약학회지 제 47 권 제 1 호 37~45 (2003)
Yakhak Hoeji Vol. 47, No. 1

Monoterpenes의 항암작용과 활성산소 전환 효소의 활성 변화

조용선 · 김수진 · 박시원#
상명대학교 화학과

(Received September 18, 2002; Revised December 18, 2002)

Anticancer Activity of Monoterpenes and the Changes of Enzymes Activities Responsible for the Conversion of Reactive Oxygen Species

Yongsun Cho, Soojin Kim and Siewon Park#
Departmet of Chemistry, College of Natural Science, Sangmyung University, Seoul 110-743

Abstract — The present study was undertaken to investigate the anticancer activity of monoterepenes in the animal and the cancer cell line tests. Both of the noncyclic and cyclic monoterpenes showed significant life prolonging effects on ICR mouse with abdominal cancer induced by Sarcoma 180 cells up to 67.4% and 63.5% in case of linalool and geraniol, respectively. Linalool and geraniol also exhibited very excellent cytotoxicity against L1210 leukemic cells with IC_{50} value of 0.32 μg/ml in 5 days culture condition. In the presence of linalool and geraniol, the generation of O_2^- ion were found to be increased proportionally to the cytotoxicity arisen from these monoterpenes. Furthermore, the antioxidant enzymes activities such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) responsible for the conversion of O_2^- ion to H_2O_2 and then to H_2O augmented remarkably by linalool and geraniol. All data put together it can be postulated that monoterpenes may kill abdominal cancer cells of ICR mouse probably by activating anticancer system of the body, whereas the death of L1210 cells may be due to the detrimental attacks of reactive oxygen species (ROS) including O_2^- in spite of antioxidant enzymes activities to overcome the ROS attacks.

Keywords □ Monoterpenes, anticancer activity, L1210 cells, reactive oxygen species, antioxidant enzymes

Monoterpenes는 자연계의 식물과 동물의 second metabilites로 함유되어 있으며 주로 향기가 좋은 꽃이나 잎의 휘발성 정유(essential oil) 성분으로 오랫동안 인류의 생활에 밀접하게 사용되어 왔다.[1,2] 이들은 탄소수 5개의 탄화수소 중합체인 terpenoids 계열 화합물중 탄소수 10개 (C10)의 탄화수소로서 alcohol, ketone, carboxylic acid 유도체를 통 털어 일컬으며 공기중의 nonmethane 탄화수소의 원료로서 대기중의 다양한 반응[3]에도 참여하고, ozone 발생에도 기여하며 숲의 토양의 질소 (N)와 탄소 (C)의 순환에도 중요한 역할을 하는 등 지구 환경에 매우 긴요한 화학적 변화를 담당하고 있는 화합물로서 최근에는 chlorofluorocarbon이나 halogenated solvents의 대용으로까지 용처가 확대되고 있다.[4] 산업적으로도 monoterpenes은 그 향기와 항균성으로 인해 향수, 화장품, 의약품 등으로 널리 사용되어 왔는데[3] 이들이 식물과 인간을 포함한 동물체내에서 산소독성이나 지질과 산화반응의 억제 등 개체방어에도 필수적으로 작용하고 있음이 밝혀지고 있는 것으로 보아, 생명체내에서 긴요한 생리화학에 관여하고 있음이 시사되고 있다.[6-9]

이와 같이 monoterepenes계 화합물은 지구상의 생태계와 생명체에서 중요한 역할을 하며 특히 의학적인 유용성은 대단히 중요한 데 오랫동안 여드름, 두통, 우울증, 비염, 감기, 알러지, cholesterol 감소효과, 고지혈증[10-15] 등의 비교적 가벼운 질환의 치료를 위해 사용되었고 무독성 마취제[16]로서의 가능성도 시사되었으며 최근에는 암[17,18]과 같은 난치병의 치료효과 역시 보고되고 있다. 이와 같은 monoterpenes계 화합물은 limonene, linalool, menthol, carvon, perillyl alcohol 등으로서 이미 limonene이나 perillyl akcohol 과 같은 cyclic monoterpene[19,20]의 항암효과는 확정적인 것으로 보고되고 있으므로 앞으로 noncyclic monoterepenes의 항암작용에 대한 연구가 심도있게 이루어져야 할 것으로 사료된다.

현재까지 암의 치료는 1 cm 정도의 조기발견인 경우에는 전이가 일어나지 않은 상태이므로 수술로 병소만 깨끗이 제거하여 완치가 용이하나 그 이후에는 수술요법과 방사선요법 그리고 전신

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5147 (팩스) 02-396-8758
(E-mail) parksw@smu.ac.kr

화학요법인 항암제 투여가 병행된다. 일반적으로 항암제는 정상 세포에 대한 부작용 때문에 환자의 고통으로 인하여 삶의 질이 떨어지고 말기암환자의 경우는 아직도 완치율이 5% 이내에 불과하다.[21,22] 따라서 각국은 가능하면 무독성이거나 독성이 매우 약하면서도 항암작용이 우수한 항암제 개발에 심혈을 기울이고 있으나 아직까지도 완전히 이상적인 항암제개발은 이루어지지 않고 있다. 한편 항암제의 작용기작에 관해서는 최근들어 cisplatin, doxorubicin, vincristine, cytosine arabinoside, me- thotrex, bleomycin[23-25] 등과 같은 항암제는 활성산소를 직접 간접으로 이용한 apoptosis 활성 복구에 의해 암세포를 사멸시키는 것으로 시사되고 있다. 본 연구는 식용으로도 사용되는 허브(herb)의 주성분이며, 대체의학인 향기요법(aromatherapy)의 주성분인 monoterpenes의 항암효과를 noncyclic monoterpenes을 중심으로 동물실험 및 백혈병계 암세포주인 L1210 세포에 대해 실험하고 나아가 그 작용기작을 활성산소대사와 연관시켜 수행하였다.

실험방법

시약 및 기기

RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), streptomycin mixture는 GIBCO BRL(Grand Island, New York USA)에서 구입하였으며, ferricytochrome *c*, xanthine, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione, glutahione reductase, phorbol 12-myistate 13-acetate, t-butyl hydroperoxide, nicotinamide adenine dimucleotide reduced, trypan blue, mitomycin, citronellol, linalool, geraniol, carvon, limonen, farnesol 등은 Sigma 사(St Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였으며 hydrogen peroxide ethylenetetraacetate, dimethylsulfoxide, ethanol 등 무기염류와 유기용매는 extra pure 수준의 제품을 사용하였다. Culture flask와 24 well plate는 Falcon Co., 현미경은 CETI, 초음파파쇄기는 Sonics & Material Inc., UV/Visible spectrophotometer는 Varian Carry 3의 제품을 사용하였다.

