

시호추출물의 ICR 발암생쥐의 생존율 및 J774A.1 세포와 L1210 세포의 증식에 미치는 영향

하혜경¹ · 정대영 · 박시원*

상명대학교 화학과, ¹한국한의학연구원 한약제제연구부

Effects of *Bupleurum falcatum* Extract on the Survival of Cancered ICR Mouse and the Growth of Cancer Cells such as J774A.1 Cells and L1210 Cells

Hyekyung Ha¹, Dae Young Jung, and Sie Won Park*

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

¹Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Abstract – The current investigation was carried out to find out the anticancer activity of the methanol extract from *Bupleurum falcatum* against cancered ICR mouse and cancer cell lines such as J774A.1 and L1210 cells. Extract of *Bupleurum falcatum* displayed the considerable augmentation(134%) of the survival of ICR mouse bearing Sarcoma 180 cancer. In addition, the cytotoxic effects of methanol extract of *Bupleurum falcatum* against J774A.1 cells and L1210 cells were found to show IC₅₀ values of 57.3 µg/ml and 54.6 µg/ml, respectively. In contrast to such cytotoxicity against cancer cells, the extract exerted only meagre toxicity against normal lymphocytes. The increased generation of O₂⁻ and the considerably increased activities of superoxide dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GPx) of both J774A.1 cells and L1210 cells in the presence of *Bupleurum falcatum* extract implied that the observed cytotoxicities may have resulted from the detrimental effect of reactive oxygen species(ROS) evoked by *Bupleurum falcatum* extract on the cancer cells.

Key words – *Bupleurum falcatum*, anticancer activity, ICR mouse, J774A.1 cells, L1210 cells, reactive oxygen species(ROS)

시호(*Bupleurum falcatum*)는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본식물로서 약리 부위는 뿌리이며 소염, 해열, 면역보강, 진통, 위양 치료 등 다양한 효과가 밝혀져 왔다.¹⁻⁴⁾ 이중에서 특히 간염 및 위궤양 등에 대한 소염작용과 면역 보강효과는 매우 우수하며 이와 같은 시호의 효과로부터 항암작용도 있을 가능성이 시사되어왔다.

시호의 소염작용이나 면역보강작용은 최근에 발암의 주요 원인으로 거론되고 있는 염증을 제어할 수도 있고, 아울러 항암면역계를 활성화 할 수도 있을 가능성도 있기 때문에 시호의 항암효과를 유추할 수 있었던 것이다. 현행 화학요법제인 항암제는 전신적으로 작용이 이루어진다는 점에서 치료는 물론 전이를 예방하기 위해 대부분의 환자에게 필수적으로 투여되고 있다. 그러나 항암제는 정상세포에 대한 독성과 다재내성⁵⁻⁷⁾과 같은 많은 문제를 내포하고 있으

므로 암세포에 대한 세포독성 이외 정상조직에 대한 독성 유무가 치료효과의 질에 있어서 관건이라고 볼 수 있으나 현재까지도 이상적인 항암제는 얻어지지 않고 있는 실정이다.

한편 암(cancer)이란 DNA mutation으로 인하여 cell proliferation이 비정상적으로 왕성하거나 apoptosis가 적절하게 일어나지 않은 상태로써 활성 산소(reactive oxygen species, ROS)에 의해서 야기되는 oxidative stress^{8,9)}가 주요 원인으로 보고 있는데, 역으로 많은 항암제의 작용기작¹⁰⁻¹⁴⁾ 역시 암세포에서 활성산소를 촉발시키고 이 활성산소가 암세포의 정상생리를 교란시켜 apoptosis를 유발하거나 또는 cell cycle arrest 효과를 나타내어 암세포수의 증식을 억제하는 것으로 알려져 왔다. 따라서 활성 산소는 발암과 항암의 병리 과정에 공통으로 관여하는 주요인자로 간주되었다. 본 연구에서는 면역계 활성화에 높은 효과를 나타내어 다수의 한약처방의 재료로 선호되고 있는 시호의 메탄올추출물에 대하여 동물준위와 암 세포주 준위에서의 항암작용을 검색하

*교신저자(E-mail) : parksw@smu.ac.kr
(FAX) : 02-396-8758

고 나아가 그 작용 기작을 활성산소 대사와 연계하여 실험하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기 - RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), streptomycin/ penicilline mixture는 GIBCO BRL(Grand Island, New York, USA)의 제품이었고, ferricytochrome c, xanthine, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione, glutathione reductase, phorbol 12-myristate 13-acetate, nicotinamide adenine dinucleotide reduced, trypan blue는 Sigma(St Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며 ethylenetetraacetate, hydrogen peroxide, dimethylsulfoxide 등 일반 무기, 유기시약은 특급수준의 제품을 사용하였다.

