

## 수종의 국화과 식물에서 분리한 Sesquiterpene Lactone들의 생리활성(제2보). FPTase 저해활성

장대식, 권병목<sup>1</sup>, 양민석\*

경상대학교 농화학과, <sup>1</sup>생명공학연구소

### Biological Activities of Sesquiterpene Lactones isolated from Several Compositae Plants. Part 2. FPTase Inhibitory Activity

Dae Sik Jang, Byoung Mog Kwon<sup>1</sup> and Min Suk Yang\*

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

**Abstracts** - Nine sesquiterpene lactones, which were isolated from *Hemisteptia lyrata* Bunge, *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura and *Chrysanthemum boreale* Makino were evaluated for the farnesyl-protein transferase (FPTase) inhibitor, conducted by the scintillation proximity assay (SPA). The angeloylcumambrin B and tigloylcumambrin B inhibited a recombinant rat FPTase with IC<sub>50</sub> value of 78 µg/ml (225 µM) and 90 µg/ml (260 µM), respectively.

**Key words** - Chrysanthemum; sesquiterpene lactone; FPTase.

Farnesyl-protein transferase(FPTase)는 세포의 증식과 분화를 조절하는 signal transduction 과정에 관여하는 효소중의 하나로써 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 ras protein에 전달하는 역할을 하며,<sup>1)</sup> ras protein은 성장조절인자를 통한 신호전달과정에서 가장 중요한 역할을 하는 단백질로서 ras proto oncogenes에 의해 발현되는데 이 ras gene은 다양한 사람의 종양에서 oncogenic gene으로서 처음 발견되었고 악성종양과 관련이 있다고 알려져 있기 때문에,<sup>2)</sup> FPTase는 효과적인 암 치료제의 개발을 선도하는 훌륭한 target으로 평가되고 있다.<sup>3-5)</sup>

따라서 본 연구에서는, 이미 B16 melanoma cell line에 대한 세포접착저해활성과 A549를 비롯한

5종의 인체암 세포주에 대해 강한 세포독성을 가진다는 사실이 확인된,<sup>6)</sup> 지칭개(*Hemisteptia lyrata* Bunge), 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura) 및 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)에서 분리한 9종의 sesquiterpene lactone을 대상으로 최근에 개발되어 사용중인 항암제 개발을 위한 여러 가지 mechanism-based bioassay 방법 중 FPTase 저해효과를 측정하였기에 그 결과를 요약하여 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

**실험물질 및 재료** - 전보<sup>6)</sup>와 같이 지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 hemisteptin A, hemisteptin B, angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin

\*교신저자 : Fax 0591-757-0178

B, cumambrin A, cumambrin B, hendelin, costunolide 및 tulipinolide를 실험재료로 사용하였다(Fig. 1).

**FPTase 저해실험** - 실험에 사용된 FPTase는 Yokoyama 등<sup>7)</sup>의 방법에 따라 흰쥐(Male Sprague-Dowley, 100~150 g)의 뇌에서 분리한 후 Anion exchange Q-Sepharose(Pharmacia Biotec.)칼럼을 이용하여 부분 정제하였다. 그리고 FPTase의 활성측정은 Scintillation Proximity assay(SPA) 방법<sup>8)</sup>에 의해 측정하였다. 즉, 20  $\mu$ l의 <sup>3</sup>H-FPP(farnesyl pyrophosphate, Amersham), 20  $\mu$ l biotin lamin B peptide, 10  $\mu$ l 시료용액, 10  $\mu$ l의 assay 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01% Triton X-100)을 넣고 3분 동안 전 배양한 후 40  $\mu$ l의 FPTase를 넣어주고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 150  $\mu$ l의 SPA bead/stop reagent 용액을 넣어주고 vortex한 다음, 30분간 상온에서 방치한 후 liquid scintillation counter로 count하였다.

효소 억제도는 다음의 방법으로 계산하였다.

