

### 3-메톡시-6-알릴치오피리다진의 사람 췌장암 세포 사멸작용

강영신\* · 서연원\*\* · 권순경 · 정춘식 · 이용수#

덕성여자대학교 약학대학, \*미국 국립보건원 세포생리학교실, \*\*중앙대학교 의약식품대학원  
(Received July 27, 2005; Revised August 3, 2005)

## Induction of Apoptosis by 3-Methoxy-6-Allylthiopyridazine in Human Pancreatic Cancer Cells

Young Shin Kang\*, Yeon Won Suh\*\*, Soon-Kyoung Kwon, Choon Sik Jeong and Yong Soo Lee#

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

\*Department of Cell Physiology, NHLBI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA

\*\*Graduate School of Food and Drug Administration, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — In this study we investigated the effect of 3-methoxy-6-allylthiopyridazine on cell growth in BxPC3 and PANC1 human pancreatic cancer cells. The treatment with 3-methoxy-6-allylthiopyridazine for 48 h decreased cell viability and induced apoptotic cell death in a dose-dependent manner, assessed by using the MTT assay and the flow cytometry, respectively. These results suggest that 3-methoxy-6-allylthiopyridazine may be a good candidate for the therapeutic management of human pancreatic cancers.

**Keywords** □ 3-methoxy-6-allylthiopyridazine, pancreatic cancer cell, BxPC3, PANC1, apoptosis

췌장암은 서구에서 흔히 볼 수 있는 암으로 국내에서도 현재 그 발생률이 증가하고 있는 추세이다.<sup>1,2)</sup> 췌장은 해부학적으로 후복막에 깊이 위치하고 두께가 얇은 특징을 갖고 있기 때문에 췌장에 발생한 암은 조기증상이 없으며 비교적 초기부터 주위의 활력장기로 침윤하므로 절제가 가능한 경우가 적고 수술한 후에도 이환율이 높다. 최근, 충분한 췌장절제, 광범위한 림프절 및 후복막 신경총 광청, 주요혈관 합병절제 등의 도입으로 근치적 절제율의 향상을 보이고 있으나 장기 생존율은 기대만큼 나아지지 않고 있으며 소화기암 중 가장 예후가 불량한 암의 하나로 남아 있다.<sup>3,4)</sup> 따라서, 췌장암세포에 대해 선택적으로 작용하여 그 성장을 억제하거나 세포사멸을 유도하는 약물의 개발이 절실히 요구되고 있다.

마늘의 주성분인 유기황화합물은 항균, 항진균, 항혈전, 콜레스테롤 저하, 항암 및 간보호 활성을 가지고 있음이 밝혀졌다.<sup>5)</sup> 디알릴설파이드(diallylsulphide) 화합물은 종양세포의 증식 및 동

물실험에서 화학물질에 의한 발암작용을 억제하는 효과가 확인되었으며,<sup>6)</sup> 유탕을 함유한 합성물질인 oltipraz나 sulindac 또한 암예방 및 간보호 작용을 가진다는 사실이 밝혀졌다.<sup>6-8)</sup> 최근 황 함유 피리다진 유도체의 생리 및 약리학적 활성이 알려지고 있는데,<sup>9,10)</sup> 본 연구실에서는 피리다진 환에 알릴치오피리다진으로써 암예방 및 항암효과를 지닌 새로운 알릴치오피리다진 유도체를 합성한 바 있다.<sup>11,12)</sup> 특히, 이 화합물의 파라위치에 알콕시 잔기로서 메칠기를 가지고 있는 3-메톡시-6-알릴치오피리다진 화합물(Fig. 1)을 K-6라 명명하였는데 이것은 SK-Hep-1 간암세포에 대해 세포사멸효과를 나타내었고,<sup>13)</sup> MMP-2 유전자의 발현저하를 통한 암세포의 침윤과 이동성을 저해하는 작용을 보였으며,<sup>14)</sup> 털 없는 생쥐(nude mice)에 사람 암세포를 이식한 실험에서도 우수한 항암효과를 나타내었다.<sup>15,16)</sup> 이 화합물은 또한 쥐에서 아플라독소 B1에 의한 간독성을 감소시키는 작용을 가진다는 사실도 밝혀졌다.<sup>17)</sup>

