

로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.) 분획물의 암세포에 대한 성장억제 및 세포사멸 유도 효과

최준혁 · 김혁일 · 이인선[†]

계명대학교 식품가공학 전공, 전통미생물 자원 개발 및 산업화 연구 센터

Effect of *Rosmarinus officinalis* L. on Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Cancer Cells

Jun-Hyeok Choi, Hyuk-Il Kim, and In-Seon Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology, The Center for Traditional Microorganism Resources,
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

The goal of this study was to evaluate the anticancer effect of *Rosmarinus officinalis* L. In this study induction of apoptosis by methanol extract of rosemary and their fractions were investigated *in vitro*. In examining the effect of rosemary methanol extract on the inhibition of growth of Hela, HepG2, A549, AGS cells and HT-29 cell, it was found that the methanol extract of rosemary and their fractions demonstrated a cytotoxic effect in a dose-dependent manner; in addition, hexane and chloroform fractions showed a particularly high cytotoxic effect on Hela and AGS cells. The results showed that the hexane and chloroform fractions of rosemary have cytotoxic effect which are related to the activity of the essential oil in the rosemary. Apoptosis in Hela and AGS cells mediated by the hexane and chloroform fractions was associated with the increase of cleaved caspase-3 levels and cleaved PARP. Therefore, with more researches on identification and action mechanism of active compound, the hexane and chloroform fractions are expected to be natural sources for the developments of functional food and medical agents to prevent gastric cancer and uterus cancer.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L., apoptosis, Hela cells

서 론

암은 정상 세포가 어떤 자극에 의해서 유전자의 형질전환이 발생되면 형태학, 생물학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 악성종양을 말하고, 전 세계적으로 인간의 생명을 위협하는 가장 중요한 요소로 지목되고 있다. 우리나라에서도 암으로 인한 사망률이 해마다 높아지고 있으며, 국내 사망원인 중 1위를 차지하고 있는 아주 중요한 질환이다(1). 그중에서도 자궁경부암은 전 세계 여성암의 15% 정도를 차지하고 있어 여성에게 발생하는 악성 종양 중 2위를 차지하고 있으며, 선진국보다 개발도상국에서 더 흔한 암으로 알려져 있다. 2002년 한국 중앙 암 등록사업 보고서에 의하면 우리나라는 2002년 한 해에 3,979명의 환자가 새로 발생하는 등 서구 선진국에 비하여 아직은 높은 발생률을 보이고 있다(2). 기존에 알려진 암에 대한 치료법은 뚜렷한 효과도 없을 뿐더러 면역기능저하, 조혈장애, 유전자 손상 등의 부작용을 유발한다. 따라서 부작용을 감소시키면서 암세포에만 특이

적으로 작용하여 다른 정상세포에 영향을 주지 않는 천연적 항암치료제를 개발하려는 노력이 시도되고 있다(1). 현재는 각종 과채류에 다량으로 존재하는 천연물질 flavonoid류와 산성 페놀화합물들이 항산화성, 항 알레르기성, 항암성 등 다양한 생리활성 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀져 이에 대한 검색이 활발히 진행되고 있다(3).

최근 암을 억제하는 기작으로 apoptosis에 관한 연구가 많이 보고되어 있다. Apoptosis는 세포주기 의존적 및 비의존적으로 일어날 수 있으며, apoptosis 현상으로 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다(4,5). 또한 그 과정을 통해 생성된 apoptotic body들은 주변의 세포들이나 대식세포 등의 식세포 작용에 의해 제거됨으로써 염증을 유발하지 않고 암으로 진행되지 않게 된다(6).

한편, 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.)는 해안에서 많이 자생하고 있고, 지중해 연안이 원산인 상록관목으로 소나무 잎처럼 뾰족한 잎에 장뇌와

[†]Corresponding author. E-mail: inseon@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5538, Fax: 82-53-580-5538

