

Farnesol의 HL-60 세포에 대한 세포독성과 활성산소 및 항산화효소 활성 변화

임소윤 · 박사원[#]

상명대학교 자연과학대학 화학과

(Received November 6, 2006; Revised December 15, 2006)

Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzyme Activities in Accordance with the Cytotoxicity of Farnesol Against HL-60 Cells

So Yoon Lim and Sie Won Park[#]

Department of Chemistry, College of Natural Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

Abstract — Farnesol in fruits, vegetables, herbs and leaves acts as bioactive component related with prevention of cancer and psychological malaise. We investigated the cytotoxic effects of farnesol on human leukemic cell, HL-60 cells, by MTT assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide. Farnesol (0.1~50 µg/ml) exhibited cytotoxicities against HL-60 cells in concentration and culture period dependent manner. In the cytotoxic condition induced by farnesol against HL-60 cells, the generation of reactive oxygen species such as O_2^- and H_2O_2 were found to be considerably increased. The most prominent augmentations of O_2^- and H_2O_2 were over five folds of controls. In an attempt to explore the response of HL-60 cells to the increased O_2^- and H_2O_2 , superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase activities of HL-60 cells treated with farnesol were measured. SOD and GPx activities were found to be remarkably elevated by addition of farnesol showing the best results of 273% and 167% of controls, respectively. All data suggest that farnesol may have played as an apoptosis inducer in HL-60 cells via production of reactive oxygen species (ROS) and HL-60 cells may have failed to overcome the damage of ROS on account of still deficient ROS scavengers including SOD and GPx.

Keywords □ farnesol, cytotoxicities, HL-60 cells, ROS, antioxidant enzymes

Terpene계 화합물은 isoprene(C_5)의 중합유도체로 식물에서는 주로 탄소수가 적은 monoterpenes(C_{10})이나 sesquiterpenes(C_{15})으로 존재하며, 수목, 꽃, 야채, 과일 등의 향기와 풍미성분으로 알려져 있다. 이들은 공기 중의 nonmethane 탄화수소(NMHC)의 원료로서 대기 중의 다양한 반응¹에 참여하며, ozone 발생 및 토양의 질소와 탄소의 순환² 등 지구 환경과 관련하여 중요한 역할을 담당하고 있으며, 산업적으로도 그 좋은 향기와 향균성으로 인해 향수, 화장품, 의약품 등으로 널리 사용되어 왔다.³ 더욱이 이들이 식물과 인간을 포함한 동물체내에서 산소독성이나 지질과산화반응의 억제^{4,5} 등 개체방어에도 필수적으로 작용하고 있음으로 보아, 생명체내에서 긴요한 생리 화학에 관

여하고 있음이 시사되고 있다.

Farnesol은 sesquiterpenes 계열의 isoprenyl alcohol로서 꽃과 과일 등의 정유 성분으로, 동물에서는 mevalonate/cholesterol 생합성 경로의 유도체로 존재한다. Farnesol은 항균작용,^{6,7} 후각신경 작용⁸ 그리고 항암작용 등 다양한 작용이 보고 되고 있으며, 항암작용으로는 암세포 증식억제,^{9,10} 암세포사멸 유도^{11,12} 그리고 암세포 증식과 발육억제¹³ 등이 있다. 이러한 다양한 farnesol의 항암작용의 작용기작으로는 nuclear hormone receptor인 farnesoid X receptor(FXR)의 활성화,¹⁴ peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPAR α) 및 - γ (PPAR γ) 활성화¹⁵ 그리고 thyroid hormone receptor(THR) β 1 mRNA expression 유도 등 gene transcription 조절과 관련 있는 것으로 보고 되고 있다.¹⁶ 이외에도 post translation modification의 한가지로 단백질에 farnesol이나 geranylgeranyl을 부가하는 prenylation반응은 signal transduction, cytoskeletal regulation, cell proliferation

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5147 (팩스) 02-2287-0070
(E-mail) parksw@smu.ac.kr

그리고 apoptosis에 매우 중요하며 이 과정의 조절 유전자는 ras oncogene으로 알려져 있다. 그런데 ras oncogene에 이상이 생기면 protein prenylation이 장애를 받고 당연히 이러한 ras 단백질 특히 K-ras 단백질의 이상이 약 30%의 인간 암에서 밝혀진 것으로 보아 farnesol은 암의 생리학과 직결되어 있음을 알 수 있다.¹⁷⁾ 그런가 하면 farnesyl-O-acetyl hydroquinone은 cholesterol 합성경로의 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA(HMG-CoA) reductase의 활성을 억제함으로써 대장암세포증식을 억제하는 것이 밝혀졌다.¹⁸⁾

