

Costunolide의 백혈병 세포주 U-937에 대한 분화 유도 작용

김주일, 이성호, 박재훈¹, 박희준², 이경태*

경희대학교 약학대학, ¹의과대학, ²상지대학교 자원식물학과

Induction of Differentiation on the Human Histiocytic Lymphoma Cell Line U-937 by Costunolide

Joo Il Kim, Sung Ho Lee, Jae Hoon Park¹, Hee Joun Park² and Kyung Tae Lee*

College of Pharmacy, ¹Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701 and

²Department of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract—The present work was carried out to examine the effect of costunolide on the growth of several cells and characteristics of U-937 human leukemia-derived cell line. Costunolide produced a potent antitumor activity *in vitro* dependant on concentration against several tumor cells such as P-388, L-1210 leukemia and SNU-5 stomach cancer cells. However, it showed less cytotoxicity on normal cells such as *Maccaccus rheus* monkey kidney cells (MA-104) up to 200 μ M concentration. An effect of cell differentiation by costunolide was assessed by its ability to reduce nitroblue tetrazolium (NBT), and to induce phagocytosis of latex particles. In order to establish whether costunolide induces U-937 cells to differentiate toward macrophage or granulocyte, esterase activities was measured. Based on these results, we found that costunolide having cytotoxicity on U-937 human leukemia cells was explained through differentiation inducing activity.

Key words—*Magnolia sieboldii*: costunolide: differentiation: NBT: phagocytosis: esterase.

많은 종류의 암들이 세포의 비정상적인 분화 혹은 분화의 중지 에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 암의 특징을 이용하여 암 세포에만 특이적으로 작용하는 암세포 분화 유도 물질에 의한 항암제 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포 분화와 증식은 서로 상반되는 관계가 있으며 분화(differentiation)가 진행될수록 증식(proliferation)은 저해를 받고, 증식이 진행될수록 분화는 저해를 받는다. 세포의 분화는 세포의 성숙단계에

있어 필수 과정이나 암세포의 경우 이 분화과정이 정지되고 세포증식 단계에 머물러 있으면서 이러한 세포들이 계속해서 축적되는 것이 관찰되어진다.¹⁾ 결국 분화의 정지는 암의 치료에서 중요한 인자가 되며 *in vitro* 상태에서 세포의 분화와 성숙을 유도할 수 있는 물질의 개발 또는 발견은 임상적으로 아주 중요한 의의를 가진다.

Histiocytic lymphoma cell line인 U-937 세포의 경우 세포의 성장과 분화에 대한 여러 가지 물질의 효과를 연구하는 데 있어 중요한 모델로서 사용되는 세포주이다. 항백혈병 약물인 TPA, cyto-

*교신저자 : Fax 02-966-3885

kines, vitamin D₃ 등의 처리 결과 형태학적으로 분화하여 macrophage와 유사한 형태로 분화한다.²⁾ 새로운 물질의 항암효과를 *in vitro*에서 미분화 세포주인 U-937 세포의 생화학적 그리고 형태학적 변화들을 관찰함으로써 세포분화에 미치는 영향을 검토하는 것은 새로운 항암제 개발에 있어서 중요한 검색 단계로 알려져 있다.³⁾

Costunolide는 목련과 식물인 *Magnolia sieboldii* 잎에서 분리한 sesquiterpene lactone 물질⁴⁾로서 항 hepatitis B virus 활성,⁵⁾ 항 궤양^{6,7)}과 chemopreventive 활성^{8,9)}을 가진 물질로서 보고된 바 있다. 함박꽃나무 잎에서 분리한 costunolide의 세포독성 작용과 leukemia 세포 분화 유도 기전과의 연관성을 연구하기 위하여 human myelogenous leukemia cell line인 U-937을 사용하여 분화유도 능력을 *in vitro*에서 검색하고자 본 실험에 착수하였다.