비슷한, 산뜻하고 강한 향이 있어 라벤더와 나란히 유럽에서는 예로부터 약, 향수에 사용되었다. 로즈마리의 주요 성분으로는 α -pinene, apigenin, β -carotene, β -sitosterol, betulinic acid, borneol, rosmanol, rosmarinic acid, 1-8 cineol, carnosol, carnosic acid, tannin, 칼슘, 철, 마그네슘, 망간, 인, 칼륨, 아연, 비타민 B₁, B₃, C 등이 있다(7). 로즈마리에서 추출되는 essential oils는 조미료, 향수 및 의약품으로써 널리 이용되고 있으며 그 중에서 rosmarinic acid는 로즈마리에서 추출한 2차대사산물의 일종으로 식품의 산패방지 또는 미생물의 활동을 억제하는 등 천연 항산화물질로 이용되고 있다(8). α -Pinene은 식물계에 가장 풍부한 terpenoids로써 방충, 항균, 생체활성에 기여하는 물질로 감기, 감염 등의 바이러스성 질환과 신진대사 촉진, 혈액순환 및 지혈 등에 효능을 나타내며(9), apigenin은 염증과 산화스트레스 억제 및 탄수화물대사를 증진하는 효과를 보인다(10,11). 그리고 β -sitosterol은 뇌신경세포의 지질 속에 유리 또는 에스테르 등의 유도체로 존재하며 구조형성과 여러 대사에 관여하고 있는 것으로 생각되며, 스테로이드 호르몬계 화합물의 합성원료로 이용된다(12). Borneol은 담즙을 촉진하는 물질로 일정량 섭취 시 적당량의 담즙분비를 촉진하여 체내의 콜레스테롤 수치를 낮추고 소화를 촉진하는데 기여하며, carnosol과 carnosic acid는 로즈마리 추출물의 항산화성 중 90%의 효능을 갖는 물질로 세포내의 마이크로솜과 리포솜계에서 지질의 과산화를 강력히 저해한다고 보고되고 있다(13). 이러한 기능성 성분을 함유하고 있는 로즈마리는 식품법규 65421 2000.3.9 민원회신(식품원료로 사용가능), 식품공전 원재료분류에 향신식물로 분류되어 식용으로 사용이 가능하며, 강장, 진정, 소화, 수렴 등의 효과가 있으며 구풍작용, 항균작용이 있다. 그러나 로즈마리의 추출물 및 분획물뿐만 아니라 단일성분의 세포사멸 유도 효과에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 로즈마리의 추출물 및 분획물이 여러 가지 암세포주의 성장을 억제하는지 검색

하고 세포사멸 기전을 살펴보았다.

재료 및 방법

로즈마리 시료의 제조

본 실험에 사용한 시료는 대구시의 약령시장에서 건조 상태의 것을 구입하여 사용하였다. 시료는 불순물 제거를 위하여 수세한 후 건조하여 사용하였고, 무게의 10배량(w/v)의 80% 메탄올을 가하여 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과한 다음 rotary evaporator로 55°C에서 농축한 후 동결 건조하여 메탄올 추출물로 사용하였다. Fig. 1에서와 같이 동결 건조한 로즈마리 메탄올 추출물은 20배(w/v)의 증류수에 녹인 후 hexane(hexane), chloroform(CHCl₃), ethylacetate(EtOAc) 및 butanol(BuOH)로 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통적으로 분획을 하였고 남은 수용성 층은 water 분획으로 감압농축 하여 speed vacuum으로 남은 유기용매를 휘발시킨 뒤 -20°C에서 보관하면서 사용하였다. 또한 각 시료는 실험 수행 시 DMSO에 각각 녹여 사용하였다.

세포주 배양

본 실험에 사용된 AGS, HepG2, HT-29, Hela, A549 cell은 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. 각각의 세포주는 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute) 1640, DMEM(Dulbecco Minimum Essential Medium), MEM(Minimum Essential Medium)과 10% FBS와 1% anti-biotic-antimycotic이 첨가된 배지에서 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

암세포주 저해 효과 측정

암세포주에 대한 시료의 저해효과를 측정하기 위하여 Green 등(14)의 방법에 준하여 MTT assay를 실시하였다.

