

## 사철쭉의 HeLa 세포고사 효과\*

이형자<sup>1)</sup> · 김기환<sup>2)</sup> · 박종근<sup>3)</sup> · 황은희<sup>2)§</sup>

한국식품공업협회 식품연구소,<sup>1)</sup> 원광대학교 식품영양학과,<sup>2)</sup> 원광대학교 생명과학부<sup>3)</sup>

### Effects of *Artemisia Capillaris* Thunberg on Apoptosis in HeLa Cells\*

Lee, Hyoung Ja<sup>1)</sup> · Kim, Kee Hwan<sup>2)</sup> · Park, Jong Kun<sup>3)</sup> · Hwang, Eun Hee<sup>2)§</sup>

Korea Foods Industry Association,<sup>1)</sup> Korea Advanced Food Research Institute, Seoul 137-061, Korea

Division of Biological Science,<sup>2)</sup> Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Department of Food and Nutrition,<sup>3)</sup> Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

#### ABSTRACT

This study analyzes the apoptosis of HeLa cells to see if we can use the *Artemisia capillaris* Thunberg for the prevention of chronic degenerative diseases. We used the HeLa cells to see what effects the *A. capillaris* Thunberg had on apoptosis of the cancer cells. We checked the cell activity, cell morphological change, DNA fragmentation, and DNA content after administering 0, 100, 500, 1000, and 2000 µg/ml methanol, ethyl acetate, n-butanol extract of the *A. capillaris* Thunberg. As for the cell viability, the increase of concentration of methanol and ethyl acetate decreased the survival rate of the cell, but the phenomenon was much weakened in n-butanol extract and was not observed in aqueous extract. The higher the density of the methanol, ethyl acetate, n-butanol and aqueous extract was, the lower the survival rate of the HeLa cell was. These extracts obstructed the cell cohesion and caused the blebbing of the cell membrane and fragmentation of the nucleus, both of which are symptoms of apoptosis. Laddering-pattern DNA fragmentation was observed in the groups that were treated with the 1000 µg/ml and 2000 µg/ml of methanol extract. The DNA content of the cells apoptosis measured by fluorescent-activated cell sorter (FACS) increased as the density of the methanol, ethyl acetate and butanol extract increased. The result of the study shows that *A. capillaris* Thunberg fosters the apoptosis of HeLa cells, which suggests that the *A. capillaris* Thunberg has a great potential value as food additives, medicinal supplements for patients with chronic diseases, and preventive measures against cancer. (Korean J Nutr 2008; 41(1): 22~30)

KEY WORDS : *Artemisia capillaris* thunberg, apoptosis, HeLa cells.

#### 서 론

쭉은<sup>3-4)</sup> 한국을 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 및 유럽 등에 분포하고, 번식력이 강한 다년생 초본으로 국화과 (Compositae) 쭉 속 (*Artemisia*)에 속하며, 약 400여종의 국화과 식물 중 350여종이 우리 나라에 생육하고 있다. 쭉은 단군신화에 등장하는 친숙한 식물로 사용부위는 잎, 전초 (잎과 줄기), 꽃, 종자, 뿌리이며 생쭉이나 건조쭉으로 사용된다.<sup>2)</sup> 쭉의 생약명은 인진 (茵陳)으로<sup>3,4)</sup> 민간에서는 인진쭉으로 불리며, 사철쭉 (*A. capillaris*), 더위지기 (*A. iwayomogi*),

털산쭉 (*A. sacrorum* subsp. *manshuric* K.), 흰산쭉 (*A. sacrorum* var. *vestita*), 비쭉 (*A. scoparia* W. et K.), 제비쭉 (*A. angustissia*) 등으로 분류되지만 식물학자들의 관점으로 는 형태학적 특징, 돌연변이에 따라 아종과 변종으로 분류되고 이에 따른 의견이 다양하며, 인진은 특히 황달, 간염, 간경화, 간기능 항진에 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있어 일 반쭉과는 구별하고 있다. 현재 건강보조식품 등으로 가장 많이 사용되는 것은 더위지기로서<sup>5)</sup> 다른 종류보다 향이 좋기 때문이다. 본 실험에 사용한 사철쭉은<sup>5)</sup> 전국의 낮은 지대 냇가의 모래땅이나 길가의 빈터에서 자생한다. 높이는 30~100 cm로 8~9월에 노란색 꽃을 피우고, 9~10월이 결실 기이다. 처음에는 연한 털로 덮여 있다가 더부룩한 포기를 이루고 밑부분에 목질 (木質)이 발달하여 나무처럼 되고 가지가 많이 갈라진다.

인체에 대한 쭉의 효능은 간장질환,<sup>6)</sup> 부인과질환,<sup>7)</sup> 신경관절질환,<sup>8)</sup> 위장계질환,<sup>9)</sup> 피부질환,<sup>7)</sup> 혈액심혈관계질환,<sup>6)</sup> 호

접수일 : 2007년 8월 27일

채택일 : 2008년 1월 3일

\*This research was supported by 2006 grant from Wonkwang University.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : ehhwang@wku.ac.kr

흡기계질환,<sup>6,7)</sup> 통증완화,<sup>9,10)</sup> 건강증진 및 기타질환,<sup>11,12)</sup> 항염증 및 진통효과,<sup>13)</sup> 당뇨병 및 고혈당증의 치료<sup>14)</sup> 생체내 지질의 산화억제, 항세균 및 항진균 효과가<sup>15)</sup> 보고 되었다.

쑥이 암발생에 미치는 영향에 대한 연구로는 Park 등<sup>16)</sup>이 쑥 (*A. princeps*), 황해쑥 (*A. argyi*), 사철쑥 (*A. capillaris*), 덩불쑥 (*A. rubripes*), 구와쑥 (*A. laciniata*)의 부탄올 추출물에서 Aflatoxin B<sub>1</sub>에 강한 항돌연변이성을 보고하였다. Hwang 등<sup>9)</sup>은 쑥의 물 또는 알코올 추출 성분이 혈액성암, 결장암, 간암 세포에서 세포성장억제 효과를 나타낸다고 하였다. Ham 등<sup>17)</sup>은 더위지기가 알코올 추출물, 생즙, 물 추출물 순으로 폐암세포, 유방암세포, 섬유육종암세포, 위암세포의 증식억제에 효과가 좋았다고 보고하였다. Koshihara<sup>18)</sup>는 덩불쑥 (*A. rubripes Nakai*)에서 분리한 caffeic acid, eupatilin, dimethyl-eupatilin이 유방종양세포 5-lipoxygenase의 활성을 억제한다고 하였다.

