

## 황해속 추출정제물 SD-994의 L1210 암세포에 대한 세포독성과 항산화효소의 유발

정대영 · 하혜경 · 김안나 · 이승민 · 민태진\* · 박시원#

상명대학교 자연과학부 화학전공, \*동국대학교 이과대학 화학과

(Received March 28, 2000)

### Cytotoxicity of SD-994 from *Artemisia argyi* against L1210 Cells with Concomitant Induction of Antioxidant Enzymes

Dae Young Jung, Hye Kyung Ha, An Na Kim, Seung Min Lee,  
Tae Jin Min\* and Sie Won Park#

#Department of Chemistry, Division of Natural Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

\*Department of Chemistry, College of Science, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

**Abstract** — SD-994 was prepared from methanol extract of *Artemisia argyi* by stepwise purification of solvent partitioning and silica gel chromatography. In the course of this purification, fractions obtained at each step were investigated for their cytotoxicities against L1210 cells. Fractions A~G prepared from chloroform fraction showed considerable cytotoxicities ranging 40~90% against L1210 cells. Subfractions I~IX obtained from fraction A exhibited various cytotoxicities and subfraction I (SD-994) was found to be the most effective compound. IC<sub>50</sub> values of SD-994 were measured to be 0.5 µg/ml and less than 0.05 µg/ml against L1210 cells and normal lymphocytes, respectively. When SD-994 was added to L1210 cell as cytotoxic agent, significantly increased amount of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and dramatically augmented activities of superoxide dismutase (SOD), specially MnSOD and glutathione peroxidase (GPx) were observed according to the concentration and incubation time. Whereas, in case of normal lymphocytes under the same condition, cytotoxicities were not apparent and the generation of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) or the activity changes of SOD and GPx were insignificant. These results together indicate that the cytotoxic action of SD-994 against L1210 cell may be achieved *via* necrosis and/or apoptosis induced by reaction oxygen species which could not probably be completely abolished even by drastically increased antioxidant enzymes, SOD and GPx activities.

**Keywords** □ *Artemisia argyi*, SD-994, L1210 cells, cytotoxicity, superoxide, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx).

현재 암(Cancer)은 모든 질환 중에서 가장 난치병으로서 초기암일 경우 수술요법이 매우 효과적이지만 전이가 되었거나 말기암의 경우에는 적용할 수가 없으므로 화학요법제인 항암제가 주 치료법으로 투여되고 있는 실정이다. 실제로 암이 발견되는 경우는 거의 대부분 초기암이 아니고 전이의 단계에 접어든 경우가 훨

씬 많기 때문에 화학요법에 의한 암치료는 암치료방법의 핵심이 되고 있다고 볼 수 있다.

저자들은 그 동안 완화된 약리 작용이 있으면서도 식품으로 사용되는 천연 재료로부터 가능한 무독성 항암제를 개발하고 자 연구를 해오고 있는 중에 황해속(*Artemisia argyi*) 으로부터 유의성 있는 결과를 얻어 연구를 진행중에 있다.<sup>1,2)</sup> 속(*Artemisia herba*)은 국화과(Compositae)의 다년생 식물로 주로 식품으로 사용되는 한편 부작용이 없는 말라리아 치료제인 artemisinin의 원

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

료, 탁월한 간염치료제, 뜸쪽의 재료, 하복부 냉증 개선제 등에 두루 사용되어 왔다. 이외에도 최근 들어 썩의 항세균활성, 항암활성등이 보고되고<sup>3-9)</sup> 있는 점과 연계하여 썩으로 부터의 항암제 개발을 위해 동물실험과 암세포주 대상으로 세포독성(cytotoxicity) 실험을 수행하였으며 동시에 무독성의 확인을 위하여 L1210 cells에 상응하는 normal lymphocytes에 대하여 독성도(toxicity)를 확인하고 나아가 암을 비롯한 난치병의 원인과 치료의 관점에서 주요 핵심물질로 대두되고 있는 활성산소 소거효소의 활성변화를 측정함으로써 썩 추출정제물인 SD-994의 항암작용 기작의 일부를 규명하고 자 하였다.

활성산소(reactive oxygen species, ROS)란 O<sub>2</sub>가 전자전달계에 의해 H<sub>2</sub>O까지 환원되어 가는 중에 전자(e<sup>-</sup>) 한 개씩에 의해 순차적으로 환원되면서 생성되는 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH· 과 과생 유도체들이다. 이들은 에너지가 높고 불안정하면서 반응성이 강하여 세포구성 물질을 파괴하며 결국에는 암으로까지 진행되는 것으로 알려지고 있다.<sup>10-12)</sup> 실제 생명체는 끝없이 생성되는 유해한 활성산소에 대해 겹겹의 분자적 항산화 장치를 마련하고 있으며 그중의 한 그룹인 항산화효소계로는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GPx)등이 있다.<sup>13-17)</sup> 특히 미토콘드리아의 MnSOD gene에는 항암유전자<sup>18)</sup>라는 제안이 제기되었을 정도로 암과 항산화계의 밀접한 관계가 제시되고 있음에 착안하여 본연구에서는 SD-994의 항암효과와 항산화효소인 SOD, GPx, catalase 효소 활성 사이에 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

### 실험방법

**재료** - 황해썩은 강화도에서 채취하여 3년이상 건조된 제품을 구입하였으며 L1210 cell과 기타 암세포주는 서울대학교 부설 암연구소로 부터 분양받아 사용하였다. 배양에 필요한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum, culture flask 등은 Grand Island Biological Co.(New York, USA)로 부터 구입하였으며 membrane filter는 Sartorius Co. 그리고 ICR mouse는 국제 실험동물센터로부터 구입하여 사용하였다.

**황해썩으로부터 항암성분의 계통적 추출 분리** - 황해썩은 건조된 지상부 100 g을 세절하여 70% 메탄올을

500 ml 가하여 24시간 동안 실온에서 방치하였다. 상등액은 8겹의 gauze로 여과시켜 여액을 회수하고(1차 추출액) 잔사에 다시 500 ml의 메탄올을 가하여 24시간 방치하여 재차 여과하여 여액을 회수 한 다음 1차 추출액과 합하여 감압 농축하였다. 메탄올 추출액으로부터 용매극성에 따라 계통분리한 각 분획의 조제 방법은 Scheme 1에 표시하였으며 본논문의 중심 물질은 SD-994로 표시한 정제물로서 TLC와 용점의 검색에 의하여 확인하였다. 정제과정중 필요한 분획에 대해서는 L1210세포와 더불어 normal lymphocyte에 대해서도 세포독성 검사를 시행하였다.

