

## 쑥(*Artemisia princeps* Pampan.) 추출 성분의 암세포 증식 억제효과

황윤경 · 김동청\* · 황우익\*\* · 한용봉\*\*\*

수원여자전문대학 식품조리학과, 고려대학교 부설 한국영양문제연구소,\*  
고려대학교 의과대학 생화학교실,\*\* 고려대학교 사범대학 가정교육과\*\*\*

### Inhibitory Effect of *Artemisia princeps* Pampan. Extract on Growth of Cancer Cell Lines

Hwang, Yoon Kyung · Kim, Dong Chung\* · Hwang, Woo Ik\*\* · Han, Yong Bong\*\*\*

Department of Food and Culinary Art, Suwon Women's College, Suwon 441-748, Korea  
Korea Nutrition Research Institute,\* Korea University, Seoul 136-701, Korea  
Department of Biochemistry,\*\* Medical College, Korea University, Seoul 136-701, Korea  
Department of Home Economics Education,\*\*\* Educational College, Korea University,  
Seoul 136-701, Korea

### ABSTRACT

To investigate the antitumor activity of mugwort(*Artemisia princeps* Pampan.), petroleum ether extract of mugwort was partially purified by a silica gel chromatography. Among several fractions, the fraction which was obtained under the elution with acetone, showed potent cytotoxicity against mouse leukemia cell line(L1210), human colon cancer cell line(HCT-48) and human hepatoma cell line(Hep G2), but was less effective with normal cell line(mouse embryo cell). Acetone fraction appeared to be glycolipid by Benedict test and the major fatty acids of the lipid were C 16 : 0, C 18 : 2, C 18 : 3 by GC/MS analysis. (*Korean J Nutrition* 31(4) : 799~808, 1998)

**KEY WORDS** : antitumor activity · *Artemisia princeps* Pampan. · petroleum ether extract.

## 서 론

암은 현대의학의 가장 큰 당면과제로서, WHO의 보고에 의하면 환경성 요인으로 인한 발생율이 85%에 달하며, 환경성 발암인자<sup>1)</sup> 중 특히 식품이 차지하는 비율이 큰 것으로 알려져 있다. 또한 동물 실험<sup>2)</sup>에서도 영양소가 결핍되었을 때 식품 중의 발암성 물질에 의한 암 발생율이 크다고 보고된 바 있어, 식이 요인의 중요성이 지적되고 있다. 이와 관련하여 최근 식이와 관련된 암의 원인물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐 아니라 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제 채택일 : 1998년 5월 7일

로 이용하기 위한 물질이 탐색되고 있다<sup>3)</sup>. 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제의 대부분은 합성 물질들로 부작용이 심하여 문제가 되고 있다. 이로 인해 최근 세계적으로 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연산물을 대상으로 항암성 물질의 검색이 많이 시도되고 있다<sup>4,5)</sup>. 특히, 우리나라에서는 고래로부터 한방에서 200여 종의 생약제가 암환자에게 처방되고 있음이 밝혀졌고<sup>6,7)</sup>, 또 수종의 한약제<sup>8)</sup>와 마늘<sup>9)</sup>, 인삼<sup>10)</sup>, 도라지<sup>11)</sup> 등에서 항암작용이 보고된 바 있다. 현등<sup>12)</sup>은 일부 약용식물 및 식용식물의 추출물의 항암효과에 관한 연구를 보고한 바 있으며 중국이나 일본에서도 식용식물의 항암성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 식용식물 중에서 쑥은 우리나라에서 많이

섭취되고 있고 그 성분 및 약리작용에 대해서도 많이 보고되어 있다<sup>13-22)</sup>.

쑥(*Artemisia princeps* Pampan.)은 국화과(compositae)에 속하는 다년생 초본으로 지금까지 보고된 약 400여 종의 *Artemisia* 속 식물 중 약 300여종이 우리나라에 자생하고 있으며, 의초, 황초, 영고 등으로도 불린다. 쑥은 우수한 녹엽 단백질원으로서 지방 성분 중에는 필수 지방산이 많아 영양학적인 측면에서 매우 우수한 식품이며, 섬유소량과 회분량이 많아 체중조절을 위한 식품으로서 권장할 만하다는 보고<sup>13)</sup>도 있다. 쑥은 특수 성분으로 알카로이드, 비타민, 무기질 등이 들어 있고, 정유가 0.02% 함유되어 있으며 그 주성분으로는 cineol,  $\alpha$ -thujon, sesquiterpene, sesquiterpene alcohol 외에 아테닌, 콜린 등이 함유된 것으로 밝혀져 있다<sup>14)</sup>. 생쑥과 덕쑥의 향기성분은 benzaldehyde, pinene, myrcene, cineole, 2-pyrrolidinone, camphor, thujone, 1-acetyl piperidine, caryophyllene, coumarin, farnesol 등 11가지가 보고되었으며<sup>15)</sup>, 쑥의 휘발성 화합물이 돌연변이 억제 효과를 가진다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 산쑥(*A. montana* Pampan.)은 caffeic acid, catechol, protocatechuic acid 등을 많이 함유하여, 그 항산화 효과가 우수하다고 알려졌고<sup>17)</sup>, 쑥의 정유 성분에서 santolina alcohol이 항균 활성을 가진다고 보고되었다<sup>18)</sup>. 한편, 민간요법과 한방에서 약재로 많이 사용되어 온<sup>19)</sup> 쑥의 효능은 건위, 하복부진통, 냉증, 지혈, 진통, 구취, 악취 제거 등에 쓰인다고 알려져 있다. 쑥의 항암성에 관한 연구로는 대만의 Lee와 Lin<sup>20)</sup>은 참쑥(*A. lavandulaefolia* D.C.)을 포함한 수종의 식물에서 항돌연변이 효과를 확인하였고, Xu 등<sup>21)</sup>은 쑥(*A. capillaris*)의 수용성 추출물이 종양괴사인자를 활성화시키는 효과를 가진다고 보고하였고, 그 외에 쑥의 페놀 화합물의 항암 활성<sup>22)</sup>도 발표된 바 있다.

