

## Geraniol이 L1210 세포와 ICR 생쥐 대식세포의 증식, Superoxide Dismutase(SOD)와 Inducible Nitric Oxide Synthase(iNOS) 효소활성에 미치는 영향

김지연 · 박시원<sup>#</sup>

상명대학교 자연과학대학 화학전공

(Received August 31, 2004; Revised November 19, 2004)

### Effect of Geraniol on the Proliferation of L1210 Cells and ICR Mouse Macrophages, and the Activities of Superoxide Dismutase (SOD) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Activities

Ji Yeon Kim and Sie Won Park<sup>#</sup>

Dept. of Chemistry, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

**Abstract** — The present investigation was undertaken to find out the anticancer activity of monoterpene compounds. Monoterpenes showed generally the inhibitory effect on the proliferation of L1210 cancer cells (cytotoxicity). Geraniol was found to exhibit the most potent cytotoxic effect on L1210 cells with an IC<sub>50</sub> values of 0.67  $\mu\text{g/ml}$ . On the other hand, geraniol proved to be capable of stimulating the macrophage proliferation (135% of control). When the life prolonging activity of geraniol by daily oral administration of 0.1~10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}/20 \text{g}$  body weight to Sarcoma 180 bearing ICR mouse was examined, there was also a significant elevation of survival (best result of 134% of control). The contradictory effects of geraniol on the proliferation of L1210 cells and macrophages proved to be accompanied by the coincident alterations of RNS (reactive nitrogen species) related enzymes activities such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) in macrophages and ROS (reactive oxygen species) related enzymes activities such as superoxide dismutase (SOD) in L1210 cells, respectively.

**Keywords** □ geraniol, L1210 cells, ICR mouse macrophages, life prolonging effect, superoxide dismutase (SOD), inducible nitric oxide synthase (iNOS)

현재 암 치료는 암조직의 크기가 1 cm 미만인 초기 암의 경우에는 병소만을 적출해내는 수술요법으로 치료가 용이하나 그 이후에는 수술이나 방사선 치료만으로는 완치가 어려워 전신작용이 가능하여 치료 및 전이의 예방이 가능한 항암제 투여가 모든 단계에서 선호되고 있다. 그러나 대부분의 항암제는 암세포에 대한 세포독성 이외 정상세포에 대해서도 강한 독성과 다제내성<sup>1,2)</sup>과 같은 부작용을 나타내기 때문에 환자의 치료에 난제가 되고 있다. 이에 연구자들은 항암작용은 강화되고 독성은 매우 적은 항암제 개발과 항암치료법 개발에 심혈을 기울이고 있으나 아직 까지도 이상적인 목적은 이루어지지 않고 있다.

최근에는 부작용이 거의 없는 항암제 개발이나 항암치료법 개발의 일환으로 macrophages와 NK(natural killer) cells이 중추적 작용을 하는 항암면역계<sup>3-5)</sup> 활성화 방법도 많은 관심을 모으고 있는데, 만일 암세포에 대한 높은 세포독성과 함께 정상세포에 대해서는 독성이 거의 없고 동시에 항암면역계도 활성화 할 수 있는 항암제가 개발 된다면 암 치료에 좋은 복합적 접근방법이 될 수 있을 것으로 사료 된다.

그동안 무독성 내지 저 독성 항암제 개발은 독성이 적은 천연물로부터 꾸준히 이루어지고 있는데 최근에는 monoterpenes류의 유효한 효과가 관심을 끌고 있다. 탄소수 10개의 탄화수소인 monoterpenes 유도체들은 꽃이나 잎의 휘발성 정유성분이며 공기 중의 nonmethane 탄화수소로 대기 중의 다양한 반응<sup>6)</sup>에도 참여하고, ozone 발생에도 기여를 하며 숲과 토양의 질소(N)와 탄소(C)의 순환에도 중요한 역할을 하는 등 지구 생태계<sup>7)</sup>에 중

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-2287-5147 (팩스) 02-394-9585  
(E-mail) parksw@smu.ac.kr

요한 화학적 변화를 담당하므로 인간에게도 직접 간접으로 영향을 미치고 있을 것으로 사료된다. 인간에게는 향수, 화장품성분으로는 물론 의약품으로도 널리 사용되어 왔는데 식물과 동물체내의 산소독성이나 지질과산화반응의 억제 작용<sup>8)</sup>도 탁월하며 의학적으로도 항균, 두통, 우울증, 비염, 감기, 알레르기, 고지혈증, 암 치료효과<sup>9-13)</sup> 역시 보고 되고 있다.

한편 발암의 주원인으로 활성산소(reactive oxygen species, ROS)와 이들을 소거하는 항산화제의 균형이 깨지면서 유해한 활성산소에 의해 야기된 DNA mutation<sup>14,15)</sup>이 거론되는데 흥미로운 것은 다수의 항암제의 작용기작 역시 암세포 내에 활성산소를 유발하고 이 유해한 활성산소가 apoptosis<sup>16,19)</sup>를 일으키는 것으로 활성산소는 암의 병리 과정에 깊게 관계된다는 것이 시사되어왔다.