선행연구에서 사철쑥의 성분분석과<sup>21)</sup> 혈액 및 간조직의 지질조성에 미치는 효과를<sup>22)</sup> 알아본 것을 토대로 하여 본 연구에서는 사람 상피암세포주인 HeLa cell의 세포고사에 미치는 효과를 알아보려고 세포생존율, 세포형태, DNA분절, DNA함량을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 사철쑥 시료의 제조

사철쑥 (*A. capillaris*)은 전라북도 완주군 동상면 소양마을 부근에서 자생하는 것을 채취하였다. 이것을 증류수로 행군 후 동결건조 하였고 35 mesh (500 μm)크기로 분쇄한 후 실험재료로 하였다.

사철쑥의 추출은 Fig. 1에 나타내었다.

분쇄한 사철쑥분말 1,000 g을 실온상태에서 시료중량의 3배의 85% 메탄올을 가하고 24시간 3회 추출 후, 감압여과 장치에서 여과하였다. 여과액을 감압농축하여 메탄올 추출물 (105.76 g)을 얻었다. 이것을 물에 현탁한 후 헥산으로 3회 반복 추출하고, 추출액을 무수망초로 탈수시켜 여과, 감압농축하여 헥산 추출물 (31.16 g)을 얻었다. 계속하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올에 순차적으로 같은 방법으로 용매분획하여 각각 18.61, 8.43, 9.85 g과 잔류 수층액 25.95 g을 얻었다.

### 사철쑥 추출물의 세포고사에 대한 효과

#### 세포 배양

인체 자궁경부 상피암 세포주 (Human cervix epitheloid carcinoma cell (Name of cell line: HeLa, Species: human,

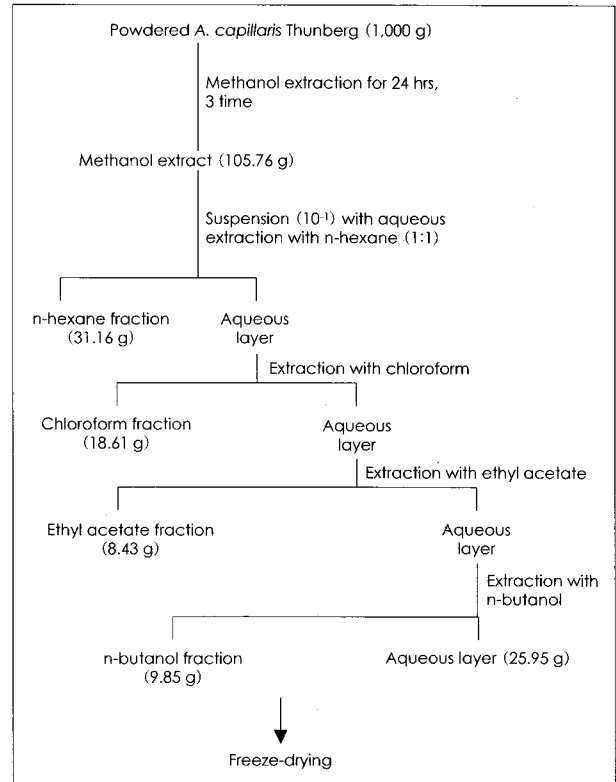


Fig. 1. Extraction and fractionation of *A. capillaris* Thunberg.

female, 31 years old, black, Tissue: cervix, uterine, Morphology: epithelial, Histopathology: adenocarcinoma, HeLa cell)인 HeLa cell은 한국세포주 은행 (KCLB, 서울)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위해 CO<sub>2</sub> 세포배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD, USA)이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 배양하였다. 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하며, 성장안정기에 있는 세포에 사철쑥의 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 2 μg/ml 녹여, 24시간 후에 세포의 고사 현상과<sup>19,20)</sup> 이에 연관된 분자세포학적 실험을 하였다.

#### 세포생존율 측정

세포생존율은 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을<sup>23-25)</sup> 하였다. 세포배양판 (96 well plate)에 200 μl씩 분주하여 24시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기 안에서 안정화시킨 후 세포에 MTT (Sigma Co, St. Louis, USA)를 100 μl/ml씩 첨가하였다. 세포활성은 24시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출에 의하였다. DMSO를 50 μl씩 분주한 후 세포배양기에서 30분 동안 방치한 다음 ELISA 분석기 (VERSA

max microplate reader, Molecular Devices, Germany) 로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포형태 변화

세포형태변화를 보기 위하여 60 mm dish에 각각  $1 \times 10^5$ 의 HeLa 세포를 분주한 후 24시간동안 배양한 후 사철썩의 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물을 각각 0, 100, 500, 1,000 및 2,000  $\mu$ l를 가하였다. 24시간 후에 각 농도별 사철썩 추출물에 대한 세포의 형태 변화를 광학현미경 (Leica Leitz DM RT, Leica, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

