

목향에서 분리한 dehydrocostuslactone의 CDK2 활성저해

전용진 · 이홍섭 · 연승우* · 고종희 · 안경미 · 유승우 · 강재훈 · 황방연¹ · 김태용
일동제약주 중앙연구소, ¹충북대학교 약학대학

Inhibitory Effects of Dehydrocostuslactone Isolated from *Saussureae Radix* on CDK2 Activity

Yong-Jin Jeon, Hong Sub Lee, Seung Woo Yeon*, Jong Hee Ko, Kyung-Mi An,
Seung-Woo Yu, Jae-Hoon Kang, Bang Yeon Hwang¹, and Tae-Yong Kim

ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co. Ltd., Yongin 449-910, Korea
¹College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – *Saussureae Radix*, the dried root of *Saussurea lappa* Clarke, has been traditionally used for alleviating pain in abdominal distention and tenesmus, indigestion with anorexia, dysentery, nausea, and vomiting. Here we observed that methanol extracts of *Saussureae Radix* inhibited CDK2 activities *in vitro*. This inhibitory compound was isolated and identified as dehydrocostuslactone, one of the major constituents of *Saussureae Radix*. It is well known that dehydrocostuslactone induces apoptotic cell death. In this study, we also showed that dehydrocostuslactone inhibited cellular Rb phosphorylation and blocked cell growth at the concentration below 12 µg/ml at which apoptotic cell death was not observed. Taken together, these results indicated that dehydrocostuslactone showed its anti-proliferative effects through the inhibition of CDK2 activity as well as the induction of apoptotic cell death.

Key words – CDK2, *Saussureae Radix*, dehydrocostuslactone, cell cycle

진핵세포는 G₀/G₁, S, G₂ 및 M기를 순차적으로 거쳐 세포분열하며 이때 각 세포분열 주기는 주기 특이적으로 활성화되는 cyclin dependent kinase (CDK)들에 의해 조절된다. 각 분열주기에서 발현되는 cyclin과 결합하여 활성화된 CDK는 해당 분열 주기의 완성 및 다음 주기로 이행을 촉진시킨다. 특히 세포분열 시작 단계인 G₁기에 작용하는 cyclin D/CDK4와 cyclin E/CDK2는 Retinoblastoma (Rb) 단백질을 인산화 시킴으로써 결합하고 있던 전사인자 E2F1을 Rb에서 방출시켜 DNA 합성에 필요한 단백질들의 발현을 유도한다.^{1,2)} 이처럼 CDK2 및 4는 세포분열을 시작하게 하고 DNA 복제가 일어나는 S기로의 이행을 촉진시키는 중요한 역할을 하므로 그 작용기전과 관련된 많은 연구가 진행되었으며³⁾ 또한 그 활성이 암세포에서 상대적으로 높은 것으로 알려져⁴⁾ 활성 저해 물질들을 항암제로서 개발 중에 있다.⁵⁾

본 연구에서도 국산 약용식물을 대상으로 CDK2 저해효

과를 탐색하여 목향 (*Saussureae Radix*) 메탄올 추출물이 저해활성을 보이는 것을 확인하였다. 목향은 국화과의 다년생 식물인 *Saussurea lappa* Clarke의 말린 뿌리로서 한의학에서는 구토, 설사 및 염증치료 등에 사용되고 있다. 또한 주요 성분인 sesquiterpene lactone 계열인 costunolide와 dehydrocostuslactone은 항 바이러스 및 항균 작용,^{6,7)} 항 염증 작용,⁸⁾ iNOS의 생성억제,⁹⁾ 혈관생성 억제¹⁰⁾ 및 암세포 주 증식 억제^{11,12)} 등 많은 약리 작용이 있다. 본 연구에서는 목향 메탄올 추출물에서 분리한 dehydrocostuslactone의 CDK2 활성 저해 효과와 세포 증식억제 효과에 대하여 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 – 본 연구에 사용한 목향은 경동시장에서 구입하였다. PARP (poly ADP ribose polymerase) antibody, Rb antibody, pRb (Ser780) antibody, Rb-C fusion protein과 활성화형 CDK2는 New England BioLab Inc. (Beverly, MA)에

*교신저자(E-mail) : swyeon@ildong.com
(FAX) : +82-31-287-1800

서 구입하였고, 나머지 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. CDK4 및 CDK2 활성 저해제 대조 약물인 flavopiridol은 Kattage 등의 방법¹³⁾을 참조하여 자체적으로 합성하여 시험에 사용하였다.

