

## Terrein의 etoposide에 의해 유도된 apoptosis 저해효과

이충환 · 이호재 · 김진희 · 김현아 · 고영희\*

생명공학연구소 면역제어물질 연구실

**Anti-apoptotic Effects of Terrein on Etoposide-induced Apoptosis of U937 Human Leukemia Cells.** Lee, Choong-Hwan, Ho-Jae Lee, Jin-Hee Kim, Hyun-A Kim, and Yung-Hee Kho\*. *Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea* - In the course of screening for the substances inhibiting apoptosis of U937 human leukemia cell induced by etoposide, a fungal strain F80834 producing a high level of inhibitor was selected. The inhibitory substance was purified and identified as terrein by spectroscopic methods of UV, EI-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and DEPT. Terrein showed inhibitory activity of caspase 3, a major protease of apoptosis cascade, with an IC<sub>50</sub> value of 20 µg/ml after 7 hrs of treatment. It also showed protective effect against cell death with an IC<sub>50</sub> value of 10 µg/ml on U937 cells induced by etoposide after 24 hrs of treatment, but did not show any cytotoxicity at the same condition without etoposide.

**Key words:** apoptosis, inhibitor, terrein, etoposide, U937 cells

Apoptosis는 necrosis와는 달리 세포 내에 본래부터 존재 하던 자살기작이 여러 가지 세포 내부, 외부의 자극에 의하여 활성화되어 세포내 protease인 caspase family를 매개로 세포가 계획된 대로 스스로 죽는 현상이다[1,4,5,14, 15,17,20]. Apoptosis와 관련된 질병은 apoptosis 저해와 유도에 의해 각각 야기되어진다. Apoptosis 저해와 관련된 질병은 암, 자가면역 질환, 바이러스 감염 등을 들 수 있으며[9,11,21,22], apoptosis의 증가와 관련된 질환은 AIDS, 신경 관련질환 (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, retinitis pigmentosa, cerebellar degeneration), 허혈성 질환 (뇌졸중, myocardial infraction, reperfusion injury) 그리고 알콜 등 독성물질에 의한 간질환 등이 있다[8,13,16]. 이러한 질병에 대한 치료제 개발 가능성 때문에 apoptosis 조절물질에 대한 관심이 고조되었으며, 현재 많은 유도 및 저해원이 알려지고 있다. Apoptosis 저해인자는 생리적인 저해제 (growth factor, extracellular matrix, CD40 ligand, neutral amino acids, zinc, estrogens, androgens), viral genes 그리고 약제 (cysteine protease inhibitors, calpain inhibitors, tumor promoters) 등이 있다. 그 중 cysteine protease inhibitor의 apoptosis 관련성 여부는 caspase 저해제 투여 연구와 caspase 1(ICE) knock out mouse 관련 연구 등으로 증명되어 지고 있다[1,4]. Apoptosis 유도인자는 항암제 개발에 대한 기대 때문에 주로 연구가 진행되어 왔으며 다양한 유발인자가 연구되었다.

암세포에 대해 apoptosis를 일으킬 수 있는 항암제를 개발하기 위해 항암제 탐색제로 caspase 유도물질 탐색제를 이용하고 있다. 동경대 Seto 교수팀이 방선균에서 신규의 caspase 3 inducer인 6-hydroxy tetrangulol을 분리정제하여 보고한 바 있으며[22], 그의 apoptolidin[11], cytotrienin [9], FE35A, B[21] 등의 물질들이 개발되었다. 이와 같이 지금까지 apoptosis 관련 caspase 조절물질 연구는 주로 항암제 개발을 위한 caspase 유도제나, 염증에 관련된 caspase 1 (ICE) 저해제에 집중되어왔다[8,13,16].