한편 암의 발생원인중 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 의한 oxidative stress가 주요 원인으로 알려져 왔으며, 암세포 사멸에도 활성산소가 밀접하게 관계되는 것이 보고 되어 왔다.¹⁹⁾ 활성산소란 원자태도나 분자태도에 한 개나 또는 그 이상의 unpaired electron을 가진 화합물로서 반응성이 매우 높은 것이 특징이다. ROS의 종류로는 hydrogen peroxide(H₂O₂), superoxide radical(O₂⁻), hydroxyl radical(OH) 그리고 singlet oxygen(¹O₂) 등이 있으며 이들은 강한 반응성 때문에 갖가지 유해 작용을 유발하여 oxidative stress를 일으킨다. 이 ROS는 인체에 이롭기도 하고 해롭기도 하는 양면성을 지닌 물질로 알려져 있다. 인체 내의 해로운 작용으로는 oxidative stress를 일으켜 세포내 signal cascade에 있어서 secondary messengers로 작용하여 암세포를 유발하는 가하면, 위궤양, Alzheimer, 관절염, 뇌졸중등의 직접적인 원인이 되기도 하며,²⁰⁻²³⁾ 이로인한 작용으로는 감염된 세균이나 neoplastic 세포를 neutrophils이나 phagocytes 같은 면역계 세포가 박멸할 때 ROS인 O₂를 신속하게 다량 발생시켜 사멸시키는 도구로 사용하는 경우가 있다.^{24,25)} 한편 인체 내에서는 해로운 내인성 ROS가 자연스럽게 생성되는데, 예를 들어 peroxisome에서 long chain fatty acids가 산화되면서 H₂O₂가 부산물로 생성되며, lipooxygenase가 arachidonic acid를 전환하는 중에도 생성되고, 또 다른 주요 경로인 mitochondria의 respiratory chain에서 지속적으로 일어나는데 보통 mitochondria의 electron transport chain을 지나는 전자중의 약 1~2% 정도가 흘러나와 분자산소(O₂)와 쉽게 결합하여 O₂를 형성한다고 한다.^{26,27)} 외인성 ROS는 자동차 배기가스와 같은 환경오염물질, 담배연기, 이온 복사과, iron salts, 자외선, 자연식품의 phenol성 화합물 등에서 각각 생성되므로 ROS는 우리 주변의 다양한 source로부터 생성되는 것을 알 수 있다.²⁸⁾ 한편 흥미 있는 것은 발암의 주원인인 ROS가 많은 항암제의 작용기작으로도 작용한다는 점이다. 예를 들어 cisplatin, doxorubicin, vincristine, cytosine arabinoside, methotrex, bleomycin 등의 항암제는 암세포의 apoptosis를 유발하는 활성산소를 생성시켜 암세포가 사멸하게끔 유도하는 것으로 보고 되고 있다.²⁹⁻³²⁾

현재 사용되고 있는 항암제는 그 부작용이 심하여 환자의 삶의 질이 떨어지고 완치율도 평균 50% 정도에 불과하며 말기 암

환자의 완치율은 5% 이내로 떨어지는 것으로 알려져 있다. 따라서 각국은 가능하면 무독성이거나 독성이 매우 약하면서도 항암 작용이 우수한 항암제 개발에 심혈을 기울이고 있으나 아직까지도 이상적인 항암제개발은 이루어지지 않고 있다. 본 연구는 식물의 정유성분이며 sesquiterpene계 화합물인 farnesol의 항암효과를 인간 백혈병 암세포인 HL-60 세포를 대상으로 세포독성 효과를 검색하고, 이 세포독성 효과의 작용기작을 규명하고자 farnesol에 의해 유도된 활성산소 생성량의 변화와 활성산소 소거효소의 활성변화를 측정함으로써 farnesol의 항암효과와 작용기작을 활성산소와 연계하여 규명하고자 시행되었다.

실험 방법

시약 및 기기

RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), streptomycin mixture는 GIBCO BRL(Grand Island, New York USA)에서 구입하여 사용하였다. trans, trans-farnesol, ferricytochrome c, xanthine, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione(reduced), glutathione reductase, phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), *t*-butylhydroperoxide, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(reduced), glutathione peroxidase, glutathione reductase, lipopolysaccharide(LPS)(*E. coli*, 055:B5)는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였고 5-FU(CAS No. 51-21-8)은 Wako Pure Chemicals Industries Ltd.(Osaka, Japan)의 제품을 구입하여 사용하였다. 단백질 정량시약은 Bio-Rad kit(Hercules, CA, USA)를 사용하였고 그리고 기타 시약은 analytical grade 제품을 구입하여 사용하였다. 20 ml와 50 ml의 culture flask와 24 well plate는 Falcon Co.(Dickenson Co. France), CO₂ incubator(New Brunswick Scientific Inc.), UV/Visible spectrophotometer는 Varian Carry 3(Varian, PTY LTD, Australia), ELISA microplate reader(ELX800, BIO-TEK instruments)등을 사용하였다.

HL-60 세포 배양

한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 배양액은 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)을 함유한 RPMI 1640 배지에 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂, humidified incubator에서 배양하였으며 계대배양은 약 70%의 confluence가 되는 2~3일 마다 시행하였다. Farnesol은 실험 직전에 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시켜 사용하였으며 대조군(control)과 시료군(sample)의 DMSO의 최종농도는 0.05% 이었다. 항산화효소 활성을 측정하기 위한 효소액 조제를 위한 HL-60 세포의 대량 배양은 20 ml 또는 50 ml의 culture flask를

사용하여 시행하였다.

MTT 법에 의한 세포독성 측정

Farnesol에 의한 HL-60 세포독성은 MTT 법³³⁾으로 측정하였다. HL-60 세포는 24 well plate에 1×10^5 cells/ml로 접종하고, 다양한 농도의 farnesol(0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)을 처리하여 12, 24, 48시간 동안 배양하였으며, control에는 vehicle로써 DMSO를 동량 첨가하였다. 배양 후 새 배지로 바꿔주고 10 μl 의 MTT(5 mg/ml)를 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 800 rpm에서 10 분간 원심분리 하여 상등 액은 버리고 200 μl 의 DMSO를 가하여 생성된 formazan을 용해시킨 후, 570 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 계산법: % cytotoxicity=(A570 of control cells-A570 of treated cells)/A570 of control cells \times 100%.

HL-60 세포의 O₂ 이온 정량

HL-60 세포에 farnesol을 첨가하여 배양 후 생성된 O₂ 이온의 정량은 Markert³⁴⁾ 법에 의한 ferricytochrome c의 환원반응을 활용하였다. 요약하면, HL-60 세포는 farnesol을 농도별(0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 단시간 인 10, 30 그리고 60 분간 배양한 다음 세포들을 800 rpm으로 10분간 원심 분리한다. 상등 액은 버리고, 세포는 HBSS(Hank's balanced salt solution) buffer로 부유시켜 24 well plates에 1×10^6 cells/ml로 접종한 다음 PMA(20 μM)를 5 μl 첨가하고 90초 후에 cytochrome c 용액의 최종농도가 150 μM 이 되도록 가한다. 이 반응 액을 37°C에서 1시간 동안 incubation한 다음 1,000 rpm에서 원심 분리하여 상등 액을 취하여 550 nm에서 흡광도를 10초 간격으로 5분간 측정하여, O₂ 생성량을 $O_2(\text{nmol/ml})=47.7 \times A_{550 \text{ nm}}$ 식으로부터 계산하였다. Farnesol을 장시간(12 hr) 처리하는 경우에 생성되는 O₂ 생성량은 단시간의 경우와 동일한 방법으로 시행하였다.

