

어성초 추출물의 ICR 생쥐와 L1210 세포에 대한 항암작용 및 SOD, GPx 효소활성변화

하혜경* · 정대영 · 박시원#

상명대학교 화학과, *한국한의약연구원 한약제제연구부

(Received July 2, 2003; Revised August 6, 2004)

Anticancer Effect of *Houttuynia cordata* Extract on Cancered ICR Mouse and L1210 Cells with Changes of SOD and GPx Activities

Hyekyoung Ha*, Dae Young Jung and Sie Won Park#

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

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

Abstract — The present investigation was undertaken to examine the anticancer activity of the methanol extract from *Houttuynia cordata* on ICR mouse with induced abdominal cancer and L1210 cancer cells. When the methanol extract of *Houttuynia cordata* (10–200 µg/ml) was administered orally to ICR mouse with abdominal cancer, 47.8% of the best life prolonging effect was obtained. In case of cytotoxicity study (inhibition of cell proliferation) of *Houttuynia cordata* extract against L1210 cells, IC₅₀ was found to be 62.8 µg/ml. In contrast to such considerable toxicity against cancer cell line, the toxicity demonstrated by the identical extract against normal lymphocytes was very meagre as shown to be <5% compared with 86.5% in case of L1210 cells at the same condition. To get an insight into the reaction mechanism underlying the anticancer activity, O₂⁻ ion quantity and antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) of L1210 cells in the presence of *Houttuynia cordata* extract were measured. The increased values of SOD and GPx enzyme activities in addition to the augmented generation of O₂⁻ ion in L1210 cells implied that the reactive oxygen species including O₂⁻ ion which were presumably induced by *Houttuynia cordata* extract might have participated in the process of L1210 cells cytotoxicity.

Keywords □ *Houttuynia cordata*, anticancer activity, ICR mouse, L1210 cells, SOD, GPx

어성초(*Houttuynia cordata*)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본인 약모밀의 전초로서 집약초 또는 즙초로 불리며 대표적인 성분으로는 afzelin, cordarin, p-cymene, cis-N-(4-hydroxystyryl)benzamide, lauryl aldehyde, decanoyl acetaldehyde, borneol acetate 1, 8-cineol 등이 알려져 있으며 sufamine보다 탁월한 항균작용을 비롯하여, 항바이러스, 항염, 이뇨작용을 나타내며 용종을 치유하는 효과로부터 항암작용도 있을 가능성이 시사되어 왔다.¹⁻⁵⁾

현재 항암제는 암치료의 거의 전 과정에 투여되고 있는데 이것은 항암제가 전신작용이 가능하므로 치료 및 전이를 예방하기 위하여 선호되고 있다고 볼 수 있다. 그러나 항암제가 항암

효과 이외 정상세포에 대해서조차 강한 독성과 다제내성과 같은 부작용을 나타내기 때문에 항암제의 사용은 암환자의 치료에 난제가 되고 있다.⁶⁻⁹⁾ 따라서 각 국은 무독성이거나 독성이 매우 약하면서도 항암작용이 우수한 항암제 연구에 심혈을 기울이고 있으나 아직까지도 이상적인 항암제개발은 이루어지지 않고 있다.

한편 암이란 genetic change와 epigenetic change가 원인이 되어 oncogene이 활성화되거나 suppressor gene이 억제되면서 균형이 깨지게 되어 생기는 것으로 볼 수 있는데 이러한 이상상태의 촉발인자로 인체에 유해한 환경이나 물질에 의해 생성되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 거론되어져 왔다.¹⁰⁻¹⁵⁾ 흥미로운 것은 임상적으로 사용되는 항암제인 doxorubicin, cisplatin, vincristine, cytosine arabinoside, methotrex, bleomycin 등의 작용기작^{16,17)} 역시 활성산소와 직접 간접으로 연관된 apoptosis 활성 복구에 의해 암세포를 사멸시키는 것으로 나

#본 논문에 관한 문헌은 저자에게로
(전화) 02-2287-5147 (팩스) 02-396-8758
(E-mail) parksw@smu.ac.kr

타나 결국 활성산소는 발암의 원인임과 동시에 항암의 수단이 된다고 하는 점이다.

본 연구에서는 어성초의 추출물에 대하여 Sarcoma 180으로 복수암을 유발시킨 ICR 생쥐 및 백혈병계 세포주인 L1210 세포에 대한 항암효과를 실험하고 나아가 normal lymphocyte에 대한 독성의 정도를 검색하며, 그 작용기작을 활성산소대사와 연관시켜 규명하고자 O_2^- 이온의 정량 및 O_2^- 소거효소인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx) 및 catalase 효소활성을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻어 제시하는 바이다.