**동물 실험** - 4주령 썩의 ICR mouse를 구입하여 2주일 동안 실험실 조건에 적응시키면 체중이 약 18~22 g이 된다. 이때 복수암의 형태로 계대 보존하였던 Sarcoma 180을 mouse로 부터 채취하여 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 조절한 후 100 µl/20 g body weight로 복강에 주입하였다. 주입 후 24시간 썩부터 검사하고자 하는 황해썩의 methanol extract를 10 µg/100 µl로, 그리고 황해썩에서 최종적으로 분리 정제하여 항암성분으로 선택한 SD-994를 1 µg과 2 µg/100 µl의 농도로 제조하여 10일간 매일 100 µl/20 g body weight로 경구투여 하면서 사망일자를 검사하였다. 이 결과를 복수암만 유도시킨 대조군의 사망일자와 비교하여 백분율(%)로 비교함으로써 생명연장 효과 즉 항암효과의 일부로 간주하였다. 각 실험군의 동물은 6마리였다.

**세포배양, 세포독성 검사, 항산화효소 용액 조제** - L1210 세포는 생쥐에서 유래한 leukemia cell로서 계대 배양은 3~4일에 한 번씩 시행하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 humidified condition이었으며 세포독성 검사는 NCI방법<sup>19)</sup>의 protocol에 준하여 24 well plate에 10<sup>6</sup> cells/ml의 세포를 가한후 3일간 배양하고 그 세포수의 변화를 hemocytometer로 계산하여 control 세포수에 대한 감소를 백분율(%)로 나타내었다. 한편 황해썩으로부터 얻은 각 분획의 세포독성과 연관된 L1210 세포내 항산화효소 활성변화를 검색하기 위해서는 50 ml culture flask에 10<sup>6</sup> cells/ml농도의 seed cells 0.9 ml과 DMEM 배지 8.1 ml 가하여 총량을 9 ml로 조절한 후 일정기간 배양한 후 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액은 배지분획으로 회수하고 침전인 세포분획에 대해서는 0.1M phosphate buffer 1.5 ml를 가하여 Elvejehn homo-

genator로 10초씩 5차례 균질화 하였다. 이 균질액은 다시 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 세포질 분획으로 취하고 미토콘드리아를 포함하는 침전 분획은 다시 1.5 ml의 동일 buffer를 가하여 Sonics & Materials Inc. 의 sonicator로 10초씩 5차례 초음파처리를 하여 미토콘드리아의 matrix 존재하는 것으로 알려진 MnSOD효소를 노출하여 미토콘드리아 분획의 항산화효소의 조효소액으로 사용하였다.

**Normal lymphocytes 분리** - ICR mouse로 부터 normal lymphocytes를 조제하는 방법은 기본적으로 Boyum의 방법을 적용하였다.<sup>20)</sup> ICR mouse로 부터 venous blood를 EDTA를 함유한 용기에 신속하게 모은 다음 약 1시간 이내에 모든 조작을 수행하였다. 실온에서 15 ml의 conical test tube에 3 ml의 dextran 유도체인 histopaque를 가한 다음 혈액 3 ml를 조심스럽게 layering 하여 400 g에서 정확히 30분간 실온에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 pasteur pipette로 plasma인 상층부를 취하여 버리고 다음으로 lymphocyte를 포함하는 불투명한 중간층을 취하여 이 중간층에 10 ml의 phosphated buffered saline(PBS)을 가하여 조심스럽게 섞었다. 이 분산액을 250 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 pellet를 10 ml의 DMEM(5% FBS) 배지에 현탁한 다음 다시 250 g에서 10분간 원심분리 하였다. 이 마지막 세척 조작을 다시 한번 반복하여 최종적으로 배양액에 현탁하여 세포수를 계산 한 다음 세포배양에 사용하였다. 배양은 DMEM 배지에 streptomycin과 penicillin을 1 µg/ml의 농도로 첨가하여 primary culture를 시행하였다.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 정량** - SD-994에 의해 생성되는 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 정량은 O<sub>2</sub><sup>-</sup>이온이 ferricytochrome을 ferocytochrome으로 환원하는 반응을 응용한 것이다. 1 µg/ml농도의 SD-994를 첨가하여 1일과 3일 동한 배양한 후 원심분리하여 수거한 L1210 세포를 24 well plate에 10<sup>6</sup> cells/well, 700 µl의 PBS buffer, 50 µl의 cytochrome c 용액 그리고 O<sub>2</sub><sup>-</sup>이온 발생 촉진제로 50 µl의 phorbol myristate acetate(5 µg/ml)을 첨가하여 60분간 incubation한 다음 원심분리하고 상등액 200 µl를 buffer로 1 ml까지 희석하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferricytochrome c의 환원 반응은 21.1 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>의 extinction coefficient를 적용하여 계산하였으며 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 생성량은 O<sub>2</sub><sup>-</sup> nmoles/10<sup>6</sup> cells/60 min으로 나타내었다.

**Superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GPx) 효소분석** - 항산화효소의 대표격인 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GPx), catalase 효소활성의 측정은 보고된 방법에 준하였다. SOD의 측정방법은 McCord & Fridovich 의 방법<sup>21)</sup>에 의하였으며 반응액은 50 mM potassium phosphate buffer, 1×10<sup>5</sup> M cytochrome c, 0.05M xanthine, 0.1 mM EDTA. SOD 조효소액을 함유하며 이 용액을 25°C에서 15분간 항산화시킨 다음 xanthine oxidase를 가하여 반응이 개시된다. Xanthine oxidase의 양은 흡광도의 증가가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하였다. SOD의 1 unit는 550 nm에서 cytochrome 환원 속도를 50% 억제하는 양으로 결정하였다.

Catalase활성의 측정은 Maral *et al.* 의 방법<sup>22)</sup>에 준하여 250 nm, 20°C에서의 흡광도감소를 근거로 이루어졌다. 반응액 1 ml에는 50 mM의 potassium phosphate buffer(pH 7.4), 12.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalase 조효소액이 함유되며 흡광도는 10초간격으로 5분간 측정하였으며 활성값은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nmoles degraded/min/10<sup>8</sup> cells로 표시하였다.

GPx활성의 측정은 Matsuo의 방법<sup>23)</sup>에 의하여 tertiarybutylhydroperoxide를 기질로 하여 이루어졌다. 반응액 1 ml에는 5 mM EDTA, 0.134 mM NADPH, 2 mM reduced glutathione, 1 u/ml glutathione reductase, enzyme solution을 함유하며 37°C에서 수분간 예열시킨 다음에 최종적으로 0.16 mM tertiary butylhydroperoxide를 첨가하여 340 nm에서 NADPH의 산화에 의한 흡광도 감소를 10초 간격으로 기록하였다. GPx활성은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nmoles degraded/min/10<sup>8</sup> cells로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

**황해속의 메탄올 추출액과 SD-994의 암유발 동물의 생명연장 효과** - 황해속에서 분리한 물질들의 항암효과와 항산화효소와의 관계를 실험하기 전에 우선 항암 효과의 일환으로 암유발동물의 생명연장 효과를 검색하였다. Table I에 표시되어 있듯이 메탄올 추출액은 암을 유발시킨 쥐보다 평균 4.5일 정도 더 살아 18.36%의 생명연장을 나타냈고, SD-994의 경우 1 µg/20g body weight에서는 5.3일 그리고 2 µg/20 g

body weight의 농도에서는 약 6일 정도 더 살아 각각 17.67%와 25.83%의 생명연장 효과를 나타내었다. 이 결과로부터 황해쑥의 메탄올추출액과 그 추출액으로부터의 최적 정제물인 SD-994는 Sarcoma 180으로 발암된 mouse의 종양을 제거하지는 못하였어도 생명을 연장하는 효과가 비교적 높은 것으로 판단되었다.