HL-60 세포의 H₂O₂ 정량

Farnesol에 의해 HL-60 세포에서 생성되는 H₂O₂는 Paglia and Valentine³⁵⁾ 방법을 변형하여 측정하였다. HL-60 세포는 farnesol을 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하고, 단시간인 10, 30 그리고 60분간 배양한 다음 세포들을 800 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 상등 액은 제거한다. 세포는 HBSS buffer로 부유시켜, 1×10^6 cells/ml로 세포수를 조정하고, cuvette에 1.0 ml의 세포와 표준 시약(20 mM GSH, 1.25 mM NADPH, 1.0 U/ml GSH·Px and 2.0 U/ml GSSG reductase 함유)을 2.0 ml 가하여 반응을 개시한다. Spectrophotometer는 0.2~0.6 O.D.(340 nm)가 되도록 조절하고 흡광도는 full scale mode로 400초간 37°C에서 monitoring 한다. 이와 같이 12시간 처리 실험의 경우에도 동일한 방법으로 시행하였다. 생성된 H₂O₂양은 NADPH의 산화에

의한 340 nm에서의 흡광도 감소를 monitoring 하는 동안 얻어진 직선의 기울기로부터 계산하여 $\mu\text{mol NADPH oxidized/min/mg protein}$ 으로 표시하였다.

SOD, GPx, catalase 효소액 조제

HL-60 세포는 farnesol을 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 12시간 배양한 다음 800 rpm으로 10분간 원심 분리하여 세포를 포집한다. 세포는 HBSS로 세 차례 세척하고 1 ml의 등장액 Tris·HCl buffer에 부유시켜 freezing, thawing을 반복하여 lysate를 만든다. 이 lysate를 4°C에서 8,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 핵과 조직 잔류물을 제거하고 상등액을 취하여 superoxide dismutase(total SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase 활성을 각각 측정하였다.

SOD 활성 측정

SOD활성은 xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성된 O₂에 의한 cytochrome c의 환원 반응을 SOD가 억제하는 정도를 측정하는 것으로, McCord and Fridovich³⁶⁾와 Floeh 방법³⁷⁾을 이용하였다. 반응 액(0.02 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 50 μM xanthine, 10 μM cytochrome c)에 조제된 효소액을 첨가하여 25°C에서 15분간 방치한 다음 xanthine oxidase (XOD)를 첨가하여 반응을 개시하였으며 550 nm에서 10초 단위로 5분간 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응 액의 흡광도 흡수가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하여 첨가하였다. SOD 활성의 표시는 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 측정하여 units/mg protein으로 나타내었다.

Glutathione Peroxidase(GPx) 활성 측정

GPx의 활성측정은 Gunzler *et al.*³⁸⁾의 방법을 적용하였다. 배양된 세포로부터 조제된 25 μl 의 효소 시료를 900 μl Tris/EDTA (50 mM Tris, pH 7.6, 1 mM EDTA, 4 mM sodium azide)에 가한 다음 20 μl glutathione(0.15 M), 20 μl glutathione reductase (208 units/ml), 20 μl NADPH(8.4 mM) 그리고 20 μl *t*-butylhydroperoxide(30 μM)를 가하여 총량 1 ml로 하여 340 nm에서 흡광도감소를 1분간 측정하였다. 효소활성은 $\mu\text{moles NADPH oxidized/min/mg protein}$ 으로 정의하였다.

Catalase 활성 측정

Catalase 활성 측정은 Claiborne³⁹⁾의 방법에 준하였다. 반응액은 1.95 ml phosphate buffer, 1 ml H₂O₂(0.09 mol/l) 그리고 효소액이 함유된 총량 3 ml로 이루어져 있다. 240 nm에서의 흡광도 변화를 10초단위로 측정하였으며, catalase 활성은 nmoles H₂O₂ consumed/min/mg protein로 표시하였다.

통계처리

실험 결과는 3회~4회 실험횟수에 대한 평균과 평균오차 값을 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 으로 표시하였다. 유의성 검증은 Student *t*-test를 시행하여 control 값에 대하여 * $p < 0.05$ 와 ** $p < 0.01$ 로 표시하였다.

실험결과 및 고찰

HL-60 세포에 대한 farnesol의 세포독성

HL-60 세포에 farnesol을 0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 12, 24, 48시간 배양 후, 살아있는 세포 변화를 MTT 법으로 측정하였다. Table I에 제시한바와 같이 각 농도조건에서의 세포는 farnesol의 농도에 따라 대부분 농도와 배양기간 의존적인 감소 경향을 나타내었다. 12시간과 24시간에 나타난 세포독성은 저 농도인 0.1~1.0 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 0.7~6.3% 정도로 미약했으나, 농도가 높아짐에 따라 61.7%까지 나타났다. 배양시간이 48시간인 경우에는 모든 농도에서 24시간보다 더 높은 세포독성을 나타내었으며, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 에서 38.5%로 나타난 것으로 보아 farnesol의 HL-60 암세포에 대한 세포독성은 현저한 것으로 판단되었다. IC_{50} 값은 48시간 기준으로 7.81 $\mu\text{g/ml}$ 로서 positive control로 사용한 5-FU($\text{IC}_{50} = 0.72 \mu\text{g/ml}$)와 비교하여 세포독성효과가 낮으나, 정상임파구에 대한 독성 실험결과 거의 세포독성을 보이지 않았다(결과 제시하지 않음). 이 결과로부터 HL-60 암세포에 대한 farnesol의 세포독성 효과는 이미 보고된 monoterpenes과

sesquiterpenes 화합물의 세포독성 효과⁹⁻¹³)와도 일치하며 farnesol이 인체 내에서 상당히 안전하게 암세포제거 역할을 할 수 있는 가능성을 시사한 것으로 볼 수 있다.