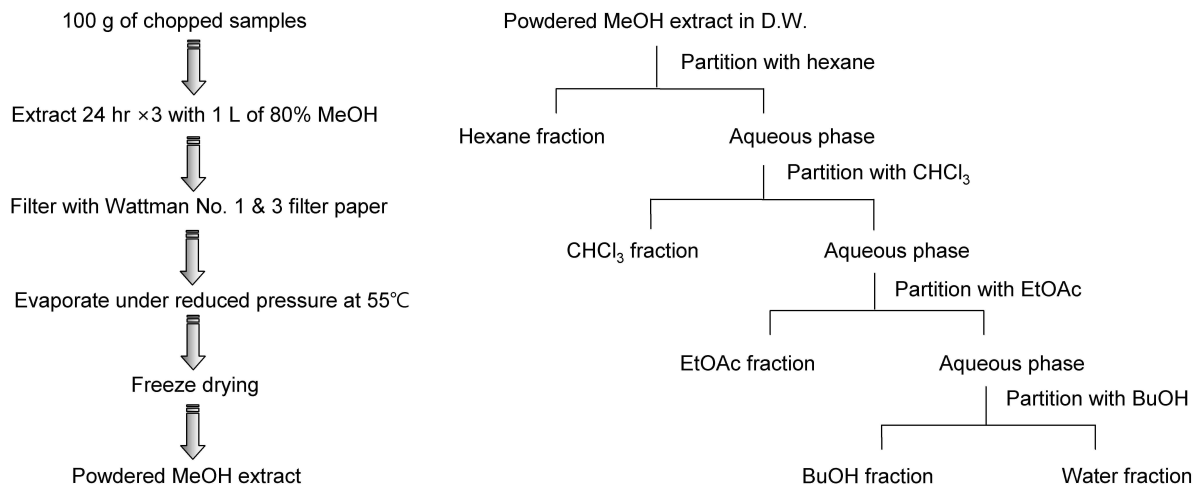


Fig. 1. Fractionation procedure of methanol extract from *Rosmarinus officinalis* L. by solvent separation.

암세포주를 96 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 200 μ L 분주하고 24시간 배양 후 새로운 배지로 교환하고, 시료를 일정농도로 희석하여 20 μ L 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 10 μ L를 첨가하고 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 각 well 당 DMSO 100 μ L를 가하여 10분간 교반한 후 ELISA reader(Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 성장억제효과(Growth inhibitory effect (%)) = $100 - (\text{시료처리구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 를 구하여 암세포의 성장 저해 효과를 측정하였다.

Western blot analysis

Hela cell로부터 단백질 분리: Hela cell을 6-well plate에 5×10^5 cell/2 mL로 분주하고 로즈마리 분획물을 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 120×g에서 10분 동안 원심분리 하여 모은 뒤 PBS로 세척하였다. 세척된 cells에 lysis buffer(50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16 μ M PMSF)를 넣고 suspension한 뒤, 얼음 위에서 20분간 유지시킨 후 용해된 세포를 13,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 새 튜브에 옮기고 그 추출된 단백질을 BCA kit를 사용하여 정량하였다.

단백질 전기영동: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 위하여 먼저 10% running gel과 4.5% stacking gel을 제조하였다. 이때 분리한 단백질의 농도를 10 μ g으로 조정하고 95°C에서 5분간 가열한 후 준비된 gel에 분주하여 20 mA에서 전기영동 하였다.

Western blotting: 전기영동을 하여 분리한 단백질은 immobilon-P transger membrane과 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 180 mA에서 90분간 transfer 시켰다. 단백질이 이동된 membrane은 ponceau solution으로 transfer의 유무를 확인한 후, 5% non-fat skim milk solution(100 mM Tris-Cl, 1.5 M NaCl, 0.5% tween-20)으로 5분 간격으로 3회 세척하였다. 계속하여 이차항체인 goat anti-Rabbit IgG와 2시간 반응시키고 다시 TTBS으로 3회 세척하였다. 증류수로 세척하고 membrane에 ECL detection kit의 발색시약 I 과 II를 1:1로 섞은 후에 혼합액을 도포하고, X-ray film에 노출하여 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다. 실험에 사용한 1, 2차 항체인 Bcl-2, Bax, Goat Anti-Rabbit IgG, Goat Anti-Mouse IgG 등은 Santa Cruz사(California, USA)로부터, caspase family는 Cell Signaling Technologies(Beverly, MA, USA)사로부터 구입하였으며, 그 밖의 시약들도 특급 또는 일급의 제품을 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(8)을 응용하여 측정하였다. 즉 각 메탄올 추출물 시료 1 mg을 증류수 1 mL에

녹이고 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na₂CO₃ 2 mL을 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron Instruments, Milan, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 tannic acid를 이용한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(15)의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 100 μ L를 80% ethanol 900 μ L에 희석한 후 100 μ L를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 μ M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 total flavonoid 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

통계처리

결과들은 평균±표준오차로 표시하고, 변수의 분석들은 Student t-test를 사용하였다. P값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의하다는 판정을 하였으며, 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하여 통계처리를 하였다.

결과 및 고찰

로즈마리 메탄올 추출물의 계통적 분획 수율

로즈마리 메탄올 추출물을 극성이 다른 용매인 hexane, chloroform, ethylacetate 및 butanol로 순차 분획하였으며 그 수율은 Table 1과 같다. Water 분획물과 ethylacetate 분획물은 각각 33.5%, 10.26%로 높은 수율을 보였으며, butanol 분획물과 hexane 분획물은 17.1%, 2.5%의 수율을 나타냈다. chloroform 분획물은 0.9%로 가장 낮은 수율을 나타냈다.