다음으로 황해쑥의 메탄올 추출액으로부터 최종적으로 항암물질인 SD-994를 정제하여가는 과정에서 얻어진 중간 분획들 즉 chloroform 분획, 이 chloroform 분획으로부터 얻어진 subfraction I~IX에 대해 L1210 암세포주에 대한 세포독성과 정상세포에 대한 안전성의 검색을 위하여 정상 세포인 normal lymphocytes에 대한 독성을 측정하였으며 최종적으로 얻어진 SD-994에 대해서는 반응 기작의 규명을 위하여 활성산소 및 항산화효소와의 관계를 실험하여 그 결과를 다음에 순차적으로 제시하였다.

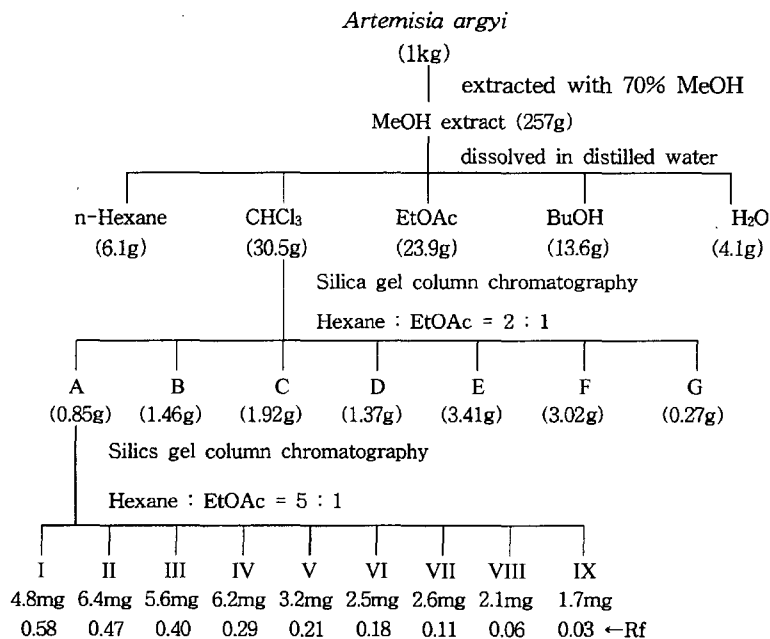
**Chloroform추출물의 분획 A~G의 암세포주에 대한 세포독성** - 황해쑥의 methanol extract가 동물실험에서 생명연장 효과가 있음을 토대로 이 methanol extract로부터 항암 성분을 체계적으로 분리 정제하기 위하여 용매의 극성에 따라 silica gel chromatography를 순차적으로 시행하였다. 본 연구실에서는 이미 황해쑥

의 열수추출액과 메탄올추출액은 HTB 176, TIB 67, SK-Mel-1, SNU-1 암 세포등 검색한 거의 모든 암세포주에 대하여 다른 천연계 생약제의 추출물과 달리 상당히 높은 세포독성을 고르게 나타낸 결과를 얻어 부분적으로 밝힌 바 있다.<sup>1,2)</sup> 이들 결과로부터 황해쑥에는 다양한 암세포에 대하여 항암효과를 나타내는 성분이 다수 함유되어 있을 가능성이 시사되었기에 본

**Table I** - Life prolonging effects of methanol extract and SD-994 from *Artemisia argyi* on ICR mouse bearing Sarcoma 180

Animal No.(n=6)	Survived period (days)			
	Control	Meth. extract (10 g/b.w.)	SD-994 (1 g/b.w.)	SD-994 (2 g/b.w.)
1	17	22	18	25
2	19	22	24	26
3	22	25	29	31
4	27	28	31	31
5	30	37	35	35
6	32	41	36	37
Mean $\pm$ SD	24.50 $\pm$	29.00 $\pm$	28.8 $\pm$	30.83 $\pm$
Prolonging effect (%)	6.09	7.85	36.86	4.75*
	0	28.36%	17.67%	25.83%

Designation b.w. means 20 g of mouse body weight. Meth means methanol. \*p<0.05: significantly different from control.



**Scheme 1** - Preparation of SD-994 from *Artemisia argyi* by systematic purification using solvent partitioning and silica gel chromatography. Values presented in the parenthesis are yield and Rf in Hexane : EtOAc=5:1 solvent system.

**Table II** – Cytotoxicity of subfractions I-IX from chloroform fraction A against L1210 cells at the concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$ 

Subfractions (1 $\mu\text{g/ml}$ )	L1210		Normal lymphocytes	
	Cytotoxicity	Viability	Cytotoxicity	Viability
I	77.0 $\pm$ 9.2**	98.7 $\pm$ 1.3	9.2 $\pm$ 2.1*	98.5 $\pm$ 1.6
II	26.6 $\pm$ 8.4**	98.5 $\pm$ 7.2	3.5 $\pm$ 1.5	97.6 $\pm$ 4.3
III	34.1 $\pm$ 5.6**	96.3 $\pm$ 3.5	2.7 $\pm$ 1.2	94.5 $\pm$ 3.8
IV	71.9 $\pm$ 7.9**	96.1 $\pm$ 8.5	7.8 $\pm$ 2.4	92.4 $\pm$ 6.1*
V	70.3 $\pm$ 4.3**	91.7 $\pm$ 3.4*	12.3 $\pm$ 3.2**	87.3 $\pm$ 5.2*
VI	41.8 $\pm$ 6.2**	97.7 $\pm$ 5.5	9.4 $\pm$ 2.9*	94.7 $\pm$ 3.8*
VII	75.5 $\pm$ 5.8**	91.2 $\pm$ 6.3*	10.5 $\pm$ 3.5*	94.3 $\pm$ 5.7
VIII	80.7 $\pm$ 9.1**	96.9 $\pm$ 4.4	14.3 $\pm$ 2.8**	89.5 $\pm$ 7.1*
IX	73.4 $\pm$ 6.3**	86.3 $\pm$ 6.7**	9.1 $\pm$ 1.7*	93.6 $\pm$ 8.3

\* $p < 0.05$ : significantly different from control. \*\* $p < 0.01$ : significantly different from control

실험을 수행하였다. 분리정제 과정의 개요는 Scheme 1에 제시되어 있으며 황해쑥의 methanol 추출액으로부터의 분리 정제 첫 번째 단계인 각 용매 분획이 백혈병의 지표 암세포인 L1210 세포에 대해 나타내는 세포독성을 검색한 결과 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 hexane(74.6 $\pm$ 6.3%), chloroform(85.7 $\pm$ 6.2%), ethylacetate(44.8 $\pm$ 6.6%), buthanol(27.9 $\pm$ 5.3%), water(25.3 $\pm$ 6.1%)의 세포독성 결과를 얻었으며 이 중에서 암세포에 대하여 세포독성이 높으면서도 normal lymphocytes에 대하여 10%이내의 약한 세포독성을 나타낸 분획이 chloroform 분획과 ethylacetate 분획이었는데 이 두 분획 중에서 chloroform 분획의 암세포에 대한 세포독성이 더 높았으므로 다음 분리 정제의 대상으로 chloroform 분획을 선택하였다.