재료 및 방법

시약-P-388, L-1210, SNU-5와 U-937 cell line은 한국 세포주 은행에서 MA-104 세포주는 경희대학교 김동현 교수님으로부터 공급받았다. Costunolide는 상지대 박희준 교수님으로부터 제공받았으며⁴⁾ fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640, penicillin/streptomycin은 Gibco사의 것을 사용하였다. 1 α ,25(OH)₂D₃, phorbol 12-myristate 13-acetate(TPA), naphthyl AS-D chloroacetic esterase kit, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), latex particle(diameter: 0.81 μ M)과 NBT 시약은 sigma사에서 구입하였다. 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다.

세포 배양-P-388, L-1210, U-937, SNU-5 및 MA-104 세포들은 10% Fetal bovine serum, penicillin(100 unit/ml) streptomycin(100 unit/ml)을 함유한 RPMI1640 배지에 suspension 시킨 뒤 5%의 CO₂를 함유하며 37 $^{\circ}$ C를 유지하는 incubator에서 배양하였다.

MTT assay¹⁰⁾-MTT assay는 각각의 세포를 10⁶ cells/ml 농도로 조절하여 0.1 ml를 96 well plate에 이식한 후 costunolide 검체를 1.5, 3.5,

7.5, 15, 30 μ M 농도로 준비한 후 0.1 ml를 첨가하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 5 mg/ml 농도의 MTT 용액 50 μ l를 가하여 4시간 배양 후 상등액을 제거하고 DMSO 50 μ l를 첨가하여 침전물을 용해시킨 후 elisa reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Trypan blue assay-U-937 세포를 1 \times 10⁶ cells/ml로 준비한 후 1.5, 3.5, 7.5, 15, 30 μ M 농도의 costunolide와 함께 2~4일간 배양 하였다. Costunolide는 메탄올에 용해 하였으며 최종 메탄올 농도가 모든 실험에서 0.1%를 넘지 않도록 하였다. 세포의 생존률은 trypan blue 방법¹⁰⁾으로 시행 하였으며 저해율은 다음 식으로 계산¹¹⁾하였다:

$$100 - \frac{I}{C} \times 100$$

(C: 대조군의 세포수, I: 시료처리군의 세포수)

NBT assay¹⁰⁾-U-937 cell line의 분화 능력은 NBT 환원을 측정하였으며 실험과정을 간단히 요약하면 아래와 같다. NBT(1 mg/ml) 450 μ l에 TPA (200 μ g/ml) 50 μ l를 혼합한 뒤 500 μ l의 cell suspension에 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 20분 incubation 한 뒤 ice 상에서 반응을 정지시키고 이때 생성되어진 침전 formazan particle을 역상현미경 (\times 100)에서 counting 하였다.

Esterase 활성 시험-Sigma kit의 방법에 따라 α -naphthyl acetate esterase와 AS-D chloroacetate esterase의 활성을 염색하여 계산하였다.

Phagocytosis 시험¹⁰⁾-U-937 세포(1 \times 10⁶ cells/ml)들을 0.2% latex particles을 함유한 혈청이 없는 배지로 현탁한 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간동안 배양하였다. 배양 후 세포들을 phosphate-buffered saline(PBS)으로 한번 세척한 후 세포 중 latex particles 10개 이상이 포함된 세포들을 phagocytic 세포들로서 계산하였다.

결과 및 고찰

단백질의 tyrosine 인산화는 여러 성장 인자들에 대한 세포의 반응 및 여러 oncogenic 바이러스에 의한 암의 형성에 밀접한 관련성을 보여 주고 있다. 인산화된 tyrosine은 세포의 성장과 밀접한 관련이

있으며, 증식 상태가 멈춘 분화는 세포내 tyrosine의 인산화의 감소와 연관되어 세포의 증식 능력이 계획대로 멈추는 것을 포함하는 신호전달기전의 중심적인 매개 역할을 담당하고 있다.¹²⁾ 단백질 tyrosine을 인산화시키는 protein tyrosine kinase(PTK)와 이의 탈 인산화의 역할을 하는 protein tyrosine phosphatase(PTPase)의 상호 조절 작용으로 생체내 아직 알려지지 않은 단백질의 tyrosine 인산화에 대해 평형 상태를 조절하고 있다. 세포에 따라 단백질의 tyrosine 인산화를 조절하는 PTK와 PTPase의 역할은 각각 다른 것으로 알려졌으며 일반적으로 분화과정에서는 총 단백질 tyrosine 인산화의 감소가 보고되어졌다.¹³⁾ PTK의 저해 또는 PTPase의 활성화에 의한 세포내 인산화 tyrosine의 감소는 백혈병 세포의 분화 유도함으로서 항암 치료제의 개발 가능성을 제시해주고 있다.