로즈마리 추출물의 암세포주에 대한 성장저해 효과

각각의 암세포주에 로즈마리 MeOH 추출물 및 분획물을 적정농도로 희석하여 24시간 동안 처리한 후 살아있는 세포의 수를 측정한 결과는 Table 2와 같았다. MeOH 추출물의

Table 1. Yields of *Rosmarinus officinalis* L. methanol extract and their hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water fractions

Fraction	Yields (%) ¹⁾
Methanol extract	27.3
Hexane fraction	2.5
Chloroform fraction	0.9
Ethyl acetate fraction	10.26
butanol fraction	17.1
Water fraction	33.5
Total	64.26

¹⁾Percentage of each fractions to methanol extract content (100 g).

Table 2. Inhibition rate of rosemary methanol extracts and their fractions in HeLa, AGS, HT-29, HepG-2, A549 cells

Fraction	Concentration (µg/mL)	Inhibition rate (%)				
		Cell line				
		HeLa	AGS	HT-29	HepG-2	A549
MeOH	50	35.57±1.00	80.68±2.57	23.88±2.61	8.55±3.64	38.43±3.35
	100	83.98±1.04	95.53±0.24	78.56±4.11	65.63±4.36	60.10±3.93
Hexane	50	81.18±0.73	91.33±1.27	59.30±1.48	38.31±2.90	48.88±5.67
	100	93.93±0.32	92.98±1.04	85.72±0.09	84.47±1.54	87.71±1.75
CHCl ₃	50	76.14±9.30	60.92±2.06	16.56±3.43	—	18.20±2.70
	100	92.69±0.05	95.30±0.35	87.04±0.07	75.53±1.83	62.77±1.32
EtOAc	50	13.85±0.71	6.63±6.67	—	5.03±0.03	22.82±3.37
	100	12.23±1.98	8.26±1.97	—	—	18.39±1.67
Butanol	50	2.89±4.00	2.89±3.91	—	—	22.31±1.10
	100	28.39±3.56	1.52±2.33	—	4.19±0.04	7.02±1.39
Water	50	26.87±2.83	—	0.03±3.25	—	25.73±0.39
	100	20.23±5.80	6.66±4.76	—	7.84±3.54	21.10±0.13

The values are mean±standard deviation. —: no inhibition.

경우, 가장 높은 농도인 100 µg/mL을 첨가 시 위암세포주인 AGS cell에서 95%로 가장 높은 성장저해 효과를 보였고, 다음으로 HeLa, HT-29, HepG2, A549 순으로 각각 83%, 78%, 65%, 60%를 저해하는 것으로 나타났다. 분획물의 가장 높은 농도인 100 µg/mL을 첨가 시 hexane 분획물에서는 HeLa cell에서 93%로 가장 높은 저해 활성을 나타냈으며, chloroform층의 경우 100 µg/mL을 첨가 시, AGS cell에서 95%로 가장 높은 저해 활성을 나타냈으며, HeLa cell에서도 92% 이상의 저해 활성을 나타냈다. 그 이외의 ethyl acetate, butanol, water 분획물에서는 암세포주에 대한 저해 활성이 미미한 수준으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 각각의 암세포주에서는 로즈마리의 hexane, chloroform 분획물이 뛰어난 성장 저해 효과를 나타내는 것을 알 수 있었으며 이들 분획물을 사용하여 HeLa 세포주에 대한 세포사멸 유도 기전을 알아보았다.

로즈마리 hexane, chloroform 분획물이 apoptosis 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

Bcl-2 family 단백질의 발현: 세포들은 외부의 여러 자극들의 변화에 의해 매우 민감하게 반응하며, 자극의 종류나 강도에 따라 필요시 매우 정밀한 세포사멸 신호전달 과정을 작동하게 된다. 수십 년간의 연구를 통하여 세포사멸 과정을 유도하거나, 조절할 수 있는 여러 세포 인자들이 밝혀졌다. Bcl-2 family에 속하는 여러 단백질들은 apoptosis에서 중요한 역할을 하는데 이들 중 Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-xS 등은 apoptosis를 촉진하는 역할을 하며, Bcl-2, Bcl-xL 등은 apoptosis를 억제하는 기능을 가진다고 보고되었다(16). Bcl-2 family 중 Bax와 Bcl-2의 단백질 발현을 western blot 방법으로 확인하였다. 로즈마리의 hexane, chloroform 분획물을 다양한 농도로 24시간 처리한 결과 Fig. 2, 3과 같이

apoptosis를 유도하는 Bax의 단백질 발현은 농도에 비례하여 증가한 반면 apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질은 농도에 비례하여 발현이 감소하였다. 따라서 hexane, chloroform 분획물은 Bcl-2의 발현 감소와 Bax의 발현 증가를 통해 apoptosis를 촉진할 것으로 생각된다.

