

연교(*Forsythiae fructus*)로부터 분리한 caspase 유도 저해물질

김진희 · 고영희 · 김미리¹ · 김현아 · 이상명 · 이충환*

한국생명공학연구원, ¹충남대학교 식품영양학과

A Caspase Inducing Inhibitor Isolated from *Forsythiae fructus*

Jin-Hee Kim, Yung-Hee Kho, Mee Ree Kim¹, Hyun-A Kim,
Sang-Myung Lee and Choong-Hwan Lee*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

¹Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

During the screening of inhibitors of caspase-3 induction in U937 human monocytic leukemia cells from natural sources, *Forsythiae fructus*, which showed a high level of inhibition, was selected. And then, the compound was purified from the methanol extract using silica gel column chromatography and HPLC. The inhibitor was identified as rengyolone, by spectroscopic methods of ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, and HMBC. Rengyolone showed inhibitory activity of caspase-3 induction, a major protease of apoptosis cascade, with an IC₅₀ value of 6.25 µg/mL after 7 h of treatment in U937 cells. It also showed inhibitory activity of caspase-1 induction, with an IC₅₀ value of 7.50 µg/mL after 40 h of treatment in D10S cells. In addition, it showed protective effect against cell death with an IC₅₀ value of 11 µg/mL on U937 cells induced by etoposide after 24 h of treatment, but did not show any cytotoxicity at the same condition without etoposide, a caspase 3 inducing agent.

Key words: apoptosis, rengyolone, etoposide, U937, D10S

서 론

Apoptosis는 necrosis와는 달리 세포 내에 본래부터 존재하던 자살기작이 여러 가지 세포 내부, 외부의 자극에 의하여 활성화되어 세포내 protease인 cascade family를 매개로 세포가 계획된 대로 스스로 죽는 현상이며⁽¹⁻³⁾, 세포사 실행인자로서 caspase family의 활성화가 세포사에 필수적이다. Caspase는 아미노산배열의 상동성에 따라 추정된 진화계통수에 의하여 ICE(caspase-1), ICH-1(caspase-2), CPP32(caspase-3)를 중심으로 하는 세 가지 형태로 나눌수 있으며, CPP32의 활성화 경로가 apoptosis에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. Cyteine protease인 ICE와 CPP32는 apoptosis과정을 수행하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있다. ICE는 pro-IL-1β-processing enzyme으로 세포의 사멸과정을 수행하기 위해 필수적인 유전자로, ICE inhibitor인 CrmA는 apoptosis를 억제한다는 보고가 있어 이들 protease의 활성이 apoptosis유도에 필수적인 것으로 나타났다^(4,5).

Apoptosis와 관련된 질병은 apoptosis 저해와 유도에 의해 각각 야기되어진다. Apoptosis 저해와 관련된 질병은 암, 자가면역 질환 및 바이러스 감염 등을 들 수 있으며⁽⁶⁻¹⁰⁾, apoptosis의 증가와 관련된 질환은 AIDS, 신경관련질환 (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⁽¹¹⁻¹⁴⁾. 이러한 질병에 대한 치료제 개발 가능성 때문에 apoptosis 조절 물질에 대한 관심이 고조되었으며, 현재 많은 유도 및 저해원이 알려지고 있다.

연교(*Forsythiae fructus*)는 한방과 민간에서 열매를 종창, 임질, 통경, 이노, 치질, 결핵, 나력, 음, 해독 등에 널리 사용되고 있다⁽¹⁵⁾. 연교에 함유되어 있는 성분에는 lignan류 (phillygenin, pinoselinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucoside류(phillyrin, pinoselinol-D-glucose, arctin, matairesinonide), flavonoid(rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl glycoside류(forsythiaside, acteoside, suspensaside 및 hydroxyacteoside) 등이 있다. 그 중 phillyrin이 혈압강화작용이 있으며, pinoselinol과 pinoselinol-D-glucoside가 cyclic AMP-phosphodiesterase 활성을 억제 및 혈압강화작용이 있다고 보고되었다^(16,17). 또한 phenylpropanoid glycosides는 항균 작용, 3β-acetoxy-20, 25-epoxydammarane-24-ol은 항염증 효

*Corresponding author : Choong-Hwan Lee, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Oun-dong, Yuseong, Taejeon 305-333, Korea
Tel: 82-42-860-4294
Fax: 82-42-860-4595
E-mail: Chlee@mail.kribb.re.kr

과가 있는 것으로 알려져 있다^(18,19).

