

알레지 추출물의 ICR 마우스와 L1210 암세포에 대한 항암작용과 그에 따른 항산화효소 활성변화

신유진 · 정대영¹ · 하혜경 · 박시원*

상명대학교 화학과, ¹한국 한의학 연구원 한약제재 개발부

Anticancer Effect of *Erythronium japonicum* Extract on ICR Mouse and L1210 Cells with Alteration of Antioxidant Enzyme Activities

Yoo Jin Shin, Dae Young Jung¹, Hye Kyung Ha, and Sie Won Park*

Department of Chemistry, Sangmyung University

¹Department of Herbal Pharmacology, Korea Institute of Oriental Medicine

Effects of *Erythronium japonicum* methanol extract on ICR mouse with induced abdominal cancer and L1210 cells were studied. Administration of methanol extract (10-100 µg/20 g body weight) prolonged life by 47.8% and decreased number of L1210 cells with IC₅₀ of 54.6 µg/mL after 3 days culture, whereas little effect was observed against normal lymphocytes (<6% compared to 83.2% of L1210 cells under the same condition). Increased SOD and GPx enzyme activities, and remarkably augmented generation of O₂⁻ ion in L1210 cells by *E. japonicum* extract, implied that reactive oxygen species including O₂⁻ ion, might have participated in L1210 cell death

Key words: *Erythronium japonicum*, anticancer activity, ICR mouse, L1210 cells, superoxide dismutase, glutathione peroxidase

알레지(*Erythronium japonicum* Decne)는 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 차전엽산자고, 산우두, 가재무릇, 비단나물이라 불리우기도 하며, 눈 덮인 2부터 5월까지 깊은 산에서 화려하고 아름다운 꽃을 피우는 식물로서 높이가 25-30 cm 인데 반하여 인경은 땅속 깊이 30 cm 까지 들어가며, 어린 잎은 주로 나물로 사용되고 인경에서는 녹말을 채취하여 구황 식품으로 사용해 왔다. 알레지 유사 식물의 인경에 함유된 녹말 함량은 수백 g/kg까지 이르며(1), 이 녹말 중에는 강추위를 이겨내는 osmoprotectant 및 항암작용도 보고 되고 있는 fructan 이(2,3) 상당량 포함되어 있다.

현재 항암제는 조기암을 비롯한 암치료의 전과정에 대부분 투여되고 있는데 이것은 항암제가 전신적으로 작용하기 때문에 치료 및 전이를 예방하기 위하여 선호되고 있다고 볼 수 있다. 그러나 항암제가 암세포에 대한 항암효과 이외 정상세포에 대해서조차 강한 독성과 다제내성(4,5)과 같은 부작용을 나타내기 때문에 항암제의 사용은 환자의 치료에 난제가 되고 있다. 따라서 각 국은 가능하면 무독성이거나 독성이 매우 약하면서도 항암작용이 우수한 항암제 연구에 심혈을 기울이고 있으나 아직까지도 이상적인 항암제개발은 이루어지지 않고 있다.

한편 암이란 genetic changes와 epigenetic changes가 원인이

되어 oncogenes이 활성화되거나 suppressor genes이 억제되면서 균형이 깨지게 되어 생기는 것으로 볼 수 있는데 이러한 이상 상태의 촉발인자로 인체에 유해한 환경이나 물질에 의해 생성되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 거론되어져 왔다(6,7). 흥미로운 것은 임상적으로 사용되고 있는 항암제인 doxorubicin, cisplatin, vincristine, cytosine arabinoside, methotrex, bleomycin 등의 작용기작(8-11) 역시 활성산소와 직접 간접으로 연관하여 apoptosis 활성이 복구되어 암세포를 사멸시키는 것으로 나타나 결국 활성산소는 발암의 원인임과 동시에 항암의 수단이 된다고 하는 점이다.

본 연구에서는 그동안 무독성 나물이나 전분원료로 사용되어 온 알레지의 메탄올추출물에 대하여 Sarcoma 180으로 복수암을 유발시킨 ICR 마우스 및 백혈병계 암세포주인 L1210 세포에 대한 항암효과를 실험하고 나아가 normal lymphocyte에 대한 독성의 정도를 검색하며, 그 작용기작을 규명하고자 활성산소인 O₂⁻이온의 정량 및 항산화효소인 SOD, GPX, catalase 효소활성을 측정하여 의미 있는 결과를 얻어 제시하는 바이다.

