

식용 허브 메탄올추출물의 L1210 암세포에 대한 세포독성과 항산화효소 활성 변화

김수진 · 조용선 · 박시원*

상명대학교 화학과

Cytotoxicity of Methanol Extracts of Edible Herbs Against L1210 Cells with the Changes of Antioxidant Enzymes Activities

Soojin Kim, Yongsun Cho, and Siewon Park*

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

Abstract – The methanol extracts prepared from ten kinds of culinary herbs were investigated for the cytotoxic effect against L1210 cancer cells and the mode of action. The substantial cytotoxic effects were observed in all cases with the most prominent effect demonstrated by lemon verbena extract showing $87 \pm 4.1\%$ cytotoxicity with $100 \mu\text{g/ml}$ concentration and 3 days culture period. The cytotoxic effect was found to be dose and culture period dependent. With respect to the mechanism of the cytotoxicity, the augmented generation of O_2^- ion and the dramatically escalated activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) with addition of the herb methanol extracts suggested that there would be the involvement of reactive oxygen species (ROS) metabolism in the course of L1210 cancer cell death by the methanol extract of the edible herbs.

Key word – Edible herbs, L1210 cells, Cytotoxicity, Reactive oxygen species (ROS), O_2^- ion, Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase

허브 (Herbs)는 대부분 향기를 지닌 초본류로서 식용이나 완화한 의약품으로 널리 사용되어 왔다. 식용으로서의 허브는 주 재료에 부수적인 향을 가미하거나 시각적으로 식욕을 돋굴 수 있는 정도의 부향제의 의미로 사용되어 왔으나 최근 들어 의약품으로서 우울증, 불면증, 두통, 불안증과 같은 비교적 가벼운 정신신경계 질환의 치료나 여드름, 발적, 잇몸질환, 산부인과질환 등에 항균제로 광범위하게 사용되어 왔다.¹⁻³⁾

그러나 최근 들어 치료가 매우 힘든 알러지, 만성통증, 고지혈증, 암, 관절염, 심장계 질환과 같은 난치병 치료에 허브를 사용하여 많은 효과를 나타내고 있음이 속속 밝혀지고 있다.⁴⁻⁶⁾ 허브의 의학적 사용은 부작용이 거의 없으면서도 질환의 개선효과가 뚜렷하다는 점에서 선호하고 있다고 보여진다. 예를 들어 미국인 3명중 1명이 매년 1회 정도 정규 의학치료법이 아닌 대체의학을 사용한 경험이 있으며 미국에서의 매년 허브의 매상고⁷⁾는 20억불이 넘는 것으로 보

아 허브의 의약품으로서의 연구는 관심 있게 이루어져야 할 것으로 보인다.

허브의 유효 성분으로는 terpenoids, flavonoids, lignans, sulfide, polyphenols, carotenoids, coumarins, saponin, curcumins, plant sterols, phthalides 등의 다양한 구조들이 밝혀져 있으며 허브의 가장 주요한 분획으로 간주되고 있는 정유(essential oil)의 주성분이 terpenoids로서 이들 terpenoid들의 유효성에 대한 탐구가 다각도로 이루어져야 할 것으로 판단된다. 최근 들어 허브의 성분들에 강한 항암효과⁸⁾가 있음을 밝히고 섭취할 것을 권장하고 있으며 이들이 과일, 야채들에 의한 항암효과의 성분들과 유사함을 제시하고 있음으로서^{9,10)} 허브의 의학적 적용범위가 난치병인 암에까지 이름을 알 수 있다. 이와 같은 허브들에 의한 항암 효과의 기작으로 이들 성분들이 antioxidant 또는 electrophile scavenger로 작용하고, 면역보강효과를 나타내며, DNA이상을 억제하고, 암발생과 진행을 억제하며, phase I, II의 해독효소를 유발시킨다는 결과들이 보고되고 있다.¹¹⁻¹⁵⁾

현재 기존의 항암제는 약효 못지 않게 부작용이 심하여

*교신저자(E-mail) : parksw@sangmyung.ac.kr

환자의 삶의 질을 떨어뜨릴 뿐 아니라 치료효과도 미흡하여 환자의 전체 사망률이 50%에 이르며 말기암의 완치율은 아직도 5% 미만으로 알려지고 있다.^{16,17)} 따라서 각 국은 부작용이 적으면서도 항암효과는 높은 항암제 개발에 매진하고 있다. 본 연구실에서는 식품으로 사용되어 독성이 근원적으로 없거나 약한 천연물로부터 저독성의 항암제 개발 연구를 해오던 바 허브의 일종인 황해쑥으로부터 우수한 항암 성분을 확인하였고 그 성분이 terpenoid인 linalool인 것을 밝힌 바 있다.^{18,19)} 나아가 본 연구에서는 이같은 정유성분을 함유한 식용 허브로부터 무독성 내지는 저독성 항암제의 개발 가능성이 클 것으로 보고 식용 허브를 대상으로 L1210 암세포에 대해 세포독성이 높은 허브 메탄을 추출물을 탐색하고 나아가 이들의 암세포에 대한 세포독성과 활성 산소(reactive oxygen species) 대사와의 관계를 밝히고자 하였다.