본 연구에서는 apoptosis 조절물질을 탐색하고자 보유하고 있던 한약재 55종의 methanol 추출물을 대상으로 apoptosis 유도물질의 하나인 etoposide를 이용하여 U937세포주의 apoptosis를 유도한 후 apoptosis 정도를 caspase-3 와 caspase-1의 활성을 측정하였으며, 그 결과 저해활성이 우수한 연교를 선별한 후 저해물질을 정제하고, 구조결정 및 저해활성을 조사하였는 바 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

시약

실험에 사용한 무기염류 및 일반용매는 시약특급을 사용하였고, 배양에 사용한 배지류는 주로 Difco(USA)제품을 사용하였다. 물질분리 및 확인에 사용한 silica gel은 Merck사(Germany)의 silica gel 60(63-200 μm)을, TLC plate는 Merck TLC plate silica 60F₂₅₄를 사용하였고, HPLC column은 YMC 사(Japan), Phenomenex 사(USA)의 제품을, Sephadex LH-20은 Pharmacia(Sweden) 제품을 각각 사용하였다. 각 정제단계 및 column chromatography에 사용된 메탄올, 에틸아세테이트 등의 용매는 일반시약을, HPLC 용매는 Baxter(Burdick & Jackson, USA), Merck 제품을 사용하였다. NMR용 CD₃OD 등은 Aldrich 사(USA) 제품을 사용하였다. 세포배양에 사용된 시약류는 Gibco BRL 제품을 사용하였으며, caspase assay에 사용된 기질 및 저해제 등은 Enzyme System Products(USA) 제품을 사용하였다.

활성물질의 분리정제

저해물질을 Sephadex LH-20(Pharmacia LKB, Sweden), 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 detector를 사용하였다.

이화학적 특성 및 구조분석

Mass 스펙트럼은 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA)를 사용하여 측정하였다. NMR 스펙트럼은 Varian UNITY 300(USA)를 이용하여, 용매로는 CD₃OD를 사용하였다.

Caspase-3 활성 측정

U937 세포를 RPMI-1640배지(10% FBS)를 이용하여 5% CO₂ incubator에서 배양 후, 96-well microplate에 sample을 처리하고 10 μg/mL의 etoposide로 apoptosis를 유도한 후 5시간 후에 현미경으로 cell의 모양을 상태를 관찰하여 apoptosis 여부를 1차 판정하였으며, 세포를 harvest 한후 얻은 lysate를 이용하여 caspase-3의 활성을 형광합성 기질인 5 mM의 DEVD-AFC(Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin)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. AFC의 생

성은 spectrofluorometer(Perkin-Elmer LS-50B)를 사용하여 측정하였다⁽²⁰⁾.

Caspase-1(ICE) 활성 측정

D10S T-helper cell을 RPMI-1640배지(5% FBS와 5 μM 2-mercaptoethanol 첨가)를 이용하여 5% CO₂ incubator에서 48 시간 배양 후, 96-well microplate에 sample과 Interleukin-1β를 1 ng/mL로 처리하여, 40시간후 cell의 상태를 현미경으로 관찰하여 caspase-1의 활성을 1차적으로 판단후, 세포를 harvest하여 얻은 lysate를 이용하여 YVAD-AFC(Thr-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin)를 기질로 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. AFC의 생성은 spectrofluorometer(Perkin-Elmer LS-50B)를 사용하여 측정하였다⁽²⁰⁾.