이와같은 관점에서 황<sup>23-25)</sup>은 각종 생약제 및 식품의 항암성을 수증 암세포를 대상으로 실험한 바 있고, Sato 등<sup>26)</sup>도 이들 생약제에 대한 항암성을 규명하여 부작용이 적은 항암제 개발 가능성을 제시하고자 인체 조직 배양을 이용하여 생약제의 항암성을 탐색한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 쑥의 유효 성분이 항암제 개발의 기초자료로 사용될 수 있는지 탐색하고, 식품 산업에서 항암효과를 가진 기능성 식품으로의 제조가능성을 밝히고자 쑥의 유효성분을 추출하여 생쥐의 백혈병성 임파모세포, 인체 결장암세포 및 인체 간암세포에 대한 증식 억제 효과를 관찰하고, 유효성분을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

쑥(*Artemisia princeps* Pampan.)은 강화군 강화읍에서 채집하고 식용 부위만 선별하여 3일간 그늘에서 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하여 실험용 시료로 사용하였다. L1210 암세포의 배양액은 Fischer's 배지이며, HCT-48, Hep G2 및 생쥐 배아세포(mouse embryo cell)의 배양액은 Dulbecco's modified eagle 배지(DMEM)로 말혈청(horse serum), 송아지혈청(fetal bovine serum), trypsin-EDTA와 더불어 모두 G-IBCO(Grand Island Biological Co.) 제품을 사용하였다.

추출용매인 석유에틸은 Mallinckrodt 제품을, 실리카겔 크로마토그래피에 사용한 담체는 Bio-sil A 100 mesh로 Bio-Rad 제품을, 클로로포름, 아세톤, 메탄올 용매는 Merck 제품을, 그외 시약은 Sigma사 1급 시약을 사용하였다.

### 2. 사용 세포

본 실험에 사용한 암세포는 mouse 유래의 백혈병 임파모세포인 L1210과 인체의 결장암세포인 HCT-48, 인체 간암세포인 Hep G2이었고, 정상세포로는 생쥐 배아세포(mouse embryo cell)를 사용하였다. L1210 세포와 HCT-48 세포는 고려대학교 의과대학 생화학실에서 *in vitro*로 배양해 오던 것을 사용하였고, Hep G2 세포는 ATCC(America type culture collection)사에서 구입하여 사용하였으며, 생쥐 배아세포는 임신한 ICR mouse에서 직접 태아를 꺼내어 1차 배양하여 실험에 사용하였다.

### 3. 암세포 및 정상세포 배양

L1210은 Fischer와 Sartorelli<sup>27)</sup>의 방법으로 배양하였다. 즉, 말혈청을 10% 함유한 Fischer's 배지에 암세포를 일정량씩 첨가하여 16×25mm 크기의 파이렉스 시험관에 분주한 뒤 37℃ 항온기에서 수평을 유지시켜 배양하였다. 그리고, HCT-48과 Hep G2는 5% 송아지혈청 및 항생제(antibiotic-antimycotic)를 첨가한 배지(DMEM)를 배양액으로 하여 플라스크 또는 35mm 페트리접시에 이식시킨 후 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37℃의 CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하여 실험에 사용하였다<sup>28)</sup>. 이들 용기에 암세포가 90% 포화상태(4×10<sup>5</sup> cells/mL)로 증식되면 완충식염수(phosphate buffered saline)로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA를 1mL 넣고 10분간

항온기에서 분리시켜 새 배지에 계대 배양하였다.

정상세포인 생쥐 배아세포의 배양<sup>29)</sup>을 위해 ICR mice를 임신한지 13일째 되는 날에 태아를 꺼내어 가위로 잘게 썰어 트립신 처리를 한 뒤 세포를 분리하였다. 10% 송아지혈청이 포함된 DMEM 배양액으로 1차 배양을 하였고, 72시간 증식후에 트립신을 처리하여 세포수를 측정하여 실험에 사용하였다.

**4. 암세포 및 정상세포의 배가시간(doubling time) 측정**

L1210 암세포는 시험관에  $2 \times 10^4$  cells/mL이 되도록 분배한 다음 37℃의 CO<sub>2</sub> 항온기 내에서 수평을 유지시켜 배양하면서 배양시간별로 세포수를 세포수 측정기로 측정하고 이를 도시하여 그 증식 곡선으로부터 세포수가 2배로 증가하는데 소요되는 시간을 산출하였다<sup>30,31)</sup>. 한편, 암세포인 HCT-48과 Hep G2 및 정상세포인 생쥐 배아세포의 배가시간은 각 세포를 약  $3 \sim 4 \times 10^4$  cells/3mL이 되도록 이식시킨 후 부착 증식되는 세포를 24시간 간격으로 트립신을 처리하여 분리한 후 세포수 측정기로 각 페트리접시의 세포수를 측정하고 이를 도시하여 그 증식 곡선으로부터 세포수가 2배로 증가하는데 소요되는 시간을 산출하였다.

**5. 썩의 유효 성분 추출**

썩(200g)을 분말화한 뒤 석유에틸(2L)을 용매로 진탕 항온조에서 3일간 40℃에서 추출하여 상층액만 취해 0.22µm 여과지로 여과하여, 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축시키고, 질소가스를 이용하여 용매를 완전히 날린 뒤, 건조 중량을 측정하고, 실험 시에는 소량의 무수에탄올에 녹여 필요한 농도로 배양액에 희석하여 사용하였다<sup>32)</sup>.

**6. 석유에틸 추출물의 컬럼 크로마토그래피 분획 및 분석**

썩의 석유에틸 추출성분(0.5g)을 클로로포름(5mL)에 용해시킨 후 실리카겔 컬럼(2.5×30cm)에 투여하였다. 클로로포름 175mL, 아세톤 700mL, 메탄올 175mL을 차례로 흘려 각 단계별로 분획을 회수하였다. 이렇게 모은 각 단계의 분획을 차례로 클로로포름 분획, 아세톤 분획, 메탄올 분획으로 명하였다. 이들을 0.22µm 여과지로 여과하고 용매를 증류하여 제거한 뒤 실험에 사용하였다.

썩의 석유에틸 추출성분과 아세톤 분획의 성분을 규명하기 위해 메틸화(methylation)시켜<sup>33)</sup>, 가스 크로마토그래피(Gass Chromatography)로 분석하고 여기서 얻은 각 피크들을 질량분석(Mass Spectrometry)을 실시하였다. 분석 조건은 Table 1과 같다. 또한, 아세톤 분획의 성분이 당시질인지 확인하기 위해 이를 염

산으로 가수분해시켜 Benedict 실험<sup>34)</sup>을 실시하였다.

