

## 인체폐암세포의 Bcl-2 family 및 cyclooxygenases의 발현에 미치는 해면동물 *Sarcotragus sp.* 유래 furanoterpenoids의 영향

최혜정<sup>1</sup> · 김남득<sup>1</sup> · 정지형<sup>1</sup> · 최영현\*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>1</sup>부산대학교 약학대학 약학과

Received March 25, 2004 / Accepted May 11, 2004

**Regulation of Bcl-2 Family and Cyclooxygenases by Furanoterpenoids Isolated from a Marine Sponge *Sarcotragus sp.* in Human Lung Cancer A549 Cells.** Hye Joung Choi<sup>1</sup>, Nam Deuk Kim<sup>1</sup>, Jee H. Jung<sup>1</sup> and Yung Hyun Choi\*. *Department of Biochemistry, Dong-Eui University College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea, <sup>1</sup>College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* – We investigated the cytotoxic effects of seven furanoterpenoids [sarcotin A, *epi*-sarcotin A, ircinin-1, *epi*-sarcotrine B, sarcotin I, (8E,13Z,20Z)-strobilin/ (7E,13Z, 20Z)-felixinin and (7E,12E,18R,20Z)-variabilin] isolated from the sponge *Sarcotragus sp.* ( the order Dictyoceratida) on the growth of A549 human lung carcinoma cells. MTT data revealed that sarcotin A and (7E,12E,18R,20Z)-variabilin exhibited higher potencies on the anti-proliferative activities than the other compounds in A549 cells. The growth inhibition by treatment with compounds (especially *epi*-sarcotin A, ircinin-1 and *epi*-sarcotrine B) were associated with the induction of apoptotic cell death through the concentration-dependent increase of Bax/Bcl-2 ratio in a p53-dependent or independent pathway. Additionally, *epi*-sarcotin A and ircinin-1 strongly inhibited the levels of cyclooxygenase (COX)-2 expression without alteration of COX-1. Taken together, the results suggest that the furanoterpenoids from the marine sponge have strong potentials as candidates for anti-cancer drugs.

**Key words** – furanoterpenoid, sponge, apoptosis, Bcl-2, cyclooxygenase

암의 발생은 정상 세포의 성장에서 유전자의 변형이 동반되는 다단계적·복합적인 과정이다. 발암원은 표적 세포의 유전자에 돌연변이를 일으키거나 변화를 주는데, 이 세포들의 증식으로 암세포로서의 성질을 가진 세포들로 되는 원인이 된다[21]. 따라서 암유발 가능성을 지닌 물질의 독성을 평가하는데 세포증식 자료의 이용과 유의성이 강조되고 있으며, 암세포만을 선택적으로 사멸시키는 물질의 암세포에 대한 세포독성 정도의 평가는 항암제 개발을 위한 가장 기본적인 과정 중의 하나이다[6,7]. 세포사멸은 necrosis와 apoptosis로 구분되며, 이는 세포의 형태적 및 생화학적 특성에 의하여 구분된다[25]. Necrosis는 생리·화학적 외상에 의해 유도된 세포의 죽음이고, programmed cell death인 apoptosis는 개체의 정상적인 발달과 분화에 관여하며, 태아의 형태형성, 난자의 배란, 신경세포의 시냅스 형성 등과 연관된 체내 비정상적인 세포들을 제거하는 기전이다[15,25,35]. 그리고 apoptosis는 세포 내·외부적 다양한 요인에 의한 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다[2,10].

특히 apoptosis에는 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포내

부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다[24,33]. 따라서 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다[26]. Apoptosis의 유발에 종양억제 유전자 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다[5,14,18,22]. 하지만 apoptosis 과정의 교란은 손상되거나 손상이 시작된 세포의 생존과 그들 세포의 성장을 유도하기 때문에 apoptosis의 억제는 암화과정에서 중요한 역할을 한다. 따라서 최근 암세포에서의 apoptosis 조절관련 기전 해석에 기초를 둔 항암제 개발이 많은 관심을 모으고 있다.