본 연구에서는 K-6 화합물이 난치성 소화기계 암인 췌장암 세포에 대한 항암작용을 가지고 있는지를 확인하기 위해 세포성장 및 세포사멸에 미치는 영향을 검토하여 유효성을 확인하였으므로 이에 보고하고자 한다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-901-8396 (팩스) 02-901-8386  
(E-mail) yongslee@duksung.ac.kr

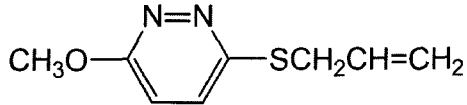


Fig. 1 - Chemical structure of K-6(3-methoxy-6-allylthiopyridazine).

## 실험 방법

### 시약 및 실험재료

실험에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA는 Gibco-BRL(Grand Island, NY)에서 구입하여 사용하였다. BxPC3와 PANC1 사람 췌장암세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA)에서 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT), propidium iodide(PI), dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였으며 기타 모든 시약들은 특급 시약을 사용하였다.

### K-6(3-메톡시-6-알릴치오피리다진)의 제조

K-6 화합물은 이전에 보고한 방법대로 피리다진을 모핵으로 하여 합성하였다.<sup>12,13</sup> 간단히 설명하면, 3,6-dichloropyridazine에서 3-methoxy-6-chloropyridazine을 얻은 다음, 이 halide와 allylmercaptane과 반응시켜 3-methoxy-6-allylthiopyridazine, 즉 K-6 화합물을 얻었다.

### 췌장암 세포의 배양

사람 췌장암세포주인 BxPC3와 PANC1 세포를 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM으로 세포수가  $5 \times 10^5$  cells/mg가 되도록 하여 배양하였다. 배양용기로 75 mm<sup>2</sup> flask를 사용하여 15 ml의 배지로 37°C, 포화습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 단층배양하였다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, confluence에 도달한 세포는 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization한 후 계대 배양하여 유지하였다.

### MTT 분석법에 의한 살아있는 세포 수 측정

살아있는 세포는 미토콘드리아에 존재하는 탈수소 효소에 의해 MTT가 MTT-formazan으로 전환 되므로 이것의 양을 측정하면 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있다.<sup>18</sup> 췌장암 세포를 1 ml 배지에 약물(3-methoxy-6-allylthiopyridazine)을 녹인 용매만을 처리하여 24-well multiwell plate에서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 MTT 용액(2.5 mg/ml H<sub>2</sub>O) 100 μl를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 생성된 MTT-formazan 결정체를 분리하기 위하여 처리된 세포 현탁액을 eppendorf tube에 옮겨 원심분리(1500 rpm, 4분)한 후, 상등액을

조심스럽게 제거하고 DMSO 100 μl를 첨가하여 결정체를 용해시킨 후 540 nm에서 ELISA reader(Molecular Devices, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다.

### 유세포 측정기(flow cytometry)를 이용한 세포사멸의 정량

세포사멸이 일어난 세포는 단편화된 DNA를 소실하므로, 유세포 측정기를 이용하여 sub-G<sub>1</sub> DNA를 가진 세포 수를 측정함으로써 세포사멸의 정도를 확인하였다.<sup>19</sup> 췌장암 세포를 PBS로 세척한 후, trypsinization하여 세포를 배양용기로부터 탈리시킨 다음, 원심분리(1200 rpm)하여 세포 pellet을 얻고, 다시 PBS와 McIlvaine's buffer(0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M citric acid, pH 7.5) 1:1 혼합액으로 세척하였다. 찬(4°C) ethanol 2 vol을 가하여 조심스럽게 섞어 세포를 고정시킨 후, 0.1% Triton X-100, 32 μg/ml RNase A 및 50 μg/ml PI를 포함하는 4 mM sodium citrate 용액에 현탁시켜 4°C에서 16시간 이상 방치한 후 유세포 측정기(BIO-RAD, CA, USA)로 DNA content를 분석하였다.