실험동물과 암세포주

ICR mouse는 원진산업 (서울)으로부터 4~5주령의 암수를 구입하여 20±2°C, 55±5% 습도, 12 hrs/dark cycle의 환경에서 1주~2주 적응시킨 다음 사용하였으며 실험이 끝날 때까지 사료와 물을 충분히 제공하였다. 본 연구에서 사용한 L1210 cell line (mouse lymphocytic leukemia; ATCC CCL 219) 세포는 한국세포주은행(서울대 암연구센터)에서 분양 받았다.

L1210 세포 배양

서울대 소속 암연구소로부터 분양 받아온 L1210 암세포는 37°C, 5% CO_2, humidified condition에서 배양하였다. 배양액의 구성은 RPMI 1640에 10% FBS을 첨가하고 100 units/ml의 penicillin과 100 units/ml의 streptomycin을 혼합액을 사용하였으며 계대배양은 3~4일마다 시행하였다.

Sarcoma 180에 의한 복수암 유발

10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양된 Sarcoma 180 세포를 5×10^6 cells/ml 농도로 조절하여 ICR mouse 복강에 매일 한차례씩 100 μl를 접종하였다. 약 10일 후 복수암이 유발된 mouse를 경추 탈골시키고 복부를 절개 후 복강내의 Sarcoma 180 세포를 포집하여 0.83 M ammonium chloride 5 ml과 혼합하고 250 × g에서 5분간 원심분리 하였다. 포집된 세포에 배지를 가하여 세척하고 5×10^6 cells/ml 농도가 되도록 조절하여 ICR mouse 복강에 100 μl씩 주입하였다. 이러한 방법으로 새로운 ICR mouse에 복수암을 유발하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

Monoterpenes의 항암작용 검색을 위한 동물실험

Monoterpenes의 간접적인 항암작용을 검색하기 위하여 장기간인 4주간에 걸쳐 monoterpene을 경구투여한 다음 비로서 복수암을 유발하여 생명연장 효과를 관찰하였다. ICR mouse에 DMSO의 농도가 1%를 넘지 않는 범위로 용해한 monoterpenes을 5 μg/20 g body weight의 농도로 4주간 매일 한차례씩 경구투여를 시행하였다. 24시간 후 Sarcoma 180 cell을 접종하여 복수암을 유발한 다음 다음 사망기간을 관찰하여 생명연장 효과를 계산하였다. Control그룹의 경우에도 경구투여 주사기에 의한 스트레스를 동일하게 부과하기 위해 식수를 동일한 방법으로 경구투여 하였다. 이상의 실험과 달리 monoterpenes의 직접적인 암세포 사멸작용에 의한 생명연장 효과를 검색하고자 ICR mouse의 복강에 Sarcoma 180 cell을 접종하여 24시간 경과 후부터 monoterpenes를 매일 한차례씩 일정시각에 경구 투여하면서 생존기간을 관찰하였다. Monoterpenes은 DMSO의 농도가 1%를 넘지 않는 범위로 용해한 다음 5 μg/20 g body weight의 농도로 매일 경구 투여하였으며 control그룹 역시 식수를 경구투여용 주사기로 투여하였다.

Normal lymphocytes 분리

Monoterpenes의 정상세포에 대한 무독성의 정도를 측정하고자 L1210 세포가 유래된 ICR mouse로부터 normal lymphocytes를 분리하여 이에 대해 L1210 세포과 동일한 방법으로 세포독성을 검색하였다. Normal lymphocytes의 분리방법은 Boyum의 방법[26]을 적용하였다. Mouse를 ether로 마취시킨 후 하대정맥을 절개하여 헤파린 처리가 된 주사기에 채혈한 뒤 여기에 HISTOPAQUE R-1077 3 ml을 조심스럽게 가한 다음 400 × g에서 30분간 실온에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액인 plasma층을 제거하고 lymphocyte가 포함된 불투명한 중간층을 취하여 phosphated buffered saline(PBS) 10 ml과 조심스

럽게 혼합한 다음 250 × g에서 10분간 원심분리하고 침전물에 대해 이 과정을 2회 반복 세척하여 얻어진 lymphocytes를 얻었다.

L1210 세포에 대한 세포독성(cytotoxicity) 및 생존율(viability) 측정

L1210 세포에 monoterpenes을 첨가하여 세포독성을 검색하거나 생존율을 측정하기 위해서는 다음과 같은 방법을 적용하였다. 24 well plate에 1×10^6 cells/ml의 농도로 L1210 암세포를 첨가하고 monoterpenes을 가한 후에 1~3일 동안 배양 후 세포수를 NCI의 방법[27]으로 trypan blue exclusion 법에 의해 hemocytometer를 사용하여서 전체세포수를 모두 세어 control 그룹의 전체 세포수와 비교하여 백분율(%)로 세포독성을 계산하였다. 생존율 계산은 전체 세포수에 대한 비착색 세포의 수를 백분율(%)로 나타내었다.

L1210 세포에서의 O_2^- 이온 정량

L1210 세포 배양액에 monoterpenes을 첨가하여 일정기간 배양 후 생성된 O_2^- 이온의 정량은 Markesbery[28]의 방법에 의하여 이루어졌다. 본 실험에서는 1일~3일간 배양하여 250 × g에서 원심분리 후 24 well plate에 1×10^8 cells/well, 700 μl PBS, 50 μl cytochrome c, 5 μg/ml의 phorphol myristate acetate(PMA) 50 μl를 첨가하여 60분간 배양 후에 원심분리 하였다. 상등액 200 μl에 PBS를 가하여 1 ml가 되도록 희석하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferricytochrome c의 환원반응은 21.1/mM/cm의 몰흡광계수를 적용하였으며 O_2^- 생성량은 nmoles/60 min/10^8 cells로 나타내었다.