### DNA 분절

세포고사의 확인 방법중 하나인 DNA분절분석은<sup>26)</sup> 다음과 같이 수행하였다. 대략  $1 \times 10^5$ 의 HeLa 세포를 60 mm dish에 각각 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포정상 배양액에 사철썩 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물을 각각 0, 100, 500, 1,000 및 2,000  $\mu$ l 가하였다. 24시간 후에 세포를 수거한 후 원심분리 (13,000 rpm, 7 min, 4°C)하여 생리식염수 (phosphate-buffered saline: PBS)로 세척하여 상층액을 제거한 후에 2 ml의 extraction buffer (Tris-HCl 0.5 ml, EDTA 10 ml, SDS 2.5 ml)를 37°C에서 3시간동안 처리하여 세포를 용해시키고, proteinase K (20 mg/ml) 40  $\mu$ l를 첨가하여 50°C에서 3시간 동안 배양하였다. 이 혼합물에 phenol chloroform-isoamylalcohol 1 ml을 첨가하여 가볍게 세포를 풀어준 후 원심분리 (13,000 rpm, 7 min, 4°C)하여 새 튜브에 상층액을 취하였다. 무수에탄올 6 ml을 넣고 -70°C에 30분이상 방치 후 원심분리 (13,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상층액을 버린 후 70% 에탄올 2 ml로 세척하여 원심분리 (13,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 진공 건조 시켰다. 여기에 50  $\mu$ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)와 pancreatic RNAase (20  $\mu$ g/ml)를 1  $\mu$ l가하여 DNA pellet을 용해한 후 2% agarose gel에서 Tris-acetate buffer [TAE: 0.04 M Tris-

acetate 0.001M EDTA (pH 8.0)]로 2시간 (30 V) 전기 영동하여 자외선 (UV transilluminator)하에서 DNA 분절을 관찰하였다.

### DNA 함량

DNA 함량<sup>26)</sup>은 형광물질 propidium iodide (PI: 1 mg/ml RNase: 50  $\mu$ g/ml, propidium iodide, 0.1% Triton-X 100, in 3.8 mM sodium citrate)를 이용하였다. 60 mm dish에  $1 \times 10^5$ 의 HeLa 세포를 분주한 후 24시간동안 배양한 후 세포를 수거하여 생리식염수로 두 번 세척하고 원심분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 70% 에탄올 200  $\mu$ l로 세포를 가볍게 풀어주고 4°C에서 10분간 방치한 후 원심분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상층액을 버린 후 생리식염수로 두 번 세척 후 원심 분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 다시 상층액을 버린 후 PI 200  $\mu$ l로 현탁하여 고사된 세포의 DNA 함량을 유세포분석기 (fluorescent-activated cell sorter FACS (Flow cytometry), Bacton Dickinson Co. USA)로 확인 분석하였다.

### 통계분석

실험에서 얻은 결과는 통계프로그램인 Statistical package for the social sciences (SPSS ver. 11.0)를 사용하여, 3회 반복 분석한 평균값과 표준오차 (Mean  $\pm$  Standard error)를 계산하였으며 실험군과 대조군의 평균값에 대한 p-value를 t-test로 구하여 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 사철썩 추출물의 세포고사에 대한 효과

#### 세포생존율 측정

사철썩의 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 추출물이 HeLa 세포의 세포생존율을 측정된 MTT분석결과는 Table 1

**Table 1.** MTT assay of HeLa cells exposed for 24 hr to various concentrations of methanol, ethyl acetate, n-butanol, aqueous fraction of *A. capillaris* Thunberg

Concentration ( $\mu$ g/ml)	Methanol extract	Ethylacetate fraction	Butanol fraction	Acqueous fraction
Control	100.17 $\pm$ 3.72	100.09 $\pm$ 4.62	100.09 $\pm$ 5.62	100.09 $\pm$ 3.62
10	94.10 $\pm$ 2.20	100.54 $\pm$ 4.98	100.34 $\pm$ 2.78	100.49 $\pm$ 4.96
50	93.32 $\pm$ 4.76	90.93 $\pm$ 4.86	95.10 $\pm$ 3.88	98.74 $\pm$ 3.92
100	82.89 $\pm$ 4.29	91.98 $\pm$ 3.02	96.16 $\pm$ 1.67	98.29 $\pm$ 4.06
500	78.45 $\pm$ 3.58*	88.69 $\pm$ 4.76	94.70 $\pm$ 2.53	96.09 $\pm$ 6.62
1000	50.15 $\pm$ 5.18**	76.16 $\pm$ 3.08*	88.10 $\pm$ 3.88	94.09 $\pm$ 5.85
1500	27.30 $\pm$ 3.82***	52.54 $\pm$ 4.94**	80.58 $\pm$ 5.04	96.10 $\pm$ 7.48
2000	20.74 $\pm$ 1.92***	44.10 $\pm$ 3.45**	68.80 $\pm$ 5.82*	92.98 $\pm$ 6.56

Data show mean  $\pm$  S.E. in triplicate. Cells were pretreated with various diluted concentrations of *A. capillaris* Thunberg. for 1 day and cell viability was determined by the MTT assay. \*: p<0.05, \*\*: p<0.005, \*\*\*: p<0.001: significantly different from the control

에 나타냈다.

메탄올 추출물 500  $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서도 HeLa 세포의 생존율에 미비한 변화가 보이기 시작하며, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 50%의 생존율을 보였고, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 은 20%의 생존율을 보였다. 이러한 경향은 에틸아세테이트 추출물에서도 비슷한 현상을 보였으나 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 76%의 생존율을 보였고, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 생존율이 44%였다. 반면에 부탄올 추출물에서는 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 88%, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 68%의 생존율을 보였다. 물 추출물에서의 세포생존율은 1,000, 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 94, 92%로 거의 영향을 미치지 못하였다.

본 실험의 결과에서는 사철쭉의 메탄올, 에틸아세테이트 추출물이 높은 암세포 독성 활성을 나타내었기 때문에 암세포에 생존률을 억제시키는 것을 확인 할 수 있었다.

**세포형태 변화**

사철쭉 추출물에 의한 세포형태 변화는 Fig. 2에 나타내었다.