세포 사멸을 측정

세포 사멸율은 microculture tetrazolium assay(MTS)법을 사용하여 측정하였다. 96-well microplate에 U937 세포, etoposide 및 시료를 첨가하여 24시간 배양하였으며, 세포 사멸 정도율은 MTS시약을 첨가한 1시간 후에 UV 490 nm에서 측정된 OD값으로 환산하였다⁽²¹⁾.

결과 및 고찰

연교(*Forsythiae fructus*)로부터 caspase유도 저해물질의 분리

한약재 55종의 methanol 추출물을 대상으로 etoposide를 이용하여 U937세포주의 apoptosis를 유도한 후 apoptosis 정도를 caspase-3와 caspase-1의 활성을 측정한 결과, 최종적으로 연교를 선별한 후 저해물질을 분리하였다.

연교 600 g을 실온에서 methanol로 2회 추출하고 여과한

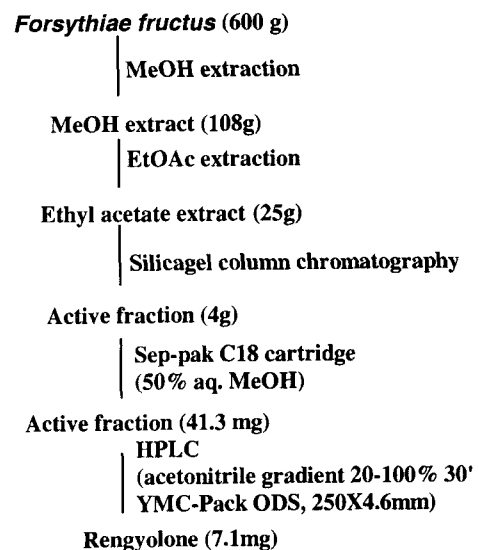


Fig. 1. Isolation procedure of an apoptosis inhibitory compound (rengyolone) from *Forsythiae fructus*.

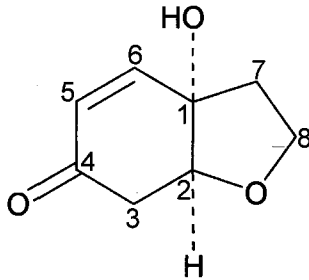


Fig. 2. Chemical structures of a rengyolone isolated from *Forsythiae fructus*

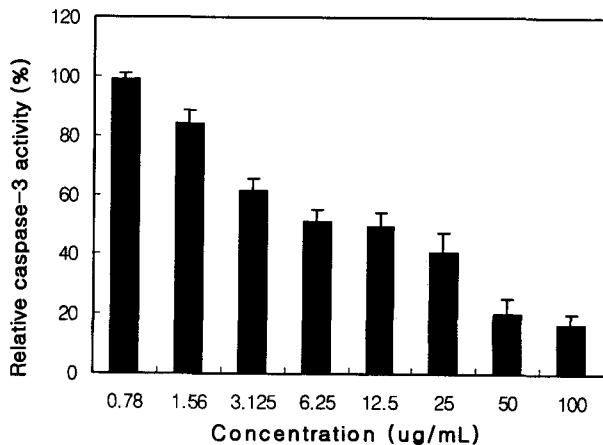


Fig. 3. Effects of rengyolone on the caspase-3 inducing activity treated with 10 µg/mL etoposide in U937 human leukemia cells

methanol 추출액을 감압농축한 후 증류수에 현탁하여 ethyl acetate로 추출하였다. 추출물을 silica gel column chromatography를 실시하여 각 fraction의 caspase-3 유도저해 활성을 측정하였다. 활성분획을 모은 후, 이 추출물을 sep-pak C₁₈ cartridge(Waters, 5 g)에 통과, 흡착시키고, 증류수로 수세한후 MeOH:H₂O을 이용하여 단계별로 용출하였다. 50% MeOH에서 용출된 활성분획(41.3 mg)을 HPLC (shisheido-Capcell Pak C₁₈ UG120, 250×10 mm, UV 220 nm)를 통해 rengyolone (7.1 mg)을 분리하였다(Fig. 1).