활성산화효소액 조제

L1210 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 1 ml를 접종한 배양액 10 ml와 monoterpenes를 50 ml culture flask에 가하여 일정기간 배양한 후 1,000 × g에서 원심분리 하여 침전한 L1210 세포를 생리식염수로 2회 세척하였다. 포집된 세포를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 1.5 ml에 현탁하여 Elvejehn homogenizer를 이용하여 얼음 상에서 5초씩 5회 균질화 하였다. 이 균질액을 4,600 × g에서 10분간 원심분리 하여 상등액은 cytoplasm분획으로 회수하고 mitochondria가 포함된 것으로 간주되는 침전물에는 다시 동일 buffer를 1.5 ml 가하여 얼음 상에서 30초간 3회 초음파 처리 후 4,600 × g에서 원심분리 하여 그 mitochondria matrix에 존재하는 것으로 알려진 MnSOD 효소가 용출된 상등액을 mitocondria 분획으로 분리하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD활성의 측정은 기본적으로 McCord and Fridovich[29]의 방법에 의해 이루어졌다. 반응액 3 ml에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 100 mM cytochrome c, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA(pH 7.8), 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 15분간 예치한 다음 xanthine oxidase(XOD)를 첨가하여 반응을 개시하였으며 반응은 550 nm에서 10초 단위로 5분간 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하였다. SOD 활성은 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 책정하여 units/min/10^8 cells로 나타내었다.

Glutathione Peroxidase(Gpx) 활성 측정

GPx의 활성은 Maral *et al.*의 방법[30]에 의하여 측정하였다. 전체 반응액 2 ml에 50 mM potassium phophate buffer(5 mM EDTA, pH 7.0), 8.4 mM NADPH, 1unit glutathione reductase (GSSGR), 150 mM의 glutathion(GSH), 효소액을 첨가하여 37°C에서 5분간 방치시킨 후 0.16 mM t-butyl hydroperoxide를 가하여 340 nm에서 10초 단위로 3분 동안 NADPH의 산화에 의해 감소되는 흡광도의 변화를 측정하며 GPx의 활성도는 1분 동안 NADPH 1 μM이 산화되는 양을 1 unit로 정의하였다.

Catalase 활성 측정

Catalase 활성의 측정은 250 nm, 25°C에서 흡광도 감소를 근거로 하는 Maral *et al.*[31]의 방법을 적용하였다. 50 mM Potassium phosphate buffer(pH 7.4), 12.5 mM H_2O_2 및 효소액을 가하여 전체 반응액이 2 ml가 되도록 한 후 250 nm에서 10초 단위로 5분간 흡광도 변화를 측정하였다. Control은 기질인 H_2O_2 대신에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)만을 가하여 측정하였다. Catalase의 활성도는 1분 동안 1 μM의 H_2O_2를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

결과 및 고찰

Monoterpenes에 의한 암유발 동물의 생명연장 효과

Noncyclic monoterpenes인 linalool, geraniol, citronellol, menthol, carvon과 cyclic monoterpene인 limonene 및 sesquiterpene인 farnesol을 비교물질로 선택하여 4주간 ICR mouse에 매일 한차례 씩 경구투여 한 후 투여를 중단하고 Sarcoma 180 세포로 복수암을 유발하여 생명연장 효과를 검색하였다. 이와 같은 장기간의 투여에 의해 혹시 monoterpenes이 생체 내에서 항암작용을 주관한다고 알려진 NK cell, cytotoxic T cell, macrophage 등으로 구성된 항암 면역계[32]를 활성화하여 이들이 암이 발병된 후에 이 암세포를 사멸할 가능성이 있다면 암유발 동물의 생명연장 현상이 일어날 수 도 있다고 사료되었던 것이다.

Table 1에 표시한 바와 같이 시료를 투여하지 않고 식수를 투여했던 control 그룹의 암 발병후 평균 생존 기간은 21.3±4.7

Table I – The life prolonging effect of monoterpenes administered prior to the injection of Sarcoma 180 cells on ICR mouse

Moneperpenes	Life span (days)	Life prolonging effect (%)
Control	21.3 ± 4.7	100.0
Carvon	28.5 ± 4.7	133.7
Citronellol	32.6 ± 4.2	152.4
Farnesol	36.1 ± 5.3	169.3
Geraniol	34.8 ± 3.9*	163.2
Limonen	29.6 ± 1.6*	138.8
Linalool	35.6 ± 4.3*	167.1

Monoterepenes were administered orally for 4 weeks and then Sarcoma 180 cells were injected peritoneally after interim pause of 24 hours. Life span was calculated by counting days of survival after injection of Sarcoma 180 cells. Values represent the mean ±SD of five individual measurements. Significantly different from the control *$p<0.05$ (Student t test)

Table II – The life prolonging effect of monoterpenes daily administered on ICR mice with abdominal cancer induced by Sar coma 180 cells

Moneperpenes	Life span (days)	Life prolonging effect(%)
Control	23.1 ± 2.8	100.0
Carvon	25.8 ± 6.4	111.6
Citronellol	31.4 ± 5.1	135.9
Farnesol	34.7 ± 4.3*	150.2
Geraniol	32.8 ± 3.5*	142.0
Limonen	29.3 ± 3.8	126.8
Linalool	35.9 ± 4.2*	155.4
Mitomycin	28.7 ± 3.6	124.2

Sarcoma 180 cells were injected peritoneally to ICR mouse to induce abdominal cancer and after 24 hours of interim pause monoterpenes were administered orally once a day till the day of death. Life span was calculated by counting the days of survival after injection of Sarcoma 180 cells. Values represent the mean ±SD of five individual measurements. Significantly different from the control. *$p<0.05$ (Student t test)

days 이었다. 이러한 control 그룹의 평균 생존기간에 비하여 monoterpenes를 투여한 그룹은 30~60%에 달하는 비교적 큰 생명연장 효과를 나타내었다. 그 중에서도 noncyclic monoterpene인 linalool과 geraniol은 모두 67.4%와 63.5%에 이르는 높은 수준의 생명연장 효과를 보였다. 반면 이미 항암식품으로 추천받고 있는 cyclic monoterpene인 limonen은 38.9% 정도의 효과를 나타낸 것으로 보아 단순히 정유의 성분으로 간주하던 noncyclic monoterpene의 항암 효과는 의외로 고무적인 것으로 볼 수 있었다. 이 Table 1의 결과로부터 monoterpenes은 발암된 동물의 생명을 뚜렷이 연장하였으며 linalool과 geraniol이 가장 그 효과가 높았고 sesquiterpene인 farnesol에 의해서도 비슷한 생명연장 효과가 나타난 것으로 보아 향기의 성분정도로 또는 가벼운 질환의 처치 재료로 비교적 가볍게 여겨졌던 noncyclic monoterpenes의 암과 같은 난치병의 치료제로서의 효능도 있을 것으로 사료되었다.