현재까지 자연계에 존재하는 각종 화합물을 대상으로 꾸준한 항암제의 탐색이 이루어져 왔고 또한 많은 성과도 있었으나, 대부분의 경우 약용자원에 대한 기록이 풍부하거나 접근이 용이한 육상식물자원에 치중되어 왔다. 그러나 최근 육상 생물에서 찾아보기 어려운 강력한 항암활성을 가지는 천연물이 해양생물에서 발견되면서 해양생태계를 구성하고 있는 다양한 생물종이 많은 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 국내 연근해에 서식하는 해면 *Sarcotragus sp.* (Dictyoceratida 속)에서 분리 추출된 수종의 furanoterpenoid계 화합물[16,17]의 항암 활성을 비교하기 위하여 인체폐암세포를 대상으로 그들의 세포독성을 조사하였고, 이와 연관된 세포증식 억제

\*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

및 apoptosis 유발에 관여할 것으로 예상되는 중요한 유전자 몇 가지의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 세포배양

본 실험에 사용한 7가지의 furanoterpenoid 화합물[sarcotin A, *epi*-sarcotin A, ircinin-1, *epi*-sarcotrine B, sarcotin I, (8E,13Z,20Z)-strobilin/ (7E,13Z,20Z)-felixinin 및 (7E,12E,18R,20Z)-variabilin]은 제주도 근해에서 채집된 *Sarcotragus* sp.에서 분리된 것을 사용하였다[16,17]. 이들을 100% ethanol에 녹인 후 세포배양용 배지에 적정 농도로 희석하였으며, ethanol의 최종 농도는 0.1%를 넘지 않게 하였다. 인체 폐암세포 A549는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

#### MTT assay를 이용한 세포 생존율의 측정

A549 폐암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, 준비된 furanoterpenoids를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma) 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되도록 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하여 3시간 동안 배양한 다음, MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 well에 생성된 formazin을 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

Furanoterpenoids의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를 확인하기 위한 핵의 형태변화 관찰을 위하여 준비된 세포들을 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하고 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 형광현미경을 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다.

#### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

이상과 동일한 조건으로 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Table 1에 나열된 유전자를 중심으로 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, sense, 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'; antisense, 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3')를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

#### 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blot analysis

정상 및 furanoterpenoids가 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리기로 세포 내 잔사물을 분리시킨 다음 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bax	Sence	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
iNOS	Sence	5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
	Antisence	5'-CAC-AGA-GCT-GAG-GGT-ACA-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting 시킨 후, 10% skim milk가 함유된 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 상온에서 2시간 정도 반응시켜 비특이적인 단백질을 blocking 시켰다. 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 처리하여 1시간 이상 항원 항체반응을 일으킨 후, PBS-T로 충분히 세척하고 특정항체에 대한 이차항체를 1시간 정도 처리한 후, enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA) 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 정도를 분석하였다. 실험에 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 이차항체로 사용된 peroxidase-labeled sheep anti-mouse 및 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp.에서 구입하였다.

**결과 및 고찰**

**A549 암세포의 성장에 미치는 furanoterpenoid 화합물의 영향**

암세포의 증식에 미치는 furanoterpenoid 화합물의 세포 독성 정도를 비교하기 위하여 다양한 농도의 7가지의 furanoterpenoid 화합물이 희석되어 있는 배지에 A549 세포를 48 시간 동안 배양한 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 본 연구에 사용된 furanoterpenoids 화합물은 모두 약간의 정도 차이는 있지만 처리 농도 의존적으로 암세포의 증식을 강력히 억제하였다. 그중 가장 큰 세포 독성 효과를 보인 것은 sarcotin A이었으며, 그 다음은 (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilin로서 LC<sub>50</sub>은 약 15 µg/ml 및 20 µg/ml

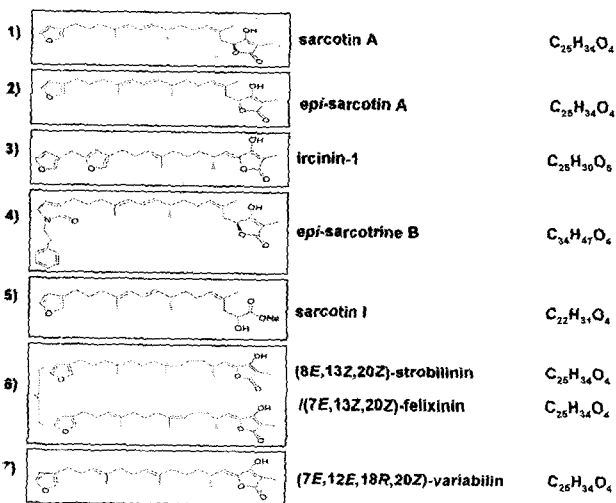


Fig. 1. Chemical structures of furanoterpenoids used in the present study.