따라서 A~G까지의 분획 중에서 세포독성이 가장 탁월한 A분획을 선택하여 다시 hexane:EtOAc=5:1 용매계로 용출하였을 때 I~IX까지의 9가지의 정제물이 얻어졌다. 이들은 evaporation 과 freeze-dry를 시켰을 때 oil과 powder로 얻어졌으므로 TLC와 융점 검사로 단일 화합물인 것을 확인하고 L1210세포에 대한 세포독성을 검사하였으며, 아울러 암세포에 대한 세포독성 못지 않게 정상세포에 대한 세포독성이 낮을수록 항암제로서의 안전성이 확보될 수 있으므로 normal lymphocytes에 대한 세포독성 검사를 병행 실험하여 그 결과를 Table II에 표시하였다

**A의 소분획 I~IX의 L1210세포와 normal lymphocytes에 대한 세포독성 비교** - 메탄올 추출액으로부터 chloroform 분획물을 얻고 이 chloroform 분획물로부터 A~G분획을 분리한 다음 다시 A 분획으로부터 I~IX물질을 얻어 이들에 대한 L1210세포에 대한 세

포독성효과와 아울러 안전성의 견지에서 normal lymphocytes에 대한 세포독성 실험을 병행하여 그 결과를 Table II에 제시하였다. 이 실험에서는 이들 화합물들이 단일 화합물로 정제된 상태이므로 추출 혼합물보다 낮은 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하였다. 결과로부터 알 수 있듯이 I~IX까지의 물질은 L1210 암세포주에 대해서는 각각 26.6 $\pm$ 8.4~80.7 $\pm$ 9.1%의 세포독성을 나타내었고 세포생존율은 거의 90%이상의 수치를 나타내었다. 이 물질들이 정상 lymphocytes에 대해서 나타낸 세포독성은 2.7 $\pm$ 1.2~14.3 $\pm$ 2.8%로 암세포주에 대한 세포독성 보다는 훨씬 미약한 것을 알 수 있었으며 이 경우에도 세포생존율은 대부분 90% 이상의 값을 나타내었다. 특히 I와 VIII화합물은 각각 77.0 $\pm$ 9.2%과 80.7 $\pm$ 9.1%의 높은 세포독성에 비해 normal lymphocytes에 대해서는 9.2 $\pm$ 2.1%와 14.3 $\pm$ 2.8% 정도의 약한 세포독성을 나타내어 독성이 작으면서도 상당히 우수한 항암 효과를 지닌 성분으로 간주 할 수 있었으므로 이 중에서 I 화합물을 선택하여 SD-994로 칭하고 작용기작의 검색을 활성산소 및 항산화효소와 연계하여 추진하게 되었다.

본 실험을 통하여 황해쑥의 특징으로서 파악하게 된 사항은 작은 fraction A 한가지로부터 유래한 I~IX의 소분획에만 해도 L1210세포사멸효과가 있는 물질이 다수 존재할 가능성을 시사되었는데 이 사실은 황해쑥 식물 전체에는 아마도 각각 다른 구조와 작용기작을 발휘하는 여러종류의 항암물질이 공존할 것으로 판단되어 실제 발생기작이 복잡한 암을 임상적으로 치료하기 위해서는 오히려 황해쑥 전초의 추출물 자체를 투여하면 다각도로 항암효과를 유도할 수 있지 않을까 사료되었다.

**Table III** – Comparison of cytotoxicity of SD-994 and 5-fluorouracil against L1210 cells and normal lymphocytes

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cytotoxicity (%)			
	SD-994		5-FU	
	L1210	Lymphocytes	L1210	Lymphocytes
0	0	0	0	0
0.015	0	0.01 $\pm$ 0.01	26.74 $\pm$ 4.24**	8.92 $\pm$ 3.24**
0.030	0.03 $\pm$ 0.04*	0.31 $\pm$ 0.17*	41.2 $\pm$ 5.12**	16.24 $\pm$ 5.72*
0.060	0.03 $\pm$ 0.01*	0.52 $\pm$ 0.23	68.7 $\pm$ 8.53**	23.44 $\pm$ 3.87**
0.125	6.80 $\pm$ 3.21*	0.73 $\pm$ 0.38*	79.8 $\pm$ 11.6**	38.91 $\pm$ 5.82**
0.250	21.04 $\pm$ 4.71**	1.84 $\pm$ 0.29*	80.7 $\pm$ 7.92**	36.52 $\pm$ 6.95**
0.500	49.73 $\pm$ 3.94**	3.07 $\pm$ 0.42**	84.0 $\pm$ 10.51**	45.76 $\pm$ 8.32**
1.000	82.31 $\pm$ 5.11**	4.68 $\pm$ 0.85*	84.2 $\pm$ 6.74**	55.87 $\pm$ 9.63**
2.000	83.25 $\pm$ 6.74**	6.74 $\pm$ 1.32*	86.7 $\pm$ 8.55**	67.54 $\pm$ 11.42**
5.000	85.68 $\pm$ 7.49**	18.52 $\pm$ 4.79**	83.6 $\pm$ 7.93**	72.56 $\pm$ 13.27**
10.000	83.54 $\pm$ 5.32**	28.35 $\pm$ 3.74**	82.4 $\pm$ 7.62**	83.54 $\pm$ 10.26**

\* $p < 0.05$  : significantly different from control. \*\* $p < 0.01$  : significantly different from control.

**SD-994와 5-FU(5-fluorouracil)의 세포독성 비교** – 이상으로 부터 SD-994로 명명된 I화합물은 L1210세포에 대해서는 독성이 강하면서도 normal lymphocytes에 대해서는 매우 저독성임을 알게 되었다. 아울러 이와같은 SD-994의 효과를 기존의 항암제의 일종인 5-fluorouracil(5-FU)과 참고로 비교 검색하였다. Table III에 제시된 결과에 의하면 0.015  $\mu\text{g/ml}$ ~10  $\mu\text{g/ml}$ 의 넓은 농도범위에서 SD-994의 L1210 암세포와 normal lymphocytes에 대해 세포독성을 검색했을 때 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 까지의 저농도에서는 각각 6.80 $\pm$ 3.21%와 0.73 $\pm$ 0.38%정도의 매우 적은 세포독성을 나타내었다. 반면에 5-FU는 같은 농도에서 암세포와 normal lymphocytes에 대해 79.8 $\pm$ 11.6%와 38.91 $\pm$ 5.86%의 높은 세포독성을 나타내었다. 심지어 5-FU의 경우 최소농도인 0.015  $\mu\text{g/ml}$ 에서조차 L1210세포와 normal lymphocytes에 대해 각각 26.7 $\pm$ 4.24%와 8.92 $\pm$ 3.24%의 상당한 세포사멸효과를 보였다.

