

소목(*Caesalpinia sappan*)으로부터 분리한 caspase 유도 저해 물질손은정 · 김진희 · 김현아 · 백승화 · 고영희 · 김미리¹ · 이충환*한국생명공학연구원, ¹충남대학교 식품영양학과A Caspase Inducing Inhibitor Isolated from *Caesalpinia sappan*Eun-Jung Son, Jin-Hee Kim, Hyun-A Kim, Seung-Hwa Baek,
Yung-Hee Kho, Mee-Ree Kim¹ and Choong-Hwan Lee*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

¹Department of Food and nutrition, Chungnam National University

Through the screening of caspase-3 inducing inhibitors in U937 human monocytic leukemia cell from natural sources, *Caesalpinia sappan*, which showed a high level of inhibition, was selected. The inhibition compound was purified from methanol extract by silica gel column chromatography and HPLC. The inhibitor was identified as brazilin by spectroscopic methods of ESI-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. Brazilin showed inhibitory activity of caspase-3 induction, a major protease of apoptosis cascade, with IC₅₀ value of 4.5 µg/mL after 7 hr of treatment in U937 cells.

Key words: apoptosis, caspase-3 inhibitor, brazilin, U937

서 론

Apoptosis는 necrosis와는 달리 세포 내에 본래부터 존재하던 자살기작이 여러가지 세포 내부, 외부의 자극에 의하여 활성화되어 세포 내 protease인 cascade family를 매개로 세포가 계획된 대로 죽는 현상이며^(1,3), 세포사 실행인자로서 caspase family의 활성화가 세포사에 필수적이다. Caspase는 아미노산배열의 상동성에 따라 추정된 진화계통수에 의하여 ICE(caspase-1), ICH-1(caspase-2), CPP32(caspase-3)를 중심으로 하는 세 가지 형태로 나눌 수 있으며, CPP32의 활성화 경로가 apoptosis에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다^(4,5).

Apoptosis와 관련된 질병은 apoptosis 저해와 유도에 의해 각각 야기되어진다. Apoptosis 저해와 관련된 질병은 암, 자가면역 질환 및 바이러스 감염 등을 들 수 있으며⁽⁶⁻¹⁰⁾, apoptosis의 증가와 관련된 질환은 AIDS와 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, retinitis pigmentosa, cerebellar degeneration 등의 신경관련 질환, 뇌졸중, myocardial infraction, reperfusion injury 등의 허혈관 질환 그리고 알콜 등 독성물질에 의한 간질환 등이 있다⁽¹¹⁻¹⁴⁾.

이러한 질병에 대한 치료제 개발 가능성 때문에 apoptosis 조절물질에 대한 관심이 고조되었으며, 현재 많은 유도 및 저해원이 알려지고 있다.

소목(sappan wood)은 콩과(Legminosae)에 속한 낙엽소교목 또는 관목인 *Caesalpinia sappan* L.의 껍질을 제거한 심재를 건조한 한약재로 인도, 말레이시아 반도, 중국 남부 등 열대 아시아에 분포하는 식물이다⁽¹⁵⁾. 중약대사전에는 소목의 약리작용으로써 항균작용, 중추억제작용, 심혈관에 대한 작용이 기록되어있다⁽¹⁶⁾. 소목의 심재는 여러 가지 화학성분 즉, 페놀성 화합물, 정유, 배당체, 지방산 에테르로 구성되어 있다고 보고되어 있다⁽¹⁷⁾. 국내에서도 소목에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 항산화 효과와 위암세포주에 대한 세포독성 효과, 항염 효과 및 항균 소취 가공 등에 관한 보고서가 있다⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

본 연구팀에서는 apoptosis 조절물질을 탐색하고자 apoptosis 유도 물질의 하나인 etoposide를 이용하여 U937 세포주의 apoptosis를 유도한 후 apoptosis 정도를 caspase-3의 활성화로 측정하는 시스템을 확립하였다⁽²¹⁻²⁵⁾. 이를 이용하여 저해활성을 나타내는 소목을 선별한 후 저해물질을 정제하고, 구조결정 및 저해활성을 조사하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

시약

실험에 사용한 무기염류 및 일반용매는 시약특급을 사용

*Corresponding author : Choong-Hwan Lee, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Oun-dong, Yuseong, Taejeon 305-333, Korea
Tel: 82-42-860-4294
Fax: 82-42-860-4595
E-mail: Chlee@mail.kribb.re.kr

