

황해쑥 (*Artemisia argyi*) 의 H9(ATCC HTB176) 세포에 대한 세포독성 및 항산화효소 활성

김경하 · 정대영 · 민태진* · 박시원#

상명대학교 자연과학부 화학과, *동국대학교 자연과학부 화학과

(Received June 30, 1999)

Cytotoxicity of *Artemisia argyi* Extract Against H9 (ATCC HTB 176) Cell and Antioxidant Enzyme Activities

Kyoung Ha Kim, Dae Young Jung, Tae Jin Min* and Sie Won Park#

Department of Chemistry, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

*Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 110-001, Korea

Abstract — The hot water and methanol extracts of *Artemisia argyi* showed considerable cytotoxicities against H9(ATCC HTB 176) cancer cell with IC_{50} values of 48.6 $\mu\text{g/ml}$ and 50.9 $\mu\text{g/ml}$, respectively. These cytotoxicities were found to be dependent on the extract concentrations and culture days. CuZnSOD and MnSOD activities were significantly increased in the cytoplasm and mitochondria fractions of cancer cell, and media in the presence of *Artemisia argyi*. Such enhanced SOD activities were generally in the range of two to threefolds. In contrast to SOD, catalase and glutathione peroxidase activities were not detected at all. These results suggest that *Artemisia argyi* have generated O_2^- in the mitochondria and cytoplasm of H9 cancer cell with concurrent induction of CuZnSOD and MnSOD in situ, which dismutate O_2^- to H_2O_2 . Without coordinated actions of catalase and/or glutathione peroxidase H_2O_2 is easily converted to very toxic $OH\cdot$ and these reactive oxygen species together might have induced necrosis and/or apoptosis of H9 cell.

Keywords □ *Artemisia argyi*, H9 (ATCC HTB 176), cytotoxicity, superoxide, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase.

쑥(*Artemisia herba*)은 일반적으로 황달과 담낭염 치료, 해열, 이남, 항균 등의 작용을 나타내는데 그중에서도 황해쑥(*Artemisia argyi*, 애엽)은 주로 기혈을 다스리고 한습을 몰아내며 온경, 지혈, 안태의 효능이 있고 복부의 냉증에 의한 통증, 도혈, 비출혈, 하혈, 태동불안 등을 치료하며 뜸쑥의 대표적인 재료로 사용되어 왔다.^{1,2)} 이 외에도 쑥은 항균작용과 항암성을 나타내는데 쑥의 종류에 따라서 tumor necrosis factor (TNF)의 priming activity를 나타내고, 정유 성분인 santolina alcohol은 antibacterial activity를 나타내며^{3,4)} 염증 및 항암과 관련된 interleukin-1, interleukin-2,

TNF- α 의 생성과 분비를 촉진 시키고 여러종의 tumor cell line에 대해 세포독성 효과를 나타내는 것이 알려져져왔다.^{5,6)}

현재 암의 치료를 위하여 수술요법, 방사선요법과 더불어 화학요법이 기본으로 처방되는데 이러한 복합치료에도 불구하고 사망율이 50%에 달하며 특히 화학요법에 의한 심각한 독성 때문에 암환자의 치료에 많은 어려움이 따르는 것으로 알려져 왔다.⁷⁻⁹⁾ 이와같은 암치료제의 부작용을 감소시킨 무독성 치료제의 개발을 위해 지난 20여년이 넘는 기간 동안 각국은 치열한 노력을 기울여 왔다. 그러나 현재까지도 실제 항암 효과가 높으면서도 무독성의 이상적 항암제는 출현하지 않고 있으며 공해나 식품의 발암성 물질에 의한 생활환경의 악화¹⁰⁾로 인해 발암이 급증하고 있는 가운데

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-2287-5147 (팩스) 02-396-8758

저독성 내지 무독성 항암제의 개발은 어떠한 경우에도 시급한 실정이다.