**7. 암세포 및 생쥐 배아세포 증식 억제효과 측정**

썩의 석유에틸 추출물과 컬럼 크로마토그래피의 클로로포름 분획, 아세톤 분획, 메탄올 분획을 투여하여 암세포 증식 억제 효과를 측정하였다. L1210의 경우 썩의 석유에틸 추출물 및 클로로포름 분획, 아세톤 분획, 메탄올 분획이 농도별로 함유된 배지에 세포를  $2 \times 10^4$  cells/mL이 되도록 첨가한 후 시험관에 배분하여 37℃에서 배양하면서 배양시간별(24, 48, 72hr), 추출물 농도별(40µg/mL, 80µg/mL, 120µg/mL)로 각 군의 세포수를 세포수 측정기로 측정하여 대조군(추출물을 넣지 않은 군)과 비교하였다. 그리고, T-75 플라스크에서 배양한 HCT-48 및 Hep G2 등 인체 암세포는 트립신 처리하여 분리한 후 배양액으로 희석하고, 35mm 페트리접시에 각 3mL씩 분배 이식시킨 후, 약 24시간 배양하여 각 암세포가 각 접시에 부착, 증식되어 세포수가 약  $2 \sim 3 \times 10^4$  cells/3mL되었을 때 각 추출 성분이 농도별(100µg/mL, 200µg/mL, 300µg/mL)로 함유

**Table 1.** Instruments and operating conditions for GC/MASS

Instrument	Hewlett-Packard 5890 II GC Hewlett-Packard 5988 MS
Ionization method	Electron ionization(EI)
EI condition	Electron Energy : 70eV Source Temperature : 250℃ Trap Current : 300µA
Column	Ultra-2(50m×0.2mm×0.11µm)
Detector Temp.	320℃
Injector Temp.	300℃
Carrier gas	He(0.5mL/min)
Temperature condition	60℃(4min, 10℃/min) - 300℃

**Table 2.** GC/MASS analysis of petroleum ether extract of mugwort and Acetone fraction

Compounds	Content(%)	
	Petroleum ether	Acetone fraction <sup>a</sup>
1 C16 : 0	13.99	22.81
2 C18 : 2	10.81	12.55
3 C18 : 3	18.28	27.69
4 C18 : 0	1.43	1.29
5 C20 : 0	1.43	0.70
6 C22 : 0	2.07	3.19
7 C27 : 0	-	1.49
8 Unknown	51.99	30.28
Total	100.00	100.00

<sup>a</sup> : the fraction obtained under the elution with acetone in silica gel column chromatography

된 배양액으로 교체하였다. 그후 72시간 배양하면서 24시간마다 각 접시에 증식된 암세포를 트립신 처리하여 분리하고, 식염수(0.9% NaCl)로 희석하여 세포수 측정기로 각 군의 세포수를 측정하였다. 이때 3개의 펠트리접시의 값을 측정하여 평균을 구하였다. 대조군은 실험군에서 각각의 추출액 첨가량에 해당되는 양의 무수알콜(0.2% 미만)을 첨가하여 동일한 조건에서 측정하였다. 정상세포인 생쥐 배아세포의 경우는 인체 암세포와 같은 방법으로 실험하였고, 배양액은 10% 송아지혈청이 함유된 DMEM을 사용하였으며, 아세톤 분획에 대해서만 실험하였다. 대조군의 세포수를 기준하여 다음 식에 의하여 각각의 추출물 첨가 배양군의 세포 증식을 또는 사멸율을 산출하였다. 증식은 대조군과 비교하여 추출물 첨가배양군의 세포 증식 및 증식억제의 정도를 나타내고, 사멸율은 추출물 첨가 배양시 출발시의 세포수에 비해 감소된 세포수의 비율로써 (-) 값으로 나타나며 이는 세포가 사멸한 정도를 나타낸다. 추출물 첨가 배양군의 배양시간에 따른 증식세포수가 출발세포수보다 늘어나면 증식으로 나타내었고, 출발세포수보다 사멸되어 줄어들면 사멸율로 나타내었다.

$$\text{증식율(\%)} = \frac{\text{실험군의 배양시간별 증식세포수} - \text{출발시 세포수}}{\text{대조군의 배양시간별 증식세포수} - \text{출발시 세포수}} \times 100$$

$$\text{사멸율(\%)} = \frac{\text{실험군의 배양시간별 증식세포수} - \text{출발시 세포수}}{\text{출발시 세포수}} \times 100$$

쑥의 석유에틸 추출물 및 클로로포름 분획, 아세톤

분획, 메탄올 분획의 세포증식 억제 효과를 같은 수준에서 비교하기 위해 활성의 단위를 다음과 같이 정하였다. 1 단위(unit)는 시료가 농도별로 들어 있는 배양액에서 각 세포를 24시간 배양한 후, 대조군과 비교하여 각 실험군 세포의 배가시간을 2배로 연장시키는데 소요되는 배양액 mL당 함유된 각 시료 추출물의 건조 중량으로 정하였다.

8. 암세포 형태의 조직학적 관찰 및 크기 분포 측정

HCT-48 암세포배양액에 아세톤 분획을 100µg/mL 및 300µg/mL 씩 첨가하고, HCT-48 세포를 72시간 배양하면서 실험군과 대조군의 세포 모양의 변화를 24시간마다 현미경으로 관찰하여 세포증식 억제현상을 비교하였다<sup>35)36)</sup>. 또한, HCT-48 암세포배양액에 아세톤 분획을 300µg/mL 첨가하고 72시간 동안 배양하면서 대조군과 비교해 암세포 크기 분포에 미치는 영향을 세포 크기 분포 측정기(size distribution analyzer)를 이용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포 및 정상세포의 배가시간(doubling time)

본 연구에서 사용한 L1210의 배가시간은 약 12시간으로 Chu와 Fischer<sup>37)</sup>의 보고와 일치하였고, HCT-48은 24시간으로 Morita 등<sup>38)</sup>의 보고와 일치되어 정상적으로 증식되고 있음을 알 수 있었다. Hep G2의 배가시간은 28~32시간이었고, 정상세포인 생쥐 배아세포의 배가시간 측정결과는 32~36시간이었다.

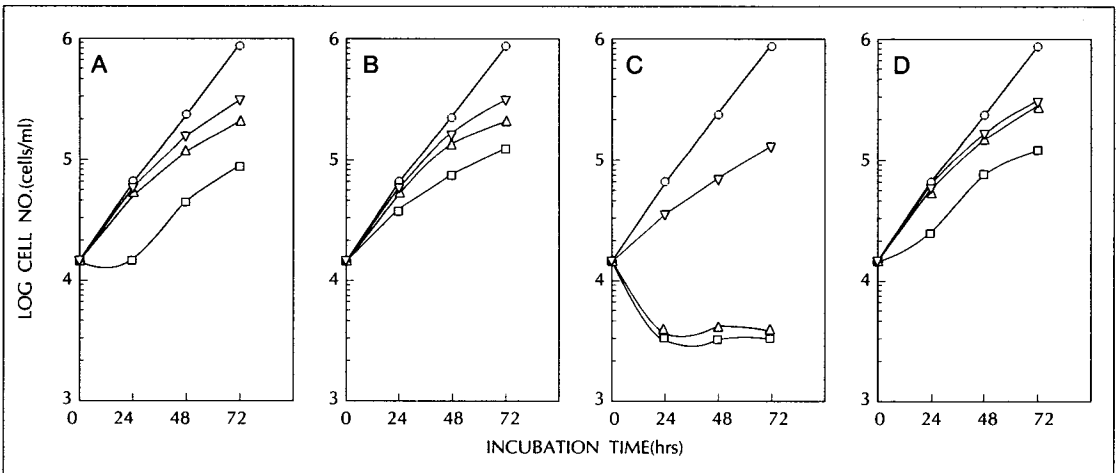


Fig. 1. Growth curves of L1210 cells in the culture medium containing the petroleum ether extract of mugwort and the eluted fractions throughout silica gel chromatography by solvents. A : petroleum ether extract, B : Eluted fraction by chloroform, C : Eluted fraction by acetone, D : Eluted fraction by methanol in a silica gel column chromatography. ○-○ : Control, ▽-▽ : 40µg/ml, △-△ : 80µg/ml, □-□ : 120µg/ml

