

강화 사자발쑥의 항암활성 증진을 위한 추출조건의 최적화

권민철* · 김철희* · 김효성* · 이상희* · 최근표** · 박옥연** · 유상권*** · 이현용****†

*강원대학교 BT특성화학부대학, **강원도립대학 식품가공제과제빵과,
강릉대학교 해양생명공학부, *강원대학교 생명공학연구소

Optimal Extract Condition for the Enhancement of Anticancer Activities of *Artemisia princeps* Pampanini

Minchul Kwon*, Cheol Hee Kim*, Hyou Sung Kim*, Sang Hee Lee*, Geun Pyo Chio**,
Uk Yeon Park**, Sang Guan You***, and Hyeon Young Lee****†

*College of Bioscience & Biotechnology, Kangwon Natl. Univ., ChunCheon 200-701, Korea.

**Department of Food Processing & bakery, Gangwon Provincial Univ., Gangneung 210-804, Korea.

***Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea

****Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

ABSTRACT : Extractions of *Artemisia princeps* Pampanini were obtained by using water and ethanol at different temperatures (60 °C, 100 °C) with or without ultrasonification process (40 kHz). Yield of ultrasonificated extracts were about 20% higher than that of control group. Cytotoxicity of all conditions through adding 1.0 mg/ml was below 37%, and treated with ultrasonification group was lower than the other group, about 5~8%. 100 °C water extract with ultrasonification was higher anticancer activities as maximum 73% and higher selectivities at concentrations over 0.8 mg/ml. The extracts treated with ultrasonification were higher anticancer activities than the control. Densitometric analysis of bcl-2 revealed that extracts of high anticancer activity had low density. This results suggest that expression of bcl-2 protein by adding of *Artemisia princeps* Pampanini extracts relative to taking cancer. To conclude, optimum condition for efficient extraction of *Artemisia princeps* Pampanini is using water with ultrasonification at over 60 °C below 100 °C.

Key Words : *Artemisia princeps* Pampanini, anticancer activity, temperature, solvent, ultasonification, Bcl-2

서 언

Artemisia 종에 속하는 쑥은 우리나라 산야의 전 지역에서 자생하는 번식력이 강한 여러해살이풀로 분류학적으로는 국화과에 속하는 다년생 초본이다. 북반구에 약 2,000여종이 분포하며 우리나라 자생종만도 약 300여종이 분포하는 것으로 알려져 있으며 (Shin *et al.*, 2005) 예로부터 민간요법을 통해 수십 가지의 효능이 알려져 중요 약용식물로 널리 사용되어왔다. 독특한 향기와 맛 때문에 음식의 재료로도 사용되어 왔으며, 특히 한방에서 만성위장병, 하복부통, 천식, 구토, 지혈, 구충 및 악취 제거에 효과가 있다고 알려져 왔다. 또, 피를 맑게 하고 소화를 돕는가 하면 피부미용에도 효과가 있다하여 최근 쑥을 약용, 과자, 국수, 커피 대용차 등 다양한 식품에 응용하고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다 (Choi *et al.*, 2004).

우리나라에서는 강원도나 지리산 부근에서 생산된 인진쑥과 백령도, 강화도, 당진, 함평 등 서해안 지역에서 생산되는 약쑥이 효과가 크다고 알려져 많이 보급되고 있으나 쑥의 종류, 성분 추출방법 등에 따라 이용 가능한 유효성분이 매우 다양하여 인진쑥 등 알려진 몇몇의 대표적인 쑥을 제외하고 각각에 대한 약리적 효능 연구는 미진한 편이다. 강화 사자발쑥 (*Artemisia princeps* Pampanini)은 강화도 지역에서만 주로 자생하는 다년생 초본으로 한방에서는 소염제, 진통제, 강심제, 진해제 및 흡입제 등으로 널리 이용되었으며, 주요 약리작용으로는 항균 작용이 알려져 있다 (Oh *et al.*, 1997). 또한 페놀, 플라보노이드, 아미노산 함량이 다른 쑥에 비해 상대적으로 많아 유효 성분 역시 많이 함유하고 있을 것으로 기대되고 있다 (Choi *et al.*, 2004). 하지만 아직 그 이용을 위한 연구가 미진하여 GC/MS를 이용한 정유성분의 분석 및 몇몇 플라보노이드, 스테롤 분리에 대한 연구만이 보고되어 있을 뿐이다.

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received January 31, 2007 / Accepted August 2, 2007

동물 실험을 통해 영양소가 결핍되었을 때 식품 중의 발암성 물질에 의한 암 발생률이 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 항암제로 이용하기 위한 물질이 탐색되고 있다. 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제의 대부분은 합성물질들로 부작용이 심하여 문제가 되고 있다. 이로 인해 최근 세계적으로 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연물을 대상으로 항암성 물질의 검색이 많이 시도되고 있다. 특히, 우리나라에서는 한방에서 200여 종의 생약재가 암환자에게 처방되고 있음이 밝혀졌고, 또 수종의 한약재와 마늘, 인삼, 도라지 등에서 항암작용이 보고된바 있다 (Kim *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2004). Lee (2002) 등은 일부 약용식물 및 식용식물의 추출물의 항암 효과에 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 (Hwang *et al.*, 1998). 특히 쑥의 항암에 관한 연구로는 참쑥 (*A. lavandulaefolia* D.C.)을 포함한 수종의 식물에서 항돌연변이 효과를 확인하였고 (Lee and Lin, 1988), Xu (1989) 등은 쑥 (*A. capilaris*)의 수용성 추출물이 종양괴사인자를 활성화시키는 효과를 가진다고 보고하였으며 그 외에 쑥의 페놀 화합물의 항암 활성도 발표된 바 있다 (Ryakhovskaya *et al.*, 1989).