실험재료 및 방법

시약

Ferricytochrome c, xanthine, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione, glutathione reductase, phorbol 12-myristate 13-acetate, nicotinamide adenine dinucleotide reduced, trypan blue, dimethylsulfoxide, ethylenetetraacetate은 Sigma(St

*Corresponding author: Sie Won Park, Department of Chemistry, Sangmyung University, Hongji-dong, Seoul 110-743, Korea
Tel: 82-2-2287-5147
Fax: 82-2-396-8758
E-mail: parksw@smu.ac.kr

Louis, MO, USA)의 제품을 구입하였으며, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin mixture는 GIBCO BRL(Grand Island, New York, USA)에서 구입하였으며 무기화합물과 유기용매는 특급품 수준의 제품을 사용하였다.

알레지 추출물 조제

알레지는 강원도 설악산 오색약수터의 진명사로부터 그해 2-5월 사이에 설악산에서 채취한 시료를 마른 나뭇잎의 형태로 일괄 구입하여 냉동실에 보관하면서 필요에 따라 메탄올추출물을 조제하였다. 시료는 조심스럽게 씻어 물기를 닦아낸 다음 잘게 썰어 다음 비율로 추출물을 조제하였다. 시료 10 g을 100 mL의 70% 메탄올에 침지하여 24시간 실온 방치한 후 상정액을 취하고 잔사를 동일하게 다시 처리하여 상정액을 취한다. 앞서 얻은 상정액과 합하여 7겹의 gauze를 통과시켜 얻은 여액을 다시 Watman 여과지로 여과시켜 여액을 감압 농축한 다음 냉동 건조하여 무게를 평량하였다.

발암 ICR 마우스의 생명 연장효과

ICR 마우스에서 계대배양 되어 온 Sarcoma 180 cells을 실험용 ICR 마우스 복강에 1×10^5 cells/10 μ L/20 g body weight의 농도로 접종한 다음 24시간 후부터, 알레지 추출물을 0.5% 이내의 최소한의 DMSO에 용해하여 10-100 g/20 g body weight의 농도로 매일 일정 시간에 한차례 씩 경구투여 한 다음 상태를 관찰하면서 생존율을 계산하였다. Control의 경우는 시료에 사용한 동일 용량의 DMSO를 증류수에 가하여 동일한 방법으로 경구 투여 하였다.

L1210 세포주 배양

본 연구에서 사용한 L1210 cells(murine lymphocytic leukemia; ATCC CCL 219) 세포는 한국세포주 은행(서울대 암연구센터)에서 분양 받아 사용하였다. 이들 암세포는 37°C, 5% CO₂, humidified condition에서 배양하였으며 배양액은 10% FBS를 함유한 RPMI 1640이었고, 항생제로는 penicillin/streptomycin의 혼합액을 사용하였으며 계대 배양은 3-4일마다 시행하였다.

Normal lymphocytes 분리

정상세포에 대한 무독성의 정도를 검색하기 위해 ICR 마우스로부터 normal lymphocytes를 분리하여 이 세포에 미치는 알레지 추출물의 독성을 검색하였다. Normal lymphocytes의 분리 방법은 Boyum(12)의 방법을 적용하였는데 간단히 다음과 같다. Mouse를 ether로 마취시킨 후 하대정맥을 절개하여 heparin 처리가 된 주사기에 채혈한 뒤 15 mL tube에 모아서 여기에 dextran 유도체인 Histopaque R-1077 3 mL을 조심스럽게 가한 다음 400 \times g에서 30분간 실온에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 pasteur pipette로 상정액인 plasma층을 제거하고 lymphocyte가 포함된 불투명한 중간층을 취하여 phosphated buffered saline (PBS) 10 mL과 조심스럽게 혼합한 다음 250 \times g에서 10분간 원심분리 하여 상정액은 버리고 얻어진 침전물에 대해 2회 반복 세척하였다. 얻어진 normal lymphocytes를 PBS에 부유시켜 세포수를 계산한 다음 penicillin/streptomycin용액과 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에 가하여 배양하였다.

L1210 세포와 normal lymphocytes에 대한 세포수 감소

알레지 추출물이 나타내는 L1210 암세포 증식 억제효과와 normal lymphocytes에 대한 독성정도를 세포 수 변화를 지표로

시행하였다. 24 well plate에 1×10^6 cells/mL 농도로 L1210 세포 또는 normal lymphocytes를 가하고 여기에 알레지 추출물을 첨가한 다음 일정기간 배양 후 Thayer(13) 방법에 준하여 hemocytometer를 사용한 trypan blue exclusion법으로 살아있는 비착색 세포수와 control 그룹의 비착색 세포수를 세어 백분율(%)로 세포독성을 계산하였다. 즉 control 그룹의 수보다 감소한 수를 세포독성의 결과의 일환으로 간주하여 계산하였다.