2. 쑥의 유효 성분 분석

쑥의 석유에텔 추출물과 아세톤 분획의 성분을 가스 크로마토그래피와 질량분석을 실시한 결과는 Table 2와 같다. 쑥의 석유에텔 추출물은 주 물질이 C16 : 0인 hexadecanoic acid(palmitic acid), C18 : 2인 9, 12-octadecadienoic acid(linoleic acid), C18 : 3인 9,12,15-octadecatrienoic acid(linolenic acid)였고, 그 외에 C18 : 0인 stearic acid와 C20 : 0인 arachidic acid, C22 : 0인 behenic acid 등이 확인되었으며, 미확인된 긴 사슬 탄화수소(long chain hydrocarbon) 등이 다량 나타났다. 쑥의 석유에텔 추출물의 컬럼 크로마토그래피에서 얻은 아세톤 분획의 Benedict 테스트 결과, 양성으로 나타나 이 분획이 당지질 성분을 포함함을 확인하였다. 아세톤 분획의 주물질은 C16 : 0인 hexadecanoic acid(palmitic acid), C18 : 2인 9,12-octadecadienoic acid(linoleic acid), C18 : 3인 9,12,15-octadecatrienoic acid(linolenic acid)였고, 그 외에 C18 : 0인 octadecanoic acid와 C20 : 0인 eicosanoic acid(arachidic acid), C22 : 0인 behenic acid, C27 : 0인 heptacosanoic acid가 소량 존재하였으며, 역시 다량의 미확인 성분을 포함하고 있음이 확인되었다.

3. 쑥 주출 성분의 세포 증식 억제효과

L1210 암세포를 쑥의 석유에텔 추출물과 이를 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 클로로포름 분획, 아세톤 분획, 메탄올 분획을 각각 첨가한 배양액에서 24, 48, 72 시간 배양한 후의 증식 곡선은 Fig. 1과 같다. 즉, 출발 세포수  $1.5 \times 10^4$  cells/mL이던 것이 24, 48, 72시간 배

양 후에 대조군은  $6 \times 10^4$ ,  $2.2 \times 10^5$  및  $8 \times 10^5$  cells/mL로 배양시간 경과에 따라 점차 증식되는 반면 석유에텔 추출물 첨가시에는 증식이 억제되었다. 쑥의 석유에텔 추출물을 40, 80 $\mu$ g/mL 첨가시 증식율은 24시간 후에 86%, 67%, 48시간 후에 71%, 51%, 72시간 후에 36%, 24%였고, 120 $\mu$ g/mL 첨가시에는 24시간 후에 증식이 완전히 억제되었고, 48, 72시간 배양 후에는 증식율이 각각 15%와 8%이었다(Fig. 1A). 아세톤 분획을 40 $\mu$ g/mL 첨가 배양시 24, 48, 72시간 후에 증식율이 33%, 22%, 13%로 세포증식이 억제되었고, 80  $\mu$ g/mL, 120 $\mu$ g/mL 첨가 배양시 사멸율이 24시간 후에 -77%, -80%, 48시간 후에 -77%, -82%, 72시간 후에는 -79%, -82%로 세포가 강력히 사멸되는 효과를 보였다(Fig. 1C). 클로로포름 분획의 경우는 40, 80, 120 $\mu$ g/mL 첨가 배양에서 24시간 후에 증식율이 91%, 67%, 44%이었고, 72시간 후에 36%, 25%, 15%로 증식 억제효과가 낮게 나타났다(Fig. 1B). 메탄올 분획의 경우는 40, 80, 120 $\mu$ g/mL 첨가 배양에서 증식율이 24시간 후에 91%, 78%, 22%이었고, 72시간 후에는 36%, 30%, 15%로 클로로포름 분획과 유사하게 낮은 증식 억제효과를 보였다(Fig. 1D). 쑥의 석유에텔 추출물의 암세포 증식억제 활성 성분은 대부분 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 아세톤 분획으로 이행되었고, 클로로포름 분획과 메탄올 분획에는 미미한 효과만이 나타났다.

HCT-48 암세포를 쑥의 석유에텔 추출물과 클로로포름 분획, 아세톤 분획, 메탄올 분획을 각각 첨가한 배양액에서 24, 48, 72시간 배양한 후의 증식 곡선은

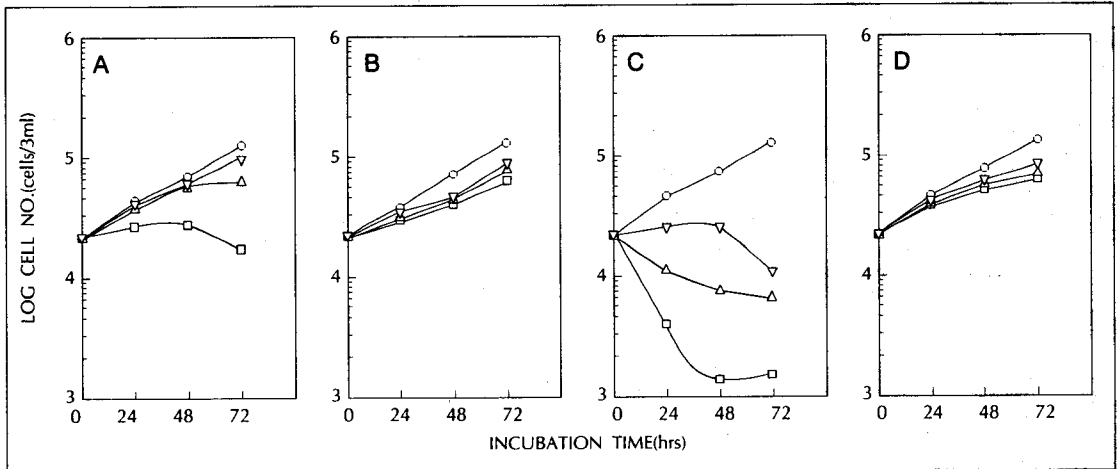


Fig. 2. Growth curves of HCT-48 cells in the culture medium containing the petroleum ether extract of mugwort and the eluted fractions throughout silica gel chromatography by solvents. A : petroleum ether extract, B : Eluted fraction by chloroform, C : Eluted fraction by acetone, D : Eluted fraction by methanol in a silica gel column chromatography. ○-○ : Control, ▽-▽ : 100 $\mu$ g/ml, △-△ : 200 $\mu$ g/ml, □-□ : 300 $\mu$ g/ml

