

TPA로 야기된 HL-60 세포의 기질부착에 대한 *Asadisulphide*의 억제효과

충남대학교 자연과학대학 생물학과, 충남대학교 약학대학 약학과*

유관희¹ · 박미아 · 김선희[†] · 안병준[†]

국문초록: 항암제로 사용되어 온 아위를 사용하여 극성에 따른 용매추출 분획을 얻고 TPA로 처리된 HL-60 세포를 사용하여 기질부착 억제실험을 수행한 결과, ethyl acetate (EA) 층에서 가장 강한 부착억제효과가 있음을 알아 내었기에 ethyl acetate (EA)층을 다시 ethyl acetate (EA), hexane (HEX), ethyl ether (EE)로 추출한 뒤 3회 chromatography하여 아위 순수활성물질인 asadisulphide를 분리해 내었다. 이 순수활성물질을 가지고 HL-60 암세포에 대한 부착 억제실험을 수행한 결과 asadisulphide는 최소농도 2 µg/ml에서 HL-60 세포의 부착을 98%억제하였다. 또한 asadisulphide는 HL-60 세포에 대해 ED₅₀값은 2.6 µg/ml이었으며, 20 µg/ml 농도 이하에서 세포독성이 없고 항암효과가 있다는 사실을 규명하였다.

서 론

아위 (*Ferula assafoetida*)는 다년생 초본으로 주생 산지는 아프가니스탄과 이란 등이며, 강한 마늘 냄새가 나는 것이 특징이다. 약리 작용으로는 sedative effect, 거담, antibacterial effect, anticoagulant effect 등이 보고되어 있고, 성분으로는 정유가 10~17%로 이중 sec-butyl-propenyl disulfide가 반을 차지하고 있다. 아위의 냄새를 일으키는 성분으로는 주로 disulfide 류 (C₈H₁₆S₂, C₁₀H₁₈S₂, C₁₁H₂₀S₂)를 들 수 있으며 그 외에도 ferulic acid와 그 ester 및 farnesiferol A, B, C 등이 포함되어 있다.

강력한 발암 촉진물질인 phorbol ester는 세포를 활성화시키는 동시에 여러 세포대사를 다양하게 변화시킨다. 즉 phorbol ester는 세포의 형태를 변화시키고²⁾, ornithine decarboxylase의 활성화¹²⁾, polyamin 생합성의 유도⁴⁾, prostaglandin과 arachidonic acid 생성의 촉진⁶⁾, T 세포에서의 interleukin-2 생성 유도⁹⁾, myeloid leukemia 세포의 분화 유도³⁾, lymphocyte의 응집과 기질표면에 대한 부착을 유도하는 것으로 알

려졌다⁷⁾. Phorbol ester의 일종인 TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)는 강력한 발암 촉진제로서 phorbol과 acetic acid, myristic acid와 diester 물질로 파두유에서 처음 분리된 cocarcinogen이다. 한편 Rovera 등⁸⁾은 사람의 백혈병 세포인 HL-60 세포에 TPA를 처리했을 경우 많은 세포 돌기들이 형성되고 이로 인해 culture flask의 바닥에 부착되는 기질부착현상을 관찰하였다.

본 연구에서는 이러한 TPA로 인해 야기된 돌기형성과 부착현상을 억제하는 물질이 TPA의 발암 촉진기능의 억제와 관련이 있으리라는 가정 하에 종양 치료에 사용되어 온 생약제 중 아위로부터 asadisulphide를 순수분리하여 TPA처리로 인해 야기된 HL-60 암세포의 기질부착억제효과를 분석함으로써 그 항암효과를 조사하였고, 또한 asadisulphide의 세포독성실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 생약 및 용매와 silicagel

시료로 사용된 아위는 건재상으로부터 구입하여 사용하였으며, 추출에 쓰인 용매류는 국내외의 EP급을 2차 증류하여 사용하였고, 분리에 사용한 silicagel은 Sigma사의 230~400 mesh를 사용하였다.

*논문 접수: 2000년 8월 19일

수정재 접수: 2000년 9월 21일

[†]별책 요청 저자: 유관희, 충남대학교 자연과학대학 생물학과 대전광역시 유성구 궁동 220, 305-764

Tel) 042-821-5498, Fax) 042-822-9690, E-mail) khyou@cnu.ac.kr.