세포 배양 - A549 세포와 HCT116 세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 시험에 사용하였다. 각 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT, USA)을 함유한 DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, High Glucose, HyClone) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 분압조건으로 배양하였고 계대배양은 trypsin 용액 (0.25% trypsin, 0.02% EDTA)을 처리하여 수행하였다.

Dehydrocostuslactone 분리 - 목향을 100% 메탄올로 2 일 동안 추출하여 농축하고 농축액의 10배 부피의 아세톤을 가하여 침전물을 제거 후 상층액을 회수하여 농축하였다. 농축액에 톨루엔을 가하여 현탁 후 현탁액의 5배 부피의 헥산을 처리하여 침전물을 제거하고 농축하였다. 이후 silica 및 LH20 column chromatography를 수행하여 95% 이상의 순도로 저해물질을 분리 (Fig. 1)하였다. LC/MS, ²H- 및 ¹³C-NMR 기기 분석하여 저해물질이 dehydrocostuslactone임을 확인하였다.

MTT assay - 세포 증식억제효과는 MTT법으로 측정하였다. MTT assay에 사용된 세포주는 A549와 HCT116으로써 한국 세포주 은행에서 분양 받아 시험에 사용하였다. 96-well plate에 1 × 10⁴/90 μl/well의 농도로 A549 세포와 HCT116 세포를 분주하여 1일 동안 배양 후 DMSO에 용해한 각 물질을 최종농도가 1%가 되도록 배양액으로 희석하

고 A549세포와 HCT116세포에 처리하여 3일 동안 배양하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, 5 mg/ml in PBS]용액을 각 well당 15 μ씩 첨가하여 4시간동안 37°C에서 반응시키고 well당 100 μ의 lysis buffer (0.01 N HCl, 10% SDS)를 처리하여 형성된 formazan이 완전히 용해되도록 37°C에서 24시간 동안 방치한 후 570/652 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Apoptosis 유도 여부 확인 - 6-well plate에 1 × 10⁶/well의 A549 세포와 HCT116 세포를 분주하여 16시간 동안 배양한 다음 DMSO에 용해한 각 물질을 최종농도가 1%가 되도록 시료에 처리 하여 24시간동안 배양하였다. Protease inhibitor cocktail과 2 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF가 첨가된 lysis buffer (50 mM Tris-Cl, pH7.6, 180 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100)로 단백질을 추출한 뒤 10% SDS PAGE gel에서 분리하고 PVDF membrane에 transfer한 뒤 PARP antibody를 이용하여 Western blot을 수행하였다.

DNA fragmentation 시험도 시료 처리조건은 동일하였다. 세포를 모은 후 450 μl의 cell lysis buffer (5 mM Tris-Cl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS, 50 μg/ml proteinase K, 100 μg/ml RNase)로 현탁하여 45°C에서 1 시간동안 방치하였다. Phenol : chloroform (=25 : 24)을 처리하여 여분의 단백질을 제거하고 ethanol 침전 및 20 μl의 TE buffer에 녹인 뒤 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 DNA fragmentation을 확인하였다.

세포 내 Rb 단백질 인산화 측정 - Rb 단백질 및 이의 인산화를 확인하기 위해서 protease inhibitor cocktail과 2 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF가 첨가된 high salt lysis buffer (50 mM Tris-Cl, pH7.6, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100)로 단백질을 추출하여 6% SDS PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane에 transfer 후 Rb 단백질 및 이의 780번 serine 인산화를 특이적으로 인지하는 antibody들을 사용하여 Rb 단백질의 인산화 정도를 조사하였다.