항암제 개발의 기초연구와 연계하여 필수적인 발암(carcinogenesis)과 항암(anticancer)의 기작에 대해서는 그동안 수많은 연구가 이루어졌으며 특히 최근의 논거에 의하면 발암과 항암의 경우 모두 분자산소에서 유래하는 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 유도체가 여러가지 원인에 의해 유발된 발암에 직접적으로 관여되어 있다는 사실이 입증되어오고 있다. 활성산소는 O_2 에 전자가 결합하여 부분적으로 환원된 물질로서 superoxide(O_2^-)를 위시하여 H_2O_2 와 $OH\cdot$ 등이 있으며 이들은 반응성이 매우 강하여 생체내 거의 모든 분자들을 무차별 공격하여 암을 비롯한 난치질환의 근원이 되는 것으로 밝혀지고 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 특히 이 활성산소 무리들은 생성된 위치(site)에서 또는 널리 이동을 하면서 세포구성물질의 대부분 즉 lipid, protein, DNA 나아가 transcription factors 등을 파괴하는데 우선 세포막의 구성지질을 과산화하여 lipid peroxyradical과 hydroperoxide를 생성하여 막의 기능이 붕괴됨과 동시에, 각종 proteins 즉 thiol protein을 파괴함으로써 receptors와 enzymes이 변형되고, ion channel의 이상을 초래하여 특히 Ca^{++} 의 통과에 큰 차질을 빚어냄으로서 세포의 signal transduction이 무너지고, transcription factors의 이상을 야기하여¹⁴⁻¹⁵⁾ 핵에서는 DNA-MDA (malondialdehyde) complex와 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG)을 형성하고 deoxyribose의 구조를 변형함으로써 결국 cell proliferation이나 apoptosis에 관련된 genes mutation이 일어나 암세포까지 진행되는 것으로 알려져 있다.^{16,17)} 이렇게 세포에 치명적인 활성산소들의 작용은 carcinogenesis과정중 initiation, promotion은 물론 progress 단계까지 여러 준위에서 영향을 미치고 있음이 속속 밝혀지고 있다.¹⁸⁾

현재 항암 치료의 가장 기본이 되는 항암제의 작용기전이 암세포에 잠재되어 있는 apoptosis(programmed cell death) 작용의 유발에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있는데 ROS 역시 무작위 세포파괴 현상인 necrosis는 물론 apoptosis 유발 과정에 다양한 기전으로 관여하고 있음이 밝혀지고 있음에 따라 항암제의 암세포 사멸과 ROS조거제인 항산화 물질과의 관계 규명이 항암제 개발의 기초 연구로 매우 중요하다고 할 수 있다.¹⁹⁻²²⁾ 따라서 본 연구에서는 천연계 식물중에서

식품으로 사용되어 근원적으로 독성이 배제될 수 있는 쑥으로 부터 무독성 항암제 개발을 위한 기초 연구로서 열수 및 메탄올 추출액을 조제 하여 체계적인 항암효과와 그 작용기작을 검색하기 위하여 백혈병계 세포주인 H9(TIB 176) 세포에 대한 세포독성 효과를 검색하고 나아가 항암과 발암의 주요 조절 인자로 대두되고 있는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD) 활성의 변화를 세포 분획별로 검색하여 우선 쑥의 항암효과와 SOD활성과의 작용기작의 일부를 규명하고자 하였다.

실험방법

재료 및 시약 - 본 실험에서 사용한 황해쑥(*Artemisia argyi*)은 강화도에서 채취후 3년 이상 건조한 제품으로서 서울 경동시장의 동명 약제 상사에서 구입하여 사용하였다. 항암효과의 연구 대상 암세포는 백혈병계 T-lymphocyte 암세포인 H9(ATCC HTB 176 cell)종양 세포로서 한국세포주 은행(서울 대학교 암연구센터)으로부터 분양 받아 사용하였는데 약 6~8개월 간격으로 새로 분양받아서 사용하였다. 배양시약인 RPMI 1610, fetal bovine serum(FBS), culture flasks, pipettes, membrane filters는 Grand Island Biological Co. (Göttingen, Germany)의 제품을 사용하였으며 trypan blue, xanthine, xanthine oxidase는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로 부터 구입하였으며 나머지 시약들은 시판 특급시약을 사용하였다.

쑥의 열수 및 메탄올 추출액 조제 - 쑥이 식품으로 사용되는 경우 섭취 방법은 국이나 나물과 같이 수용성 성분을 대상으로 하는 방법이므로 이와같은 수용성 성분의 효과를 검색하기 위하여 열수 추출액을 조제하고 아울러 유효성분 분리·정제의 출발물질인 메탄올 추출액을 조제하였다. 열수추출액의 경우에는 건조 쑥의 지상부를 세절하여 10g을 평량한 다음 증류수 400ml를 첨가하여 2시간 동안 자비시킨 후 7겹의 gauze를 통과시켜 여과한 후 3000g에서 원심분리하여 상등액을 감압 농축 및 동결건조 시켜 건조추출물을 얻었다. 메탄올 추출액은 건조쑥 10g을 메탄올 200ml에 첨가하여 24시간 방치하고 여과 한 다음 잔류물에 다시 200ml의 메탄올을 가하여 24시간 방치하여 여과한 여액을 초기의 여액과 합하여 감압 농축 및 동결건조 시켜 건조추출물을 얻었다. 두가지 추출

물 모두 사용시에는 필요량을 증류수에 용해시킨 다음 membrane filter로 제균하여 사용하였다.

H9세포 배양 - 분주받은 암세포는 suspended cell의 형태로서 다량 배양시에 50 ml의 culture flask, 소량 배양시에는 conical tube에서 20%의 fetal bovine serum(FBS)을 함유한 RPMI 1640 배지 중에서 배양하였으며 CO₂, 37°C의 환경에서 이루어졌다. 계대 배양은 일주일에 2~3회 시행하였으며 썩 추출액을 첨가한 후 생존된 세포수를 계산하고 세포 분획으로부터 세포질분획과 미토콘드리아 분획을 조제하여 superoxide dismutase(SOD)활성을 측정하였다.