이상과 같이 monoterpene이 아마도 생체의 항암 system을 활성화하여 간접적으로 암세포를 사멸한 결과 생명연장을 나타낸 것을 알 수 있었는데 암세포 자신에 대해서는 직접적으로 어떻게 작용을 할지 검색해 보기로 하였다. 실험 및 방법에서 언급한 대로 ICR mouse에 복수암을 유발하기 위하여 Sarcoma 180 cell을 접종하여 이 암세포가 정착하도록 24시간이 지난 시각부터 매일 한차례씩 mooterpenes과 비교물질인 farnesol 그리고 지표물질로 mitomycine을 경구투여 하였다. Table 2의 결과에 의하면 식수만을 투여한 control 그룹의 생존일수는 23.1±2.8 day 이었으며 monoterpenes의 경우 약 20~70%의 생명연장 효과를 나타내었는데 가장 우수한 경우는 linalool과 geraniol 로서 각각 55.4%와 42.0%의 생명연장 효과를 나타내고 farnesol 역시 50.2%로 우수한 암세포사멸효과를 나타내었으며 mitomycine의 경우는 45.6%로 linalool이나 geraniol보다 약간 떨어지는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과는 그동안 저자들이 천연물인 황해쑥[33,34]에서 다각도로 연구하여 항암작용이 큰 물질이 linalool인 것을 밝힌 바 있어 monoterpene이 천연물의 성분으로 또는 개별 성분으로서도 각각 우수한 항암작용을 나타낸다는 사실을 확인 할 수 있었다.

Normal lymphocytes에 대한 독성 비교

이상의 Table 1과 Table 2의 결과를 종합하면 동물실험에서

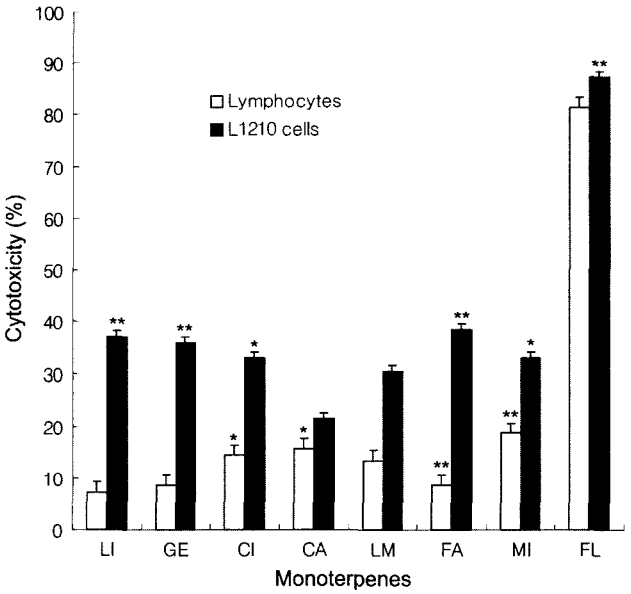

Fig. 1 – The cytotoxicities of monoterpenes (0.5 μg/ml) against normal lymphocytes and L1210 cells. Values represent the mean±SD of six individual measurements. (LI : Linalool, GE : Geraniol, CI: Citronrllol, CA : Carvon, LM : Limonen, FA : Farnesol, MI : Mitomycin, FL: 5-Fluorouracil) Significantly different from the control *$p<0.05$, **$p<0.01$ (Student t test)

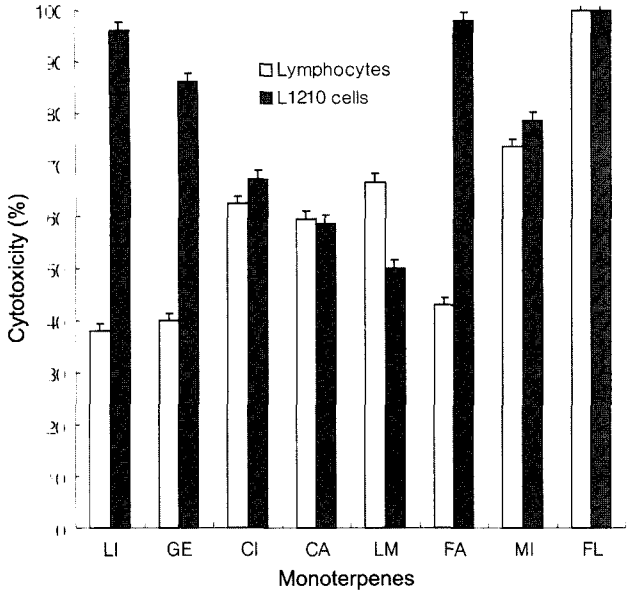

Fig. 2 – The cytotoxicities of monoterpenes (5.0 μg/ml) against normal lymphocytes and L1210 cells. Values represent the mean±SD of six individual measurements. All values were significantly different from the control **p<0.01 (Student *t* test) (LI : Linalool, GE : Geraniol, CI: Citronrllol, CA : Carvon, LM : Limonen, FA : Farnesol, MI : Mitomycin, FL: 5-Fluorouracil)

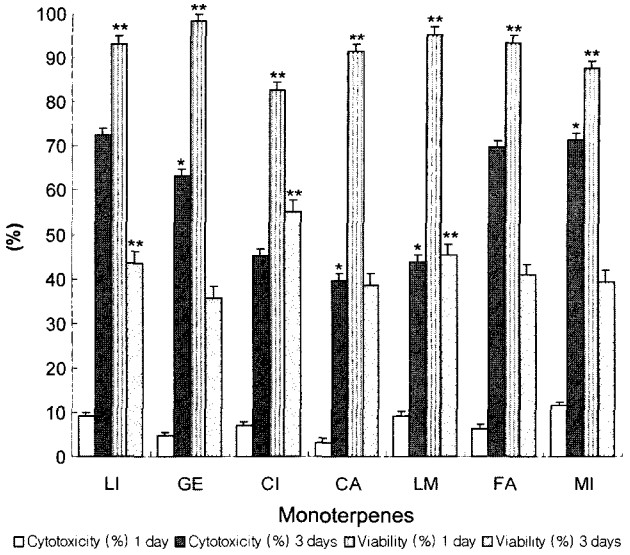

Fig. 3 – The effect of monoterpenes on the cytotoxicity and viability of L 1210 cells according to the culture period. Values represent Values represent the mean±SD of six individual measurements. Significantly different from the control. *p<0.05, **<0.01. (Student *t* test) (LI:linalool, GE:geraniol, CI:citronellol, CA:carvon, LM:limonene, FA:farnesol, MI: mitomycine)