2) HL-60 세포와 배양액

사람의 백혈병 세포인 HL-60 세포주는 화학연구소 (대전)에서 분양받아 사용하였고 24시간에 한 번씩 계대배양하였다. 배양액은 증류수에 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640배지와 fetal bovine serum을 100 ml, NaHCO₃ 2 g, penicilline G 100,000 units와 streptomycin 100 mg을 넣어 용해시켰다. 0.1 N HCl로 pH를 7.2로 조절하여 전체량을 1:1로 한 뒤 멸균여과하여 제조하였고, 4°C에서 보관하면서 사용하였다. HL-60 세포는 5% CO₂ incubator를 이용하여 37°C에서 배양하였다.

2. 실험방법

1) HL-60 세포 현탁액의 조제

세포독성실험에 사용했던 HL-60 세포는 logarithmic phase에 도달한 것을 얻기 위하여 실험 24시간 전에 36~37°C로 가온한 RPMI 배지를 넣은 250 ml 삼각 flask에 HL-60 세포를 2~3×10⁵ cells/ml 농도가 되게 조정된 후 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이 세포를 세포독성실험 바로 전에 미리 36~37°C로 가온한 새 배양액으로 희석하여 1×10⁵ cells/ml 농도가 되도록 한 후 HL-60 세포 현탁액을 만들었다¹¹⁾.

2) 아위의 추출과정 및 asadisulphide의 분리

아위를 극성이 낮은 hexane (HEX)부터 ethyl ether (EE), ethyl acetate (EA) 순으로 점차 극성을 높여 가며 추출하고, 각 분획을 얻어 TPA로 처리된 HL-60 세포에 대한 기질부착 억제작용실험에 사용하였다. 이 시료를 TPA로 처리된 HL-60 세포에 있어서 기질부착 억제실험을 수행하여 가장 부착억제효과가 강한 시료를 얻고, 이 시료를 다시 silicagel column (230~400 mesh)에서 전개용매 HEX:EA:MeOH=6.0:2.5:1.5를 사용하여 11개의 분획을 얻어 분리축적에 따른 작용강화 여부를 관찰하였다.

이 중 부착억제효과가 가장 강한 분획을 다시 silicagel column (230~400 mesh)에서 전개용매 benzene: acetone=9.2:0.8을 사용하여 2차 분획을 얻고 분리축적에 따른 작용강화 여부를 관찰하였다. 같은 방법으로 부착억제효과가 가장 강한 분획을 다시 silicagel column (230~400 mesh)에서 전개용매 (CHCl₃: EA:MeOH=94.5:5.0:0.5)를 사용하여 3차 분획을 얻고 분리축적에 따른 작용강화 여부를 관찰한 뒤 부착억제효과가 가장 강한 분획을 정제하여 유상의 순수 단일활성물질인 asadisulphide를 분리하였다.

3) TPA로 처리된 HL-60 세포에 대한 asadisulphide의 기질부착억제효과 분석

TPA는 50 µg/ml EtOH용액을 증류수로 25배 희석한 후 50 µl씩 사용하였고, asadisulphide는 10 mg/ml 및 25 mg/ml의 EtOH용액으로 만든 후 증류수로 10배 희석하거나, EtOH에 잘 녹지 않는 부분은 동일 농도가 되도록 EtOH/DMSO 혼합액에 용해시킨 후 증류수로 10배 희석하여 사용하였다.

HL-60 세포 현탁액은 1×10⁵ cells/ml가 되게 조제하여 24-well 4개에 각각 1 ml씩 분주하였다. 여기에 위와 같은 방법으로 제조한 asadisulphide를 가지고 제1 well에는 asadisulphide용액 20 µl, 제2 well에는 TPA 50 µl, 제3 well에는 asadisulphide용액 20 µl와 TPA용액 50 µl, 제4 well에는 용제만을 넣어 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하여 20시간이 경과된 후 well plate를 흔들어 준 다음 현탁액은 0.025% trypan blue용액을 가하여 세포를 염색한 후 hemocytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다. 한편 상등액을 제거한 각 well에는 0.5% typsin용액 300 µl씩을 가하고 약 1시간 배양시킨 후 기질에 부착된 세포를 현탁시켜 0.025% trypan blue로 염색하여 세포수를 계산하였다. TPA만 가했을 때 상등액내의 세포수와 기질에 부착된 세포수의 비율을 기준으로 하여 시료 첨가시 이 비율의 변화를 계산하여 부착억제 비율을 산출하였으며 동시에 아래 방법으로 세포독성도 관찰하였다.

