

황해속 물분획물의 L1210 세포에 대한 세포독성과 항산화효소 활성변화

정대영 · 박시원*

상명대학교 화학과 생화학실

(Received August 27, 2001; Revised December 18, 2001)

Cytotoxicity of Water Fraction of *Artemisia argyi* against L1210 Cells and Antioxidant Enzyme Activities

Dae Yung Jung and Sie Won Park*

Department of Chemistry, School of Natural Science, Sangmyung University,
7 Hongji-dong, Jongro-ku, Seoul 110-743

Abstract — The water fraction exhibiting anticancer activity was prepared from 70% methanol extract of *Artemisia argyi* by stepwise solvent partitioning. This water fraction (5 µg/ml concentration) showed a considerable cytotoxicity against leukemic L1210 cells with a maximal value of 92% for 3 days culture. Contrastingly to such substantial anticancer activities the identical fraction showed far low toxicity against normal lymphocytes than chloroform fraction of *Artemisia argyi*, mitomycin and 5-fluorouracil at every concentration ranging 0.01 µg/ml~10.00 µg/ml. The cytotoxicity displayed against L1210 cells by the water fraction of *Artemisia argyi* was found to be proportional to the decrease of viability of L1210 cells. On the other hand, O₂⁻ ion generation in L1210 cells appeared to be elevated in accordance to cytotoxicity by the water fraction with concurrent increases of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) which are responsible for the conversion of O₂⁻ ion and H₂O₂ respectively. These findings taken together indicate that the death of L1210 cells by the water fraction of *Artemisia argyi* may be induced at least in part by the detrimental action of reactive oxygen species (ROS) including O₂⁻ in spite of substantial efforts of SOD and GPx to overcome the attack of ROS.

Keywords □ water fraction of *Artemisia argyi*, L1210 cells, cytotoxicity, O₂⁻ ion, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx)

대표적 난치성 질환인 암(cancer)은 날이 갈수록 악화되는 환경요인과 생활의 부조화로 인하여 이환율은 계속 증가하는데 반하여 치료율은 여전히 저조하여 사망률은 50%에 이르고 있다. 이와같이 암치료가 어려운 것은 그동안 여러 가지 우수한 항암제가 개발되어 왔지만 아직도 이들 항암제가 나타내는 심한 부작용인 독성 때문으로 간주되고 있다.^{1,2)} 이에 수많은 연구자들이 무독성 내지는 저독성 항암제를 개발하고자 수많은 노력을 경주하고 있으나 아직 이상적인 항암제는 개발되지 않았다.

본 연구실에서는 지난 수년간 항균,³⁾ 항위궤양,⁴⁾ 항치석,⁵⁾ 항종양^{6,7)} 효과를 나타내는 황해속(*Artemisia argyi*) 으로부터 무독성이거나 매우 저독성인 항암제를 개발하고자 용매의 극성에 따

라 여러 분획물을 제조하여 그 항암효과를 검색하는 반면 그 작용기작을 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 대사와 연계하여 연구하여 왔다.^{8,9)} 이들 결과에 따르면 항암효과는 황해속의 거의 모든 용매 분획에서 확인되었고, 매우 저독성이면서도 높은 항암효과를 지닌 항암성분을 황해속의 chloroform 분획으로부터 분리하여 linalool인 것을 밝힌바 있다. (unpublished data)

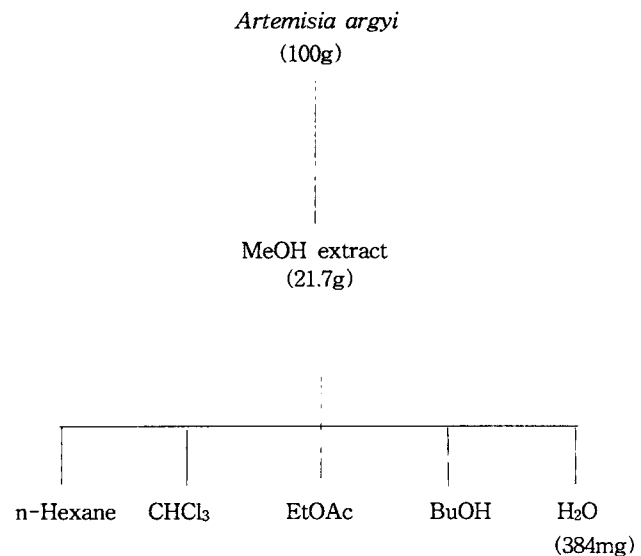
한편 황해속의 수용성 분획에 대한 예비실험에서도 상당한 항암효과를 관찰하였을 뿐 아니라 정상 lymphocytes에 대한 독성이 linalool이 포함된 chloroform 분획의 것보다 훨씬 더 적었음을 발견하여 이 황해속의 물분획물로부터 더 무독성인 항암제의 개발 가능성을 시사받아 본 실험을 수행하게 되었다. 우선 황해속으로부터 수용성 분획을 차례로 수거하고 최종적으로 물분획을 조제한 다음 이 물분획의 L1210 백혈병계 암세포주를 비롯한 수종의 암세포주에 대한 항암효과를 관찰하고 나아가 이 항암효과의 기작을 일부를 규명하고자 활성산소 및 항산화효소의 활성과의 관계를 실험하여 그 상관 관계를 연구하였다.