monoterpenes은 뚜렷하게 항암작용을 나타낸 것을 알 수 있었으므로 다음으로 normal lymphocytes와 L1210 암세포에 대한 독성의 정도를 비교하기로 했다. Monoterpenes이 나타내는 세포사멸 정도와 기존의 항암제인 mitomycine과 5-fluorouracil(5-FU)를 비교물질로 선택하였는데 참고로 5-FU는 독성은 강하지만 암세포를 무차별 공격하여 신속하게 사멸시키므로 임상투여에 있어서 항암제 조합에 대부분 포함되며, mitomycine은 독성은 어느 정도 있지만 암세포사멸작용이 우수하므로 역시 대부분의 항암제 구성에 포함되는 약물이므로 비교 항암제로 선택하였다. Fig. 1과 Fig. 2의 결과에서 제시된 바와 같이 normal lymphpcytes에 대한 독성을 보면 비교적 저 농도인 0.5 μg/ml에서 monoterpenes은 약 7~9%의 세포독성을 나타낸 linalool과 geraniol을 위시하여 대부분 10% 내외의 세포독성을 나타낸 것에 비하여 mitomycine은 약 20% 그리고 5-FU는 80%가 넘는 세포독성을 보인 것으로 보아 현재 사용중인 항암제의 독성이 monoterpenes보다 더 높은 것을 알 수 있었다. 고농도인 5.0 μg/ml에서도 monoterpenes은 약 50% 내외, 그리고 mitomycine은 약 80%, 5-FU는 100%에 달하는 높은 세포독성을 나타낸 것으로 보아 고농도에서도 역시 monoterpenes은 항암제보다 독성이 약한 것으로 나타났다. 다음으로 암세포인 L1210 세포에 대해서는 저농도에서 20~40%를 나타내었으며 고농도에서는 linalool과 geraniol, farnesol이 mitomycine보다 높은 90%정도의 높은 세포독성을 나타내었으며 물론 5-FU에 의해서 암세포는 한 개도 남아 있지 않았다.

이 결과로부터 현행의 항암제가 normal lymphocytes에 대하여 나타내는 세포독성에 비하여 momoterpenes의 세포독성은 상당히 낮아서 0.5 μg/ml의 농도를 지표로 삼았을 때 약 1/3-1/10의 약한 독성을 나타내었으며 특히 linalool과 geraniol은 가장 저독성으로 상당히 안전하다고 판단되었고, L1210 암세포에 대한 암세포 사멸효과는 역시 linalool과 geraniol이 현재의 항암제인 mitomycine 못지 않게 우수한 것으로 보아 저독성 항암제로 개발하는 것은 충분히 타당성이 있는 것으로 판단되었다. 참고로 항암제로 추천 받고 있는 cyclic monoterpene인 limonen의 정상세포에 대한 독성도 linalool이나 geraniol보다 높은 반면 L1210 세포에 대한 세포 사멸효과는 더 낮았으며, 오히려 sesquiterpene인 farnesol은 linalool이나 geraniol 못지 않게 정상세포에 대한 저독성과 암세포에 대한 높은 세포독성으로 보아 추후 탄소수 15개인 sesquiterpene류의 항암작용에 관한 연구도 연속되어야 할 것으로 사료되었다.

Monoterpenes의 L1210 세포에 대한 세포독성을 배양기간에 따라 측정하고 이 세포독성을 생존율과 비교하여 표시한 결과는 Fig. 3에 제시되었는데 시료를 1 μg/ml 농도로 가한 후 배양 1일째에는 거의 모든 그룹에서 10% 미만에 불과하고 2일째 부터서는 약 30%까지의 세포독성효과가 나타나기 시작하였으며 배양 3일째에서는 거의 모든 그룹에서 60% 이상의 현저한 세포독성이 이중에서도 linalool, geraniol 그리고 farnesol이 가장 높은 세포독성을 나타냈고 mitomycine의 세포독성도 linalool이나

farnesol의 경우와 유사하였다. 한편 monoterpenes의 항암작용 기작을 구체적으로 규명해보고자 우선 세포독성과 함께 변화하는 암세포의 생존율을 검색하여 보았다. 세포독성 즉 세포수 감소는 결국 cell growth의 cycle arrest가 일어나 숫자가 증가하지 않은 경우와 일단 증식된 세포가 사멸된 후 해체되어 숫자가 감소한 두가지로 경우로 볼 수 있기 때문에 본 실험에서는 시료를 첨가하여 배양 후 남은 세포들의 생존유무를 검색하여 보았다. Fig. 3에서와 같이 monoterpenes의 농도와 배양기간이 증가함에 따라 세포독성도 증가하지만 살아남은 세포 즉 생존율 역시 비례적으로 격감하는 것을 알 수 있었다. 특히 고농도로 시료를 첨가하여 배양기간이 5일인 경우에는 세포독성이 모두 90% 이상에 달하였고 생존율은 1~2% 수준에 불과한 것으로 보아 monoterpenes에 의한 세포독성은 아마도 암세포를 직접적으로 사멸시킴으로 일어나는 숫자의 감소로 유추되었고 이와 같이 세포를 살해하는 요인이 무엇인지 추구하여야 할 필요가 있다고 사료되었다.