활성물질의 구조분석

ESI-MS분석 결과 m/z 155에서 (M+H)⁺피크가 관찰되어 분자량 154로 확인되었다. ¹³C-NMR과 DEPT NMR data 분석 결과 40.38(CH₂), 40.54(CH₂), 67.1(CH₂), 82.3(CH), 128.8(CH), 150.7(CH), 75.55, 199.1 ppm에서 8개의 carbon peaks가 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum으로부터 2.22 ppm (1H, dd, $J=5.6, 7.8$ Hz), 2.58 ppm (1H, dd, $J=7.2, 8.7$), 2.75 ppm (1H, dd, $J=4.8$), 3.6 (1H, d, $J=6.6$) 3.82 ppm (1H, dd, $J=7.2, 7.8$), 3.95 ppm (1H, dd, $J=5.6, 8.5$), 4.15 ppm (1H, dd, $J=1.8, 4.3$), 5.95 ppm (1H, d, $J=10.2$), 6.78 ppm (1H, d, $J=10.2$)에서 피크가 관찰되었다. 분자량과 NMR data로부터 구조식을 C₈H₁₀O₃로 결정하였으며, data base 검색결과 rengyolone으로 동정되었다(Fig. 2). Rengyolone은 Endo 등⁽²²⁾에 의해 antibacterial 성분으로 보고된 바 있다.

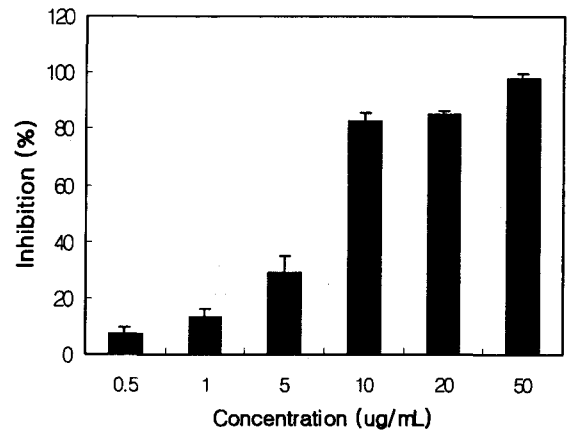


Fig. 4. Effects of rengyolone on the caspase-1 activity treated with 1 ng/mL Interleukin-1β in D10S cell

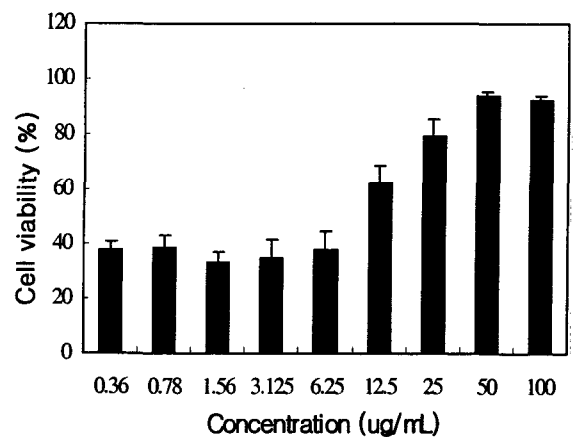


Fig. 5. Protecting effects of rengyolone against the etoposide (10 µg/mL) induced cytotoxicity in U937 human leukemia cells