Farnesol에 의한 HL-60 세포의 O_2 생성

항암제의 작용기작중에 항암제가 암 세포내에 활성산소를 유발하며 apoptosis²⁹⁻³²)를 일으켜 의해 암세포가 사멸하는 경우가 다양하게 보고 되고 있다. 이에 본 실험에서도 farnesol에 의해 야기된 HL-60 세포의 세포독성의 작용기작을 활성산소와 연계하여 규명해보고자 일차적으로 다음 실험을 시행하였다. HL-60 세포는 farnesol을 농도별(0, 1.0, 5.0, 50.0 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하고, 단 시간(10, 30, 60분) 및 12시간 동안 생성되는 O_2 의 양을 측정하였다. O_2 은 분자산소(O_2)로부터 생성되는 일련의 활성산소 전환 반응의 첫 번째 분자^{24,25})로서 활성산소 연구의 핵심 분자라 할 수 있다. Table II에는 단시간 처리하여 얻어진 결과를 제시하였으며 Fig. 1에 12시간 장기간 처리하여 얻어진 결과를 제시하였다.

Table II의 결과에 따르면 farnesol은 1분~60분 처리 시 농도 증가에 따른 O_2 생성량은 control과 비교하여 미약한 수준에서의 증가양상을 보이고 있으나, 12시간 처리 시 farnesol의 농도에 따라 현저한 O_2 생성 증가가 나타났다(Fig. 1). 특히 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 control 값의 5배 이상의 O_2 가 생성 되었으며, 처리된 farnesol의 농도가 증가할수록 생성량 또한 증가하는 것으로 측정되었다(Fig. 1). 참고로 본 실험에서는 O_2 의 생성을 야기한

Table I - Cytotoxicities induced in HL-60 cells incubated with indicated farnesol concentrations

Incubation time (hr)	Farnesol ($\mu\text{g/ml}$)					
	0.1	1.0	10.0	50.0	100.0	5-FU
	Cytotoxicity (%)					
12	1.5 \pm 1.6	8.5 \pm 3.1	14.9 \pm 8.7	21.5 \pm 7.6	29.5 \pm 5.8*	21.8 \pm 6.9
24	7.2 \pm 2.5	31.6 \pm 6.4	45.4 \pm 9.7	49.5 \pm 5.6*	61.7 \pm 9.3*	64.5 \pm 5.7*
48	11.5 \pm 3.6	38.5 \pm 7.3*	58.3 \pm 7.4	68.4 \pm 9.5	91.3 \pm 5.2**	88.6 \pm 9.7*
72	19.6 \pm 6.4	37.9 \pm 6.4*	77.5 \pm 9.7*	87.6 \pm 8.7*	97.6 \pm 4.2**	95.7 \pm 7.5**

Data shown are cytotoxicities \pm S.E.M. of four independent experiments. 5-FU (1 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control. Cells remaining after farnesol exposure were determined using the MTT assay. % cytotoxicity=(A570 of control cells-A570 of treated cells)/A570 of control cells \times 100%. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ represent significant differences compared with control values.

Table II - Effect of farnesol on the generation of O_2 by PMA stimulated HL-60 cells

Incubation time (min)	Farnesol ($\mu\text{g/ml}$)					
	0.0	0.1	1.0	10.0	50.0	LPS
	O_2 (nmol/ml)					
10	5.4 \pm 0.8	5.6 \pm 0.9	6.7 \pm 0.2**	6.3 \pm 0.7*	5.8 \pm 1.2	8.3 \pm 1.6
30	6.6 \pm 1.4	7.1 \pm 2.3	5.7 \pm 0.3*	4.6 \pm 1.8	6.2 \pm 1.6	11.9 \pm 0.4**
60	6.7 \pm 2.4	7.1 \pm 2.3	5.9 \pm 3.1	5.3 \pm 0.6**	6.7 \pm 1.2	14.8 \pm 1.7*

Cells were incubated with indicated concentrations of farnesol for 10, 30 and 60 min. Harvested cells were suspended at a density of 1×10^6 cells/ml and then incubated for 15 min. LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control. Ninety seconds after stimulation with 5 μl of PMA solution (20 μM), 50 μl of cytochrome c solution (1.0 mM) was added. After 1 hr incubation, the supernatants thus obtained was used for measuring O_2 by absorbancy at 550 nm. O_2 produced was expressed as nmol/min/mg protein. Results are mean \pm S.E.M. of four independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from non treated cells.

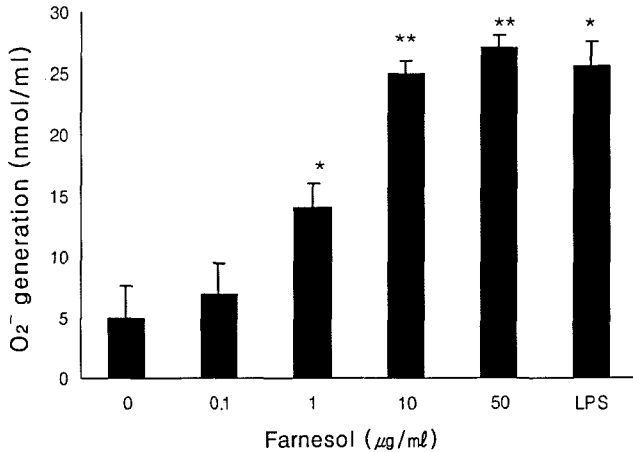


Fig. 1 – Effect of farnesol on the generation of O₂⁻ in HL-60 cells. After cells were incubated with indicated concentrations of farnesol for 12 hr, harvested cells were suspended at a density of 1×10⁶ cells/ml and incubated for 1 hr at 37°C after 90 sec of PMA (1 µM) stimulation. The background absorbancy of O₂⁻ released from non stimulated cells were subtracted from all data. Values are the mean±S.E.M. of four determinations. *p<0.05 and **p<0.01, significantly different from non treated culture cells.