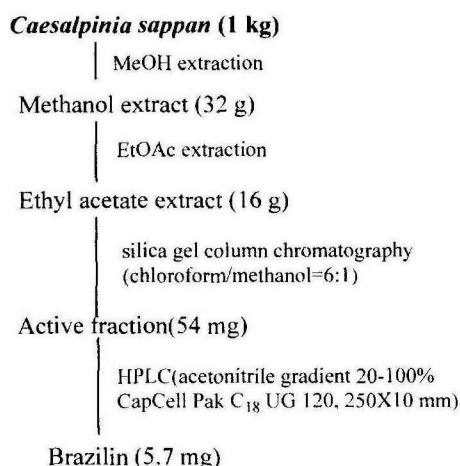


Fig. 1. Isolation procedure of an apoptosis inhibitory compound from *Caesalpinia sappan*.

하였고, 배양에 사용한 배지류는 주로 Difco(USA)제품을 사용하였다. 물질분리 및 확인에 사용한 silica gel은 Merck사(Germany)의 silica gel 60(63-200 µm)을, TLC plate는 Merck TLC plate silica 60F254를 사용하였고, HPLC column은 Hitachi사(Japan)의 제품을 사용하였다. 각 정제단계 및 column chromatography에 사용된 butanol, ethanol, ethyl acetate 등의 용매는 일반시약을, HPLC 용매는 Baxter(Burdick & Jackson, USA) 제품을 사용하였다. NMR용 CD₃OD는 Aldrich사(USA) 제품을 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지류는 Gibco BRL(USA) 제품을 사용하였으며, caspase assay에 사용된 기질 및 저해제 등은 Enzyme System Products(USA) 제품을 사용하였다.

공시재료

대전 일신약품에서 구입한 중국산 건조 소목을 메탄올로 추출하여 감압 농축한 후 10 mg/mL로 녹여 apoptosis 저해활성을 측정하였다.

활성물질의 분리정제

저해물질을 silica gel 60(63-200 µm, Merck, Germany), CapCell Pak HPLC column(250×10 mm, Shisheido, Japan)을 사용하여 분리하였다. HPLC는 Hitachi사(Japan)의 L-7100 intelligent pump L-7100 pump, L-7400 UV detector를 사용하였다.

이화학적 특성 및 구조분석

Mass 스펙트럼은 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA)를 사용하여 측정하였다. NMR 스펙트럼은 Varian UNITY 300(USA)를 이용하였고, 용매로는 CD₃OD를 사용하였다.

Caspase-3 활성 측정

U937 세포를 RPMI-1640 배지(10% FBS)를 이용하여 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 96-well microplate에 sample을

Table 1. Inhibition activity of caspase-3 induction from natural sources (50 mg/mL)

Scientific name	Korean name	Activity (%)
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	gamcho	71
<i>Saussureae Radix</i>	mokhyang	90
<i>Tribuli semen</i>	baekjilryeo	45
<i>Polygoni Multiflori Radix alba</i>	baekhasuo	82
<i>Evodiae Fructus</i>	osuyoo	78
<i>Caesalpiniae Lignum</i>	somok	100
<i>Tritici Semen</i>	somaek	41
<i>houottuyniae Herba</i>	eosungcho	85
<i>Nelumbinis Semen</i>	yeonjayook	53

처리하고 10 µg/mL의 etoposide로 apoptosis를 유도한 후 7 시간 후에 현미경으로 cell의 모양을 관찰하여 apoptosis 여부를 1차 판정하였으며, 세포를 수확 한 후 얻은 용해액을 이용하여 caspase-3의 활성을 형광합성 기질인 5 mM의 DEVD-AFC(Asp-Glu-Val-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin)을 100 µL의 buffer[100 mM HEPES buffer containing 10 mM DTT, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, and 0.1% BSA]와 혼합하여 25°C에서 반응시켰다. AFC의 생성은 spectrofluorometer(Perkin-Elmer LS-50B)를 사용하여 측정하였다^[26].

결과 및 고찰

소목(*Caesalpiniae sappan*)으로부터 caspase 유도 저해 물질의 분리

한국생명공학연구원 내 자생식물사업단의 한약재 sample 200종을 대상으로 etoposide를 이용하여 U937 세포주의 apoptosis를 유도한 후 apoptosis 정도를 caspase-3로 측정하고, 좋은 활성을 보이는 여러 생약재들 중 최종적으로 소목을 선별하여 저해물질을 분리하였다(Table 1).