여러 생약재들을 기존의 열수 추출방법으로 추출할 때 낮은 추출효율과 이로 인한 에너지 소비가 많으며 열로 인한 많은 유용성분의 파괴, 단백질의 변이, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출, 열에 대하여 불안정 등의 단점을 드러내고 있다. 이에 반해 최근 대두되고 있는 초음파 추출을 병행하는 방법은 전통적인 열수 추출방법과는 달리 많은 경비가 소요되지 않으면서 추출공정의 효율을 높이고 식물성분의 용매 추출에 효과를 나타내는 등 최근 관심이 집중되고 있는 실정이다 (Kim *et al.*, 2005a).

특히 초음파 에너지를 추출에 이용하면 초음파 진동에 의한 공동현상 (citation)에 의해 매우 큰 에너지를 발생하게 된다. 또한 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격 효과로는 높은 압력을 유도하여 혼합 효과를 높여주게 된다 (Chung *et al.*, 2000). 용매추출과 초음파 추출을 비교한 실험에서 초음파 에너지를 용매추출공정에 도입하여 추출한 결과, 초음파 조사 시간이 증가함에 따라 추출량은 증가하였고, 이는 용매추출에 비해 매우 짧은 시간에 추출이 완료된 것으로 초음파의 공동효과에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문이라는 결과를 보고한바 있다 (Kim *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004).

따라서 본 연구에서는 유용한 이점을 가진 초음파 병행 추출을 이용하여 타 쑥에 비해 우수한 유효활성이 기대되는 강화 사자발쑥을 이용하여 항암활성의 가능성을 알아보고, 높은 추출효율과 높은 생리활성을 위해 온도, 용매, 초음파 병행을 통한 최적 추출조건을 알아봄으로써 기능성 식품 및 기능성 소재로서의 활용에 있어 바탕자료로 사용하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출방법

본 실험에 사용한 사자발쑥 (*Artemisia princeps* Pampanini)은 2005년 3월 인천광역시 강화군 산림조합에서 구입하였다. 추출은 시료 200 g에 각각 2 l의 증류수와 ethanol (95%)을 사용하여 100°C, 60°C로 24시간동안 추출하였으며, 다시 초음파 추출기를 통하여 각각의 온도인 100°C와 60°C에서 40 kHz의 초음파로 30분간 초음파 추출을 병행한 것을 이용하였다. 추출물들은 감압여과 및 농축 후 동결건조를 통해 분말을 얻었으며 각각의 수율을 계산하였다.

2. 정상세포 독성 및 암세포의 생육 억제 실험

실험에 이용한 세포주는 인간 암세포주로 간암세포주인 Hep3B (Hepatocellular carcinoma, Human), 인간 폐암세포주인 A549 (Lung carcinoma, Human), 인간 위암세포주인 AGS (Stomach adenocarcinoma, Human), 인간 유방암세포주인 MCF-7 (Breast adenocarcinoma, Human)을 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상 세포주로는 인간 폐세포주인 HEL299 (Embryo lung cell, Human)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포주들 중 Hep3B, MCF-7은 DMEM (GIBCO, USA)배지를 A549, AGS, HEL 299는 RPMI 1640 (GIBCO, USA)배지에서 10% heat-inactivated fetal bovine serum을 첨가하여 배양하였다. SRB (sulforhodamine B) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 MCF-7 (10% FBS, DMEM media)과 A549 (10% FBS, RPMI 1640 media)의 농도를 $4.0\sim 5.0 \times 10^4$ cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 100 μ l씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (Trichloroacetic acid) 100 μ l를 가하여 4°C에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조하였다. 그 후 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μ l씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic

acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (Rubinstein *et al.*, 1990). 정상 세포 (HEL 299)의 세포독성과 각 암세포주의 암세포 생육 억제 활성을 측정 한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산하였다.

$$Selectivity = \frac{\text{암세포생육 억제활성}}{\text{정상세포의 세포독성}}$$

3. Bcl-2 발현 실험

1 \times 10⁶ 정도의 세포를 사용하여 cytochrome c의 Western blotting을 위한 세포질성 단백질을 분리하였다. 일단 플라스크에 있는 배지를 제거하고 cold PBS를 첨가한 후 scraper로 세포를 수집하였다. 10초간 원침하여 상등액을 버린 후 400 μ l의 cold buffer A (10 mM HEPES-KOH [pH7.9], 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.1% NP-40)에 잘 현탁하여 얼음에서 30분간 방치하였다. 다시 10초간 피펫팅한 후 원침하고 상등액을 취하여 단백질의 농도를 측정 한 후 영하 70 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 사용하였다.