썩추출액의 세포독성 및 세포 생존율 효과 - 썩추출액의 세포사멸 효과를 검색하기 위하여 Thayer의 방법²³⁾을 적용하였다. H9세포를 5×10⁵ cells/ml의 농도로 15 ml의 conical tube에 첨가하여 4일간 배양한 다음(spinner culture), 이 암세포를 다시 1×10⁵ cells/ml의 농도로 24 well plate에 가하고 아울러 썩추출액을 전체 용량의 5% 이내가 되도록 조절하여 첨가한 다음 3일간 동일한 조건에서 배양하였다. 배양 후 각 시료를 균일하게 잘 교반하여 일정량을 취하여 NCI의 방법²⁴⁾에 의하여 hemocytometer로 세포수를 계산한 다음 control의 세포수와 비교하여 세포독성 (cytotoxicity)을 %로 계산하였으며, 아울러 생존해 있는 세포수와 사멸된 세포수를 비교 계산하여 세포 생존율 (viability)을 %로 계산하였다.

SOD enzyme source로서의 subcellular fractions - 50 ml culture flask에서 배양이 끝난 배양물은 9 ml로서 배양 후 3000 g에서 원심분리하여 일단 배지(media)분획과 세포(pellet)분획으로 분리하고, 세포 분획은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 2차례 세척하였다. 세포분획에 1.5 ml의 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 균질화 시킨 다음 15,000 g에서 원심분리하여 상등액을 cytoplasm 분획의 SOD조효소액으로 사용하였으며, mitochondria가 포함된 침전물은 다시 1.5 ml의 상기 buffer를 가하여 1분간격으로 3초씩 5차례 초음파처리를 하여 mitochondria matrix에 함유된 SOD를 용출하여 조효소액으로 사용하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정 - CuZnSOD와 MnSOD활성의 측정은 기본적으로 McCord & Fridovich방법에 의하였다.²⁵⁾ 반응액은

50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8), 1×10⁻⁵ M cytochrome c, 0.05 M xanthine, 0.1 mM EDTA, SOD조효소액을 함유하며 이 용액을 25°C에서 15분간 항온화 시킨 다음 xanthine oxidase를 가하면 반응이 개시된다. Xanthine oxidase 의 양은 흡광도의 증가가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하였다. SOD의 1 unit는 550 nm에서 cytochrome c의 환원 속도를 50% 억제하는 양으로 결정하였다.

Data presentation - 본 연구의 실험은 모두 triplicate set로 두차례씩 수행하였으며 결과는 Mean±SD로 표시하였고 control치로 부터의 유의성 여부는 Student t test를 시행하여 *, p<0.05, **, p<0.01로 표시하였다.

결과 및 고찰

썩의 열수 및 메탄올추출액의 H9 세포에 대한 세포 독성효과 - H9세포에 대한 썩 추출액의 암세포 사멸 효과(cytotoxicity)를 농도에 따라 관찰하였다. 배양 기간은 3일로 고정하였으며 Table I에 제시된 바와 같이 썩의 열수 및 메탄올추출액의 농도를 10 µg/ml부터 200 µg/ml까지 변화시켰을 때 열수의 경우 3.9±2.6% 내지 87.4±12.7%의 세포 독성을 나타내었으며, 메탄올 추출액의 경우 6.2±4.3% 내지 73.5±7.5%를 나타내었다. 이러한 세포독성의 효과는 두가지 추출액의 경우 거의 비슷한 것으로 보아 항암성을 나타내는 유효성분이 상당히 극성이 높거나 또는 항암 성분이 한가지 이상일 가능성이 제시되었다. 본 실험으로부터 약 50%의 세포사멸효과가 나타나는 농도 (IC₅₀) 가 열수추출액의 경우 48.6 µg/ml, 메탄올 추출액의 경우 50.9 µg/ml로 계산되었다. 이 농도는 항암제를 개발하는 경우 추출액의 항암 효과의 IC₅₀ 지표 수준인 20 µg/ml의 세포독성 효과에 비해 미흡하지만 투여량이 많더라도 독성이 적은 항암제를 개발하려는 우리의 의도에는 충분한 농도로 간주되었다. 따라서 차후의 실험은 한편으로는 이 썩추출액으로 부터 유효성분 분리 및 구조결정 실험을 수행하며 본 추출액과 각 fraction에 대하여서는 반응 기작 규명 실험을 병행하여 수행하며 동시에 동물암의 소멸효과도 검색중에 있다.