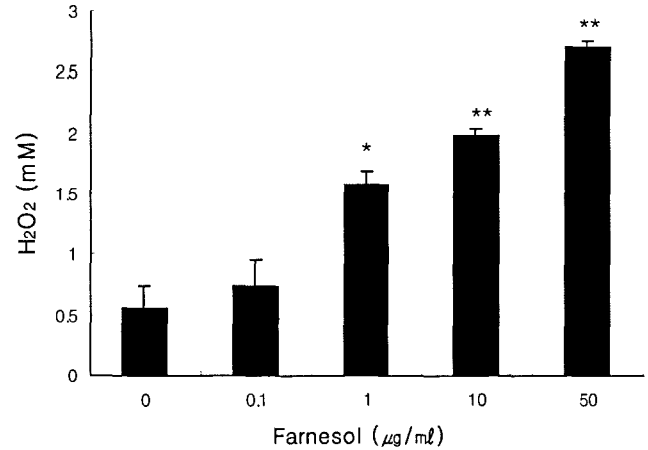


Fig. 2 – Effect of farnesol on the generation of H₂O₂ in HL-60 cells. Cells were incubated with indicated concentrations of farnesol for 12 hrs. Harvested cells(1ml) were suspended at a density of 1×10⁶ cells/ml and reagent (2 ml) containing 20 mM GSH, 1.25 mM NADPH, 1.0 U/ml GPx and 2.0 U/ml GSSG reductase was added to the cell suspension. H₂O₂ produced was determined by the decrease of absorbancy at 340 nm and expressed as µmol NADPH oxidized/min/mg protein. Values are the mean±S.E.M. of four determinations. *p<0.05 and **p<0.01, significantly different from non treated cells.

다고 알려진 PMA를 가하여 O₂⁻ 생성량을 측정하였으나, 부수적으로 PMA를 가하지 않은 대조 실험을 수차례 반복 시행한 결과 PMA 첨가를 하지 않아도 O₂⁻ 생성량은 크게 달라지지 않았다.(결과 제시하지 않음) Table I에서 보였던 farnesol에 의한 HL-60 세포의 생존율 감소 현상은 세포내 O₂⁻ 생성의 증가에 기인할 수도 있을 것으로 추정된다.

Farnesol에 의한 HL-60의 H₂O₂ 생성

O₂⁻는 반감기가 10⁶초 정도로 매우 짧아서 곧 다음 반응으로 진행하여 H₂O₂를 생성하게 되리라고 간주된다. 따라서 farnesol에 의해 O₂⁻ 다음으로 생성될 것으로 판단되는 H₂O₂의 생성량 변화를 측정하였다. Farnesol 처리 후 생성된 H₂O₂량은 O₂⁻ 생성량 측정과 동일한 조건하에서 실험하였는데 이는 생성된 O₂⁻이 단시간에 H₂O₂로 전환되리라 생각하였지만 축적되지 않았을 가능성도 있으므로 분 단위의 단시간 검색을 하여보았고, 아울러 O₂⁻에서와 같이 시간 단위의 장시간에서 비로소 H₂O₂가 축적될 수도 있기 때문에 두 가지 조건에서 모두 검색하였다. 우선 farnesol을 단시간 처리 후 생성된 H₂O₂량은 Table II에 제시되었듯이 control 값에 비하여 큰 변화는 없었다. 물론 farnesol의 농도가 증가할수록 또는 반응시간에 따라 H₂O₂의 생성량이 증가하는 양상을 보였으나 그 정도는 10~20% 정도의 증가에 불과하였다. 12시간의 장기 처리 실험에서는 farnesol 농도 증가에 비례하여 H₂O₂의 생성량도 크게 증가하였으며, 50 µg/ml 고농도를 처리한 경우에는 control과 비교하여 5배의 큰 증가를 나타내었다(Fig.

2). 이 Fig. 2의 결과는 O₂⁻ 생성량 실험인 Fig. 1의 결과와 매우 유사한 것으로 farnesol을 HL-60 세포에 가하면 활성산소인 O₂⁻와 H₂O₂가 모두 증가한다는 사실을 시사 하는 것이며, 아울러 H₂O₂ 증가가 생각보다 시간단위의 장시간에서 나타나는 현상에는 아마도 이들 분자의 세포내 소기관이나 세포막의 통과과정이나 또 다른 원인이 관계될 가능성도 제시된다. 여하튼 본 실험 결과는 farnesol의 처리로 인하여 야기되는 HL-60 세포의 세포독성의 원인이 활성산소가 apoptosis의 촉발인자^{41,42)} 라는 기존의 결과들을 근간으로 O₂⁻와 H₂O₂에 의했을 가능성이 큰 것으로 간주되었다. 이 사실은 doxorubicine을 위시한 다수의 항암제의 작용 기작이 활성 산소 유발 및 그에 따른 apoptosis 촉발에 의해 암세포가 사멸한다는 보고²⁹⁻³²⁾들과도 일치하는 결과이다.