Caspase 단백질 발현: Apoptosis 유도과정에서는 caspase라고 불리는 cysteine계의 단백질 분해 효소 군이 관여한다. Caspase-9은 Fas나 TNF 수용체와 같은 death receptor를 통해서 보내어지는 신호에 반응해서 apoptosome을 형성하고, 이것이 caspase-3를 절단하여 활성화시키고 PARP라는 기질을 이용해서 세포사멸을 유도하게 된다(16). 미토콘드리아 막에는 cytochrome c가 존재하며 자극시에 세포질로 방출되고 이는 세포사멸을 유도하는 caspase 3을 활성화시키는 기능을 한다. 즉 미토콘드리아 막의 전위 상실됨으로서 전자전달계 시스템이 붕괴되고 이는 결과적으로 자유라디칼의 생성이 증가되고 궁극적으로 세포사멸을 유발하게 된다(17). Caspase-3는 Yama, Apopain 등으로 불리는 유전자로써 과발현될 경우 apoptosis가 유도되고 (18) caspase-3 activity inhibitor를 사용하면 apoptosis가 억제되는 등 apoptosis에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며(19), caspase-7 또한 여러 가지 기질의 절단을 일으켜 실제적인 죽음의 실행자 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (20). 따라서 로즈마리 분획물이 유도하는 apoptosis 과정의 caspase의 신호전달 기전을 알아보려고 HeLa cell에 로즈마리의 hexane, chloroform 분획물을 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도로 각각 처리하여 caspase의 활성을 측정된 결과 Fig. 4, 5와 같이 농도 의존적으로 그 활성이 증가되는 것을 알 수 있었다. 또한 로즈마리 hexane, chloroform 분획물은 caspase-3, 7, 9를 각각 활성화시킴으로써 최종적으로 PARP를 활성화시켜 apoptosis를 유도하는 것으로 나타났다.

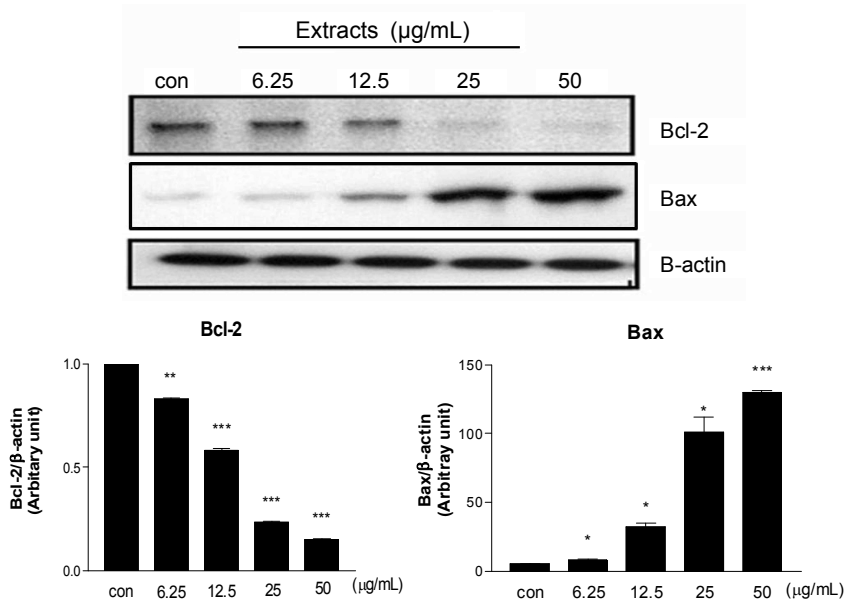


Fig. 2. Effect of rosemary hexane fraction on protein levels of Bcl-2 and Bax in HeLa cell. Bcl-2 and Bax activities were normalized to β-actin activity. Each value represents the means±SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