소목 1 kg을 실온에서 methanol로 2회 추출하고, 여과한 methanol 추출액을 감압농축한 후 증류수에 현탁하여 hexane, ethyl acetate, butanol로 각각 추출한 후 caspase 유도 저해 활성이 있는 ethyl acetate 추출물을 silica gel column chromatography(CHCl₃/MeOH)를 실시하였고 이를 통해 얻은 활성분획(54.3 mg)을 HPLC(Shisheido-CapCell Pak C₁₈ UG120, 250×10 mm, UV 220 nm, CH₃CN gradient 20-100%, flow 1.5 mL/min)를 통해 brazilin(5.7 mg)을 분리하였다(Fig. 2).

활성물질의 구조분석

ESI-MS분석 결과 m/z 309에서 (M+Na)⁺, 285에서 (M-H)⁻ 피크가 관찰되어 분자량 286으로 확인되었다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 분석결과 42.89(CH₂), 78.08(CH₂), 51.05(CH), 104.20(CH), 109.95(CH), 112.42(CH), 112.84(CH), 115.55(CH), 137.43(CH), 70.84, 131.31, 132.22, 145.34, 145.65, 155.72, 157.87 ppm에서 16개의 carbon peak가 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum으로부터 2.72 ppm(1H, d, H-7a, $J=15.6$), 2.78 ppm(1H, d, H-7b, $J=15.6$), 2.94 ppm(1H, d, H-6'a, $J=15.3$), 3.02 ppm(1H, d, H-6'b, $J=15.3$), 3.78 ppm(1H, s, H-12), 6.28 ppm(1H, d, H-4, $J=2.4$), 6.46 ppm(1H, dd, H-

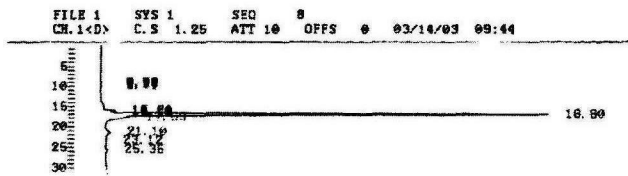


Fig. 2. HPLC chromatogram of brazilin isolated from *Caesalpinia sappan* (Acetonitrile gradient 20-100% 1.5 mL/min 240 nm).

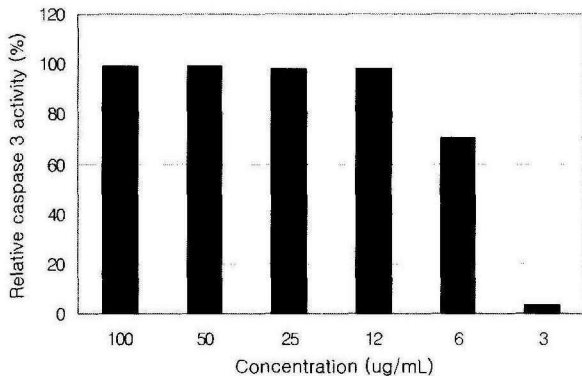


Fig. 3. Effects of brazilin on the caspase-3 inducing inhibitory activity treated with 10 µg/mL etoposide in U937 human leukemia cells.

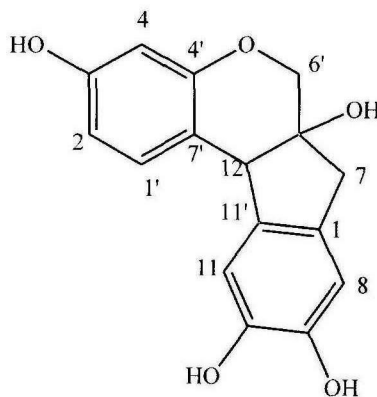


Fig. 4. Chemical structure of brazilin isolated from *Caesalpinia sappan*.

2, $J = 2.7, 8.4$), 6.60 ppm(1H, s, H-11), 6.70 ppm(1H, s, H-8), 7.26 ppm(1H, d, H-1', $J = 8.4$)에서 peak가 관찰되었다. 분자량과 NMR data로부터 구조식을 $C_{16}H_{14}O_5$ 로 결정하였으며, data base 검색결과 brazilin으로 동정되었다(Fig. 3).