Costunolide 화합물은 sesquiterpene lactone의 특징을 가진 물질로서 CD-3 분자의 세포막 결합에 의한 tyrosine 인산화를 저해함으로서 cytotoxic T lymphocytes의 세포 살상효과를 감소하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾

본 실험에서는 tyrosine 인산화를 저해하는 것으로 알려진¹⁴⁾ costunolide의 암세포주에 대한 항 증식작용과 U-937 백혈병 세포주에 대한 세포성장 저해 최적농도를 정하여 세포 분화 유도작용과의 연관성을 조사하였다. 세포 독성을 검색하기 위하여 암세포주들과 정상 원숭이 신장세포에 시료를 48시간 배양한 후 MTT법으로 측정하였다. 암 세포에 대해서는 농도 의존적인 세포 독성을 나타내었으며 P-388, L-1210의 백혈병 세포주와 SNU-5 위암 세포

에 대한 IC₅₀ 수치는 각각 27.5, 30 및 45 μM을 보여줌으로서 암세포주에 대한 세포독성 효과는 비슷함을 보여 주고 있다(Table I). 그러나 MA-104 원숭이 정상 신장 세포에서의 costunolide는 최대 200 μM에서 세포독성을 나타내지 않음으로서 암세포에 대한 선택성을 보여주고 있다.

Costunolide의 세포분화유도에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 세포의 생존에는 커다란 영향을 미치지 않고 세포성장을 억제하는 최적 농도를 설정할 필요가 있다. 여러 농도의 costunolide를 48시간에서 120시간 동안의 배양시간에 따른 세포성장

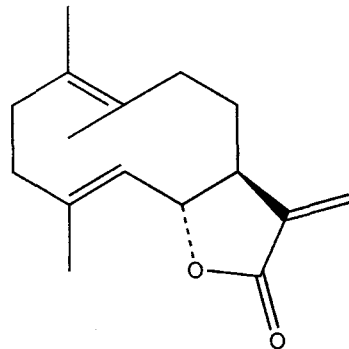


Fig. 1. Chemical structure of costunolide.

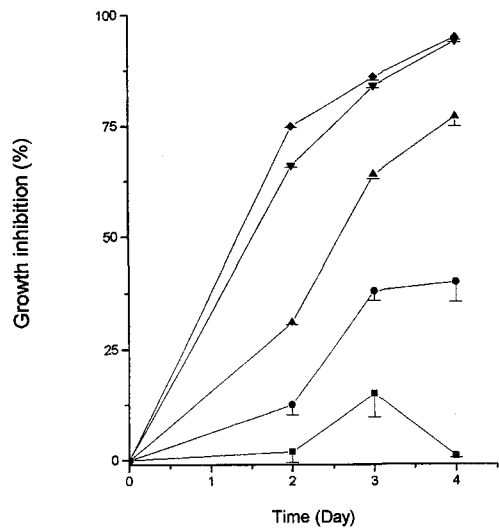


Fig. 2. The effect of costunolide on growth of U-937 cells. Cells were treated with increasing concentration of costunolide (1.5~30 μM) for 4 days. The bars represent the mean and SD of three independent experiments. ■: 1.5 μM, ●: 3.5 μM, ▲: 7.5 μM, ▼: 15 μM, ◆: 30 μM.

Table I. Sensitivity of cultured cells to costunolide

Cell lines	Origin	IC ₅₀ ^a (μM)
P-388	Leukemia, mouse	27.5
L-1210	Leukemia, mouse	30
SNU-5	Stomach cancer, human	45
MA-104	Kidny cell, monkey	>200

^aIC₅₀ is defined as the concentration which resulted in a 50% decrease in cell number as compared with that of the control cultures in the absence of inhibitor. The values represent the mean of three independent experiments.