Rengyolone의 생물활성

Rengyolone은 U937 세포에서 etoposide에 의한(10 µM, 7 h) caspase-3의 유도를 농도 의존적으로 저해하였으며, IC₅₀ 값은 6.25 µg/mL이었다(Fig. 3). IL-1 의존적인 D10S 세포에서 Interleukin-1β에 의한(10 ng/mL, 40 hrs) caspase-1의 유도를 저해하는 활성을 측정된 결과, IC₅₀ 값은 7.50 µg/mL이었다(Fig. 4). Rengyolone의 caspase-3 유도저해활성이 etoposide에 의한 세포사멸(apoptosis)에 미치는 영향을 확인하기 위해, etoposide(10 µg/mL, 24 h)에 의해 유도된 apoptosis 조건에서 U937 세포의 cell viability를 MTS assay로 측정하였다(Fig. 5). Rengyolone은 etoposide에 의해 24시간동안 유도된 U937 human leukemia cell의 apoptosis를 농도 의존적으로 저해하여 세포의 사멸을 저해하는 것으로 확인되었다. 또한 동일한 조건에서 etoposide에 의한 자극 없이 rengyolone의 세포 독성을 측정하여 본 결과 100 µg/mL 이상의 IC₅₀ 값을 나타내어 비교적 낮은 세포독성을 나타내었다(Fig. 6).

Caspase-1과 caspase-3는 apoptosis 과정을 수행하는데 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져있으며, Mingwei 등⁽²³⁾은 transgenic mSOD1^{G93A} mice neuron에서 caspase-1과 caspase-3의 발현정도를 조사한 결과, apoptosis pathway에서 ALS(amyotrophic lateral sclerosis)의 초기에 caspase-1이 관여

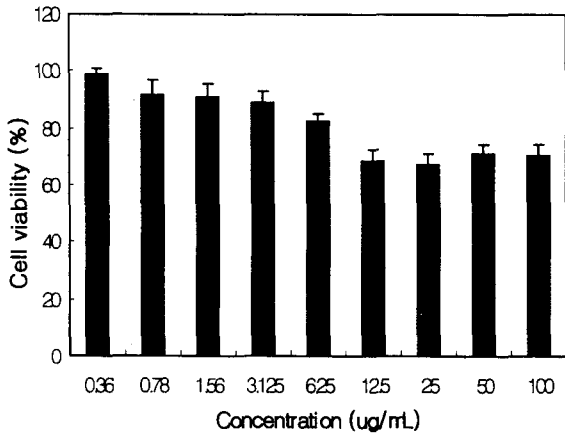


Fig. 6. Cytotoxic effects of rengyolone in U937 human leukemia cell after 24 h measured by MTS assay

되며 caspase-3는 말기에 관여한다고 보고하였으며, Tewari 등⁽²⁴⁾은 *in vitro*에서 caspase-1은 caspase-3를 activate한다고 보고하는 등 apoptosis 조절활성은 caspase-1과 caspase-3에 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다. 이러한 결과를 바탕으로 rengyolone의 caspase 유도저해활성은 신경관련질환 등을 조절할것으로 추정된다.

이번 실험에 의해 분리된 rengyolone은 연교에서 이전에 분리보고된 물질이나, rengyolone의 caspase 유도저해활성을 나타내는 성분으로는 본 실험에 의해 처음 밝혀졌으며, 그 작용기작에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연교의 메탄올 추출물로부터 caspase 저해물질을 분리하였으며, ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 등의 기기분석 자료에 의하여 rengyolone으로 동정하였다. 이 물질은 IC₅₀ 6.25 µg/mL의 농도에서 etoposide가 처리된 U937 세포주의 caspase-3 유도 저해를 나타내었다. 또한 rengyolone은 Interleukin-1β가 처리된 D10S 세포에서 caspase-1의 유도저해활성을 나타내었으며, IC₅₀값은 7.5 µg/mL이었다.