정도였다. 이 결과는 실험 방법상의 차이점으로 선행연구의 결과와 직접 비교하기는 어려우나, 세포독성의 효과 면에서는 대체로 유사한 경향성을 보인다고 할 수 있겠다[16,17]. 이러한 furanoterpenoids의 세포독성 효과는 Fig. 3A에 나타낸 바와 같이 암세포의 전체적인 형태변화에도 큰 영향을 미쳤으며, 특히 고농도 처리군에서 많은 세포들이 부착력을 상실하고 배지로 부유하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 ircinin-1 및 epi-sarcotrine B 처리군에서는 암세포의 모양이 길어지면서 분지를 형성하는 듯한 특이한 형태적 변화를 관찰할 수 있었다. 따라서 이 두 furanoterpenoid는 암세포의 분화 가능성과 연관된 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**Furanoterpenoids에 의한 apoptosis의 유발**

다음은 이러한 furanoterpenoids의 세포 독성에 의한 암세포의 성장억제와 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 직접적인 연관성이 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 실시된 DAPI 염색의 결과는 Fig. 3B에 나타낸 바와 같다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 furanoterpenoids가 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 furanoterpenoids가 처리된 암세포의 경우, 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body[2,10]가 furanoterpenoids 처리 농도 의존적으로 증가되었다. 특히 apoptotic body의 형성이 상대적으로 많이 관찰된 것은 epi-sarcotin A, ircinin-1, epi-sarcotrine B 등이었으며, 그중 ircinin-1 처리군에서 가장 많은 apoptotic body를 관찰할 수 있었다. 즉 이러한 apoptotic body의 출현은 nucleosome의 linker DNA 부분의 절

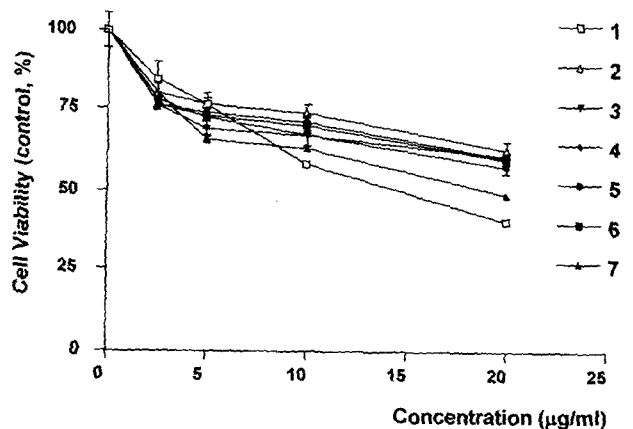


Fig. 2. Anti-proliferative effects of furanoterpenoids on the cell proliferation in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of furanoterpenoid compounds. After 48 h incubation with furanoterpenoid compounds, MTT assay was performed. Results are expressed as average from three separate experiments.

단에 의한 DNA 단편화의 결과[5,35]이므로 furanoterpenoids의 처리에 의한 암세포의 증식억제 및 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

**Bcl-2, Bax 및 p53의 발현에 미치는 furanoterpenoids의 영향**

이상의 결과에서 관찰된 furanoterpenoids의 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현을 조사하였다. 그중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다[5]. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endo-

nuclease 등의 활성을 조절한다[5,18,22]. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다[14,22].

Fig. 4는 10 µg/ml 및 20 µg/ml의 furanoterpenoids를 48 시간 동안 처리한 후 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사된 Bcl-2, Bax 및 p53의 발현 정도를 나타낸 것이다. 결과에서 알 수 있듯이 처리된 furanoterpenoids의 종류에 따라 조사된 3가지 유전자의 산물들이 다양한 발현의 차이를 보여줌을 알 수 있었다. 먼저 sarcotin A 및 (7E,12E,18R,20Z)-variabilin 처리군의 경우 전사 및 번역 수준에서 Bcl-2 및 Bax 발현에 큰 영향을 주지 않았다. 그러나 epi-sarcotin A, ircinin-1 및 epi-sarcotrine B 처리군에서 Bcl-2는 mRNA 및 단백질 수준의 발현이 모두 감소된 반면, Bax는 모두 강하게 증가되었음을 알 수 있었다. 그리고 sarcotin I 처리군에서 두 유전자 모두 전사 수준에서는 큰 차이점이 없었으나 단백질 발현의 정