Monoterpenes 첨가에 의한 L1210 세포의 O_2^- 생성

Monoterpenes 화합물에 의한 L1210 세포의 사멸효과가 어떠한 기작에 의해 일어나는지 추구하고자 활성 산소 관계 실험을 시행하였다. 알려진 바에 의하면 항암제에 의해 암세포가 사멸하는 기작은 necrosis 보다는 apoptosis에 의한다는 것이 시사[23-25]되고 있으며 apoptosis 촉발 인자로는 활성산소[35,36]의 영향은 중요하므로 monoterpene에 의해 세포독성이 증가하는 조건을 설정한 다음 이에 따른 O_2^- 이온의 생성량의 변화를 측정하여 보았다. O_2^- 이온은 산소로부터 생성되어 파생되는 활성산소대사물의 첫출발물질이고 활성산소의 대표격이므로 그 의미가 크다고 할 수 있겠다. Monoterpens 중에서도 특히 linalool과 geraniol이 정상세포에 대한 독성도 가장 약한 반면 L1210 암세포에 대한 세포독성은 매우 높았으므로 이들을 대상으로 세포독성과 관계되어 나타난 O_2^- 생성량의 변화를 측정하여 그 결과를 Table 3에 제시하였다.

Table III – The effects of linalool and geraniol on the generation of O_2^- in L1210 cells according to the concentration and culture period

Concentration (μg/ml)	O_2^- (nM/60 min/10^8 cells)			
	Linalool		Geraniol	
	1 day	3 days	1 day	3 days
0.0	0.09 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.11 ± 0.05	0.27 ± 0.06
0.1	0.13 ± 0.08	0.18 ± 0.06	0.08 ± 0.07	0.30 ± 0.45
0.2	0.26 ± 0.04*	0.67 ± 0.05**	0.19 ± 0.11	0.54 ± 0.08
0.5	0.34 ± 0.07*	1.32 ± 0.13*	0.27 ± 0.05*	0.81 ± 0.13*
1.0	0.30 ± 0.06*	1.78 ± 0.06**	0.19 ± 0.07	2.03 ± 0.18**
5.0	0.45 ± 0.13	2.79 ± 0.17**	0.35 ± 0.13	2.44 ± 0.17**

Values represent the mean ±SD of five individual measurements. Significantly different from the control. *p<0.05,**p<0.01(Student *t* test)

결과에 따르면 겉보기에는 세포수가 별로 감소하지 않은 배양 1일째에 벌써 linalool과 geraniol을 첨가한 그룹의 O_2^- 생성이 control그룹에 비하여 점진적으로 증가하여 linalool의 경우는 1.8배, geraniol의 경우는 2.1배까지 증가하였고 세포독성이 50~80%이었던 배양 3일째에는 역시 크게 증가하여 1 μg/ml의 농도에서는 모두 약 10배 정도의 높은 증가를 보였다. 이러한 결과를 종합하면 암세포를 사멸하는 시료인 linalool과 geraniol이 암세포를 사멸하는 정도에 비례하여 암세포내에 O_2^- 이온의 생성증가가 병행되어 일어나며 이 사실은 암세포가 monoterpene에 의해 사멸되는 과정에 O_2^- 이온을 비롯한 활성산소가 관여할 수도 있다는 사실을 시사한다고 볼 수 있었다. 그런데 이 O_2^- 이온은 생명체에 유해한 물질이므로 암세포 내에서도 이 O_2^-에 대한 대응반응이 일어날 가능성이 있으며 일차적으로 O_2^-의 대사과정을 파악하는 것이 중요하므로 O_2^- 이온의 전환 반응을 맡고 있는 일련의 항산화효소 예를 들어 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase 활성의 변화를 monoterpene의 세포독성과 연계하여 측정하여 보았다.

Linalool과 geraniol 첨가에 의한 superoxide dismutase (SOD) 활성 변화

O_2^-은 SOD에 의해서 H_2O_2로 전환되고 이 H_2O_2는 catalase나 GPx에 의해서 무독한 H_2O로 전환되거나 또는 비효소적으로 맹독성인 OH로 전환되는 것으로 알려져 있는데 monoterpene을 가하여 야기되는 세포독성에 우선 SOD활성변화가 수반되는지 파악하기 위하여 L1210 세포에 linalool과 geraniol을 가하여 배양한 다음 mitochondria와 cytoplasm 분획에서의 SOD활성을 각각 측정 비교하였다. SOD 효소는 cytoplasm에는 CuZnSOD 그리고

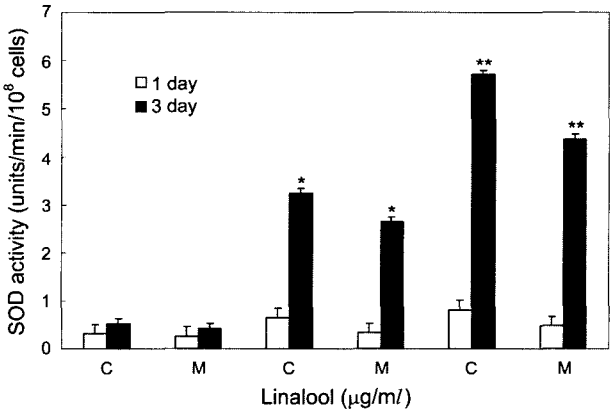

Fig. 4 – The effect of linalool on the SOD activity changes of cytoplasm and mitochondria fractions of L1210 cells. Values represent the mean±SD of five individual measurements. (C : cytoplasm, M : mitochondria) Significantly different from the control *p<0.05,*p<0.01 (Student *t* test)

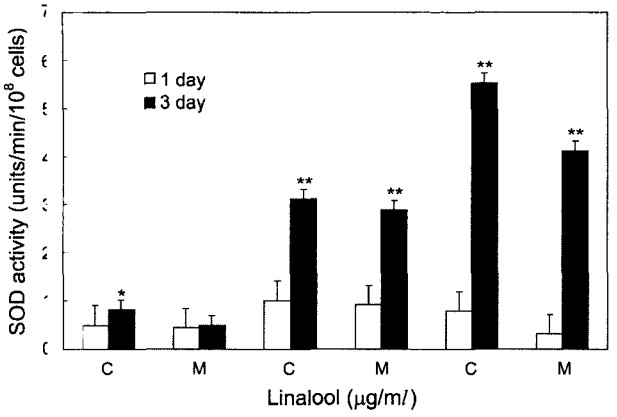

Fig. 5 – The effect of geraniol on the SOD activity changes of cytoplasm and mitochondria fractions of L1210 cells. Values represent the mean±SD of five individual measurements. Significantly different from the control. *p<0.05,*p<0.01 (C : cytoplasm, M : mitochondria)