그동안 본 연구실에서는 천연 물질로부터 다양한 암 세포주에 대하여 직접적인 사멸효과를 높게 나타내면서도 정상세포에 대해서는 저 독성을 나타내는 항암제를 탐색하던 중 허브(herb) 성분들로부터 좋은 결과를 얻은 바 있다.<sup>20,21)</sup> 이 효과는 허브 성분 중 특히 monoterpenes류에서 특히 높게 나타났기에 본 연구에서는 monoterpenes를 중심으로 더욱 구체적으로 이들의 항암 작용과 항암면역계 세포에 미치는 영향을 비교 측정하여 geraniol을 선택하였고 그 작용기작을 활성산소 등과 연계 추구하고 이에 제시하는 바이다.

## 실험 방법

### 실험동물

ICR 생쥐는 한림 실험동물 연구소(경기도 수원)로부터 4주령의 수컷을 구입하여 20±1°C, 55±5%, 12 hrs/dark cycle의 사육실에서 약 1~2주 적응시킨 다음 사용하였으며 일부는 복수암을 유발시켜 시료의 생명연장 효과에 대한 실험에 사용하였고, 일부는 macrophage 분리 실험용으로 분리 실험 3일 전에 thioglycolate broth를 복강 내 주사하는 전 처리를 시행하였으며 본 실험 때까지 물과 사료를 충분히 공급하였다. 발암 ICR 생쥐의 생존효과를 측정하기 위한 실험은 다음과 같다. ICR 생쥐의 복강에서 계대배양 되어온 Sarcoma 180 세포를 실험용 ICR 생쥐 복강에 1×10<sup>5</sup> cells/10 μl/20 g body weight의 농도로 접종한 다음 24시간 후부터 geraniol을 0.01% 이내의 DMSO에 용해하여 10~200 μg/20 g body weight의 농도로 매일 일정 시간에 한 차례 씩 경구투여 한 다음 상태를 관찰하면서 21일째에 살아남은 마리수로 생존율을 계산하였다. Control군에는 시료를 용해시킨 것과 동일 용량의 DMSO를 증류수에 가하여 경구 투여 하였다.

### 시약 및 기기

3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT),

dimethyl sulfoxide(DMSO), lipopolysaccharide from Escherichia coli serotype 011:B4(LPS), trypsin-EDTA, Griess reagent, ferricytochrome c, xanthine, xanthine oxidase(XOD), flavin adenine dinucleotide(FAD), nicotinicamide adenine dinucleotide phosphate reduced(NADPH), L-arginine, dihydropteridine-reductase(DHPR), (6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin(TH<sub>4</sub>), lactic dehydrogenase, ethylene diamine tetraacetate(EDTA), pyruvate, Hanks' balanced salt solution(HBSS), triton X-100, aprotinin, geraniol, linalool, carvon, limonene, citronellol, terpinol, cubenol, myrcene, ledene, phenylmethyl sulfonyl-fluoride(PMSF), pepstatin A, thioglycollate broth는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품이었고 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), RPMI 1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin mixture는 GIBCO(Grand Island, New York, USA)에서 구입하였으며, 6 well 및 24 well plate, culture dish, 15 ml 및 50 ml conical tube, culture flask와 pipette 등은 Falcon(Dickenson Co. Tokyo, Japan)의 제품이었으며 유기용매와 무기염류는 특급 수준의 제품을 사용하였다.

### Peritoneal macrophage 분리

Peritoneal macrophage를 얻는 방법은 기본적으로 Chung<sup>22)</sup> 방법을 적용하였다. Macrophage harvest 3일 전 1ml의 3% thioglycollate broth를 ICR 생쥐의 복강에 주사하여 macrophage를 활성화시킨 후, 실험당일 laminar flow 내에서 척추탈골로 급사시켜 70% ethanol로 전신을 소독한 후 복강부의 피부를 벗기고 Hanks' balanced salt solution(HBSS) 30 ml를 복강 내에 주입한 후 약 3분간 부드럽게 massage를 하여 각 장기에 붙어 있거나 몰려있는 macrophage가 잘 해체되게 한다. 연이어 skin을 Forcep으로 살짝 들어 올린 후 절개한 후 needle 없는 주사기로 복강 액을 50 ml conical tube에 조심스럽게 취하는데 약 30 ml의 exudate가 얻어진다. 이 복강 액을 4°C, 500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 macrophage에 HBSS를 가하여 세척한 다음 DMEM(10% FBS, 1% penicillin-streptomycin)에 부유시켜 사용한다.

### L1210 세포배양

서울 대 암 연구소로부터 분양 받아온 L1210 세포는 ICR 생쥐로부터 유래한 암세포로서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humidified condition에서 배양하였다. 배양은 RPMI 1640배지에 10% fetal bovine serum을 첨가한 배양액 중에서 이루어졌으며 계대배양은 3~4일마다 시행하였다. 세포 수 변화 실험은 24 well plate에서 시행하였고 효소 액을 조제하기 위한 배양은 50 ml의 culture flask에서 배양을 하여 세포를 수거하여 이루어졌다.