세포독성효과와 더불어 세포 생존율(viability)의 결과를 보면 control시료의 세포생존율이 약 95%임에

Table I – Cytotoxic activities of hot water and methanol extracts of *Artemisia argyi* against H9 cell line according to the concentration of the extracts

Artemisia concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Hot water extract		Methanol extract	
	Viability (%)	Cytotoxicity (%)	Viability (%)	Cytotoxicity (%)
0 (Control)	95.3 \pm 8.2	0	93.4 \pm 6.7	0
10	88.5 \pm 7.5	3.9 \pm 2.6*	91.2 \pm 7.5	6.2 \pm 4.3*
20	79.5 \pm 8.5*	29.3 \pm 5.4**	81.6 \pm 11.4	18.7 \pm 7.8**
30	54.6 \pm 8.2**	38.5 \pm 11.3**	42.8 \pm 8.9**	41.7 \pm 9.5**
50	42.7 \pm 12.8*	51.5 \pm 8.2**	37.5 \pm 11.3**	49.6 \pm 12.4**
100	30.6 \pm 7.9**	62.8 \pm 13.4**	31.8 \pm 10.5**	67.3 \pm 15.6**
200	13.8 \pm 5.7**	87.4 \pm 12.7**	15.5 \pm 4.9**	91.5 \pm 7.2**

Culture was carried out for 3 days.

비하여 쑥의 첨가량에 비례하여 세포의 생존율이 현저하게 감소하였는데 약 50%의 세포독성 효과가 나타난 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 열수추출액의 경우 42.7 \pm 12.8%와 메탄올 추출액의 경우 49.6 \pm 12.4%로서 약 반 정도의 생존율 값을 나타낸 것을 알 수 있었다. 아울러 세포독성이 심했던 농도인 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 열수추출액의 경우 13.8 \pm 5.7% 그리고 메탄올 추출액의 경우는 15.5 \pm 4.9%로서 쑥추출액을 첨가함으로써 암세포수도 뚜렷하게 감소하였을 뿐 아니라 남아있는 암세포의 온전성마저도 심하게 손상받았음을 알 수 있었다. 그 이유는 여러가지로 추정할 수 있으나 무엇보다도 necrosis와 apoptosis의 촉발제로 밝혀진 활성산소와의 관계를 규명하는 것이 우선일 것으로 간주되었다.

이 실험과 아울러 배양기간에 따른 쑥추출액의 세포독성효과와 생존율의 변화도 관찰하였다. 그 결과는 Table II에 제시된 바와 같이 쑥추출액의 농도를 약 50%의 세포독성 효과가 나타났던 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 고정하고 배양기간은 1일, 3일, 5일, 7일 까지 관찰하였다. 7일 이후에는 거의 모든 세포가 사멸되어 한 개도 발견되지 않은 경우 즉 세포독성이 100%인 경우가 자주 발견되었다. 실험 결과에 의하면 배양기간 1일째에는 두 추출액의 경우 오히려 세포수가 증식하는 양상을 보였다. 반면에 배양 2일째부터 10%내외의 세포독성을 보이다가 3일째에 열수와 메탄올 추출액 모두 57.5 \pm 7.2%와 43.8 \pm 12.7%의 뚜렷한 세포독성 효과를 나타내었다. 이 효과는 배양기간이 증가함에 따라 비례하여 증가하였으며 배양기간 7일째에는 두가지 농도의 경우 모두 80%이상의 세포사멸 효과를 나타내었다. 세포독성과 함께 변화하는 생존율 역시 세포배양일수에 비례하여 현저하게 감소하여 배양일 7일째에는 10~20% 정도의 낮은 생존율을 보임으로서 쑥추출액

은 암세포를 사멸시키거나 암세포증식을 억제할 뿐 아니라 심한 세포손상을 유발하게 됨을 알 수 있었다.

이상의 Table I과 Table II의 결과로부터 쑥추출액은 H9 암세포 사멸효과를 나타내었으며 이 효과는 쑥추출액의 농도와 배양기간에 의존하는 것을 밝혔다. 아울러 이들 세포독성효과는 쑥의 열수 추출액과 메탄올 추출액의 경우 모두 유사하였으며 다만 열수추출액의 경우가 조금 더 효과적이었으므로 다음 실험에서는 열수추출액을 선택하여 적용하였다. 이와같은 쑥의 세포독성효과가 최근 세포 사멸의 기본 기작의 근거로 설명되고 있는 apoptosis유발 현상이나 necrosis 현상과 연관성이 있는지 나아가 이들의 촉발제로 밝혀지고 있는 활성 산소^{20-22,26,31}와 그 소거제기능을 가진 항산화효소 즉 SOD 효소²⁹⁻³¹활성과의 관계를 측정하여 보았다.