위에서 분리한 각 암세포주의 단백질 40 ml를 9% SDS-polyacrylamide gel에서 Tris-glycine buffer로 전기 영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 분리하여 western blotting 장치에 설치한 후 여기에 transfer buffer를 채우고, 50 V로 2시간 전이하고 membrane을 분리하여 30분간 blocking solution으로 blocking한 후 BclXL 혹은 Mcl-1에 대한 1차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 blocking solution으로 잘 적신 후 여기에 horseradish peroxidase 또는 alkaline phosphatase가 증합되어 있는 anti-mouse immunoglobulin G 항체 또는 anti-rabbit immunoglobulin G 항체를 첨가하여 30분간 반응하였다. 위에서와 같이 PZBS, PBST를 바꾸어 가면서 membrane을 세척한 다음 membrane에 ECL 발색 시약을 첨가하여 반응시킨후 X-선 필름에 적정 시간 동안 노출시켰다. 이 감광된 필름의 수치적 데이터를 위하여 densitometer로 측정하였다 (Yen *et al.*, 1986).

결과 및 고찰

1. 사자발쑥의 추출공정별 추출 수율

Table 1은 사자발쑥의 증류수와 ethanol을 이용한 각 공정별 추출 수율을 나타낸 것이다. 초음파를 병행한 100 $^{\circ}$ C 물 추출물이 20.51%로 가장 높은 수율을 보였으며, 60 $^{\circ}$ C Ethanol 추출물이 5.83%로 가장 낮았다. 열수추출과 초음파 병행추출 모두에서 60 $^{\circ}$ C ethanol 추출에 비해 60 $^{\circ}$ C 물 추출이 약 2배, 100 $^{\circ}$ C 물 추출이 약 3배의 수율 향상을 나타내었다. 또 각각

Table 1. Comparison of extraction yields of *Artemisia princeps* Pamapanini according to extraction methods

Extraction process	Solvent	Yield (%)
Simple extract	Ethanol (60 $^{\circ}$ C)	5.83
	Water (60 $^{\circ}$ C)	10.4
	Water (100 $^{\circ}$ C)	16.6
Ultrasonification extract	Ethanol (60 $^{\circ}$ C)	7.2
	Water (60 $^{\circ}$ C)	13.06
	Water (100 $^{\circ}$ C)	20.51

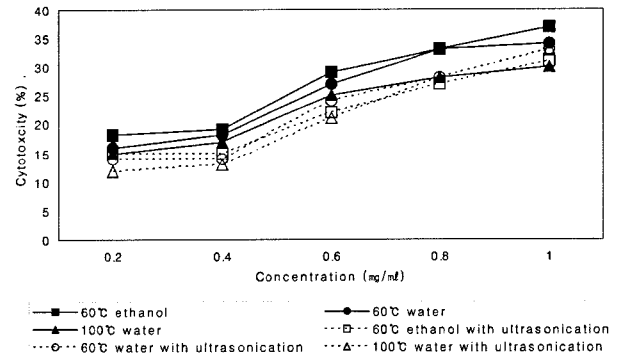


Fig. 1. Cytotoxicity of the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini against the human normal cell line (HEL299).

의 추출조건에서 초음파 병행추출이 일반 열수추출에 비해 약 1.2배 높은 추출 수율을 나타내었다. 이와 같은 추출 수율은 기존 사자발쑥 추출에 대한 연구가 없어 직접적인 비교는 불가하나 다수의 쑥 연구를 통해 알려진 쑥의 열수추출 수율 및 Lee 등이 보고한 사철쑥의 5~15% (Lee *et al.*, 2002)를 상회하는 결과로, 기존 열수 추출에 비하여 초음파 병행 추출의 수율이 높게 나타나는 것은 초음파 조사 시 용존 산소나 기포를 액외로 방출시키는 탈기현상이 일어나고 이들이 용매와 상호 작용하면서 상승작용을 일으키기 때문인 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2005a). 이런 상승작용으로 인하여 기존의 열수 추출보다 낮은 온도에서 더 효율적인 추출이 이루어져 초음파 병행 추출물의 수율이 높게 나타나는 것으로 판단되며, 따라서 초음파를 병행한 추출물에 보다 많은 활성성분이 함유되어 있을 것이 기대되어 이후의 실험을 진행하였다.

2. 인간 정상세포의 독성 측정 결과

Fig. 1은 인간 정상 폐 세포인 HEL 299에 대한 사자발쑥 추출물의 세포독성을 SRB방법으로 측정하여 나타낸 것이다. 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 최대 투여농도인 1.0 mg/ml에서 60 $^{\circ}$ C ethanol 추출물이 37%로 가장 높은 값을 나타내었다. 용매 및 온도조건별로는 60 $^{\circ}$ C ethanol 추출물이 다른 농도 조건에서도 가장 높은 세포독성을

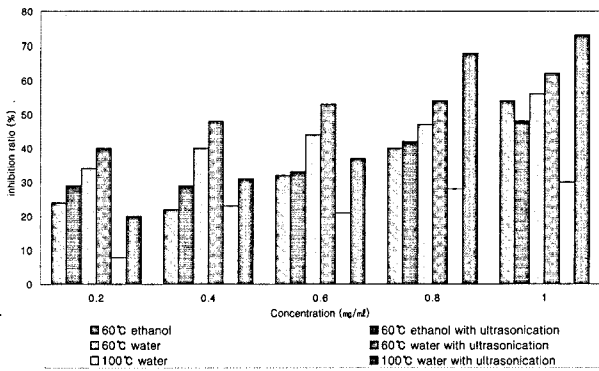


Fig. 2. Inhibition ratio of the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini against human cancer cell line, Hep3B.

