

섬오갈피 유래 Lupane-triterpene glycoside 화합물의 PC-3 전립선암세포 증식 억제 효과

부혜진¹, 현재희¹, 홍지영¹, 김상철¹, 강정일¹, 김영호², 유은숙¹, 강희경¹

¹제주대학교 의학전문대학원 약리학교실, ²충남대학교 약학대학 천연물연구실

Abstract

The antiproliferative effects of lupane-triterpene glycosides from *Acanthopanax koreanum* in PC-3 human prostate cancer cells

Hye-Jin Boo¹, Jae-Hee Hyun¹, Ji-Young Hong¹, Sang-cheol Kim¹, Jung-Il Kang¹, Young Ho Kim², Eun-Sook Yoo¹, Hee-Kyoung Kang¹

¹Department of Pharmacology, Jeju National University School of Medicine, Jeju,

²College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Acanthopanax koreanum is a medicinal plant native to Korea. Lupane-triterpene glycosides from *A. koreanum* are known to have various biological activities such as anti-inflammatory, immunostimulatory, and antioxidant effects. However, the anti-cancer activity of lupane-triterpene glycosides in human prostate cancer cells has not been elucidated. We examined the anti-cancer effects of five lupane-triterpene glycosides (acankoreoside D, acankoreoside A, acankoreoside F, acantrifoside A and acankoreoside K) from *A. koreanum* in PC-3 prostate cancer cells. When treated with the lupane-triterpene glycosides to PC-3 cells at 50 μ M, the compounds markedly inhibited (acankoreoside D, 57.7% acankoreoside A, 59.0% acankoreoside F, 49.2% acantrifoside A, 46.6% and acankoreoside K, 45.4%) the growth of PC-3 cells. The result indicated that the lupane-triterpene glycosides from *A. koreanum* could have therapeutic role against prostate cancer. (J Med Life Sci 2010;7:135-138)

Key Words : *Acanthopanax koreanum*, PC-3, Prostate cancer, lupane-triterpene glycosides

서론

섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*)는 한국 특산종으로 쌍떡잎 식물 산형화목 두릅나무과의 낙엽관목으로서 제주에서 자생한다. 약용식물로 알려져 있으며, 민간에서는 요통, 신경통 및 증풍 등에 사용된다고 알려져 있다¹⁾. 또한 사전연구에서 섬오갈피는 항염증²⁾, 면역촉진³⁾, 그리고 항산화⁴⁾ 활성을 갖는다고 보고되어 있다. 이 식물의 화학적 구성에 대한 연구에서, 뿌리는 diterpenoids, lignans, triterpenoids, polyacetylenes, phenylpropanoids, flavonoids⁵⁾ 및 polysaccharides⁶⁾ 등을 포함한다고 알려져 있다. 최근 섬오갈피에서 lupane-triterpene glycosides 화합물이 분리되어 생리활성에 대한 연구들이 진행되고 있다^{6, 7)}. Lupane계의 화합물들은 식물자원에서 흔히 발견되며, 다양한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다. Lupane계에

속하는 대표적인 화합물 중의 하나인 betulinic acid는 항HIV, 항염증효과 및 항노화효과를 나타낸다고 보고되었다⁸⁻¹⁰⁾. 특히, lupane계 화합물이 잠재적인 항암활성을 가지고 있음이 보고되어 있으나, 섬오갈피 유래 lupane-triterpene glycosides 화합물들의 항암활성에 대한 보고는 미비한 실정이다.