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5147 (팩스) 02-396-8758
(E-mail) kwon@cnu.ac.kr

실험방법

재료 및 시약 - 본 실험에서 사용한 황해쑥(*Artemisia argyi*)은 강화도에서 채취한 후 3년 이상 건조시킨 제품이었다. 연구대상인 암세포는 백혈구계 L1210세포로서 서울대학교 암연구소의 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다. 시약은 RPMI 160, fetal bovine serum(FBS), culture flask, pipettes, membrane filter는 Grand Island Biologica Co.(Gottinggen, Germany)의 제품, trypan blue, xanthine, xanthine oxidase, cytochrome c, glutathione, glutathione reductase 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

쑥의 물분획의 조제 - 황해 쑥으로부터 일차 70% 메탄올 추출액을 조제한 다음 이로부터 용매의 극성에 따라 분획화를 시행하고 최종적으로 증류수로 추출하여 물분획을 조제하였다. 이 분리과정은 Scheme 1에 제시되어 있는데 우선 쑥을 잘게 세절하여 줄기부위를 제외한 다음 100 g을 취하여 여기에 1 l의 70% 메탄올을 가하여 24시간 실온에서 방치하였다. 방치후 8겹의 gauze를 통하여 여과한 다음 그 잔사에 다시 1 l의 70% 메탄올을 가하여 24시간 방치후 동일한 방법으로 용출 하였다. 약 2 l의 여액을 합하여 원심 분리후 상등액을 진공 증발 시킨 다음 잔류물을 냉동건조시켜 21.7 g의 70% 메탄올 추출물을 얻었다. 이 70% 메탄올 추출물에 대해 200 ml의 증류수를 가하여 현탁액을 만든 다음 극성 순위에 따라 n-hexane, chloroform, ethylacetate, buthanol의 순으로 1 l 씩 유기용매를 가하여 세게 30분간 진탕한 다음 각각 12시간 방치하여 분리 수거한 다음 최후로 남은 잔류물에 1 l의 증류수를 가하여 마찬가지로 방치후 용출액을 얻어 진공증발 및 냉동건조하여 384 mg의 물분획물을



Scheme 1 - The preparation of the water fraction of *Artemisia argyi* by systematic solvent partitioning.

얻어 본연구의 시료로 사용하였다.

정상임파구에 대한 세포독성 - 이상에서 얻어진 황해쑥 물분획물의 독성 검색을 하기 위하여 mouse의 정상임파구를 분리하여 이에 대한 세포독성을 다른 분획물과 비교하였다. 정상임파구의 분리는 Boyum¹⁰의 방법을 적용하였다. 간단히 요약하면 ICR mouse를 ether로 마취시킨 후 경정맥을 절개하여 0.15M Na-citrate가 처리된 15 ml의 시험관에 혈액을 1 ml 취하였다. 여기에 Histopaque 1-1077 3 ml를 조심스럽게 가한다음 400×g에서 정확히 30분 동안 실온에서 원심 분리하였다. 원심분리후 Pasteur pipette로 상등액을 제거하고 임파구가 포함된 불투명한 중간층을 취하여 phosphate buffered saline(PBS) 10 ml와 혼합하여 조심스럽게 세척하였다. 이 용액은 25×g에서 10분동안 실온에서 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물에 대해 이 세척과정을 3차례 반복한 다음 PBS에 현탁하여 세포수를 계산한 다음 정상세포에 대한 세포독성실험에 사용하였다. 이 정상 임파구에 대하여 물 분획물을 위시하여 비교군으로 이미 항암효과 입증된 chloroform 분획물 및 기존 항암제인 5-FU와 mitomycin을 비교물질로 적용하였다. 이들 항암제 및 후보물질들은 DMSO에 용해시켜 첨가하되 DMSO의 양은 1%이하로 조절하였다.

L1210세포에 대한 물분획 물의 세포독성 - L1210 암세포는 부유형태의 세포로서 배양은 5% CO₂, 37°C의 humidified condition에서 이루어졌다. 배지로는 10%의 FBS를 포함한 RPMI 1610 배지에 L1210세포의 seed cell 농도를 5×10⁵ cells/ml로 가한 다음 실험 조건에 따라 conical tube 또는 50 ml culture flask에서 배양하였다. 계대 배양은 주 2회 시행하였으며 황해쑥 물분획물을 첨가한 후 세포독성과 그에 비례하는 활성산소 관계물질의 변화를 검색하였다. 배양이 끝난후 NCI protocol¹¹에 따라서 trypan blue exclusion 방법으로 전체 암세포수, 착색 및 비착색세포수를 hemocytometer로 세어 세포독성과 생존율을 계산하였다. 즉 착색 및 착색되지 않은 전체 세포수를 합산하여 control값의 전체 세포수와 비교한 백분율(%)을 세포독성 (cytotoxicity) 그리고 전체 세포수에 대한 비착색 세포수의 백분율을 생존율(viability)로 각각 계산하였다.

황해쑥 물분획물 첨가에 의한 L1210세포에서의 O₂⁻이온의 생성 - L1210 암세포의 배양액에 황해쑥 물분획물을 첨가하여 야기된 세포독성이 활성산소와 관계되는 지 검색하고자, 황해쑥 물 추출액을 가하여 생성된 O₂⁻를 Markesbery¹²의 방법으로 정량하였다. 황해쑥 물분획물을 L1210세포에 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml의 농도로 첨가하여 1일, 3일, 5일 동안 배양한 후 250×g에서 원심분리하여 상등액은 버리고 수집된 암세포를 10⁶ cells/ml의 농도로 24 well plate에 1 ml를 첨가하고 700 µl의 PBS 용액, 50 µg의 cytochrome c, 5 µg/ml의 phorbol myristate acetate (PMA) 50 µl를 첨가하여 60분간 37°C에서 부치한 다음 원심 분리하였다. 상등액 200 µl를 PBS로 1 ml가 되도록 희석

하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. O_2^- 이온 생성량에 비례하여 일어나는 ferricytochrome c의 환원반응은 $21.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 흡광계수를 적용하여 계산하였으며 O_2^- 이온의 생성량은 $O_2^- \text{ nmoles}/10^8 \text{ cells}/60 \text{ min}$ 으로 표시하였다.

항산화효소 용액의 조제 - 50 ml의 culture flask에 $10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ 의 농도로 L1210 암세포를 접종하고 황해속 물분획물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가한 배양액 10 ml를 일정기간 배양한 원심분리(10 min, 1000 g) 하여 상등액은 버리고 침전된 세포는 PBS로 세척한 다음 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.4) 1.5 ml에 현탁시켜 얼음상에서 5초씩 균질화하였다. 이 균질액을 원심분리(4000×g) 하여 상등액은 세포질분획으로 회수하고 미토콘드리아가 포함된 침전물에는 다시 1.5 ml의 Na-phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 초음파파쇄기를 사용하여 ice bath상에서 5초씩 3회 초음파처리를 하여 미토콘드리아의 matrix에 존재한다고 알려진 Mn-SOD가 용액중으로 노출되도록 하여 mitochondria 분획의 항산화효소 용액으로 사용하였다.

Superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase 활성측정 - SOD활성 측정은 McCord & Fridovich¹³⁾의 방법에 따라 50 mM potassium phosphate buffer, $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ cytochrome c, 0.05M xanthine, 0.1 mM EDTA, 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 15분간 부치하여 예열한 다음 xanthine oxidase를 가하여 반응을 개시하였다. Xanthine oxidase 양은 효소액을 포함하지 않은 용액의 흡광도 증가가 분당 0.025가 되도록 조정하였다. 550 nm에서 흡광도를 10초 단위로 5분간 측정하여 직선관계가 이루어진 부분을 취하여 cytochrome c 환원속도를 50%억제하는 SOD의 양을 1 unit로 결정하였다. 효소활성값은 $\text{units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 로 나타내었다.

Catalase 활성의 측정은 250 nm, 25°C에서 흡광도 감소를 근거로 하는 Maral¹⁴⁾의 방법에 의하여 이루어졌다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 12.5 mM H_2O_2 , 효소액을 가하여 전체 반응액이 1 ml가 되도록 혼합한 후 250 nm에서 10초 단위로 5분동안 흡광도 변화를 검색하여 계산하였다. 효소의 활성값은 $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ nmoles degraded}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 로 나타내었다.

GPx의 활성 측정은 Maral¹⁴⁾의 방법에 의하여 이루어졌다. 5 mM EDTA, 0.134 mM NADPH, 2 mM reduced glutathione, 1 unit/ml glutathione reductase, 효소액을 가하여 전체 반응액이 1 ml가 되도록 한 다음 37°C에서 5분동안 부치한 후 0.16 mM t-butylhydroperoxide를 가하여 340 nm에서 3분동안 NADPH의 산화에 의하여 감소되는 흡광도의 변화를 측정하여 $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ nmoles degraded}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 로 GPx의 활성을 나타내었다.

Data 분석 - 실험은 4회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 $\text{means} \pm \text{SD}$ 로 표시하였으며 Student t-test를 시행하여 $p < 0.05$ 인 경우를 유의성이 있는 것으로 판단하여 *를 첨가하였다.

실험 결과 및 고찰

황해속 물분획물의 정상임파구에 대한 독성실험 - 황해속 물분획물이 이미 저독성 항암효과가 발견된 황해속의 chloroform 분획 및 현행 항암제와 비교하여 정상 임파구에 대해 나타내는 독성 정도를 검색하기 위하여 본실험을 수행하였다. 기존의 항암제로는 5-fluorouracil(5-FU)과 mitomycin을 사용하였으며 매우 저농도에서부터 고농도에 이르기까지 다양한 농도에 따라 세포독성을 측정하였다. Table I에 제시된 결과에 따르면 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 항암제와 황해속 분획물들을 첨가했을 때 현행 항암제인 mitomycin과 5-FU의 정상임파구에 대한 독성이 매우 저농도인 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 나타나기 시작하였으며 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 21.4%~25.6%에 해당하는 상당히 높은 정상세포 독성을 그리고 약 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도의 농도에서 두가지 항암제 모두 ED_{50} 값이 나타나는 것을 알 수 있었다.

반면에 황해속의 chloroform 분획물과 물분획물의 경우를 보면 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 정상 임파구에 대한 독성이 거의 나타나지 않았을 뿐 아니라 그 이상의 농도에서도 항암제의 독성보다 대체적으로 1/10~1/20으로 매우 저독성인 것을 알 수 있었다. 아울러 황해속의 물분획물의 독성이 chloroform 분획물의 독성보다 더욱 낮은 것으로 보아 물분획물로부터의 무독성 항암제의 개발 가능성을 크게 시사되었다. 따라서 정상세포에 대한 독성이 매우 낮은 황해속 물분획물의 항암제로서의 효과를 검색하고자 다음단계로 L1210세포에 대한 세포독성의 정도를 측정하였다.

황해속 물분획물의 L1210세포에 대한 세포독성 및 생존율 - 이 결과는 Table II와 Table III에 제시되어 있는데 황해속 물분획

Table I - Cytotoxicity of the water and chloroform fractions of *Artemisia argyi*, mitomycin and 5-FU against normal lymphocytes

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cytotoxicity (%)			
	Water fraction	CHCl_3 fraction	Mitomycin	5-FU
0.01	-	-	5.4 ± 2.6	7.5 ± 3.2
0.02	-	-	6.3 ± 3.1	5.3 ± 1.8
0.03	-	-	$12.9 \pm 1.3^*$	$9.6 \pm 1.2^*$
0.05	-	2.6 ± 2.3	18.8 ± 7.3	17.4 ± 4.1
0.10	1.3 ± 1.5	3.9 ± 1.7	$21.4 \pm 2.6^*$	25.6 ± 6.2
0.20	1.0 ± 1.5	2.8 ± 2.1	29.7 ± 6.2	$31.5 \pm 2.8^*$
0.50	$3.3 \pm 0.3^*$	5.2 ± 3.3	$41.5 \pm 3.3^*$	$56.8 \pm 3.3^*$
1.00	3.1 ± 3.1	4.6 ± 2.5	$78.1 \pm 5.9^*$	$63.5 \pm 3.9^*$
2.00	2.8 ± 1.9	$9.1 \pm 1.2^*$	$77.3 \pm 8.5^*$	63.7 ± 8.4
5.00	$4.3 \pm 0.8^*$	8.3 ± 4.1	81.6 ± 11.4	$91.3 \pm 4.7^*$
10.0	5.6 ± 4.2	$14.5 \pm 2.8^*$	$88.7 \pm 6.5^*$	$89.6 \pm 5.2^*$