실험재료 및 방법

시약

Ferricytochrome *c*, xanthine, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione, glutathione reductase, phorbol 12-myristate 13-acetate, *t*-butyl hydroperoxide, nicotinamide adenine dinucleotide reduced, trypan blue, dimethylsulfoxide, ethylenetetraacetate는 Sigma(St Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 구입하였으며, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin mixture는 GIBCO BRL(Grand Island, New York, USA)에서 구입하였으며 dimethylsulfoxide, methanol 등 무기화합물, 유기용매는 특급수준의 제품을 사용하였다.

어성초 추출물 조제

어성초는 한국토종 약초연구소(부암동, 서울)에서 일괄 구입하여 냉동실에 밀봉 보관하면서 필요에 따라 메탄올 추출물을 조제하였다. 잘 씻어 물기를 닦아낸 다음 잘게 썬 어성초 시료에 대해 다음과 같이 추출물을 조제하였다. 어성초 시료 10 g을 100 ml의 70% 메탄올에 침지하여 24시간 실온에서 방치 후 상등액을 취한 다음 잔사를 다시 동일한 방법으로 처리하여 상등액을 취한다. 앞서 얻은 상등액과 합하여 7겹의 gauze를 통과시켜 얻은 여액을 다시 Whatman 여과지로 여과하여 여액을 진공 증류기로 감압 농축한 다음 냉동 건조하여 무게를 평량 하였으며 건조물의 평균 수득량은 14.6%이었다.

발암 ICR 생쥐의 생명 연장효과

ICR 생쥐의 복강에서 계대배양 되어 온 Sarcoma 180 cells을 실험용 ICR 생쥐 복강에 1×10^5 cells/10 μ l/20 g body weight로 접종한 다음 24시간 후부터, DMSO의 농도가 0.5%를 넘지 않은 범위내 용해시킨 어성초 추출물을 10~200 μ g/10 μ l/20 g body weight의 농도로 매일 일정 시간에 경구투여 한 다음 상태를 관찰하면서 생존율을 계산하였다. Control의 경우는 시료와 동일한 양의 DMSO를 증류수에 용해하여 동일한 방법으로 경구투여 하였다.

L1210 세포주 배양

L1210 cells(murine lymphocytic leukemia; ATCC CCL 219)은 한국세포주 은행(서울대 암연구센터)에서 분양 받아 사용하였다. L1210 세포의 배양은 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배양액 중에서 37°C, 5% CO_2 , humidified condition으로 이루어졌으며 항생제로는 penicillin/streptomycin을 사용하였고 계대 배양은 3~4일마다 시행하였다.

Normal lymphocytes 분리

정상세포에 대한 무독성의 정도를 검색하기 위해 ICR 생쥐로부터 normal lymphocytes를 분리하여 이 정상세포에 미치는 어성초 추출물의 독성을 검색하였다. Normal lymphocytes의 분리 방법은 Boyum¹⁸⁾의 방법을 적용하였는데 간단한 방법은 다음과 같다. ICR 생쥐의 척추를 탈골시킨 다음 하대정맥을 절개하여 heparin 처리가 된 주사기에 채혈한 뒤 15 ml tube에 도아서 여기에 dextran 유도체인 HistopaqueR-1077 3 ml을 가한 다음 1,000 rpm에서 30분간 실온에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 plasma층인 상등액을 제거하고 lymphocyte가 포함된 불투명한 중간층을 취하여 phosphated buffered saline(PBS) 10 ml에 혼합한 다음 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액은 버리고 침전물에 대해 3회 반복 세척하였다. 얻어진 normal lymphocytes를 PBS에 부유시켜 세포수를 계산한 다음 사용하였다.

L1210 세포와 normal lymphocytes에 대한 세포독성

L1210 암세포와 normal lymphocytes에 대한 세포독성 검색은 다음과 같이 시행하였다. 24 well plate에 1×10^6 cells/ml의 농도로 L1210 세포 또는 normal lymphocytes를 가하고 여기에 어성초 추출물을 첨가한 다음 배양 후 NCI¹⁹⁾ 방법에 준하여 hemocytometer를 사용하여 trypan blue exclusion을 시행함으로써 살아있는 비착색 세포수(생존세포)를 모두 세어 control 그룹의 비착색 세포수와 비교하여 백분율(%)로 세포독성을 계산하였다.