Brazilin의 생물활성

Brazilin은 U937 세포에서 etoposide에 의한(10 µM, 7 hr) caspase-3의 유도를 농도 의존적으로 저해하였으며, IC_{50} 값은 4.5 µg/mL이었다(Fig. 4). 또한 항산화활성검색 결과, DPPH법에 의한 radical 생성에 대한 IC_{50} 값이 약 3.2 µg/mL로, 농도 의존적인 저해활성을 나타내었다(Fig. 5). 항산화 활성과 apoptosis 조절과의 상관성은 많은 연구 결과가 보고되었다. Verhaegen 등⁽²⁷⁾은 human HL-60 leukemia cell에서 항산화제

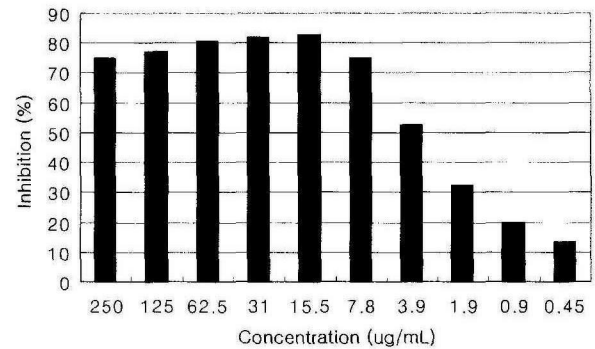


Fig. 5. DPPH radical scavenging activity of an apoptosis inhibitory compound (brazilin).

에 의해 apoptosis가 저해된다고 보고하였으며, Tsai 등⁽²⁸⁾은 vascular smooth muscle cells에서 PDTC(pyrrolidinedithiocarbamate), NAC(N-acetylcystein)등의 항산화제가 apoptosis 저해하는 것으로 보고하는 등 apoptosis 조절 활성은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁽²⁹⁾. 이러한 결과를 바탕으로 brazilin의 apoptosis 저해활성은 항산화 활성에 기인하는 것으로 추정되며, 그 작용기작에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이번 실험에 의해 분리된 brazilin은 소목에서 이전에 분리 보고된 물질이나, brazilin의 caspase-3 유도 저해활성을 나타내는 성분으로는 본 실험에 의해 처음 밝혀졌다. Brazilin은 3.6 µg/mL의 농도에서 54%의 radical 소거활성을 나타내었다. 이 화합물의 항산화 활성에 대하여 다양한 측정계를 사용한 연구가 필요할 것이다.

요 약

한약재로부터 U937 세포주를 사용한 caspase-3 유도저해물질을 탐색한 결과 소목(*Caesalpinia sappan*)을 선별하였다. 소목의 메탄을 추출물로부터 silica gel column chromatography, HPLC 등을 사용하여 저해물질을 분리하였으며, ESI-MS, 1H -NMR, ^{13}C -NMR 등의 기기분석을 실시하여 brazilin이 동정되었다. 이 물질은 IC_{50} 4.5 µg/mL의 농도로 U937세포주의 etoposide에 의한 caspase-3 유도를 저해하였으며, DPPH 라디칼 소거능도 나타내었다.

문 헌

1. Cohen, G. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16 (1997)
2. Barinaga, M. Death by dozens of cuts. *Science* 280: 32-34(1998)
3. Thornberry, N. Caspases: Key mediators of apoptosis. *Chem. Biol.* 5: 97-103 (1998)
4. Friedlander, R., Brown, R., Gagliardini, V., Wang, J. and Yuan, J. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* 388: 31 (1997)
5. Salvatore, M., Hensens, O., Zink, D., Liesch, J., Dufresne, C., Ondeyka, J., Jurgens, T., Borris, R., Raghoobar, S., Mccauley, E., Kong, L., Gartner, S., Koch, S., Pelaez, F., Diez, M., Cascales, C., Martin, I., Polishookv, J., Balick, M., Beck, H., King, S., Hsu, A. and Lingham, R. L-741, 491, a fungal metabolite that is an inhibitor of interleukin-1 β converting enzyme. *J. Nat. Prod.* 57: 755-760 (1994)