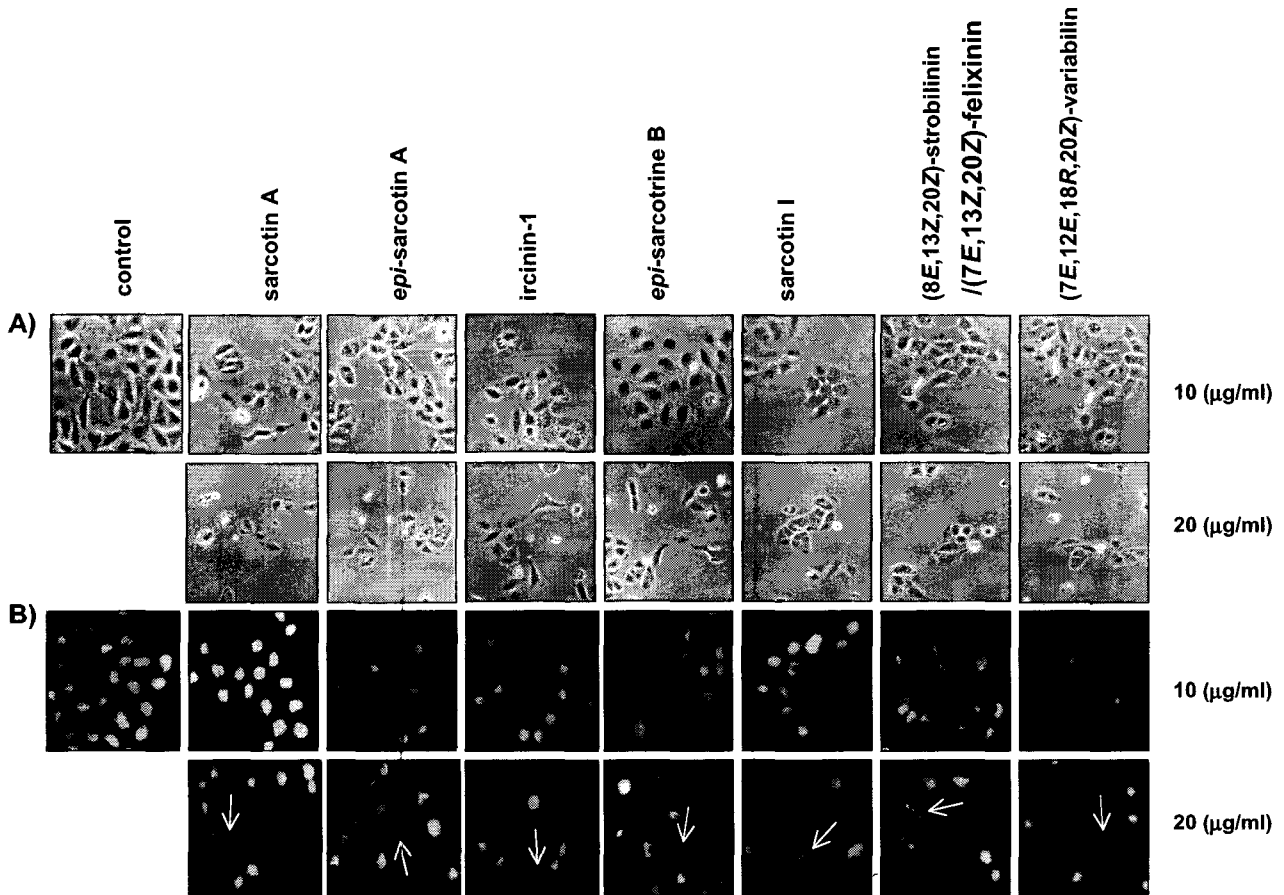


Fig. 3. (A) Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with furanoterpenoid compounds. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (control) or furanoterpenoid compounds for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, ×200. (B) Induction of apoptotic bodies by treatment with furanoterpenoid compounds in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with furanoterpenoid compounds for 48 h, and fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