실험 재료 및 방법

재료 및 시약 - 본 연구의 실험재료로 사용한 허브는 식용으로 많이 사용되는 체리 세이지 (*Salvia officinalis*), 레몬 밤 (*Melisa officinalis*), 레몬 바베나 (*Aloysia triphylla*), 오레가노 (*Oreganum vulgare*), 페퍼민트 (*Mentha piperita*), 스피아민트 (*Mentha spicata*), 로즈마리 (*Rosemarinus officinalis*), 레몬 타임 (*Thymus vulgaris*), 스테비아 (*Stevia rebaudiana*), 바질 (*Ocimum basilicum*)로서 이들은 미리내 허브농원(양재동, 서울)에서 신선한 식물 형태로 구입하였다. Murine leukemic cell인 L1210 세포는 서울대 암연구소의 한국세포주 은행으로부터 분양 받았다. RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin & streptomycin mixture는 Gibco BRL (Grand Island, New York, USA), trypan blue, xanthine, xanthine oxidase, cytochrome c, glutathione, glutathione reductase 등은 Sigma사로부터 구입하였다. 유기용매 및 무기염류는 일급시약을 사용하였다. Vacuum evaporator는 EYELA (Tokyo, Japan), UV/VIS spectrophotometer는 Varian Carry 3E (Varian PTY LTD, Australia)을 각각 사용하였다.

식용 허브 메탄추출물 조제 - 허브 잎을 조심스럽게 씻어 물기를 닦아낸 다음 잘게 썬 시료 10 g을 100 ml의 70% 메탄올에 침지하여 24시간 실온에서 방치한 후 상등액을 취한 다음 잔사에 다시 100 ml의 70% 메탄올을 100 ml 가하여 24시간 방치 후 상등액을 취한다. 앞서 얻은 상등액과 합하여 7겹의 gauze를 통과시켜 얻은 여액을 진공증류기로 감압 농축한 다음 냉동 건조하여 무게를 평량하였다. 이와 같은 허브 메탄추출물은 매일 새롭게 조제하

여 사용하였다.

L1210 세포 배양 - 서울대 암연구소로부터 분양 받은 L1210 암세포는 37°C, 5% CO₂, humidified condition에서 배양하였다. RPMI 1640배지에 10% fetal bovine serum을 첨가한 배양액을 사용하였으며 계대배양은 3-4일마다 시행하였다. 세포독성 검사를 위한 배양은 24 well plate에서 시행하였고 항산화 효소액을 제조하기 위한 배양은 50 ml의 culture flask에서 다량배양을 한 다음 세포를 수거하여 항산화 효소액을 조제하였다.

세포독성 (cytotoxicity) 및 생존율 (viability) 측정 - 정상세포 및 암세포에 대한 세포독성 검사를 하기 위하여서는 다음과 같은 방법을 적용하였다. 24 well plate에 1×10⁶/ml의 농도로 L1210 암세포 또는 정상세포를 첨가하고 적정 시간 배양 후 세포수를 NCI의 protocol 방법²⁰⁾으로 trypan blue exclusion법에 의해 착색, 비착색 세포수를 haemocytometer로 세어 세포독성과 생존율 계산을 시행하였다. 시료를 가지지 않은 control 그룹의 세포수(A)로부터 시료를 가한 그룹의 세포수(B)를 뺀 숫자를 사멸되어 해체된 세포수(C)로 간주하여 C의 A에 대한 백분율을 세포독성으로 계산하였으며, 전체 세포중 trypan blue에 착색되지 않아 살아있는 세포수(B)의 전체 세포수(A)에 대한 백분율을 생존율로 계산하였다.

세포독성 =

$$\frac{\text{Control 그룹의 세포수(A)} - \text{시료그룹의 세포수(B)}}{\text{Control그룹의 세포수(A)}} \times 100$$

$$\text{생존율} = \frac{\text{비착색 세포수(B')}}{\text{전체세포수(A')}} \times 100$$

정상 lymphocyte 분리 - L1210 세포가 유래된 ICR mouse로부터 정상 lymphocyte를 분리하는 방법은 Boyum의 방법²¹⁾을 적용하였다. Mouse를 ether로 마취시킨 후 경정맥을 절개하여 0.15 M sodium citrate가 처리된 유리시험관에 조심스럽게 혈액을 채취하였다. 여기에 dextran 유도체인 Histopaque^R-1077 3 ml을 조심스럽게 가한 다음 400 g에서 30분간 실온에서 원심분리 하였다. Pasteur pipette로 상등액인 plasma층을 제거하고 lymphocyte가 포함된 불투명한 중간층을 취하여 phosphated buffered saline (PBS) 10 ml와 조심스럽게 혼합한 다음 250 g에서 10분간 원심분리한 후 침전물에 대해 이 과정을 2회 반복 세척하여 정상 lymphocyte를 얻었다.

L1210 세포에서 생성된 O₂⁻ 이온 정량 - 허브추출물을 첨가하여 L1210세포를 배양한 후 O₂⁻ 이온 생성의 측정은

Markesbery의 방법²²⁾에 따라 시행하였다. L1210 세포배양액에 허브추출물을 첨가한 다음 일정기간 배양하여 250 g에서 원심분리 후 상등액은 버리고 수집된 L1210세포를 24 well plate에 1×10^6 cells/well, 700 μ l PBS, 50 μ l cytochrome c, 5 μ g/ml의 phorpholmyristate acetate 50 μ l를 첨가하여 60분간 배양한 다음 원심분리 하였다. 상등액 200 μ l에 PBS를 가하여 1 ml가 되도록 한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferricytochrome c의 환원반응은 21.1/mM/cm의 몰 흡광계수를 적용하여 계산하였으며 O_2^- 생성량은 nmoles/ 10^8 cells/60 min로 나타내었다.