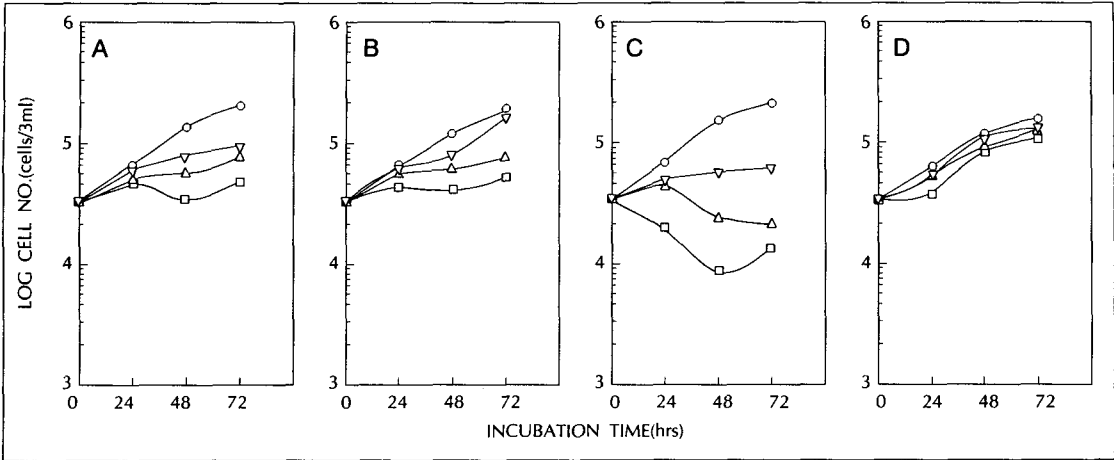


Fig. 3. Growth curves of Hep G2 cells in the culture medium containing the petroleum ether extract of mugwort and the eluted fractions throughout silica gel chromatography by solvents. A : petroleum ether extract, B : Eluted fraction by chloroform, C : Eluted fraction by acetone, D : Eluted fraction by methanol in a silica gel column chromatography. ○-○ : Control, ▽-▽ : 100µg/ml, △-△ : 200µg/ml, □-□ : 300µg/ml

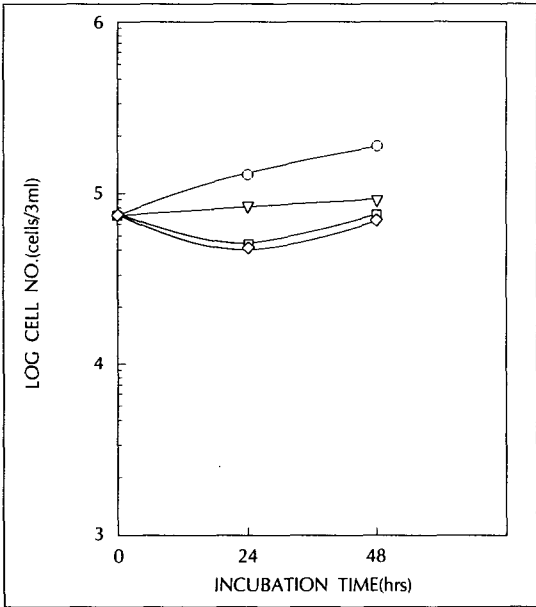
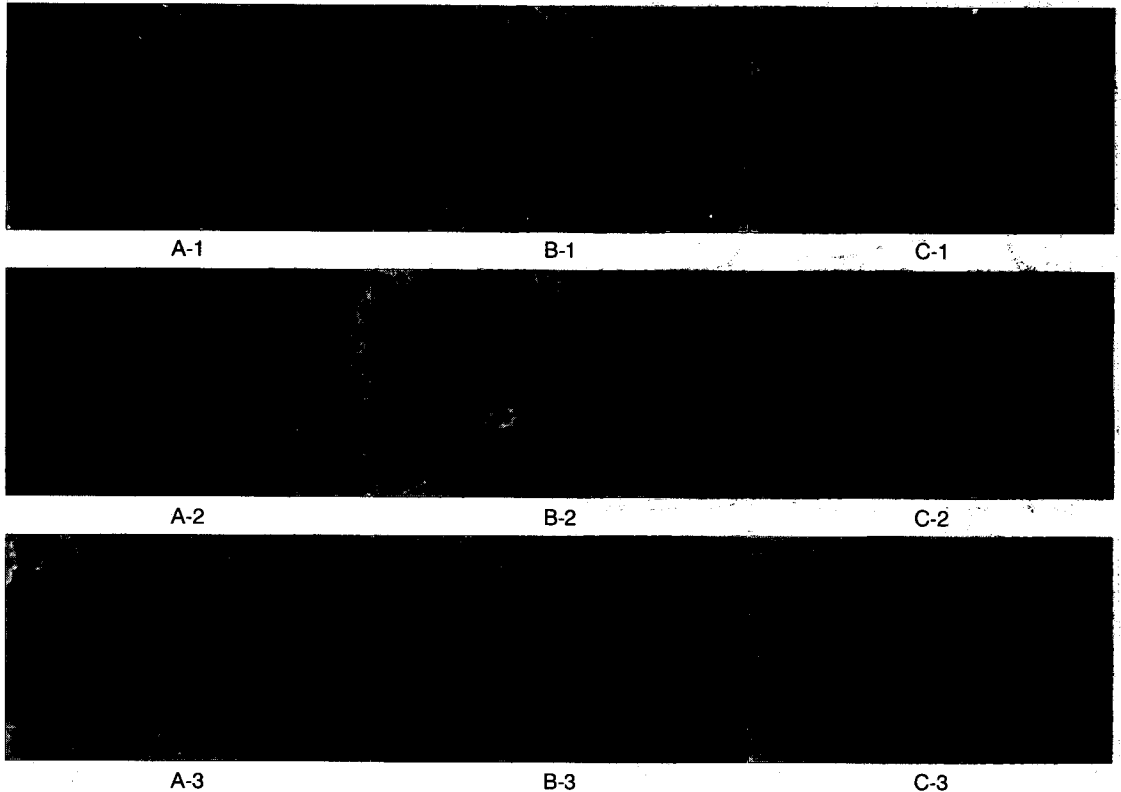