전립선암은 서구사회의 남성에서 발생하는 암 중 가장 흔한 암의 하나이며, 세계적으로는 남성 암 사망 원인 중 두 번째를 차지하고 있다¹¹⁾. 한국에서도 식생활의 서구화와 노령인구의 증가로 인하여 근래에 남성에서 발견되는 암 중 전립선암의 발생 빈도가 급격히 증가하고 있는 추세이다¹²⁾. 전립선암은 전립선특이항원(prostate specific antigen; PSA)의 등장 이후 쉽게 진단이 가능하게 됨으로써 초기에 발견되어 치료를 받는 환자가 늘어났으나, 많은 환자들이 전이가 동반된 상태에서 발견될 뿐만 아니라 수술을 받은 환자의 경우에도 재발하는 경우가 많은 실정이다. 전이성 전립선암의 경우 초기에 남성호르몬 차단 요법으로 일차적인 효과를 거둘 수 있으나 그 효과의 지속기간은 대부분 약 1~2년 정도로 짧고 호르몬불응성 암으로 발전하게 된다. 이러한 호르몬불응성 전립선암 환자의 경우 적절한 치료법이

Address for correspondence : Hee-Kyoung Kang
Department of Pharmacology, Jeju National University School of Medicine, 66 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : pharmkhk@jejunu.ac.kr

없는 실정이다¹³. 전립선암세포 중 PC-3 세포는 호르몬불응성 암세포의 하나로 알려져 있다.

본 연구에서는 호르몬불응성 전립선암세포인 PC-3를 대상으로 섬오갈피로부터 분리된 lupane-triterpene glycosides의 세포 증식억제 효과를 조사하였다.

대상 및 방법

1. 시료

본 연구에 사용된 화합물들은 섬오갈피로부터 분리된 acankoreoside D, acankoreoside A, acankoreoside F, acantrifoside A 및 acankoreoside K로 lupane-triterpene glycoside류의 화합물이며, 충남대학교 약대학 천연물연구실로부터 제공 받았다. 본 실험에서 각각의 화합물들을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 원하는 농도에 따라 실험용 배지로 희석하여 사용하였다.

2. 세포 배양

PC-3 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank) 으로부터 분양 받아서 사용하였다. 100 units/ml의 penicillin-streptomycin (GIBCO Inc, Grand Island, NY, USA)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Hyclone, UT, USA) 이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ humidified incubator에서 배양하였으며, 계대배양은 약 70~80%의 confluence가 되는 3~4일마다 한번씩 시행하였다.

3. 세포 독성 측정

여러 화합물에 의한 PC-3 세포의 성장증식에 대한 효과를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 검색하였다¹⁴. 살아있는 암세포 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 MTT가 환원되어 형성되는 자주색을 띠는 비수용성의 formazan을 microplate (ELISA) reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여, 대사적으로 왕성하게 생존하는 세포를 조사하였다. PC-3 (1×10⁶ cells/ml) 세포를 96 well plate에 넣고 여러 화합물을 1, 3, 10, 20, 50 μM의 농도로 처리하였다. 이를 3일간 배양한 후, MTT (Sigma chemical Co., St. Louis, USA) 50 μl (2 mg/ml)를 첨가하고 4시간 동안 반응 시킨 후, dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma chemical Co., St. Louis, USA) 150 μl를 가하여 침전물을 용해시킨 다음, microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하여, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 증식 억제 정도를 조사하였다.