세포수 감소(%) =

$$\frac{\text{Control군의 비착색 세포수} - \text{시료군의 비착색 세포수}}{\text{Control군의 비착색 세포수}} \times 100$$

L1210 세포의 O₂⁻ 이온 정량

L1210 세포 배양액에 알레지 추출물을 첨가하여 일정기간 배양 후 L1210 세포가 나타내는 O₂⁻ 생성량의 정량은 Markesbery(14)의 방법에 의하여 시행하였다. 본 실험에서는 L1210 세포를 1일-3일간 배양하여 250 \times g에서 원심분리 후 상정액은 버리고 수집하여 24 well plate에 1×10^6 cells/well, 700 μ L PBS, 50 μ L cytochrome c, 5 μ g/mL의 phorphol myristate acetate (PMA) 50 μ L와 배지를 첨가하여 60분간 배양 후 원심분리 하였다. 상정액 200 μ L에 PBS를 가하여 1 mL가 되도록 희석하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferricytochrome c의 환원 반응은 21.1/mM/cm의 몰흡광계수를 적용하였으며 O₂⁻ 생성량은 moles/60 min/10⁸ cells로 나타내었다.

항산화효소액 조제

L1210 세포를 1×10^6 cells/mL 농도로 접종한 배양액 10 mL를 50 mL culture flask에서 일정기간 배양한 후 1,000 \times g에서 원심분리 하여 상정액은 제거하고 침전된 L1210 세포를 생리 식염수로 2회 세척하였다. 포집된 세포를 5 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 1.5 mL에 현탁하여 Elvejehn homogenizer를 이용하여 ice bath내에서 5초씩 5회 균질화 한 다음 이 균질액에 대하여 초음파 파쇄기를 이용하여 얼음 상에서 30초간 3회 초음파 처리하여 mitochondria matrix에 존재하는 것으로 알려진 MnSOD 효소까지 용출시켜 이 균질액을 4,500 \times g에서 원심분리하여 그 상정액을 항산화효소액으로 조제하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD활성의 측정은 기본적으로 McCord and Fridovich(15)의 방법에 의해 이루어졌다. 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 측정하여 이루어졌다. Xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하였다. SOD 활성은 효소액이 함유되지 않은 반응액의 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 책정하여 unit/min/10⁷ cells로 나타내었다.

Glutathione Peroxidase(GPx) 활성 측정

GPx의 활성은 Maral 등(16)의 방법에 의하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(5 mM EDTA, pH 7.0), 8.4 mM NADPH, 1 unit glutathione reductase(GSSGR), 150 mM의 glutathione(GSH), 효소액을 첨가하여 전체 반응액 2 mL이 되도록

록 한 다음 37°C에서 5분간 예치시킨 후 0.16 mM *t*-butyl hydroperoxide를 가하여 340 nm에서 3분 동안 NADPH의 산화에 의해 감소되는 흡광도의 변화를 측정하였으며 NADPH의 흡광계수는 $6.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 을 사용하여 효소활성을 계산하였다.

Catalase활성 측정

Catalase 활성의 측정은 250 nm, 25°C에서 흡광도 감소를 근거로 하는 Maral 등(16)의 방법을 적용하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 12.5 mM H₂O₂ 및 효소액을 가하여 전체 반응액이 2 mL가 되도록 한 후 250 nm에서 10초 단위로 5분간 흡광도 변화를 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 mean±S.D.으로 표시하였다. Control값과 치료값 사이의 유의성은 Student's *t*-test를 적용하여 $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ 인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

얼레지 추출물에 의한 발암 ICR 마우스의 생명연장효과

Sarcoma 180으로 발암시킨 ICR 마우스에 얼레지 추출물을 경구 투여하여 생존하는 기간을 control의 것과 비교하여 계산한 생명연장효과는 Table 1에 표시한 바와 같다. ICR 마우스에 복수암을 유발하기 위하여 Sarcoma 180 cell을 접종하여 24시간이 지난 후부터 얼레지 추출물을 10-200 µg/mL로 매일 한차례씩 경구투여 하여 사망일을 계산한 결과 control군의 평균 생존 기간은 21.3±3.7 days이었으며 얼레지 추출물 투여군의 생명연장효과는 50 µg/mL의 농도부터 현저히 증가하여 70 µg/mL 농도에서는 143.7%로 최고조에 달하였으며 전체적으로는

Table 1. The life prolonging effect of the *Erythronium japonicum* extract on ICR mice bearing peritoneal cancer

| <i>Erythronium japonicum</i> (µg/20 g body weight) | Survived days | Life prolonging effect (%) |
|--|---------------|----------------------------|
| 0.0 | 21.3±3.7 | 100 |
| 10.0 | 24.6±4.3 | 115.5 |
| 20.0 | 23.8±3.9 | 111.7 |
| 50.0 | 28.7±2.2* | 134.7 |
| 70.0 | 30.6±1.6* | 143.7 |
| 100.0 | 29.5±4.7 | 138.1 |

Each value represents the mean±S.D. of six individual experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group ($p < 0.05$).