6. Yamashita, N., Shin-Ya, K., Furihata, K., Hayakawa, Y. and Seto, H. New ravidomycin analogues, FE35A and FE35B, apoptosis inducers produced by *Streptomyces rochei*. J. Antibiotics 51: 1105-1108 (1998)
7. Yamashita, N., Harada, T., Shin-Ya, K. and Seto, H. 6-Hydroxytetraangulol, a new CPP32 protease inducer produced by *Streptomyces* sp. J. Antibiotics 51: 79-81 (1997)
8. Kim, J. W., Adachi, H., Shin-ya, K., Hayakawa, T. and Seto, H. Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardia* sp. J. Antibiotics 50: 628-630 (1997)
9. Kakeya, H., Zhang, H., Kobinata, K., Onosa, R., Onozawa, C., Kudo, T. and Osada, H. Cytotrienin A, a novel apoptosis inducer in human leukemia HL-60 cells. J. Antibiotics 50: 370-372 (1997)
10. Mastrangelo, A. and Betenbaugh, M. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression system. Trends Biotechnol. 16: 88-95 (1998)
11. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267: 1445-1462 (1995)
12. Lee, E., Miura, M., Yoshinari, M., Iwai, H. and Kariya, K. Selective inhibition of dexamethasone-induced apoptosis in rat thymocytes by herbimycin A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202: 128-134 (1994)
13. Ji, L., Zhang, G. and Hirabayashi, Y. Inhibition of tumor necrosis factor α and ceramide-induced internucleosomal DNA fragmentation by herbimycin A in U937 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 640-647 (1995)
14. Shimura, M., Ishizaka, Y., Yuo, A., Hatake, K., Oshima, M., Sasaki, T. and Takaku, F. Characterization of room temperature induced apoptosis in HL-60. FEBS Lett. 417: 379-384 (1997)
15. All Oriental Medicine University Bonchihak teacher. Bonchihak. Yunglimsa, Seoul, Korea (1995)
16. Shinnongchobonkyung. JungYak Big Dictionary. Iljunga, Seoul, Korea (1995)
17. Namikosi, M. and Saitih, T. Homoisoflavoids and related compound IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* L. Chem. Pharm. Bull. 35: 3579-3602 (1987)
18. Lim, D.K., Choi, L.U. and Shin, D.H. Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 77-82 (1996)
19. Park, K.J., Kim, E.H., Eun, Y.A., Kang, B.J. and Sung, H.J. Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines. Korean J. Pharmacogn. 28: 233-238 (1997)
20. Kim, Y.S., Noh, Y.K., Lee, G.I., Kim, Y.K., Lee, K.S. and Min, K.R. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. Korean J. Pharmacogn. 26: 265-272 (1995)
21. Lee, C.H., Chung, M.C., Lee, H.J. and Kho, Y.H. An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicum*. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 448-453 (2000)
22. Lee, C.H., Lee, H.J., Kim, J.H., Kim, H.A. and Kho, Y.H. Anti-apoptotic effects of terrein on etoposide-induced Apoptosis of U937 human leukemia cells. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 87-91 (2000)
23. Kim, J.H., Kho, Y.H., Kim, M.R., Kim, H.A., Lee, S.M. and Lee, C.H., A caspase inducing inhibitor isolated from *Forsythiae fructus*. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 114-117 (2002)
24. Lee, C.H., Kim, H.A. and Kho, Y.H. Agastinol and Agastenol, novel lignans from *Agastache rugosa* and their evaluation in an apoptosis inhibition assay. J. Nat. Prod. 65: 414-416 (2002)
25. Lee, C.H., Kim, J.H., Lee, H.J., Lee, S.M. and Kho, Y.H. Two new constituents of *Isodon excisus* and their evaluation in an apoptosis inhibition assay. J. Nat. Prod. 64: 659-660 (2001)
26. Gurtu, V., Kain, S.R. and Zhang, G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. Anal. Biochem. 251: 98-102 (1997)
27. Verhaegen, S., McGowan, A., Brophy, A., Fernandes, R. and Cotter, T. Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. Biochem. Pharmacol. 50: 1021-1029 (1995)
28. Tsai, J., Jain, M., Hsieh, C., Lee, W., Yoshizumi, M., Patterson, C., Perrella, M., Cooke, C., Wang, H., Haber, E., Schlegel, R. and Lee, M. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cell. J. Biol. Chem. 271: 3667-3670 (1996)
29. Buttke, T. and Sandstrom, P. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol. Today. 15: 167-169 (1994)

(2003년 1월 20일 접수; 2003년 7월 11일 채택)