항산화효소액 조제 - L1210 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 접종한 배양액 10 ml를 50 ml culture flask에서 일정기간 배양한 후 1,000 g에서 원심분리 하여 침전된 L1210 세포를 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 세척한 다음 다시 동일 buffer 1.5 ml에 현탁하여 얼음상에서 5초씩 5회 균질화하였다. 이 균질액을 4,600 g에서 원심분리 하여 상등액은 cytoplasm분획으로 회수하고 mitochondria가 포함된 침전물에는 다시 동일 buffer를 1.5 ml 가하여 얼음상에서 5초씩 5회 초음파 처리하여 mitochondria matrix에 존재하는 것으로 알려진 MnSOD²³⁾ 효소가 용출되어 나오도록 한 다음 4,600 g에서 원심분리 하여 pellet는 버리고 상등액을 사용하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정 - SOD 활성의 측정은 기본적으로 McCord and Fridovich²⁴⁾의 방법에 의해 이루어졌다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM cytochrome c, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA, 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 15분간 예치한 다음 xanthine oxidase를 첨가하여 반응을 개시하였으며 반응은 550 nm에서 10초 단위로 5분간 흡광도를 측정하여 이루어졌다.

Xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하였다. SOD 활성은 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 측정하여 units/min/ 10^8 cells로 나타내었다.

Glutathione peroxidase (GPx) 활성 측정 - GPx 활성의 측정은 Matsuo²⁵⁾의 방법에 의해 이루어졌다. 전체 반응액 2 ml에는 50 mM potassium phosphate buffer (5 mM EDTA, pH 7.0), 8.4 mM NADPH, 1 unit glutathione reductase (GSSGR), 150 mM glutathione (GSH) 및 효소액을 가하여 다음 37°C에서 5분간 예치한 후 0.16 mM의 *t*-butyl hydroperoxide를 가하여 반응을 개시시키고 340 nm에서 3분간 흡광도의 변화를 10초 단위로 기록하여 활성을 계산하였다. GPx의 1 unit는 1분간에 1 μ mole의 NADPH를 산화시키는 양으로 정의하여 units/min/ 10^8 cells으로 표시하였다.

Catalase 활성 측정 - Catalase 활성의 측정은 250 nm, 25°C에서 흡광도 감소를 근거로 하는 Marak *et al.*²⁶⁾의 방법을 적용하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 12.5 mM H_2O_2 및 효소액을 가하여 전체 반응액이 1 ml가 되도록 한 후 250 nm에서 10초 단위로 5분간 흡광도 변화를 측정하였다. H_2O_2 의 몰 흡광계수를 기초로 하여 H_2O_2 μ moles degraded /min/ 10^8 cells 로 활성을 나타내었다.

실험결과의 처리 - 실험은 기본적으로 triplicate로 반복 실험하였으며 결과에 대한 통계처리는 Student *t* test를 시행하여 그 결과 유의성을 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 로 표시하였다.

결과 및 고찰

허브의 메탄올추출물의 농도와 배양기간에 따른 L1210 세포에 대한 세포독성효과 - 허브의 메탄올 추출물이 농도

Table I. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from edible herbs against L1210 cells according to the concentration

Extracts	Concentration (μ g/ml)				
	1	10	30	50	100
	Cytotoxicity (%)				
Cherry sage	2.5 \pm 3.2	14.0 \pm 3.2	28.3 \pm 2.1*	41.5 \pm 3.4*	66.8 \pm 5.1*
Lemon balm	6.1 \pm 2.1	21.4 \pm 4.3	36.9 \pm 3.4*	57.3 \pm 7.1	78.2 \pm 8.3
Lemon thyme	8.2 \pm 3.5	10.5 \pm 2.6	32.5 \pm 3.2	45.4 \pm 4.8	69.4 \pm 4.9*
Lemon verbena	7.5 \pm 3.1	23.2 \pm 2.1	56.5 \pm 4.0*	72.3 \pm 2.5**	87.2 \pm 4.1**
Oregano	4.8 \pm 3.2	18.5 \pm 4.7	38.6 \pm 7.2	48.9 \pm 5.6	62.3 \pm 7.5
Peppermint	3.4 \pm 4.3	15.3 \pm 7.7	33.7 \pm 8.4	45.3 \pm 1.4**	59.3 \pm 6.9
Rosemary	5.2 \pm 5.0	18.3 \pm 5.3	26.4 \pm 2.1	40.3 \pm 6.8	48.6 \pm 2.8*
Spearmint	9.0 \pm 2.4	17.2 \pm 4.8	61.4 \pm 5.7	77.5 \pm 3.7**	84.1 \pm 7.1*
Stevia	7.2 \pm 4.1	18.9 \pm 5.4	60.8 \pm 4.7*	79.2 \pm 7.4	84.5 \pm 5.3*
Sweet Basil	4.6 \pm 3.5	8.7 \pm 4.6	34.5 \pm 7.3	55.1 \pm 4.8*	63.8 \pm 7.4

Culture was carried out for 3 days. Values are the mean \pm SD. Significantly different from the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

에 따라 L1210 세포에 대해 나타낸 세포독성의 실험 결과가 Table I에 제시되어 있다. 허브추출물은 혼합물이므로 통상 10-100 µg/ml 농도에서 약 50% 정도의 세포독성을 나타내면 항암성분 분리 후보물질 또는 항암혼합물로 적합하다고 간주되고 있기 때문에 본 실험에서도 이 농도를 중심으로 세포독성을 검색하였다. 허브추출물의 농도를 1 µg/ml-100 µg/ml까지 L1210 세포에 첨가하여 예비실험에서 좋은 배양기간으로 설정된 3일간 배양한 후 관찰한 결과 1 µg/ml 정도의 저농도에서의 세포독성 효과는 거의 나타나지 않았으며 10 µg/ml 부터서는 세포독성이 뚜렷하여 대부분의 IC₅₀ 값이 30-70 µg/ml로 나타났는데 특히 레몬 버베나, 스피아민트, 스테비아의 경우 IC₅₀ 값이 각각 28.2, 24.1, 25.9 µg/ml로서 가장 세포독성 효과가 상당히 높게 나타났다.