Fig. 4. Growth curves of mouse embryo cells in the culture medium containing the fraction eluted by acetone throughout silica gel column chromatography. ○-○ : Control, ▽-▽ : 100µg/ml, □-□ : 200µg/ml, ◇-◇ : 300µg/ml

Fig. 2와 같다. 즉, 출발 세포수  $2 \times 10^4$  cells/3mL에서 24, 48, 72시간 배양 후 대조군은  $4 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $1.3 \times 10^5$  cells/3mL로 배양시간 경과에 따라 점차 증식되었다. 석유에텔 추출물을 100µg/mL 및 200µg/mL 첨가 배양 후에는 대조군과 큰 차이 없이 증식하였고, 300µg/mL 첨가 배양에서는 24, 48시간 배양 후에 증

식이 25%로 증식이 억제되다가 72시간 배양후에 사멸율이 -20%로 세포가 사멸되는 현상을 보였다(Fig. 2A). 아세톤 분획을 100µg/mL 첨가 배양할 때는 24, 48, 72시간후에 증식율 및 사멸율이 10%, -5%, -51%로 증식이 현저히 억제 및 사멸되었으며, 200µg/mL 및 300µg/mL 첨가 배양시 사멸율이 -45%에서 -90%까지 세포가 거의 사멸되는 현상을 보여 아세톤 분획이 강력한 증식 억제 및 사멸 효과를 나타냄을 알 수 있다(Fig. 2C). 클로로포름 분획과 메탄올 분획의 경우는 100µg/mL 첨가 배양에서 석유에텔 추출물의 첨가시와 유사한 증식율을 나타내었고, 200µg/mL, 300µg/mL 첨가 배양에서도 농도 증가에 따라 큰 차이가 없어 증식 억제 효과가 미미함을 보였다(Fig. 2B, D).

Hep G2 암세포를 쑥의 석유에텔 추출물과 클로로포름 분획, 아세톤 분획, 메탄올 분획을 각각 첨가한 배양액에서 24, 48, 72시간 배양 후 증식 곡선은 Fig. 3과 같다. 즉, 출발 세포수  $3.1 \times 10^4$  cells/3mL이던 것이 24, 48, 72시간 배양후 배양 시간 경과에 따라  $5.8 \times 10^4$ ,  $1.2 \times 10^5$ ,  $1.8 \times 10^5$  cells/3mL로 점차 증식되었다. 석유에텔 추출물을 100, 200, 300µg/mL 첨가하여 48시간 배양후, 44%, 32%, 5%의 증식율을 보였고(Fig. 3A), 동일한 조건에서 클로로포름 분획의 경우는 80%, 29%, 9%, 메탄올 분획의 경우는 80%, 73%, 60%의 증식율을 보였다(Fig. 3B, D). 그러나, 아세톤 분획의 경우는 72시간 배양후 증식율 및 사멸율이 9%, -42%, -61%로 현저한 증식억제 및 사멸 효과를 나타내었다(Fig. 3C). Hep G2 세포에 대한 증식곡선에서도 석유에텔 추출물의 암세포 증식억제 활성이 아세



**Fig. 5.** Photomicrographs( $\times 100$ ) of HCT-48 cells incubated with or without(control) the fraction eluted by acetone throughout silica gel column chromatography.

A-1,2,3 : Control group incubated for 24, 48 and 72 hrs., respectively.

B-1,2,3 : The group incubated with acetone fraction 100µg/ml for 24, 48 and 72 hrs., respectively.

C-1,2,3 : The group incubated with acetone fraction 300µg/ml for 24, 48 and 72 hrs., respectively.

톤 분획으로 이행되었음을 확인할 수 있었다.

정상세포인 생쥐 배아세포를 1차 배양하고, 컬럼 크로마토그래피의 각 분획 중 가장 암세포 증식억제 활성이 큰 아세톤 분획을 첨가하여 증식곡선 Fig. 4를 얻었다. 출발 세포수  $7 \times 10^4$  cells/3mL에서 24, 48시간 배양후 대조군은  $1.2 \times 10^5$ ,  $1.8 \times 10^5$  cells/3mL로 점차 증식한데 비해, 아세톤 분획을 100µg/mL 첨가 배양한 군은 증식율이 16%, 47%이었고, 200µg/mL 및 300 µg/mL 첨가하여 48시간 배양 후에 -5%, -3%의 매우 낮은 사멸율을 보였다. 이는 아세톤 분획이 다른 암세포에 대한 높은 증식 억제활성을 보이는 것에 비해 현저한 차이를 나타내는 것으로, 정상세포인 배아세포에 대해서는 아세톤 분획의 강한 사멸효과가 감소되는 것을 볼 수 있었다.

결과적으로 썩의 석유에텔 추출물과 이를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 아세톤 용출 분획은 L1210과 HCT-48 및 Hep G2 등의 암세포에 대하여 높은 세포 증식억제 효과를 나타내었고, 정상세포인 생쥐

배아세포에는 영향이 작음을 알 수 있었다. 썩의 석유에텔 추출물의 경우는 L1210, HCT-48 및 Hep G2 암세포에서 각각 96, 270 및 300µg/mL이 1 unit를 나타냈고, 아세톤 분획의 경우는 L1210, HCT-48, 및 Hep G2 암세포에서 40, 60 및 80µg/mL이 1 unit를 나타내었다. 아세톤 분획은 석유에텔 추출물보다 L1210, HCT-48 및 Hep G2 암세포에 대해 각각 2.4배, 4.5배 및 3.8배 높은 활성을 나타내었다.