도에서는 Bcl-2가 다소 감소되었으며, Bax는 약간 증가함을 관찰할 수 있었다. 반면, (8E,13Z,20Z)-strobilinin/(7E,13Z, 20Z)-felixinin 처리군에서는 Bcl-2의 발현만이 상대적으로 감소함을 알 수 있었다. 즉 sarcotin A 및 (7E,12E,18R,20Z)-variabilin 처리군을 제외한 모든 furanoterpenoids 화합물 처리군에서 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 유전자에 대한 apoptosis 유도에 관여하는 Bax 유전자의 상대적 발현이 매우 증가하였음을 관찰할 수 있었으며, 이는 이들 furanoterpenoids 에 의한 apoptosis 유발의 한 기전으로 해석될 수가 있을 것으로 추정된다.

한편 p53의 경우 전사 수준에서는 모든 furanoterpenoids 화합물 처리군에서 거의 유의적인 차이점을 볼 수 없었으나, 단백질 발현의 정도에는 ircinin-1, sarcotin I 및 (8E,13Z, 20Z)-strobilinin/(7E,13Z, 20Z)-felixinin 처리군에서 처리 농도 의존적으로 증가되었는데, 특히 ircinin-1 처리군에서 가장 큰 발현의 증가를 관찰할 수 있었다. 그러나 mRNA 수준에서의 차이점 없이 단백질의 발현만이 증가되었다는 흥미로운 결과는 몇 가지의 가능성을 시사하여 준다. 먼저 p53 유전자의 번역 후 조절에 관한 가정으로 p53 단백질의 sta-

bility의 상대적인 증가를 고려할 수 있을 것이고, 또한 전사 수준의 변화 없이 단백질로의 상대적인 번역율의 증가 또는 p53 단백질이 ubiquitin/proteasome 경로를 통한 빠른 단백질 분해를 일으키는 대표적인 단백질의 하나인 점을 고려해 볼 때 ubiquitin/proteasome 활성의 변화 등도 고려해 볼 수 있겠다[3,4,19]. 그러나 어떠한 형태로든지 p53 단백질의 축적이 증가되었다는 것은 Bax의 발현에 변화를 주거나[18, 20,22] 세포주기 조절에 가장 중요한 음성 조절인자 중의 하나인 Cdk inhibitor p21(WAF1/CIP)의 발현 증가[9,13] 등을 초래할 수 있을 것이므로 여기에 관한 보다 깊이 있는 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각한다.

**Cyclooxygenases (COXs)의 발현에 미치는 furanoterpenoids의 영향**

한편 염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin 은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다[12]. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는