다음 실험으로 허브추출물을 가하여 배양하는 기간에 따른 세포독성효과를 검색하고자 하였다. 제반 조건은 Table I의 경우와 같이 하되 농도를 30 µg/ml으로 설정하고 배양 기간을 1일, 2일, 3일, 5일 까지 연장하여 나타나는 세포독성을 검색하였는데 Table II에서 제시된 바와 같이 대부분의 경우 배양 1일째에는 세포독성이 2.3%-8.5%로 매우 미흡하였으나, 배양 2일째에는 12.6%-37.4%이었고 배양 3일째에는 36.4%-59.4% 그리고 배양 5일 째에는 48.7%-92.4%에 이르렀다. 특히 세포독성이 가장 뚜렷한 경우는 배양 5일째에 92.43%를 나타낸 스피아민트의 경우였으며 레몬 버베나와 스테비아의 경우가 그 다음이었다. 이상의 두 가지 실험을 통하여 우리가 주로 식용으로 사용하고 있는 10가지 허브의 메탄올 추출물은 L1210 암세포에 대하여 농도와 배양기간에 의존적으로 세포독성을 나타내었음을 알

수 있었다.

허브 메탄올추출물에 의한 L1210 세포의 생존율 - 이러한 세포독성 현상은 두 가지 경로 즉 cell growth cycle의 어느 단계에서 arrest가 일어나거나 또는 cell division은 일어나 증식되어진 세포가 항암시료의 직접적인 독성 때문에 결국 사멸하는 경우가 있을 것이며 이 두 가지 경로가 동시에 작용할 수도 있을 것이다. Table I, II의 결과에 따른 허브의 메탄올 추출물이 나타내는 세포독성 효과가 어떠한 경로로 이루어지는 지 알아보기 위하여 생존율을 검사하여 보

Table III. Effect of the methanol extracts of edible herbs on the viability of L1210 cells

Extracts	Viability (%)	
	Culture period	
	1 day	3 days
Control	93.2±5.6	89.5±7.4
Cherry sage	83.9±4.1	57.3±6.9*
Lemon balm	91.3±6.8	59.2±8.2*
Lemon thyme	93.5±3.9	68.3±4.1*
Lemon verbena	86.2±7.3*	39.8±4.5**
Oregano	88.4±9.2	55.3±5.8*
Peppermint	91.2±5.2	59.8±2.3**
Rosemay	87.9±3.4	63.7±4.2**
Spearmint	82.1±7.6*	42.7±3.7**
Stevia	90.6±3.1	45.6±3.2**
Sweet Basil	88.7±6.9*	60.7±8.4*

The concentration of the herb methanol extracts was 30 µg/ml. Values are the mean±SD. Significantly different from the control (*p<0.05, **p<0.01)

Table II. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from edible herbs against L1210 cell according to the culture period

Extracts	Culture period (days)			
	1	2	3	5
	Cytotoxicity (%)			
Control	3.1±2.5	4.6±3.7	8.5±5.7	11.8±5.6
Cherry sage	2.3±2.5	12.6±4.1	39.3±4.8**	60.2±6.4**
Lemon balm	8.5±4.1	21.3±6.9	41.7±5.5*	69.2±8.2*
Lemon thyme	6.5±3.9	20.4±2.9	33.7±5.0**	76.3±4.1**
Lemon verbena	6.7±7.3	37.4±4.5*	59.4±3.1**	88.6±7.3*
Oregano	5.6±4.5	28.4±5.3	42.6±6.8	63.1±8.3*
Peppermint	8.2±5.2	18.9±3.8	43.3±3.9*	71.8±2.3**
Rosemay	7.6±3.4	24.5±5.6	46.5±4.9*	62.7±4.2**
Spearmint	3.1±2.6	31.6±3.7	54.1±5.1*	92.4±4.9**
Stevia	4.3±3.1	27.9±6.5	49.5±7.1	86.3±8.2*
Sweet Basil	8.4±5.4	17.3±3.8	36.4±5.7	63.8±7.2*

The concentration of the herb methanol extract was 30 µg/ml. Values are the mean±SD. Significantly different from the control (*p<0.05, **p<0.01)

았다. Table I과 II의 결과로부터 허브 메탄올 추출물을 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 배양하면 배양 1일째에는 세포독성은 거의 없으나 배양 3일째에는 약 50% 정도의 세포독성이 나타나는 조건을 선택하였다. Table III의 결과에 의하면 세포독성이 별로 나타나지 않았던 배양 1일째에는 L1210 세포의 생존율이 대부분 80%–90%이었으며, 세포독성이 약 50%인 배양 3일째의 생존율은 약 40%–60%에 불과하였다. 특히 높은 세포독성 효과를 나타내었던 레몬 바베나, 스피아민트, 스테비아의 경우 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 3일간 배양했을 때의 생존율은 각각 상당히 낮은 39.8%, 42.7%, 45.6%를 나타내었다. 이와 같은 결과는 허브추출물의 농도나 배양기간의 증가에 비례하여 암세포의 숫자가 줄어드는 현상은 허브추출물의 직접적인 살해작용에 의한 가능성이 큰 것으로 시사되었다.