나타내었으며 100°C 물 추출물이 대체적으로 낮은 세포독성을 나타내었다. 초음파를 병행한 추출물은 초음파를 병행하지 않은 각각의 조건보다 5~8% 낮은 값을 나타내었다. 위의 결과를 통해 최대 투여농도인 1.0 mg/ml 에서도 모든 조건의 추출물이 정상세포의 생존율을 65% 이상으로 유지시켜 사자발췌 추출물이 정상세포에 대한 안전성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포독성을 고려하여 사자발췌는 ethanol 보다는 물을 용매로 하여 100°C의 고온에서 추출하는 것이 좋을 것으로 생각되며, 초음파 병행 추출 공정을 통해 추출물의 세포독성 감소를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 암세포 생육 억제 활성 및 세포선택성 측정 결과

암세포 생육 저해 효과는 인간 폐암세포 (A549)와 위암세포 (AGS), 유방암 세포 (MCF7)와 간암세포 (Hep3B)를 이용하여 SRB 방법을 통해 측정하였다. 사용된 sample의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 조절하여 실험하였다. Fig. 2는 인간 간암세포인 Hep3B를 이용하여 사자발췌 추출물의 첨가를 통한 암세포 생육 억제 활성을 나타낸 것이다. 0.8과 1.0 mg/ml의 농도에서 초음파를 병행한 100°C 물 추출물이 각각 68%와 73%로 가장 높은 활성을 보였으나 이하의 농도에서는 20~37%로 다른 추출물과 비교하여 높은 활성을 나타내지 못하였다. 반면 초음파를 병행 추출한 60°C 물 추출물이 농도 의존적으로 40~62%의 활성을 나타냄으로서 모든 농도에서 대체적으로 높은 활성을 나타내었다. 반면 초음파를 병행하지 않은 100°C 물 추출물은 농도 유의적으로 8~30%의 활성을 보이며 가장 낮은 수치를 나타냈다.

Fig. 3과 Fig. 4는 각각 인간 폐암 세포인 A549와 인간 위암세포인 AGS에 대한 사자발췌 추출물의 암세포 생육억제 활성을 나타낸 것으로 두 결과 모두에서 100°C 물 추출의 초음파를 병행 추출물이 1.0 mg/ml의 농도에서 각각 60%와 70%의 최대 활성을 보이며 0.8과 1.0 mg/ml의 농도에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 100°C 물 추출물은 1.0 mg/ml에서 최

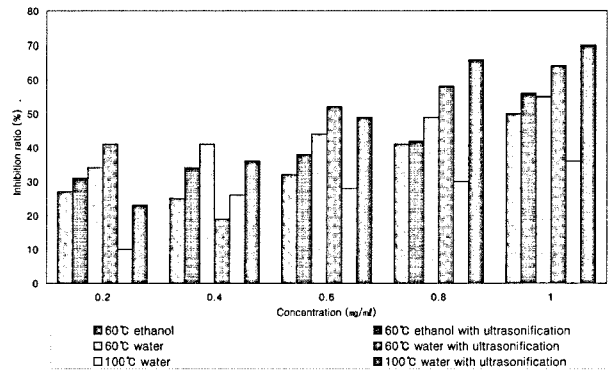


Fig. 3. Inhibition ratio of the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini against human cancer cell line, A549.

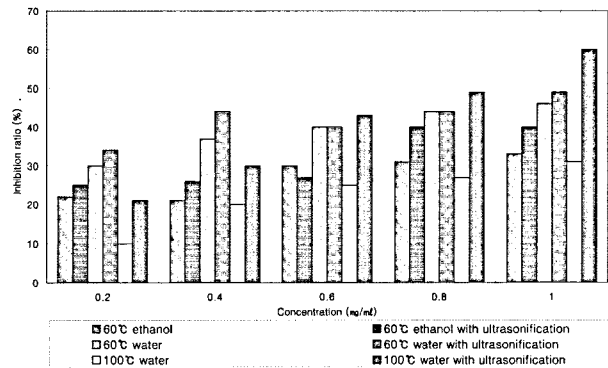


Fig. 4. Inhibition ratio of the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini against human cancer cell line, AGS.