시호 추출물의 조제 - 시호는 경동시장의 토종 생약협회에서 일괄 구입하여 전 실험을 통하여 균일한 재료를 사용하였다. 시호 뿌리는 흙을 씻어내고 물기를 닦아낸 다음 100 g을 세절하여 1의 70% 메탄올에 침지하여 24시간 실온에서 방치한 후 상등액을 취한 다음 잔사에 이 방법을 반복 하여 상등액을 취하였다. 앞서 얻은 상등액과 합하여 10 겹의 gauze를 통과시켜 얻은 여액을 다시 Whatman 여지로 통과시켜 그 여액을 진공 증류기로 감압 농축한 다음 냉동 건조하여 무게를 평량 하였으며 수율은 평균 15.7%이었다.

발암 ICR 생쥐의 생존효과 - ICR 생쥐의 복강에서 계대배양 되어온 Sarcoma 180 세포를 실험용 ICR 마우스 복강에 1×10^5 cells/10 μ l/20 g body weight의 농도로 접종한 다음 24시간 후부터 시호 추출물을 0.3% 내의 최소한의 DMSO에 용해하여 10~200 μ g/20 g body weight의 농도로 매일 일정 시간에 한차례 씩 경구투여 한 다음 상태를 관찰하면서 20일째에 살아남은 마리수로 생존율을 계산하였다. Control군에는 시료를 용해시킨 것과 동일 용량의 DMSO를 증류수에 가하여 경구 투여하였다.

J774A.1 세포 및 L1210 세포 배양 - J774A.1 cells (monocytemacrophage, mouse, ATCC TIB 67)과 L1210 cells(lymphocytic leukemia, mouse, ATCC CCL 219)은 생쥐의 백혈병계 임파구로서 한국세포주 은행(서울대 암연구센터)에서 분양 받아 사용하였다. 이들 암세포는 37°C, 5% CO₂, humidified condition에서 배양하였으며 배양액의 구성은 RPMI 1640에 FBS를 10%가 되도록 첨가하고 penicillin/streptomycin 혼합액을 첨가하였으며 계대 배양은 3~4일 마다 시행하였다.

Normal lymphocytes 분리 - 시호 메탄올 추출물의 정상세포에 대한 무독성의 정도를 검색하고자 ICR 생쥐로부터 normal lymphocytes를 분리하여 이에 대한 세포독성을 검색하였다. Normal lymphocytes의 분리방법은 Boyum의 방법¹⁵⁾을 적용하였다. ICR 생쥐를 경추 탈골한 다음 하대

정맥을 절개하여 헤파린 처리가 된 주사기에 채혈한 뒤 15 ml tube에 모아서 여기에 dextran 유도체인 Histopaque^R-1077 3 ml를 조심스럽게 가하여 30분간 실온에서 원심분리하였다. 원심분리 후 pasteur pipette으로 상등액인 plasma층을 제거하고 lymphocyte가 포함된 불투명한 중간층을 취하여 phosphated buffered saline(PBS) 10 ml과 조심스럽게 혼합한 다음 10분간 원심 분리하여 상등액은 버리고 PBS로 2회 반복 세척하여 얻어진 lymphocytes를 PBS에 부유시켜 세포 수를 계산하여 조절한 다음 배양에 사용하였다.