Table II. Induction of differentiation markers in U-937 cells after treatment with costunolide for 4 days

Compounds	Concentration (μM)	NBT reduction (%)	Naphthol AS-D chloroacetate esterase activity (%)	α -Naphthol acetate esterase activity (%)	Phagocytosis (%)
Costunolide	- ^b	5.8 \pm 0.4 ^a	11.9 \pm 0.9	6.93 \pm 0.9	2.7 \pm 0.5
	3.5	73.3 \pm 2.4	9.8 \pm 0.8	60.9 \pm 1.8	36.9 \pm 2.5
Vitamin D ₃	0.01	71.5 \pm 8.4	12.2 \pm 1.5	47.9 \pm 5.2	40.4 \pm 3.5

^aMean \pm S.D. (n=3).^bUntreated cells.

저해를 trypan blue 실험으로 분석하였다(Fig. 2). 15 μM 및 30 μM 농도에서 costunolide는 배양 시간에 의존적으로 세포 살상효과를 보여주고 있으며 96시간 배양에서는 대부분의 세포가 생존하지 않았다. 3.5 μM 에서는 72시간 배양 후부터 cytostatic 상태를 보여줌으로서 세포 분화유도의 최적 농도로서 추정되었다.

이러한 세포성장 저해는 세포분화와의 관련성이 많은 세포에서 발견²⁾되었으며, 본 연구자들은 NBT 및 phagocytosis 활성실험을 사용하여 U-937세포의 granulocytes와 monocytes로의 분화 정도를 확인하였다.¹⁾ U-937 세포를 0.35 μM 의 costunolide와 4일간 배양하였을 때 73.3%의 분화를 NBT 방법으로 확인하였으며 대조군으로 1 α , 25(OH)₂D₃를 처리한 군에서는 71.5% 양성으로 염색됨을 보여주고 있다. Phagocytosis 실험에서도 costunolide와 1 α , 25(OH)₂D₃ 처리군에서 각각 36.9%와 40.4%를 보여줌으로서 costunolide 처리에 의한 U-937 세포에서의 분화를 확인하였다.

Costunolide를 처리한 경우 세포의 분화 방향이 granulocyte 또는 monocytes/macrophage쪽으로 성숙되는 것을 확인하기 위하여 esterase 활성을 측정하였다.²⁾ U-937세포를 3.5 μM 의 costunolide를 처리한 경우 α -naphthyl acetate esterase 활성은 60.9%이나 상대적으로 granulocyte의 지표인 naphthol AS-D chloroacetate esterase 활성은 9.8%로서 변화가 없었다. 이 실험에서 costunolide는 U-937 세포를 monocyte/macrophage로 분화시키고 있음을 보여주고 있으며 대조 약물로 사용한 1 α , 25(OH)₂D₃는 α -naphthyl acetate esterase에 47.9%의 양성 반응을 보임으로서 monocyte/macrophage로 분화됨을 확인하

였다.

*In vitro*에서 protein tyrosine kinase에 의한 단백질 tyrosine기의 인산화를 저해하는 herbimycin A와 genistein은 특정 조건에서 여러 종류의 세포를 분화하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 이러한 결과에서 세포에서 특정 tyrosine 잔기의 인산화를 저해하는 것은 직접적 또는 간접적으로 세포의 성장을 저해하며 세포 분화를 유도하는 환경으로 만드는 것으로, 만약 costunolide의 세포 분화를 유도하는 작용위치가 PTK의 저해에 의한 반응이라면 정상적인 PTPase와 PTK의 저해에 의한 세포내 단백질 tyrosine기의 축적으로 평형 상태가 깨어지면서 세포 성장의 저해와 세포 분화를 유도하는 것으로 추정된다.

현재까지 costunolide의 세포 분화유도의 분자적 기전에 대해 아직까지 밝혀진 바가 없으며 앞으로 이에 대한 연구가 계속 되어야 할 것이다.