본 연구에서는 apoptosis 조절물질을 탐색하고자 apoptosis 유도물질의 하나인 etoposide를 이용하여 U937 인체 백혈병 세포의 apoptosis를 유도한 후 apoptosis 정도를 apoptosis cascade의 중요 효소인 caspase 3 활성으로 측정하는 시스템을 확립하였으며, 이를 이용하여 U937세포에서 etoposide에 의한 caspase 3 유도를 저해하는 활성을 나타내는 F80834균주를 선발한 후 저해물질을 정제하고, 구조를 결정한 후 저해활성을 조사하였는 바 그 결과를 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 시약

실험에 사용한 무기염류 및 일반용매는 시약특급을 사용하였고, 곰팡이 배양에 사용한 배지류는 주로 Difco(USA) 제품을 사용하였다. 물질분리 및 확인에 사용한 TLC plate는 Merck TLC plate silica 60F<sub>254</sub>를 사용하였고, HPLC column은 YMC 사(Japan), Phenomenex 사(USA)의 제품을, Sephadex LH-20은 Pharmacia(Sweden) 제품을 각각 사용하였다. BuOH, EtOAc, MeOH 등의 용매는 일반시약

\*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4350, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: yhkho@mail.kribb.re.kr

을, HPLC 용매는 Baxter(Burdick & Jackson, USA), Merck 제품을 사용하였다. NMR용매 CD<sub>3</sub>OD는 Aldrich 사(USA) 제품을 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지류는 Gibco BRL(USA) 제품을 사용하였으며, caspase assay에 사용된 기질 및 저해제 등은 Enzyme System Products (USA) 제품을 사용하였다.

### 공시재료

생명공학연구소 미생물 탐색실로부터 분양받은 약 3000 여주의 미생물 배양액을 대상으로 강한 저해활성을 나타내는 물질을 탐색하였다. 균주의 배양액을 EtOAc, BuOH 등의 용매로 추출, 농축하여 MeOH에 녹인 후 활성 검정용 시료로 사용하였으며, 그 결과 곰팡이 F80834 균주를 선발하였다.

### 균주의 배양

Potato dextrose agar (PDA) 배지에서 사면 배양한 곰팡이 F80834 균주를 YpSs (glucose 2%, yeast extract 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, pH 5.8)배지 100 ml 을 함유한 500 ml conical 플라스크에 접종한 후 72 시간 배양하여 발효용 종배양액을 만들었다. 이 종배양액을 3 l 생산 배지를 함유한 5 l 발효조(한국발효기 KF-5L, Korea)에 접종한 후, 통기량 1 vvm, 교반 속도 200 rpm, 25°C의 조건에서 6 일간 배양하였다.

### 활성물질의 분리정제

저해물질을 Sep-pak C18 cartridge(Waters, USA), ODS-AM HPLC column(250×4.6 mm, YMC Co., Japan) 등을 사용하여 분리하였다. HPLC는 Hitachi 사(Japan)의 L-6200 intelligent pump, L-6000 pump, L-4000 UV detector 를 사용하였다.

### 이화학적 특성 및 구조분석

Mass 스펙트럼은 ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA) 및 EI-MS(electron impact mass spectromerty, Jeol JMS-DX303, Japan)를 사용하여 측정하였다.

NMR 스펙트럼은 Varian UNITY 300(USA)을 이용하여 측정하였다. 화학이동 값은 ppm으로 나타내었고, 짝지움 상수(*J* value)는 Hz로 나타내었다. NMR 실험은 시료를 CD<sub>3</sub>OD 용매로 녹여 5 mm NMR tube에서 측정하였으며, 용매의 피크를 내부 표준물질로 하여 화학이동을 측정하였다.

### Caspase-3 활성 발현유도 및 저해물질의 탐색

Apoptosis 유도물질의 하나인 etoposide의 농도와 처리 시간을 각각 달리하며 U937 세포의 apoptosis를 유도하고, cell lysate의 caspase 3 활성과 cell의 상태를 현미경으로

검정하였다. 그 결과에 근거하여 10 μM의 etoposide를 시료와 함께 7 시간동안 처리하여 apoptosis를 유도시켰다.