### Macrophages와 L1210 세포의 세포 수 변화 및 생존율 계산

실험 전 과정을 통하여 실험 준비를 위한 간단한 세포 수 계산은 trypan blue exclusion 방법으로 hemocytometer를 사용하여 계산하였다. 필요에 따라 slide 상에 세포시료를 놓고 trypan blue(0.4% in PBS)를 가하여 3분간 부치 후 광학현미경하에서 비 착색 세포(생존세포)와 착색 세포(사멸세포)의 수를 각각 계산하였다. 시료에 의한 macrophage와 L1210 세포의 생존율 실험에서는 Mosmann의 방법<sup>23)</sup>을 변용한 MTT 방법을 시행하여 control값에 대한 백분율로 계산하였다. MTT 방법은 다음과 같다. 시료를 첨가하여 24 well plate에서 배양한 다음 원심분리로 포집한 macrophage 또는 L1210 세포에 MTT 용액을 well당 1ml씩 가한 후 4시간 동안 37°C에서 부치 하면 생존 세포의 dehydrogenase에 의해 노란색의 수용성 시약인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 보라색의 비수용성의 formazan 결정으로 전환되는 것이 육안으로도 확인될 수 있다. 이 formazan 결정을 DMSO로 녹인 후 다시 37°C에서 10분간 방치 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 control 값과 비교하여 백분율로 나타내었다.

### Nitric oxide(NO) 정량

Nitric oxide 정량은 Griess시약을 사용하여 Thomas<sup>24)</sup> 방법에 따라 시행하였다. Geraniol을 첨가하여 배양한 L1210 세포 또는 macrophage 배양액을 원심분리 후 배양액과 동량의 Griess reagent(1% sulfonamide, 0.1% naphthylethylene diamine dihydrofluoride, 2.5% phosphoric acid)를 가한 후 15분간 실온에서 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Macrophages 세포 및 L1210 세포에서 생성된 O<sub>2</sub> 이온 정량

Macrophage와 L1210 세포 배양액에 geraniol을 첨가한 다음 일정기간 배양 후 생성된 O<sub>2</sub> 이온의 정량은 Markesbery<sup>16)</sup>의 방법에 의하여 이루어졌다. Geraniol을 가하여 세포독성의 유무가 분명한 실험 조건으로 50 ml culture flask에서 대량배양을 한 다음 충분한 세포수를 포집하여 24 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well, 700  $\mu$ l PBS, 50  $\mu$ l cytochrome c, 5  $\mu$ g/ml의 phorphol myristate acetate(PMA) 50 ml를 첨가하여 60분간 배양 후에 원심분리 하였다. 이 상등액 200  $\mu$ l에 PBS를 가하여 1 ml가 되도록 희석하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferricytochrome c의 환원 반응은 21.1/mM/cm의 몰흡광계수를 적용하였으며 O<sub>2</sub> 생성량은 nmoles/60 min/ $10^8$  cells로 나타내었다.

### Enzyme solution 조제

Geraniol에 의해 야기되는 macrophages와 L1210 세포의 SOD와 iNOS 활성 변화를 측정하기 위한 효소 액의 조제는 다음과 같다. 50 ml의 culture flask에 macrophage와 L1210 세포를 각

각  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 접종하고 여기에 geraniol을 0.1, 0.5, 1.0  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하여 각각 2일간 배양하였다. Geraniol을 가하면 세포독성에 의하여 세포 수가 감소하기 때문에 효소활성을 측정하기 위한 충분한 세포수를 확보하기 위하여 다수의 50 ml의 culture flask에 배양을 시행하였다. Macrophage는 배양이 끝난 다음 원심분리 후 PBS로 2회 세척 후 표면에 부착되어 있는 macrophages를 spatula로 긁어내어 포집하였다. 다음 과정은 culture flask 한 개당 처리하는 방법으로서 macrophages와 L1210 세포에 대하여 동일하게 처리하였다. 배양 후 포집된 macrophages와 L1210 세포의 수를 계산한 다음 여기에 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 1.0 ml를 가하여 Elvehjem homogenizer를 이용하여 ice bath내에서 5초씩 5회 균질화 하고 다시 초음파 파쇄기로 30초간 3회 초음파 처리하여 mitochondria matrix에 존재하는 것으로 알려진 MnSOD 효소가 지 용출시킨 균질 액을 12,000 rpm에서 원심분리 하여 상등액을 효소 액으로 회수하였으며 침전물에 대하여 동일한 조작을 반복하여 얻어진 두 번째 효소 액을 첫 번째의 것과 합하여 사용하였다.

### Superoxide dismutase(SOD) assay

SOD활성의 측정은 기본적으로 McCord and Fridovich<sup>25)</sup>의 방법에 의해 이루어졌다. 반응액 3 ml에는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 100 mM cytochrome c, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA(pH 7.8), SOD 효소 액을 포함시켜 25°C에서 15분간 예치한 다음 xanthine oxidase(XOD)를 첨가하여 개시된 반응은 550 nm에서 10초 단위로 5분간 흡광도를 측정하여 이루어졌다. Xanthine oxidase 첨가량은 효소 액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 최소한 0.025가 되도록 조절하였다. SOD 활성은 효소 액이 함유되지 않은 반응액의 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 양을 1 unit로 측정하였으며, 효소활성의 비교는  $1 \times 10^8$ 개의 세포수를 대상으로 units/min/ $10^8$  cells로 나타내었다.