메탄올 추출물 (B~E)과 에틸아세테이트 추출물 (G~J)에 처리 배양된 HeLa 세포는 정상배지에서 배양된 세포와 비교하였을 때 농도의존적으로 세포 부착상태를 유지 못하여 세

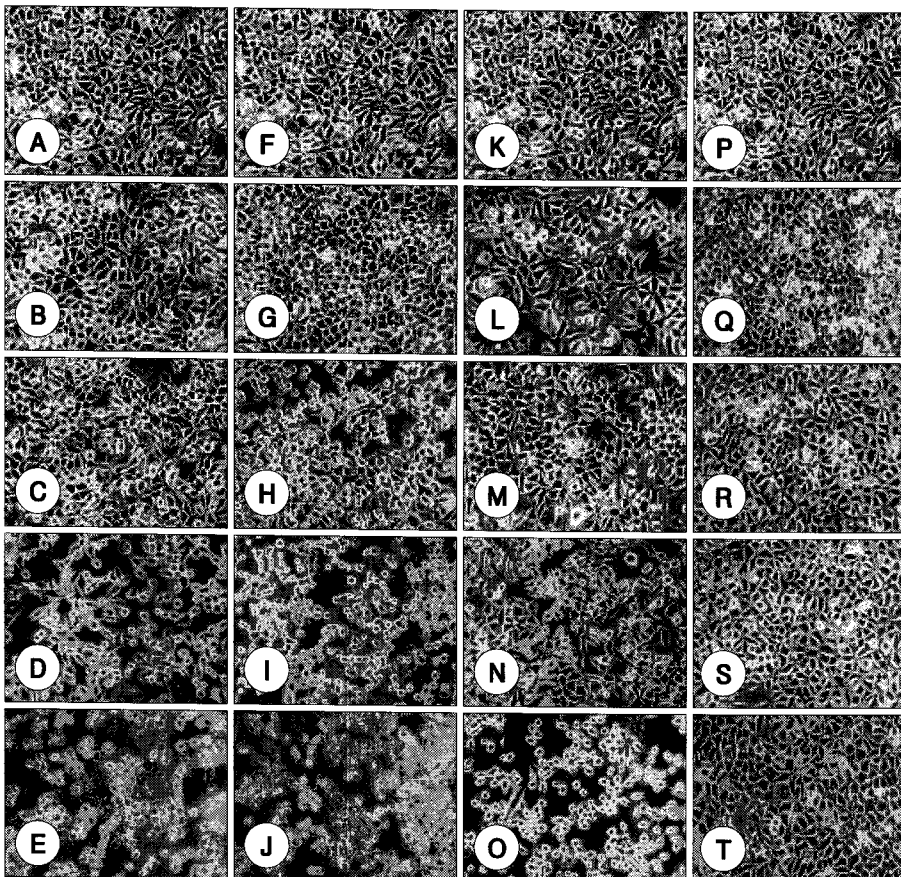
포수의 감소를 확인 할 수 있었다. 추출물의 농도증가에 따라 세포막의 수축과 수포형성 (blebbing) 및 핵의 분절화 등 세포고사의 전형적인 특징들이 관찰되었으나 본 지면의 사진 상으로는 뚜렷하지 않다. 이러한 현상은 부탄올 추출물 (L~O)에서는 그 정도가 약화되었으며, 물 추출물 (Q~T)에서는 아주 미약하게 관찰되었다. 그러므로 사철쭉 추출물의 HeLa 세포에 대한 세포수의 감소는 메탄올과 에틸아세테이트 추출물에서 큰 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 사철쭉의 메탄올, 에틸아세테이트 추출물이 암세포의 증식을 효과적으로 억제시키는 것으로 여겨진다.

**DNA 분절**

배양된 HeLa 세포에서 사철쭉의 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물에 의한 세포고사 현상적 특징의 하나인 사다리형 (ladder-pattern) DNA 분절 현상을 Fig. 3-5와 같이 확인하였다.

배양된 HeLa 세포에 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물을 각각 0, 100, 500, 1,000 및 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 로 24시간 처리 후 DNA를 추출한 후 2% agarose gel에 전기영동하여 DNA 분절현상을 관찰한 결과, 메탄올 추출물 1,000, 2,000



**Fig. 2.** Morphological change of HeLa cells exposed for 24 hrs to various concentrations of different fraction of *A. capillaris* Thunberg. Fractions: B-E: methanol, G-J: ethyl acetate, L-O: n-butanol, Q-T: aqueous. Concentrations: 0  $\mu\text{g/ml}$  (A, F, K, P), 100  $\mu\text{g/ml}$  (B, G, L, Q), 500  $\mu\text{g/ml}$  (C, H, M, R), 1000  $\mu\text{g/ml}$  (D, I, N, S), 2000  $\mu\text{g/ml}$  (E, J, O, T).

μg/ml농도에서 DNA 분절이 관찰되었다.

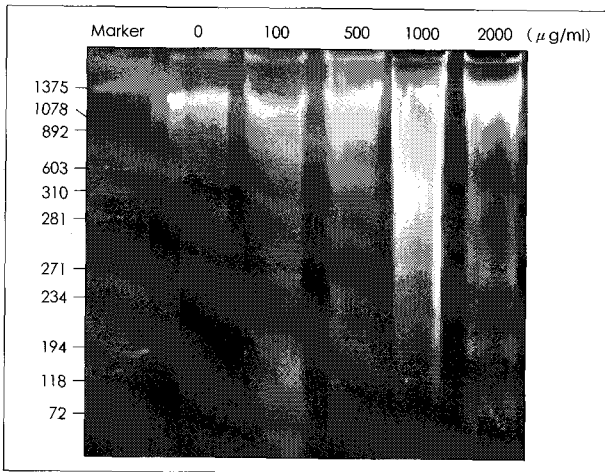
이상의 결과 사철쭉의 메탄올, 에틸아세테이트 추출물이 HeLa 세포의 생존률을 저하시키며, HeLa 세포의 죽음은 세포고사 기전에 의함이 밝혀졌다. 또한 메탄올 추출물에 의한 HeLa 세포의 세포고사 현상은 사철쭉의 각 용매분획의 농도에 의존적임을 알 수 있었다.