J774A.1 세포, L1210 세포 및 normal lymphocytes에 대한 세포독성 - 시호 추출물의 암세포에 대한 세포독성을 검색하기 위하여 다음과 같은 방법을 적용하였다. 24 well plate에 1×10^6 cells/ml의 농도로 J774A.1 세포, L1210 세포 또는 normal lymphocytes를 넣고 각각에 시호 메탄올추출물을 가하여 1~3일 동안 배양 후 trypan blue exclusion 법으로 살아있는 세포수를 세어 control 그룹의 살아있는 세포수와 비교하여 세포독성을 다음 식에 준하여 백분율(%)로 산출하였다. Normal lymphocytes에 대한 세포독성 역시 암세포에 대한 방법과 동일하게 이루어졌다. 세포독성의 계산은 약물을 가하는 시점에서의 세포수(Tz, zero time)와 약물대신 동량의 배지만을 가하여 배양했을 때의 세포수(C, control) 및 시호추출물을 가하여 배양했을 때의 세포수(T, test)를 각각 측정하여 다음의 수식에 따라 이루어졌다. 즉 $Tz > T$ 인 경우에는 $[(T - Tz)/(C - Tz)] \times 100$ 으로 계산하였고, $Tz < T$ 인 경우에는 $[(C - Tz)/Tz] \times 100$ 의 수식으로 계산하였다.

J774A.1 세포 및 L1210 세포에서 생성된 O₂⁻ 이온 정량 - J774A.1세포와 L1210 세포 배양액에 시호추출물을 첨가한 다음 일정기간 배양 후 생성된 O₂⁻ 이온의 정량은 Markesbery¹⁶⁾의 방법에 의하여 이루어졌다. 본 실험에서는 시호추출물을 가하여 1~3일동안 배양한 다음 포집된 두 가지 암세포를 24 well plate에 1×10^6 cells/well, 700 μ l PBS, 50 μ l cytochrome c, 5 μ g/ml의 phorbol myristate acetate (PMA) 50 μ l를 첨가하여 60분간 배양 후에 원심분리 하였다. 이 상등액 200 μ l에 PBS를 가하여 1 ml가 되도록 희석하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferricytochrome c의 환원반응은 21.1/mM/cm의 몰흡광계수를 적용하였으며 O₂⁻ 생성량은 nmoles/60 min/10⁸ cells로 나타내었다.

항산화 효소액 조제 - J774A.1 세포 및 L1210 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 접종한 배양액 10 ml를 50 ml culture flask에서 일정기간 배양한 후 1,000xg에서 원심분리하여 상등액은 제거하고 침전한 L1210 세포를 생리식염수로 2회 세척하였다. 포집된 세포를 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 1.5 ml에 현탁하여 Elvehjehm homogenizer를 이용하여 ice bath내에서 5초씩 5회 균질화 하였다. 이 균질액에 대하여 초음파 파쇄기를 이용하여 얼음 상에서 30초

간 3회 초음파 처리하여 mitochondria matrix에 존재하는 것으로 알려진 MnSOD 효소까지 용출된 이 균질액을 12,000 rpm에서 원심분리하여 그 상등액을 total SOD 효소액으로 조제하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정 - SOD활성의 측정은 기본적으로 McCord and Fridovich¹⁷⁾의 방법에 의해 이루어졌다. 전체 반응액 3 ml에 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 oxidase(XOD)를 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 이상의 조건에서 나타나는 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 책정하여 units/min/10⁸ cells로 나타내었다.

Glutathione peroxidase(GPx) 활성 측정 - GPx의 활성은 Maral *et al.*의 방법¹⁸⁾에 의하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(5 mM EDTA, pH 7.0), 8.4 mM NADPH, 1 unit glutathione reductase(GSSGR), 150 mM의 glutathione(GSH), 효소액을 첨가하여 전체 반응액이 1 ml가 되도록 한 다음 37°C에서 5분간 방치시킨 후 0.16 mM hydrogen peroxide를 가하여 340 nm에서 3분 동안 NADPH의 산화에 의해 감소되는 흡광도의 변화를 측정하였다.

Catalase 활성 측정 - Catalase 활성의 측정은 250 nm, 25°C에서 흡광도 감소를 근거로 하는 Maral *et al.*¹⁸⁾의 방법을 적용하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 12.5 mM H₂O₂ 및 효소액을 가하여 전체 반응액이 1 ml가 되도록 한 후 250 nm에서 10초 단위로 3분간 흡광도 변화를 측정하였다.