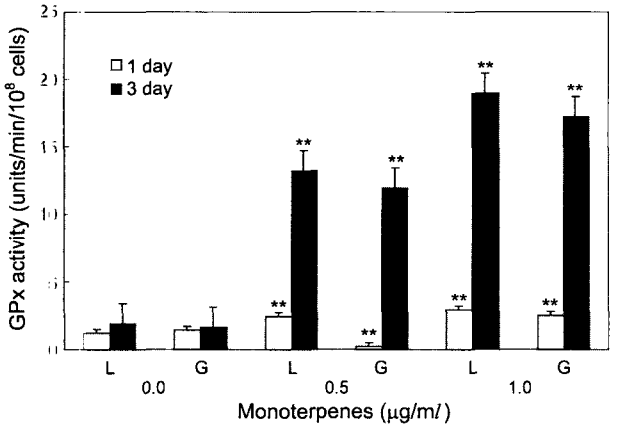

Fig. 6 – The effect of linalool & genaniol on the Glutathione peroxidase activity changes of L1210 cells. Values represent the mean±SD of five individual measurements. Significantly different from the control. *p<0.05, *p<0.01(Student *t* test) (L : linalool, G : genaniol)

mitochondria에는 MnSOD의 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으므로 두 분획으로 분리하여 시행하였다. Fig. 4에 제시된 결과를 보면 linalool이나 geraniol 모두 세포독성의 정도에 비례하여 cytoplasm과 mitochondria의 SOD 활성이 변화된 것을 알 수 있었다. 즉 세포독성이 거의 일어나지 않는 조건인 배양 1일째에 linalool을 가한 시료의 cytoplasm 분획의 SOD활성은 1.86 unit/10^8 cells이었고 mitochondria 분획의 것은 1.64 unit/10^8 cells로서 control 값인 1.47 units/10^8 cells에 비하여 별로 변화하지 않았다. 그러나 세포독성이 80% 정도로 높았던 배양 3일째에는 cytoplasm 분획의 SOD활성은 15.37 units/10^8 cells이었고, mitochondria 분획의 SOD활성은 8.32 units/10^8 cells로서 control의 값보다 8배 그리고 6배씩의 활성 증가를 각각 나타내었다. Farnesol을 가한 시료군의 SOD 활성 역시 세포독성이 거의 없는 배양 1일째에 cytoplasm 분획과 mitochondria 분획의 SOD활성은 1.04 units/10^8 cells과 0.8 unit/10^8 cells으로서 1.17 unit/10^8 cells과 1.2 units/10^8 cells인 control값과 거의 유사하였다. 반면 높은 세포독성이 나타난 배양 3일째에는 SOD활성 역시 현저하게 증가하였는데 cytoplasm분획의 SOD활성값은 8.42 units/10^8 cells 그리고 mitochondria분획의 경우는 5.13 units/10^8 cells 로서 각각 7배와 4배씩 증가한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 가장 세포독성을 강하게 나타낸 linalool과 geraniol 모두 4-10배에 가까운 매우 높은 SOD 활성의 증가를 수반 한 것으로 보아 이들에 의한 암세포 살해작용에는 활성산소인 O_2^- 이온은 물론 SOD의 반응물인 H_2O_2도 관여되리라고 유추할 수 있었다. 물론 O_2^- 이온 중 H_2O_2로 전환되지 않고 자발적으로 생성되는 $\cdot OH$[37,38]도 세포사멸 작용에 관여할 가능성이 있다고 보여진다.

Linalool과 geraniol 첨가에 의한 GPx (glutathion peroxidase)와 catalase 활성 변화–SOD에 의해 생성되는 H_2O_2는 GPx와 catalase에 의해 무독한 H_2O로 전환될 것이므로 다음 실험으로 linalool과 geraniol에 의한 L1210 세포의 사멸에 수반될 수도 있는 GPx와 catalase 활성을 측정하여 보았다. Fig. 5의 결과에 의하면 GPx 역시 SOD와 마찬가지로 세포독성에 비례하여 활성변화를 나타내는 것으로 알 수 있었다. 우선 세포독성이 나타나지 않는 배양 1일째에는 linalool과 geraniol을 첨가하였을 때 뚜렷한 GPx 활성의 변화가 없이 control의 값과 거의 동일하였으나 linanlool과 geraniol을 1 μg/ml의 농도로 3일간 배양하여 약 80% 이상의 세포독성이 야기된 조건에서의 GPx의 활성은 control값에 비하여 모두 10배 이상의 증가양상을 나타내었다. 즉 세포독성이 거의 없는 배양 1일, 세포독성이 40% 정도 나타나는 배양 2일, 세포독성이 80% 정도 나타나는 배양 3일째의 GPx의 값은 각각의 control값에 견주어 1.07배, 5.48배 그리고 12.4배로 현저하게 증가하였다. 이상의 활성산소에 관한 결과를 종합하면 L1210 세포에 linalool과 geraniol을 첨가하면 O_2^- 이온의 생성되고 이 O_2^- 이온을 전환하기 위해 SOD활성이 증가하며, 이 결과 SOD의 산물인 H_2O_2가 크게 증가하고 이 H_2O_2를 제거하기 위한 GPx 효소의 활성이 연이어 크게 증가하는 것으로 판단되었다. 이 실험에 부가하여 H_2O_2를 분해하는 또 하나의 효소인 catalase 효소의 활성을 동일 조건에서 측정한 바 어느 조건에서도 활성이 측정되지 않았다. 이는 catalase 효소가 세포내에서 대부분 peroxisome에 국재되어 있어서 반응이 제한적이므로 세포질에 넓게 존재하는 GPx에 의해 대부분의 H_2O_2의 분해가 이루어지는 것으로 추측되었다.

이상의 모든 결과를 집약하면 천연의 허브로부터 얻어지는 향기물질의 주성분인 monoterpenes류 특히 linalool과 geraniol은 동물실험에서 항암면역계를 활성화하거나 또는 직접 암세포를 사멸하는 일거양득의 항암제로서의 가능성을 시사하였으며, L1210

세포에 대하여는 기존의 항암제인 mitomycine 보다 독성은 약하면서도 더 강한 항암작용을 나타내었고, 그 작용 기작은 이들 monoterpenes이 암세포 내에서 우선 O_2^- 이온을 양산하고 이로부터 생성된 H_2O_2 또는 ·OH 등의 활성산소가 결국 암세포의 apoptosis를 유발하여 암세포가 사멸하는 것으로 간주되었으며, 한편으로 급증된 이들 활성산소의 독성에 대하여 암세포는 활성산소 소거효소인 SOD나 GPx을 유발하여 활성산소의 독성을 막아보려 하나 결국은 역부족으로 사멸하게 되는 것으로 유추되었다.