문 헌

- Cohen, G. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16 (1997)
- Barinaga M. Death by Dozens of cuts. *Science* 280: 32-34 (1998)
- Thornberry N. Caspases: Key mediators of apoptosis. *Chem. & Biol.* 5(5): 97-103 (1998)
- Friedlander R., Brown R. and Gagliardini V., Wang J., Yuan J. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* 388: 31 (1997)
- Salvatore, M., Hensens, O., Zink, D., Liesch, J., Dufresne, C., Ondeyka, J., Jurgens, T., Borris, R., Raghoobar, S., McCauley, E., Kong, L., Gartner, S., Koch, S., Pelaez, F., Diez, M., Cascales, C., Martin, I., Polishookv, J., Balick, M., Beck, H., King, S., Hsu, A. and Lingham, R.: L-741, 494, a fungal metabolite that is an inhibitor of interleukin-1β converting enzyme. *J. Nat. Prod.* 57(6): 755-760 (1994)
- Yamashita, N., Shin-Ya, K., Furihata, K., Hayakawa, Y. and Seto,

- H. New ravidomycin analogues, FE35A and FE35B, apoptosis inducers produced by *Streptomyces rochei*. *J. Antibiotics* 51(12): 1105-1108 (1998)
- Yamashita, N., Harada, T., Shin-Ya, K. and Seto, H. 6-Hydroxy-tetraganol, a new CPP32 protease inducer produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiotics* 51(1): 79-81 (1997)
- Kim, J. W., Adachi, H., Shin-Ya, K., Hayakawa, T., Seto, H. Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardia* sp. *J. Antibiotics* 50(7): 628-630 (1997)
- Takeya, H., Zhang, H., Kobinata, K., Onose, R., Onozawa, C., Kudo, T., Osada, H. Cytotrienin A, a novel apoptosis inducer in human leukemia HL-60 Cells. *J. Antibiotics* 50(4): 370-372 (1997)
- Mastrangelo, A. and Betenbaugh, M. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Trends Biotechnol.* 16: 88-95 (1998)
- Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1462 (1995)
- Lee, E., Miura, M., Yoshinari, M., Iwai, H. and Kariya, K. Selective inhibition of dexamethasone-induced apoptosis in rat thymocytes by herbimycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202(1): 128-134 (1994)
- Ji, L., Zhang, G. and Hirabayashi, Y. Inhibition of tumor necrosis factor α and ceramide-induced internucleosomal DNA Fragmentation by herbimycin A in U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(2): 640-647 (1995)
- Shimura, M., Ishizaka, Y., Yuo, A., Hatake, K., Oshima, M., Sasaki, T., Takaku, F. Characterization of room temperature induced apoptosis in HL-60. *FEBS Letters* 417: 379-384 (1997)
- Kim, T.J. Korean resources plants. Seoul National University Pub. Co., p. 262 (1991)
- Lee, E.B. and Keum, H.J. Pharmacological studies on *Forsythae Fructus*. *Kor. J. Pharmacogn.* 19(4): 262-269 (1988)
- Takeshi, H., Yuka, K., Kazuhiro, O., Ryoji, K., Kazuo, Y. and Chayan, P. Cyclohexylethanoids and related glucosides from *Millingtonia Hortensis*. 39(1): 235-241 (1995)
- Kitagawa, S., Nishibe, S. and Baba, H. Studies on the chinese crude drug *Forsythiae fructus* on isolation of phenylpropanoid glycosides from fruits of *Forsythia koreana* and their antibacterial activity. *Yakugaku Zasshi* 107(4):274-278 (1987)
- Ozaki, Y., Rui, J. and Yuan, T. T. Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa* VAHL and its active principle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 23(3): 365-367 (2000)
- Gurtu, V., Kain, S.R. and Zhang, G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem.* 251: 98-102 (1997)
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S. and Marshall, N.J. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J. Immunol. Methods* 179: 95-103 (1995)
- Endo, K., Seya, K. and Hikino, H. Biogenesis-like transformation of solidroside to rengyol and its related cyclohexyletanoids of *Forsythia Suspensa*. *Tetrahedron* 45(12): 3673-3682 (1989)
- Li, M., One, V.O., Guegan, C., Chen, M., Lewis, V.J., Andrew, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S., Frzedborski, S. and Friedlander, R.M. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288(14): 335-339 (2000)
- Tewari, M., Quan, K.O., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beider, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. Yama, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitible protease that cleaves the death substrate Poly(ADP-Ribose) polymerase. *Cell* 81(2): 801-809 (1995)