통계처리 - 실험결과는 mean ± SD로 표시하였고 Student *t*-test를 실시하여 **p* < 0.05, ***p* < 0.01를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

결과 및 고찰

시호추출물에 의한 발암 ICR 생쥐의 생존율 변화 - Sarcoma 180으로 발암시킨 ICR 생쥐에 시호추출물을 경구 투여하여 계산한 생존율 결과는 Table I에 표시한 바와 같다. ICR 생쥐에 Sarcoma 180 세포를 접종하여 24시간이 지난 후부터 시호추출물을 10~200 µg/ml로 매일 한차례씩 경구투여 하면서 21일째에 살아있는 동물수를 계산한 결과 대체적으로 시호추출물의 농도가 증가할수록 살아남은 생쥐의 마리수가 증가하였는데, 특히 70 µg/ml 농도에서는 가장 높아 생존율이 control 군의 134%에 달하였다. 이로써 시호

Table I. Effect of *Bupleurum falcatum* extract on the survival of ICR mouse with induced abdominal cancer

Bupleurum (µg/ml)	Survived animals	% of Control
0	1.78 ± 0.42	100
20	1.84 ± 0.12	104.5
50	2.13 ± 0.07**	120.1
70	2.38 ± 0.09**	133.7
100	2.27 ± 0.11*	127.5
200	1.87 ± 0.56	105.1

Each data represents the mean ± SD of four individual experiments (n=5).

Asterics denote a significant difference compared with the control group (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

추출물은 복수암을 유발시킨 ICR 생쥐의 생존율을 상당히 증가시키는 것을 알 수 있었다.

시호추출물의 J774A.1 세포 및 L1210 세포에 대한 세포독성 효과 - 백혈병계 암세포인 J774A.1 세포와 L1210 세포에 대해 나타내는 시호추출물의 세포독성 효과가 Table II에 제시되어있다. 시호추출물은 J774A.1 세포와 L1210 세포에 대해 모두 배양기간과 농도에 따라 세포독성이 높아졌는데 저 농도인 10 µg/ml 에서부터 3일간 배양했을 때 10% 이상의 세포독성 효과를 나타내기 시작하여 70 µg/ml 의 농도에서 3일간 배양하였을 때 J774A.1 세포와 L1210 세포에 대해 각각 84.7%와 89.45%의 가장 현저한 세포독성 효과를 나타냈으며 그 이상의 고농도에서는 약 90% 정도의 세포독성으로 살아남은 암세포가 매우 적었다. J774A.1 세포와 L1210 세포에 대한 IC₅₀ 값은 각각 57.3 µg/ml과 54.6 µg/ml 으로 계산되었다.

Normal lymphocytes에 대한 시호추출물의 세포독성 - 시호추출물의 정상세포에 대한 독성 정도를 파악하기 위하여 normal lymphocytes에 대한 세포독성을 측정하여 그 결과를 Table III에 제시하였다. 배양 1일째는 control군과 시호추출물 첨가군 모두 세포독성이 거의 나타나지 않았으나 배양 3일째가 되면 약간의 세포독성이 나타났는데 그 값은 암세포의 것에 비하여 매우 낮았다. 예를 들어 시호추출물을 암세포에 70 µg/ml 농도로 첨가하여 3일간 배양하면 두 가지 암세포 모두 80% 이상의 높은 세포독성을 보였던 경우에도(Table II) normal lymphocytes에 대해서는 약 8% 정도의 매우 낮은 세포독성만을 나타내었다. 따라서 시호추출물은 매우 고농도가 아닌 경우에는 정상세포에 대하여 독성이 없거나 매우 미약한 독성만을 나타내므로 비교적 안전한 항암제로서의 가능성이 있다고 간주되었다.

시호추출물에 의한 J774A.1 세포 및 L1210 세포의 O₂⁻ 생성 - 이상의 결과로부터 시호추출물이 농도 의존적으로 J774A.1 세포와 L1210 세포에 대해 세포독성을 나타냄을 알게 되었으므로 다음 실험은 이 세포독성 효과가 어떠한

Table II. Cytotoxic effect of *Buplerum falcatum* extract against J774A.1 cells and L1210 cells according to the concentration and culture period