세포독성(%)

$$\begin{aligned} & \text{Control군의 비착색 세포수} \\ & - \frac{\text{시료군의 비착색 세포수}}{\text{Control군의 비착색 세포수}} \times 100 \end{aligned}$$

L1210 세포의 O_2^- 이온 정량

L1210 세포 배양액에 어성초 추출물을 첨가하여 일정기간 배양 후 생성된 O_2^- 량은 Markesbery 등²⁰⁾의 방법에 의하여 시행하였다. 본 실험에서는 L1210 세포에 어성초 추출물을 첨가하여 배양한 다음 250 \times g에서 원심분리 후 상등액은 버리고 수집하여 24 well plate에 1×10^8 cells/well, 700 μ l PBS, 50 μ l cytochrome *c*, 5 mM의 phorbol myristate acetate(PMA) 50 μ l와 배지를 첨

가하여 60분간 배양 후 원심분리 하였다. 상등액에 200 µl PBS 를 가하여 1 ml가 되도록 희석하고 550 nm에서 흡광도를 측정 하였다. Ferricytochrome c의 환원반응은 21.1/mM/cm의 몰흡광 계수를 적용하여 계산하였다.

항산화효소액 조제

L1210 세포를 1×10⁶ cells/ml 농도로 접종한 배양액 10 ml 를 50 ml culture flask에서 배양한 후 2,000 rpm에서 원심분리 하여 상등액은 제거하고 침전한 L1210 세포를 생리식염수로 2 회 세척하였다. 포집된 세포를 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 1.5 ml에 현탁하여 Elvejehn homogenizer를 이용하여 5초씩 5회 균질화 한 다음 이 균질액에 대하여 ultrasonifier를 이용하여 얼음 상에서 30초간 3회 초음파 처리하여 mitochondria matrix에 존재하는 MnSOD 효소까지 모두 용출시킨 다음 4,000 rpm 에서 원심분리 하여 그 상등액을 SOD 효소액으로 조제하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD 활성의 측정은 기본적으로 McCord 등²¹⁾의 방법에 의해 이루어졌다. 반응액의 총량은 3 ml로서 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 100 mM cytochrome c, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA(pH 7.8) 및 효소액이 포함된 반응액을 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 흡광도가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하였다. SOD 활성은 효소액이 함유되지 않은 반응액의 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 책정하여 units/min/10⁸ cells로 나타내었다.

Glutathione Peroxidase(GPx) 활성 측정

GPx의 활성은 Maral 등²²⁾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 glutathion(GSH), 효소액을 첨가하여 반응액이 2 ml가 되도록 한 다음 37°C서 5분간 방치시킨 후 0.16 mM t-butyl hydroperoxide 를 가하여 340 nm에서 3분 동안 NADPH의 산화에 의해 감소되는 흡광도의 변화를 측정하였으며 NADPH의 흡광계수는 6.22 cm⁻¹mM⁻¹을 적용하여 사용하여 효소활성을 계산하였다.

Catalase 활성 측정

Catalase 활성의 측정은 250 nm, 25°C에서 흡광도 감소를 근거로 하는 Maral 등²²⁾의 방법을 적용하였다. 50 mM Potassium phosphate buffer(pH 7.4), 12.5 mM H₂O₂ 및 효소액을 가하여

전체 반응액이 2 ml가 되도록 한 후 250 nm에서 10초 단위로 5 분간 흡광도 변화를 측정하였다. Catalase의 활성도는 1분 동안 1 µmol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

결과 및 고찰

어성초 추출물에 의한 발암 ICR 생쥐의 생명연장효과

Sarcoma 180으로 발암시킨 ICR 생쥐에 어성초 추출물을 투여하여 생존하는 기간을 control의 것과 비교 계산한 생명연장효과는 Table I에 표시한 바와 같다. ICR계 mouse에 복수암을 유발하기 위하여 Sarcoma 180 cells을 접종하여 24시간이 지난 후 부터 어성초 추출물을 10~200 µg/ml까지 매일 한차례씩 경구투여 하여 사망일을 계산한 결과 control 군의 평균 생존 기간은 21.3±3.7 days 이었으며 어성초 추출물 투여군의 생명연장효과는 50 µg/ml의 농도부터 현저히 증가하여 70 µg/ml 농도에서는 control을 100%로 했을 때 143.7%로 최고조에 달하였으며 전체적으로는 111.7%~143.7%에 이르렀다. 이로써 어성초 추출물은 복수암을 유발시킨 ICR 생쥐의 생명을 상당히 연장시키는 것으로 판단되었다.