### 자료분석 및 통계적 검정

모든 실험은 네 번 반복해서 실시하고 실험 결과는 control 조건에 대한 백분율로 나타내었다. Data는 평균값±standard error of mean(SEM)으로 표시하고 one way analysis of variance(ANOVA)로 분석하며 각각의 유의성 비교는 Student-Newman-Keul's test를 이용하였다. P값이 0.05 이하인 경우에만 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 실험 결과 및 고찰

마늘(*Allium sativum* L.)은 단군신화에도 등장할 만큼 우리민족의 생활 속에 자리 잡은 지 오래되었고 우리 식생활에서 없어서는 안 될 중요한 향신료이다. 예로부터 마늘은 각종 성인병에 신비한 약효가 있는 것으로 알려져 왔으며 최근 연구에 의하면 마늘의 유효화합물은 여러 암종에 대한 항암작용을 가지고 있음이 밝혀졌다.<sup>20</sup> 유효화합물의 항암작용 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았지만 간에 작용하여 발암물질을 대사하는 효소의 활성을 증가시키거나,<sup>21</sup> 발암물질의 생성을 감소시키는<sup>22</sup> 작용이 중요하게 관여할 것으로 보고 있다. 마늘오일(garlic oil)의 유효화합물 성분의 하나인 알리신(allicin)은 여러 암종에서 암세포의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 효과가 있는 것으로 밝혀진 바 있다.<sup>23,24</sup> 하지만, 알리신은 불안정하고 악취로 인하여 의약품으로의 개발가치는 낮으므로 알리신의 약효를 지니면서 안정하고 악취가 없는 반합성 화합물의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 알리신의 약효발현을 위해 필요한 분자구조는 알릴치오기일 것으로 추정되고 있으므로 본 연구실에서는 피리다진 헤테로 고리를 모핵으로 하여 여기에 약리단(pharmacophore)인 알

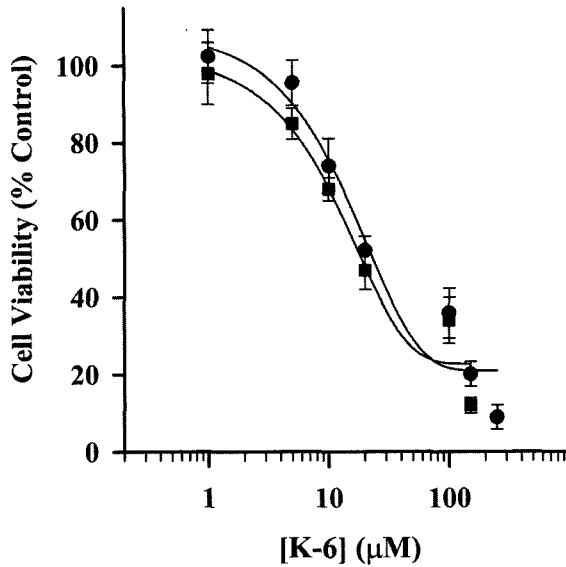


Fig. 2 – Reduced cell viability by K-6 in human pancreatic cancer cells. Cell viability was measured by using MTT assay. Closed circle and closed square represent BxPC3 and PANC1 human pancreatic cancer cells, respectively. The experiments were performed four times. The data were expressed as means  $\pm$  SEM (standard error of the mean). The lines of the graphs were obtained using the sigmoid regression program commercially supplied by Sigma Plot® (Chicago, IL, USA).

릴치오기를 도입시키고 이것의 파라워치에 할로젠 또는 알콕시 등의 치환기를 도입시킨 유도체를 다수 합성하고 그 효능을 검색한 바 알콕시 치환기를 갖는 화합물이 특히 간암세포의 성장 억제 활성이 강하다는 사실을 밝힌 바 있다.<sup>11-16)</sup> 그 중에서 K-6 라 명명한 메톡시 유도체(Fig. 1)를 사용하여 본 연구에서는 난치성 소화기계 암종인 췌장암 세포의 성장 및 사멸에 미치는 영향을 검토하였다.