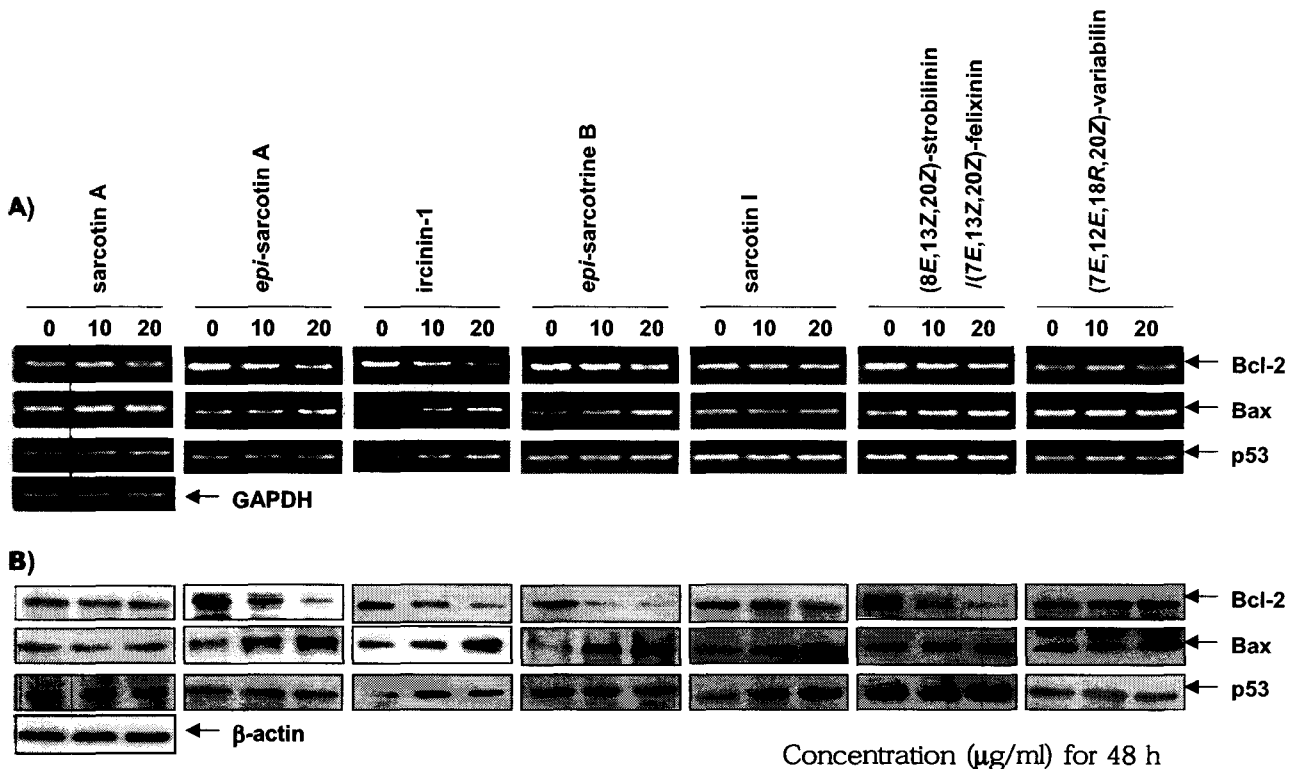


Fig. 4. Effects of furanoterpenoid compounds on the levels of Bcl-2, Bax and p53 in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with furanoterpenoid compounds for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with furanoterpenoid compounds for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다 [8,32]. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다[12,30]. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암 조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 특이적 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방 전략이 대두되고 있다[23,30]. 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자발현을 유도하는 nuclear factor kappa B에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다[30,34]. 따라서 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비

중을 두고 있다.

이러한 선행 연구에 준하여 furanoterpenoids가 처리된 A549 폐암세포를 대상으로 COXs 및 iNOS의 발현 변화 가능성을 조사하여 보았다. Fig. 5의 결과에서 볼 수 있듯이 조사된 furanoterpenoids 거의 대부분은 COX-1 및 iNOS의 발현에 큰 영향을 주지 않았다. 그러나 *epi-sarcotin A*와 *ircinin-1* 처리군에서는 COX-1의 발현 변화 없이 COX-2의 mRNA 및 단백질의 발현이 모두 처리 농도 의존적으로 매우 감소함을 관찰할 수 있었다. 따라서 *epi-sarcotin A*와 *ircinin-1*은 염증을 포함한 암, Alzheimer 등의 병적 현상에 매우 중요한 prostaglandin의 생성[1,28]을 충분히 억제할 수 있을 것으로 사료되며, 이에 관한 연구를 해볼 가치가 매우 높은 것으로 생각된다. 또한 COX-2는 종양촉진자, 성장인자, 염증성 cytokine 등에 의하여 매우 빨리, 강하게 유발될 수 있으며[11, 27], COX-2의 과발현은 많은 실험 동물에서 종양형성을 촉진할 수 있고 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 잘 알려져 있다[11,29,31]. 특히 *epi-sarcotin A*와 *ircinin-1* 처리군에서 Bcl-2의 발현 감소 및 Bax의 발현 증가와 상대적인 apoptotic body의 형성 빈도가 높았다는 점은 서로 어느 정도의 상관성을 가지는 것으로 추정된다. 따라서 이 두 furanoterpen-