쑥추출액에 의한 세포분획의 SOD활성 – 활성산소인 O_2 의 소거효소인 SOD는 세포의 부위에 따라 종류와 세부기능이 각각 다르다는 사실이 밝혀져왔는데 진핵세포의 경우 세포질(cytoplasm)에는 CuZnSOD, 미토콘드리아(mitochondria)에는 MnSOD 그리고 세포외액(extracellular fluid)에는 세포질의 것과는 형태가 다른 CuZnSOD, 이외에 미생물에는 FeSOD의 존재가 각각 증명되었다.²⁷⁻³¹ 이중에서 특히 미토콘드리아의 MnSOD가 암의 발생과 억제에 긴밀하게 작용한다는 실험결과에 의해 MnSOD의 유전자를 항암 유전자(cancer suppressor genes)로 간주하는 경우도 있어왔다.^{27,30,31} 따라서 앞선 쑥의 암세포사멸효과가 활성 산소 소거제인 SOD와 어떠한 관계를 지니는가를 규명하고자 세포독성에 따른 세포 분획의 SOD활성 변화를 측정함으로써 그 상관 관계를 검색하여 보았다. 우선 세포독성을 확립하기 위한 조건으로 적정농도의 쑥

Table II – Cytotoxic activities of boiling water and methanol extracts of *Artemisia argyi* against H9 cell line according to the culture period.

Culture period (days)	Hot water extract		Methanol extract	
	Viability (%)	Cytotoxicity (%)	Viability (%)	Cytotoxicity (%)
0	93.5 ± 5.7	0	95.7 ± 2.8	0
1	84.2 ± 7.5	-5.7 ± 2.1	83.2 ± 7.2*	-7.9 ± 3.1
2	66.8 ± 12.3*	18.7 ± 4.2**	71.5 ± 8.9**	19.3 ± 4.7**
3	55.7 ± 11.4**	51.5 ± 7.2**	44.6 ± 10.3**	47.8 ± 12.7**
5	34.7 ± 7.5**	69.4 ± 8.5**	38.5 ± 9.4**	70.3 ± 9.3**
7	18.6 ± 5.2**	87.1 ± 14.7**	20.2 ± 5.9**	81.3 ± 11.5**

The concentration of *Artemisia argyi* extract was 50 µg/ml.

추출액과 배양기간을 적용하여 세포독성을 유발하고 배양이 끝난 다음에 암세포의 세포분화화를 시행하여 세포질, 미토콘드리아 및 배지분획의 SOD활성분석을 시행하였다.

Table III~V까지의 결과 표시중 total SOD는 CuZnSOD와 MnSOD 활성을 합한 값이며 이중 MnSOD 값은 분리 측정하여 표시하였다. 배지에서의 SOD활성 변화의 결과는 Table III에 제시하였는데 control시료의 경우에도 약 1~2 units/ml의 SOD활성이 나타난 것은 배지에 첨가한 FBS에 함유되어 있던 SOD 때문인 것으로 간주된다. 썩의 농도증가와 배양 기간에 따라 total SOD와 MnSOD값이 함께 증가하는 양상을 보였는데 total SOD 증가정도는 배양기간 3일째에 10 µg/ml의 경우 1.6±1.1 units/ml에서 100 µg/ml일 때는 3.8 units/ml로서 약 2.4배정도 증가하였다. 이 때 MnSOD 활성 역시 증가하였으며 10 µg/ml 농도인 경우 0.4±0.2 units/ml로 부터 100 µg/ml이었을 때 2.5±0.5 units/ml로서 약 6배정도의 현저한 증가양상을 나타내었다. 이와같이 배양 3일 째에 썩의 농도에 준하여 total SOD와 MnSOD활성이 증가하는 것은 배양기간 5일 째의 경우에도 마찬가지였으며 total SOD는 약 2배, 그리고 MnSOD는 약 3배 정도 씩 증가하는 것으로 나타났다. 이상과 같은 Table III

의 결과는 H9암세포에 썩을 가하면 상당한 세포가 사멸하며 이때 암세포내에 활성산소인 O₂가 발생하며 이 독성물질로 부터 암세포자신을 보호하기 위하여 MnSOD와 CuZnSOD의 활성이 세포내에서 증가하지만 워낙 역부족으로 결국 암세포는 사멸되면서 이 두 가지 SOD는 배지내로 용출되어 나온 것으로 시사된다. 그동안 항암현상에는 주로 MnSOD활성 증가가 언급되어 왔지만^{27,30,31} 본 결과에 의하면 CuZnSOD효소 역시 상당히 증가하는 것을 보아 썩의 열수추출액은 암세포내에서 광범위한 O₂⁻ 유발을 하는 것으로 해석할 수 있다.

배지의 SOD활성의 증가현상은 결국 암세포내 SOD활성의 증가를 반영한 결과이므로 다음으로 cytoplasm 분획과 mitochondria 분획의 SOD활성에 대한 썩추출액의 첨가효과를 Table IV와 Table V에 각각 제시하였다. 우선 Table IV의 경우는 cytoplasm분획의 SOD의 활성변화를 측정한 것으로 역시 CuZnSOD와 MnSOD 활성의 변화치를 썩추출액의 농도와 배양기간의 차이에 따라 측정하여 나타내었다. 결과에서 썩추출액의 농도가 10~100 µg/ml으로 변화하는 동안에 배양 3일째에 total SOD활성과 MnSOD 활성 모두 2~3배씩 증가하는 양상을 보였으며, 배양 5일째에는 절대 수치는 3일째의 것보다 더 증가되었지만 변화양

Table III – Changes of superoxide dismutase (SOD) activities of media fraction of H9 cells cultured for 3 and 5 days according to the concentrations of *Artemisia argyi* water extract.