111.7%-143.7%에 달하였다. 이로써 얼레지 추출물은 복수암을 유발시킨 ICR 마우스의 생명을 상당히 연장시키는 것으로 판단되었다.

얼레지 추출물의 L1210세포에 대한 세포독성

얼레지 추출물이 암유발 동물준위에서 상당한 생명연장효과를 나타내었으므로 암세포준위에서의 억제효과를 검색해 보았다. 백혈병계 암세포인 L1210 세포에 얼레지 추출물을 10 µg/mL에서 200 µg/mL 농도까지 첨가한 다음 1-4일간 배양하여 세포수를 계산한 결과가 Table 2에 제시되어 있는데 배양 1일째에는 세포수 감소가 거의 나타나지 않았으나 농도가 증가하고 배양일수가 증가할수록 현저한 세포수 감소를 나타내었다. 이와 같은 세포수 감소는 세포독성으로 인하여 암세포를 사멸시키거나 또는 cell cycle arrest와 같은 세포분열 억제 때문인 것으로 어떠한 이유에서든 암세포수가 감소한다는 것은 항암효과와의 중요한 지표이다. 배양 3일과 배양 4일째에는 50 µg/mL 농도 이상에서는 약 50%이상의 세포독성 효과를 나타내었고, 4일간 배양 시에는 최고 98.6%의 세포독성이 시사하는 바와 같이 고농도에서는 살아남은 세포가 거의 없었다. 세포독성에 대한 일반적인 실험 기준인 배양 기간 3일을 선택하여 계산한 IC₅₀값은 54.6 µg/mL이었다.

Normal lymphocytes에 대한 얼레지 추출물의 독성

얼레지 추출물이 항암제로서의 효과가 있으려면 암세포에 대해서는 세포독성이 높은 대신 정상세포에 대해서는 무독성이 확보되어야 하므로 L1210세포가 유래한 ICR 마우스로부터 normal lymphocytes를 분리하여 독성유무를 실험하였다. Table 3에 제시된 결과에 따르면 normal lymphocytes에 얼레지 추출물을 첨가한 후 배양 1일째에는 대부분 세포사멸보다는 10% 내외의 세포증식효과가 나타났으며, 배양 2일째에도 저 농도의 경우에는 세포증식 효과 그리고 100-200 µg/mL의 고농도에서 5% 남짓의 미약한 세포수 감소 효과가 나타났다. 배양 3일째에도 약 5% 정도의 적은 세포수 감소 현상이었고 배양 4일째에 가서야 10%가 넘는 세포독성 효과가 나타났다.

이 결과를 L1210 세포의 경우인 Table 2의 결과와 비교하면 얼레지 추출물은 암세포에 대해서는 높은 세포독성을 나타낸 반면 normal lymphocyte에 대해서는 아주 미약한 독성만을 나타내었다. 예를 들어 얼레지 추출물을 100 µg/mL농도로 가하여 3일간 배양시켰을 때 L1210 세포의 생존율은 16.8%정도에 불과하였으나 normal lymphocytes는 84.2%의 높은 생존율을 보였다. 따라서 얼레지 추출물은 개발하기에 따라서는 독성이 적고 항암성은 높은 우수한 항암제로서의 가능성이 시사된다고 볼 수 있다.

Table 2. The effect of *Erythronium japonicum* extract on the cell number changes of L1210 cells

| Culture days | Cell number reduction (%) | | | | |
|--------------|-------------------------------|-----------|------------|------------|------------|
| | Extract concentration (µg/mL) | | | | |
| | 10 | 20 | 50 | 100 | 200 |
| 1 | 1.7±0.5 | 1.4±0.8 | 3.0±1.9 | 5.3±1.6 | 7.4±1.2 |
| 2 | 2.1±1.1 | 5.7±3.8 | 26.0±1.3* | 39.2±5.1** | 46.2±4.9* |
| 3 | 15.5±2.3 | 23.8±5.7 | 53.0±2.1* | 83.2±2.5** | 95.7±3.3** |
| 4 | 16.7±3.7 | 32.5±3.9* | 72.4±3.6** | 83.7±3.4** | 98.6±2.3** |

Each value represents the mean±S.D. of four individual experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group ($p < 0.05$, $p^{**} < 0.01$).