보다 고농도인 0.250~10.0  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위에서 SD-994는 L1210세포에 대해서는 21.04 $\pm$ 5.11%~83.54 $\pm$ 5.323%의 이세포독성을 나타내었고 normal lymphocytes에 대해서는 1.84 $\pm$ 0.29%~28.35 $\pm$ 3.74%의 세포독성을 나타내었다. 반면에 5-FU는 L1210세포에 대해서는 80.70 $\pm$ 7.92%~82.42 $\pm$ 7.62%의 높은 세포독성을 나타내었을 뿐 아니라 normal lymphocytes에 대해서도 36.52 $\pm$ 6.95%~83.54%의 심한 세포독성을 보였다. 구체적인 예로 단일 항암 성분의 보통 사용량인 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서의 세포독성을 비교하여 보

면 SD-994는 L1210세포와 normal lymphocytes에 대해서 82.31~5.11%와 4.68~0.85%의 세포독성을, 5-FU는 84.2 $\pm$ 6.74~55.87 $\pm$ 9.63%의 세포독성을 각각 나타낸 것으로 보아 SD-994는 L1210세포에 대해서는 5-FU와 비슷한 세포독성을 나타내면서도 normal lymphocytes에 대해서는 독성이 약 1/10에 불과하므로 안전성이 훨씬 높은 것을 알 수 있었다. L1210세포에 대하여 계산된 SD-994와 5-FU의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 과 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

**SD-994의 첨가에 의한 L1210세포에서의 O<sub>2</sub><sup>-</sup>생성** – 이상의 결과들로부터 SD-994가 L1210세포에 대해 강한 세포독성을 일으키는 것을 알게 되었는데 이러한 암세포의 사멸현상의 기작을 규명하고자 L1210세포에 SD-994를 첨가함으로써 야기되는 변화를 활성산소의 관점에서 검색하여 보았다. 우선 산소(O<sub>2</sub>)로부터 유래하는 활성산소 대사과정의 첫째 단계의 물질은 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)로써 이 superoxide가 생성되면 순차적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그리고  $\cdot\text{OH}$  radical이 생성되므로<sup>11-13)</sup> SD-994의 첨가에 의하여 활성산소들이 생성되는 지 알기 위하여 무엇보다도 superoxide의 생성을 확인하고자 하였다. Table IV에 제시된 결과에 의하면 SD-994를 L1210세포에 농도별로 첨가했을 때 control 값에 비해 SD-994를 첨가한 실험군에 있어서 배양기간과 SD-994의 농도에 비례하여 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 생성이 123.5 $\pm$ 7.43~357.54 $\pm$ 18.56%로 모두 증가하는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 L1210 세포에 SD-994를 가하여 사멸시킬 때 L1210 세포에서는 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 생성이 증가된

**Table IV** – Effect of SD-994 on the generation of superoxide anion ( $O_2^-$ ) in L1210 cells

SD-994 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$O_2^-$ generated (%)	
	1 day	3 day
0 (control)	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
0.1	118.9 $\pm$ 14.8*	137.8 $\pm$ 16.8*
0.2	128.5 $\pm$ 21.3*	253.7 $\pm$ 23.5**
0.5	154.7 $\pm$ 14.6**	282.6 $\pm$ 16.9**
1.0	245.5 $\pm$ 21.5**	311.4 $\pm$ 25.4**
2.0	273.1 $\pm$ 18.9**	359.5 $\pm$ 26.6**

\* $p < 0.05$ : significantly different from control. \*\* $p < 0.01$ : significantly different from control.

다는 것을 시사하는 것으로 볼 수 있으며 이 사실은 본 저자가 다른 종류의 암세포의 경우에서도 보고한 바 있는데<sup>1,2)</sup> 최근들어 여러 항암제의 작용기작이 활성산소의 유발에 의해 apoptosis가 촉발되기 때문이라는 보고가 점점되고 있음에 비추어 본 SD-994의 작용기작 역시  $O_2^-$  생성을 기점으로 활성산소와 그들의 대사 물질이 관여하는 것이 아닌가 사료되었다. 이와 같은 논리의 추이를 위하여 다음 실험으로 superoxide의 전환효소인 superoxide dismutase(SOD) 그리고 그 생성물인  $H_2O_2$ 의 분해효소인 catalase와 glutathione peroxidase(GPx)의 활성을 측정하여 보았다.

**SD-994의 첨가에 의한 L1210세포의 superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione peroxidase(GPx) 효소활성의 변화** – 다음으로 SD-994의 항암 기작의 규명을 위하여 SD-994에 의해 유발된 세포독성과 활성산소 제거효소인 항산화효소 활성과의 연관 실험을 행하게 되었다. L1210세포에 대해 50%이상의 충분한 세포독성을 일으키는 농도인 1  $\mu\text{g/ml}$ ~10  $\mu\text{g/ml}$ 의 SD-994를 첨가하여 50 ml의 culture flask에서 3일간 배양을 한 다음 각각의 cytoplasm과 mitochondria 분획을 분리하여 각 분획의 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GPx) 효소활성을 측정하였다. 이들 효소들은 분자 산소에서 유래한 유해 활성산소들을 제거하는 대표적인 항산화효소<sup>14-16)</sup>로서 그들의 활성이 SD-994를 첨가함으로써 변화하는 것은 곧 활성산소의 대사 변화를 의미하는 것으로 간주할 수 있기 때문이다. 이 실험의 결과는 Fig. 1, Fig. 2, Table VI에 걸쳐 제시하였다. 첫째로 Fig. 1에 L1210 암세포와 lymphocytes에 세포독성을 충분히 야기시키는 농도인 1~10  $\mu\text{g/ml}$ 까지의 SD-994를 첨가했을 때 변화하는 cytoplasm 분획과 mitochondria 분획의

SOD 활성치가 제시되어 있다. 무엇보다도 SD-994를 첨가하지 않은 control 그룹의 암세포와 normal lymphocytes사이에는 SOD활성값 자체가 뚜렷한 차이를 보였다. 즉 L1210 암세포의 cytoplasm분획과 mitochondria분획의 SOD 활성은 측정값 자체가 거의 무시될 정도로 적은 반면 normal lymphocytes의 두 분획의 SOD활성치는 1.89  $\pm$  0.32 units/ $10^8$  cells와 2.06  $\pm$  0.41 units/ $10^8$  cells로서 L1210암세포의 것보다 월등히 높았다. 이와 같이 암세포의 SOD활성값이 정상세포보다 매우 낮다는 사실은 이미 보고된 바와 같고 암세포가 정상세포보다 oxidative stress를 잘 이겨내고 있다는 반증이 되기도 한다.<sup>24,25)</sup>