K-6 화합물은 Fig. 2에서 보듯이 실험에 사용한 두 가지의 사람 췌장암 세포(BxPC3 및 PANC1)에 대해서 농도의존적인 세포생존율의 감소를 초래하였다. K-6의 이러한 췌장암세포에 대한 독성작용이 BxPC3 세포에 비해 PANC1 세포에서 약간 더 민감하게 나타났으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. Table I에서 보듯이 세포생존율 감소에 미치는  $IC_{50}$  값은 PANC1 및 BxPC3 세포에서 각각 18.5 및 20.0  $\mu$ M이었다. 비록 동물실험이지만 K-6 화합물은 이 농도이상에서도 유의한 독성을 나타내지 않았으므로<sup>25)</sup> 췌장암세포의 성장을 억제하는 유효한 물질이라고 할 수 있을 것이다.

다음으로 K-6의 이러한 세포독성이 세포사멸 효과와 연관되어 있는 것인지를 유세포측정기를 사용하여 확인하였다. Fig. 3에서와 같이 이 방법은 세포핵을 propidium iodide로 염색시켜 DNA의 크기를 관찰하는 것인데  $G_0/G_1$ 상보다 작은 DNA 크기를 가

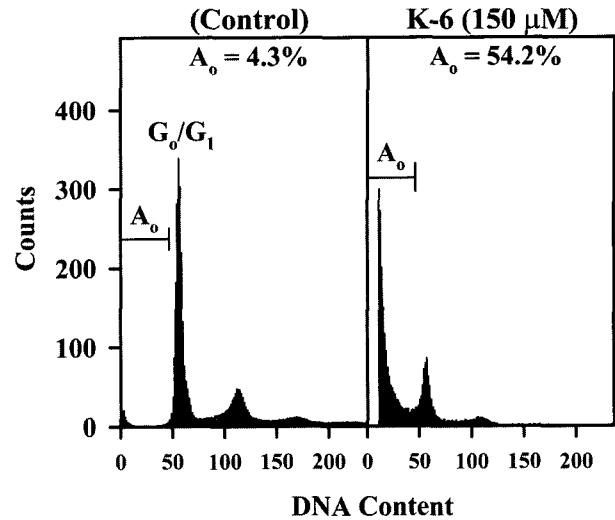


Fig. 3 – Induction of apoptosis by K-6 in BxPC3 human pancreatic cancer cells. The number of apoptotic cells was measured by flow cytometry. The region to the left of the  $G_0/G_1$  peak, designated  $A_o$ , was defined as cells undergoing apoptosis-associated DNA degradation. Note that K-6 induced a significant apoptotic cell death in the cells.

진 세포집단은 세포사멸을 일으킨 것으로 판정한다.<sup>19)</sup> Fig. 3에서 보면 BxPC3 세포에서 K-6 화합물을 처리하면 세포사멸을 일으킨 세포가 현저히 증가함을 볼 수 있다. PANC1 세포에서도 비슷한 양상을 나타내었다. Fig. 4에서 나타난 것처럼 두 가지 세포 모두에서 K-6 화합물의 농도에 따른 세포사멸 유도효과를 나

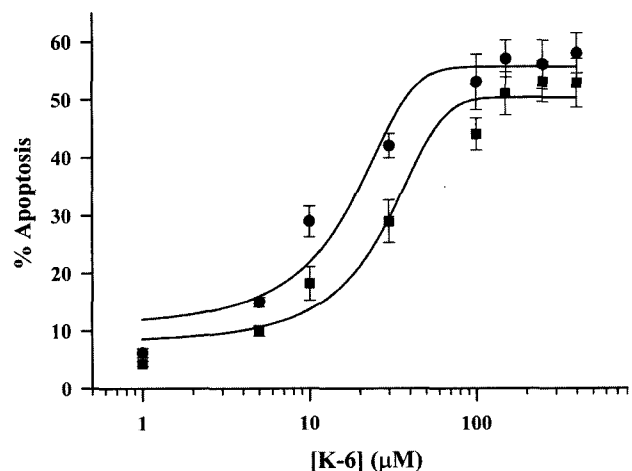


Fig. 4 – Dose-dependent induction of apoptosis by K-6 in human pancreatic cancer cells. Closed circle and closed square represent BxPC3 and PANC1 human pancreatic cancer cells, respectively. The number of apoptotic cells was measured by flow cytometry, as described in Fig. 3. The experiments were performed four times. The data were expressed as means  $\pm$  SEM. The lines of the graphs were obtained using the sigmoid regression program commercially supplied by Sigma Plot® (Chicago, IL, USA).