The culture was performed for 3 days in the presented concentration of anticancer agents including the water fraction of *Artemisia argyi*. (n=4)

Table II – Cytotoxicity of the water and chloroform fractions of *Artemisia argyi*, 5-fluorouracil and mitomycin against L1210 cells

Concentration (µg/ml)	Cytotoxicity (%)			
	Water fraction	CHCl ₃ fraction	Mitomycine	5-FU
0.01	-	-	7.9 ± 2.1	6.3 ± 4.7
0.02	-2.5 ± 3.2	1.9 ± 2.1	8.5 ± 4.2	11.5 ± 3.8
0.05	-3.8 ± 2.7	1.8 ± 1.4	22.7 ± 2.3*	18.9 ± 4.7
0.10	5.1 ± 1.6	4.1 ± 1.3	29.1 ± 7.4	23.5 ± 9.6
0.20	23.1 ± 7.5	8.5 ± 4.6	45.8 ± 4.9	56.5 ± 7.4
0.50	42.2 ± 4.3*	39.0 ± 5.2	88.6 ± 7.5*	92.1 ± 8.5*
1.00	41.4 ± 8.3	48.3 ± 4.7*	86.1 ± 11.3	99.2 ± 13.6
2.00	58.5 ± 5.9*	50.6 ± 8.3	99.4 ± 1.6*	95.4 ± 6.1*
5.00	85.6 ± 9.5	89.5 ± 2.7*	99.5 ± 0.8*	97.8 ± 5.2*
10.0	86.4 ± 11.3	92.5 ± 7.6*	98.5 ± 1.1*	99.3 ± 3.2*

The culture was performed for 3 days with the anticancer agents including the water fraction of *Artemisia argyi* in the presented concentration. (n=4)

Table III – The cytotoxicity and viability of L1210 cells treated with the water fraction of *Artemisia argyi*

Concentration (µg/ml)	Cytotoxicity (%), Viability		
	Culture period (days)		
	1 day	3 days	5 days
0.1	-4.7 ± 1.8	7.5 ± 3.2	5.9 ± 1.5
	(95.3 ± 4.8)	(91.5 ± 6.4)	(94.6 ± 8.3)
0.5	-3.9 ± 2.5	11.8 ± 4.05	21.3 ± 7.2
	(93.5 ± 7.8)	(89.7 ± 4.8)	(88.4 ± 6.5)
1.0	-8.6 ± 2.6	27.3 ± 5.0	67.3 ± 5.8*
	(92.7 ± 9.3)	(84.9 ± 7.2)	(86.2 ± 7.8)
3.0	-5.8 ± 5.6	57.2 ± 7.9	79.3 ± 8.4
	(86.1 ± 8.9)	(43.0 ± 8.3)	(29.0 ± 7.9)
5.0	7.4 ± 8.3	71.4 ± 8.9	92.4 ± 7.8*
	(81.2 ± 9.4)	(25.9 ± 9.3)	(10.2 ± 9.5)
10.0	18.2 ± 6.3	83.4 ± 6.9*	91.1 ± 9.4*
	(76.9 ± 3.5)	(22.5 ± 8.4)	(7.9 ± 7.2)

물, chloroform 분획물 그리고 mitomycin과 5-FU를 각각 비교하여 L1210세포에 대한 세포독성과 그에 따라 변하는 생존율을 실험하였다. Mitomycin과 5-FU는 저농도인 0.01 µg/ml에서 부터 세포독성을 보이기 시작하여 농도에 따라 크게 증가하였다. 두가지 항암제 모두 ED₅₀ 값이 모두 0.2 µg/ml 정도로서 암세포에 대한 항암효과가 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. 반면 황해쑥의 물분획물과 chloroform 분획물에 대한 세포독성 효과는 단일 물질인 mitomycin이나 5-FU보다 물론 적지만 농도에 따라 상당한 세포독성을 나타내어 ED₅₀은 2 µg/ml 정도로 나타났다. 이 값은 혼합물인 분획물로서는 상당한 암세포 세포독성을 나타내는 농도로 보이며 이 농도에서 정상임파구에 대해 나타내는 독성은 Table I에서 보듯이 2.8%와 9.1%보다 약간 상회하는 값에 불과하여 매우 미미하다는 것을 알 수 있었다. 특히 물분획물의 독성은 chloroform 분획물의 것보다 훨씬 낮아 단일

물질이 아닌 혼합물의 형태로 투여할 경우 물분획물의 안전성이 더 높을 가능성이 있으리라고 판단되었다. 이와 반면에 mitomycin이나 5-FU의 경우어는 ED₅₀의 농도인 0.2 µg/ml에서 정상임파구에 대한 독성 역시 황해쑥의 분획물보다 훨씬 높아서 각각 29.7%와 31.5%를 나타내었다. 결국 L1210 암세포를 50% 사멸하는 농도를 기준으로 네가지 항암물질의 효과를 비교한다면 황해쑥의 물분획물이 정상세포에 대한 독성이 가장 적다고 판단되므로 추후 개발의 대상으로 가능성이 있다고 간주되었다.

이울러 항암효과에 따른 생존율을 살펴보면 Table III에 제시되었듯이 전체적으로 세포독성과 생존율은 서로 반비례함을 알 수 있었다. 황해쑥의 물분획물을 L1210 세포에 첨가했을 때 나타나는 세포독성의 증가에 반비례하여 생존율은 조금씩 감소하여 세포독성이 매우 높은 고농도인 5 µg/ml과 10 µg/ml에서 3일 동안 배양했을 때의 생존율은 거의 10~30%에 불과하였고, 5일 정도 배양을 하게되었을 경우에는 생존하는 암세포가 한 개도 관찰되지 않은 경우도 가끔 있었다. 따라서 본 결과로부터 황해쑥 물분획물에 의해 암세포의 숫자가 감소할 때 세포분열을 억제되어 나타난 결과일 수도 있겠지만 암세포숫자의 감소와 더불어 생존율 역시 감소한다고 하는 것은 항암 시료에 의해 암세포가 사멸된 결과일 수도 있다고 사료되었다. 다시 말해 많은 경우의 항암제의 작용기작이 암세포의 apoptosis의 유도에 의한 것이 밝혀진 것처럼 이들 황해쑥의 물분획물에 의한 항암 작용 역시 apoptosis나 또는 necrosis가 촉발된 결과일 가능성을 의미한다고 볼 수 있었다.