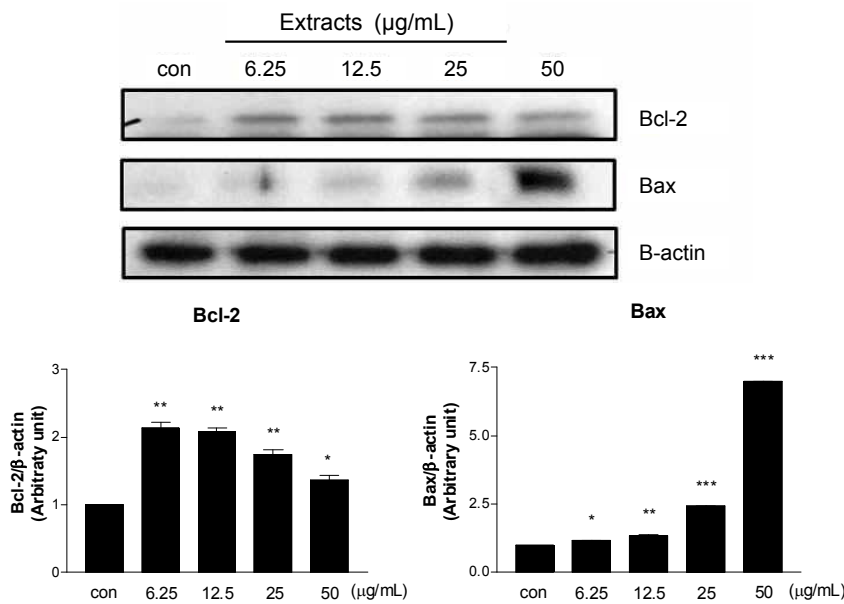


Fig. 3. Effect of rosemary chloroform fraction on protein levels of Bcl-2 and Bax in HeLa cell. Bcl-2 and Bax activities were normalized to β-actin activity. Each value represents the means±SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물의 하나로써 다양한 구조와 분자량을 가지며 플라보노이드와 탄닌이 주성분이다. 플라보노이드(flavonoid)는 방향족 폴리페놀로서 크게 플라보놀(flavonol), 플라본(flavone), 플라바논(flavanone), 플라바놀(flavanol), 안토시아니딘(anthocyanidin), 이소플라본(isoflavone) 등으로 분류된다(21). 이들은 phenolic hydroxyl(OH)기를 갖기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다. 본 실험에서는 로즈마리의 MeOH 추출물 및 분획물에 존재하는 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과(Table 3), 로즈마리의

MeOH 추출물은 172.69 mg/g으로 나타났으며, 분획물은 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water fraction 순으로 각각 161.41, 122.22, 489.02, 283.05, 120.92 mg/g의 높은 폴리페놀 화합물을 함유하고 있었으며, 특히 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 플라보노이드 함량(Table 4)은 MeOH 추출물에서 21.15 µg/mg으로 나타났으며, ethyl acetate fraction은 89.23 µg/mg으로 역시 분획물 중에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 하지만 각각의 암세포주에 대한 저해 효과를 확인한 결과 hexane, chloroform층에서 가장 뛰어난 효과가 나타난 것으로 보아 apoptosis 유도에 영향을 미친 성분은 폴리페놀류가 아닌 로즈마리의 hexane, chloroform층에 존재하는 정유성