	<i>Buplerum falcatum</i> ($\mu\text{g/ml}$)					
	10	20	50	70	100	200
	Cytotoxicity (%)					
J774A.1 cells						
1 day	6.7 \pm 1.5	5.6 \pm 2.4	7.0 \pm 4.9	6.6 \pm 6.9	8.2 \pm 5.3	11.5 \pm 5.3
2 days	8.1 \pm 4.1	7.7 \pm 3.8	26.0 \pm 3.1	29.2 \pm 5.1	35.8 \pm 2.9**	38.2 \pm 9.5
3 days	11.5 \pm 8.0	23.8 \pm 5.7	43.0 \pm 1.1**	84.7 \pm 2.5**	88.2 \pm 7.2*	93.5 \pm 8.4**
L1210 cells						
1 day	2.7 \pm 0.7	2.8 \pm 0.5	5.3 \pm 5.6	8.8 \pm 7.4	11.6 \pm 7.3	13.9 \pm 4.8
2 days	8.4 \pm 0.6	11.5 \pm 4.6	15.3 \pm 3.2	17.2 \pm 4.6	20.1 \pm 4.3	28.5 \pm 6.3
3 days	13.5 \pm 1.7	21.3 \pm 0.9*	47.5 \pm 2.9*	89.4 \pm 7.4**	87.1 \pm 8.2**	87.6 \pm 15.2

Each data represents the mean \pm SD of four individual experiments.

Asterics denote a significant difference compared with the control group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

Table III. Cytotoxic effect of *Buplerum falcatum* extract on normal lymphocytes according to the concentration and culture period

	<i>Buplerum falcatum</i> ($\mu\text{g/ml}$)					
	10	20	50	70	100	200
	Cytotoxicity (%)					
1 day	-1.3 \pm 0.5	0.5 \pm 0.8	0.4 \pm 1.5	2.7 \pm 1.5	2.6 \pm 1.3	3.8 \pm 0.7
2 day	0.9 \pm 1.1	2.3 \pm 1.7	3.6 \pm 0.3*	3.7 \pm 0.5	5.5 \pm 0.2**	5.2 \pm 0.4*
3 day	4.3 \pm 0.7	6.7 \pm 0.2**	5.9 \pm 0.7	8.1 \pm 0.3**	7.5 \pm 0.4*	8.4 \pm 1.8

Each data represents the mean \pm SD of four individual experiment.

Asterics denote a significant difference compared with the control group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

기작에 의해 일어나는지 규명하고자 시행하였다. 밝혀진 바에 의하면 항암제에 의한 암세포 사멸 기작은 많은 경우 항암제가 암세포에 활성산소 생성을 증가시키고 연이어 이 활성산소가 apoptosis를 유발하여 결국 암세포가 사멸하는 세포독성 작용을 나타내는 것으로 알려져 왔다. 따라서 본 실험에서도 시호추출물에 의한 암세포에 대한 세포독성에 활성산소가 개입하는지 확인하고자 시호 추출물의 첨가에 의

한 O_2^- 이온의 생성량의 변화를 측정하여 보았다. O_2^- 는 O_2 (dioxygen)로부터 유래하는 모든 활성산소의 첫 번째 물질이므로 O_2^- 의 존재유무 또는 생성량의 정도를 보아 활성산소 관련여부를 최소한 판단할 수 있을 것으로 간주하여 이 실험을 시도하였다.

배양기간을 달리하여 세포독성의 차이를 둔 실험군에 시호추출물을 첨가하여 그에 따른 O_2^- 생성량을 측정된 결과

Table IV. Effect of *Buplerum falcatum* extract on the generation of O_2^- in J774A. 1 cells and L1210 cells according to the concentration and culture period

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	O_2^- (nmoles/60 min/ 10^8 cells)			
	J774A. 1		L1210	
	1 day	2 day	1 day	2 day
0	1.92 \pm 0.05	2.56 \pm 0.03	1.86 \pm 0.05	2.93 \pm 0.06*
20	1.65 \pm 0.04	2.72 \pm 0.05*	1.87 \pm 0.11	3.72 \pm 0.08*
50	1.92 \pm 0.07	3.25 \pm 0.13*	2.73 \pm 0.05*	3.49 \pm 0.13
70	2.18 \pm 0.06**	6.73 \pm 0.06**	2.19 \pm 0.07*	5.97 \pm 0.18**
100	2.43 \pm 0.13	7.92 \pm 0.03**	2.85 \pm 0.05*	7.63 \pm 0.02**

Each data represents the mean \pm SD of four individual experiments.

Asterics denote a significant difference compared with the control group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

가 Table IV에 제시되어 있다.