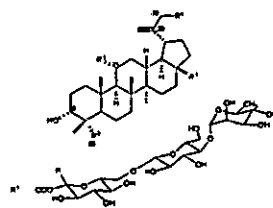
결 과

호르몬불응성 전립선암세포인 PC-3 세포에서 섬오갈피로부터

분리된 lupane-triterpene glycosides 화합물들의 세포증식억제 효과를 알아보았다. 본 연구에 사용된 화합물들인 acankoreoside D, acankoreoside A, acankoreoside F, acantrifoside A 및 acankoreoside K는 lupane-triterpene glycoside 류의 화합물이다(Fig. 1)^{6, 7}. Acankoreoside D, acankoreoside A, acankoreoside F, acantrifoside A 및 acankoreoside K 각각의 화합물들을 PC-3 세포에 1, 3, 10, 20, 그리고 50 μM의 농도로 처리하여 MTT assay를 수행하였다. Acankoreoside D의 경우 PC-3 세포에 1, 3, 10, 20, 그리고 50 μM의 농도로 처리하였을 때, 1 μM의 농도에서 17.6%, 3 μM의 농도에서 18.5%, 10 μM의 농도에서 15.5%, 20 μM의 농도에서 22.7%, 그리고 50 μM의 농도에서 57.7%의 증식 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2A). Acankoreoside A의 경우 1, 3, 10, 그리고 20 μM의 농도에서 모두 8% 이하의 낮은 증식 억제 효과를 나타내었으나, 50 μM의 농도에서는 59.0%의 높은 증식 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2B). Acankoreoside F의 경우 역시 1, 3, 10, 그리고 20 μM의 농도에서 모두 10% 이하의 낮은 증식 억제 효과를 보였으나, 50 μM의 농도에서는 49.2%의 증식 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2C). Acantrifoside A를 PC-3 세포에 처리하였을 때, 1, 3, 10 및 20 μM의 농도에서 8% 이하의 낮은 증식 억제 효과를 나타내었으나, 50 μM의 농도에서는 46.6%의 비교적 높은 증식 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2D). 그리고 Acankoreoside K의 경우 1, 3, 10 및 20 μM의 농도에서 18% 이하의 증식 억제 효과를 보여 acankoreoside D를 제외한 다른 lupane-triterpene glycosides 화합물들에 비하여 저농도에서 비교적 높은 증식 억제 효과를 나타내었으나, 50 μM의 농도에서는 45.4%의 증식

Figure 1. Chemical structures of lupane-triterpene glycosides from *A. koreanum*. (A) Structures of acankoreoside D, acankoreoside A, acankoreoside F, and acantrifoside A⁶. (B) Structure of acankoreoside K⁷.

A



Acankoreoside D: R¹=CHO R²=OH R³=H
 Acankoreoside A: R²=COOH R³=H R⁴=H
 Acankoreoside F: R²=COOH R³=H R⁴=OH
 Acantrifoside A: R²=CH₃ R³=OH R⁴=H

B

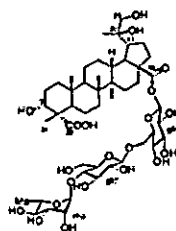
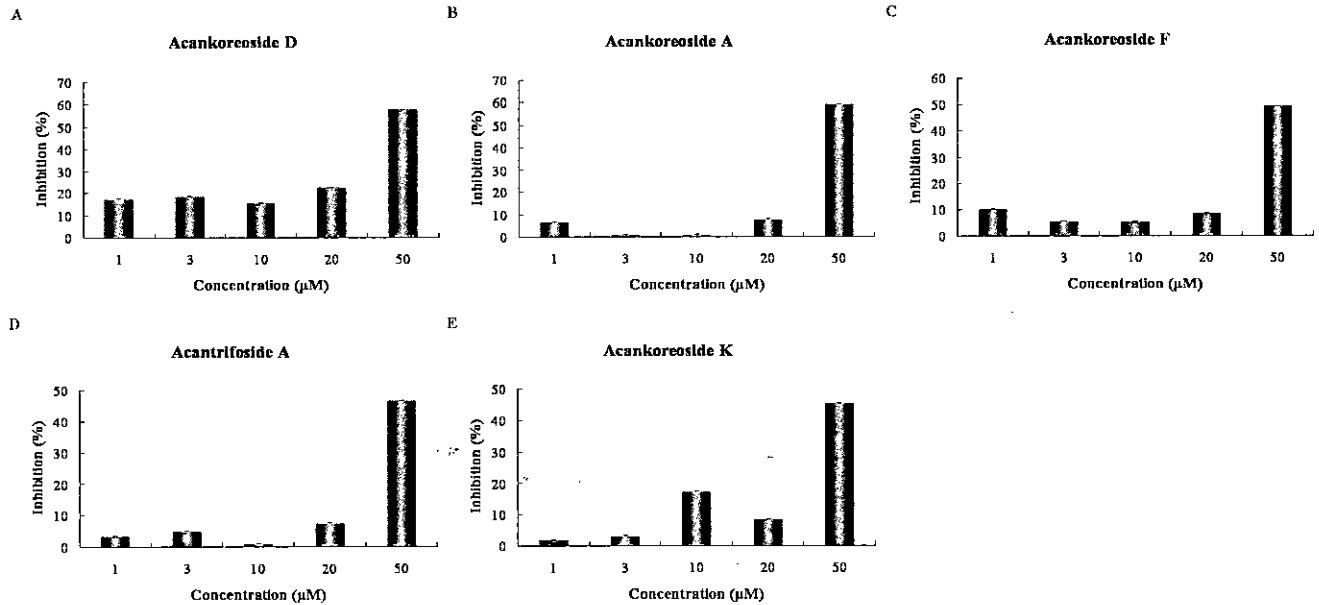