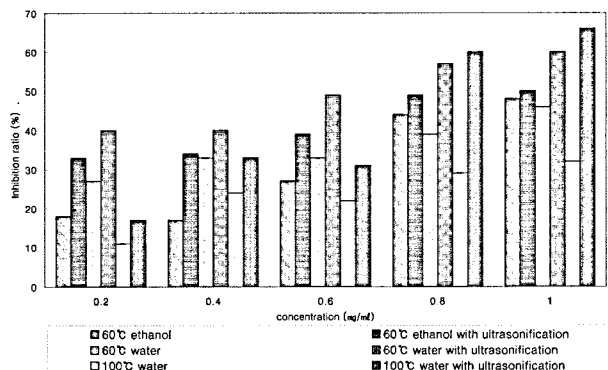


Fig. 5. Inhibition ratio of the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini against human cancer cell line, MCF-7.

대 36%의 활성으로 모든 농도에서 여전히 다른 추출물과 비교하여 낮은 수치를 나타냈다.

Fig. 5는 인간 유방암세포인 MCF-7을 이용하여 사자발췌 추출물의 암세포 생육 억제 활성을 나타낸 것이다. 그 결과 다른 암세포에서와 마찬가지로 0.8과 1.0 mg/ml의 농도에서 100°C 물 추출물의 초음파병행 추출물이 각각 60%와 66%로

가장 높은 억제 활성을 나타내었으나 이하의 농도에서는 17~31%로 다른 추출물과 비교하여 높은 활성을 나타내지 못하였으며, 반면 초음파를 병행 추출한 60°C 물 추출물이 농도 의존적으로 40~60%의 활성을 나타냄으로서 모든 농도에서 대체적으로 높은 결과를 나타내었다.

인간 암세포를 이용한 암세포 생육 억제 활성 실험을 사자발쑥 추출물은 8~56%의 암세포 생육 억제를 나타내었으며 모든 공정에서 초음파 병행 추출 공정을 통해 활성의 증가를 나타내어 일반 추출물과 비교하여 최대 43%의 활성 증가를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 Park과 Kim (2006)의 연구에서 보고한 쑥 추출물의 항암성 결과인 15~44%를 훨씬 상회하는 결과이다. 또한 0.8 mg/ml 이상의 농도에서 초음파를 병행한 100°C 물 추출물의 활성이 가장 높게 나타났으나 0.6 mg/ml 이하의 농도에서는 다른 추출물과 비교하여 높은 활성을 나타내지 못하였고, 반면 초음파를 병행한 60°C 물 추출물이 모든 농도에서 전반적으로 높은 활성을 나타냈으며, 100°C 물 추출물은 모든 농도에서 가장 낮은 활성을 나타낸 것도 확인할 수 있었다. 이로 미루어 볼 때 사자발쑥의 수용성 유용성분은 100°C 부근의 고온에서 변성 등을 통해 활성이 감소하지만 초음파 병행을 통해 변성의 회복 또는 공동화를 통한 유효성분의 추출 증가 기작이 있을 것으로 추측된다. 또한 0.6 이하의 농도에서는 그다지 활성을 갖지 않아 이를 통한 유용성분은 활성을 나타내기 위해 일정농도의 역치를 가지는 것으로 사료된다.

Fig. 6은 각 암세포에 대한 사자발쑥 추출물의 세포선택성을 평균하여 그래프로 나타낸 것이다. 암세포 억제 활성에서와 마찬가지로 100°C 물 추출의 초음파 병행 추출물이 1.75~2.43의 수치를 나타내며 0.8 mg/ml 이상의 농도에서 가장 높은 세포선택성을 나타냈으나 0.6 mg/ml 이하의 농도에서는 초음파를 병행한 60°C 물 추출물이 각각의 농도에서 1.36~4.33의 수치를 보이며 높은 세포선택성을 나타내었다. 또 모든 조건에서 초음파를 병행한 추출물이 그렇지 않은 추출물에 비해 0.5~1.0의 세포선택성 증가를 나타내었으며 실험결과에서도 초음파를 병행한 추출물이 대부분의 조건에서 1.5 이상의 수치를 나타냄으로서 초음파를 병행한 사자발쑥 추출물이 암세포를 선택적으로 사멸시키는 기작을 지닌 것을 확인하였다.

Fig. 7은 각 추출조건에 따른 추출물의 암세포 생육억제 활성을 평균하여 나타내었다. 세포 실험에서 투여 농도에 의한 차이가 있었으나 대체적으로 60°C 이상 100°C 미만의 온도에서 초음파를 병행한 물 추출물의 활성영역이 높게 나타났다. 따라서 사자발쑥의 효율적인 추출을 위해서는 암세포 억제 활성 및 세포선택성을 고려하여 물을 용매로 하여 60°C 이상 100°C 미만의 온도에서 초음파를 병행하여 추출하는 것이 바람직하다고 사료된다. 또한 사자발쑥 물 추출물이 60°C에서 암세포 생육 억제 활성을 나타내었으나 100°C에서 활성이 감소

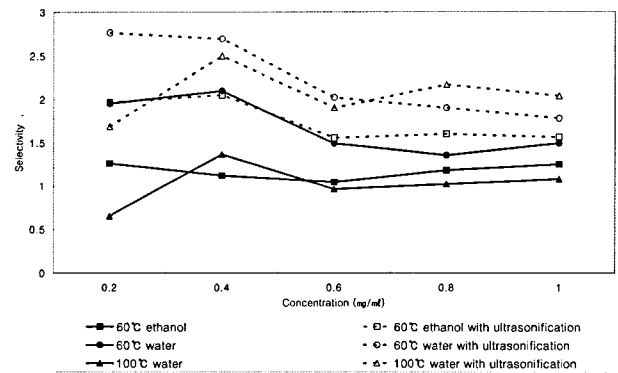


Fig. 6. Average selectivity of the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini on cancer cell lines.