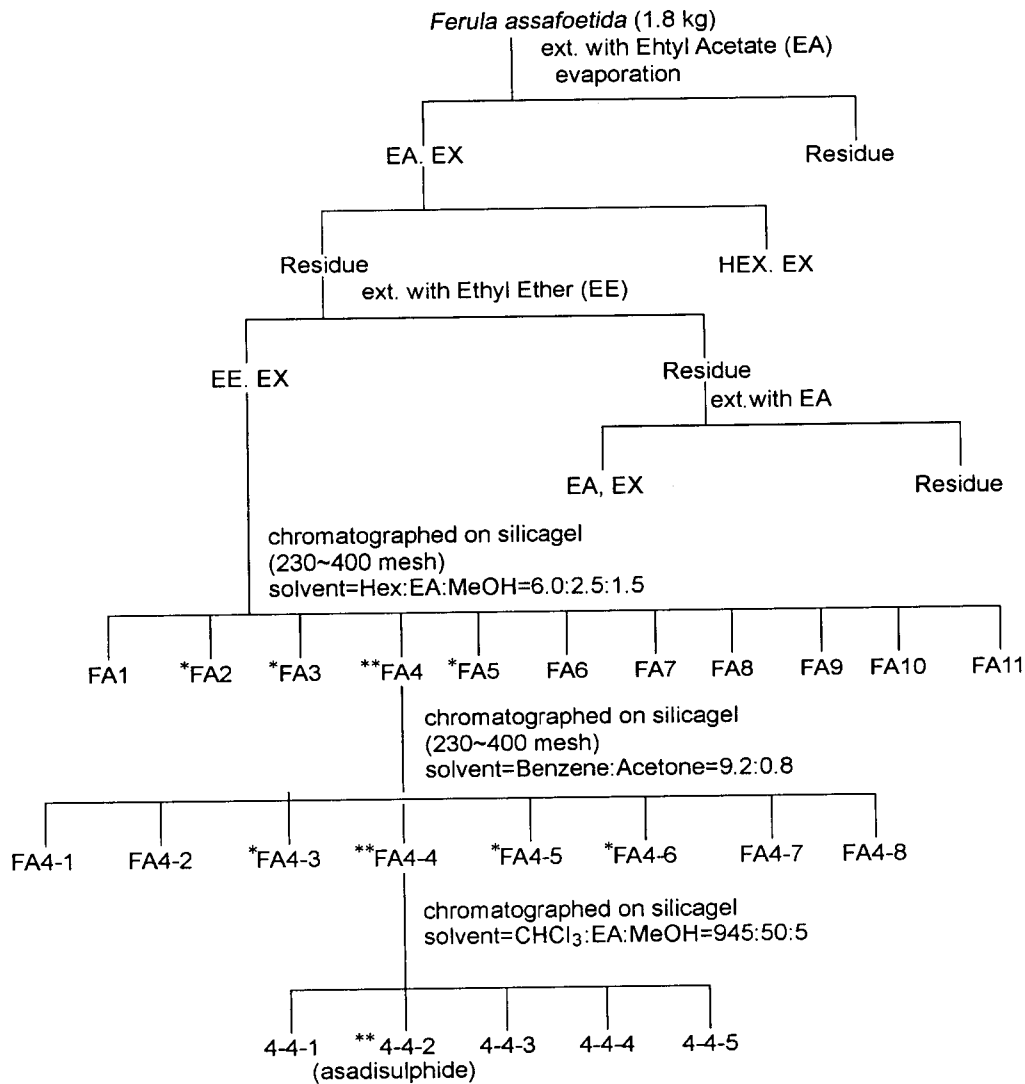
4) ED₅₀값의 결정과 세포독성의 판단

ED₅₀값은 대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 시료의 농도 (µg/ml)로 주어지며 미국 국립암연구소 (NCI, National Cancer Institute, USA) manual의 방법⁹⁾ 의해 결정하였다.