결과에 따르면 걸보기에는 세포 독성이 거의 없던 배양 1 일째에 시호추출물을 첨가하면 O₂⁻ 생성이 이미 점진적으로 증가하기 시작하여 두가지 암세포의 경우 모두 control 그룹의 약 140~160%까지 증가하였으며 세포독성이 뚜렷한 배양 2일째에는 시호추출물의 농도에 비례적으로 증가하여 70 µg/ml의 농도에서는 J774A.1 세포와 L1210 세포 모두 control 값의 281%와 246%까지 높은 증가를 보였다. 이 결과로부터 시호 메탄올추출물이 암세포를 사멸시킬 때 암세포 내에 O₂⁻ 이온의 생성이 증가되며 이 사실은 시호추출물에 의한 암세포 사멸과정에 O₂⁻ 이온을 비롯한 활성산소가 관여할 수도 있다는 것을 시사한다고 볼 수 있었다. 한편 이 O₂⁻ 이온은 유해한 물질이므로 암세포도 O₂⁻에서 벗어나기 위해 대응반응을 시도할 가능성이 있으므로 그 일환으로 다음 실험을 진행하였다. 즉 O₂⁻의 대사과정을 주관하는 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase 활성의 변화를 시호추출물에 의한 세포독성과 연계하여 측정하여 보았다.

시호추출물에 의한 J774A.1 세포와 L1210세포의 superoxide dismutase (SOD) 활성 - O₂⁻은 SOD에 의해서 H₂O₂로 전환되고 이 H₂O₂는 catalase나 GPx에 의해서 무독한 H₂O로 전환되거나 또는 Fenton 반응에 의해 맹독성인 ·OH radical^{8,9)}로 전환되는 것으로 알려져 있는데, 시호추출물에 의해 생성된 O₂⁻의 첫 번째 전환반응의 효소인 SOD 활성 변화가 수반되는지 파악하기 위하여 세포독성에 따른 SOD 활성 변화를 검색하여 보았다. Fig. 1에 제시된

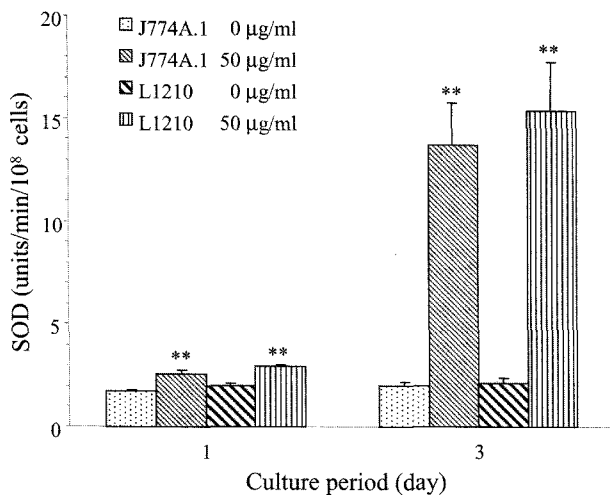


Fig. 1. Effect of the *Buplerum falcatum* extract on the superoxide dismutase activities of J774A.1 cells and L1210 cells according to the concentration and culture period. Each data represents the mean ± SD of four individual experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (**p < 0.01).

결과를 보면 시호추출물을 첨가하여 세포독성이 뚜렷한 경우 SOD 활성이 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 즉 세포독성이 거의 일어나지 않는 조건인 배양 1일째에 시호추출물을 50 µg/ml 농도로 가한 J774A.1 세포와 L1210 세포의 SOD 활성은 2.56 units/10⁸ cells과 2.93 units/10⁸ cells로서 각각의 control값에 비하여 거의 변화하지 않았다. 반면에 세포독성이 Table II의 결과에서 보듯이 80% 정도로 높았던 배양 3일째에서의 50 µg/ml 농도로 가한 J774A.1 세포와 L1210 세포의 SOD 활성은 13.72 units/10⁸ cells와 15.64 units/10⁸ cells로서 각각의 control 값보다 약 6배와 7배의 활성 증가를 나타내었다.

이상의 결과로부터 시호 메탄올추출물을 첨가하면 두가지 암세포 모두 세포독성과 비례하여 O₂⁻의 증가 및 약 6~7 배에 가까운 SOD 활성의 증가를 수반한 것으로 보아 이들이 나타내는 암세포에 대한 세포독성에는 활성산소인 O₂⁻이 관여하며 암세포는 이 유해한 O₂⁻의 독성을 벗어나기 위해 SOD 활성을 증가시키는 것으로 간주되었다. 이 SOD의 작용 결과 생성되는 종산물인 H₂O₂ 역시 유해한 활성산소이므로 다음 실험으로는 H₂O₂ 분해효소인 GPx와 catalase 효소의 활성을 측정하였다.