황해쑥 물분획물의 항암효과와 활성산소(O₂⁻) 생성 -- 이상의 결과에 의해 황해쑥 물분획물이 L1210 세포에 대해 나타내는 세포독성 현상이 최근에 세포의 apoptosis유발 인자^{14,15}로서 확인되고 있는 활성산소와 관계가 있는 지 나아가 이러한 경우 활성산소 소거제인 항산화효소와 관계되는 지를 파악하고자 황해쑥 물분획물을 첨가하여 암세포가 사멸하도록 실험조건을 조성한 다음 이 암세포의 사멸에 따른 활성산소의 발생 특히 산소(dioxygen, O₂)로부터 생성되는 활성산소 계열의 첫 번째 활성산소인 O₂⁻를 정량함으로써 황해쑥 물분획물에 의한 암세포사멸 작용에 활성산소의 발생이 수반되는지 확인하고자 하였다. 우선 세포독성이 거의 일어나지 않는 배양 1일째의 경우와 세포독성이 많이 일어나는 배양 3, 5일째의 조건에 맞추어 L1210 세포에 황해쑥 물분획물을 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml의 농도로 첨가하여 배양한 다음 생성된 O₂⁻이온의 양을 정량한 결과가 Table IV에 제시되어 있다. 우선 세포독성이 거의 나타나지 않는 경우로 황해쑥 물분획물을 세가지 농도로 가하여 1일간 배양했을 때에 생성된 O₂⁻이온의 양은 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml 농도의 경우 모두 2.05, 2.27 그리고 3.64 nmoles/10⁸ cells로서 control 값인 1.77 nmoles/10⁸ cells과 거의 같았다. 반면에 세포독성이 뚜렷한 경우인 물분획물을 5 µg/ml과 10 µg/ml의 농도로 첨가하

Table IV – The generation of O₂⁻ ion in L1210 cells by addition of the water fraction of *Artemisia argyi*

Concentration (µg/ml)	O ₂ ⁻ generated (nmoles/10 ⁸ cells)		
	Culture period (days)		
	1 day	3 days	5 days
Control	1.77 ± 0.25	2.32 ± 0.49	2.57 ± 0.73
1	2.05 ± 0.31	4.39 ± 0.73	7.32 ± 1.41
5	2.27 ± 1.54	9.55 ± 0.84*	18.27 ± 2.13*
10	3.64 ± 1.27	8.06 ± 1.82	17.39 ± 1.44*

여 3일간 배양시켰을 때에는 control 값인 2.32 nmoles/10⁸ cells 보다 3배 이상 많은 9.55 nmoles/10⁸ cells와 8.06 nmole/10⁸ cells로서 큰 O₂⁻이온의 생성증가를 보였다. 나아가 L1210 세포에 대한 세포독성이 매우 높았던 경우인 배양 5일째에는 1 µg/ml, 5 µg/ml과 10 µg/ml의 경우 7.32, 18.27, 17.39 nmoles/10⁶ cells로서 control값인 2.57 nmples/10⁸ cells보다 각각 3~7배의 O₂⁻이온의 증가량을 보였다. 이러한 결과는 황해쑥 물분획물이 L1210 암세포를 사멸시킬 때 활성산소인 O₂⁻이온의 생성을 수반한다는 것으로 볼 수 있으며 현재 사용되고 있는 항암제의 작용기작이 주로 활성산소의 발생을 수반한 apoptosis 라는 사실들과도 상통하는 것으로 볼 수 있었다.

이와같이 황해쑥 물분획물의 첨가에 의해 O₂⁻이온의 생성이 증가하면 L1210 암세포가 자신에게도 유독한 이 O₂⁻이온의 공격을 피하기 위해 이 O₂⁻이온을 무독한 물질로 전환할 가능성이 있다. O₂⁻이온의 전환 과정은 활성산소의 일반적인 대사과정^{16,17)}에서 잘 알려져 있다시피 있듯이 우선 첫 번째 H₂O₂로 전환되며, 이 H₂O₂ 역시 독성이 있으므로 다음 단계인 무독성인 H₂O로의 전환반응이 연이어 전개될 것이다. 이와같은 O₂⁻ → H₂O₂ → H₂O 반응이 일어나기 위해서는 첫번째 과정을 촉매하는 효소인 superoxide dismutase(SOD) 그리고 두 번째 반응의 촉매인 catalase나 glutathione peroxidase(GPx) 효소 활성이 증가될 것이므로 이들 항산화효소들의 활성변화를 측정하여 황해쑥 물분획물의 L1210세포에 대한 세포독성과 활성산소 대사와의 관계를 추정해보기로 하였다.

그런데 이들 항산화효소는 세포내 소체는 세포질이나 미토콘드리아등으로 각각 국재화 되어있으므로 본 실험에서도 이들의 활성을 세포질과 미토콘드리아 분획으로 분리하여 측정하여 보았다. 실험조건으로는 L1210세포에 대한 세포독성이 거의 없는 경우와 세포독성이 뚜렷한 조건을 만들기 위해 앞에서와 마찬가지로 L1210세포 배양시 황해쑥 물분획물을 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml의 농도로 가하여 세포독성이 거의 나타나지 않는 1일간의 배양과 세포독성이 뚜렷한 3일간의 배양을 시행하였다.