Table 3. The inhibitory effect of *Erythronium japonicum* extract on the cell numbers of normal lymphocytes

| Culture days | Cell number reduction (%) | | | | |
|--------------|-------------------------------|------------|-------------|-------------|------------|
| | Extract concentration (µg/mL) | | | | |
| | 10 | 20 | 50 | 100 | 200 |
| 1 | -9.2 ± 1.3* | -4.6 ± 2.2 | -7.1 ± 3.4 | -4.3 ± 0.6* | 3.8 ± 1.7 |
| 2 | -2.5 ± 1.2 | -2.1 ± 0.7 | 1.5 ± 0.4 | 3.4 ± 0.8 | 5.9 ± 1.7 |
| 3 | 1.4 ± 1.5 | 3.2 ± 0.5* | 4.2 ± 1.3 | 5.8 ± 0.4** | 6.7 ± 1.5 |
| 4 | 2.5 ± 0.3 | 5.3 ± 1.4 | 5.9 ± 0.6** | 15.9 ± 1.3* | 17.3 ± 3.5 |

Each value represents the mean ± S.D. of four individual experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (*p<0.05, **p<0.01).

L1210 세포의 O₂⁻ 생성

알레지 추출물이 암세포인 L1210 세포수를 현저하게 감소시켜 높은 항암효과의 가능성을 보였는데 이와 같은 암세포수 감소효과가 어떠한 기작에 의해 일어나는지 규명하고자 암세포수 감소 현상과 활성산소와의 관계를 규명하는 실험을 시행하였다.

현재 보고된 항암제의 작용 기작은 항암제에 의한 암세포 사멸이 necrosis 보다는 apoptosis에 의하며 이 apoptosis 촉발 인자로서의 활성산소의(8-10)의 영향은 매우 크므로 알레지 추출물에 의한 암세포수 감소에도 이와 같은 활성산소 관계물질이 연관되는지 검색하고자 하였다. 우선 알레지 추출물에 의해 암세포수 감소가 현저하게 유발될 수 있는 조건을 설정하여 이에 따른 O₂⁻이온의 생성량의 변화를 측정하고, 이 값을 세포독성이 유발되지 않은 조건에서의 O₂⁻이온의 생성량과 비교하여 보았다. O₂⁻이온은 산소로부터 생성되어 파생되는 활성산소대사물의 첫출발물질로 그 생성량은 의미가 크다고 할 수 있겠다(11,12). 세포수 감소현상은 알레지 추출물의 농도와 배양 기간에 의존하므로 알레지 추출물을 50 µg/mL과 100 µg/mL의 고농도로 첨가하여 3일간 배양을 시킨 경우를 세포독성이 높은 경우로 간주하고 10 µg/mL과 20 µg/mL의 비교적 적은 농도로 1일간이나 2일간 배양 한 경우를 세포수 감소가 거의 나타나지 않은 경우로 실험하였다. 이와 같은 조건에서 각각 배양한 후 포집한 세포에 대해 O₂⁻ 생성량을 측정하여 비교 한 결과 Table 4에서와 같이 상당히 유의성 있는 O₂⁻ 생성량의 변화를 얻게 되었다.

결과에 따르면 Table 2에서와 같이 걸보기에는 세포수 감소가 10% 이하로 매우 미약한 배양 1일째부터 알레지 추출물을 첨가한 한 그룹의 O₂⁻ 생성이 control 그룹에 비하여 점진적으로 증가하기 시작하였으며, 세포수 감소가 50-80%로 상당히 높

Table 4. The effect of *Erythronium japonicum* extract on the generation of O₂⁻ in L1210 cells

| Concentration (µg/mL) | O ₂ ⁻ (nmoles/60 min/10 ⁷ cells) | | |
|-----------------------|---|--------------|--------------|
| | Culture period (days) | | |
| | 1 | 2 | 3 |
| 0.0 | 0.09 ± 0.05 | 0.14 ± 0.03 | 0.11 ± 0.05 |
| 10.0 | 0.13 ± 0.08 | 0.18 ± 0.06 | 0.38 ± 0.07* |
| 20.0 | 0.26 ± 0.04 | 0.67 ± 0.05* | 0.93 ± 0.11 |
| 50.0 | 0.34 ± 0.07* | 1.32 ± 0.13 | 1.47 ± 0.05* |
| 100.0 | 0.45 ± 0.13 | 1.79 ± 0.17* | 2.35 ± 0.13* |

Each value represents the mean ± S.D. of five individual experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (*p<0.05, **p<0.01).