In vitro CDK2 활성측정 - In vitro CDK2 assay를 수행하기 위한 반응액으로 활성형 CDK2 5 unit과 1X kinase buffer, 전체 반응액 1/10 부피의 추출물을 혼합한 뒤 30°C에서 10분간 전처리 하였다. 전체 반응액 1/10부피의 2 mM ATP와 0.1 μg의 Rb-C fusion protein을 첨가하고 30°C에서 30분간 방치한 뒤, 반응액을 8% SDS PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane에 transfer후 Rb 단백질의 780번 serine 인산화를 특이적으로 인지하는 antibody를 사용하여 Western blot을 수행하였다.

결과 및 고찰

In vitro CDK2 활성 저해성분 분리 - CDK4 및 CDK2 활성저해제인 flavopiridol을 대조 약물로 하여 in vitro

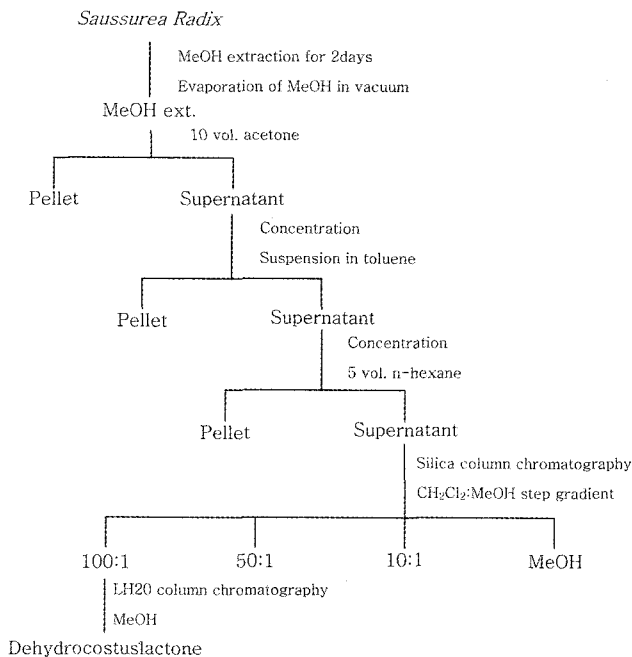


Fig. 1. Isolation of dehydrocostuslactone from *Saussurea Radix*.

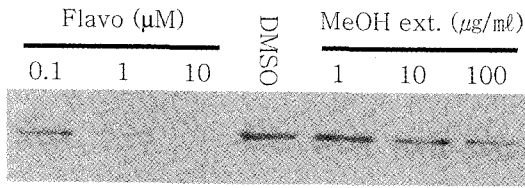


Fig. 2. Inhibitory effects of methanol extract from *Saussurea Radix* on CDK2 activity. Flavo, flavopiridol; MeOH ext., methanol extract from *Saussurea Radix*.

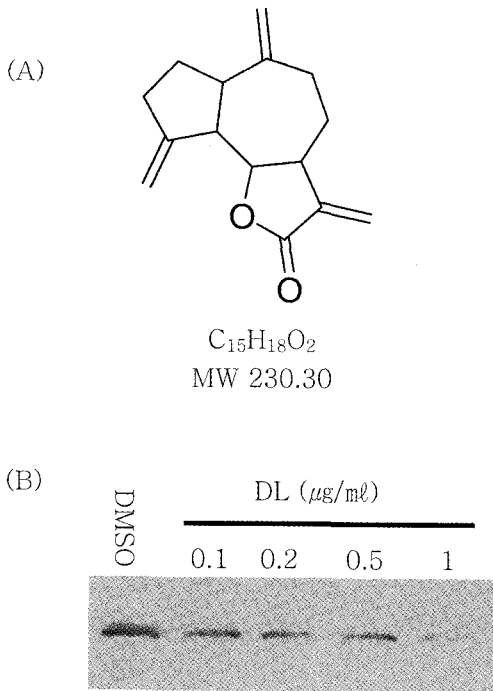


Fig. 3. Structure of dehydrocostuslactone and its inhibition of CDK2 activity. DL, dehydrocostuslactone.