배양 후 L1210 세포를 수거하여 실험 방법란에서 서술한 방법으로 세포질분획과 미토콘드리아분획을 조제하여 그들의 SOD, GPx 그리고 catalase 활성을 측정하였다. Table V에 우선 황해

Table V – The superoxide dismutase (SOD) activity changes in L1210 cells with addition of water fraction of *Artemisia argyi*

Concentration (µg/ml)	SOD Activity (units/min/10 ⁸ cells)			
	Cytoplasm		Mitochondria	
	Culture period (days)			
	1 day	3days	1 day	3 days
Control	3.13 ± 0.35	4.05 ± 1.02	2.79 ± 0.55	2.85 ± 0.56
1	3.87 ± 1.12	15.83 ± 0.82*	2.64 ± 0.34	3.57 ± 1.28
5	4.03 ± 2.81	38.67 ± 2.63*	5.89 ± 1.03	17.83 ± 1.55*
10	5.17 ± 1.57	57.24 ± 3.74*	7.56 ± 2.01	28.44 ± 2.51*

Table VI – Glutathione peroxidase (GPx) activity changes in L1210 cells with addition of water fraction from *Artemisia argyi*

Concentration (µg/ml)	GPx activity (units/min/10 ⁸ cells)			
	Cytoplasm		Mitochondria	
	Culture Period			
	1 day	3 days	1 day	3 days
Control	2.78 ± 0.55	3.01 ± 0.84	1.85 ± 0.37	1.86 ± 0.65
1	3.12 ± 0.44	2.78 ± 0.64	2.13 ± 0.55	1.97 ± 0.83
5	11.75 ± 0.73*	58.44 ± 1.35*	3.91 ± 1.04	9.58 ± 1.32
10	18.22 ± 1.04*	42.92 ± 2.16*	5.09 ± 1.82	8.92 ± 2.18

Table VII – Catalase activity changes in L1210 cells with addition of water fraction from *Artemisia argyi*

Concentration (µg/ml)	Catalase activity (units/min/10 ⁸ cells)			
	Cytoplasm		Mitochondria	
	Culture period (days)			
	1 day	3 days	1 day	3 days
Control	ND	ND	ND	ND
1	ND	0.02 ± 0.02	ND	0.08 ± 0.05
5	ND	ND	ND	ND
10	ND	0.03 ± 0.01	ND	0.03 ± 0.04

ND designates not detected.

쑥 물 추출물을 첨가하였을 때 세포질과 미토콘드리아 분획에서의 SOD효소활성의 변화에 관한 결과가 제시되어 있으며 연이어 Table VI에 GPx 효소활성의 변화 그리고 Table VII에 catalase 효소활성의 변화가 제시되어 있다.

Table V의 결과에 따르면 세포독성이 거의 나타나지 않는 조건으로 황해쑥 물분획물을 세가지 농도로 첨가하여 1일간 배양했을 때의 SOD활성은 우선 1 µg/ml 농도에서는 세포질과 미토콘드리아 분획이 각각 3.87 units/min/10⁸ cells과 2.64 units/min/10⁸ cells로서 상응하는 control 값과 거의 비슷하였으며 5 µg/ml의 경우에도 4.03 unis/min/10⁸ cells와 5.89 units/min/10⁸ cells로서 control 값과 크게 차이가 나지 않았다. 고농도인 10 µg/ml의 경우 역시 세포질과 미토콘드리아 분획 각각 5.17 unis/min/10⁸ cells 7.56 units/min/10⁸ cells로서 control의 값과 큰

차이가 나지 않았다. 이 결과로부터 황해썩 물분획물을 가하였지만 세포독성이 일어나지 않는 경우에는 O_2^- 이온의 생성도 거의 없었고 O_2^- 이온 제거효소인 SOD 효소 활성도 유도되지 않는 것으로 판단되었다.

반면에 고농도로 황해썩 물분획물을 첨가하여 3일간 배양시켜 세포독성이 현저하게 일어나게 된 경우에는 세포질질과 미토콘드리아 분획에서 모두 매우 높은 SOD 활성 증가를 보였는데 $5 \mu\text{g}/\text{m}$ 의 경우에는 $38.67 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 와 $17.83 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 로서 control값의 9.5배와 6.3배에 달하는 높은 값이었고 $10 \mu\text{g}/\text{m}$ 의 경우에도 $57.24 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 와 $28.44 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 의 활성 값을 나타낸 것으로 보아 control값의 약 14배와 10배의 증가값을 나타내었다.

이와같은 결과는 황해썩 물분획물이 나타내는 L1210세포 사멸효과는 O_2^- 이온의 생성과 비례하며 이때 O_2^- 제거효소인 SOD 효소의 활성증가도 수반되어 일어나고 있음을 알 수 있었다. 진핵세포에서 활성산소는 주로 미토콘드리아의 산화적 인산화반응에서 생성되어 누출되는 것으로 알려져 있다. 이처럼 활성산소는 미토콘드리아를 중심으로 생성되는 이외에도 세포질에서의 전자의 이동이 수반되는 여러가지 반응등으로 생성되어 세포 안팎에 존재하므로 이들을 소거하기 위해 미토콘드리아에는 MnSOD, 세포질에는 CuZnSOD 그리고 세포외부에 존재하는 SOD¹⁸⁾가 있는 것으로 알려져 있다. 본 결과에 의해서 세포질과 미토콘드리아분획의 SOD활성이 모두 크게 증가한 것으로 보아 세포사멸시에 미토콘드리아와 세포질 양쪽 모두 O_2^- 이온이 생성되거나 또는 미토콘드리아에서 생성된 O_2^- 이온이 세포질 밖으로 누출되어 나간 결과 세포질과 미토콘드리아의 SOD활성이 모두 증가한 것이 아닌가 사료되었다.