**DNA 함량**

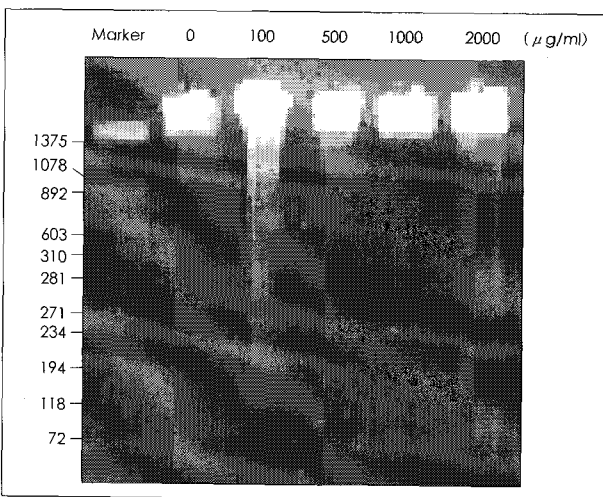
Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 의한 세포고사의 FACS

**Table 2.** Apoptotic HeLa cells population upon exposure to DMSO for 24 hr

DMSO (μg/ml)	Sub G1 cell population (%)
0	0
2	5.5
4	6.1



**Fig. 3.** DNA fragmentation of HeLa cells exposed for 24 hrs to various concentrations of methanol fraction of *A. capillaris* Thunberg.



**Fig. 4.** DNA fragmentation of HeLa cells exposed for 24 hrs to various concentrations of ethyl acetate fraction of *A. capillaris* Thunberg.

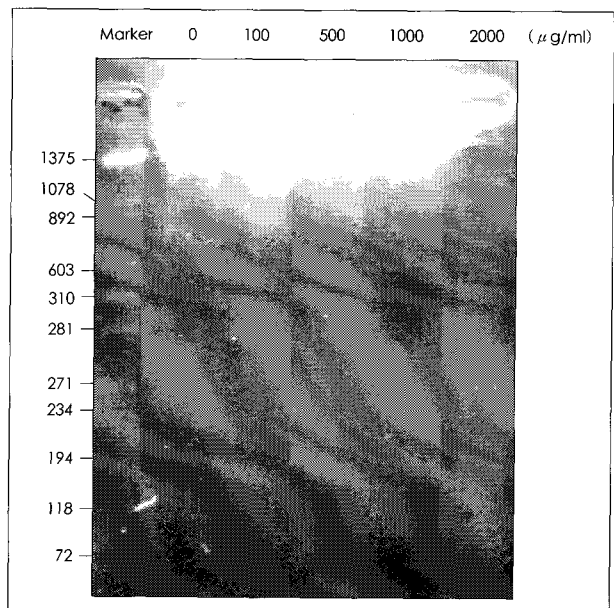
분석. 각 용매 추출물을 용해시킨 DMSO가 HeLa 세포에 미치는 영향은 Table 1과 Fig. 6에 나타내었다.

DMSO에 의해 영향 받은 세포집단 전체에 대하여 고사세포의 비율은 Fig. 6과 같이 DMSO 2 μg/ml, 4 μg/ml 처리군에서 약간 증가하였다. 이 FACS 결과에서 세포고사로 보이는 sub G1 세포집단의 전체세포에 대한 비율을 측정할 결과는 Table 1로서 대조군 0 μg/ml에서는 세포고사가 일어나지 않았으나, 각 2, 4 μg/ml처리군 (B와 C)에서 각각 5.54, 6.19%로 HeLa 세포의 고사에 미치는 영향은 미비하였다.

사철쭉 추출물에 의한 세포주기분석. 사철쭉의 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물에 의한 세포죽음의 기전이 세포고사에 의하여 매개될 가능성이 제시되었기에 세포주기를 분석하기 위하여 형광물질인 propidium iodide (PI)를 이용하여, 고사된 세포의 DNA 함량을 FACS를 통하여 확인한 결과는 Fig. 7-9와 같다.

메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물을 각각 0, 100, 500, 1,000 및 2,000 μg/ml로 처리하여 24시간 후 세포를 수거하여 확인하였다. 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물의 FACS 결과에서 세포고사를 나타내는 sub G1 세포의 전체 세포에 대한 비율은 Table 3과 같다.

세포주기조절이 가장 현저하게 일어난 것은 메탄올 추출물로 1,000, 2,000 μg/ml의 경우 각각 68.5, 84.5%의 세포고사율을 보였고, 에틸아세테이트와 부탄올추출물의 1,000, 2,000 μg/ml의 경우 각각 55.5, 82.0, 23.6, 59.2%로 나타났다.



**Fig. 5.** DNA fragmentation of HeLa cells exposed for 24 hrs to various concentrations of n-butanol fraction of *A. capillaris* Thunberg.

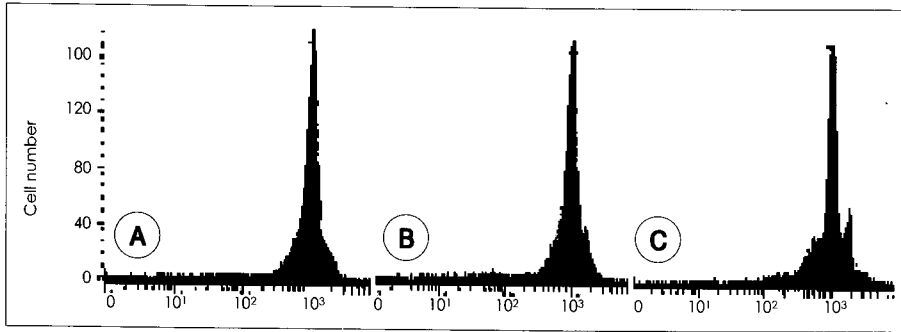


Fig. 6. FACS analysis of HeLa cells exposed to different concentrations of DMSO (A, 0; B, 2; C, 4  $\mu$ g/ml) for 24 hrs.