어성초 추출물의 L1210 세포에 대한 세포독성

어성초 추출물이 암유발 동물에서 상당한 생명연장효과를 나타내었으므로 세포주 준위에서의 암세포수에 대한 영향을 검색해 보았다. 백혈병계 암세포주인 L1210 세포에 어성초 추출물을 10 µg/ml에서 200 µg/ml 농도까지 투여한 다음 1~4일간 배양하여 control군에 비하여 감소한 세포수를 세포독성으로 간주하여 검색한 결과가 Table II에 제시되어 있는데 배양 1일째에는 농도에 관계없이 세포독성이 거의 나타나지 않았으나 그 이후부터는 특히 고농도에서 현저한 세포독성을 나타내었다. 즉 배양 3일째와 배양 4일째에 50 µg/ml 농도이상에서는 약 50% 이상의 세포독성 효과를 나타내었고 4일간 배양시 최고 98.6%의 세포독성이 시사하는 바와 같이 고농도에서는 살아남은 세포가 거의 없었다. 세포독성에 대한 일반적인 실험 기준인 배양 기간 3일을

Table I – Life prolonging effect of the *Houttuynia cordata* extract on ICR mice bearing abdominal cancer

Houttuynia cordata (µg/ml)	Survived days	% of control
0.0	21.3±3.7	100
10.0	24.6±4.3*	115.5
20.0	23.8±3.9	111.7
50.0	28.7±2.2*	134.7
70.0	30.6±1.6*	143.7
100.0	29.5±2.7*	138.1
200.0	30.1±5.3	141.1

Values represent the mean±SD of four individual experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (*p<0.05)

Table II – Cytotoxicity of *Houttuynia cordata* extract against L1210 cells

Culture period (days)	Cytotoxicity (%)				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	10	20	50	100	200
1	1.7 \pm 0.5	1.4 \pm 0.8	3.0 \pm 1.9	5.3 \pm 1.6	7.4 \pm 1.2
2	2.1 \pm 1.1	5.7 \pm 3.8	26.0 \pm 1.3*	39.2 \pm 2.1*	46.2 \pm 2.9*
3	15.5 \pm 2.3	23.8 \pm 5.7	53.0 \pm 2.1**	83.2 \pm 2.5**	95.7 \pm 3.3**
4	16.7 \pm 3.7	32.5 \pm 3.9	72.4 \pm 3.6*	83.7 \pm 3.4*	98.6 \pm 2.3**

Values represent the mean \pm SD of four individual experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (* p <0.05, ** p <0.01).

선택하여 계산한 IC₅₀값은 49.1 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

Normal lymphocytes에 대한 어성초 추출물의 독성

어성초 추출물이 항암제로서의 가치가 있으려면 암세포수 감소와 같은 항암효과 못지않게 정상세포에 대한 무독성이 확보되어야 하므로 L1210 세포가 유래한 ICR 생쥐로부터 분리한 normal lymphocytes에 대한 세포수 감소 정도를 측정하여보았다. Table III에 제시된 결과에 따르면 normal lymphocytes에 어성초 추출물을 첨가한 후 배양 1일째에는 대부분의 농도에서 세포사멸보다는 10% 내외의 세포증식효과가 나타났으며, 배양 2일째에도 저 농도의 경우에는 세포증식 효과 그리고 100~200 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 5% 남짓의 세포독성효과가 나타났다. 배양 3일째에는 세포독성 효과가 나타났지만 그 정도는 5% 정도의 미약한 것이었고 배양 4일째에 가서야 10%가 넘는 세포독성 효과가 나타났다.

이 결과를 L1210 세포에 대한 Table II의 결과와 비교하면 어성초 추출물은 암세포에 대해서는 상당한 세포수 감소를 나타낸 반면, normal lymphocytes에 대해서는 세포수를 거의 감소시키지 않았고 다만 100~200 $\mu\text{g/ml}$ 과 같은 고농도와 4일간 배양과 같은 과격한 조건에서만 15% 정도의 세포수 감소를 나타낸 것

Table III – Cytotoxicity of *Houttuynia cordata* extract against normal lymphocytes

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cytotoxicity (%)			
	Culture period (days)			
	1	2	3	4
10.0	-9.2 \pm 1.3	-2.5 \pm 1.2	1.4 \pm 1.5	6.5 \pm 0.3**
20.0	-4.6 \pm 2.2	-2.1 \pm 0.7	3.2 \pm 0.5*	5.3 \pm 1.4**
50.0	-7.1 \pm 3.4	1.5 \pm 0.4	4.2 \pm 1.3	5.9 \pm 0.6
70.0	-8.2 \pm 2.1	2.8 \pm 1.2	3.6 \pm 2.5	8.7 \pm 2.5*
100.0	-4.3 \pm 0.6	3.4 \pm 0.8	5.8 \pm 0.4	15.9 \pm 1.3*
200.0	3.8 \pm 1.7	5.9 \pm 1.7	6.7 \pm 1.5*	17.3 \pm 3.5*

Values represent the mean \pm SD of four individual experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (* p <0.05, ** p <0.01). All data represent the mean \pm SD.