이와같이 SOD활성이 증가하면 그 결과 생성된 H_2O_2 는 그 역시 해로운 활성산소의 한가지이므로 이 H_2O_2 에 대해서는 L1210 암세포가 어떻게 대처하는 지 파악하고자 H_2O_2 분해효소인 catalase와 GPx 효소활성을 동일 반응계에서 검색하였다. 알려져 있다시피 H_2O_2 가 분해되는 데는 두가지 경로가 존재하는데 한가지는 catalase¹⁹⁾에 의해 무독한 H_2O 와 O_2 로 또 한가지는 GPx²⁰⁾에 의해 H_2O 와 GSSG로 각각 분해되며 이 두가지 경로는 세포내의 국제적 특성과 종에 따라 매우 다양하게 선택되는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 본 실험에서는 GPx와 catalase의 활성을 각각 동일한 조건에서 시행하여 비교 실험하였다. 배양조건은 황해썩 물분획물에 의한 세포독성의 유무를 유도하기 위하여 SOD의 경우와 마찬가지로 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ 그리고 배양기간 역시 1일과 3일로 설정한 다음 그에 상응하여 변화하는 GPx활성과 catalase활성의 변화를 측정하여 각각 Table VI과 Table VII에 제시하였다. Table VI의 결과로부터 세포독성 유무에 따른 GPx 활성의 변화를 비교하여 보면 황해썩 물분획물을 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 농도로 가하여 1일간 배양하여 세포독성이 발현되지 않는 조

건에서 세포질의 경우는 $3.12 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 이었고 미토콘드리아에서는 $2.13 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 로서 각각의 control값과 거의 비슷하였다. 반면에 세포독성 현상이 뚜렷한 고농도의 황해썩 분획물 즉 5 $\mu\text{g}/\text{m}$ 과 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 농도로 3일간 배양을 시행하였을 경우의 GPx활성은 세포질에서는 각각 $58.44 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 과 $42.92 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 로서 control값의 약 19배와 14배에 달하는 높은 값을 보였다. 같은 조건에서의 미토콘드리아 분획의 GPx활성은 $9.58 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 와 $8.92 \text{ units}/\text{min}/10^8 \text{ cells}$ 로서 각각 5배정도의 활성증가를 나타내었다.

이와같이 황해썩 물분획물의 첨가에 의해 L1210세포가 사멸되며 이때 SOD효소활성과 GPx효소활성이 세포독성과 비례하여 증가한다는 것을 알 수 있었는데 GPx효소와 다른 경로인 catalase에 의해 일어나는 H_2O_2 의 분해과정도 측정하여 보았다. 이 실험결과는 Table V에 제시하였는데 세포독성의 발현 유무와 관계 없이 모든 배양 조건에서 catalase 효소 활성은 거의 나타나지 않았다. 다시 말해 황해썩 물분획물의 농도나 배양기간에 관계없이 catalase 효소활성은 어느 경우에도 뚜렷하게 나타나지 않은 것으로 보아 peroxisome에 존재한다고 알려진 catalase는 H_2O_2 의 분해에는 별 관여를 하지 않고 오히려 세포질의 GPx효소에 의해 H_2O_2 의 분해가 이루어지는 것으로 판단할 수 있었다.

이상의 모든 결과를 종합하여 보았을 때 황해썩 물분획물을 L1210암세포에 가했을 때 암세포는 최대 92%까지 사멸할 수 있으며 이때 O_2^- 이온의 생성, O_2^- 이온의 분해, O_2^- 이온의 분해물인 H_2O_2 의 분해 등으로 이어지는 일련의 반응이 수반되는 것을 알 수 있었고 유해한 이들 활성산소를 소거하는 항산화효소활성의 큰 증가에도 불구하고 L1210 세포가 사멸되는 것은 활성산소인 O_2^- 이온이나 H_2O_2 의 분해 시키기에는 효소활성이 역부족이기 때문인 것으로 볼 수 있을 것 같다.

활성산소의 유해성은 거의 모든 난치질환의 직접 간접 원인이 된다는 사실로부터도 강조되고 있는데 분자상의 산소(dioxygen, O_2)가 미토콘드리아의 oxidative phosphorylation반응에 의해서 H_2O 로 환원되어가는 중간과정에서 생성되거나 세포내에 자유롭게 존재하는 전자(e^-)와 산소가 쉽게 결합하여 생성되는 활성산소류는 건강인의 호흡 산소량의 5% 정도로 추산되고 있는데 인체에 해로운 상태에서는 거의 예외없이 활성산소가 증폭²¹⁾된다는 사실이 밝혀져 왔다. 이와같은 유해 활성산소에 대하여 모든 생명체에는 분자적 항산화장치가 SOD나 GPx, catalase와 같은 효소계²²⁾를 중심으로 장착이 되어 있어서 인체의 항산화성이 유지되고 있으나 인체가 허약해지거나 과도한 활성산소 발생시에는 미처 항산화작용이 충분히 작동하지 못하여 세포는 결국 지질의 과산화,²³⁾ 단백질의 변성,²⁴⁾ DNA의 돌연변이²⁵⁾등으로 이어지는 분자적 이상상태를 초래함으로써 결국 비정상 병리상태로 진행하여 암, 치매, 당뇨병, 뇌졸중, 백내장등으로 이어지는 중증 난치질환^{26,27)}으로 발전하게 되는 것으로 알려지고 있다.