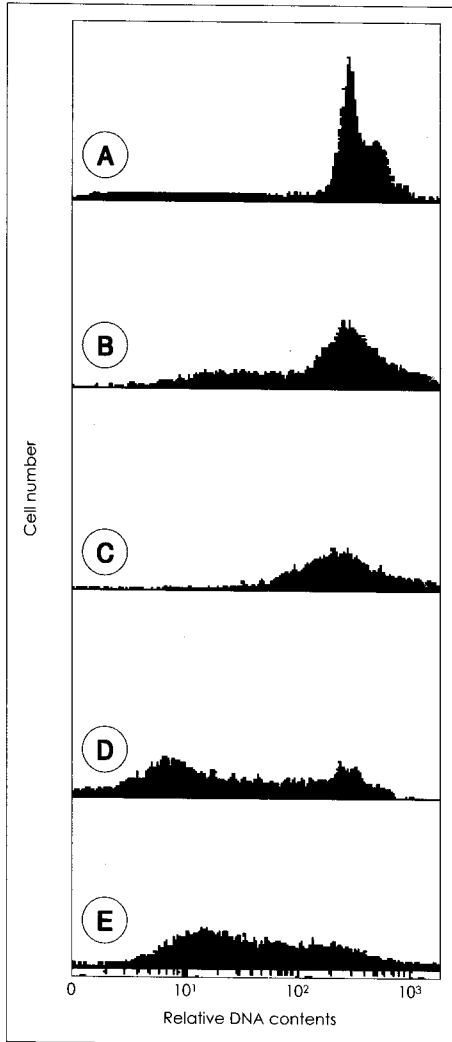


Fig. 7. FACS analysis of HeLa cells exposed for 24 hrs to various concentrations (A, 0; B, 100; C, 500; D, 1000; E, 2000  $\mu$ g/ml) of methanol fraction of *A. capillaris* Thunberg.

이상의 결과는 사철쑥의 메탄올, 에틸아세트, 부탄올 추출물이 HeLa 세포의 생존률을 저하시키며, HeLa 세포의 죽음은 세포고사 현상이었고, 이것은 사철쑥의 용매추출물 농도에 의존적임을 확인하였고 사철쑥이 인체 자궁경부 상피암 세포주인 HeLa 세포억제 및 암치료에 유익한 영향을 줄 수

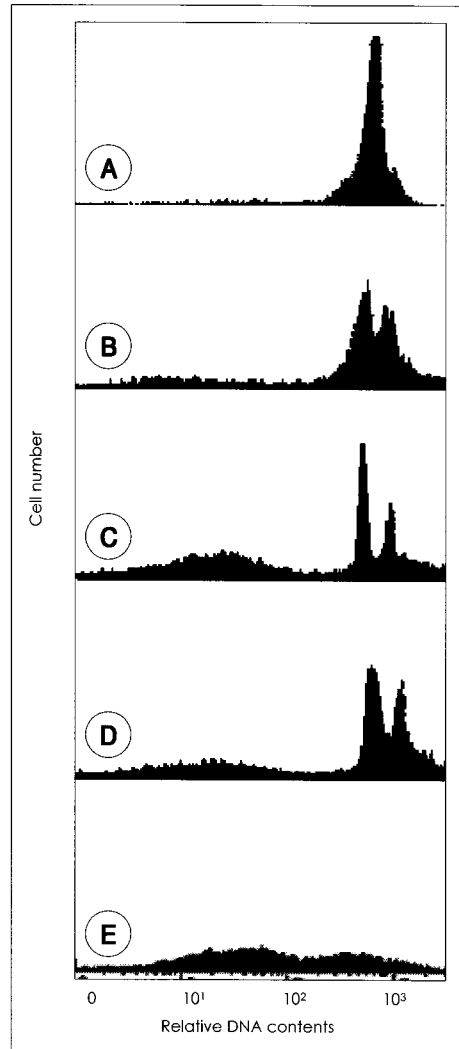
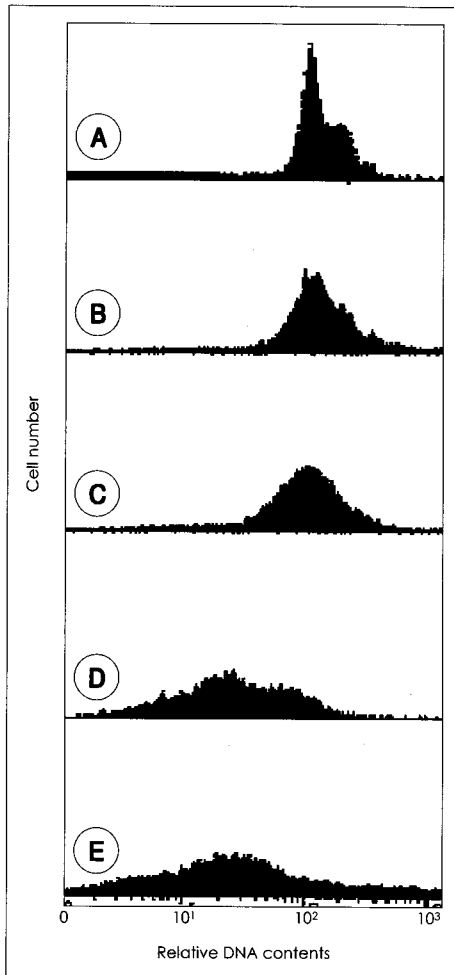


Fig. 8. FACS analysis of HeLa cells exposed for 24 hrs to various concentrations (A, 0; B, 100; C, 500; D, 1000; E, 2000  $\mu$ g/ml) of ethyl acetate fraction of *A. capillaris* Thunberg.

있을 것으로 생각된다. 세포주기 조절과 연관된 연구는 최근에서야 이루어지고 있고 암세포의 종류에 따라 항암기전이 다소 다르게 보고되고 있으므로 다양한 암세포를 대상으로 보다 부가적인 연구가 절실히 요구되고 있다.



**Fig. 9.** FACS analysis of HeLa cells exposed for 24 hrs to various concentrations (A, 0; B, 100; C, 500; D, 1000; E, 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) of n-butanol fraction of *A. capillaris* Thunberg.

**Table 3.** Apoptotic HeLa cells population upon exposure for 24 hrs various extracts by *A. capillaris* Thunberg

Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sub G1 cell population (%)		
	Methanol	Ethyl acetate	n-Butanol
0	0.0	0.0	0.0
100	18.9	14.8	4.6
500	39.8	24.2	5.3
1000	68.5	55.5	23.6
2000	84.5	82.0	59.2

## 고 찰

최근 식생활과 연관된 암의 원인물질을 검색하는 연구가 활발히 진행 되고 있을 뿐 아니라 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암물질을 함유한 물질들의 개발에 관한 연구도 다양하게 이루어 지고 있다. 암예방에 효과적인 식품으로 아시아에서 흔히 사용되고 있는 식물성식품이 다수를 차지하

고 있는데 그 중 쑥은 우리나라 어디에서나 자생하는 흔한 식물로 식용 또는 약용 등 여러 분야에 이용되고 있어 본 연구에서는 항암 활성을 소유한 새로운 물질의 탐색 및 기전 연구의 기초실험으로 사철쑥을 소재로 암세포의 생존과 세포고사에 미치는 영향을 알아보았다.