% inhibition

$$= [1 - (\text{Sample-B2}) / (\text{C-B1})] \times 100$$

Blank 1(B1): without sample and enzyme

Blank 2(B2): with sample and without enzyme

Control(C): without sample and with enzyme

### 결과 및 고찰

지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 9종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 항암제 개발을 위한 target중 하나인 FPTase에 대한 억제 효과를 측정된 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 hendelin을 제외한 8종의 sesquiterpene lactone들은 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 27~59%의 저해율을 보였다. 이 중에서 angeloylcumambrin B(59%, IC<sub>50</sub>: 78  $\mu$ g/ml, 225  $\mu$ M)와 tigloylcumambrin B(59%, IC<sub>50</sub>: 90  $\mu$ g/ml, 260  $\mu$ M)는 FPTase 저해

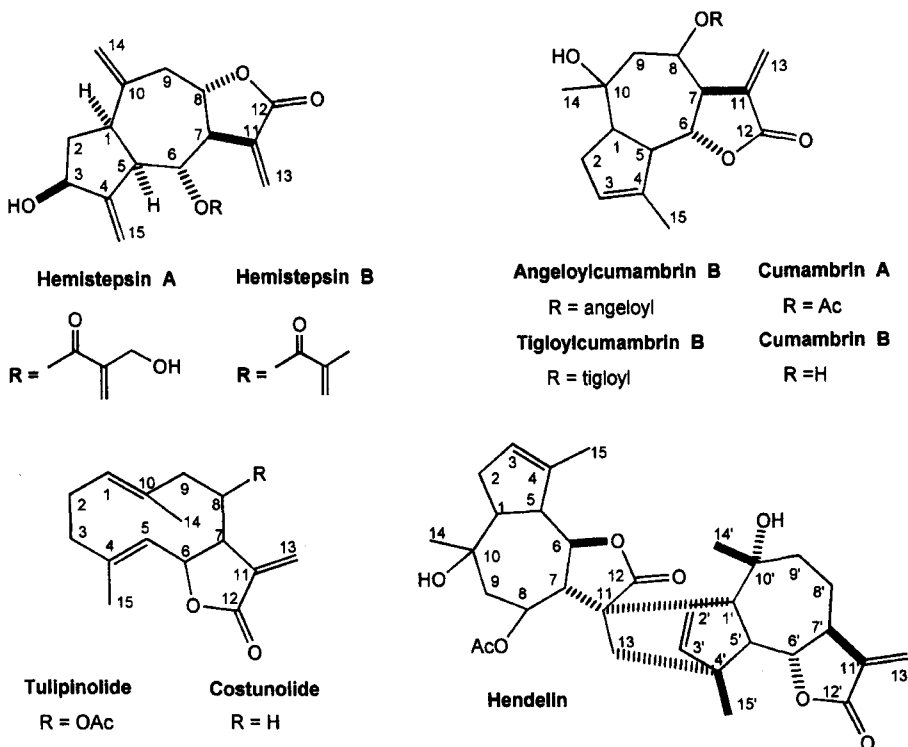


Fig. 1. The nine sesquiterpene lactones isolated from *H. lyrata*, *C. zawadskii* and *C. boreale*.

**Table I.** FPTase inhibitory activities of nine sesquiterpene lactones by Scintillation Proximity Assay

| Compounds           | Inhibition ratio of FPTase (% , 100 $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---------------------|--|
| Hemistepsin A       | 29   |
| Hemistepsin B       | 36   |
| Angeloylcumambrin B | 59 ( $\text{IC}_{50}=225 \mu\text{M}$ )                |
| Tigloylcumambrin B  | 54 ( $\text{IC}_{50}=260 \mu\text{M}$ )                |
| Cumambrin A         | 44   |
| Cumambrin B         | 43   |
| Hendelin            | 4  |
| Tulipinolide        | 27   |
| Costunolide         | 44   |

제로서 보고된 patulin( $\text{IC}_{50}=290 \mu\text{M}$ )<sup>9)</sup>이나 담배 풀에서 분리된 sesquiterpene lactone인 11(13)-dehydroivaxillin, carabrol 및 2,3-dihydroaromaticin 등( $\text{IC}_{50}=300 \mu\text{M}$ )과 비슷한 활성을 가지는 것이며,<sup>10)</sup> 또한, 이들은 rat squalene synthase( $\text{IC}_{50}\gg 200 \mu\text{M}$ )와 recombinant rat geranyl-geranyl protein transferase I( $\text{IC}_{50}\gg 200 \mu\text{M}$ )에는 활성을 보이지 않았기 때문에 본 화합물들은 FPTase에 특이성을 가지는 것으로 생각된다. 그러나 전체적으로 볼 때, 식물에서 유래한 강력한 FPTase 저해제 중 하나인 arteminolide( $\text{IC}_{50}=360 \text{ nM}$ ) 등<sup>11)</sup>과 비교하면 활성이 약한 편이며, 전보<sup>6)</sup>에서 B16 melanoma cell이나 인체암 세포주에 대해 보여주었던 강한 세포독성( $\text{IC}_{50}=1\sim 14 \mu\text{M}$ )과는 대조를 보였다.