허브 메탄올추출물의 정상세포에 대한 독성 검사 – 허브메탄올 추출물이 L1210 암세포에 대하여 상당한 세포사멸 효과를 나타낸 결과를 근거로 정상세포에 대한 독성 정도를 측정하여 비교 검색하여 보았다. 사용된 정상세포는 L1210 세포가 유래한 murine normal lymphocyte였다. Table IV에 제시된 결과에 따르면 10가지 허브의 메탄올 추출물이 농도에 따라 정상 임파구에 대해 사멸시키는 정도가 상당히 차이가 있었는데 1 $\mu\text{g/ml}$ –100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 암세포에 대해서보다는 대체적으로 훨씬 낮은 세포사멸 정도를 나타내었다. 즉 Table I의 결과와 비교하여 보면 체리 세이지, 레몬 바베나를 위시한 대부분의 경우 L1210 암세포에 대한 세포독성 값에 비하여 대부분 1/3–1/9 정도의 약한 세포독성을 나타내었으며 이러한 사실은 허브 추출물이 항암 작용은 높으나 정상세포에 대해서는 그 독성이 약하다는 것을 의미한다고 볼 수 있다. 특히 L1210 세포에 대해 세포

독성이 높았던 레몬 바베나, 레몬 타임, 스테비아의 경우 정상세포에 대해서는 1/7–1/9 정도로 더더욱 낮았으므로 이 세 가지 허브 추출물을 선택하여 항암제로서의 개발 가치가 있을 것으로 보고 차후 실험을 시행하였다.

L1210 세포의 O_2^- 이온의 생성에 대한 허브 메탄올추출물의 영향 – 다음으로 이와 같은 허브 메탄올추출물이 L1210 암세포를 사멸시키는 작용기작을 규명하고자 세포독성과 활성산소와의 관계를 실험하였다. 활성산소는 대표적인 apoptosis 유발 물질^{27,28)}로서 암세포의 사멸에 관계될 가능성이 크므로 세포독성과 관계되는 조건에서 배양하면서 생성되는 O_2^- 이온을 정량하여 그 결과를 Table V에 제시하였다. 항암제 개발 대상 허브로 선택한 레몬 바베나, 스피아민트, 스테비아 메탄올추출물을 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하여 세포독성이 거의 나타나지 않는 배양 1일째의 경우와 세포독성이 현저한 배양 3일째의 세포를 수거하여 O_2^- 이온 정량을 시행하였다. 참고로 배양 5일째는 세포독성이 너무 커서 잔존하는 세포수도 소수일 뿐 아니라 너무 낮은 생존율 때문에 생존한 세포를 거의 볼 수 없으므로 실험 대상에서 제외하였다.

Table V의 결과에서 제시되었듯이 세포독성이 거의 일어나지 않는 배양 1일째의 L1210 세포의 O_2^- 생성량은 control 그룹의 값과 비슷하였으며, 반면에 세포독성이 확실하게 일어나는 배양 3일째 L1210 세포의 O_2^- 이온의 생성량은 크게 증가하여 control 그룹의 약 4배 내지 7배까지에 달했다. 즉 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 레몬 바베나, 스피아민트, 스테비아를 첨가하여 1일간 배양한 L1210 세포의 O_2^- 이온의 생성량은 각각 0.82, 0.67, 0.75 $\mu\text{g/ml}$ 으로서 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 인 control값과 거의 비슷하였으나 3일간 배양하여 최소한 50% 이상의 세포독성을 유발한 경우의 O_2^- 이온의 생성량은 3.85,

Table IV. Cytotoxicity of methanol extracts prepared from edible herbs against normal lymphocytes according to the concentration

Extracts	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	1	10	30	50	100
	Cytotoxicity (%)				
Cherry sage	2.1 \pm 2.7	8.0 \pm 7.4	12.2 \pm 4.0	13.2 \pm 3.1	18.3 \pm 1.5*
Lemon balm	3.1 \pm 3.7	12.1 \pm 12.3	13.3 \pm 10.2	21.6 \pm 4.1	23.4 \pm 7.8
Lemon thyme	2.3 \pm 0.6	9.2 \pm 4.7	19.4 \pm 8.4	27.3 \pm 6.2	16.5 \pm 13.6
Lemon verbena	1.7 \pm 1.9	4.8 \pm 2.5	6.7 \pm 3.2	9.2 \pm 7.5	15.2 \pm 5.9
Oregano	0.8 \pm 3.4	6.3 \pm 4.8	9.9 \pm 6.3	15.7 \pm 6.9	19.8 \pm 3.8
Peppermint	2.8 \pm 2.9	8.4 \pm 7.6	14.2 \pm 1.5*	23.2 \pm 2.7*	28.7 \pm 5.9
Rosemary	3.7 \pm 3.2	9.7 \pm 3.9	12.8 \pm 8.8	30.0 \pm 4.0	38.7 \pm 2.4**
Spearmint	2.4 \pm 1.0	6.1 \pm 7.7	7.5 \pm 1.6	9.8 \pm 0.9*	17.4 \pm 3.5
Stevia	2.1 \pm 2.8	6.3 \pm 4.0	8.3 \pm 3.2	11.4 \pm 4.3	18.7 \pm 8.9
Sweet Basil	1.5 \pm 2.3	5.4 \pm 6.5	7.8 \pm 6.4	12.7 \pm 6.3	18.3 \pm 5.7

The culture period was 3 days. Values are the mean \pm SD. Significantly different from the control (* p <0.05, ** p <0.01).

Table V. The generation of O_2^- in L1210 cell during the cytotoxic process by the methanol extracts of edible herbs

Extracts	Culture period	
	1 day	3 days
	O_2^- (nmoles/60 min/ 10^8 cells)	
None	0.78±0.12	0.91±0.06
Lemon verbena	0.82±0.25	3.85±0.15**
Spearment	0.67±0.13	4.16±0.08**
Stevia	0.75±0.21	5.41±1.46*

The concentration of the methanol extracts of edible herbs was 30 µg/ml. Values are the mean±SD. Significantly different from the control (*p<0.05, **p<0.01).

Table VI. The catalase activity changes of L1210 cells with addition of the methanol extracts of edible herbs

Extracts	Culture period	
	1 day	3 days
	Catalase (moles H_2O_2 degraded/min/ 10^8 cells)	
None	0.004±0.005	0.006±0.003
Lemon verbena	ND	0.003±0.004
Spearmint	0.002±0.005	ND
Stevia	ND	ND

The concentration of the methanol extracts of edible herbs was 30 µg/ml. Values are the mean±SD. ND means not detected.