시호추출물의 첨가에 의한 GPx(glutathione peroxidase)와 catalase 활성 변화 - O₂⁻ 이온으로부터 SOD에 의해 H₂O₂가 생성되었다면 다음 단계로 이 H₂O₂가 무독성의 H₂O로 전환되는 지 알아보기 위하여 GPx 활성과 catalase 활성의 변화를 측정하여 보았다. Fig. 2에 표시된 결과에 의하면 시호추출물을 첨가하여 세포독성에 따른 GPx 활성을 측정

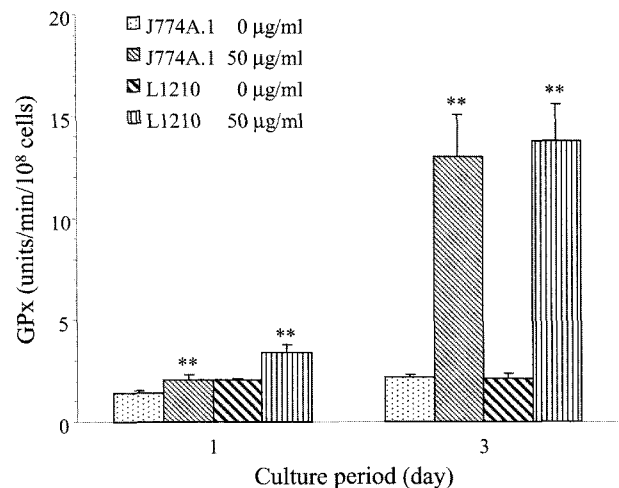


Fig. 2. Effect of the *Buplerum falcatum* extract on the glutathione peroxidase activities of J774A.1 cells and L1210 cells according to the concentration and culture period. Each data represents the mean ± SD of four individual experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (**p < 0.01).

한바 세포독성에 비례하여 GPx 활성이 뚜렷하게 변화하는 것을 알 수 있었다. 우선 세포독성이 거의 일어나지 않은 조건으로 시호추출물을 첨가하여 1일간 배양시켰을 때 GPx 활성은 50 µg/ml 농도에서 각각 2.86 units/10⁸ cells과 2.67 units/10⁸ cells로서 각각의 control 값과 유사하였다. 반면에 세포독성이 뚜렷했던 배양 3일째에는 50 µg/ml의 경우 J774A.1 세포와 L1210 세포에 있어서 13.12 units/10⁸ cells과 13.87 units/10⁸ cells로서 모두 약 5~6배 정도의 높은 GPx 활성 증가를 보였다.

한편 GPx 이외의 H₂O₂를 분해하는 효소인 catalase 활성을 동일 조건에서 측정하면 어느 조건에서도 활성이 측정되지 않았는데 이 결과로 보아 H₂O₂는 아마도 peroxisome에 국재되어 있는 catalase 보다는 세포질에 널리 존재하는 GPx에 의해서 주로 분해 될 가능성을 보였다. 이상의 결과를 집약하면 시호추출물은 발암을 유발시킨 ICR 생쥐의 생존율을 134%까지 높였으며, 정상세포에는 독성이 미약한 반면 J774A.1 세포와 L1210 세포에 대해서는 농도와 배양기간에 따른 높은 세포독성을 나타내었다. 시호추출물의 암세포에 대한 세포독성 작용기작은 시호추출물이 이들 암세포 내에 O₂⁻ 이온을 양산하도록 유도하고 이로부터 생성된 H₂O₂ 또는 ·OH 등의 활성산소가 결국 정상적인 암세포생리를 저해하여 apoptosis를 유발하거나 cell cycle arrest를 일으켜 암세포증식을 억제시키는 가능성이 시사되었으며, 한편으로 이와 같이 급증된 활성산소의 독성에 대하여 암세포는 항산화효소인 SOD나 GPx를 유발하여 활성산소의 독성을 막아보려 하나 결국은 역부족이었던 것으로 간주된다.