따라서  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone ring을 함유하는 sesquiterpene lactone 계열 화합물들의 강한 세포독성은 FPTase의 억제와는 직접적인 연관성이 없는 것으로 사료된다. 다만, 9종의 화합물 중 긴 치환체를 가지는 angeloylcumambrin B와 tigloylcumambrin B가 다른 것들에 비해 상대적으로 강한 활성을 보였기 때문에 치환체의 길이와 FPTase 저해활성 사이에 어떤 연관성이 있을 것으로 판단되므로 이와 관련된 추가 실험이 필요하다고 생각된다.

## 결 론

천연물유래 항암성 물질에 대한 연구의 일환으로,

지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 9종의 sesquiterpene lactone을 대상으로 FPTase 저해활성을 Scintillation Proximity assay(SPA) 방법으로 test한 결과, angeloylcumambrin B와 tigloylcumambrin B의 경우는 각각  $\text{IC}_{50}$  값  $78 \mu\text{g/ml}$ ( $225 \mu\text{M}$ )와  $90 \mu\text{g/ml}$ ( $260 \mu\text{M}$ )의 저해활성을 보였으나 나머지 화합물들은 모두  $\text{IC}_{50}$  값이  $100 \mu\text{g/ml}$  이상으로 세포독성실험에서 보여주었던 것과 같은 강한 활성은 나타나지 않았다.

## 사 사

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

## 인용문헌

- Pompliano, D. L., Rands, E., Schaber, M. D., Mosser, S. D., Anthony, N. J. and Gibbs, J. B. (1992) Steady-state kinetic mechanism of ras farnesyl-protein transferase. *Biochem.* 31: 3800-3807.
- Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1993) Function and regulation of RAS. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 851-891.
- Janice, E. B. and James, C. M. (1995) Farnesyl transferase inhibitors: the successes and surprises of a new class of potential cancer chemotherapeutics. *Chemistry and Biology* 2(12): 789-791.
- Kohl, N. E., Wilson, F. R., Misser, S. D., Gometz, R. P., Gibbs, J. B. and Oliff, A. (1994) Protein farnesyl transferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9141-9145.
- Hamilton, A. D. and Sebt, S. M. (1995) Inhibitors of Ras farnesyltransferase as noble antitumor agents. *DN&P* 8: 138-145.
- 장대식, 김환목, 홍동호, 전효근, 고영희, 양민석 (1998) 수종의 국화과 식물에서 분리한 sesquiterpene lactone들의 생리활성(제1보), 암세포주에 대한 세포독성. *생약학회지* 29(3): 243-247.
- Reiss, Y., Goldstein, J. L., Seabra, M. C., Patrick, J. C. and Brown, M. S. (1990) Inhibition of purified p21<sup>ras</sup> farnesyl-protein transferase by Cys-AAX tetra peptides. *Cell* 62: 81-88.
- Reiss, Y., Seabra, M. C., Goldstein, J. L. and

- Brown, M. S. (1990) Purification of ras farnesyl: protein transferase. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 3: 242-245.
9. Miura, S., Hasumi, K. and Endo, A. (1993) Inhibition of protein prenylation by patulin. *FEBS Letter* 318: 88-90.
10. 이준성 (1997) 담배풀의 성분과 항암효과. 충남대학교 약학과 박사학위논문. (1998년 11월 8일 접수)
11. Lee, S. H., Kim, M. J., Bok, S. H., Lee, H. S., Shin, J. H., Seo, Y. G. and Kwon, B. M. (1998) Arteminolide, an inhibitor of farnesyl transferase from *Artemisia sylvatica*. *J. Org. Chem.* 63: 7111-7113.