### Inducible nitricoxide synthase(iNOS) 활성 측정

iNOS 활성은 Broks<sup>26)</sup>의 방법에 따라 이루어졌다. 반응액 1 ml에 각각 100  $\mu$ l씩의 FAD, NADPH, GSH, BH<sub>4</sub>, DHPR, L-arginine, Tris buffer(pH 7.4) 그리고 효소 액을 넣은 후 4시간 부치 하였다. 이 용액을 원심분리 한 다음 Griess reagent를 가하여 15분간 방치 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계처리

실험 결과는 mean  $\pm$  SD으로 표시하였다. Control값과 시료 값 사이의 유의성은 Student's *t* test를 적용하여  $p < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.05$ 인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

**결과 및 고찰**

**L1210 세포에 대한 monoterpenes의 세포독성 효과**

L1210 세포에 대하여 10종류의 monoterpenes을 첨가하여 L1210 세포 수 변화에 미치는 영향을 검색하여 보았다. Monoterpenes을 0.1 µg/ml와 1 µg/ml의 두 가지 농도로 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 L1210 세포에 가하여 24 hr와 48 hr 배양시킨 결과 대부분의 monoterpenes에 의한 배양 24시간째의 생존율이 약 88%~56%을 나타내어 세포독성이 약 12%~45%에 이르는 것을 알게 되었고 그 효과는 48시간째에 1 µg/ml의 농도에서 약 37%~73%로 더욱 현저하였으며 특히 geraniol, linalool, limonene순으로 73%, 68%, 63%의 우수한 세포독성 효과를 나타내었다. 이러한 암세포 수 감소로 나타난 세포독성 효과는 monoterpenes 화합물에 다양한 항암효과가 있을 수 있는 가능성을 제시한다고 볼 수 있었다.

**Macrophages에 대한 monoterpenes의 세포증식 효과**

이상의 실험에서 monoterpenes류가 L1210 세포증식에 대해 상당한 억제작용을 나타내었는데, 인체 내에서 암세포 제거 역할을 맡는 macrophage에 대해서는 어떠한 작용을 나타내는지 검색하였다. 인체의 항암면역 세포 계는 주로 macrophage, NK cell을 비롯한 T cell, cytokine 등으로 구성되어 있는데<sup>3,5)</sup> 잘 알려진 바와 같이 macrophage의 주작용은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)와 활성질소(reactive nitrogen species, RNS)를 무기로 사용하여 세균, 바이러스, 암세포에 대해 공격하며, T cell

**Table I** - Inhibitory effect of monoterpenes on the proliferation of L1210 cells

Monoterpenes	L1210 cells			
	24 hr		48 hr	
	0.1 µg/ml	1.0 µg/ml	0.1 µg/ml	1.0 µg/ml
	Viability (% of control)			
None	100.0	100.0	100.0	100.0
Geraniol	93.5±4.9	56.4±5.7**	78.4±7.6*	26.5±2.3**
Linalool	102.7±3.9	59.6±8.3*	78.6±8.9*	31.9±3.2**
Citronellol	96.7±3.1	78.5±3.6**	83.5±4.6*	46.8±8.9*
Limonen	89.4±5.6	65.4±5.3**	88.1±5.2*	36.9±2.6**
Carvon	108.6±6.7	74.6±2.5**	95.3±6.4*	53.6±6.9*
Terpinol	98.2±9.5	73.2±8.7	79.6±4.5**	49.6±8.3*
Cubanol	89.0±5.8	57.3±8.5*	83.5±6.8*	63.1±1.8**
Myrcene	95.3±4.7	88.2±6.4	74.3±5.5*	52.1±2.5**
Ledene	104.5±6.7	78.2±8.7*	83.7±9.7	62.4±2.3**
Cubanol	101.5±5.4	82.4±5.9	74.6±4.3*	55.8±6.1*

L1210 cells (1×10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated in the presence or absence of monoterpene (0.1 µg/ml and 1.0 µg/ml). At the end of the incubation, the viability was measured by MTT method as described in Material and Method. Data are mean±SD of five experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

**Table II** - Stimulating effect of monoterpenes on the cell proliferation of macrophages from ICR mouse

Monoterpenes	Macrophages			
	24 hr		48 hr	
	0.1 µg/ml	1.0 µg/ml	0.1 µg/ml	1.0 µg/ml
	Viability (% of control)			
Control	100.0	100.0	100.0	100.0
Geraniol	119.5±4.9	124.8±5.7*	128.4±7.6*	138.7±5.3**
Linalool	109.7±3.9	121.6±8.3	125.6±8.9	135.9±6.2**
Citronellol	113.7±5.1	118.5±7.4	118.5±5.9*	130.6±7.8*
Limonen	118.9±7.2	120.6±4.5*	110.4±8.3	128.5±9.2
Carvon	108.6±6.7	112.6±6.5	109.5±7.5	125.6±8.6
Terpinol	108.2±9.4	105.6±7.5	111.7±6.8	125.9±5.6*
Cubanol	117.9±5.3	116.2±8.5	119.5±8.4	121.9±8.6
Myrcene	107.9±9.5	120.4±9.4	112.5±0.5*	123.3±4.9**
Ledene	104.5±6.5	118.9±8.7	114.7±8.3	122.4±7.3*
Cubanol	106.5±8.4	117.9±7.9	111.9±8.9	122.2±6.9*

Macrophages (1×10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated in the presence or absence of monoterpene (0.1 µg/ml and 1.0 µg/ml). At the end of the incubation, the viability was measured by MTT method as described in Material and Method. Data are mean±SD of five experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