결 론

시호의 메탄올 추출물을 Sarcoma 180으로 복수암을 유발시킨 ICR 생쥐에게 10~200 µg/10 µl/20 g body weight로 경구투여 한바 생존율을 최고 ccontrol 값의 134%까지 증가시켰으며, 암세포인 J774A.1 세포와 L1210 세포에 대해서는 최고 90% 이상의 높은 세포독성을 나타내었다. 한편 ICR 생쥐로부터 분리한 normal lymphocyte에 대해서는 70 µg/ml의 농도에서도 약 10% 미만의 약한 독성만을 나타내었다. 이 결과로부터 시호추출액은 암세포에 대해서는 상당한 세포독성을 나타낸 반면 정상세포에 대해서는 비교적 안정한 항암제로서의 가능성이 있는 것으로 유추되었다. 암세포에 대한 작용기작을 규명하고자 시호추출물을 가했을 때 O₂⁻ 이온의 생성량이 모두 2~3배까지 크게 증가하였으며 이 O₂⁻ 이온의 전환효소인 SOD, GPx도 연이어 6~7배 정도까지 크게 증가한 것으로 보아 시호추출물에 의한 L1210 세포 및 J774A.1 세포에 대한 세포독성 과정에 활성산소가 밀접하게 관련되는 것으로 간주되었다.

인용문헌

1. Matsumoto, T., Cyong, J. C., Kiyohara, H., Matsui, H., Abe, A., Hirano, M., Danbara, H., and Yamada, H. (1993) The pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L. enhances immune complexes binding to peritoneal macrophages through Fc receptor expression. *Inter. J. Immunopharmacol.* **15**: 683-693.
2. Guo, Y., Matsumoto, T., Kikuchi, Y., Ikejima, T., Wang, B., and Yamada, H. (2000) Effect of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. on interleukin 6 production of murine B cells and B cell lines. *Immunopharmacol.* **49**: 307-316.
3. Yamada, H., Hirano, M., and Kiyohara, H. (1991) Partial structure of an anti-ulcer pectic polysaccharides from roots of *Bupleurum falcatum*. *Carbohydr. Res.* **219**: 173-192.
4. Yamada, H., Sun, X. B., Matsumoto, T., Ra, K. S., Hirano, N., and Kiyohara, H. (1991) Purification of anti-ulcer polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Plant Medicine.* **57**: 555-559.
5. Astrow, A. B. (1994) Rethinking cancer. *Lancet* **343**: 494-499.
6. Bailer, J. C. and Gormick, H. L. (1997) Cancer undefeated. *N. Eng. J. Med.* **336**: 1569-1573.
7. Lopes, C., Garcia, M., Benavides, F., Shen, J., Conti, C. J., Alvarez, E., and Hajos, S. E. (2003) Multidrug resistance modulators PSC 833 and CsA show differential capacity to induce apoptosis in lymphoid leukemia cell lines independently of their MDR phenotype. *Leukemia Res.* **27**: 413-423.
8. Cook, J. A., Gius, D., Wibk, D. A., Krishna, M.C., Russo, A., and Mitchell, J. B. (2004) Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Seminars Radiat. Oncol.* **14**: 259-266.
9. Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updates.* **7**: 97-110.
10. Wiseman, 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**: 1729-1734.
11. Lai, M. T., Huang, K. L., Chang, W. M., and Lai, Y. K. (2003) Geldamycin induction of *grp78* requires activation of reactive oxygen species via ER stress responsive elements in 9L rat brain tumor cells. *Cellular Signaling* **15**: 585-595.
12. Steel, V. E. (2003) Current mechanistic approaches to the chemoprevention of cancer. *J. Biochem Molecul Biol.* **36**: 78-81.
13. Tudor, G., Gutierrez, P., Gutierrez, A. A., and Sausville, E. A. (2003) Cytotoxicity and apoptosis of benzoquinones' redox cycling, cytochrome c release and BAD protein expression. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 1061-1075.
14. Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T., and

- Leeuwenburgh, C. (2002) Doxorubicin treatment *in vivo* causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax Ratio. *Cancer Res.* **62**: 4592-4598.
15. Boyum, A. (1968) Isolation of leukocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Invest.* **21**: 9-14.
16. Markesbery, W. R. (1994) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. *Free Radical Bio. Med.* **23**: 134-139.
17. McCord, J. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6054.
18. 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**: 1525-1531.

(2004년 8월 1일 접수)