Figure 2. Inhibitory activity of lupane-triterpene glycosides from *A. koreanum* on the growth of PC-3 cells. The PC-3 cells (1×10^5 cells/ml) were treated with 1, 3, 10, 20, and 50 μ M for 72 hours of lupane-triterpene glycosides (acankoreoside D, acankoreoside A, acankoreoside F, acantrifoside A and acankoreoside K) from *A. koreanum* and the viability was measured by MTT assay. Growth inhibition effect by acankoreoside D (A), acankoreoside A (B), acankoreoside F (C), acantrifoside (D), and acankoreoside K (E) in PC-3 cells.



억제 효과를 보여 다른 lupane-triterpene glycosides 화합물들에 비하여 낮은 증식 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2E).

고찰

본 연구에서는 호르몬불응성 전립선암 세포인 PC-3 세포를 이용하여 섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*)로부터 분리된 lupane-triterpene glycosides 화합물들이 PC-3 세포의 증식을 억제하는지 알아보았다.

Lupane을 골격으로 하는 여러 유도체들은 잠재적인 항암활성을 가지고 있다고 알려져 있다¹⁵⁻¹⁷. 본 연구에 사용된 화합물들인 acankoreoside D, acankoreoside A, acankoreoside F, acantrifoside A 및 acankoreoside K는 lupane-triterpene glycoside 류의 화합물로서 알려져 있다. 이들 화합물들은 각각 폐암 세포주인 A549, 급성 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60, 유방암 세포주인 MCF-7, 골수 단핵구성 백혈병 세포주인 U937에서 항암활성을 갖는다고 보고된 바 있다(Table 1)^{6, 7}. 그러나 전립선암 세포주에 대하여는 아직 보고되어 있지 않은 실정이다. 전립선암 세포 중 PC-3 세포는 호르몬불응성 전립선암 세포주로서, 골격근으로 전이된 전립선암 세포로 알려져 있다. 이런 전이성 암인 경우 치료가 어려우며, 특히 호르몬불응성 전립선암의 경우는 호르몬에 의존적인 전립선암에 비하여 효과적인 치료법이 발견되지 않은 실정이다. 따라서 호르몬불응성 전립선암 세포에서 섬오갈피로부터 분리된 lupane-triterpene glycoside 류 화

합물들의 증식억제 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하여 알아보았다. 각각의 화합물들을 PC-3 세포에 50 μ M의 농도로 처리하였을 때 세포증식억제 효과를 보면, acankoreoside D는 57.7% (Fig. 2A), acankoreoside A는 59.0% (Fig. 2B), acankoreoside F는 49.2% (Fig. 2C), acantrifoside A는 46.6% (Fig. 2D), 그리고 acankoreoside K는 45.4% (Fig. 2E)의 효과를 보여, 5개의 lupane-triterpene glycosides 화합물들 중 acankoreoside A가 50 μ M의 농도에서 59%로 가장 높은 세포증식억제효과를 나타냈다(Fig. 2B). 그러나 다른 화합물들 acankoreoside D, acankoreoside F, acantrifoside A, acankoreoside K의 경우에도 50 μ M의 농도에서 모두 40% 이상