활성화 및 B cell 활성화에도 필수적으로 참여하는 세포로서 면역계에서 총체적이고 핵심적인 역할을 하는 세포이다.<sup>3,5)</sup>

ICR 생쥐로부터 분리한 macrophages에 monoterpenes을 첨가하여 배양한 다음 control값에 대해 계산한 세포생존율을 Table II에 제시하였다. 결과에 의하면 monoterpenes을 가한 시료군의 macrophages 수는 배양 24시간째 1.0 µg/ml의 농도에서 control값에 비해 105%~125%에 이르는 증가율을 보였으며 48시간 배양 시에는 120%~139%의 상당한 세포증식 효과를 나타내었다. 특히 geraniol과 linalool의 경우 약 140% 정도의 가장 높은 생존세포 증가율을 나타내었다. 따라서 비록 *in vitro* 결과이지만 많은 monoterpenes이 암세포에 대해서는 세포독성을 나타내고, 항암면역계에 대해서는 오히려 활성화시킬 수도 있는 가능성이 있어 추후 *in vivo* 확인실험이 다각도로 필요할 것 같다.

**Geraniol의 L1210 세포와 macrophage 세포의 생존율에 대한 영향**

이상의 결과로부터 geraniol과 linalool이 암세포에 대한 세포독성 효과 뿐 만 아니라 macrophage 증식효과도 가장 높았으므로 이중에서 geraniol을 선택하여 정밀 실험을 시행한 결과를 Table III에 제시하였다. Table III의 결과에 의하면 geraniol은 48 시간 배양했을 때 L1210 세포에 대해서는 대부분의 농도에서 세포독성을 나타내었는데 control 값에 비해 최고 약 89%까지의 세포독성 효과를, 그리고 macrophages에 대해서는 control 값에 비해 약 140%까지의 높은 세포 수 증가효과를 나타내었다. 이 결과로 geraniol은 암세포의 증식은 억제하면서도 macrophages

**Table III** – Effect of geraniol on the proliferation of L1210 cells and macrophages

Geraniol (μg/ml)	L1210 cells		Macrophages	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
	Viability (% of control)			
0.0	100.0±2.9	100.0±3.5	100.0±1.7	100.0±3.2
0.1	94.8±3.4	78.6±4.8**	110.3±5.7	111.6±7.4
0.2	88.3±2.5	74.9±4.6**	107.0±2.8	125.9±7.3
0.5	75.4±6.8*	59.3±6.5**	118.3±6.5	137.6±7.5*
1.0	64.3±7.2*	31.5±1.8**	123.5±7.4	131.6±8.5**
2.0	63.8±5.4**	28.6±3.4**	126.9±5.6*	139.7±2.7**
5.0	55.7±4.9**	21.3±4.9**	128.5±7.2*	137.3±3.8**
10.0	51.6±3.8**	15.2±1.8**	126.4±5.6*	132.6±7.7*

L1210 cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) or macrophages ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were incubated for 24 hr or 48 hr in the presence or absence of geraniol. At the end of the incubation, the viability was measured by MTT method as described in Material and Method. Data are mean±SD of five experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

는 증식시키는 두 가지 효과를 나타내는 것이 뚜렷해졌다.

**Geraniol이 L1210 세포와 macrophages의 O<sub>2</sub> 및 NO 생성에 미치는 영향**

이상의 결과로부터 geraniol은 L1210 세포와 macrophage의 세포 수에 대하여 반대 효과를 나타내었으므로 그 기작을 규명하고자 발암과 항암에 공통으로 관계되는 활성산소 및 활성질소와 연계된 실험을 수행하였다. 보고 된 바에 의하면 cisplatin, doxorubicin, anthracycline, arsenic trioxide, bleomycin, daunorubicin 등의 항암제가 나타내는 암세포 사멸작용은 이들 항암제가 암세포 내에 O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH 등의 활성산소나 NO, ONOO<sup>-</sup> 같은 활성질소를 유발하고 연이어 유해한 이들 물질이 apoptosis를 야기하는 것으로 알려지고 있다.<sup>16-19)</sup> 그러므로 geraniol에 의해 나타난 L1210 세포 수 감소 현상과 macrophage의 세포 수 증식 현상에 활성 산소나 활성질소가 개입 하는지 알고자 NO와 O<sub>2</sub>를 지표 물질로 선택하여 정량하였다. Table IV에 제시된 바에 의하면 geraniol을 0.1 μg/ml~5.0 μg/ml로 macrophages와 L1210 세포에 가하여 생성된 NO와 O<sub>2</sub> 이온을 정량한 결과 L1210 세포의 경우 NO 값은 최고 약 121% 정도로 control값에 비하여 거의 변하지 않은 반면 O<sub>2</sub> 이온은 control 값에 대해 452%까지의 높은 증가를 보였다. 즉 geraniol에 의한 L1210 세포의 세포독성에는 O<sub>2</sub> 이온 생성량이 대단히 높은 증가를 나타내었다.

한편 geraniol을 macrophages에 첨가하면 L1210 세포와는 정반대의 현상이 나타났다. 즉 geraniol에 의한 macrophage 증식 효과에는 NO 생성량이 control 값의 약 286%까지 매우 크게 증가한 반면, O<sub>2</sub>량은 control 값의 약 128% 정도에 불과하였다.