결 과

Asadisulphide 분리를 위하여 Table 1에서와 같이 아위를 각각 HEX, EE, EA 순으로 극성을 높여가며 추출하고 각 분획을 얻어 TPA로 처리된 HL-60 세포에 대한 이들의 부착억제 작용을 측정된 결과, EA층에서 가장 강한 기질부착억제효과가 있다는 사실을 알아내었다. 이에 다량의 엑기스를 얻기 위하여 다시 아위 1.8 kg과 EA를 삼각플라스크에 넣고 약 25°C에서 24시간 이상 흔들면서 2회 추출한 뒤 여과, 감압농축하여 EA층을 얻었다. 여기에 HEX을 넣고 흔들어 HEX에 용해되는 부분을 제거한 뒤 다시 EE를 가해 용해분을 여과하여 여액을 시

Table 1. Fractionation of exudate of *Ferula assafoetida*, *: the fraction of antiadhesive effect (**>*)



료로 하였다.

시료 (0.9 kg)을 가지고 silicagel column (230~400 mesh)에서 전개용매 HEX:EA:MeOH=6.0:2.5:1.5를 사용하여 chromatography한 뒤 11개의 1차 분획을 얻었다. 이 1차 분획을 가지고 다시 TPA처리된 HL-60 세포들에 있어서의 기질부착억제실험을 한 결과, 분획 2, 3, 4, 5에서 비교적 강한 부착억제효과를 보였는데, 그 중에서 분획 4에서 가장 강한 기질부착억제효과를 보였다. 분획 4의 20 µg/ml 농도에서는 비부착/부착 세포수비 99/1를 보였고, 분획 4의 40 µg/ml 농도에서는 비부착/부착 세포수비 100/0을 보

여, 분획 4의 40 µg/ml 농도에서 가장 강한 기질부착억제효과를 나타내었다 (Table 2).

분획 4를 다시 전개용매 benzene: acetone=9.2:0.8을 이용하여 chromatography한 뒤 얻은 2차 8개 분획에서는 분획 4-3, 4-4, 4-5, 4-6에서 비교적 강한 기질부착억제효과를 보였는데, 이 중 분획 4-4의 10 µg/ml 농도에서는 비부착/부착 세포수비 86/14를 보였고, 20 µg/ml 농도에서는 비부착/부착 세포수비 72/0을 보여, 분획 4의 20 µg/ml 농도에서 가장 강한 기질부착억제효과를 나타내었다 (Table 3).

분획 4-4를 다시 CHCl₃:EA:MeOH=945:50:5의 전

개용매를 이용하여 chromatography한 뒤 asadisulphide (분획 4-4-2)를 분리해 내었다. 이 asadisulphide를 가지고 TPA로 처리된 HL-60 세포에 대한 기질부착 억제실험을 한 결과, TPA처리군의 경우 비

부착/부착 세포수비가 9/82인데 반해 TPA와 asadisulphide 병행처리군의 경우 비부착/부착 세포수비가 86/2를 보여 98%의 높은 기질부착억제효과를 나타내었으며 (Table 4), asadisulphid의 HL-60 세포에 대한 ED₅₀은 2.6 µg/ml이었다.

Table 2. Inhibitory effects of the primary fractions from *Ferula assafoetida*

| 분 획 | 분획농도 (µg/ml) | 비부착세포수/부착세포수=비 |
|-------------|--------------|----------------|
| TPA (비교) | 1.4 µg/ml | 27/73 = 0.36 |
| TPA + FA.1 | 20 µg/ml | 35/65 = 0.54 |
| | 40 µg/ml | 39/61 = 0.64 |
| TPA + FA.2 | 20 µg/ml | 54/46 = 1.17 |
| | 40 µg/ml | 80/20 = 4.0 |
| TPA + FA.3 | 20 µg/ml | 63/37 = 1.70 |
| | 40 µg/ml | 78/22 = 3.54 |
| TPA + FA.4 | 20 µg/ml | 99/1 = 99.0 |
| | 40 µg/ml | 100/0 = 100 |
| TPA + FA.5 | 20 µg/ml | 88/12 = 7.3 |
| | 40 µg/ml | 94/6 = 15.7 |
| TPA + FA.6 | 20 µg/ml | 53/47 = 0.13 |
| | 40 µg/ml | 39/61 = 0.64 |
| TPA + FA.7 | 20 µg/ml | 41/59 = 0.70 |
| | 40 µg/ml | 42/58 = 0.72 |
| TPA + FA.8 | 20 µg/ml | 38/62 = 0.61 |
| | 40 µg/ml | 15/85 = 0.18 |
| TPA + FA.9 | 20 µg/ml | 38/62 = 0.61 |
| | 40 µg/ml | 68/32 = 2.12 |
| TPA + FA.10 | 20 µg/ml | 58/42 = 1.38 |
| | 40 µg/ml | 38/62 = 0.61 |
| TPA + FA.11 | 20 µg/ml | 37/63 = 0.59 |
| | 40 µg/ml | 30/70 = 0.43 |