이러한 조건을 바탕으로 sample을 처리하고 etoposide로 apoptosis를 유도한 후 7 시간 후에 현미경으로 cell의 모양을 관찰하여 apoptosis여부를 1차 판정하였으며, 세포를 harvest 한 후 얻은 lysate를 이용하여 caspase-3의 활성을 DEVD-AFC를 기질로 측정하였다[7]. Etoposide를 처리한 경우 유도된 caspase 활성과 비 처리시의 활성을 기준으로 각 시료의 저해 활성을 환산하였으며, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)를 표준 caspase-3 유도 저해제로 사용하였다[2].

### Caspase-3 활성 측정

Caspase 활성은 형광합성 기질을 사용하여 측정하였다. 미생물 배양액을 EtOAc로 추출한 후 DMSO에 녹여 assay에 이용하였으며, 세포 lysate를 효소원으로 사용하였다. 시료 1 μl, 5 mM의 기질(DEVD-AFC)을 100 μl의 buffer [100 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*-2(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), pH 7.5, 10 mM dithiothreitol (DTT), 10% sucrose, 0.1% CHAPS, and 0.1% BSA at 25°C]와 혼합하여 25°C에서 반응시켰다. 반응 후 생성된 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin(AFC)은 spectrofluorometer (Perkin-Elmer LS-50B)를 사용하여 측정하였다[7].

### 세포 사멸을 측정

세포 사멸율은 microculture tetrazolium assay (MTS)법을 사용하여 측정하였다[6].

96 well microplate에 U937 세포, etoposide 및 시료를 첨가하여 24시간 배양하였으며, 세포 사멸 정도율은 MTS 시약을 첨가한 1 시간 후에 UV 490 nm에서 측정된 OD 값으로 환산하였다.

## 결과 및 고찰

### 활성물질의 분리

F80834 균주가 생산하는 apoptosis 저해물질의 분리 과정을 Fig. 1에 나타내었다. 6 일간 배양한 배양액 3 liter 를 원심분리하여 균체와 상등액으로 나눈 후 상등액을 ethyl acetate로 추출하였다. 이 추출물을 Sep-pak C18 cartridge (Waters, 5 g)에 통과, 흡착시키고, 증류수로 수세한 후 MeOH:H<sub>2</sub>O를 이용하여 단계별로 용출하였다. 20% aq. MeOH 20%에서 용출된 활성분획(300 mg)을 50% aq. MeOH를 이용하여 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하였으며, 최종적으로 HPLC (YMCPack ODS AM, 250×4.6 mm, UV 220 nm)를 통해 순수 분리하였다.

### 활성물질의 구조분석

ESI-MS 분석 결과 *m/z* 153에서 (M-H)<sup>-</sup> 피크가 관찰되

**F80834 culture broth (3 liters)**  
 | centrifugation  
**Supernatant**  
 | ethyl acetate extraction  
**Ethyl acetate extract**  
 | Sep- pack C18 cartridge  
 (20% aq. MeOH)  
**Active fraction (300mg)**  
 | Sephadex LH20 column chromatography  
 (50% aq. MeOH)  
**Active fraction (140mg)**  
 | HPLC  
 (acetonitrile gradient 20-100% 30'  
 YMC-ODS-AM 250X6 mm ID)  
**Terrein (10mg)**

Fig. 1. Isolation procedure of an apoptosis inhibitory compound from F80834.

었으며, EI-MS 분석 결과 분자량 154로 확인되었다.

<sup>13</sup>C NMR 과 DEPT NMR data 분석결과 19.5(CH<sub>3</sub>), 78.1(CH), 82.4(CH), 125.9(CH), 126.4(CH), 141.8(CH), 170.8, 205.63 ppm에서 8 개의 carbon peaks가 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum으로부터 1.93 ppm(3H, dd, J=6.9, 1.5 Hz), 4.06 ppm(1H, d, J=2.7 Hz), 4.66 ppm(1H, d, J=2.7 Hz), 5.99 ppm(1H, s), 6.4 ppm(1H, dd, J=15.6, 1.5), 6.8 ppm(1H, dq, J=6.9, 15.6)에서 피크가 관찰되었다. 분자량과 NMR data로부터 구조식을 C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>로 결정하였으며, data base 검색결과 terrein (4,5-dihydroxy-3-propenyl-2-cyclopenten-1-one)으로 구조를 결정하였다 (Fig. 2).