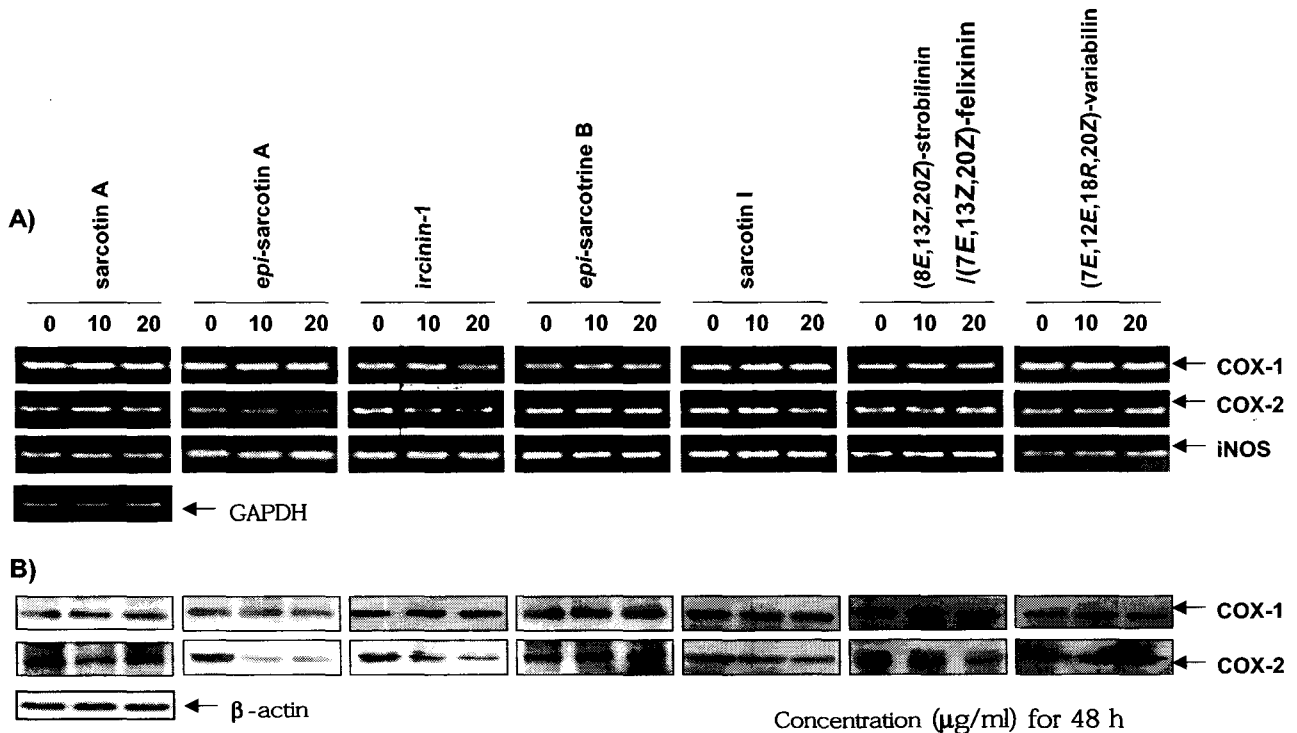


Fig. 5. Effects of furanoterpenoid compounds on the levels of COXa and iNOS A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with furanoterpenoid compounds for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with furanoterpenoid compounds for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