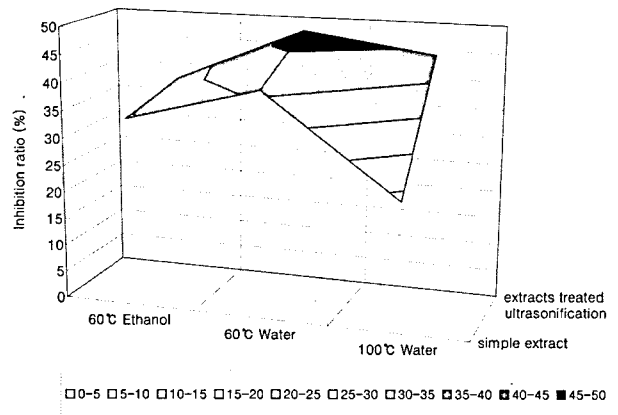


Fig. 7. Average inhibition ratio of the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini on the growth of human cancer cell lines according different conditions (ultrasonification, solvent and temperature).

하고 다시 초음파 병행을 통해 활성의 증가를 나타내는 것을 유용성분의 변성 때문인 것으로 추측하여 발암 유전자로 알려진 bcl-2의 단백질 발현에도 영향을 미치는지 알아보고자 다음 실험을 진행하였다.

4. Bcl-2 발현실험 결과

종양 발생 기전 중 세포 증식속도의 증가에 관한 연구는 비교적 많이 이루어진 반면 생리학적 세포사망 (physiological cell death)의 조절에 관한 연구는 최근에 들어서야 활발해지고 있다. 이런 생리학적 세포사망, 즉 cell suicide는 다양한 생물학적 환경에서 일어나며, 이때 나타나는 세포 내의 구조적 변화는 괴사현상 (necrotic process)과는 차이가 있다. Apoptosis로 불리는 이 기전 (Kerr et al., 1972)은 체내 여러 기관에서 일정한 수준으로 세포수를 유지하는 데 중요한 역할을 담당하고 있다.

Bcl-2는 18번 염색체에 위치하는 원형 발암 유전자 (proto-

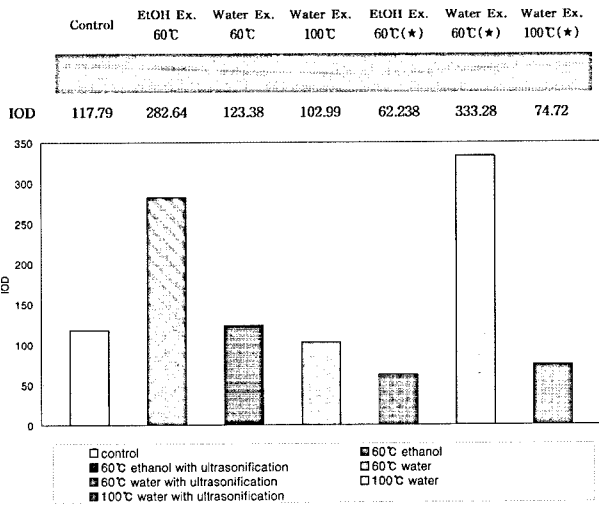


Fig. 8. Expressions of vcl-2 in Hel299 by the crude extracts of *Artemisia princeps* Pampanini. (★) with ultrasonification.

oncogene)로 apoptosis를 방해하여 세포의 생존을 연장시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있고 (Korsmeyer, 1992) 이 유전자의 산물인 bcl-2 단백질은 분자량이 26kDa으로 미토콘드리아의 내막에 위치한다고 하는데 (Hockenbery *et al.*, 1990) 최근 연구에서 bcl-2 단백질의 발현은 여러 종양 발생에 억제적 특성과 자극적 특성을 함께 가지는 것으로 나타나고 있다 (Castle *et al.*, 1993; Colombel *et al.*, 1993; Leek *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998). 즉 bcl-2는 c-myc 유전자와 공조하여 세포의 형질전환을 일으킬 수 있고 (Vaux *et al.*, 1998) 그 발현이 임파종, 백혈병, 신경아세포종, 전립선 암 등에서는 환자의 생존에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Yunis *et al.*, 1989; McDonnell *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 1993). 반면, bcl-2 양성인 폐암 및 유방암 환자의 생존율이 음성인 환자의 생존율보다 높다고 보고된 바 있다 (Pezzelia *et al.*, 1993; silvestrini *et al.*, 1994). 따라서 이 유전자의 과발현은 정상적인 apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시키며 이런 비정상적인 수명연장은 종양발생에 필수적인 여러 가지 유전적 또는 환경적인 영향들을 축적시켜 암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Clark, 1991; Lee *et al.*, 1999).