결 론

함박꽃 나무 잎에서 분리한 costunolide의 *in vitro* 세포독성 검색에서 암 세포주에 대한 선택성을 보였으며 20~50 μM 에서 IC₅₀를 나타내었다. 인체 백혈병 세포주인 U-937 세포의 세포 성장저해는 세포분화 유도에 의한 작용으로 관찰되었으며 costunolide에 의해 monocyte/macrophage로 분화됨을 확인하였다.

사 사

본 논문은 1998년도 경희대학교 교비연구비로 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. Koeffler, H. P. (1983) Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: Therapeutic implication, *Blood* 62: 709-721.
2. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2458-2462.
3. Chomienne, C., Fenaux, P. and Degos, L. (1996) Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia, *FASEB* 10: 1025-1030.
4. Park, H. J. (1996) A new approach-type alkaloid from the leaves of *Magnolia sieboldii* K. Koch, *Kor. J. Pharmacol.* 27: 123-128.
5. Chen, H. C., Chou, C. K., Lee, S. D., Wang, J. C. and Yeh, S. F. (1995) Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cell, *Antiviral Res.* 27: 99-109.
6. Yoshikawa, M., Hatadeyama, S., Incue, Y. and Yamahara, J. (1993) Saussureamines A, B, C, D and E, new antiulcer principles from *Chinense saussureae* Radix, *Chem. Pharm. Bull.* 31: 214-216.
7. Yamahara, J., Kobayashi, M., Miki, K., Kazuka, M., Sawada, T. and Fujimura, M. (1985) Cholagogic and antiulcer effect of *Saussurea* Radix and its active components, *Chem. Pharm. Bull.* 33: 1285-1288.
8. Mori, H., Kawamori, T., Tanaka, T., Chnichi, M. and Yamahara, J. (1994) Chemopreventive effect of costunolide, a constitution of oriental medicine, on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rat, *Cancer Lett.* 83: 171-175.
9. Mori, H., Kawamori, T., Tanaka, T., Hara, A. and Yamahara, J. (1995) Modifying effects of naturally occurring products on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats, *Cancer Res.* 55: 1277-1282.
10. Kim, J. I., Park, J. H., Park, H. J., Choi, S. K. and Lee, K. T. (1998) Induction of differentiation of the human histocytic lymphoma cell line U-937 by hypericin, *Arch. Pharm. Res.* 21: 41-45.
11. Zhang, L., Nakaya, K., Yoshida, T. and Kuroiwa, Y. (1992) Induction by bufalin of differentiation toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers, *Cancer Res.* 52: 4634-4641.
12. Frank, D. A. and Sartorelli, A. C. (1986) Regulation of protein phosphotyrosine content by changes in tyrosine kinase and protein phosphotyrosine phosphatase activities during induced granulocytic and monocytic differentiation of HL-60 leukemia cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 140: 440-447.
13. Frank, D. A. and Sartorelli, A. C. (1989) Alteration in tyrosine phosphorylation during the granulocytic maturation of HL-60 leukemia Cells, *Cancer Res.* 48: 52-58.
14. Arao, K., Magae, J., Nichimura, T., Otake, N. and Nagai, K. (1995) Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 2064-2067.
15. Katagiri, K., Katagiri, K., Kajiyama, K., Uehara, Y., Yamamoto, T. and Yoshida, T. (1992) Modulation of monocytic differentiation of HL-60 Cells by inhibitions of protein tyrosine kinases, *Cellular Immunology* 140: 282-294.
16. Honma, Y., Okabe-Kado, J., Hozumi, M., Uehara, Y. and Mizuno, S. (1989) Induction of erythroid differentiation of K562 human leukemia cells by herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase activity, *Cancer Res.* 49: 331-334.
17. Kondo, K., Watanabe, T., Sasaki, H., Uehara, Y. and Oishi, M. (1989) Induction of *in vitro* differentiation of mouse embryonal carcinoma (F9) and erythroleukemia (MEL) cells by herbimycin A, an inhibitor of protein phosphorylation, *Mol. Cell Biol.* 7: 285-293.

(1998년 12월 23일 접수)