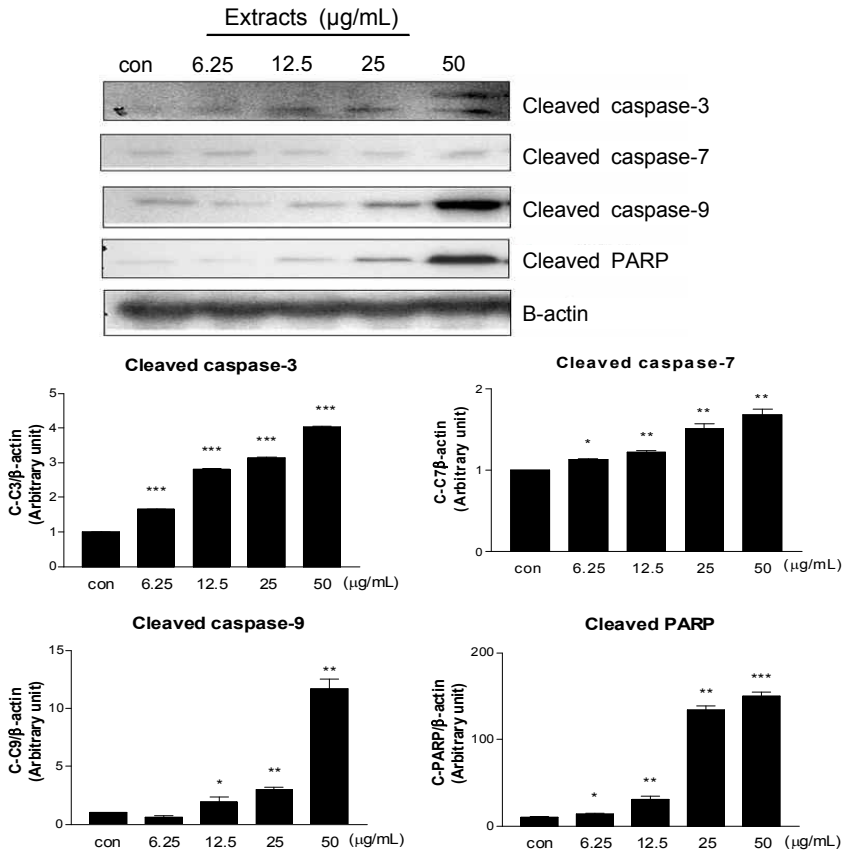


Fig. 4. Effect of rosemary hexane fraction on protein levels of cleaved caspase 3, 7, 9 and cleaved PARP in Hela cell. Caspase 3, 7, 9 and cleaved PARP activities were normalized to β -actin activity. Each value represents the means \pm SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.

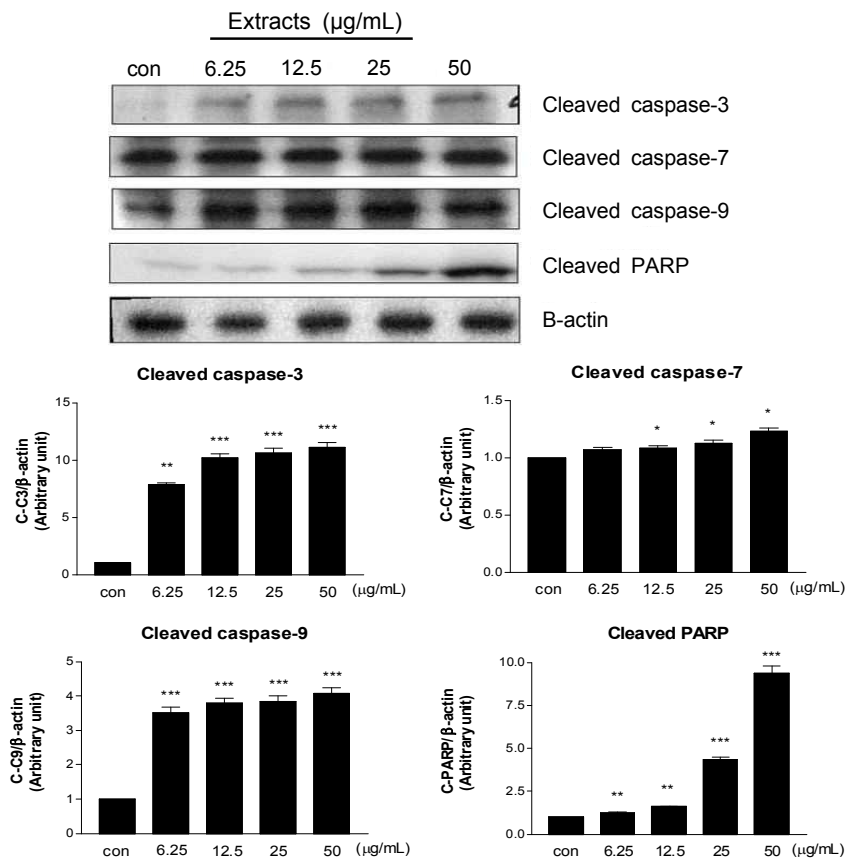


Fig. 5. Effect of rosemary chloroform fraction on protein levels of cleaved caspase 3, 7, 9 and cleaved PARP in Hela cell. Caspase 3, 7, 9 and cleaved PARP activities were normalized to β -actin activity. Each value represents the means \pm SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.

Table 3. Contents of total polyphenol of rosemary methanol extracts and their fractions (Unit: mg/g)

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Total polyphenols ¹⁾
Methanol extract	172.69±27.88 ²⁾
Hexane fraction	161.41±14.78
Chloroform fraction	122.22±29.70
Ethyl acetate fraction	489.02±64.04
Butanol fraction	283.05±47.27
Water fraction	120.92±20.15

¹⁾Milligrams of total polyphenol content/g of plants based on tannic acid as standard.

²⁾Each value is mean±SD (n≥3).