4.16, 5.41 µg/ml로서 모두 control 그룹의 값보다 7배까지 높게 증가한 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 결과로부터 허브 메탄올추출물에 의해 일어나는 L1210 암세포의 사멸 과정에는 활성산소인 O_2^- 이온의 생성 증가가 수반되며 이 O_2^- 이온은 다양한 활성산소인 H_2O_2 , $\cdot OH$ 등이 과생되는 연쇄반응의 첫 출발물로서 대표적인 활성산소이므로 차후 연쇄적인 활성산소 대사반응이 일어날 수 있는 가능성을 시사한다고 볼 수 있었다.

허브 메탄올추출물에 의한 L1210 세포의 항산화 효소 활성 - 이상의 결과와 같이 허브메탄올 추출물을 L1210 세포에 첨가했을 때 생성된 O_2^- 은 유해활성 산소이므로 암세포도 이 O_2^- 을 제거하고자 할 가능성이 있다. 이 O_2^- 전환 반응은 SOD에 의해 H_2O_2 로, H_2O_2 는 다시 GPx나 catalase에 의해 H_2O 로 순차적인 전환을 하게 될 것이며 이 일련의 반응에 관여하는 효소활성 측정은 O_2^- 경로를 추정하는데 필요 할 것으로 판단되어 O_2^- 이온의 전환효소활성에 대한 식용 허브메탄올 추출물의 영향을 측정하여 보았다. 레몬버베나, 스피어민트, 스테비아의 메탄올 추출물을 L1210 세포에 첨가하여 세포독성 유무의 실험조건으로 배양한 다음 세포를 수거하여 $O_2^- \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O$ 로 전환시키는 superoxide

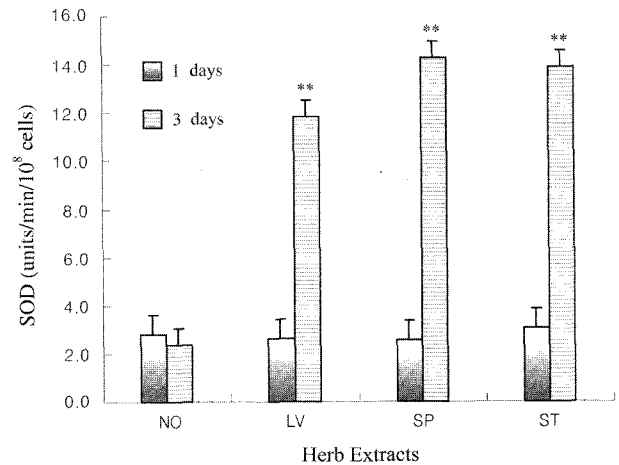


Fig. 1. The superoxide dismutase (SOD) activity changes of the cytoplasmic fraction of L1210 cells with addition of the herb methanol extracts. The concentration of the herb methanol extracts was 30 µg/ml. NO: none, LV: lemon verbena, SP: spearmint, ST: stevia (**p<0.01)

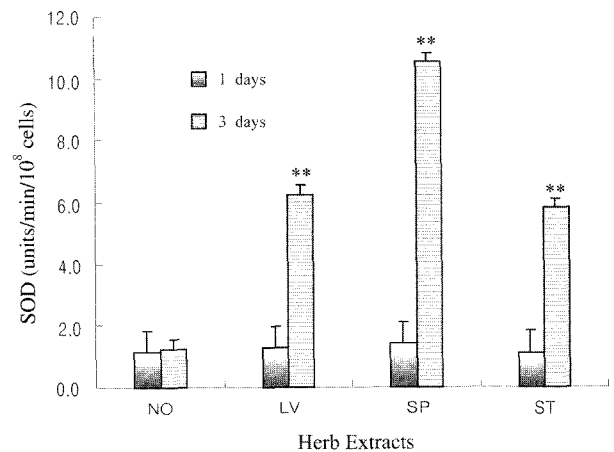


Fig. 2. The superoxide dismutase (SOD) activity changes of the mitochondrial fractions of L1210 cells with addition of herb methanol extracts. The concentration of the herb methanol extracts was 30 µg/ml. NO: none, LV: lemonverbena, SP: spearmint, ST: stevia (**p<0.01)

dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx)과 catalase 활성을 측정하였다.

이들에 관한 실험결과는 Fig. 1-Fig. 3에 각각 제시되어 있는데 연쇄반응의 첫 번째 효소인 SOD는 세포내의 존재 부위가 cytoplasm과 mitochondria로 각각 다르기 때문에 분리하여 측정해 보았다. 우선 Fig. 1과 Fig. 2에 제시한 결과에 따르면 L1210 세포의 cytoplasm과 mitochondria의 SOD 활성에 대한 세 가지 허브 메탄올추출물의 영향은 매우 유사하였다. 즉 Fig. 1에서 허브메탄올추출물을 30 µg/ml 농도로 첨가하여 배양을 1일간 시켰을 때에 비하여 세포독성이

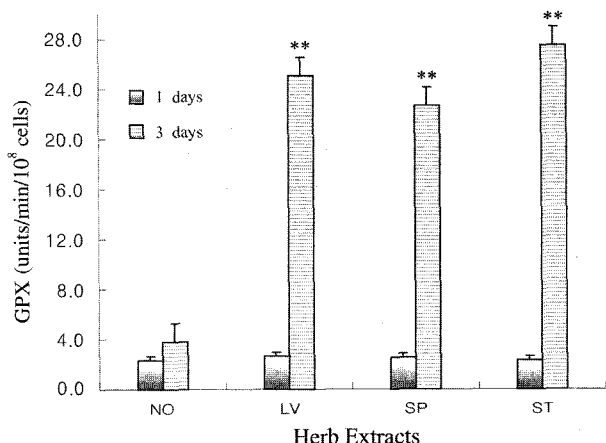


Fig. 3. The glutathione peroxidase (GPx) activity changes of L1210 cells with addition of the herb methanol extracts. The concentration of the herb spearmint, methanol extracts was 30 $\mu\text{g/ml}$. NO: none, LV: lemon verbena, SP: spearmint, ST: stevia (** $p < 0.01$).