따라서 최근에 들어 암의 발생원인이 여러 가지 이지만 그 직접적인 원인중의 한가지는 이러한 활성산소에 의해 cell differentiation 등을 주관하는 유전자등에 돌연변이가 일어나 결국은 cell division이 제어받지 못하여 일어나는 것으로 판단되고 있다. 한편 이와같이 발암의 원인이 되기도 하는 활성산소는 다양한 항암제의 작용기작²⁸⁻³¹⁾에 관여하는데 암세포의 죽음은 necrosis보다는 오히려 apoptosis에 의해서 사멸되며 이와같은 apoptosis가 일어날 때 대부분 활성산소가 signal로 작용하여 apoptosis에 직접적으로 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 다시 말해 활성산소는 암의 원인이 되기도 하고 항암제에 의한 암세포 사멸 무기가 되기도 하므로 암생물학에 있어서 활성산소는 중요한 역할을 하는 양날의 무기가 되는 셈이다. 본 실험에서도 황해썩의 물분획물에 의한 L1210세포의 항암 작용에도 활성산소인 O₂⁻이온이 급증하고 아울러 이 O₂⁻이온을 분해하려는 SOD와 GPx효소활성 역시 급증하였다고 하는 것은 황해썩 물분획물이 활성산소를 유발시켜 L1210 세포를 사멸하고자 하는데 이때 L1210세포는 이 유해한 활성산소로부터 벗어나고자 활성산소 scavenger인 항산화효소를 촉발하지만 급증하는 활성산소를 제거하기에는 충분치 못하여 결국은 활성산소의 독작용에 의해 암세포는 사멸할 가능성이 시사되는 것으로서 다시 한번 활성산소 및 관계효소가 암 사멸기작에 중요하다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 상명대학교 자연과학연구소의 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Astrow, A. B. : Rethinking cancer. *Lancet* **343**, 494 (1994).
- 2) Bailer, J. C. and Gornick, H. L. : Cancer undefeated. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1569 (1997).
- 3) Yasphe, J., Segal, R., Breurm A. and Werdreich Naftali, G. : Anti-bacterial activity of Artemisia herba alba. *J. Pharmaceutical Sci.* **68**, 924 (1979).
- 4) Oh, T. Y., Ahn, B., Y., Ko., J. I., Ryu, B. K., Son, M. W., Kim, S. H., Kim, W. B. and Lee, E. B. : Studies on protective effect of DA-9601, an *Artemisia extract*, against ethanol induced gastric mucosal damage and its mechanism. *J. Appl. Pharmacol.* **5**, 202 (1997).
- 5) Namba, T., Tsunozuka, M., Takehana, Y., Nunome, S., Takeda, K., Shu, Y. Z., Kakiuchi, N., Takgi, S. and Hattori, M. : Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines (Part IV) Screening of crude drugs for anti-plaque action and effects of *Artemisia capillaries* spikes on adherence of Streptococcus mutant to smooth surfaces and synthesis of glucan by glycosyltransferase. *Shoyakugaku Zasshi* **38**, 253 (1984).
- 6) Xu., Q., Mori, H., Sakamoto, O., Uesugi, Y. and Koda, A. : Immunological mechanism of antitumor activity of some kind of crude drugs on tumor necrosis factor production. *Int. J. immunopharam.* **11**, 607 (1989).
- 7) Mori, H., Xu, Q., Sakamoto, O., Uesugi, Y., Koda, A. and Nishioka, I. : Mechanisms of antitumor activity of aqueous extract from chinese herbs and their immunopharmacological properties. *Jap. J. Pharmacol.* **49**, 423 (1989).
- 8) Kim, K. H., Jung, D. Y., Min, T. J. and Park, S. W. : Cytotoxicity of *Artemisia argyi* extract against H9 cell and antioxidant enzymes. *Yakhak Hoeji* **43**, 598 (1999).
- 9) Lee, T. E., Park, S. W. and Min, T. J. : Antiproliferative effect of *Artemisia argyi* against J774A. 1 cells and subcellular superoxide dimutase (SOD) activity changes. *J. Biochem. Molecular. Biol.* **32**, 585 (1999).
- 10) Boyum, A. : Isolation of leukocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Invest.* **21**, 9 (1968).
- 11) National Cancer Institute USA : Cell culture screen KB. Protocol 1600. *Cancer Chemother. Rep.* (part 3) **3**, 17 (1972).
- 12) Markesbery, W. R. : Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine.* **23**, 134 (1994).
- 13) McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hetercuprein) *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
- 14) Maral, J., Puget, K., and Michelson, A. M. : Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 1525 (1977).
- 15) Thompson, C. B. : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456 (1995).
- 16) Bursch, W., Oberhammer, F. and Schulte-Helmann, R. : Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Tips* **13**, 245 (1997).
- 17) Roberbroid, M. and Caldereon, P. B. : Definitions, properties and reactions of radicals. *Free radical and oxidation phenomenon in biological systems*. Marcel and Dekkor Inc. New York p.11 (1995).
- 18) Reitter, R. J. : Oxidative processes and antioxidative defence mechanisms in the aging brain. *The FASEB J.* **9**, 526 (1995).
- 19) Ono, M. : Induction of Mn-SOD by tumor necrosis factor II-1 and interleukin-6 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **182**, 1100 (1992).
- 20) Sen, C. K. and Packer, L. : Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB J.* **10**, 709 (1996).
- 21) Jacobson, M. D. : Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83 (1996).
- 22) Evans. M. D., Griffiths, H. R. and Lunec, J. : Reactive oxygen

- species and their cytotoxic mechanisms. *Advances in Molecular and cell Biology* **20**, 25 (1997).
- 23) Matsuo, M. : Age related alterations in antioxidative defence. In *Free Radicals in aging* (Yu, B. P. ed) p. 143, CRC Press, Boca Raton, Florida (1997).
- 24) Rice, E. C. and Burdon, R. : Free radical lipid interactions and their pathological consequence. *Prog. Lipid. Res.* **32**, 71 (1993).
- 25) Cerutti, P. A. : Oxidative stress and cancer. *Lancet* **344**, 862 (1994).
- 26) Chessmann, K. H. : Tissue injury by free radicals. *Toxicol. Indust. Health* **9**, 39 (1993).
- 27) Wang, W. W., McDonald, S., Langler, R. and Penn, L. Z. : Novel synthetic organosulfur compounds induce apoptosis of human leukemic cells. *Anticancer research* **24**, 1367 (2000).
- 28) Lee, N. K., Kim, H. J., Yang, S. J., Kim, Y. S., Choi, H. L., Shim, M. J., Awh, O. D. and Kim, T. U. : The anticancer mechanism of taxol-diethylenetriamine pentaacetate conjugate in HT29 human colorectal cancer cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 237 (2001).
- 29) Burger, A., Jenkins, T., Double, J. and Bibby, M. : Cellular uptake, cytotoxicity and DNA binding studies of the novel imidazolacridine antineoplastic agent C1311. *Ex. J. Cancer* **81**, 367 (1999).
- 30) Villunger, A., Egle, A., Kos, M., Hartman, B., Geley, S., Kofler, R. and Greil, R. : Drug-induced apoptosis with enhanced fas (Apo-vCD95) ligand expression but occurs independently of fas signaling in human acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res.* **57**, 3333 (1997).