고 찰

난치병으로 분류된 암을 정복하기 위한 인간의 노력이 수십년 동안 계속되어 왔음에도 불구하고 각종 암은 여전히 현대 의학의 난제 중 하나로 남

Table 3. Inhibitory effects of the secondary fractions from *Ferula assafoetida*

| 분 획 | 분획농도 (µg/ml) | 비부착세포수/부착세포수=비 |
|--------------|--------------|----------------|
| TPA (비교) | 1.4 µg/ml | 21/79 = 0.36 |
| TPA + FA.4-1 | 10 µg/ml | 15/85 = 0.18 |
| | 20 µg/ml | 10/90 = 0.11 |
| TPA + FA.4-2 | 10 µg/ml | 24/76 = 0.32 |
| | 20 µg/ml | 33/67 = 0.49 |
| TPA + FA.4-3 | 10 µg/ml | 54/46 = 1.17 |
| | 20 µg/ml | 74/26 = 2.85 |
| TPA + FA.4-4 | 10 µg/ml | 86/14 = 6.14 |
| | 20 µg/ml | 72/0 = 100 |
| TPA + FA.4-5 | 10 µg/ml | 47/53 = 0.89 |
| | 20 µg/ml | 75/25 = 3.00 |
| TPA + FA.4-6 | 10 µg/ml | 44/56 = 0.79 |
| | 20 µg/ml | 78/22 = 3.55 |
| TPA + FA.4-7 | 10 µg/ml | 44/56 = 0.79 |
| | 20 µg/ml | 40/60 = 0.67 |
| TPA + FA.4-8 | 10 µg/ml | 34/66 = 0.52 |
| | 20 µg/ml | 48/54 = 0.85 |

Table 4. Inhibitory effects of asadisulphide on TPA-induced substrate adhesion of HL-60cells

| 실험군 | 비부착세포수 (개/ml) | 부착세포수 (개/ml) | 총 세포수 (개/ml) |
|--------------------------|---------------|--------------|--------------|
| 대조군 | 94 | 0 | 94 |
| TPA 처리군 | 9 | 82 | 91 |
| Asadisulphide | 88 | 2 | 90 |
| TPA와 Asadisulphide 병행처리군 | 86 | 2 | 88 |

아 있다. 중국의 향암 처방집에는 암이나 기타 종양 치료에 쓰이는 많은 천연물들이 소개되고 있고⁹⁾, 우리나라에서도 옛부터 한방과 민간에서 암의 치료에 한약제가 사용되어 왔다. 따라서 천연물은 항종양성 생리활성물질을 찾기 위한 귀중한 자원이라 할 수 있다. 우리나라를 비롯한 동양권에서는 옛부터 암 또는 기타 종양치료에 사용되어 온 한약제들의 세포독성 스크리닝 및 활성물질 탐구가 진행되어 왔다.

한방과 민간에서 향암의 목적으로 자주 사용되어 온 아위를 구입하여 극성에 따른 용매추출 분획을 얻고 TPA로 처리된 HL-60 세포에 있어서의 기질부착억제실험을 수행한 결과, EA층을 다시 EA, HEX, EE 순으로 추출한 후, 3회 chromatography하여 아위 순수활성물질을 분리해 내었다.

아위로부터 분리해 낸 순수 단일활성물질은 암세포의 기질부착억제효과가 있다고 알려진 sec, butyl-3-(2-hydroxymethyl-2-propenylloxy)propenyldisulfide으로 밝혀졌으며, 이것은 이미 Kajimoto 등에 의하여 분리되어 asadisulphide (2-hydroxymethyl-2butenoicacid-3-((1-methylpropyl)dithio)-2propenyl ester)라고 명명된 바 있다¹⁰⁾.