Terrein은 *Aspergillus terreus*, *Penicillium raistrickii*em에서 생산이 보고되었으나[10], 생리활성에 대한 연구보고는 많이 되어 있지 않다.

**Terrein의 acetylation**

Terrein 구조에서 OH기의 역할을 추정해보기 위해 acetylation을 실시하였다. 5 mg의 terrein을 Ac<sub>2</sub>O-pyr (1:1)

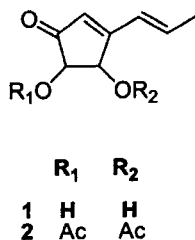


Fig. 2. Chemical structure of an apoptosis inhibitory compound (terrein) isolated from F80834.

에 녹인 후 상온에서 12시간 교반하였다. 반응액을 농축시킨 후 얻은 di-acetate terrein을 TLC로 확인하였다. ESI-MS 분석결과 m/z 499에서 [2M+Na]<sup>+</sup> 피크가 관찰되어 분자량을 238로 결정하였으며, terrein(M.W. 154)에 2개의 acety기가 결합된 것을 확인하였다.

**Terrein의 생물활성**

Terrein은 U937 세포에서 etoposide에 의한 (10 μM, 7 시간) caspase-3의 유도를 농도 의존적으로 저해하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 20 μg/ml이었다 (Fig. 3). Terrein의 caspase-3 유도저해활성이 etoposide에 의한 세포사멸(apoptosis)에 미치는 영향을 확인하기 위해, etoposide 10 μM에 의해 24 시간 동안 유도된 apoptosis 조건에서 U937 세포의 cell viability를 MTS assay로 측정하였다 (Fig. 4). Terrein은 10 μM의 etoposide에 의해 24 시간동안 유도된 U937 human leukemia cell의 apoptosis를 농도 의존적으로 저해하여 세포의 사멸을 저해하는 것으로 확인되었다. 또한 동일한 조건에서 etoposide에 의한 자극 없이 terrein의 세포 독성을 측정하여 본 결과 100 μg/ml 이상의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 비교적 낮은 세포독성을 나타내었다 (Fig. 5).

Ac-terrein은 etoposide에 의한 세포 사멸 저해 활성은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 6 μg/ml 까지 증가하다 고농도에서 오히려 낮아지는 것을 볼 수 있다. Ac-terrein은 단독처리시 terrein에 비해 4 배정도 세포 독성을 나타내어 (Fig. 5) etoposide와 동시에 처리하는 경우 세포 독성을 나타내는 것으로 보여진다.

Terrein의 작용 기작을 추정하기 위해 각종 항산화 활성을 조사한 결과(data not shown), TBA법에 의한 lipid peroxidation을 저해하는 활성을 나타내었으나, DPPH나 xanthine/xanthine oxidase에 의한 radical 생성은 저해하지 않았다. 항산화 활성과 apoptosis 조절과의 상관성은 많은