그런데 활성산소인 O<sub>2</sub>와 NO는 macrophage의 주요 작용인 세균, 바이러스나 암세포 퇴치의 핵심물질로서, 실제로는 NO

**Table IV** – Effect of geraniol on the survival of ICR mouse with induced abdominal cancer

Geraniol (μg/10 μl)	Survived animals (number)	% of Control
0.0	1.78±0.42	100.0
0.1	1.84±0.12	104.5
0.5	2.13±0.07**	120.1
1.0	2.38±0.09**	133.7
5.0	2.27±0.11*	127.5
10.0	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 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

가 O<sub>2</sub> 이온과 반응하여 유독한 peroxynitrite를 형성하고 이 peroxynitrite가 세균, 바이러스 또는 암세포의 apoptosis나 necrosis를 일으켜 사멸시키는 것으로 알려져 있다.<sup>3-5)</sup> 이 과정에서 중요한 것은 NO와 O<sub>2</sub>의 농도비이며, NO의 농도 역시 상당히 높아야 한다는 사실도 보고되고 있다. 만일 NO의 농도가 낮을 때에는 NO는 세포사멸 보다는 오히려 redox signal로 작용하여 neurotransmission, vasorelaxation, smooth muscle relaxation, innateimmune response 나아가 endothelial cell의 migration과 proliferation<sup>27-32)</sup>과 같이 중요한 생리작용을 나타내는 것으로 알려져 왔다. 따라서 Table IV에서의 geraniol 첨가에 의해 유발된 NO 농도는 아마도 세포독성 대신에 증식을 야기했을 정도의 낮은 농도로서 macrophage의 증식을 일으킨 것으로 추측된다.

이상과 같이 geraniol 첨가에 의한 L1210 세포와 macrophage의 세포 수 변화도 감소와 증가로 반대이었고, 이에 수반된 물질도 NO와 O<sub>2</sub>로 각각 다르다는 것은 geraniol이 이들 세포에 대하여 각각 독자적인 기작을 통하여 작용하는 것으로 추후 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

**Geraniol에 의한 발암 ICR 생쥐의 생존율 변화**

Sarcoma 180으로 발암시킨 ICR 생쥐에 geraniol을 농도별로 경구 투여하여 21일째에 살아있는 마리수를 세어 계산한 생존율 결과는 Table IV에 표시한 바와 같다. ICR 생쥐에 Sarcoma 180 세포를 접종하여 24시간이 지난 후부터 geraniol을 0.1 μg/ml~10 μg/ml로 매일 한차례씩 경구투여 하면서 21일째에 아직 살아 있는 동물수를 계산한 결과 대체적으로 geraniol의 농도가 증가할수록 살아남은 생쥐의 마리수가 증가하였는데, 특히 70 μg/ml 농도에서는 가장 높아 생존율이 control 군의 134%에 달하였다. 이로써 geraniol은 복수 암을 유발시킨 ICR 생쥐의 생존율을 상당히 증가시키는 것을 알 수 있었다.

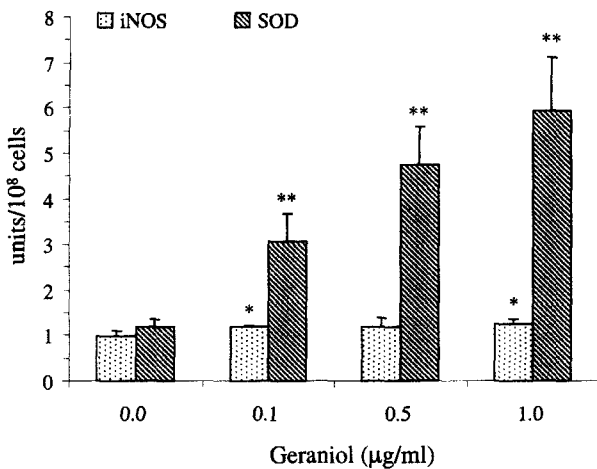
**Geraniol에 의한 L1210 세포의 inducible nitricoxide synthase(iNOS), superoxide dismutase(SOD) 활성변화**

Geraniol의 첨가에 의해 L1210 세포 수 감소와 macrophages

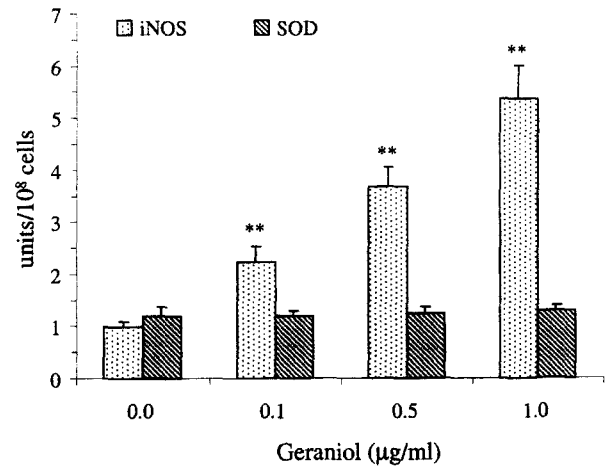
**Table V** – Effect of geraniol on the generation of NO and O<sub>2</sub> in L1210 cells and macrophages