Artemisia concentration (µg/ml)	SOD activities (units/ml)			
	3 days		5 days	
	Total SOD	MnSOD	Total SOD	MnSOD
0	1.7 ± 0.5	0.3 ± 0.1	1.9 ± 0.8	0.6 ± 0.4
10	1.6 ± 1.1	0.4 ± 0.2	2.4 ± 1.3	1.5 ± 0.5
20	2.9 ± 0.6	1.1 ± 0.5*	3.6 ± 0.4*	1.9 ± 0.8*
50	3.4 ± 0.2**	1.8 ± 1.3	5.3 ± 0.5**	3.8 ± 0.7**
100	3.8 ± 0.9*	2.6 ± 0.5**	4.7 ± 1.3*	3.4 ± 1.1**

Table IV – Changes of superoxide dismutase (SOD) activities of cytoplasm fraction of H9 cells according to the *Artemisia argyi* concentration and incubation period.

Artemisia concentration (μg/ml)	SOD activities (units/10 ⁸ cells)			
	3 days		5 days	
	Total SOD	MnSOD	Total SOD	MnSOD
0	1.7 ± 0.4	0.3 ± 0.2	1.7 ± 0.5	0.3 ± 0.1
10	1.7 ± 0.8	1.1 ± 0.7**	2.5 ± 0.6	1.7 ± 0.8*
20	2.8 ± 0.4**	1.9 ± 0.8*	3.7 ± 1.1*	2.9 ± 0.4**
50	4.6 ± 1.1**	3.8 ± 0.7**	4.9 ± 1.4**	2.9 ± 0.6**
100	5.5 ± 1.8**	3.2 ± 0.5**	6.4 ± 1.3**	4.2 ± 1.8*

Table V – Changes of superoxide dismutase (SOD) activities of mitochondria fraction of H9 cells according to the *Artemisia argyi* concentration and incubation period

Artemisia concentration (μg/ml)	SOD activities (units/10 ⁸ cells)			
	3 days		5 days	
	Total SOD	MnSOD	Total SOD	MnSOD
0	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.5	1.4 ± 0.4
10	1.8 ± 0.8	1.9 ± 0.7	1.9 ± 0.8	1.5 ± 0.5
20	2.6 ± 0.7*	2.1 ± 0.8*	3.4 ± 1.1*	3.5 ± 1.2*
50	4.1 ± 1.5*	3.1 ± 1.6*	5.6 ± 1.6**	4.7 ± 2.1*
100	3.9 ± 1.5*	4.1 ± 1.3**	6.2 ± 1.7**	5.3 ± 1.8*

상은 3일째의 결과와 찬가지로 total SOD와 MnSOD 모두 약 2~3배의 증가 양상을 보였다. 이 결과로 부터 H9암세포에 쑥추출액을 첨가하면 세포독성과 더불어 cytoplasm의 CuZnSOD^{30,32)}는 물론 mitochondria^{16,27,32)}에서 누출되어 나왔을 MnSOD 활성 까지도 크게 증가함을 알 수 있으며 이 과정에 과격한 mitochondria막구조물을 포함 한 막구조물의 파괴가 일어났을 가능성이 시사되었다.

다음으로 동일한 조건에서 수행한 mitochondria의 CuZnSOD와 MnSOD활성 변화의 결과는 Table 5에서 보다시피 쑥의 농도와 배양기간에 따라 SOD활성이 증가하는 사실은 Table III이나 Table IV의 결과와 매우 유사하지만 특히 total SOD를 구성하는 효소종류가 배양 3일째와 5일째 모두 약 80~100% MnSOD인 것으로 보아 mitochondria에서 작용하는 SOD형태는 MnSOD라는 것이 뚜렷하며 동시에 cytoplasm내에서 증가되었던 CuZnSOD효소는 mitochondria 내로는 별로 진입하지는 않는 것으로 보아진다. 따라서 쑥추출액에 의해 H9암세포가 사멸되어 가는 과정 중에 활성 산소인 O₂⁻가 아마도 cytoplasm과 mitochondria내에서 각각 생성되며 그에 상응하는 소거제인 CuZnSOD와 MnSOD가 각각 유발되어지며 이들은 급격히 부실해진 막구조를 통과하여 서로 혼입되지만 그러한 과정

중에서도 mitochondria로 부터 MnSOD가 일차적으로 cytoplasm내로 진입하며 다음으로 cytoplasm내의 CuZnSOD와 혼입된 MnSOD가 함께 세포막을 통과하여 배지로 까지 누출되는 일방적인 배향을 취할 가능성이 시사되었다.