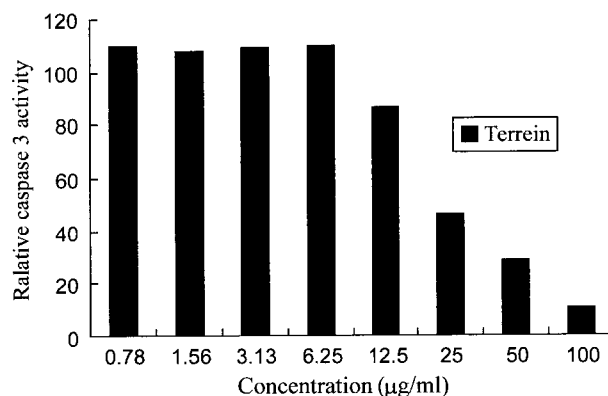
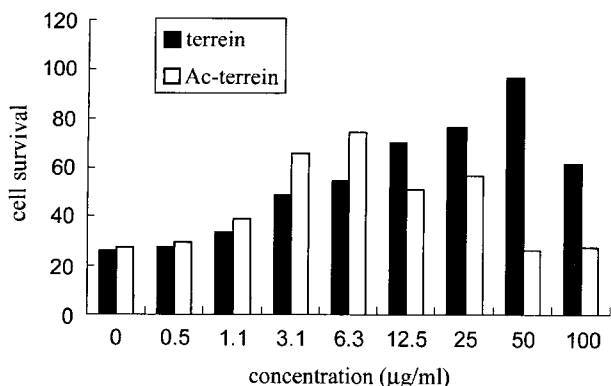
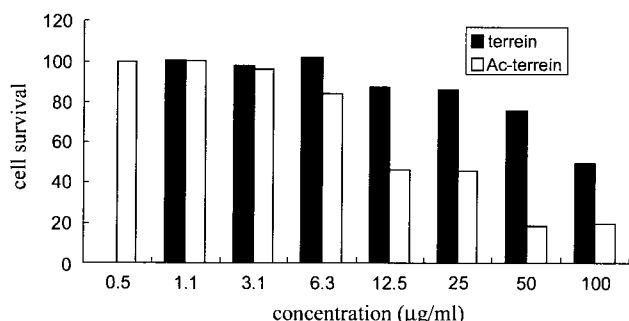


Fig. 3. Effects of terrein on the caspase-3 activity in U937 human leukemia cells. 10 μM etoposide was treated. The caspase activity was measured after 7 hrs of etoposide treated.



**Fig. 4. Protecting effects of terrein and Ac-terrein against the etoposide(10  $\mu$ M) induced cytotoxicity in U937 human leukemia cell.**

Cytotoxicity was measured by MTS assay after 24 hrs of etoposide treatment.



**Fig. 5. Cytotoxic effects of terrein and Ac-terrein in U937 human leukemia cell after 24 hrs measured by MTS assay.**

연구결과가 보고되었다. Verhaegen 등[19]은 human HL-60 leukemia cell 에서 항산화제에 의해 apoptosis가 저해된다고 보고하였으며, Tsai 등[18]은 vascular smooth muscle cells에서 PDTC (pyrrolidinedithiocarbamate), NAC (N-acetylcystein) 등의 항산화제가 apoptosis를 유도하는 것으로 보고하는 등 apoptosis 조절활성은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다[3].

Terrein은 낮은 세포 독성을 나타내는 화합물로, etoposide에 의해 유도된 세포사멸을 농도 의존적으로 저해하여 세포를 보호하는 활성을 나타내었다. 최근 신경세포나 간세포에 대한 보호물질의 개발이 절실히 요구되는 시점에서 본 연구에 의해 새롭게 밝혀진 terrein의 생물활성과 그 작용기작에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

미생물로부터 U937 세포주의 etoposide에 유발된 apoptosis 저해물질을 탐색한 결과 곰팡이 F80834 균주를 선발하였다. 균주 배양액으로부터 저해물질을 분리한 후 UV, EIMS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT 등의 기기분석을 실시한 결과

terrein으로 동정되었다. 이 물질은  $\text{IC}_{50}$  20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 U937 세포주의 etoposide에 의한 caspase 3 유도를 저해하였다. Etoposide에 의한 세포의 사멸도  $\text{IC}_{50}$  10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 저해하였으며, 동일한 농도 조건에서 단독 처리시 세포 독성을 나타내지 않았다.