oids 화합물은 Bcl-2의 과발현 세포주 작성을 통한 COX-2 및 apoptosis 유발과의 상관관계에 관한 깊은 연구가 더욱 절실히 요구되는 물질로서 연구의 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서 국내 연근해에 서식하는 해면 *Sarcotragus* sp. (Dictyoceratida 속)에서 분리 추출된 7종의 furanoterpenoid 계 화합물[sarcotin A, *epi*-sarcotin A, ircinin-1, *epi*-sarcotrine B, sarcotin I, (8E,13Z,20Z)-strobilinil/(7E,13Z, 20Z)-felixinin and (7E,12E,18R,20Z)-variabilin]의 항암 활성을 비교하기 위하여 A549 인체폐암세포를 대상으로 그들의 세포독성을 조사하였고, 이와 연관된 세포증식 억제 및 apoptosis 유발에 관여할 것으로 예상되는 중요한 유전자 몇 가지의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 조사된 7종의 화합물 모두 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 증식을 억제하였는데, 그중 sarcotin A 및 (7E,12E,18R,20Z)-variabilin이 비교적 높은 세포독성을 나타내었다. 이러한 세포증식의 억제는 종양억제 유전자 p53 의존적 또는 비의존적으로 Bcl-2 유전자에 대한 Bax의 발현 증가와 연관된 apoptosis 유발과 관련이 있었으며, *epi*-sarcotin A, ircinin-1 및 *epi*-sarcotrine B 처리군에서 이러한 현상은 두드러지게 관찰되었다. 또한 *epi*-sarcotin A와 ircinin-1은 COX-1의 발현에는 아무런 영향을 미치지 않았으나, COX-2의 발현은 선택적으로 저해하였다. 이러한 결과는 해양 해면동물에서 유래된 furanoterpenoid계 화합물이 선택적으로 강력한 항암효과를 가질 수 있다는 것을 의미한다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, W. F., A. Umar, J. L. Viner and E. T. Hawk. 2002. The role of cyclooxygenase inhibitors in cancer prevention. *Curr. Pharm.* **8**, 1035-1062.
- Arends, M. J., R. G. Morris and A. H. Wyllie. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* **136**, 593-608.
- Balint, E. E. and K. H. Vousden. 2001. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br. J. Cancer* **85**, 1813-1823.
- Blagosklonny, M. V. 2002. p53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int. J. Cancer* **98**, 161-166.
- Chiarugi, V., L. Magnelli and G. Basi. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 603-612.
- Cohen, S. and L. Ellwein. 1990. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* **249**, 1007-1011.
- Cunningham, M. L. 1996. Role of increased DNA replication in the carcinogenic risk of nonmutagenic chemical carcinogens. *Mutat. Res.* **365**, 59-69.
- Dempke, W., C. Rie, A. Grothey and H. J. Schmoll. 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**, 411-417.
- El-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietenpol, M. Burrell, D. E. Hill, Y. Wang, K. G. Wiman, W. E. Mercer, M. B. Kastan, K. W. Kohn, S. J. Elledge, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**, 1169-1174.
- Evans, V. G. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* **17**, 461-476.
- Gately, S. and R. Kerbel. 2003. Therapeutic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the management of tumor angiogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* **37**, 179-192.
- Giercksky, K. E. 2001. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **15**, 821-833.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S. J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hockenbery, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Millman and S. L. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241-251.
- Lieberthal, W., J. S. Koh and J. S. Levine. 1998. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol.* **18**, 505-518.
- Liu, Y., B. H. Bae, N. Alam, J. Hong, C. J. Sim, C. O. Lee, K. S. Im and J. H. Jung. 2001. New cytotoxic sesterterpenes from the sponge *Sarcotragus* species. *J. Nat. Prod.* **64**, 1301-1304.
- Liu, Y., J. Hong, C. O. Lee, K. S. Im, N. D. Kim, J. S. Choi and J. H. Jung. 2002. Cytotoxic pyrrolo- and furanoterpenoids from the sponge *Sarcotragus* species. *J. Nat. Prod.* **65**, 1307-1314.
- Lowe, S. W., H. E. Ruley, T. Jacks and D. E. Housman. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**, 957-967.
- Michael, D. and M. Oren. 2003. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 49-58.
- Miyashita, T. and J. C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
- Pitot, H. C. and A. E. Sirica. 1980. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **605**, 191-215.
- Rosse, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen and C. B. Borner. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**, 496-499.
- Sawaoka, H., S. Tsuji, M. Tsujii, E. S. Gunawan, Y. Sasaki, S. Kawano and M. Hori. 1999. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. *Lab. Invest.* **79**, 1469-1477.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459.

25. Searle, J., J. F. Kerr and C. J. Bishop. 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* **17**, 229-259.
26. Shi, L., W. K. Nishioka, J. Th'ng, E. M. Bradbury, D. W. Litchfield and A. H. Greenberg. 1994. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* **263**, 1143-1145.
27. Smith, W. L., D. L. DeWitt and R. M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 145-182.
28. Soh, J. W. and I. B. Weinstein. 2003. Role of COX-independent targets of NSAIDs and related compounds in cancer prevention and treatment. *Prog. Exp. Tumor Res.* **37**, 261-285.
29. Stratton, M. S. and D. S. Alberts. 2002. Current application of selective COX-2 inhibitors in cancer prevention and treatment. *Oncology (Huntingt)* **16**, S37-51.
30. Surh, Y. J., K S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park and S. S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat. Res.* **480**, 243-268.
31. Umar, A., J. L. Viner, W. F. Anderson and E.T. Hawk. 2003. Development of COX inhibitors in cancer prevention and therapy. *Am. J. Clin. Oncol.* **26**, S48-57.
32. Vainio, H. 2001. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer* **94**, 613-614.
33. Wyllie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
34. Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **107**, 135-142, 2001.
35. Zimmermann, K. C., C. Bonzon and D. R. Green. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* **92**, 57-70.