이상의 결과를 종합하여보면 H9암세포에 쑥추출액을 가했을 때 세포독성과 더불어 CuZnSOD와 MnSOD활성이 크게 증가하는 사실을 발견할 수 있었는데 이 사실은 쑥추출액에 의해 암세포내에서 O₂⁻이온이 생성되며 연이어 증가된 SOD활성은 O₂⁻으로 부터 H₂O₂를 생성하는데 이 H₂O₂의 대사경로가 세포 사멸과 관련하여 매우 중요하다고 볼 수 있는데 왜냐하면 H₂O₂는 다른 활성산소와 달리 생성부위에서 멀리까지 이동을 하면서¹¹⁻¹⁵⁾ 세포내 구성물질을 공격하므로 잠재적 독성이 큰 ROS이기 때문이다. 이렇게 O₂⁻에서 시작된 활성산소의 독성을 무독화 시키기 위해서는 SOD와 함께 H₂O₂의 분해효소인 catalase나 glutathione peroxidase 효소활성이 연계되어 H₂O와 O₂까지 완전히 분해되어야만 비로서 활성산소의 독성을 피할수 있게된다.^{12-15,32)} 만일 catalase나 glutathione peroxidase효소가 연계되지 않으면 H₂O₂는 Fenton reaction을 통해 Fe나 Cu와 같은 transient metal의 존재하에 자발적으로 맹독성인 OH·를 생성하여 생

체는 더욱 위험에 노출되게 된다. 이 OH·은 너무 독성이 심하여 이물질을 분해할수 있는 효소마저도 존재하지 않는 독성물질^{11,15)}로서 본연구에서 나타난 H9암세포의 사멸 역시 결국은 이 OH·에 의한 가능성이 크다고 볼 수 있다. 본 논고의 결과에 표시하지는 않았지만 그동안 본연구실에서 수행한 여러 실험계중 쑥추출액의 첨가에 의해 SOD활성은 H9암세포를 위시하여 TIB 67 세포, SNU-1 세포 등에서 모두 현저히 증가하였으나 catalase와 glutathione peroxidase효소활성은 거의 측정되지 않았다. 따라서 결론적으로 쑥에 의한 H9암세포의 사멸은 아마도 쑥추출물이 일차적으로 암세포내에 O₂⁻을 유발하고 연이어 H₂O₂ 그리고 맹독성인 OH· 등의 활성산소들이 생기며 이들이 apoptosis 또는 necrosis를 촉발시키는 것으로 추정할 수 있는데 이때 항산화소거제인 소거제인 catalase 및 glutathione peroxidase효소활성이 유발되지 않는 점도 H9암세포 사멸의 주요한 원인이 될 것으로 사료되었다.

결 론

황해쑥(*Artemisia argyi*)의 열수 및 메탄올 추출액은 H9(ATCC HTB 176) 암세포에 대하여 IC₅₀의 농도가 각각 48.6 µg/ml과 50.9 µg/ml로서 상당한 세포독성을 나타내었다. 세포독성은 황해쑥 추출액의 농도와 배양기간에 비례하였다. 이 황해쑥 추출액을 첨가하면 암세포의 세포질 분획과 미토콘드리아분획의 CuZnSOD와 MnSOD 활성이 두배 내지 세배정도 증가하였으며 SOD와 달리 catalase와 glutathione peroxidase 활성은 전혀 검출되지 않았다. 이 결과를 종합하여 보았을 때 황해쑥은 H9 암세포의 세포질과 미토콘드리아에서 O₂⁻를 생성시키며 동시에 O₂⁻를 H₂O₂로 전환시키는 CuZnSOD와 MnSOD효소를 유발시키지만 catalase와 glutathione peroxidase 효소는 유발되지 않으므로 H₂O₂는 결국 맹독성인 OH·이 되며 이 OH·이 주로 암세포의 necrosis 또는 apoptosis를 야기하는 것으로 추정된다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 학술 연구비(BSRI-97-3445)에 의하여 지원 되었습니다.