뚜렷한 실험조건인 배양 3일째의 cytoplasm의 CuZnSOD 값은 모두 약 3배-5배 정도까지 크게 증가한 양상을 보였다. 즉 레몬 버베나의 경우 배양 1일째에 비하여 배양 3일째에는 3.7배, 스피어민트의 경우는 4.6배, 스테비아의 경우 3.8배의 활성증가를 각각 나타내었다. 이와 같은 SOD 활성의 증가는 암세포가 사멸되면서 cytoplasm내에 SOD가 반응하는 O_2^- 이온이 많아졌다는 것을 시사하므로 Table V의 결과로부터도 세포독성과정에 O_2^- 이온의 증가가 수반된다는 Table IV의 실험결과를 반증한다고 볼 수 있을 것이다.

다음으로 mitochondria의 SOD활성에 대한 허브추출물의 영향을 검색하고자 시행한 실험 결과를 보면 Fig. 2에 제시되었듯이 cytoplasm의 결과와 마찬가지로 레몬 버베나, 스피어민트, 스테비아 모두 배양 1일째에 비해 배양 3일째에 약 3-6배 정도까지 효소활성의 증가가 나타났다. Fig. 1과 Fig. 2의 결과로부터 허브 메탄올추출물에 의해 L1210 암세포가 사멸해가는 과정중에 급격하게 증가하는 O_2^- 이온을 무독화시키기 위한 첫 번째 반응 효소인 SOD는 cytoplasm과 mitochondria 모두에서 크게 유발되는 것으로 볼 수 있었다. 연이어 SOD 활성이 증가하면 반응 종산물인 H_2O_2 가 증가할 것이며 이 H_2O_2 역시 유해한 활성물질로서 이 H_2O_2 는 일부 맹독성인 $\text{OH}\cdot$ 로 자발적으로 전환되거나 또는 GPx와 catalase²⁶⁾에 의해 H_2O 로 무독화되는 반응이 일어날 것이다. GPx의 활성을 측정한 실험의 결과가 Fig. 3에 제시되어있는데 도표에서 보듯이 GPx 활성 변화는 SOD의 경우와 마찬가지로 배양 3일째가 되면 배양 1일째의 활성값에 비하여 거의 10배 정도 높은 값을 나타내었다. 이러한 양상은 세 가지 허브추출물에 있어서 다 비슷하였으며 특

히 스피어민트의 경우가 가장 높았는데 배양 1일째 2.4 units/ 10^8 cells이었던 값이 배양 3일째에는 22.5 units/ 10^8 cells로 약 10배 정도까지 증가하였다.

아울러 이 반응을 촉매하는 또 다른 효소활성인 catalase 활성을 측정해본 결과 Table VI에 제시된 바와 같이 어떠한 실험 조건에서도 실질적인 활성값이 나타나지 않은 것으로 보아 H_2O_2 의 H_2O 로의 분해는 주로 GPx 효소가 맡는 것으로 간주되었다. 이상의 결과를 총합해보면 허브추출물에 의해 L1210 암세포가 사멸해가는 과정에는 O_2^- 생성이 수반되었으며 동시에 이 O_2^- 이온을 H_2O 까지 전환시키는 효소인 SOD 및 GPx 효소의 활성도 크게 증가한 것으로 보아 허브 메탄올추출물에 의해 야기되는 L1210 암세포의 사멸은 아마도 O_2^- 이온을 비롯하여 O_2^- 이온으로부터 파생되는 H_2O_2 또는 $\cdot\text{OH}$ 등의 활성산소에 의한 직접적인 독작용에 의해 이루어지는 것으로 추정되었다. 물론 이와 같은 활성산소의 유해작용에 대해 L1210 암세포 자신도 SOD와 GPx와 같은 항산화효소의 활성증가를 통하여 활성산소를 소거하고자 하지만 충분하지 못하여 결국은 사멸되는 것이 아닌가 사료되었다. 이 같은 결과는 활성산소가 직접 간접으로 nuclear DNA 및 mitochondria DNA를 손상하여 암의 발생에 결정적으로 중요한 작용을 한다는 많은 보고²⁹⁻³¹⁾들과 더불어 많은 항암제가 암세포의 apoptosis를 유발하여 암세포를 살해할 경우에도 활성산소가 관여한다는 사실³²⁻³⁵⁾들은 암의 병리와 치료과정에 활성산소의 대사가 매우 중요하다는 것을 시사하고 있다고 사료되었다.

인용문헌

1. Craig, W. J. (1999) Health promoting properties of common herbs. *Am J. Clin. Nutr.* **70**: 491S-499S.
2. Starway, A. (1982) *Attenuative Medicine ; A guide to natural therapies.* pp: 18-32, *Penguin Books Ltd.* Hamondworth. New York.
3. Tyler, V. E. (1993) *The Honest Herbal*, 3rd edn. pp: 57-73, *Haworth Press Inc.* Binghampton. New York.
4. Tyler, V. E. (1994) *Herbs of Choice: The therapeutic use of phytochemicals.* pp: 126-145, *Haworth Press.* New York;
5. Balchin, M. L. (1997) Essential oils and "aromatherapy": their modern role in healing. *J. Rus. Soc. Health* **117**: 324-329.
6. Bucke, J. (1999) Use of aromatherapy as a complementary treatment for chronic pain. *Altern. Ther.* **5**: 42-51.
7. Eisenberg, D. M., Kessler, R.C., Foster, C., Norlock, F. E. Calkins D. R. and Delbanco, T. L. (1993) Unconventional medicine in the United States, preference, costs and patterns of use. *N. Engl. J. Med.* **328**: 246-252.