으로 보아(L1210 세포의 경우에는 90% 내외) 어성초 추출물은 암세포 증식은 강하게 억제하면서도 정상세포는 크게 손상시키지 않을 가능성이 시사되어 항암제로서의 개발 값어치가 있다고 간주되었다.

어성초 추출물에 의한 L1210 세포의 O₂ 생성

Table III까지의 결과로부터 어성초 추출물은 암유발 동물실험에서 생명연장 효과가 뚜렷하였고, 암세포주 실험에서도 농도와 배양기간에 의존적으로 L1210 세포수를 감소시키는 것을 알게 되었으므로, 다음실험으로 이 암세포수 감소 현상의 기작을 파악하고자 활성산소와 어성초 추출물과의 관계를 규명하는 실험을 시행하였다.

기존의 항암제에 대한 연구에 의하면 항암제에 의한 암세포 사멸은 necrosis 보다는 apoptosis에 의한다는 결과²³⁻²⁵)가 다수 보고 되고 있으며, apoptosis 촉발 인자로서의 활성산소의 영향은 매우 크므로 어성초 추출물에 의한 암세포 사멸에도 활성산소 관계물질이 연관되는지 검색하고자 하였다. 우선 어성초 메탄올 추출물에 의해 세포독성이 현저하게 유발될 수 있는 조건을 설정하여 이에 따른 O₂ 이온의 생성량의 변화를 측정하고 이 값을 세포독성이 유발되지 않은 조건에서의 O₂ 이온의 생성량과 비교하여 보았다. O₂ 이온은 활성산소의 대표적인 화합물로서 O₂로부터 생성되는 활성산소군의 첫 번째 물질로 그 생성량은 의의가 크다고 할 수 있겠다.²⁶⁻²⁸) Table IV의 실험 조건으로는 어성초 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 첨가하여 1~3일간 배양을 시켜 각 경우마다 배양 후 포집한 세포에 대해 O₂ 생성량을 측정하여 비교한 결과 상당히 유의성 있는 O₂ 생성량의 변화를 얻게 되었다.

Table IV의 결과에 의하면 세포수 감소가 10% 이하로 적었던 배양 1일째에 어성초 추출물 첨가군의 O₂ 생성이 농도에 의존적으로 상당히 증가하기 시작하였으며, 세포독성이 50~80%로 상당히 높았던 배양 3일째에는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 control 값의 약 4배, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 control 값의 약 5배 이상의

Table IV – Effect of methanol extract from *Houttuynia cordata* on the generation of O₂ in L1210 cells

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	O ₂ (nmoles/60 min/10 ⁸ cells)		
	Culture period (days)		
	1	2	3
0.0	0.09 \pm 0.05	0.13 \pm 0.05	0.17 \pm 0.03
10.0	0.13 \pm 0.05	0.18 \pm 0.10	0.31 \pm 0.05
20.0	0.25 \pm 0.07*	0.33 \pm 0.07	0.63 \pm 0.03*
50.0	0.36 \pm 0.10*	1.02 \pm 0.05*	1.29 \pm 0.12*
100.0	0.43 \pm 0.13*	1.57 \pm 0.05**	2.41 \pm 0.07**

Values represent the mean \pm SD of four individual experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (* p <0.05, ** p <0.01).

높은 증가를 보였다. 즉 L1210 세포에 어성초 추출물을 첨가할 경우 겉으로는 세포독성이 약하게 나타났던 배양 1일째 이미 L1210 세포내에서는 O₂⁻ 이온의 생성이 상당히 증가되는 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 역시 같은 농도에서 3일간 배양시키면 O₂⁻ 생성량은 더욱 증가하여 약 8배 내지 15배 까지 높은 값을 나타내었다. 이와 같이 L1210 세포에 어성초 추출물을 가하여 생긴 세포독성에 O₂⁻ 생성이 크게 수반되는 것을 알게 되었다. 보고된 바에 의하면 O₂⁻ 이온의 반감기는 대략 1×10⁻⁶ sec으로 매우 신속하게 대사되며²⁰⁾ 대사의 첫 번째 단계는 O₂가 H₂O₂ 또는 ·OH로 전환되는 반응이고, 두 번째 단계는 생성된 H₂O₂가 무독성인 H₂O로 전환되는 반응이다.²⁶⁻²⁸⁾ 따라서 어성초 추출물에 의해 L1210 세포내에 생긴 O₂⁻도 H₂O₂ 또는 ·OH로 전환될 가능성이 있으며 이들 활성산소는 암세포에게도 해로운 물질일 수 있으므로 암세포가 자신을 보호하기 위한 대응 반응을 할 가능성이 있어 검색해보기로 하였다.