Farnesol에 의한 HL-60 세포내 SOD 효소활성 변화

Farnesol 처리 후 생성되는 유독한 활성산소(O₂⁻, H₂O₂)에 대해 HL-60 세포의 대응 방법이 당연히 관심 사항이 된다. 첫째로 farnesol을 HL-60 세포에 처리하였을 때 O₂⁻의 양이 크게 증가하였으므로, O₂⁻를 전환시키는 효소인 superoxide dismutase(SOD) 활성을 측정하여 보았다. SOD는 활성산소 전환반응의 첫 번째 단계에서 O₂⁻를 H₂O₂로 전환시키는 효소로서 포유동물의 경우 세포질에는 CuZnSOD, 미토콘드리아에는 MnSOD가 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 farnesol의 세포독성이 재현성

Table III - Effect of farnesol on the generation of H₂O₂ in HL-60 cells

Incubation time (min)	Farnesol ($\mu\text{g/ml}$)				
	0.0	0.1	1.0	10.0	50.0
	H ₂ O ₂ (nmol/ml)				
10	0.6±0.1	0.7±0.5	0.6±0.4	0.7±0.5	0.8±0.2
30	0.7±0.8	0.8±0.3	0.7±0.4	0.5±0.3	0.6±0.7
60	0.5±0.6	0.6±0.7	0.8±0.3	0.9±0.2	0.8±0.5

Cells were incubated with indicated concentrations of farnesol for 10, 30 and 60 min. Harvested cells (1 ml) were suspended at a density of 1×10^6 cells/ml and 2 ml of reagents containing 20 mM GSH, 1.25 mM NADPH, 1.0 U/ml GPx and 2.0 U/ml GSSG reductase was added to the cell suspension. H₂O₂ produced was determined by the decrease of absorbance at 340 nm and expressed as μmol NADPH oxidized/min/mg protein.

있게 나타나는 조건으로 farnesol을 농도별로 HL-60 세포에 처리하여 24시간 배양한 다음 야기되는 total SOD 활성을 측정하였다. Farnesol에 의한 HL-60 세포의 세포독성이 증가하는 경향과 유사하게 SOD 활성이 증가하였으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 control과 비교하여 약 273% 정도의 활성증가를 보이고 있다. (Fig. 3). 따라서 farnesol을 첨가할 때 증가한 유해 활성산소인 O₂는 HL-60 암세포 자신에게도 해롭기 때문에 이 O₂를 제거하기 위해 HL-60 세포의 SOD 활성이 증가 하는 것으로 판단된다. 한편 이 O₂가 SOD에 의해 모두 또는 충분히 제거되지 않는다면 O₂는 이미 보고 된 바와 같이 caspase 활성화^{41,42}를 통하여 HL-60 세포의 apoptosis를 촉발시킬 것이며 그에 따라 HL-60 세포는 독성을 입고 사멸할 것으로, O₂ 생성량과 이를 제거하는 SOD 활성 값의 상관관계가 중요할 것으로 생각된다.

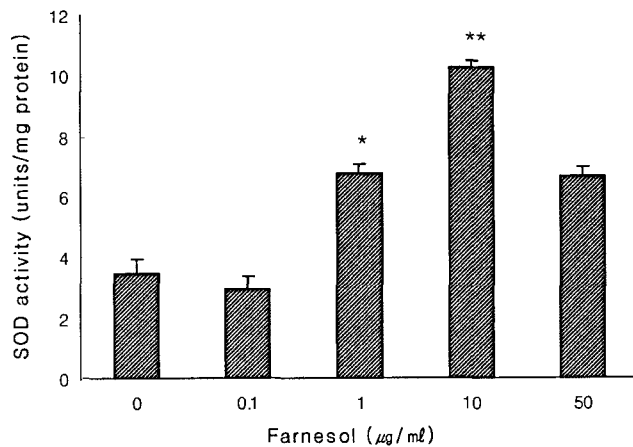


Fig. 3 - Effect of farnesol on the SOD activities of HL-60 cells. The reaction mixture (1.1 ml) contained 0.02 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 50 μM xanthine, 10 μM cytochrome *c* and enzyme solution. The reaction was initiated by adding xanthine oxidase and the rate of cytochrome *c* reduction was monitored at 550 nm spectrophotometrically. The enzyme activity was expressed as units/mg protein according to the definition of 1 unit as the amount of SOD necessary for inhibiting cytochrome *c* reduction by 50%. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from non treated cells.

Farnesol에 의한 HL-60 세포내 GPx 효소활성 변화

이상의 결과로부터 farnesol이 HL-60 암세포 내에 활성산소인 O₂와 H₂O₂를 증가시켰으며 O₂를 소거하는 SOD 활성도 증가시켰으므로, 다음으로 H₂O₂를 제거하는 효소인 GPx와 catalase의 활성을 각각 측정하였다. GPx와 catalase는 모두 H₂O₂를 소거하는 효소로서 GPx의 반응에서는 전자 주개로 GSH(reduced glutathione)가 사용되고, catalase의 경우에는 H₂O₂ 단독으로 반응에 참여하며 특히 이 효소는 peroxisome에 존재하는 점어 특징이라 할 수 있다.^{43,44} Farnesol에 의해 증가된 SOD 효소는 당연히 종산물인 H₂O₂를 control 보다 더 많이 생성할 것이고 이 H₂O₂는 보고 된 바^{41,42}와 같이 caspase 활성화에 의해 apoptosis를 일으키므로 HL-60 세포에 유독하다 할 수 있으므로 이 암세포는 어떻게든 이 H₂O₂를 제거하기 위해 GPx 또는 catalase 활

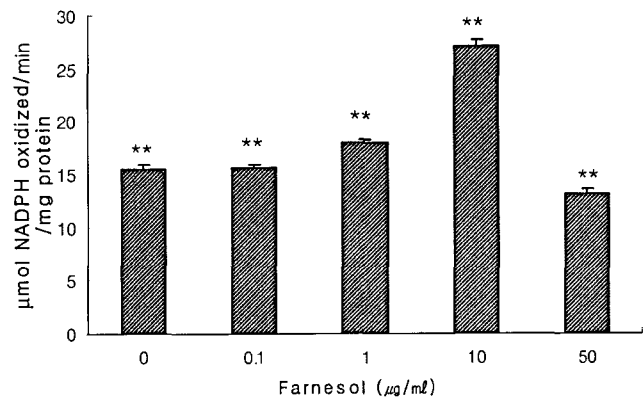


Fig. 4 - Effect of farnesol on the glutathione peroxidase (GPx) activities of HL-60 cells. The reaction mixture (1 ml) contained 0.1 mol/l Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.4 mmol/l EDTA, 1.0 mmol/l NaN₃, 1.0 mmol/l *t*-butylhydroperoxide, 1.0 mmol/l glutathione (GSH), 0.15 mmol/l NADPH, 1 unit of glutathione reductase and 100 μl enzyme extract. *t*-butylhydroperoxide was added to start the reaction. GPx activity was determined by the rate of NADPH oxidation at 340 nm via a spectrophotometer. Enzyme activity was expressed as μmole NADPH oxidized/mg protein/min. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from non treated cells.