CDK2 활성을 저해하는 생약추출물을 검색 중 목향 메탄올 추출물의 저해활성 (Fig. 2)을 확인하였으며 ($IC_{50} = 56 \mu\text{g/ml}$), 또한 유효성분을 분리하였다. CDK2 활성 저해물질은 목향의 주요 성분의 하나인 dehydrocostuslactone (Fig. 3A)이었으며, 최저 처리 농도인 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 에서도 농도 의존적인 저해효과 (Fig. 3B)를 보였다. 분리과정 중 목향의 주요 구성 성분인 costunolide의 CDK2 저해활성도 확인하였으나 상대적으로 저해 활성이 낮아 본 연구는 dehydrocostuslactone에 초점을 두고 수행하였다.

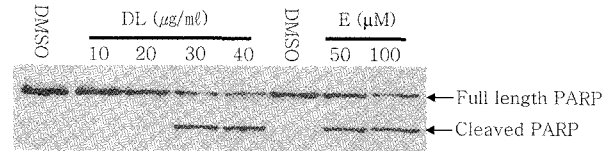
세포 증식 억제효과 - 분리한 dehydrocostuslactone의 세포 증식억제 효과 (Table I)를 MTT법으로 확인하였다. Dehydrocostuslactone은 A549세포에서는 $3.63 \mu\text{g/ml}$, HCT116세포에서는 $2.41 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 50%의 세포 증식 억제 효과를 보였다.

Dehydrocostuslactone의 apoptosis 유도효과 - Dehy-

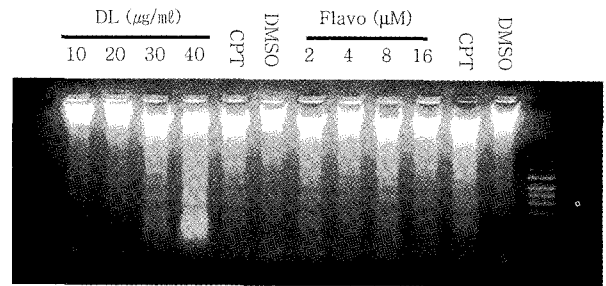
Table I. Anti-proliferative effects of dehydrocostuslactone.

Cell line	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
A549	3.63
HCT116	2.41

(A) PARP cleavage



(B) DNA fragmentation



(C) Cell morphology

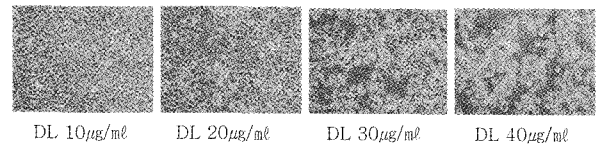


Fig. 4. Apoptosis induction by dehydrocostuslactone. (A) PARP cleavage, (B) DNA fragmentation and (C) morphological changes. E, etoposide; CPT, camptothecin; Flavo, flavopiridol.

drocostuslactone의 세포증식 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 조사하였다. Apoptosis는 PARP 단백질의 분해와 DNA fragmentation 유도를 조사함으로써 확인하였다. Dehydrocostuslactone을 A549 세포에 처리 시 $20 \mu\text{g/ml}$ 에서 PARP절단 (Fig. 4A)이 관찰되었다. 대조약물로 사용한 etoposide와 마찬가지로 dehydrocostuslactone은 농도 의존적으로 PARP 분해 산물을 증가시켰다. 또한 dehydrocostuslactone은 $20 \mu\text{g/ml}$ 부터 DNA fragmentation (Fig. 4B)을 일으키는 것을 확인하였다. 대조 약물로 사용한 flavopiridol은 최저 농도인 $2 \mu\text{M}$ 처리 시에도 DNA fragmentation을 유도하였다. Dehydrocostuslactone 처리에 의해 PARP 단백질의 분해와 DNA fragmentation이 관찰된다는 것은 dehydrocostuslactone이 caspase-3를 활성화시켜 암세포의 apoptosis를 유도한다는 것을 의미한다.