이 control 그룹에 비하여 SD-994를 1  $\mu\text{g/ml}$ ~10  $\mu\text{g/ml}$ 을 가하여 암세포에 대한 세포독성이 70%이상 (Table II) 야기되었을 경우에는 L1210암세포의 SOD 활성은 control치에 비하여 cytoplasm의 경우 40~50배, mitochondria의 경우 역시 40~50배에 해당되는 현저한 활성증가가 세포독성에 수반된 것을 알 수 있었다. 이와같이 SD-994의 존재하에서 암세포의 SOD 활성의 증가는 SOD가 처리해야 할 superoxide anion( $O_2^-$ )이 다량으로 생성되었다는 것을 의미하기 때문에 Table IV의 결과를 다시 입증하는 것으로서 SD-994가 암세포를 사멸시킬 때 암세포내에  $O_2^-$ 가 크게 유발됨을 시사한다고 볼 수 있다. 이와 같은 현상은 SD-994의 농도가 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 높은 경우 특히 가장 높았는데 이 경우에는 세포독성이 가장 높을 뿐 아니라 (Table III) 그나마 형체가 남아있는 암세포의 생존율 자체가 32.75  $\pm$  4.61%(자체 data)에 불과한 것으로 보아 암세포사멸시에  $O_2^-$ 가 밀접하게 관계된다는 것을 다시 한번 더 의미하는 것으로 볼 수 있었다. 언급한대로 다른 종류의 암세포에서는 물론 아직 보고하지 않은 수종의 항암 추출물의 경우에서도 암세포의 종류에 관계없이  $O_2^-$ 의 발생이 포착되고 있다. 본 연구실에서의 결과와 다른 연구실로부터 보고되고 있는 결과들을 종합하여 보면 천연 항암제에 의해 암세포가 사멸하는 경우에  $O_2^-$ 를 비롯한 활성산소 무리들이 암세포의 necrosis는 물론 최근에 거론되는 apoptosis의 주요 인자일 가능성을 강하게 시사하고 있다. 암세포와 달리 normal lymphocytes에 있어서는 SD-994를 가함에 따라 cytoplasm과 mitochondria분획의 SOD 활성의 증가가 17.45  $\pm$  3.24%~42.93  $\pm$  5.8% 정도로서 암세포의 경우처럼 수십배에 달하지는 않고 약

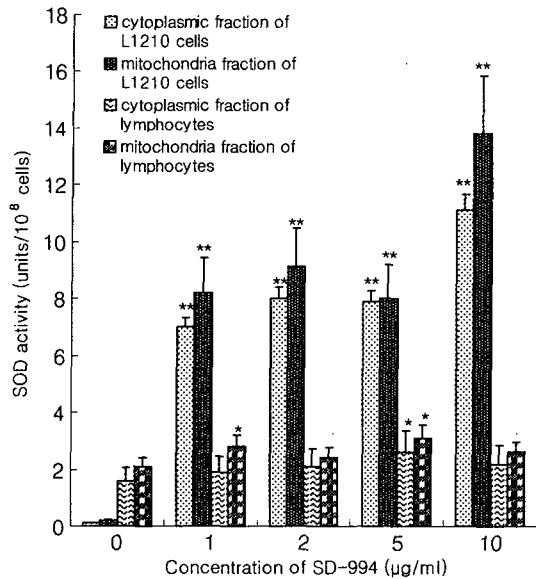


Fig. 1 - Effect of SD-994 on the SOD activity changes of mitochondria and cytoplasm fractions of both L1210 cells and normal lymphocytes according to the concentration.

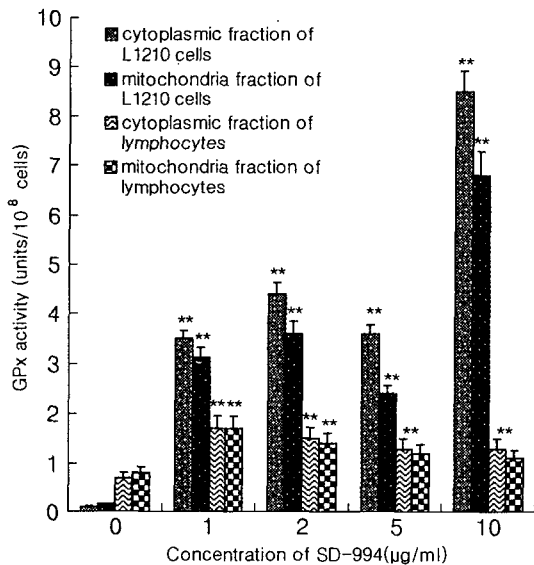


Fig. 2 - Effect of SD-994 on the GPx activity changes of mitochondria and cytoplasm fractions of both L1210 cell and normal lymphocytes according to the concentration.

간의 증가에 불과하였다.

항산화효소에는 SOD 이외 SOD에 의해 생긴  $H_2O_2$ 를 분해시키는 glutathione peroxidase(GPx)와 catalase

의 활성도 활성산소의 주요 물질인  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ 를 대사를 파악하는데 중요하므로 다음 실험에서는 이들 두가지 효소의 활성을 측정하였다.

SOD측정과 동일한 조건에서 L1210암세포와 normal lymphocytes의 cytoplasm분획과 mitochondria 분획의 glutathione peroxidase(GPx)활성을 SD-994의 첨가농도에 따라 측정한 결과는 Fig. 2에 제시되어 있는데 대체적인 변화 양상이 Fig. 1의 것과 흡사하였다. 암세포는 70~80% 사멸하고 반면에 normal lymphocytes는 5%~20% 정도로 사멸하는  $1 \mu g/ml \sim 10 g/ml$ 의 농도에서 GPx 활성은 SOD의 경우와 마찬가지로 두가지 세포종류간에 매우 뚜렷한 차이를 보였다. 우선 SOD의 경우에서 처럼 SD-994를 가하지 않은 control 그룹의 L1210암세포는 정상세포인 normal lymphocytes에 비하여 GPxx의 활성이 극히 작았는데 이와같은 control 세포에서의 GPX의 활성은 SD-994를  $1 \sim 10 \mu g/ml$ 농도로 첨가했을 때 급격하게 변화하는 양상을 보였다. 즉 GPx활성이 극히 미약하였던 암세포가 SD-994의 첨가에 의하여 cytoplasm과 mitochondria 분획 모두 30~70배의 급격한 GPx활성증가를 나타내었으며 그 변화 정도는 cytoplasm의 경우가 더욱 현저하였다. 이러한 결과는 SD-994의 첨가에 의해 암세포내부에 GPx로 처리해야 할  $H_2O_2$ 가 다량 생성되었다는 것을 의미하는 것으로 볼 수 있다. 이것은 활성산소류의 생성과 변화과정의 첫단계가 바로 SOD가 작용하는 단계이고<sup>12-14)</sup> Fig. 1의 결과에서 SD-994의 첨가에 의해 SOD활성이 크게 야기되었다는 것은 곧  $O_2^-$  anion이 전환되어  $H_2O_2$ 가 다량 생성되었다는 것을 시사하므로 이 유해한  $H_2O_2$ 를 제거하기 위해 GPx활성이 유발된 것은 당연한 결과로 보여진다.