본 연구에서는 인간 정상 신장 세포인 HEK 293을 이용하여 각 추출물 첨가가 bcl-2 발현에 미치는 영향을 검토하였으며, densitometer를 이용하여 IOD값을 측정함으로써 bcl-2의 발현량을 정량적으로 비교하였다.

Bcl-2 발현 및 측정량은 Fig. 8에 나타내었다. 100°C 물 추출물이 333.28의 IOD 수치를 나타내며 가장 높은 값을 나타내었으며, 초음파를 병행한 100°C 물 추출물이 74.222로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 이는 암세포 생육 억제 결과와 비슷한 양상으로 bcl-2의 발현이 종양 발생에 자극적 특성을 가지

는 것을 뒷받침하는 것이다. 또한 초음파를 병행한 추출물이 초음파를 병행하지 않은 추출물에 비해 40에서 최대 250까지 적은 IOD 값을 나타냄에 따라 초음파 병행 공정이 암 발생 기작에 관여하는 단백질의 변성과 상관관계가 있음을 추측해 볼 수 있다. 따라서 초음파 병행을 통한 추출 공정에서의 bcl-2의 발현 증가 억제에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Bcl-2의 기능은 종양 억제 유전자인 p53에 의해 상당한 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 최근에는 bcl-2의 발현이 세포 내 p53의 축적을 지연 및 감소시킨다는 사실이 종양 세포 항암화학요법 중 밝혀진 바 있다. 또한 많은 연구에서 p53 유전자와 bcl-2 유전자가 발현함에 있어 서로 길항적 작용을 하고 있음을 보고하고 있다. 이러한 현상은 정상 세포 조직뿐만 아니라 종양세포에서도 확인되었다. 본 연구에서는 p53의 발현 여부를 알아보지 않았지만, p53과 bcl-2 간의 상호작용을 고려할 때 bcl-2의 발현에 관련한 인자로서의 역할을 더욱 객관화하기 위해서는 p53의 분석이 동시에 이루어지는 연구가 필요하다고 사료된다.

적 요

중류수 및 Ethanol을 용매로 하여 온도 (60, 100°C) 및 초음파 병행 조건을 달리한 사자발쑤의 추출에서 초음파를 병행한 100°C 열수 추출이 20.51%로 가장 높은 수율을 나타냈다. 또한 60°C 및 100°C 열수 추출이 60°C ethanol 추출에 비해 각각 2배, 3배 정도의 수율 향상을 나타내었으며, 각각의 추출 조건에서 초음파를 병행한 추출이 일반 열수 추출과 비교하여 약 20% 높은 수율을 나타내었다. 인간 정상세포를 이용한 사자발쑤의 세포독성 실험에서 60°C ethanol 추출물의 세포독성이 가장 높게 나타났으며 100°C 물 추출물의 세포독성이 대체적으로 낮게 나타났다. 또한 초음파를 병행한 추출물이 초음파를 병행하지 않은 각각의 조건에 비해 5~8% 낮은 세포독성을 나타내었다.

인간 암세포를 이용하여 사자발쑤 추출물의 첨가를 통한 암세포 생육 억제 활성 측정 결과를 통해 0.8 mg/ml 이상의 농도 조건에서 초음파를 병행한 100°C 물 추출물이 최고 73%의 억제 활성을 나타내며 가장 높은 활성을 나타내었고, 60°C 물 추출물의 초음파 병행 추출물이 농도 의존적으로 40~62%의 활성을 나타냄으로서 모든 농도조건에서 대체적으로 높은 활성을 나타내었다. 또한 각각의 조건에서 초음파를 병행한 추출물의 암세포 억제 활성이 초음파를 병행하지 않은 열수 추출물에 비해 최대 110% 까지 증진된 것을 확인할 수 있었다. 세포선택성에서도 모든 조건에서 초음파를 병행한 추출물이 병행하지 않은 일반 열수 추출물에 비해 증가된 세포선택성을 나타냈다.

암 발생 기작을 알아보기 위한 bcl-2 발현 실험에서 100°C 물 추출물의 IOD 수치가 가장 높게 나왔으나 초음파를 병행 을 통해 감소하여 가장 적은 수치를 나타냄에 따라 초음파 병행 공정을 통해 열수 추출 공정 및 용매에 따른 암 발생 관련 성분의 발현을 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 사자발쑥의 효율적인 추출을 위해서 60°C 이상 100°C 미만의 온도에서 물을 용매로 하는 것이 바람직하며, 초음파 병행 공정을 통해 수율 향상 및 세포독성의 저해는 물론 암세포 생육 억제 활성의 증진을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

농촌진흥청 바이오그린21 사업에 의해 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 포함합니다.