있던 배양 3일째에는 농도에 비례하여 O₂⁻ 생성이 급증하였는데 50 µg/mL의 경우에는 control 값의 약 12배, 100 µg/mL의 농도에서는 control 값의 약 23배 정도의 매우 높은 증가를 보였다. 이 결과를 종합하면 L1210 세포에 알레지 추출물을 첨가할 경우 걸음으로는 세포수 감소가 나타나지 않는 배양 첫날부터 이미 O₂⁻이온의 생성이 증가되기 시작하며 세포수 감소의 정도와 비례하여 지속적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 일반적으로 O₂⁻이온의 반감기는 대략 10⁻⁵sec으로 매우 신속하게 대사(14)되는 것으로 알려져 있는데, 대사의 첫 번째 단계는 O₂가 H₂O₂와 OH로 전환되는 반응이며, 두 번째 단계는 생성된 H₂O₂가 무독성인 H₂O로 전환되는 반응(11,12)이다. 그런데 이 과정 중에 생기는 H₂O₂는 물론 O₂와 부산물인 ·OH도 매우 유해하며 암세포에게도 해로운 물질들이므로 암세포 역시 이 활성산소들에 대해 자신을 보호하기 위한 대응 반응을 할 것으로 간주되어 검색해보기로 하였다.

즉 알레지 추출물을 가하여 L1210 세포 내에 생긴 O₂⁻이 무독한 H₂O까지 전환되는 연쇄반응의 지표물질로 항산화효소(17,18)인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx) 또는 catalase 활성을 측정하여 알레지 추출물의 세포수 감소효과와 연계하여 보았다.

알레지 추출물에 의한 L1210세포의 SOD 활성 변화

O₂⁻은 SOD에 의해서 H₂O₂로 전환되고 이 H₂O₂는 catalase나 GPx에 의해서 무독한 H₂O로 전환된다고 알려져 있거나 Fenton 반응에 의해 자발적으로 맹독성인 ·OH로 전환되는 것으로 알려져 있는데(11,12), 알레지 추출물로 야기되는 세포독성 과정에 실제 SOD활성 변화가 수반되는지 파악하기 위하여 세포수 감소에 따른 SOD활성을 각각 측정 비교하였다.

Fig. 1에 제시된 결과를 보면 알레지 추출물을 첨가하여 야기된 세포수 감소 정도에 비례하여 SOD활성의 변화가 큰 것을 알 수 있었다. 우선 세포수 감소가 거의 일어나지 않는 조건인 배양 1일째에 알레지 추출물을 첨가하여 배양시킨 후 L1210 세포의 SOD활성은 10 µg/mL에서는 1.31 units/10⁷ cells, 50 µg/mL의 농도에서 0.96 units/10⁷ cells, 100 µg/mL에서는 1.64 units/10⁷ cells로서 control 값인 0.57 units/10⁷ cells에 비하여 약 2-3배 증가 값을 보였다. 이와 같은 현상은 걸음으로는 세포수 감소가 현저하지 않은 배양 1일째에도 실제 적으로는 암세포가 알레지 추출물에 의해 독성 상태가 되어 O₂⁻를 생성시키고 이 O₂⁻를 제거하기 위한 SOD 활성도 벌써부터 증가하기 시작한 것으로 보인다.

세포수 감소가 50-90% 정도까지 높았던 배양 2일째와 3일째, 4일째의 결과를 보면 control 그룹의 SOD 활성도 배양 기간에 비례하여 2-3배 증가하였으며, 알레지 추출물 첨가군의 SOD

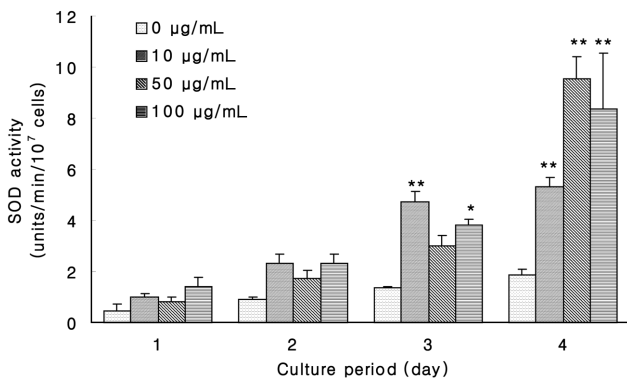


Fig. 1. The effect of *Erythronium japonicum* extract on the SOD activities of L1210 cells.