Rb 단백질 인산화 저해효과 - 앞서의 결과들에 의하면 dehydrocostuslactone은 apoptosis를 유도하는 물질이라는 것을 알 수 있다. 이는 costunolide와 dehydrocostuslactone이

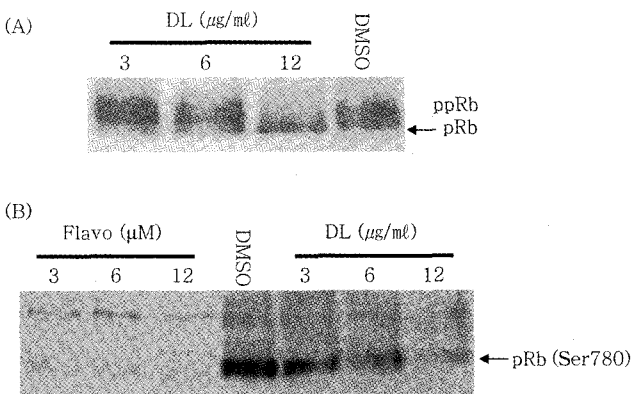


Fig. 5. Inhibition of Rb phosphorylation by dehydrocostuslactone. Flavo, flavopiridol; DL, dehydrocostuslactone; pRb, retinoblastoma protein; ppRb, hyperphosphorylated forms of pRb.

apoptosis를 유도한다는 다른 연구 결과들^{14,15)}과 일치하는 것이다. 이외에 본 연구에서 dehydrocostuslactone이 *in vitro* CDK2 활성을 저해한다는 것을 새롭게 확인하였다. 이것은 dehydrocostuslactone이 세포 내 CDK2 활성 저해를 통해 세포증식 억제효과를 보일 수 있다는 것을 의미한다. CDK2는 CDK4와 함께 Rb 단백질을 인산화시켜 G₁기에서 S기로의 세포분열주기를 이행시키므로 이들의 활성이 저해된다면 Rb 단백질의 인산화가 억제 되고 이로 인하여 세포분열은 멈추게 된다. Dehydrocostuslactone의 *in vitro* CDK2 활성 저해효과가 세포에 처리 시에도 나타나는지 확인하고자 Rb 단백질 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. Dehydrocostuslactone은 apoptosis를 유도하므로 이의 영향을 최소로 하면서 세포증식 억제효과를 보이는 농도를 먼저 결정하였다. PARP 단백질 분해와 DNA fragmentation 결과에 의하면 dehydrocostuslactone은 20 µg/ml 이하에서는 apoptosis를 유도하지 않았고 세포 형태도 정상적 (Fig. 4C)이었다. 따라서 이보다 낮은 농도에서 dehydrocostuslactone을 처리하여 Rb 단백질의 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. Dehydrocostuslactone 처리는 Rb 단백질의 농도에는 영향을 주지 않았으나 인산화는 최고 처리 농도인 12 µg/ml까지 농도의존적으로 억제 (Fig. 5A)하였다. 또한 Rb 단백질의 780번 serine의 인산화를 인지하는 antibody를 사용하여 인산화 된 Rb를 조사 시에도 dehydrocostuslactone 처리는 780번 serine의 인산화를 농도 의존적으로 억제하였다. 대조약물로 사용한 CDK4 및 CDK2 활성저해제인 flavopiridol은 3 µM 이하에서도 780번 serine의 인산화를 완전히 억제 (Fig. 5B)하는 것을 확인할 수 있었다.

Rb 단백질의 인산화는 세포 내에서 CDK4 및 CDK2 활성에 의하여 일어난다. 세포 내에서 CDK4 및 CDK2의 활성은 p16^{INK4A} 및 p21^{WAF/CIP} 등의 활성저해 단백질들에 의해 조절된다.¹⁶⁾ 세포주기 진행에 문제가 발생하면 활성저해 단

백질들의 발현이 증가하게 되고 이들은 CDK4 및 CDK2와 결합하여 그 활성을 억제한다. 따라서 dehydrocostuslactone 처리가 Rb 단백질 인산화를 억제한 것은 활성저해 단백질들의 발현 증가에 의해 일어난 결과일 가능성도 있다. 그러나 dehydrocostuslactone이 *in vitro*에서 CDK2 활성을 저해한 것으로 보면 Rb 단백질 인산화 억제는 세포 내 CDK2 활성의 직접 저해 결과로 보여진다. 이와 함께 Rb 단백질을 기질로 하는 CDK4 활성 또한 저해할 수 있으므로 이에 대한 조사가 요구된다. 향후 dehydrocostuslactone이 CDK4 활성을 저해하는지 조사할 예정이며 이와 더불어 실제로 세포 분열을 억제하는지 세포분열주기 분석을 통해 조사하고자 한다.