LITERATURE CITED

- Campos L, Rovulult JP, Sabido O** (1993) High expression bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 18:3091-3096.
- Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J** (1993) Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, In neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J. Pathol.* 143:1543-1550.
- Choi BB, Lee HJ, Bang SK** (2004) Studies on Amino Acid, Sugar Analysis and Antioxidative Effect of Extracts from *Artemisia* sp. *Korean J. Food & Nutr.* 17(1):86-91.
- Chung K, Kim WI, Hong IK, Park KA** (2000) Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Applied Chemistry.* 4(2):149-152.
- Clark WH** (1991) Tumor progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer.* 64:631-644.
- Colombel M, Symmans F, Gil S** (1993) Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone refractory human prostate cancers. *Am. J. Pathol.* 143:390-400.
- Hockenbery D, nunez G, Milliman C** (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336.
- Hwang YK, Kim DC, Hwang WI, Han YB** (1998) Inhibitory effect of *Artemisia princeps* Pampan. extract on growth of cancer cell line. *Korean J. Nutrition* 31(4):799-808.
- Kerr JF, Willie AH, Currie AR** (1972) Apoptosis; a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. cancer* 26:239-257.
- Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee HY** (2005) Enhancement of immune Activities of Ephedrae Herba and Rubi Fructus at Low Temperature Extraction. *Korean J. medicinal Crop Sci.* 13(3):81-86.
- Kim JH, Kim DH, You JH, Kim CH, Kwon MC, Seong NS, Lee SE, Lee HY** (2005) Immuno-regulatory Activities of Various Fractions from Ephedrae Sinica STAPF, Rubus Coreanus Miq. and Angelica gigas Nakai Extracts with Ultrasonification. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(4):161-170.
- Kim KJ, Do JR, Kim HK** (2005) Antimicrobial, Antihypertensive and Anticancer Activities of Garlic Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(2):228-232.
- Kim SJ, Shin SS, Seo BI, Jee SY** (2004) Effect of Mountain Grown Ginseng Radix, Mountain Cultivated Ginseng Radix, and Cultivated Ginseng Radix on apoptosis of HL-60 cells. *Kor. J. Herbology* 19(2):41-50.
- Kim WI, Chung KW, Lee SB, Hong IK, Park KA** (2001) Ultrasound energy effects on solvent extraction of amaranth seed oil. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 12(3):307-311.
- Korsmeyer** (1992) Bcl-2 indicates a new category of oncogenes; Regulations of cell death. *Blood* 80:879.
- Lee DH, Kim JH, Huh JR, Kim DJ, Kim YM, Kim YT, Nam JH, Mok JE** (1998) Expression and Prognostic Significance of bcl-2 in Epithelial Ovarian Tumors. *Korean J. Obstetrics and Gynecology* 41(5):1304-1314.
- Lee H, Lin JY** (1988) Antimutagenetic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat. Res.* 204(2):229-234.
- Lee JM, Cho HI, Kang JS** (1999) The Studies for Usefulness of Overexpression of bcl-2, p53 Gene and Apoptosis as a Response Predictor to neoadjuvant Chemotherapy in Cervical Cancer. *Korean J. Obstetrics and Gynecology* 42(5):1096-1101.
- Lee MK, Lee HY, Lee JH, Oh JS, Chio GP, Kim JH, Kim JD** (2002) Anticancer Effect of *Sorbus commixta* Hedl Extracts. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 10(5):403-408.
- Leek RD, Kakkamanis L, Pezzela F** (1994) Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumors and in situ cancer. *Br. J. Cancer* 69:135-139.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM** (1989) Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57:79-88.
- Oh TY, Ahn BO, Ko JI, Tyu BK, Son MW, Kim SH, Kim WB, Lee EB** (1997) Studies on protective Effect of DA-9601, an *Artemisiae* Herba Extract, against Ethanol-induced Gastric mucosal Damage and its Mechanism. *The J. Applied Pharmacology* 5(2):202-210.
- Park CS, Kim ML** (2006) Functional properties of Mugwort Extracts and Quality Characteristics of Noodles Added mugwort Powder. *korean J. Food Preserv.* 13(2):161-167.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY** (2004) Improvement of Anticancer Activation of Ultrasonificated Extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* stapf, *Rubus coreanus* miq. and *Artemisia capillaris* Thunb. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 12(4):273-278.
- Pezzelia F, Turley H, Kuzu I** (1994) Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 329:690-694.
- Rubinstein, LV, Shoemaker RH, Boyd MR** (1990) Comparison of *in vitro* anticancer drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1113-1118.
- Ryakhovskaya TV, Ushbaeva GG, Zhemaletdinov FG** (1989) The antitumor activity of phenol compounds from some

- Artemisia* spp L. Rastit. Resur. 25(2):249-253.
- Shin DH, In JG, Yu SR, Choi KS** (2005) Investigation of Medicinal Substance from in vitro Cultured Cells and leaves of *Artemisia princeps* var. *Orientalis*. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 13(3):69-76.
- Silvestrini R, Veneroni S, Diadone MG** (1994) The bcl-2 protein; a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. 86:49-504.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM** (1988) Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalizepre-B cells. Nature 335:440-442.
- Xu Q, mori H, Sakamoto O, Uesugi Y, Koda A** (1989) Immunological mechanism of antitumor activity of some kinds of crude drugs on tumor necrosis factor production. Int. J. Immunopharmacol. 11(6):607-614.
- Yen Y, Guernsey DL** (1986) Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. Cancer Res. 46:4156-4161.
- Yunis J, mayor M, Arnesen M** (1989) Bcl-2 and other genomic alternations in the prognosis of large-cell lymphoma. N Engl. J. Med. 320:1047-1054.