Data represent the mean \pm S.D. of five individual experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (* p <0.05, ** p <0.01).

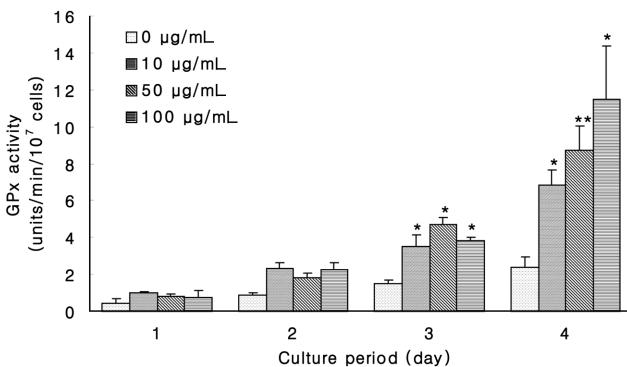


Fig. 2. Effect of *Erythronium japonicum* extract on the GPx activities of L1210 cells.

Data represent the mean \pm S.D. of five individual experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (* p <0.05, ** p <0.01).

활성은 각각의 control 값의 5배 정도까지의 높은 증가 값을 보인 것으로 보아 얼레지 추출물로 인하여 야기되는 세포수 감소에는 O_2^- 전환효소인 SOD 효소활성이 크게 수반되는 것을 알 수 있었다.

L1210 세포의 GPx(glutathion peroxidase)와 catalase 활성 변화

이상의 결과에서 SOD활성이 증가한다는 것은 생성물인 H_2O_2 이 생긴다는 것을 의미하므로 연이어 H_2O_2 의 전환효소인 glutathione peroxidase(GPx)나 catalase활성의 변화가 수반될 수도 있다고 보아진다. Fig. 2의 결과에 의하면 SOD와 동일한 조건에서 GPx 활성변화를 측정 한 바 SOD의 경우와 마찬가지로 세포수 감소현상이 뚜렷한 조건에서 GPx 효소활성은 세포수 감소 정도에 비례하여 뚜렷하게 증가하는 것을 알 수 있었다.

우선 세포수 감소가 거의 나타나지 않는 배양 1일째에 얼레지 추출물을 10 μ g/mL부터 100 μ g/mL 농도까지 첨가하였을 경우 GPx 활성은 0.7-1.2 unit/ 10^7 세포로서 control의 값과 거의 유사하였으나 세포수 감소가 현저했던 배양 2일째, 3일째 그리고 4일째의 GPx활성은 control 군에 있어서도 약 2배 정도, 그리고 각각의 얼레지 추출물 첨가 군에 있어서도 배양 시기와 농도에 비례하여 GPx 활성이 해당된 배양기간의 control 값의

3배정도 까지 크게 증가하였다.

활성산소 전환효소인 SOD와 GPx 항산화효소에 관한 이상의 결과를 종합하면 L1210 세포에 얼레지 추출물을 첨가할 경우 현저하게 세포수 감소 현상이 유발되는데 이때 O_2^- 이온의 생성이 급증하고, 이 O_2^- 이온을 소거하기 위해 SOD활성이 증가하며, 그 결과 H_2O_2 가 증가하고 이 H_2O_2 를 소거하기 위한 GPx 효소의 활성이 연이어 크게 증가하는 것으로 판단되었다. 그런데 GPx는 주로 세포질에 널리 분포되어 있는 반면, H_2O_2 를 분해하는 또 다른 효소인 catalase는 세포내 peroxisome에 국재되어 있으며(18,19) 본 GPx 분석 실험에서도 부가하여 catalase 효소의 활성을 측정한다. 어느 조건에서도 활성이 나타나지 않았는데 이는 catalase가 peroxisome에 국재되어 있어서 반응이 제한적이거나 또는 생성된 H_2O_2 분해에는 관여하지 않고, 세포수 감소에 수반되어 대부분의 H_2O_2 는 세포질에 넓게 존재하는 GPx에 의해 분해 되는 가능성이 큰 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 종합하면 얼레지 추출물은 L1210 세포를 뚜렷하게 사멸시키고 normal lymphocyte는 거의 파괴하지 않으며, L1210 세포수를 감소시키는 과정 중에 우선 L1210 세포내에 O_2^- 을 양산하고 이로부터 생성된 H_2O_2 또는 $\cdot OH$ 등의 활성산소가 apoptosis를 유발함으로써 암세포가 사멸될 가능성이 시사되었으며, 한편으로 급증된 이들 활성산소의 독성에 대하여 암세포는 활성산소 소거효소인 SOD나 GPx를 유발하여 활성산소의 독성을 막아보려 하나 결국은 역부족으로 사멸하게 되는 것으로 간주되었다.