Geraniol (μg/ml)	NO (μmoles/10 <sup>8</sup> cells)		O <sub>2</sub> (μmoles/10 <sup>8</sup> cells)	
	L1210	Macrophages	L1210	Macrophages
0.0	0.92±0.05	1.14±0.03	1.07±0.05	1.38±0.06
0.1	1.03±0.08	1.18±0.06	1.18±0.07	1.56±0.04
0.2	0.88±0.08	2.17±0.06**	2.15±0.09**	1.37±0.05
0.5	1.12±0.04	3.04±0.05**	3.27±0.11**	1.42±0.08
1.0	1.07±0.07	3.75±0.13**	3.68±0.08**	1.36±0.07
2.0	1.03±0.06	3.55±0.06**	4.68±0.07**	1.44±0.08
5.0	0.95±0.13	2.06±0.17**	4.31±0.13**	1.76±0.17*

At the end of the incubation of L1210 cells or macrophages in the presence or absence of geraniol, NO and O<sub>2</sub> were assayed as described in Material and Method. Data are mean±SD of four experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

**Fig. 1** – Effect of geraniol on the activities of iNOS and SOD activities of L1210 cells. At the end of the incubation of L1210 cells in the presence or absence of geraniol, the determination of iNOS and SOD activities were carried out as described in Material and Method. Data are mean±SD of four experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

세포 수 증가가 일어났고, 이 현상에 O<sub>2</sub>와 NO가 각각 선택적으로 증가하였으므로 이 기작을 좀 더 구체적으로 파악하고자 O<sub>2</sub>와 NO 대사효소인 SOD와 iNOS의 활성 변화를 측정하여 보았다. 결과는 Fig. 1에 제시되어 있는데 L1210 세포의 경우 geraniol을 첨가하면 SOD활성이 크게 증가하였고 NO 생성효소인 iNOS는 거의 변화하지 않았다. 반면에 iNOS의 최고 값은 control 값의 108%에 불과하였다. 이 사실은 geraniol에 의한 L1210 세포의 생존을 감소에 O<sub>2</sub>가 다량 유발되며 다른 항암제의 작용기작<sup>18-24)</sup>과 유사하게 O<sub>2</sub>를 비롯한 활성산소가 apoptosis 유발제로 작용한 것으로 유추되며 이 같은 결과는 geraniol의 MCF-7 유방암세포에 대한 cell cycle arrest 효과,<sup>33)</sup> 인간 직장암에 대한 5-fluorouracil의 세포독성 증강효과,<sup>34)</sup> *Matricaria chamomilla*에

**Fig. 2** – Effect of geraniol on the changes of iNOS and SOD activities of macrophages. At the end of the incubation of macrophages in the presence or absence of geraniol, the determination of iNOS and SOD activities were carried out as described in Material and Method. Data are mean±SD of five experiments. Asterics denote a significant difference compared with the control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

서의 apoptosis 유발효과<sup>35)</sup> 등과 함께 고찰해보면 geraniol이 나타내는 세포독성은 아마도 활성산소를 유발하여 이루어지는 현상일 가능성이 크다고 간주된다. 한편 이렇게 유발된 활성산소는 암세포 자신에게도 유해하므로 암세포는 유해한 O<sub>2</sub>를 소거하고자 SOD 효소를 유발한 것이 아닌 가 사료되었다.

#### Geraniol에 의한 macrophages의 inducible nitric oxide synthase(iNOS), superoxide dismutase(SOD) 활성 변화

Geraniol을 macrophages에 첨가하면 세포수가 증가하며, 그에 상응하여 NO 생성량이 크게 증가하였으므로 관계효소인 iNOS 활성화와 SOD 활성을 측정된 결과가 Fig. 2에 제시되어 있다. 결과에 따르면 iNOS 값은 control 값의 283%까지의 매우 높은 활성을 나타낸 반면 SOD 활성은 대부분의 조건에서 control 값에 비해 115%와 135% 정도로 크게 변하지 않았다. 이렇게 geraniol에 의해 iNOS 활성이 높아졌다는 것은 NO 생성량이 증가된다는 것을 시사하며 Table IV의 결과와도 잘 일치한다. 그런데 이 NO 증가는 macrophage 세포 수 증가에 따른 현상인 것으로 미루어보아 이 NO 농도는 세포독성을 야기하는 peroxynitrite 형성보다는 세포증식을 촉진하는 redox signal<sup>27-31)</sup>로 작용하여 그 결과 macrophage 증식이 일어나는 것이 아닌 가 사료되었으며, 이는 보고<sup>32)</sup>된 바와 같이 NO가 guanylate cyclase 활성화하고 이때 생긴 c-GMP가 연쇄적인 반응을 초래하며 cell division이 촉발되는 양상으로 전개되어 그 결과 macrophage 증식이 일어났을 가능성이 시사되었다. 이 모든 결과를 종합하면 허브의 주성분 중의 한가지인 geraniol은 발암된 실험동물의 생명을 상당

히 연장하였으며, 비록 *in vitro* 실험이지만 암세포는 직접 죽이고, 다른 한편으로는 macrophages를 증식시킴으로서 암세포퇴치에 이중 효과를 기대할 수도 있는 항암물질로서의 가능성이 시사되었으며 향후 *in vivo* 실험으로 이 현상을 추시할 필요가 있는 것으로 사료되었다.