#### 4. HCT-48 암세포 형태에 미치는 영향

썩의 석유에텔 추출물로 얻은 활성 성분이 암세포의 형태 변화에 미치는 영향을 보기 위해 컬럼 크로마토그래피의 아세톤 분획을 HCT-48 암세포에 100µg/mL 및 300µg/mL 첨가하고 72시간 배양하면서 세포의 형태 변화를 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다. 72시간까지의 대조군 세포들은(A-1,2,3) 모두 배양 시간이 경과함에 따라 정상적으로 증식되었으나, 아세톤 분획을 100µg/mL 첨가 배양한 경우(B-1,2,3)는 배양

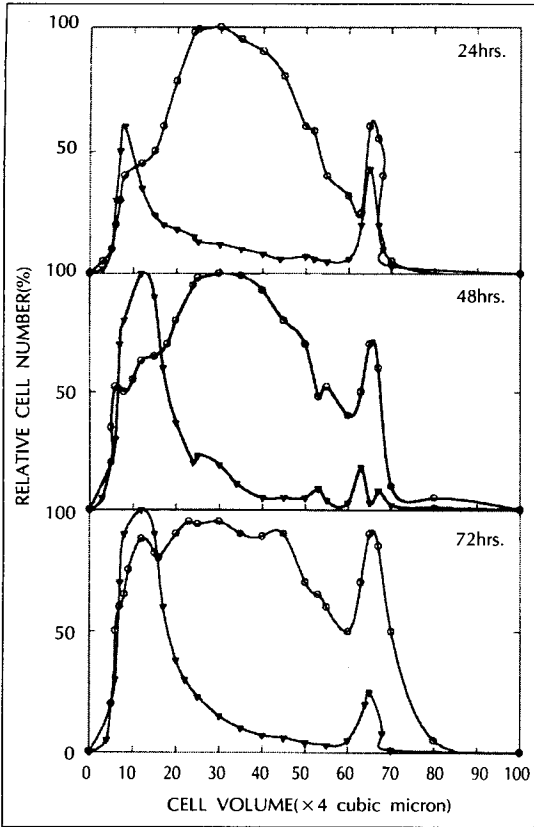


Fig. 5. Size distribution curves of HCT-48 cells incubated with and without the fraction eluted by acetone throughout silica gel column chromatography.

○-○ : Control, △-△ : Fraction eluted by acetone

시간 경과에 따라 세포수가 감소하고 모양이 약간 위축됨을 볼 수 있다. 한편, 아세톤 분획을 300µg/mL 첨가 배양한 경우(C-1,2,3)는 세포수의 감소가 24시간부터 현저하게 나타나며 세포크기가 상당히 위축되었을 뿐 아니라 세포가 겨우 바닥에 붙어 있는 정도로 심하게 사멸되었음을 볼 수 있었다.

5. HCT-48 암세포의 크기 분포에 미치는 영향

HCT-48 암세포의 배양시간별로 세포의 크기분포를 세포 크기분포 측정기(size distribution analyzer)로 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 대조군의 경우 세포가 24시간에는 80~160 cubic micron에서 최다 분포를 보이며 40~200 cubic micron에 많이 분포하고 있다. 그런데 아세톤 분획을 300µg/mL 첨가 배양한 경우는 40 cubic micron에서 최대 피크를 보이며 80~160 cubic micron에 해당하는 세포는 현저히 감소했음을 알 수 있다. 48시간, 72시간 배양시에는 이런 크기 축소 경향이 더 강화되어 40 cubic micron 부근에

서 최대 피크를 보이며 전체 세포의 크기가 많이 줄어들어 활성성분이 세포에 손상을 끼쳤다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 쑥의 석유에테르 추출 성분과 그중에서도 칼럼 크로마토그래피의 아세톤 용출 분획이 정상세포인 생쥐 배아세포(mouse embryo cell)에는 영향을 거의 미치지 않고, mouse 유래의 백혈병 임파모세포인 L1210과 인체의 결장암세포인 HCT-48, 인체 간암세포인 Hep G2의 증식을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다. 인삼과 도라지에서 역시 석유에테르 추출물이 효과적인 항암효과를 나타낸다고 보고되었는데<sup>10(11)(39)(40)</sup>, 쑥 및 도라지의 석유에테르 추출물의 칼럼 크로마토그래피 용출분획을 HCT-48 암세포에 처리하여 72시간 배양한 결과를 비교하여보면, 쑥의 경우 300µg/mL 처리시에 사멸율이 -90%로 나타났고, 도라지의 경우 300µg/ml 처리시에 사멸율이 약 -90%로 보고되었으며<sup>11)</sup>, 쑥 및 인삼의 석유에테르 추출물의 칼럼 크로마토그래피 용출분획을 HepG2 암세포에 처리하여 72시간 배양한 결과를 비교하여보면, 쑥의 경우 200µg/mL 처리시에 사멸율이 -42%로 나타났고, 인삼의 경우 120µg/ml 처리시에 사멸율이 약 -40%로 보고된 바 있어<sup>39)</sup> 쑥의 석유에테르 추출물이 우수한 암세포 증식억제 효과를 가짐을 알 수 있었다.

결론

쑥의 석유에테르 추출물과 이를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 아세톤 용출하여 얻은 분획의 세포 증식 억제효과를 생쥐 유래의 백혈병성 임파모세포인 L1210과 인체 결장암세포인 HCT-48 및 인체 간암세포인 Hep G2를 대상으로 분석한 결과 모든 암세포에 대하여 현저히 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었고, 정상세포인 생쥐 배아세포에는 영향이 적었다. 컬럼크로마토그래피의 아세톤 용출 분획을 인체 결장암세포 HCT-48에 첨가 배양시 세포수가 현저히 감소되었고, 세포의 모양도 변형, 위축되었으며, 암세포의 크기 분포가 현저히 감소되는 세포 조직학적 현상을 관찰할 수 있었다. 또한, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 암세포 증식억제 성분이 아세톤 용출 분획으로 이행됨을 알 수 있었고, 그 성분은 Benedict 테스트에서 양성 결과를 보여 당지질 성분을 포함함이 확인되었고, GC/MS 분석 결과 주성분은 C16 : 0, C18 : 2, C18 : 3이었다. 따라서 쑥에 의한 암세포 증식억제의 주효과는 당지질 성분에 기인할 가능성이 높다고 여겨진다. 이상의 결과를 종합해보면 석유에테르 추출된 쑥의 유효성분이 여러



종류의 암세포를 효과적으로 증식억제시키고, 정상세포에는 영향이 적은 것으로 나타났으므로 생취 배아세포보다 증식속도가 느리게 안정화되어 있는 정상 체세포에 대해서는 부작용이 매우 적을 것으로 보이며, 이에 따라 쑥의 유효성분을 효과적인 항암제로 개발함에 기초자료를 제공할 것으로 여겨진다.