Table 4. Contents of total flavonoid of rosemary methanol extracts and their fractions (Unit: mg/g)

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Total flavonoids ¹⁾
Methanol extract	21.75±1.50 ²⁾
Hexane fraction	6.07±0.29
Chloroform fraction	8.98±1.76
Ethyl acetate fraction	89.23±8.52
Butanol fraction	74.38±6.51
Water fraction	13.59±1.92

¹⁾Milligrams of total flavonoid content/g of plants based on tannic acid as standard.

²⁾Each value is mean±SD (n≥3).

분이나 지용성 성분인 apigenin, β-carotene, β-sitosterol, tannin 등일 것이라 생각되며, 향후 연구에서 로즈마리의 분리정제를 통한 단일물질에 대한 분석이 요구된다.

이상의 결과에서 로즈마리 분획물 중 hexane과 chloroform층의 처리에 의한 암세포의 저해 활성은 apoptosis 조절에 중요한 유전자들의 선택적 발현 조절을 통한 apoptosis 유도 및 밀접한 관련이 있었으며 로즈마리는 항암효과를 가진 식품소재로 개발 가능성이 있는 물질 중의 하나로서 향후 지속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

최근 다방면에서 효능이 알려지고 있는 로즈마리를 이용하여 apoptosis 유도기전을 해석하기 위하여 인간유래 자궁암 Hela 세포주를 대상으로 조사한 결과는 다음과 같다. 로즈마리 분획물 중 hexane층과 chloroform층의 처리 농도 의존적으로 Hela 자궁암세포의 저해활성은 현저하게 감소되었으며 이는 apoptosis 유도 및 연관성이 있었다. 로즈마리 분획물 중 hexane층과 chloroform층의 처리에 의하여 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 단백질의 발현은 감소되었으며, apoptosis 유도에 관여하는 Bax 유전자의 발현은 농도 의존적으로 증가되었다. 로즈마리 분획물 중 hexane층과 chloroform층의 처리에 의한 apoptosis 유도는 caspase-3, 7, 9 및 PARP의 활성화와 연관성이 있었다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 계명대학교 대학원 학생학술연구 장학금과 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Yoon JH. 2006. Effects of *Curcuma longa* L. on some kinds of cancer cells. *PhD Dissertation*. Kyung-Hee University, Seoul, Korea.
2. Nam KY. 2000. Tumor cell growth inhibition of material separation and apoptosis of stilbene derivatives from *Cynanchum paniculatum* Kitagawa. *MS Thesis*. Ewha Womans University, Seoul, Korea.
3. Schulze-Osthoff KD, Ferrari M, Los S. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254: 439-459.
4. Wylie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
5. Yu MH. 2003. Antitumor and antioxidant effect of *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam. *MS Thesis*. Keimyung University, Daegu, Korea.
6. Yun KS. 2005. Analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *MS Thesis*. Sun Moon University, Chungnam, Korea.
7. Duke JA. 1997. *The green pharmacy*. Rodale Press, New York, USA. p 6-23.
8. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
9. Park HK. 2008. Antimicrobial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Melaleuca alternifolia* and *Lavandula angustifolia*. *MS Thesis*. Kyungnam University, Masan, Korea.
10. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751.
11. Oh EK, Kim HJ, Bae SM, Park MY, Kim YW, Kim TE, Ahn WS. 2008. Apogenin-induced apoptosis in cervical cancer cell lines. *Korean J Obstet Gynecol* 51: 874-881.
12. Bouice PJ. 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curropin Clin Nutr* 4: 471-475.
13. Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosemarinic acid in bulk oil and oil in water emulsion. *J Agric Food Chem* 44: 131-135.
14. Green LC, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lympholines. *J Immuno Methods* 126: 131-138.
15. Nivea MM, Sampietre AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
16. Oh YL, Eo WK, Hong KY, Kim YS, Kim HY. 2007. The effect of apoptosis related protein expression by cyclosporine in osteoblast. *Kosin Medical Journal* 22: 232-239.
17. Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.

18. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. 1996. Molecular ordering of the Fas apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine protease. *Proc Natl Acad Sci* 93: 14486-14491.
19. Zhou Q. 1997. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspase. *J Biol Chem* 272: 7797-7800.
20. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269: 30761-30764.
21. Jeon SK, Lee JW, Lee IS. 2007. Effect of antioxidant activity and induction of DNA damage on human gastric cancer cell by *Rubus coreanus* Miquel. *J Life Science* 17: 1723-1728.

(2009년 4월 30일 접수; 2009년 7월 7일 채택)