## 사 사

이 논문은 2004년도 상명대학교 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사합니다

## 인용문헌

- 1) Astrow, A. B. : Rethinking cancer. *Lancet* **343**, 494 (1994).
- 2) Bailer, J. C. and Gormick, H. L. : Cancer undefeated. *N. Eng. J. Med.* **336**, 1569 (1997).
- 3) Hakim, F. T., Flomerfelt, F. A., Boyiadzis, M. and Grees, R. E. : Aging, immunity and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 151 (2004).
- 4) Jakobisiak, M., Lasek, W. and Golob, J. : Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol. Letters* **90**, 103 (2003).
- 5) Terabe, M. and Berzofsky, J. A. : Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 157 (2004).
- 6) Lerdau, M., Guenther, A. and Monson, R. : Plant production and emission of volatile organic compounds. *Bioscience* **47**, 373 (1997).
- 7) White, C. S. : Monoterpenes: their effects on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* **20**, 1381 (1994).
- 8) Choi, H. S., Song, H. S., Ukeda, H. W. and Sawamura, M. : Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydralyl. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4156 (2000).
- 9) Pauli, A. : Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* **11**, 126 (2001).
- 10) Umezumi, T., Ito, H., Naghano, K., Yamakoshi, M., Oouchi, H., Sakaniwa, M. and Morita, M. : Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. *Life Sci.* **72**, 91 (2002).
- 11) Barrata, M. T., Doman, H. J., Deans, S. G. and Figueriredo, A. S. : Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flav. Fragr. J.* **13**, 235 (1998).
- 12) Clark, S. S., Perman, S. M., Sahim, M. B., Jenkins, G. J. and Elegbede, J. A. : Antileukemia activity of perillyl alcohol : uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest. *Leukemia* **16**, 213 (2002).
- 13) Clayton, J. : d-Limonene, an anticarcinogenic terpene. *Nutr. Rev.* **46**, 363 (1988).
- 14) Pelicanp, H., Carney, D. and Huang, P. : ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resis. Updates* **7**, 97 (2004).
- 15) Higuchi, Y. : Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1527 (2003).
- 16) Steel, V. E. : Current mechanistic approaches to the chemoprevention of cancer. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 78 (2003).
- 17) Miller J. W. H. : Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist* **7**, 14 (2002).
- 18) Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H. and Murai, M. : Role of reactive oxygen species in the dichlorodiammine induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Bx. J. Cancer* **76**, 206 (1997).
- 19) Serrano, J., Palmeria, C. M., Kuehl, D. W. and Wallace, K. B. : Cardioselctive and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchromic doxorubicin administration. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 201 (1999).
- 20) Cho, Y. S., Kim, S. J. and Park, S. W. : Anticancer activities of monoterpenes and the changes of enzymes responsible for the conversion of reactive oxygen species. *Yakhak Hoeji* **47**, 37 (2003).
- 21) Kim, S. J., Cho, Y. S. and Park, S. W. : Cytotoxicity of methanol extracts of dible herbs against L1210 cells with changes of antioxidant enzymes. *Kor. J. Pharmacog.* **33**, 36 (2002).
- 22) Chung, H. S., Shin, C. H., Lee, E. J., Hong, S., H. and Kim, H. M. : Production of nitric oxide and tumor necrosis factor by Smilacis rhizoma in mouse peritoneal macrophages. *Compar. Biochem. Physiol. part C : Toxicology and Pharmacology* **135**, 197 (2003).
- 23) Mosmann, T. : Rapid colometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 24) Juliet, P. A. R., Hayashi, T., Iguchi, A. and Ignarro, L. J. : Concomitant production of nitric oxide and superoxide in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 367 (2004).
- 25) McCord, J. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte protein (heterocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
- 26) Brooks, P. S. : Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* **3**, 187 (2004).
- 27) Bogdan, C. : Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol.* **2**, 907 (2001).
- 28) Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P. and Lancaster, J. J. : The biological lifetime of nitric oxide : implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Science USA* **98**, 355 (2001).

- 29) Schmidt, H. H. W. H. and Walter, U. : NO at work. *Cell* **78**, 919 (1994).
- 30) Moncada. S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. : Nitric oxide : physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Review* **43**, 109 (1991).
- 31) Maulik, N. and Das. D. K. : Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radical Bio.l Med.* **33**, 1042 (2004).
- 32) Zich, M., Morbidelli, L., Masini, E. S., Americni, H. J., Granger, C. A., Geppetti, P. and Ledda, F. : Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration vitro promoted by substance P. *J. Clin. Invest.* **94**, 2036 (1994).
- 33) Duncan, R. E., Lau, D., El-Soheby, A. and Archer, M. C. : Geraniol and  $\beta$ -ionone inhibit progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1739 (2004).
- 34) Carnesecchi, S., Bra-Goncalves, R., Bradaia, A., Zeisel, M., Gosse, F., Poupon, M. and Raul, F. : Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Letters* **215**, 53 (2004).
- 35) Izumi, S., Takashima, O. and Hirata, T. : Geraniol is a potent inducer of apoptosis-like cell death in the cultured shoot primordia of *Matricaria chamomilla*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 519 (1999).