문 헌

- 1) 鄭善燮, 辛民教, 鄉藥 大事典 pp. 1009-1020 永林社 (1989).
- 2) 陸昌壽, 韓國藥品 食品 資源 圖鑑, 眞明 出版社 p. 385 (1981).
- 3) Park, K. Y., Ha, J. O., Yu, J. B., Lee, J. H. and Park, J. C.: Antimutagenic Effect of Some *Artemisia* Species. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 96 (1996).
- 4) Yashipe, J., Segal, R., Breuer, A. and Naftali, G.: Antibacterial *Artemisia herba*. *J. Pharmac. Sci.* **68**(7), 924 (1979).
- 5) Xu, Q., Mori, H., Sakamoto, O., Uesugi, Y. and Koda, A.: Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of crude drugs on tumor necrosis factor production. *Int. J. Immuno-pharmacol.* **11**, 607 (1989).
- 6) Mori, H., Xu, Q., Sakamoto, O., Uesusi, Y., Koda, A. and Nishioka, I.: Mechanisma of antitumor activity of aqueous extracts from Chinese herbs, and their immunological properties. *J. Pharmacol. (JPN)*, **49**, 423 (1989).
- 7) Parker, S. L., Tong, T., Bolder, S. and Winggo, P. A.: Cancer Statistics. *Cancer J. Clin.* **46**, 5 (1996).
- 8) Bailer, J. C. and Gorrnick, H. L.: Cancer undefeated. *N. Eng. J. Med.* **336**, 1569 (1997).
- 9) Astrow, A. B.: Rethinking Cancer. *The LANCET* **343**, 494 (1994).
- 10) Minamoto, T., Mai, M. and Ronai, Z.: Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis* **20**, 519 (1999)
- 11) Cerutti, P. A.: Oxyradicals and cancer. *The LANCET* **344**, 862 (1994).
- 12) Roberbroid, M. and Calderon, P. B.: Definitions, properties and reactions of radicals. *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems*, Marcel Dekkor Inc. New York, p. 11 (1995).
- 13) Poegelle, B., Reiter, R.J., Tan, D. X., Chen, L. D. and Manchester, L. C.: melatonin, hydroxy radical mediated oxidative damage and aging. *J. Pineal Res.* **14**, 151 (1993).
- 14) Rice-Evance, C. and Burdon, R.: Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* **32**, 71 (1993).
- 15) Chessman, K. H.: Tissue injury by free radicals.

- Toxicol. Indust. Health* **9**, 39 (1993).
- 16) Reitter, R.: Oxidative process and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *The FASEB J.* **9**, 526 (1995).
 - 17) Sen, C. K. and Packer, L.: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB J.* **10**, 708 (1996).
 - 18) Guyton, K. Z., Gorospe, M. and Holbrook, N. J.: *Oxidative stress, gene expression and the aging process.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.247 (1997)
 - 19) Markesbery, W. R.: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer Disease in *Free Radical Biology and Medicine* Elsevier Science Inc. **23**, 134 (1997)
 - 20) Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S. and Kolaja, K. L.: The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* **106**, 289 (1998).
 - 21) Bursch, W., Oberhammer, F. and Schulte-Hermann, R.: Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Tips* **13**, 145 (1992).
 - 22) Dixon, S., Soriano, B. J., Lush, R. M., Bommer, M. M. and Figg, W. D.: Apoptosis: its role in the development of malignancies and its potential. *Annals of Pharmacother.* **31**, 76 (1997).
 - 23) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watts, G. L.: Cytotoxicity assays with L 1210 cell *in vivo* and KB cells *in vitro*. *Cancer Chemotherapy Reports* (part 2), 2, April (1971).
 - 24) National Cancer Institute USA: Cell culture screen, KB. Protocol 1600, *Cancer Chemother. Rep.* (part 3) **3**, 17.
 - 25) McCord, J. M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase (SOD) assay. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
 - 26) Lopez-Torres, M., Perex-Campo, R., Rojas, C., Cadens, S. and Barja, G.: Free Radical Biol. Med. **15**, 133 (1993).
 - 27) Bravard, A., Sabatier, L., Hofschir, F., Ricoul, M., Luccioni, C. and Dutrillaux, B.: SOD 2: a new type of tumor suppressor gene? *Int. J. Cancer* **51**, 476 (1992).
 - 28) Harris, C. A., Derbin, K. S., Hunte-McDonough, B. and Epstein, L. B.: Manganese superoxide dismutase is induced by IFN- γ in multiple cell types. *J. Immunol.* **147**, 149 (1991).
 - 29) McCord, J. M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: an enzymic function of erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
 - 30) Reiter, R. J.: Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB J.* **9**, 526 (1995).
 - 31) Southern, P. A. and Powis, G.: Free radicals in medicine. *Mayo Clin. Proc.* **63**, 381 (1988).
 - 32) Roberfroid, M. and Calderon, P. B.: Antioxidants and radical scavengers: some therapeutical uses. *Free Radicals and Oxidative Phenomena in biological Systems*, Marcel Dekkor Inc. New York. p. 193 (1995)
 - 33) Takizawa, S., Matsushima, K. and Shinohara, Y., Ogawa, S., Kormatsu, N., Utsunomiya, H., Watanabe, K.: Histochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain. *J. Neurolog. Sci.* **122**, 66 (1994).
 - 34) Urshini, F.: Selenium-dependent peroxidase (ed) Paolletti, R., Samuelson, B., Cataparro, A. L., Poli, A., Rinnetti, N., *Oxidative processes and antioxidants*, Raven Press Ltd. New York, p. 25 (1994).