### Literature cited

- 1) Wynder EL, Gori GB. Contribution of environment to cancer medicine. *J Natl Cancer Inst* 58 : 826-832, 1977
- 2) Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs(retinoids). *Fed Proc* 35 : 1332, 1976
- 3) Miyazaki T, Nishijima M. Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull* 29(12) : 3611-3616, 1981
- 4) Ha YL, Michael WP. Naturally-occurring novel anticarcinogenes : Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA)(in Korean). *J Korean Soc Food Nutr* 20(4) : 401-407, 1991
- 5) Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka Y. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes*(Berk) sing. *Cancer Research* 30 : 2276-2781, 1970
- 6) Hong MH. Statistical studies on the formularies of oriental medicine(I). Prescription frequency and their origin distribution of herb drugs(in Korean). *Kor J Pharmacogn* 3 : 57-64, 1972
- 7) Cha SM. Potential anticancer medicinal plants. A statistical evaluation of their frequencies of appearance in oriental medicine formularies(in Korean). *Kor J Pharmacogn* 8 : 1-15, 1977
- 8) Hwang WI, Lee SD, Oh SK. A study on the pharmacological activities of Korean medicinal herbs. Mainly on the antitumor activities(in Korean). *Korean Biochem J* 15(3) : 205-219, 1982
- 9) Son HS, Hwang WI. A study on the cytotoxic activity of Galic(*Allium sativum*) extract against cancer cells(in Korean). *Korean J Nutrition* 23(2) : 135-147, 1990
- 10) Hwang WI, Oh SK. Effects of petroleum ether extract of ginseng root on some enzyme activity in human colon cancer cells(in Korean). *Korean J Ginseng Sci* 8(2) : 153-166, 1984
- 11) Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines(in Korean). *Korean J Food Sci Technol* 30(1) : 13-21, 1998
- 12) Hyun JW, Lim KH, Shin JE, Sung MS, Won YJ, Kim YS, Kang SS, Chang IM, Woo WS, Paik WH. Antineoplastic effect of extracts from traditional medical plants and various plants(in Korean). *Kor J Pharmacogn* 25(2) : 171-177, 1994
- 13) Haw IW, Lee SD, Hwang WI. A study on the nutritional effects in rats by feeding basal diet supplemented with mugwort powder(in Korean). *J Korean Soc Food Nutr* 14 (2) : 123-130, 1985
- 14) Lim KH. A Medical Phytology(the details), pp.287, Dong Dyoung Sa, Seoul, 1971
- 15) Kim YS, Lee JH, Kim MN, Lee WG, Kim JO. Volatile flavor compounds from raw mugwort leaves and parched mugwort tea(in Korean). *J Korean Soc Food Nutr* 23(2) : 261-267, 1994
- 16) Kim JO, Kim YS, Lee JH, Kim MN, Rhee SH, Moon SH, Park KY. Antimutagenic effect of the major volatile compounds identified from mugwort(*Artemisia asiatica nakaii*) leaves. *J Korean Soc Food Nutr* 21(3) : 308-313, 1992
- 17) Lee GD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in wormwood (*Artemisia montana* Pampan.)(in Korean). *J Korean Soc Food Nutr* 21(1) : 17-22, 1992
- 18) Yashphe J, Segal R, Bréuer A, Erdreich-Nartali G. Antivascular activity of *Artemisia herba-alba*. *J Pharmaceu Sci* 68(7) : 924-925, 1979
- 19) Cho HW, Ryo KS. Pharmacognostical investigation on the oriental medicine(II). Botanical origin of usual vegetable drugs(in Korean). *Kor J Pharmacogn* 7(1) : 73-84, 1976
- 20) Lee H, Lin JY. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat Res* 204(2) : 229-234, 1988
- 21) Xu Q, Mori H, Sakamoto O, Uesugi Y, Koda A. Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of crude drugs on tumor necrosis factor production. *INT J Immunopharmacol* 11(6) : 607-614, 1989
- 22) Ryakhovskaya TV, Ushbaeva GG, Zhemaletdinov FG. The antitumor activity of phenol compounds from some *Artemisia* spp L. *Rastit Resur* 25(2) : 249-253, 1989
- 23) Hwang WI. A study on the growth inhibition of human colon cancer cells by eucommial leaf extract(in Korean). *Korean J Food & Nutrition* 5(1) : 13-21, 1992
- 24) Lee CS, Ju JS, Hwang WI. The inhibitory effect of water extracts of the trichosanthes semen and synapsis semen against some cancer cells growing(in Korean). *Korea University Medical Journal* 20(1) : 39-49, 1983
- 25) Lee TH, Paik JM, Hwang WI. Effect of *Prunus mume* extract on the growth rate of animal leukemic cells(L1210, P388) and human colon cancer cells(HRT-18, HCT-48, HT-29)(in Korean) *Korea University Medical Journal* 25(1) : 365-373, 1988

- 26) Sato A, Nakano Y, Taguchi T. Antitumor activity of crude drugs with human tissue culture screening. *Proc Symp Wakan-Yaku* 12 : 56, 1979
- 27) Fischer GA, Sartorelli AG. Development maintenance and assay of drug resistance. *Meth In Med Res* 10 : 247-254, 1964
- 28) Jakoby WB, Pastan IH(ed.). *Methods in Enzymology*, Vol. LVIII. Cell Culture, Academic Press, New York, 132-140, 1979
- 29) Freshney, *Culture of animal cells, A manual of basic technique*, 2<sup>nd</sup> edition, Alan R.Liss, Inc., pp.107-126, New York, 1988
- 30) Iove NN, Senn JS, III JE, McCulloch EA. Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture effect of conditional medium from human leukocytes. *Blood* 37 : 1, 1971
- 31) Hayflick L, Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585, 1961.
- 32) Hwang WI, Cha SM, Lee SY. Determination of antitumor effects of extracts from Korean medicinal plants on cancer cells(L5178Y)(in Korean). *Korean Biochem J* 13(1) : 25-39, 1980
- 33) Chee KM, Gong JX, Rees DMG, Meydani MM, Ausman L, Johnson J, Sinuel EN, Schaefer EJ. Fatty acid content of marine oil capsules. *Lipids* 25(9) : 523-528, 1990
- 34) Korean society of Medical biochemistry and molecular biology, *Experimental biochemistry*, pp.151, Seoul, 1993
- 35) Clerk G. *Staining Procedures*, 4<sup>th</sup> edition, Williams & Wilkins, pp.46, 1981
- 36) Kim KS, Paik JM, Hwang WI. Determination of antitumor effects of extracts from Korean medicinal plants on cancer cells(in Korean). *Korea University Medical Journal* 25 : 759-769, 1988
- 37) Chu MY, Fischer GA. The incorporation of <sup>3</sup>H-cytosine arabinoside and its effect on murine leukemic cells(L5178Y). *Biochem Pharmacol* 17 : 753, 1968
- 38) Morita A, Jsao D, Kim YS. Effect of sodium butyrate on alkaline phosphatase in HRT-18, a human rectal cancer cell line. *Cancer Res* 42 : 4540, 1982
- 39) Kim IH, Hwang WI. A Study on the Cytotoxic Activity of Polyacethylene of Ginseng against Hep G2(Hepatoma) and L929 Cells, in vitro(in Korean). *Korea University Medical Journal* 30 : 35-52, 1993
- 40) Hwang WI. A Study on the Antitumor Activity of Panax ginseng. *Korean J Ginseng Sci* 17(1) : 52-60, 1993