8. Caragay, A. B. (1992) Cancer preventive foods and ingredients. *Food Technol.* **46**: 65-68.
9. Lee, K. G., Mitchell, A. E. and Shibamoto, T. (2000) Determination of antioxidant properties of aroma extracts from various beans. *J. Agr. Food. Chem.* **43**: 4817-4820.
10. Lam, L. K. T., Zhang, J., Hasegawa, S. and Chut, H. A. J. (1994) Inhibition of chemically induced carcinogenesis by citrus limonoids. In: Huang, M. T., Osawa, T., Ho, C. T., Rosen, R. T., eds. Food of phytochemicals for cancer prevention I. fruits and vegetables. Washington DC : *American Chemical Society*. pp: 209-219.
11. Tian, Q., Miller, E. G., Ahmad, H., Tang, L. and Patil, B. S. (2001) Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutrition and Cancer* **40**: 180-184.
12. Zheng, G. Q., Zhang, J., Kenney, P. M. and Lam, L. K. T. (1994) Stimulation of glutathione S-transferase and inhibition of carcinogenesis in mice by celery seed oil constituents. In: Huang M. T., Osawa, T., Ho, C. T., Rosen, R. T., eds., Food phytochemicals for cancer prevention I. Fruits and vegetables. Washington, DC: *American Chemical Society* pp: 230-238.
13. Cuvlier, M. E., Bercet, C. and Richard, H. (1994) Antioxidant constituents in sage(*Salvia officinales*) *J. Agr. Food Chem.* **42**: 665-669.
14. Kikuzaki, H. and Nakatani, N. (1993) Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.* **58**: 1407-1410.
15. Elson, C. E. and Yu, S. G. (1994) The chemoprevention of cancer by mevalonate derived constituents of fruits and vegetables. *J. Nutr.* **124**: 607-614.
16. Bailer, J. C. and Gornick, H. L. (1997) Cancer undefeated. *N. Eng. J. Med.* **336**: 1569-1573.
17. Astrow, A. B. (1994) Rethinking cancer. *Lancet* **343**: 494-498.
18. Jung, D. Y. , Ha, H. K., Kim, A. N., Lee, S. M., Min, T. J. and Park, S. W. (2000) Cytotoxicity of SD-994 from *Artemisia argyi* against L1210 cells with concomitant induction of antioxidant enzymes. *Yakhak Hoeji* **44**: 213-218.
19. Lee, T. E., Park, S. W. and Min, T. J. (1999) Antiproliferative effect of *Artemisia argyi* extract against J774. A cells and subcellular superoxide dismutase (SOD) activity changes. *J. Biochem. Molecular. Biol.* **32**: 585-592.
20. National Cancer Institute USA: Cell culture screen KB. Protocol 1600. (1972) *Cancer Chemotherapy Rep.* (part 3) **3**: 17-27.
21. Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watts, G. L. (1971) Cytotoxicity assays with L1210 cells *in vitro*: comparison with L1210 and KB cells *in vitro*. *Cancer Chemotherapy Rep.* (part 2) **2**: 1-25.
21. Boyum, A. (1968) Isolation of leukocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Invest.* **21**: 9-16.
22. Markesbery, W. R. (1994) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Med.* **23**: 134-141.
23. Roberfield, M. and Calderon, P. B. (1995) Free radicals and oxidative phenomenon in biological system. pp.: 48-63, *Marcel Dekkor Inc.* New York.
24. McCord, J. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyuprein (heterocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
25. Boyum, A. (1968) Isolation of leukocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Invest.* **21**: 9-14.
26. Maral, J., Puget K. and Michelson, A. M. (1977) Comparative study of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**: 1525-1534.
27. Jacobson, M. D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**: 83-89.
28. Evans, M. D., Griffith, H. R. and Lunec, J. (1997) Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms. *Advan. Molecul. Cell Biol.* **20**: 25-32.
29. Rice, E. C. and Burdon, R. Free radical lipid interaction and their pahological consequences. (1993) *Prog. Lipid Res.* **32**: 71-78.
30. Cerutti, P. A. (1994) Oxidative stress and cancer. *Lancet* **344**: 862-869.
31. Wieseman, H. and Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen species and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**: 17-29.
32. Kagan, V. E., Kuzmenko, A. I., Tyurina, Y. Y., Shvedora, A. A., Matrura, T. and Yalowich, J. C. (2001) Pro-oxidant and antioxidant mechanism of etoposide in HL60 cells: Role of myeloperoxidase. *Cancer Res.* **61**: 7777-7784.
33. Shacter, E., Williams, J. A., Hinson, R. M., Senturker, S. and Lee, Y. J. (2000) Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy : inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood* **96**: 307-313.
34. Lee, N. K., Kim, H. J., Yang, S. J., Kim, Y. S., Choi, H. I. Shim, M. J. and Kim, T. U. (2001) The anticancer mechanism of taxol diethylenetriamine pentaacetate conjugate in HT29 human colorectal cancer cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**: 237-245.
35. Burger, A., Jenkins, T., Double, J. and Bibby, M. (1999) Cellular uptake, cytotoxicity and DNA binding studies of the novel imidazolacridine antineoplastic agent C1311. *Br. J. Cancer* **81**: 367-373.

(2002년 9월 2일 접수)