## REFERENCES

- Barinaga, M. 1998. Death by dozens of cuts. *Science* **280**: 32-34.
- Bessho, R., K. Matsubara, M. Kubota, K. Kuwakado, H. Hirota, Y. Wakazono, Y. Lin, A. Okuda, M. KaWai, R. Nishikomori, and T. Heike. 1994. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ ) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 883-1889.
- Buttke, T. and P. Sandstrom. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*. **15**: 167-169.
- Cohen, G. 1997. Caspases. the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**: 1-16.
- Friedlander, R., R. Brown, V. Gagliardini, J. Wang, and J. Yuan. 1997. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature*. **388**: 31.
- Goodwin, C. J., S. J. Holt, S. Downes, and N. J. Marshall. 1995. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J. Immunol. Methods*. **179**: 95-103.
- Gurtu, V., S. R. Kain, and G. Zhang. 1997. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem.* **251**: 98-102.
- Ji, L., G. Zhang, and Y. Hirabayashi. 1995. Inhibition of tumor necrosis factor  $\alpha$  and ceramide-induced internucleosomal DNA Fragmentation by herbimycin A in U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**: 640-647.
- Takeya, H., H. Zhang, K. Kobinata, R. Onose, C. Onozawa, T. Kudo, and H. Osada. 1997. Cytotrienin A, a novel apoptosis inducer in human leukemia HL-60 Cells. *J. Antibiot.* **50**: 370-372.
- Kawakubo, J., H. Nishira, K. Aoki, and R. Shinke. 1993. Production of phenolic compounds by *Aspergillus* S-4 in sake cake medium and identification of terrein. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1208-1209.
- Kim, J. W., H. Adachi, K. Shin-Ya, T. Hayakawa, and H. Seto. 1997. Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardiosis* sp. *J. Antibiot.* **50**: 628-630.
- Lee, E., M. Miura, M. Yoshinari, H. Iwai, and K. Kariya. 1994. Selective inhibition of dexamethasone-induced apoptosis in rat thymocytes by herbimycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**: 128-134.
- Mastrangelo, A. and M. Betenbaugh. 1998. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Tibtech.* **16**: 88-95.
- Polverino, A. and S. Patterson. 1997. Selective activation of

- caspases during apoptotic induction in HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 7013–7021.
15. Salvatore, M., O. Hensens, D. Zink, J. Liesch, C. Dufresne, J. Ondeyka, T. Jurgens, R. Borris, S. Raghoobar, E. Mccauley, L. Kong, S. Gartner, S. Koch, F. Pelaez, M. Diez, C. Cascales, I. Martin, J. Polishookv, M. Balick, H. Beck, S. King, A. Hsu, and R. Lingham. 1994. L-741, 494, a fungal metabolite that is an inhibitor of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *J. Nat. Prod.* **57**: 755–760.
  16. Shimura, M., Y. Ishizaka, A. Yuo, K. Hatake, M. Oshima, T. Sasaki, and F. Takaku. 1997. Characterization of room temperature induced apoptosis in HL-60. *FEBS Letters.* **417**: 379–384.
  17. Thornberry, N. 1998. Caspases : Key mediators of apoptosis. *Chem. & Biol.* **5**: 97–103.
  18. Tsai, J., M. Jain, C. Hsieh, W. Lee, M. Yoshizumi, C. Patterson, M. Perrella, C. Cooke, H. Wang, E. Haber, R. Schlegel, and M. Lee. 1996. Induction of apoptosis by pyrrolidine-dithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 3667–3670.
  19. Verhaegen, S., A. McGowan, A. Brophy, R. Fernandes, and T. Cotter. 1995. Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 1021–1029.
  20. Wright, C., U. Schellenberger, H. Wang, Y. Wang, and D. Kinder. 1998. Chemotherapeutic drug activation of the AP24 protease in apoptosis: Requirement for caspase 3-like-proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**: 797–803.
  21. Yamashita, N., K. Shin-Ya, K. Furihata, Y. Hayakawa, and H. Seto. 1998. New ravidomycin analogues, FE35A and FE35B, apoptosis inducers produced by *Streptomyces rochei*. *J. Antibiot.* **51**: 1105–1108.
  22. Yamashita, N., T. Harada, K. Shin-Ya, and H. Seto. 1997. 6-Hydroxytetrangulol, a new CPP32 protease inducer produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **51**: 79–81.

(Received January 8, 2000)