세포고사 기전에는 여러 유전자가 관계하고 여러 가지 자극에 의해서 다양한 경로를 통하여 유도되지만 공통적으로 발견되는 유전자는 p53,<sup>27)</sup> p21,<sup>28)</sup> interleukin1 $\beta$  converting enzyme (ICE) 등이 있다. 이중 p53 유전자 변이는 인체종양에서 흔하게 발견되는 것이며, p53단백질은 세포주기 중지 기능을 가져 세포 간기 중 DNA 합성준비기인 G1기의 check point에서 제어 역할을 한다. DNA가 손상되면 세포 내 p53 단백질이 활성화되어 세포주기가 G1기에 정지되어 세포 고사를<sup>26)</sup> 일으킨다. 세포고사 과정 중 DNA의 분절은<sup>25)</sup> 전기영동상에서 사다리모양 (laddering-pattern)의 특징을 보이며, DNA함량의 감소를 FACS분석으로<sup>26)</sup> 관찰 할 수 있음을 근거로 하여, 본 실험결과로는 사철쑥의 메탄올, 에틸아세테이트 분획물이 암세포인 HeLa 세포의 생존율을 저하시키며, HeLa 세포의 죽음은 세포고사 기전에 의함이 밝혔고 또한 메탄올, 에틸아세테이트 분획물에 의한 HeLa 세포의 세포고사 현상은 사철쑥의 각 용매분획의 농도에 의존적임을 알 수 있었다.

Hwang 등<sup>9)</sup>이 석유에테르에 추출된 쑥 (*A. princeps*)의 유효성분이 생쥐 유래의 백혈병성 임파모세포인 L1210, 인체결장암세포인 HCT-48 및 인체 간암세포인 HepG2에 대하여 현저히 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었고, 사철쑥 컬럼 크로마토그래피의 아세톤 분획물로 추출하여 인체 결장암세포 HCT-48에 첨가 배양시 세포수가 현저히 감소되었고, 세포 모양도 변형, 위축되었으며, 암세포의 크기가 현저히 감소되는 세포 조직학적 현상을 관찰 할 수 있었다고 보고하였다. Ham 등<sup>18)</sup>도 더위지기 에탄올 추출물에 대한 세포독성 실험에서도 폐암세포주인 A549에 대하여 에탄올 추출물을 50  $\mu\text{g/ml}$  첨가하였을 때 89%의 강한 암세포 성장 억제 효과를 보였다고 한다. Hu 등<sup>29)</sup>은 사철쑥 수용성 추출물이 사람 간암 세포주인 SMMC-7721이용하여 25~200  $\mu\text{g/ml}$ 농도로 3일간 처리하였을 때, 세포고사의 전형적인 특징인 분절된 DNA의 형태를 보였다고 보고하였다. 세포고사를 일으키는 DNA 분절현상은 세포고사의 징후인 nucleosome-sized DNA ladder로 나타났고, 사철쑥의 수용성 추출물을 사람 간암세포주인 SMMC-7721에 대조군, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간 처리하였을 때 세포주기 중 G1기에 영향을 주어 세포고사율이 각각 78.98%, 83.7%, 81.57%임을 발표하였다.

그러나 본 연구에서 수용성 분획물의 경우 세포고사의 유의한 증가를 보이지 않았는데, 이는 분획 방법과 세포주의 차이를 반영하는 것으로 보이며 이에 대해서는 각 용매분획 별 성분의 분석이 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

Hahm 등<sup>30)</sup>은 피사성 채장염을 유발시킨 흰쥐에서 쑥 (*A. asiatica*) 추출물의 일종인 DA-9601를 처리한 군들에서 농도가 증가할수록 세포고사지수 (apoptotic index)가 높아졌다고 보고하였는데, 본 실험에서도 HeLa 세포의 DNA 분절은 사철쑥에 의해 세포고사를 유도했다고 생각된다.

사철쑥의 약리주성은 주성분이 capillin이고, 과실의 열탕 추출물에서는 6,7-dimethyl aesculetin이 분리되었다. 전초(全草)의 정유성분 중 1%는 capillin, capilline, capillone, capillarin 등이 있다. 쑥의 특유성분으로는<sup>31)</sup> 정유가 0.02%로 그 주성분으로는 cineol (50%),  $\alpha$ -thujone, sesquiterpene alcohol, capillin, capillene, capillone 등이며, 비타민 A, B, C, D, amylase, adenine, choline 등이 함유된 것으로 밝혀져 있다. 향기성분으로는 benzaldehyde,  $\alpha$ -pinene, myrcene, 1,8-cineole, 2-pyrrolidinone, camphor, thujone, 1-acetyl-piperidine, caryophyllene, coumarine, farnesol 등이, 당류로 rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose 등과, flavonoid인 eupatilin 등<sup>32)</sup>이 보고되었다.

본 실험에서 사철쑥의 어느 성분이 인체 자궁경부 상피암 세포인 HeLa세포의 생존을 억제했는지는 구체적으로 알 수 없으나 메탄올, 에틸아세트, 부탄올 분획물이 HeLa세포에서 세포고사에 의해 세포수를 감소시키고, 암세포의 생존을 억제하는 용매추출물과 가능한 기전을 제시하였으므로 후속 연구를 통하여 효능을 함유한 성분을 분석하고 각각의 항암기전규명이 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