즉 어성초 추출물을 L1210 세포에 가하여 생긴 O₂⁻이 무독한 H₂O로 전환시키기 위한 일련의 반응이 일어날 것으로 유추되는데, 그 지표물질로 첫 번째 반응인 O₂⁻으로부터의 H₂O₂ 생성반응의 효소인 superoxide dismutase(SOD), 두 번째 반응인 H₂O₂로부터의 H₂O 생성반응의 효소인 glutathione peroxidase(GPx)와 catalase 활성을 측정하여 어성초 추출물의 세포독성 현상과 연계하여 보았다.

어성초 추출물에 의한 L1210 세포의 SOD 활성 변화

O₂⁻은 SOD에 의해서 H₂O₂로 전환되고, 이 H₂O₂는 catalase나 GPx에 의해서 무독한 H₂O로 전환되거나 Fenton 반응에 의해 맹독성인 ·OH로 전환되는 것으로 알려져 있는데 어성초 추출물로 야기되는 세포독성 과정에 실제 SOD 활성변화가 수반되는지 파악하기 위하여 세포독성의 조건에 따라 SOD 활성을 각각 측정 비교하였다. Fig. 1에 제시된 결과를 보면 어성초 추출물을 첨가하여 야기되는 세포독성의 정도에 비례하여 SOD 활성의 변

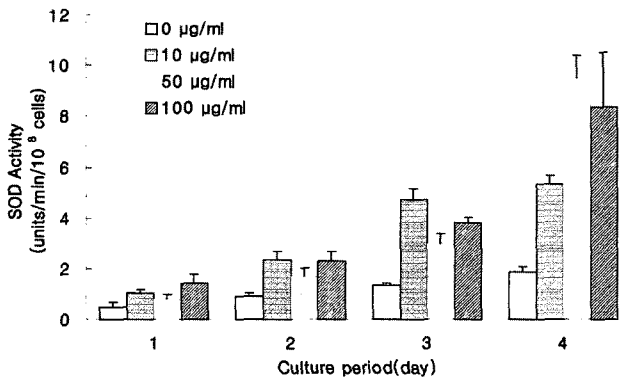


Fig. 1 – Effect of methanol extract from *Houttuynia cordata* on the SOD activities of L1210 cells. Values represent the mean ± SD of four individual experiments.

화가 큰 것을 알 수 있었다. 우선 세포독성이 거의 일어나지 않는 조건인 배양 1일째에 어성초 추출물을 첨가하여 배양시킨 후 L1210 세포의 SOD 활성은 10 µg/ml에서는 1.31 units/10⁸ cells, 50 µg/ml의 농도에서 0.96 units/10⁸ cells, 100 µg/ml에서는 1.64 units/10⁸ cells로서 control 값인 0.57 units/10⁸ cells에 비하여 약 2~3배 증가 값을 보였다. 이와같은 현상은 겉으로는 세포독성이 현저하지 않은 배양 1일째이지만 실제 내적으로는 암세포가 어성초 추출물에 의해 독성 상태가 되어 O₂⁻를 생성시키고 이 O₂⁻를 제거하기 위한 SOD 활성도 벌써부터 증가하기 시작한 것으로 유추되었다.

세포독성이 약 50~90% 정도까지 높았던 배양 2일째와 3일째, 4일째의 결과를 보면 control군의 SOD 활성도 배양 기간에 비례하여 2~3배 증가하였으며, 어성초 추출물 첨가군의 SOD 활성은 각각의 control 값의 5배 정도까지의 매우 높은 증가 값을 보인 것으로 보아 어성초 추출물로 인하여 야기되는 세포독성에는 O₂⁻ 전환효소인 SOD 효소활성 증가가 크게 수반되는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 어성초 추출물에 의한 암세포 증식 억제 작용에는 활성산소인 O₂⁻ 이온의 생성증가가 일어나며 동시에 이 O₂⁻ 이온의 전환효소인 SOD 효소가 크게 유발되는데, SOD 활성이 증가한다는 것은 생성물인 H₂O₂이 생긴다는 것을 의미하므로 아마도 H₂O₂의 전화효소인 glutathione peroxidase(GPx)나 catalase활성의 변화가 연이어 일어날 수도 있다고 사료되었다.