성을 증가시킬 가능성이 있다고 판단된다. 따라서 세포독성이 나타나거나 또는 나타나지 않는 조건을 설정하여 GPx와 catalase 효소활성을 측정하였다. 우선 catalase 활성은 control과 동일한 변화 양상을 보이며(결과 제시하지 않음), 이는 아마도 catalase는 peroxisome에 국한 되어 존재하는 효사이므로 farnesol에 의해 생성된 H₂O₂는 catalase가 아닌 세포질의 GPx에 의해서 주로 전환되는 것으로 생각된다. 한편 GPx 활성은 farnesol의 농도에 비례하여 증가하는 양상을 보이며, 10 µg/ml 농도에서 control과 비교하여 약 167%의 GPx 활성 증가를 보이고 있다 (Fig. 4). 위의 결과들을 요약하면 HL-60 세포에 farnesol을 처리하면 활성산소인 O₂와 H₂O₂ 생성량이 증가되며 이들 각각에 대한 소거효소인 SOD, GPx 등도 순차적으로 증가하는 것을 알 수 있었다.

결론

본 연구에서는 sesquiterpene계 화합물인 farnesol의 항암효과를 검색하기 위하여 human leukemic cell인 HL-60 세포를 대상으로 세포독성을 검색한 결과, 농도 의존적으로 세포독성을 나타내었으며 특히 50 µg/ml 농도에서 24시간 또는 48시간 배양했을 때 모두 90% 이상의 높은 세포 수 감소현상을 나타내었다. 한편 farnesol에 의한 HL-60 세포 수 감소 현상의 작용기작을 규명하기 위하여 farnesol에 의해 세포독성을 입은 HL-60 세포의 O₂와 H₂O₂의 생성량을 측정된 결과 모두 control 세포의 것보다 5배 정도의 증가 양상을 보였고, 동시에 이 활성 산소를 분해하는 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GPx) 활성 역시 각각 273%와 167% 정도의 증가 양상을 보였다. 즉 이 결과들을 종합하여 보면 farnesol은 HL-60 세포에 대하여 유독한 활성산소인 O₂와 H₂O₂를 양산하며 이에 대해 HL-60 세포는 이 활성산소들을 제거하기 위해 각각의 소거효소인 SOD와 GPx를 증가시켜서 제거하려 하지만, 그럼에도 불구하고 HL-60 세포의 생존율이 현저하게 감소하는 이유는 SOD나 GPx 효소활성이 O₂와 H₂O₂를 충분히 제거하기에는 부족하여 결국은 이 활성 산소들의 독성에 의해 사멸하는 가능성이 있는 것으로 사료 된다.

감사의 말씀

본 연구는 2006년도 상명대학교 자연과학 연구소의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1) Hyötyläinen, T., Kallio, M., Kronholm, J., Kulmala, M. and

- Riekkolaa, M. L. : Characterization of organic compounds in aerosol particles from a coniferous forest by GC-MS. *Chemosphere*. **64**, 1185 (2006).
- 2) Guenther, A., Karl, T., Harley, P., Wiedinmyer, C., Palmer, P. L. and Geron, C. : Estimates of global terrestrial isoprene emissions using MEGAN (Model of Emissions of Gases and Aerosols from Nature). *Atmospheric Chem. Phys.* **6**, 3181 (2006).
- 3) Robert, A. R., Boris, O., Schlumpberger, R., Kaczorowski, L. and Timothy, P. H. : Phylogenetic fragrance patterns in nicotiana sections alatae and suaveolentes. *Phytochem.* **67**, 1931 (2006).
- 4) Hakola, H., Shores, B., Arey, J. and Atkins, R. : Product formation from the gas-phase reaction of OH radical and O₃ with b-phellandrene. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 278 (1993).
- 5) Politeo, O., Jukic, M. and Milos, M. : Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycons from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oils. *Food Chem.* **101**, 379 (2007).
- 6) Sandip, B. B., Kamlesh, K., Bhutani, S. I., Kahn, B. L., Tekwani, Melissa, R. J., Ikhlas, A. K. and Inder, P. S. : Biomimetic synthesis, antimicrobial, antileishmanial and antimalarial activities of euglobals and their analogues. *Bioorgan. Medicin. Chem.* **14**, 1750 (2006).
- 7) Masako, K., Yusuke, K., Hideyukia, I., Atsuko, M., Yoshiki, M., Kayoko, M. and Makoto, K. : A novel method to control the balance of skin microflora. *J. Dermatol. Sci.* **39**, 197 (2005).
- 8) Tanida, M., Nijijima, A., Shen, J., Nakamura, T. and Nagai, K. : Olfactory stimulation with scent of lavender oil affects autonomic neurotransmission and blood pressure in rats. *Neurosci. Lett.* **398**, 155 (2006).
- 9) McAnally, J. A., Jung, N. and Mo, H. : Farnesyl-O-acetylhydroquinone and geranyl-O-acetylhydroquinone suppress the proliferation of murine B16 melanoma cells, human prostate and colon adenocarcinoma cells, human lung carcinoma cells, and human leukemia cells. *Cancer Lett.* **202**, 181 (2003).
- 10) Burke, Y. D., Ayoubi, A. S., Werner, S. R., McFarland, B. C., Heilman, D. K., Ruggeri, B. A. and Crowell, P. L. : Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer Res.* **22**, 3127 (2002).
- 11) Crowell, P. L. and Gould, M. N. : Chemoprevention of mammary cancer by monoterpenoids. *Crit. Rev. Oncogen.* **5**, 1 (1994).
- 12) Ong, T. P., Heider, R., de Conti, A., Dagli, M. L. Z. and Moreno, F. S. : Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions apoptosis, plasma cholesterol and HMG-CoA reductase. *Carcinogenesis* **27**, 1194 (2006).