요 약

나물이나 전분원료로 사용되어 온 얼레지(*Erythronium japonicum*)의 항암작용을 검색하였다. 얼레지 추출물을 Sarcoma 180으로 복수암을 유발시킨 ICR 마우스에 대하여 경구투여 한 결과 143.7%에 이르는 생명연장효과를 얻었으며, 백혈병계 암세포인 L1210 세포에 대해서는 최고 98.6%의 세포수 감소효과를 얻었다. 아울러 얼레지 추출물의 독성유무를 검색하고자 normal lymphocyte를 분리하여 이 정상세포에 얼레지 추출물을 첨가했을 때 세포수 감소는 거의 일어나지 않았으며, 고농도의 3일간의 긴 배양기간에 의해서도 L1210 세포의 경우 83.2%에 비해 5.8% 정도로 매우 적었다. 이와 같은 결과로부터 얼레지 추출물은 무독성 또는 저독성 항암제로서의 개발 가치가 있을 것으로 사료되었다. 한편 얼레지 추출물의 암세포에 대한 작용기작으로 일환으로 활성산소인 O_2^- 의 생성량을 측정한 결과 control 값의 최대 약 3.6배까지 크게 증가하였으며, 동시에 O_2^- 전환효소인 SOD와 SOD의 종산물인 H_2O_2 분해효소인 GPx도 각각 5배와 3배까지 크게 증가하였다 따라서 얼레지 추출물은 암세포에서 O_2^- 를 비롯한 활성산소를 유발시키고 이 증가된 활성산소가 암세포의 apoptosis를 야기하는 것으로 간주되었다.

문 헌

- Mullin WJ, Peacock S, Loewen DC, Turner NJ. Macronutrients content of yellow glacierlily and balsamroot; root vegetables used by indigenous peoples of north western north America. Food Res. Intl. 30: 769-775 (1997)
- Ritsens T, Smeekens M. Fructans: beneficial for plants and humans. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 223-229 (2003)
- Cooper PD, Carter M. The anti-melanoma activity of inulin in mice. Mol. Immunol. 23: 903-911 (1986)
- Astrow AB. Rethinking cancer. Lancet 343: 494-503 (1994)

5. Bailer JC, Gormick HL. Cancer undefeated. N. Eng. J. Med. 336: 1569-1575 (1997)
6. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen species and nitrogen species in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem. J. 313: 1729-1734 (1996)
7. Evans MD, Griffith HR, Lunec J. Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms. Adv Mol. Cell. Biol. 20: 25-31 (1997)
8. Steel VE. Current mechanistic approaches to the chemoprevention of cancer. J. Biochem. Mol. Biol. 36: 78-81 (2003)
9. Serrano J, Palmeria CM, Kuehl DW, Wallace KB. Cardioselctive and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following sub-chromic doxorubicin administration. Biochem. Biophys. Acta 1411: 201-205 (1999)
10. Reynolds CP, Maureer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as target for cancer therapy. Cancer Lett. 206: 169-180 (2004)
11. Sould AK, Tacka KA, Galvan KA, Penefsky HS. Immediate effects of anticancer drugs on mitochondrial oxygen consumption. Biochem. Pharmacol. 66: 977-987 (2003)
12. Boyum A. Isolation of leukocytes from human blood. Scan. J. Clin. Invest. 21: 9-15 (1968)
13. Thayer PS, Himmelfarb P, Watts GI. Cytotoxicity assays with L1210 cells *in vitro*: Comparison with L1210 *in vivo* and KB cells *in vitro*. Cancer Chemother. Rep. (part 2) 2: 1-25 (1971)
14. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. Free Rad. Biol. Med. 23: 134-139 (1994)
15. McCord J, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (heterocuprein). J. Biol. Chem. 244: 6049-6052 (1969)
16. Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. Biochem. Biophys. Res. Comm. 77: 1525-1531 (1997)
17. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. FASEB J. 9: 528-534 (1995)
18. Amstad P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu-Zn superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. J. Biol. Chem. 58: 1606-1612 (1994)
19. Orrenius S. Mechanisms of Oxidative Cell Damage: An Overview of Oxidative Process and Antioxidants. Raven Press Ltd., New York, NY, USA. pp. 53-71 (1994)

(2004년 2월 17일 접수; 2004년 10월 15일 채택)