L1210 세포의 GPx(glutathione peroxidase)와 catalase 활성 변화

어성초 추출물에 의한 암세포증식 억제 작용에 SOD 효소활성이 증가함을 알게 되었으므로 다음 반응을 맡고있는 GPx와 catalase 효소활성을 측정하였다. SOD의 경우와 마찬가지로 세포독성이 유발되는 조건에서 실험하여 측정한 GPx 효소활성을 Fig. 2에 제시하였는데 전체적으로 어성초 추출물에 의한 세포독

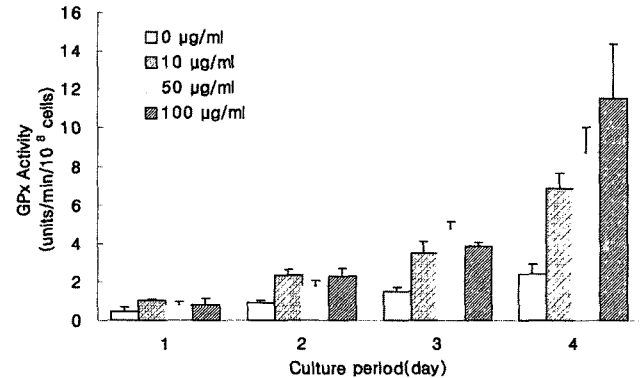


Fig. 2 – Effect of methanol extract from *Houttuynia cordata* on the GPx activities of L1210 cells. Values represent the mean ± SD of four individual experiments.

성의 증가에 비례하여 GPx 활성이 뚜렷하게 증가하는 것을 알 수 있었다.

결과에 따르면 우선 세포독성이 거의 나타나지 않는 배양 1일째에 어성초 추출물을 10 µg/ml부터 100 µg/ml 농도까지 첨가하였을 경우 GPx 활성은 0.7~1.2 units/10⁸ cells로서 control의 값과 거의 유사하였으나 세포독성이 현저했던 배양 2일째, 3일째 그리고 4일째의 GPx 활성은 control 군에 있어서도 3배 이상의 증가, 그리고 어성초 추출물 첨가군에 있어서도 배양 시기와 농도에 비례하여 해당된 배양기간의 각각의 control 값의 5배정도까지 크게 증가하였다.

활성산소 전환효소인 SOD와 GPx 항산화효소에 관한 이상의 결과를 종합하면 L1210 세포에 어성초 추출물을 첨가할 경우 상당한 세포사멸 현상이 유발되는데 이때 O₂ 이온의 생성이 급증하고, 이 O₂ 이온을 소거하기 위해 SOD 활성이 증가하며, 그 결과 H₂O₂가 증가하고 이 H₂O₂를 소거하기 위한 GPx 효소의 활성이 연이어 크게 증가하는 것으로 판단되었다. 이 실험에 부가하여 H₂O₂를 분해하는 또 하나의 효소인 catalase 효소의 활성을 측정할 바 어느 조건에서도 활성이 나타나지 않았는데 이는 catalase 효소가 대부분 peroxisome에 국재되어 있어서 반응이 제한적이거나 또는 생성된 H₂O₂ 분해에는 관여하지 않는 반면 대부분의 H₂O₂는 세포질에 넓게 존재하는 GPx에 의해 특정적으로 분해되는 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 이상으로부터 어성초 추출물은 L1210 세포 증식을 뚜렷하게 사멸하는데 이 과정을 보면 우선 L1210 세포내에서 O₂ 이온을 양산하고 이로부터 생성된 H₂O₂ 또는 ·OH 등의 활성산소가 증가하여 이들이 apoptosis를 유발하거나 또는 cell cycle의 arrest를 야기하여 암 세포 증식의 억제가 일어날 수 있는 가능성이 시사되었으며, 한편으로 급증된 이들 활성산소의 독성에 대하여 암세포는 활성산소 소거효소인 SOD나 GPx를 유발하여 활성산소의 독성을 막아 보려 하나 결국은 역부족이었던 것으로 사료되었다.