이상의 결과들을 종합하면 dehydrocostuslactone은 CDK2의 활성을 저해하며 이는 세포분열주기 억제로 이어져 세포증식억제효과의 주요 작용기전으로써 관여할 것으로 추정된다.

결 론

목향 메탄올 추출물에서 *in vitro* CDK2 활성저해 성분을 분리 및 구조 분석하여 sesquiterpene lactone 계열의 dehydrocostuslactone임을 밝혔다. 또한 dehydrocostuslactone은 apoptosis 유도 뿐 아니라 CDK2 활성 저해를 통해 세포증식억제효과를 보인다는 것을 본 연구를 통해 알 수 있었다.

인용문헌

- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev.* **13**: 1501-1512.
- Adams, P. D. (2001) Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim. Biophys. Acta* **1471**: M123-M133.
- Kato, J. (1999) Induction of S phase by G₁ regulatory factors. *Front. Biosci.* **4**: D787-D792.
- Donnellan, R. and Chetty, R. (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol. Pathol.* **51**: 1-7.
- Fry, D. W., Bedford, D. C., Harvey, P. H., Fritsch, A., Keller, P. R., Wu, Z., Dobrusin, E., Leopold, W. R., Fattaey, A., and Garrett, M. D. (2001) Cell cycle and biochemical effects of PD 0183812. A potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *J. Biol. Chem.* **276**: 16617-16623.
- 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 cells. *Antiviral Res.* **27**: 99-109.
- Wedge, D. E., Galindo, J. C., and Macias, F. A. (2000) Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochem.* **53**: 747-757.

8. Park, H. J., Jung, W. T., Basnet, P., Kadota, S., and Namba, T. (1996) Syringin 4-O-beta-glucoside, a new phenylpropanoid glycoside, and costunolide, a nitric oxide synthase inhibitor, from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *J. Nat. Prod.* **59**: 1128-1130.
9. Matsuda, H., Toguchida, I., Ninomiya, K., Kageura, T., Morikawa, T., and Yoshikawa, M. (2003) Effects of sesquiterpenes and amino acid-sesquiterpene conjugates from the roots of *saussurea lappa* on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* **11**: 709-715.
10. Jeong, S. J., Itokawa, T., Shibuya, M., Kuwano, M., Ono, M., Higuchi, R., and Miyamoto, T. (2002) Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway. *Cancer Lett.* **187**: 129-133.
11. Choi, J. H., Seo, B. R., Seo, S. H., Lee, K. T., Park, J. H., Park, H. J., Choi, J. W., Itoh, Y., and Miyamoto, K. (2002) Costunolide induces differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Arch. Pharm. Res.* **25**: 480-484.
12. Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F., and Miglietta, A. (2004) A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells. *Chem. Biol. Interact.* **147**: 79-86.
13. Kattage, S. L., Naik, R. G., Lakdawalla, A. D., Dohadwalla, A. N., Rupp, R. H., and Desouza, N. J. (1990) 4H-1-benzopyran-4-one compounds which have anti-inflammatory or immunomodulating action. U.S. Patent 4,900,727
14. Park, H. J., Kwon, S. H., Han, Y. N., Choi, J. W., Miyamoto, K., Lee, S. H., and Lee, K. T. (2001) Apoptosis-Inducing costunolide and a novel acyclic monoterpene from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 342-348.
15. Lee, M. G., Lee, K. T., Chi, S. G., and Park, J. H. (2001) Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrom C release. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 303-306.
16. Pavletich, N. P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**: 821-828.

(2005년 3월 9일 접수)