이 asadisulphide를 사용하여 HL-60 암세포를 대상으로 대조군, TPA처리군, asadisulphide처리군, TPA와 asadisulphide 병행처리군으로 나누어 부착억제실험을 수행한 결과, asadisulphide는 최소 2 µg/ml 농도에서 HL-60 세포의 기질부착을 98% 억제하고, ED₅₀ 값은 20 µg/ml 농도 이하로써 세포독성이 없고 기질부착억제효과가 있다.

본 연구의 예비실험 결과 종양치료에 사용되어 온 생약중 기질부착억제효과가 있는 생약은 목적, 황백, 상백피, 상사자, 아위 등 5종의 ethyl acetate 추출물인 바, 특히 아위의 ethyl acetate 추출물이 비부착/부착 세포수비 98/2를 보여 가장 강한 기질부착억제작용을 하였다. 이들은 모두 TPA만 처리한 경우의 비부착/부착 세포수비 19/81에 비하여 그 기질부착억제 비가 월등히 높았다. 또한 이물질은 HL-60 세포에 대해 ED₅₀=2.6 µg/ml를 보임으로써 NCI manual에 따르면 HL-60 세포에 따른 세포독성 평가는 식물추출물일 경우 ED₅₀이 20 µg/ml 이하, 합성품인 경우 4 µg/ml 이하일 때 세포독성이 없다고 규정한 바⁹⁾, asadisulphide는 세포독성 면이라 항암성 면에서 우수성을 보여 주었다.

참 고 문 헌

- 1) 홍원식 편저: 現代中共의 癌治療, 1980. 영문사.
- 2) Driedger PE and Blumberg PM (1977): The effect of phorbol esters on chicken embryo fibroblast. *Cancer Res*, **37**: 3257-3265.
- 3) Huberman E and Callahan FM (1979): Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 1293-1297.
- 4) Huberman E, Weeks C, Herrman A, Callahan M and Slaga T (1981): Alteration in polyamine levels induced by phorbol diesters and other agents that promote differentiation in human promyelocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**: 1062-1066.
- 5) National Cancer Institute USA (1972): Cell culture technical procedure.
- 6) Ohuchi K and Levine L (1978): Stimulation of prostaglandin synthesis by tumor-promoting phorbol-12,13-diester in canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem*, **253**: 4783-4790.
- 7) Rovera G, O'Brien GT and Diamond L (1979): Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science* **204**: 868-8870.
- 8) Rovera G, Santoli D and Damsky C (1979): Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 2779.
- 9) Stoeck M, Lees R, Pantaleo G and McDonald MR (1989): Comparison of phorbol-myristate-13 acetate and dioctanoyl-sn-glycerol in the activation of EL4161 thymoma cell. *J Cell Physiol*, **138**: 545-547.
- 10) Kajimoto T (1989): Sesquiterpenoid and disulphid derivative from *Ferula Assafoetida*. *Phytochemistry*, **28**: 1761-1763.
- 11) Thayer PS, Hirn P and Watt GL (1971): Cancer chemother. *Rep*, **2**: 1.
- 12) Yuspa SH, Lichi U, Ben T, Patterson T, Hennings H, Slaga TJ, Colburn N and Kelsey W (1976): Phorbol esters stimulate DNA synthesis and ornithin decarboxylase activity in mouse epidermal cell cultures. *Nature*, **262**: 402-404.

=Abstract=

Inhibitory Effects of *Asadisulphide* on the TPA-induced Adherence of HL-60 Cells

Kwan-Hee You¹, Mi-A Park, Seon-Hee Kim[†] and Byung-Zun Ahn[†]

*Department of Biology, [†]Department of Pharmacy, Chungnam National University,
Daejeon, 305-764*

Asadisulphide were purified from *Ferrula assafoetida* by organic solvent extraction and chromatography. Its inhibitory effects on the TPA-induced adherence of HL-60 cells was analyzed. Since ethyl acetate extracts of *F. assafoetida* has the strongest inhibitory effect on adherence of HL-60 cells, it was re-extracted with ethyl acetate, hexane, and ethyl ether and chromatographed three times to isolate asadisulphide. At the minimum concentration of 2 µg/ml, asadisulphide inhibited adherence of 98% of HL-60 cells that have been treated with TPA. It also showed anti-cancer effect with no cytotoxicity in the ED₅₀ value of 20 µg/ml.

Key Words: Antitumor effects, Asadisulphide, *Ferrula assafoetida*, HL-60 cells, Substrate adhesion, TPA

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(3): 181–186, September, 2000]

[†]Corresponding author