사철쑥 (*Artemisia capillaris* Thunberg)이 암세포의 세포고사에 미치는 영향을 보기 위하여 인체 자궁경부 상피암 세포주인 HeLa 세포를 이용하여 사철쑥의 메탄올, 에틸아세트, 부탄올 추출물의 농도를 각각 0, 100, 500, 1,000 및 2,000  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 세포활성도, 세포형태 변화, DNA 분절, DNA 함량을 알아보았다. 세포활성도는 사철쑥의 메탄올, 에틸아세트 추출물이 농도에 비례하여 HeLa 세포생존율을 감소시켰지만 부탄올 추출물에서는 그 정도가 약하였고 물 추출물에서는 거의 관찰되지 않았다. 사철쑥의 메탄올, 에틸아세트, 부탄올과 물 추출물은 각 추출물의 농도에 의존적으로 배양된 HeLa 세포에 세포부착을 방해하고 세포막의 blebbing 및 핵의 분절화 등 세포고사의 특징

들을 나타냈다. 사다리형 DNA 분절현상은 사철쑥의 메탄올 추출물 1,000  $\mu\text{g/ml}$ , 2,000  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서 관찰되었다. 유세포분석기 (FACS)를 이용하여 측정된 고사세포의 DNA 함량은 메탄올과 에틸아세트, 부탄올 추출물이 농도 의존적으로 증가하였다. 이상의 결과는 사철쑥이 암세포의 세포고사를 증가시킴으로서 암억제 작용이 있을 것을 시사해 준다고 할 수 있다.

## Literature cited

- 1) 한국생명과학회 교수회 편저. 본초학, 아카데미서적; 1994. p.366
- 2) 이성우. 고려이전의 한국 식생활사. 향문사; 1986. p.388
- 3) 김재길. 원색천연약물대사전. 남산당 1992;64:79
- 4) 신민교. 임상본초학. 영림사; 1994. p.602
- 5) 이창복. 대한식물도감. 향문사; 1985. p.753-761
- 6) Kim KS, Lee MY. Effects of *Artemisia selengensis* methanol extract on ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1996;25(4):581-587
- 7) Bown D. Encyclopaedia of herbs and their uses. Darling Kinder-sley. London; 1995. p.23
- 8) Lee GD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in wormwood (*Artemisia montana* Pampan). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1992; 21(1): 17-22
- 9) Hwang YK, Kim DC, Hwang WI, Han YB. Inhibitory effect of *Artemisia princeps* Pampan extract on growth of cancer cell lines. *Korean J Nutr* 1998; 31(4): 799-808
- 10) Nam SM, Kim JG, Ham SS, Kim SJ, Chung ME, Chung CK. Effects of *Artemisia iwayomogi* extracts on antioxidant enzymes in rats administered benzo ( $\alpha$ ) pyrene. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1999; 28(1): 199-204
- 11) Lee SY. Use and perspective views of oriental herbs in food industry. *Korean J Food & Nutr* 2005; 5(3): 21-26
- 12) Park JC, Lee ST. Functional food and bioactive constituents from oriental medicine resources. *Korean J Food Indus and Nutr* 2000; 5(3): 27-36
- 13) Tariq MM, Mossa JS, Al-Yahya MA, Parmar NS, Ageel AM. Evaluation of *Artemisia inculca* for anti-inflammatory activity in rats. *Am J Clin Med* 1987; 15(3-4): 127-132
- 14) Twaij HA, Al-Badr AA. Hypoglycemic activity of *Artemisia herba alba*. *J Ethnopharmacol* 1994; 43(3): 167-171
- 15) Park SK, Park JC. Antimicrobial activity of extracts and coumaric acid isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 1994; 9(5): 506-511
- 16) Park KY, Ha JO, Yu YB, Lee JH. Antimutagenic effect of some *Artemisia* species. *Korean J Pharmacogn* 1996; 27(2): 96-100
- 17) Ham SS, Chung CK, Lee JH, Choi KP, Jung SW, Kim EJ. Anti-mutagenicity and cytotoxicity of *Artemisia iwayomogi* Kitamura extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1998; 27(1): 157-162
- 18) Koshihara Y, Neichi T, Muroda S, Lao A, Fujimoto Y, Tatsuno T. Selective inhibition of 5-lipoxygenase by natural compounds isolated from Chinese plants (*Artemisia rubripes* Nakai). *FEBS Lett* 1983; 158(1): 41-49



- 19) Cohen JJ. Apoptosis the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)* 1993; 28(12): 35-43
- 20) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis mechanism and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 223-254
- 21) Lee HJ, Hwang EH, Yu HH, Song IS, Kim CM, Kim MC, Hong JH, Kim DS, Han SB, Kang KJ, LEE EJ, Chung HW. The analysis of nutrients in *Artemisia Capillaris* Thunberg. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2002; 31 (3) : 361-366
- 22) Lee HJ, Hwang EH. Effect of *Artemisia Capillaris* Thunberg on Plasma and Liver Lipid Metabolism in rats. *Korean J Nutr* 2002; 35 (4) : 421-430
- 23) Giannoni E, Cirri P, Paoli P, Fiaschi T, Camici G, Manao G, Raugei G, Ramponi G. Acylphosphatase is a strong apoptosis inducer in HeLa cell line. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3 (5) : 264-270
- 24) Ferrera R, Larese A, Berthod F, Guidollet J, Rodriguez C, Dureau G, Dittmar A. Quantitative reduction of MTT by hearts biopsies in vitro is an index of viability. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25 (9) : 1091-1099
- 25) Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem* 1993; 268 (5) : 3037-3039
- 26) Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phases. *Cancer Res* 1994;54:448-454
- 27) Kastan MB, Onyekwerw O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;56:6304-6311
- 28) Garc JF, Piris MA, Lloret E, Orradre JL, Murillo PG, Martez JC. p53 expression in CMV-infected cells association with the alternative expression of the p53 transactivated genes p21/WAF1 and MDM2. *Histopathology* 1997;30 (2) :12-125
- 29) Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. Apoptosis in human Hepatoma Cell Line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Jpn J Cancer Res* 2000;91 (1) :113-117
- 30) Hahm KB, Kim JH, You BM, Kim YS, Cho SW, Yim H, Ahn BO, Kim WB. Induction of apoptosis with an extract of *Artemisia asiatica* attenuates the severity of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 1998;17 (2) :153-157
- 31) Kim YS, Lee JH, Kim MN, Lee WG, and Kim JO. Volatile flavor compounds from raw mugwort leaves and parched mugwort tea (in Korea). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1994; 23 (2) : 261-267