- 13) Culier, M. E., Bercet, C. and Richard, H. : Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinales*). *J. Agr. Food Chem.* **42**, 665 (1994).
- 14) Kikuzaki, H. and Nakatani, N. : Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.* **58**, 1407 (1993).
- 15) Takahashi, N., Kawada, T., Goto, Y., Yamamoto, T., Taimatsu, A., Matsui, N., Kimura, K., Saito, M., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Fushiki, T. : Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Letters* **514**, 315 (2002).
- 16) Duncan, R. E. and Archera, M. C. : Farnesol induces thyroid hormone receptor (THR) β 1 but inhibits THR-mediated signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 239 (2006).
- 17) Bifulco, M. : Role of the isoprenoid pathway in ras transforming activity, cytoskeleton organization, cell proliferation and apoptosis. *Life Sci.* **77**, 1740 (2005).
- 18) Bifulco, M., Laezza, C. and Aloj, S. M. : Inhibition of farnesylation blocks growth but not differentiation in FRTL-5 thyroid cells. *Biochim.* **81**, 287 (1999).
- 19) Valco, M., Keibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. L. : Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44 (2007).
- 20) Bartsch, H. and Nair, J. : Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer : Role of lipid peroxidation and DNA damage and repair. *Lagenbeck's Arch. Surg.* **391**, 499 (2006).
- 21) Kok, P. L., Shan, H. H., De Silva, R., Tan, B. K. H. and Yi, Z. Z. : Oxidative stress : Apoptosis in neuronal injury. *Curr. Alzheimer Res.* **3**, 327 (2006).
- 22) Sisto, M., Acquafredda, A., Mitolo, V., Panaro, M. A., Lisi, S. and Saccia, M. : Polimorphonuclear cell-mediated oxidative stress : Sink for reactive oxygen species and cell various type damage. *Immunopharm. Immunotox.* **28**, 153 (2006).
- 23) Levy, A. P. : Application of pharmacogenomics in the prevention of diabetic cardiovascular disease: Mechanistic basis and clinical evidence for utilization of the haptoglobin genotype in determining benefit from antioxidant therapy. *Pharmacol. Therapeu.* **112**, 501 (2006).
- 24) Augusta, M. : NADPH oxidase-derived ROS : Key modulators of heme-induced mitochondrial stability in human neutrophils. *Exper. Res.* (2006) article in press.
- 25) Hald, A. and Lotharius, J. : Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exper. Neurol.* **193**, 279 (2005).
- 26) Meany, D. L., Poe, B. G., Navratil, M., Moraes, C. T. and Amiaga, E. A. : Superoxide released into the mitochondrial matrix. *Free Radical Biol. Med.* **41**, 950 (2006).
- 27) Bulteau, A. L., Szweda, L. I. and Friguet, B. : Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Exper. Gerontol.* **41**, 653 (2006).
- 28) Lee, D. W. and Opanashuk, L. A. : Polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254-induced oxidative stress plays a role in dopaminergic cell injury. *Neurotoxicol.* **25**, 925 (2004).
- 29) Mizutania, H., Tada-Oikawa, S., Hirakua, Y., Kojima, M. and Kwanishi, S. : Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* **76**, 1439 (2005).
- 30) Schmacker, P. T. : Reactive oxygen species in cancer cells: Live by sword, die by sword. *Cancer Cell* **10**, 175 (2006).
- 31) Tokarska-Schlattner, M., Michael Zaugg, Zuppinger, C., Wallimann, T. and Schlattner, U. : Review article. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 389, (2006).
- 32) Yen, H. C., Chang, H. M., Majimam H. J., Chen, F. Y. and Li, S. H. : Levels of reactive oxygen species and primary antioxidant enzymes in WI38 versus transformed WI38 cells following bleomycin treatment. *Free Radical Biol. Med.* **38**, 950 (2005).
- 33) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55 (1983).
- 34) Markert, M., Andrews, P. C. and Babior, B. M. : Measurement of O $_2$ production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from neutrophils. *Meth. Enzymol.* **105**, 358 (1984).
- 35) Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Labor. Chem. Med.* **70**, 158 (1967).
- 36) McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
- 37) Flohe, L. and Otting, F. : Superoxide dismutase assays. *Meth. Enzymol.* **105**, 93 (1984).
- 38) Gunzler, W. A., Kremers, H. and Flohe, L. : An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **12**, 444 (1974).
- 39) Clairborne, A. : Catalase activity. In: R. A. Greenwald, Editor, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC press, Boca Raton, USA, p. 383 (1985).
- 40) Reiter, R. J. : Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB Journal* **9**, 528 (1995).
- 41) Olguin-Martinez, M., Mendieta-Condado, E., Martha Contreras-Zentella, M., Escamilla, J. E., Aranda-Fraustro, A., El-Hafidi, M. and Hernández-Muñoz. R. : Rate of oxidant stress regulates balance between rat gastric mucosa

- proliferation and apoptosis. *Free Rad. Biol. Med.* **41**, 1325 (2006).
- 42) Sandra, M., Cardoso, A., Rego, C., Penacho, N. and Oliveira, C. R. : Apoptotic cell death induced by hydrogen peroxide in NT2 parental and mitochondrial DNA depleted cells. *Neurochem. Internat.* **45**, 693 (2004).
- 43) Schrader, M. and Dariush, H. : Fahimi A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **435**, 243 (2005).
- 44) Zhou, Z. and Kang, Y. J. : Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *J. of Histochem. Cytochem.* **48**, 585 (2000).