이상의 결과와 연계하여 암세포사멸에 항산화효소의 활성변화가 수반됨을 알게 되었는데 항산화효소중에서 SOD와 GPx 이외 catalase 역시  $H_2O_2$ 의 제거에 주요한 효소로서 세포내에서는 주로 peroxisome에 국한되어 있는 것으로 알려져 있는 효소이다. L1210암세포가 사멸하는 과정에 SOD에 의해 생성된  $H_2O_2$ 를 GPx이외 catalase도 분해하는지 검색하기 위하여 다음 실험으로 SD-994를 첨가함에 따라 변화하는 catalase 활성 변화를 측정하였다. 그 결과를 Table V에 제시하였는데 무엇보다도 특이 한 것은 어느 실험 조건에서나 catalase 활성이 절대적으로 적어서 측정이 잘되지 않았다는 점이다. 효소의 양을 많이 사용하였을 때 혼



**Table V** – Effect of SD-994 on the catalase activity changes of L1210 cells and normal lymphocytes according to the concentration

Concentration of SD-994 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Catalase activity (units/ $10^8$ cells)	
	L1210 cells	Normal lymphocytes
0	ND	$0.01 \pm 0.02$
0.5	$0.02 \pm 0.02$	ND
1.0	ND	ND
2.0	ND	$0.01 \pm 0.01$
5.0	$0.02 \pm 0.03$	ND
10.0	$0.02 \pm 0.02$	$0.01 \pm 0.02$

ND means not detected.

적량의 흡광도 변화가 있는 것으로 추정해보아 미량의 catalase활성이 존재하기는 하나 그 양이 워낙 적은 것을 보아 peroxisome에 국한 되어 있는 catalase는 본 실험계의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 분해에는 관여하지 않는 것으로 판단되었다. 그 뿐 아니라 SD-994를 첨가한 시료에서도 역시 효소활성은 거의 측정되지 않은 것으로 보아 L1210 암세포가 SD-994에 의해 사멸될 때  $\text{O}_2$ 가 생성되며 이  $\text{O}_2$ 의 분해를 위해서는 SOD와 GPx 두가지 효소활성이 크게 유발되는 것으로 판단되었다.

다시 말하면 분자산소 ( $\text{O}_2$ )가 부분적으로 환원되면서  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  등의 활성산소를 생성하는 다단계 경로에서 결정적으로 중요한 첫 번째와 두번째 단계의 반응을 촉매하는 SOD와 GPx 또는 catalase 효소의 활성이 전체 활성산소의 항배를 결정하는 주요요인이 될 수 있는 데 본 연구의 결과 catalase활성은 cytoplasm 과 mitochondria 에서 거의 측정되지 않았으므로  $\text{O}_2$ 로부터 생성된  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 catalase에 의해  $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ 가 되는 반응보다는 GPx효소에 의해  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{hydrogem acceptor}$ 의 경로로 진행되는 것으로 판단 되었다.

여하튼 L1210암세포가 사멸하는 과정에  $\text{O}_2^-$ 와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하는 효소인 SOD와 GPx 활성이 대단히 높게 유발되는 사실은 SD-994의 첨가에 의해  $\text{O}_2^-$  anion 과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 다량 생성된다는 것을 의미하며 L1210 세포는 이들을 제거 하기 위하여 이 두가지 효소를 증폭시켜 나름대로 최대의 활성산소 소거작용을 하지만 미처 다 제거하지 못하고 결국은 necrosis나 apoptosis에 의한 세포사멸로 이어지는 것으로 간주된다. 이 과정중에  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 분해가 충분치 못할 경우 세포내에서 효소 없이도 용이하게 일어나는 Fenton reaction<sup>24,25</sup>인  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH}$ 에 의해서 세포에 치명적인  $\cdot\text{OH}$ 도 생성되어 가일층 활성산소의 공격에 견디지 못한 암세포는 결국

은 세포사멸로 이어지는 것이 아닌가 사료되었다. 세포 사멸 기전 특히 apoptosis 유발기전은 현재 왕성하게 연구가 진행되고 있으며 생식세포를 제외한 모든 세포 내에는 자멸기전인 apoptosis machinery가 잠재되어 있다. 세포의 존재가 여러 가지 원인에 의해 비랴직하지 못하다고 판단되었을 때 스스로 자멸하게 되는데 최근의 결과에 의하면 necrosis의 주요 원인으로 간주되던 활성산소가 apoptosis도 유발시킬 수 있다고 보고되었다.<sup>26-28</sup> 아울러 최근 cisplatin, doxorubicin, bleomycin, mehothrexate, vincristine과 같은 항암제의 작용 기작이 활성산소를 매개로한 *bcl2* gene의 과도한 유발에 의해 결국 apoptosis가 일어나게 되며 그로 인하여 암세포의 사멸이 이루어진다는 결과도 다수 보고되고 있다.<sup>29-32</sup> 본 연구에서도 SD-994를 L1210 세포에 첨가했을 때 아마도 mitochondria와 cytoplasm 모두에서  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  그리고  $\cdot\text{OH}$ 와 같은 활성산소의 양이 급증하게 되며 이 유해한 활성산소를 소거시키기 위해서 L1210암세포내 SOD와 GPx활성이 크게 증가하지만 충분치 못하여 결국은 necrosis나 apoptosis에 의해 L1210 세포는 사멸하는 것으로 판단된다.

## 결 론

1. 황해속의 methanol추출액과 이로부터 silica gel chromatography를 시행하여 얻은 많은 분획에는 여러 암세포에 대하여 세포독성을 나타내는 물질이 많았으며 그중 가장 세포독성효과가 높은 정제물질인 SD-994는 백혈병계 암세포인 L1210세포에 대해  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 90%의 세포독성을 나타낸 반면 normal lymphocytes에 대해서는 약 5%의 약한 독성을 나타낸 것으로 보아 비교적 안전성이 큰 것으로 보였다.

2. L1210세포에 SD-994를 첨가했을 때 배양기간과 농도에 비례하여  $\text{O}_2^-$ 의 생성 증가가 나타났으며 control치에 비하여 120~350%의 증가값을 보였다.

3. L1210 세포에 대하여 SD-994를 첨가했을 때 L1210세포의 cytoplasm분획과 mitochondria분획 모두에서  $\text{O}_2^-$ 의 전효소인 superoxide dismutase(SOD)와 그 생성물인  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 분해효소인 glutathione peroxidase(GPx) 효소활성이 control치에 비하여 50배 정도로 높은 증가율을 보였다.