Table 1. The effects of lupane-triterpene glycosides from *A. koreanum* on the growth of human cancer cells^{6, 7}

Compounds	IC ₅₀ (μ M)			
	A549	HL-60	MCF-7	U937
Acankoreoside D	9.2	>100	12.5	>100
Acankoreoside A	12.1	18.9	16.9	16.5
Acankoreoside F	32.1	33.2	16.5	21.5
Acantrifoside A	21.5	22.5	16.5	18.5
Acankoreoside K	6.8	18.6	23.1	>100

의 세포증식억제효과를 보이고 있어, 섬오갈피로부터 분리된 5개의 lupane-triterpene glycosides 화합물들이 모두 PC-3 세포의 증식을 억제하는데 가능성을 가지고 있다고 볼 수 있으며, 호르몬불응성 전립선암 세포를 효과적으로 치료하는데 잠재력을 가지고 있다고 볼 수 있다.

섬오갈피로부터 분리된 화합물들이 PC-3 세포의 성장을 저해한다는 본 연구결과는 치료법이 미비한 호르몬불응성 전립선암에 대하여 항암제로 이용될 수 있는 근거를 시사하며, 항암 치료제 또는 예방제의 유효 성분 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Lee YN. Flora of Korea. Kyohaksa, seoul 1996:544.
- 2) Cai XF, Shen GH, Nguyen TD, Kang OH, Lee YM, Lee JJ et al. Inhibitory effect of kaurane type diterpenoids from *Acanthopanax koreanum* on TNF- α secretion from trypsin-stimulated HMC-1 cells. Arch Pharm Res 2003;26:731-4.
- 3) Han SB, Park SK, Ahn HJ, Yoon YD, Kim YH, Lee JJ et al. Characterization of B cell membrane receptors of polysaccharide isolated from the root of *Acanthopanax koreanum*. Int Immunopharmacol 2003;3:683-91.
- 4) Kim JY, Yang KS. Screening of antioxidant activity of *Acanthopanax* species in vitro. Yakhak Hoeji 2003;47:361-4.
- 5) Shin KH, Lee S. The chemistry of secondary products from *Acanthopanax* species and their pharmacological activities. Nat Prod Sci 2002;8:111-26.
- 6) Nhiem NX, Tung NH, Kiem PV, Minh CV, Ding Y, Hyun JH et al. Lupane triterpene glycosides from leave of *Acanthopanax koreanum* and their cytotoxic activity. Chem Pharm Bull 2009;57:986-9.
- 7) Nhiem NX, Kiem PV, Minh CV, Ha DT, Tai BH, Yen PH et al. Lupane-type triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax koreanum* and their in vitro cytotoxicity. Planta Med 2009;75:1-5.
- 8) Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentino LM, Chen CH, Garrett PE, Lee KH. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. J MED Chem 1996;39:1016-7.
- 9) Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB et al. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. J Nat Prod 1994;57:243-7.
- 10) Inoue H, Saito H, Koshihara Y, Murota S. Inhibitory effect of glycyrrhetic acid derivatives on lipoxygenase and prostaglandin synthetase. Chem Pharm Bull 1986;34:897-901.
- 11) Dehm SM, Tindall DJ. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. J Cell Biochem 2006;99:333-44.
- 12) Nieto M, Finn S, Loda M, Hahn WC. Prostate cancer: Re-focusing on androgen receptor signaling. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:1562-8
- 13) Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. Nat Rev Cancer 2001;1:34-45.
- 14) Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res 1988;48:4827-33.
- 15) Gauthier C, Legault J, Lebrun M, Dufour P, Pichette A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. Bioorg Med Chem 2006;14:6713-25.
- 16) Mutai C, Abatis D, Vagias C, Moreau D, Roussakis C, Roussis V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. Phytochemistry 2004;65:1159-64.
- 17) Sarek J, Klinot J, Dzubak P, Klinotova E, Noskova V, Krecek V et al. New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. J Med Chem 2003;46:5402-15.