문 헌

- Hayashi, K., Kamiya, M. and Hayashi, T. : Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1 influenza virus and HIV. *Planta Medica* **61**, 237 (1995).
- Chang, J. S., Ching, L. C., Chen, C. C., Liu, L. T., Wang, K. C. and Lin, C. C. : Antileukemic activity of *bidens pilosa* minor (Blume) Sheriff and *Houttuynia cordata* Thumb. *Amer. J. Chin. Med.* **29**, 303 (2001).
- Urabe, K., Nakamoto, T., Kawamura, M. and Yasumoto, K. : Effects of *Houttuynia cordata* and refinery final mosses on the development of offensive odor in porcine small intestine during storage. *J. Nutr. Sci. Vitamin.* **40**, 63 (1994).
- 약초의 성분과 이용 (문관심) 과학 백과사전 출판사편, 일월서각 서울 p. 127 (1991).
- 서울대학교 天然物科學研究所 文獻情報學研究室 編. 東洋醫學大典 I p. 282 (2003).
- Astrow, A. B. : Rethinking cancer. *Lancet* **343**, 494 (1994).
- Bailer, J. C. and Gormick, H. L. : Cancer undefeated. *N. Eng. J. Med.* **336**, 1569 (1997).
- Steel, V. E. : Current mechanistic approaches to the chemoprevention of cancer. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 78 (2003).
- Lopes, C., Garcia, M., Benavides, F., Shen, J., Conti, C. J., Alvarez, E. and Hajos, S. E. : Multidrug resistance modulators PSC 833 and CsA show differential capacity to induce apoptosis in lymphoid leukemia cell lines independently of their MDR phenotype. *Leukem. Res.* **27**, 413 (2003).
- Ramirez, J. L., Sarries, C., Castro, P. L., Roig, B., Queralt, C. and Escuin, D. : Methylation patterns and k-ras mutations in tumor and pared serum of resected nonsmall cell lung cancer patients. *Cancer Letters* **193**, 207 (2002).
- Segura, P. B., Trejo, B. C., Perex, C. E., Taja, C. L., Mariscal, I., Chavex, A., Acuna, C., Salazar, A. M., Lizano, M. and Duenas, G. A. : Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1596 (2003).
- Harden, S. V., Tokumaru, Y., Westra, W. H., Goodman, S., Ahrendt, S. A., Yang, S. and Sideransky, D. : Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1370 (2003).
- Lee, S. H. : Recognition of DNA damage in Mammals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 489 (2001).
- Spruck, C. H., Strohmaier, H., Sangfelt, O., Muller, H. M., Hubalt, M., Muller, H. E., Marth, C., Widschwendter, M. and Reed, S. I. : hC DC4 gene mutations in Endometrial Cancer. *Cancer Res.* **62**, 4535 (2002).
- Palena, S. and Tsang, K. Y. : Differential gene expression profiles in a human T-cell line stimulated with a tumor-associated self peptide versus an enhancement agonist peptide. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1616 (2003).
- Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T. and Leeuwenburg, C. : Doxorubicin treatment *in vivo* causes cytochrome *c* release and cardiomyocytes apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity and Bcl-2 : Bax ratio. *Cancer Res.* **6**, 4592 (2002).
- Evans, M. D., Griffith, H. R. and Lunec, J. : Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms. *Advan. Mol. Cell Biol.* **20**, 25 (1997).
- Boyum, A. : Isolation of leukocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Invest.* **21**, 9 (1968).

- 19) National Cancer Institute USA : Cell Screen KB. Protocol 1600. *Cancer Chemother. Rep.* (part 3) **3**, 17 (1972).
- 20) Markesbery, W. R. : Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. *Free Radical Bio. Med.* **23**, 134 (1994).
- 21) McCord, J. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (heterocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
- 22) Maral, J., Puget K. and Michelson, A. M. : Comparative study of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 1525 (1977).
- 23) Brown, J. M. and Wouters, B. G. : Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agent. *Cancer Res.* **59**, 1391 (1999).
- 24) Fulda, S., Sievertes, H., Friesen, C., Herr, I. and Debatin, K. M. : The CD95(APO-1/Fas) System mediates drug induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **57**, 3823 (1997).
- 25) Han, J. W., Duionne, C. A., Kedersha, N. L. and Goldmacher, V. S. : p53 status affects the rate of onset but not the overall extent of doxorubicin induced cell death in rat fibroblasts constitutively expressing c-Myc. *Cancer Res.* **57**, 176 (1997).
- 26) Reiter, R. J. : Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J.* **9**, 526 (1995).
- 27) Boonstra, J. and Post, J. A. : Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* **337**, 1 (2004).
- 28) Jacobson, M. D. : Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83 (1996).