이상의 결과들을 종합하였을 때 황해속에는 다수의 항암제가 함유되어 있을 뿐 아니라 최종 정제물인

SD-994는 L1210 세포에 대하여 우수한 세포독성을 나타낸 반면 normal lymphocytes에 대해서는 미약한 세포독성을 나타내어 안전성이 높을 것으로 판단되며, 이와 같은 암세포사멸 현상에는 활성산소인  $O_2^-$ 의 생성은 물론 항산화효소인 SOD와 GPx의 증폭된 활성 증가가 수반된 것을 보아 암세포사멸 기작에는 활성산소의 대사과정이 개입된 것으로 사료되었다.

### 감사의 글

이 논문은 학술진흥재단의 기초과학연구비 1998-D00202에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Kim, K. H., Jung, D. Y., Min, T. J. and Park, S. W. : Cytotoxicity of *Artemisia argyi* extract against H9 cell and antioxidant enzymes. *Yakhak Hoeji* **43**, 598 (1999).
- 2) Lee, T. E., Park, S. W. and Min, T. J.: Antiproliferative effect of *Artemisia argyi* extract against J774A. 1 cells and subcellular superoxide dismutase(SOD) activity changes. *J. Biochem. Molecular Biol.* **32**, 585 (1999).
- 3) Namba, T., Tsunozuka, M., Takehana, Y., Nunome, S., Takeda, K., Shu, Y. Z., Kakiuchi, N., Takagi, S. and Hattori, M. : Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines (Part IV) Screening of crude drugs for anti-plaque action and effects of *Artemisia capillaries* spikes on adherence of *Streptococcus* mutants to smooth surfaces and synthesis of glucan by glucosyltransferase. *Shoyakugaku Zasshi*. **38**, 253 (1984).
- 4) Ranasinghe, A., Sweatlock, J. D. and Coos, R. G. : A rapid screening method for artemisin and its congeners using MS/MS: searching for new analogues in *Artemisia annua*. *J. Natural Products* **56**, 552 (1993).
- 5) Ikenaga, T., Tajima, M. and Matuo, H. : Effect of mineral fertilizers on the production of flower bud and choleretic substances in flower bud of *Artemisia capillaries*. *Shoyakugaku Zasshi* **43**, 310 (1989).
- 6) Oh, T. Y., Ahn, B. Y., Ko, J. I., Ryu, B. K., Son, M. W., Kim, S. H., Kim, W. B. and Lee, E. B. : Studies on protective effect of DA-9601, an *Artemisia* extract, against ethanol induced gastric mucosal damage and its mechanism. *J. Appl. Pharmacol.* **5**, 202 (1997).
- 7) Yashphe, J., Segal, R., Breuer, A. and Erdreich-Naftali, G. : Anti-bacterial activity of *Artemisa herba-alba*. *J. Pharmaceut. Sci.* **68**, 924 (1979).
- 8) Xu, Q., Mori, H., Sakamoto, O., Uesugi, Y. and Koda, A. : Immunological mechanisms of antitumor activity of some kind of crude drugs on tumor necrosis factor production. *Int. J. Immunopharmac.*, **11**, 607 (1989).
- 9) Mori, H., Xu, Q., Sakamoto, O., Uesugi, Y., Koda, A. and Nishioka, I. : Mechanisms of antitumor activity of aqueous extract from chinese herbs : their immunopharmacological properties; *Jap. J. Pharmacol.* **49**, 423 (1989).
- 10) Roberbroid, M. and Calderon, P. B. : Definitions, properties and reactions of radicals. *Free radical and oxidation phenomena in biological systems*. Marcel Dekkor Inc., New York, p. 11 (1995).
- 11) Rice evance, C. and Burdon, R. : Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* **32**, 71 (1993).
- 12) Chessman, K. H. : Tissue injury by free radicals. *Toxicol. Indus. Health* **9**, 39 (1993).
- 13) Reitter, R. : Oxidative process and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *The FASEB J.* **9**, 526 (1995).
- 14) Markesbery, W. R. : Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease *Free radical Biology and Medicine*. Elsevier Science. Inc. **23**, 134 (1997).
- 15) Klaunig, J. E., Xu, Yong., Iseberg, J., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E. and Walborg, E. F. : The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Persp.* **106**, 289 (1998).
- 16) Markesbery, W. R. : Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*. **23**, 134 (1997).
- 17) Urshini, F. : Selenium dependent peroxidase(ed) Paolletti, R., Samu -ellson, B., Cataparo, A. L., Poli, A., Rinnetti, N., *Oxidative processes and antioxidants*, Raven Press Ltd. New York, p. 25 (1994).
- 18) Bravard, A., Sabatier, L., Hofschir, F., Ricoul, M., Luccini, C. and Dutrilau, B. : SOD<sub>2</sub>: new type of tumor suppressor gene? *Int. J. Cancer* **51**, 476 (1992).
- 19) National Cancer Institute USA : Cell culture screen, KB. Protocol 1600, *Cancer Chemother. Rep.* (part 3) **3**, 17 (1972).
- 20) Boyum, A. : Isoation of leukocytes from human blood.

- Scan. J. Clin. Invest.* **21**, 9 (1968).
- 21) McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase assay. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
- 22) Maral, J., Puget, K. and Michelson, A. M. : Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 1525 (1977).
- 23) Matsuo, M. : Age related alterations in antioxidative defense. In *Free Radicals in Aging* (Yu, B. P., ed.) pp. 143-181, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 24) Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. and Hiai, H. : Persistent oxidative stress in cancer *FEBS Lett.* **358**, 1 (1995).
- 25) Southern, P. A. and Powis, G. : Free radicals in medicine. *Mayo Clin. Proc.* **63**, 381 (1988).
- 26) Cerutti, P. A. : Oxidative stress and cancer. *Lancet* **344**, 862 (1994).
- 27) Gorman, A., McGowan, A. and Gotter, T. G. : Role of peroxide and superoxide anion during tumor cell apoptosis. *FEBS Letters* **404**, 27 (1997).
- 28) Johnson, T. M., Yu, Zu-Xi., Ferrans, V. J., Lowenstein, R. A. and Finkel, T. : Reactive oxygen species are downstream mediators of p53 dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**, 11848 (1996).
- 29) Brown, J. M. and Wouters, B. G. : Apoptosis, p53 and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* **59**, 1391 (1999).
- 30) Sinh, K. K., Russel, J., Sigala, B., Zhang, Y., Williams, J and Keshav, K. F. : Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. *Oncogene* **18**, 6641 (1999).
- 31) Burger, A., Jenkins, T., Double, J. and Bibby M. : Cellular uptake, cytotoxicity and DNA binding studies of the novel imidazoacridinone antineoplastic agent C1311. *Br. J. Cancer* **81**, 367 (1999).
- 32) Villunger, A., Egle, A., Kos, M., Hartman, B., Geley, S., Kofler, R. and Greil, R. : Drug-induced apoptosis with enhanced fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res.* **57**, 3333 (1997).