문 헌

1) Dev, S. : Handbook of terpenoids-monoterepenoids, Vol. 1 and 2. *CRC Press,* Boca Raton, Fla. (1982).
2) Lerdau, M., Guenther, A. and Monson, R. : Plant production and mission of volatile organic compounds. *Bioscience.* **47**, 373 (1997).
3) White, C. S. : Monoterpenes: their effects on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* **20**, 1381 (1994).
4) Hakola, H., Shores, B., Arey, J. and Atkins, R. : Product formation from the gas-phase reaction of OH radical and O_3 with b-phellandrene. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 278 (1993).
5) Criag, W. J. : Health promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 491S (1999).
6) Grassman, J., Hippeli, S. and Elstner, E. F. : Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terepenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol. Biochem. in press* (2002).
7) Choi, H. S., Song, H. S., Ukeda, H. W. and Sawamura, M. : Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4156 (2000).
8) Barrata, M. T., Doman, H. J. and Deans, S. G. and Figueriredo, A. S. : Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.* **13**, 235 (1998).
9) Harrewijn, P., Osten, A. M. and Piron, P. G. M. : Natural terpenoids as messengers. A multidisciplinary study of their production, biological functions, and practical applications. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrechst, Boston, London. (2001).
10) Coviella, C. E., Stipanovic, R. D. and Trumble, J. T. : Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO_2 and nitrogen in transgenic cotton plants. *J. Exp. Botany.* **53**, 323 (2002).
11) Lam, L. K. T., Zhang, J., Hasegawa, S. and Chut, H. A. J. : Inhibition of chemically induced carcinogenesis by citrus liminoids. In: Huang, M. T., Osawa, T., Ho, C. T., Rosen, R. T., eds. Food of phytochemicals for cancer prevention I. fruits and vegetables. Washington DC : *American Chemical Society.* 209 (1994).
12) Crowell, P. L. and Gould, M. N. : Chemoprevention of mammary cancer by monoterpenoids. *Crit. Rev. Oncogenesis.* **5**, 1 (1994).
13) Zheng, G. Q., Zhang, J., Kenney, P. M. and Lam, L. K. T. : Stimulation of glutathione S-transferase and inhibition of carcinogenesis in mice by celery seed oil constitutents. In: Huang, M. T., Osawa, T., Ho, C. T., Rosen, R. T., eds. Food phytochemicals for cancer prevention. Fruits and vegetables. Washington, DC: *American Chemical Society* 230 (1994).
14) Cuvlier, M. E., Bercet, C. and Richard, H. : Antioxidant constituents in sage (Salvia officinales). *J. Agr. Food Chem.* **42**, 665 (1994).
15) Kikuzaki, H. and Nakatani, N. : Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.* **58**, 1407 (1993).
16) Re, L., Barroci, S., Sonnino, S., Mecarelli, A., Vivani, C., Paolucci, G., Scarpantonio, A., Rinaldi, L. and Mosca, E. : Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol. Res.* **42**, 137 (2000).
17) Elson, C. E. and Yu, S. G : The chemoprevention of cancer by mevalonate derived constituents of fruits and vegetables. *J. Nutr.* **124**, 607 (1994).
18) Elson, C. E. : Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. *J. Nutr.* **125**, 1666S-72S (1995).
19) Clark, S. S., Perman, S. M., Sahim, M. B., Jenkins, G. J. and Legbede, J. A. : Antileukemia activity of perillyl alcohol: uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest. *Leukemia.* **16**, 213 (2002).
20) Showin, G. C. : d-Limonene, an anticarcinogenic terpene.: *Nutr. Rev.* **46**, 363 (1988).
21) Bailer, J. C. and Gormick, H. L. : Cancer undefeated. *N. Eng. J. Med.* **336**, 1569 (1997).
22) Astrow, A. B. : Rethinking cancer. *Lancet.* **343**, 494 (1994).
23) Brown, J. M. and Wouters, B. G. : Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agent. *Cancer Res.* **59**, 1391 (1999).
24) Fulda, S., Sievertes, H., Friesen, C., Herr, I. and Debatin, K. M. : The CD95 (APO-1/Fas) System mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **57**, 3823 (1997).
25) Han, J. W., Dionne, C. A., Kedersha, N. L. and Goldmacher, V. S. : p53 status affects the rate of onset but not the overall extent of doxorubicin induced cell death in rat 1 fiblroblsts constituitively expressing c-Myc. *Cancer Res.* **57**, 176 (1997).
26) Boyum, A. : Isolation of leukocytes from human blood. Scan. *J. Clin. Invest.* **21**, 9 (1968).
27) National Cancer Institute USA : Cell Screen KB. Protocol 1600. *Cancer Chemother. Rep.* (part 3) **3**, 17 (1972).
28) Markesbery, W. R. : Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. *Free Radical Bio. Med.* **23**, 134 (1994).
29) McCord, J. and Fridovich, I. : uperoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (heterocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
30) Maral, J., Puget, K. and Michelson, A. M. : Comparative study of superoxide ismutase, catalase, glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. **77**, 1525 (1977).
31) Li., H. F., Waisman, T., Maimon, Y., Shakjar, K., Rosenne, L. and Sueviell, B. F. : The effects of chinese herb formula, anticancer number one (ACNO) on NK cell activity and tumor metastasis in rat. *Int. Immunopharm.* **1**, 1947 (2001).
32) Miller, J. S. : The biology of the natural killer cells in cancer, infection and pregnancy. *Exp. Hematol.* **29**, 1157 (2001).
33) Lee, T. E., Park, S. W. and Min, T. J. : Antiproliferative effect of artemisia argyi extract against J774. A. cells and subcellular superoxide dismutase (SOD) activity changes. *J. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 585 (1999).
34) Jung, D. Y., Ha, H. K., Kim, A. N., Lee, S. M., Min, T. J. and Park, S. W. : Cytotoxicity of SD-994 from Artemisia argyi against L1210 cells with concomitant induction of antioxidant enzymes. *Yakhak Hoeji*. **44**, 213 (2000).
35) Jacobson, M. D. : Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS.* **21**, 83 (1996).
36) Evans, M. D., Griffith, H. R. and Lunec, J. : Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms. *Adv. Mol. Cell Biol.* **20**, 25 (1997).