**Table I** - IC<sub>50</sub> values for K-6 on the cell viability-decreasing and apoptosis-inducing activities in human pancreatic cancer cells

Pancreatic cancer cell	IC <sub>50</sub> (μM)*	
	cell viability	apoptosis
BxPC3	20.0	24.7
PANC1	18.5	13.7

\*The IC<sub>50</sub> values were obtained using the sigmoid regression program commercially supplied by Sigma Plot® (Chicago, IL, USA).

타내었으며 Table I에서 보듯이 세포사멸 유도작용에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 PANC1 및 BxPC3 세포에서 각각 13.7 및 24.7 μM이었다. 이 결과는 K-6 화합물이 나타내는 세포생존을 저하작용(Fig. 2)은 세포사멸 유도효과에 기인함을 시사하며 암세포에 대한 세포사멸 유도가 이상적인 항암제의 조건임<sup>26)</sup>을 감안해 보면 K-6 화합물은 췌장암의 치료제로 개발될 수 있는 필요조건은 갖추었다고 말할 수 있을 것이다. 그러나 이 물질을 치료제로 개발하기 위한 충분조건을 만족시키기 위해서는 우선 급성 및 아급성 등의 여러 독성시험의 결과가 음성으로 나와야 하고 췌장암세포에 대한 사멸 유도작용의 분자기전이 확립되어야 할 것이다. 최근 난치성 췌장암의 치료제를 개발하고자 하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있으며 특히, farnesyl transferase 억제제인 R115777<sup>27)</sup> 및 metalloproteinase 억제제인 marimastat<sup>28)</sup>의 임상결과가 우수한 것으로 나타나고 있다. 본 연구실에서도 향후 K-6 화합물을 췌장암 치료제로 개발하기 위해 필요한 여러 보충실험을 수행할 예정이다.

결론적으로, 마늘의 유기황함유 성분과 유사한 구조를 지닌 합성된 K-6 화합물은 사람 췌장암 세포에 대해 세포생존율을 억제하고 세포사멸을 유도하는 효과를 나타내었다. 이 결과는 K-6 화합물이 췌장암의 치료제 개발을 위한 선도화합물로서 가치가 있음을 시사한다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 여자대학교 연구기반확충지원사업(R06-2002-004-01007-0) 지원으로 수행되었음.

