costunolide가 UACC62 cell을 제외한 4종의 cell line에 대해 IC₅₀ 값이 0.3 µg/ml 이하로 나타나 전반적으로 가장 높은 활성을 보였다. 또한, cumambrin A, hendelin 및 costunolide의 경우 HCT15와 UO-31 cell에 대해서 positive control로 사용된 adriamycin보다 더 강한 활성을 보였다. 9종류의 화합물 모두 실험에 사용된 5종류의 인체암 세포주에 대해 IC₅₀ 값 5.0 µg/ml 이하의 강한 세포독성을 보여주었다.

사 사

이 연구는 1998년도 농림부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 연구결과 중 일부입니다.

인용문헌

- Jang, D. S., Yang, M. S. and Park, K. H. (1998) Sesquiterpene lactone from *Hemisteptia lyrata*. *Planta Med.* 64(3): 289-290.
- 장대식, 박기훈, 최상욱, 남상해, 양민석 (1997) 구절초 꽃의 항균성물질. *한국농화학회지* 40(1): 85-87.
- Yang, M. S., Park, K. H., Jang, D. S., Choi, S. U., Nam, S. H. and Mooto, S. (1996) Cumambrin A in *Chrysanthemum boreale* Makino. *Kor. J. Pharmmacogn.* 27(3): 207-211.
- 장대식, 박기훈, 양민석 (1998) 산국 꽃의 germacranolides. *생약학회지* 29(2): 67-70.
- Charlwood B. V. and Banthorpe, D. V. (1991) Terpenoids. *In Methods in plant biochemistry*, Dey, P. M. and Harborne, J. B. (ed.), Vol. 7, 187-211. Academic Press, London.
- Hoffmann, H. M. R. and Rabe, J. (1985) Synthesis and biological activity of α -methylene- γ -butyrolactones. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24: 94-110.
- Geissman, T. A. (1973) *In Recent advances in phytochemistry*. Vol. 6, Runeckless, V. C. and Mabry, T. J. (ed.), 65-95. Academic Press, New York.
- Ann, F. C., Charulata, H. and Charles, W. P. (1993) Adhesion of metastatic, ras-transformed NIH₃T₃ cells to osteopontin, fibronectin, and laminin. *Can. Res.* 53: 701-706.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McManhon, J., Vistica, D. T., Warren, J., Bokesch, H., Kinney, S. and Boyd, N. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
- Ahn, B. Z. and Sok, D. E. (1996) Michael acceptors as a tool for anticancer drug design. *Current Pharmaceutical Design* 2: 247-262.
- 이준성 (1997) 담배풀의 성분과 항암효과. *충남대학교 약학과 박사학위 논문*.
- 남상해, 최상도, 최진상, 장대식, 최상욱, 양민석 (1997) 산국으로부터 분리한 sesquiterpene lactones의 흰쥐 복수암에 대한 효과. *한국식품영양학회지* 26(1): 144-147.

(1998년 7월 21일 접수)