## 참고문헌

- Song, K. J., Kim, M. Y. and Min, J. S. : The problems of surgical management in pancreatic cancer. *J. Korean Surg. Soc.* **38**, 583 (1990).
- Lee, K. U., Moon, B. I., Kang, H. S. and Kim, J. P. : Chronologic changing pattern of the management of pancreatic carcinoma. *J. Korean Surg. Soc.* **48**, 416 (1995).
- Yeo, C. J., Cameron, J. L., Lillemoe, K. D., Sitzmann, J. V., Hruban, R. H., Goodman, S. N., Dooley, W. C., Coleman, J. and Pitt, H. A. : Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas: 201 patients. *Ann. Surg.* **221**, 721 (1995).
- Ishikawa, O., Ohigashi, H., Sasaki, Y., Kabuto, T., Furukawa, H., Nakamori, S., Imaoka, S., Iwanaga, T. and Kasugai T. : Practical grouping of positive lymph nodes in pancreatic head cancer treated by an extended pancreatectomy. *Surgery* **121**, 244 (1997).
- Kwon, S. K. : Organosulfur compounds from *Allium sativum* and physiological activities. *J. Applied Pharmacol.* **11**, 8 (2003).
- Clapper, M. L. : Chemopreventive activity of oltipraz. *Pharmacol. Ther.* **53**, 17 (1998).
- Rao, C. V., Rivenson, A., Simi, B., Zang, E., Kelloff, G., Steele, V. and Reddy, B. S. : Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res.* **55**, 1464 (1995).
- Goluboff, E. T., Shabsigh, A., Saidi, J. A., Weinstein, I. B., Mitra, N., Heitjan, D., Piazza, G. A., Pamukcu, R., Buttyan, R. and Olsson, C. A. : Exisulind (sulindac sulfone) suppresses growth of human prostate cancer in a nude mouse xenograft model by increasing apoptosis. *Urology* **53**, 440 (1999).
- Cho, M. K. and Kim, S. G. : Differential induction of rat hepatic microsomal epoxide hydrolase and rGSTA2 by diazines: the role of cytochrome P450 2E1-mediated metabolic activation. *Chem. Biol. Interact.* **116**, 229 (1998).
- Bandoh, K., Ishizuka, Y. and Sato, M. : Effects of 3-[N-(2-Chlorobenzyl)amino]-6-(1H-imidazol-1-yl)pyridazine dihydrochloride on various aromatase enzyme systems and experimental breast cancer. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* **45**, 897 (1995).
- Kwon, S. K. : Pyridazine derivatives developed as medicines. *J. Applied Pharmacol.* **8**, 1 (2000).
- Kwon, S. K. and Hyun, J. W. : Synthesis of allylthiopyridazine derivatives and their protective effects of UV-C irradiation. *J. Pharm. Soc. Kor.* **44**, 9 (2000).
- Jung, M. Y., Kwon, S. K. and Moon, A. : Chemopreventive allylthiopyridazine derivatives induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells through a caspase-3-dependent mechanism. *Eur. J. Cancer* **40**, 827 (2001).
- Lee, E. J., Shin, I., Kwon, S. K. and Moon, A. : Chemopreventive allylthiopyridazines inhibit invasion, migration and angiogenesis in hepatocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **23**, 1645 (2003).
- Chai, H. Y., Sin, J. S., Kim, T. M., Kwon, W., Cho, Y. M., Choi, E. K., Hwang, S. Y., Kim, Y.-B., Moon, A., Kwon, S. K. and Kang, J. K. : Antitumor activity of pyridazine derivative in nude mice. *Kor. J. Lab. Animal Sci.* **20**, 68 (2004).
- Kwon, S. K. and Moon, A. : *In vivo* anti-tumor activity of 3-

- methoxy-6-allylthiopyridazine in nude mice xenografted with Hep-G2 hepatocarcinoma. *J. Applied Pharmacol.* **13**, 113 (2005).
- 17) Shin H. S. and Kwon, S. K. : Synthesis of allylthiopyridazine derivatives and inhibition of aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in rats. *Arch. Pharm. Res.* **5**, 351 (2003).
- 18) Bellamy, W. T. : Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of *in vitro* assays. *Drugs* **44**, 690 (1992).
- 19) Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J. F. and Harlan, J. M. : Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* **89**, 2429 (1997).
- 20) Wu, X., Kassie, F. and Mersch-Sundermann, V. : Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds. *Mutat. Res.* **589**, 81 (2005).
- 21) Munday, R. and Munday, C. M. : Relative activities of organosulfur compounds derived from onions and garlic in increasing tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in rat tissues. *Nutr. Cancer* **40**, 205 (2001).
- 22) Milner, J. A. : Mechanisms by which garlic and allyl sulfur compounds suppress carcinogen bioactivation. Garlic and carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **492**, 69 (2001).
- 23) Zheng, S., Yang, H., Zhang, S., Wang, X., Yu, L., Lu, J. and Li, J. : Initial study on naturally occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **27**, 106 (1997).
- 24) Dorai, T. and Aggarwal, B. B. : Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **215**, 129 (2004).
- 25) Jung, K. H. : Single oral toxicity of 3-methoxy-6-allylthiopyridazine in rats. *J. Applied Pharmacol.* **13**, 123 (2005).
- 26) Kim, R. : Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* **103**, 1551 (2005).
- 27) Venkatasubbarao, K., Choudary, A. and Freeman, J. W. : Farnesyl transferase inhibitor (R115777)-induced inhibition of STAT3 (Tyr705) phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines require extracellular signal-regulated kinases. *Cancer Res.* **65**, 2861 (2005).
- 28) Bloomston, M., Zervos, E. E. and Rosemurgy, A. S. 2nd. : Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials. *Ann. Surg. Oncol.* **9**, 668 (2002).