

GOVP1200815419

최 종  
연구보고서

T0024122

약쑥의 간암과 유방암 억제기작 규명  
및 암 예방 식품소재개발

Chemopreventive mechanisms of mugwort  
against liver and breast cancer, and  
development of functional food materials

서울대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “약쑥의 간암과 유방암 억제기작 규명 및 암 예방 식품소재개발”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 7월 30일

주관연구기관명: 서울대학교

총괄연구책임자: 이형주

연 구 원: 서영준

연 구 원: 허행진

연 구 원: 강민경

연 구 원: 구옥경

연 구 원: 정민아

연 구 원: 이경미

연 구 원: 이동은

연 구 원: 권정연

연 구 원: 김보현

연 구 원: 신봉직

연 구 원: 황문경

연 구 원: 송누리

연 구 원: 조은선

연 구 원: 이기원

연 구 원: 이정상

연 구 원: 김도희

연 구 원: 이정철

연 구 원: 김민정

연 구 원: 박신애

연 구 원: 정은주

연 구 원: 윤진

# 요 약 문

## I. 제 목

약쑥의 간암과 유방암 억제기작 규명 및 암 예방 식품소재개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구 개발의 목적

본 연구의 최종 목표는 약쑥의 추출물을 제조하여, 항산화 및 항염증 효과를 분석하고 *in vitro* 및 *in vivo* 모델에서 간암과 유방암의 항암 및 발암 억제 활성화와 작용기작을 규명하여 약쑥을 이용한 암 예방 식품 소재 개발 기술을 확립하는 데에 있음

### 2. 연구 개발의 필요성

가. 기술적인 측면

1) 약쑥 (*Artemisia asiatica* Nakai)은 우리나라 어느 지역이나 자라는 국화과 쑥 속의 여러해살이 식물로 항염증, 부인병 예방과 같은 여러 효능이 있는 것으로 알려졌음.

2) 쑥 속의 식물은 약 세계적으로 약 400~500여종에 이르며 국내의 쑥 속의 식물도 약 40여종에 이룸. Valant-Vetschera 등에 따르면 같은 쑥 속의 식물일지라도 함유되어 있는 flavonoid의 종류와 농도가 다름

3) 최근 약쑥의 추출물이 acetaminophen과 사염화탄소에 의해 유도된 간 손상과 여러 독성 모델에서 위장, 간 그리고 췌장의 손상에 대한 보호효과와 항산화 항염증 활성을 나타낸다고 하는 보고가 있으며 위염치료제로서의 효능도 검증되었음

4) 본 연구에서 사용한 약쑥은 식품으로 이용할 수 있으며 전국에 자생하여 기능성 식품으로 제조하기 위한 원료의 확보가 쉬움. 또한 기존 연구결과가 매우 적고, 특히 간암과 유방암의 예방에 대한 보고가 이뤄지지 않아 약쑥을 간암과 유방암 예방 소재로 이용하기 위해서는 이에 대한 기초연구가 필요할 것으로 사료됨

나. 경제·산업적 측면

1) 수입의존도가 높은 기능성 소재 및 건강보조식품시장 개선이 필요함

2) 국내에서 대량재배가 가능하고 고부가가치 소재로 개발이 가능하여 농민 소득증대에 기여할 수 있는 작목 개발이 절실함

3) 약쑥을 이용한 다양한 암예방 기능성식품의 개발을 통해 약쑥과 관련된 제품에

대한 소비 및 수출이 증가하여 식품산업발전과, 재배 농가의 수입 증진에 기여한다. 사회 · 문화적 측면

- 1) 우리나라는 현재 고령화 사회로 바뀌고 있으며 이에 따라 건강한 삶과 삶의 질(QOL) 향상을 소구하는 사회적 요구가 증대 되고 있음
- 2) 암은 우리나라에서 사망률 1위에 해당하는 질병이며 간암은 우리나라 암중 사망률 3위, 유방암은 6위를 나타냄 이는 개인적으로나 국가적으로 막대한 경제적 부담을 주고 있음
- 3) 식품에 의한 암예방이 매우 중요하며 암 예방 생리활성 기능성 소재 탐색 연구 필요함
- 4) 본 연구에서와 같이 한국인이 전통적으로 많이 섭취한 약쑥의 간암과 유방암 예방 효과 탐색은 한국인에게 호발하는 암의 예방 및 치료에 큰 기여를 할 수 있을 것임

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 약쑥의 *in vitro* 항산화, 항염증 활성 및 암세포 증식 억제 활성 탐색

가. 약쑥의 *in vitro* 항산화, 항염증 활성 탐색

나. 약쑥의 인간 유방암세포와 간암세포에 대한 약쑥 추출물의 세포증식 억제 및 항염증효과 탐색

#### 2. 약쑥의 간암, 유방암 및 위암 세포에 대한 세포 사멸기작과 세포간 신호전달 조절기작 탐색

가. 약쑥의 유방암과 간암세포 및 위암세포에 대한 사멸 기작 및 효과 탐색

나. 약쑥의 간암과 유방암세포에 대한 세포간 신호전달 조절 활성 탐색

#### 3. 약쑥의 *in vitro* 간암과 유방암 모델을 이용한 침투 및 전이 억제활성 탐색 및 *in vivo* 동물 모델을 이용한 대장암 중앙 증식 억제활성 탐색 및 암 예방 식품소재 개발

가. 약쑥의 간암세포, 유방암세포에 대한 이동 및 전이 억제활성 탐색

나. *In vivo* 동물모델을 이용한 약쑥의 중앙 증식 억제활성 탐색

다. 약쑥의 암예방 식품 소재의 산업적 응용을 위한 기능성식품소재의 생산 조건 확립

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 약쑥의 *in vitro* 항산화, 항염증 활성 및 암세포 증식 억제 활성 탐색

약쑥을 채취한 뒤 세척, 분쇄 후 메탄올을 이용하여 추출물 (약쑥추출물)을 제조하였다. 약쑥 추출물로부터 활성 성분을 분리하기 위하여 메탄올 추출물로부터 에틸아

세틸 분획물을 분리한 뒤 silica gel chromatography를 수행하여 분획물들을 제조하였다. TLC 분석을 통해 분획물들을 유사한 성분으로 조성된 분획물로 구분하였고, 그 중 활성을 갖는 분획 물을 ODS-18 resin으로 분리하였고 70% 메탄올로 elution된 분획 물에서 최종 활성 분획을 분리하였다. 이 활성 분획으로부터 플라보노이드인 eupatilin, jaceosidin 그리고 TMH flavone이 동정되었으며 (Figure 1), 각 성분들을 이용하여 암 예방 활성을 규명하였다. 약쭉 추출물은 1 g의 추출물 당 14.54 mg의 gallic acid에 해당하는 페놀성 화합물을 포함하고 있는 것으로 분석되었으며, 약 50 mg/ml에서 50% DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 그러나 약쭉 플라보노이드의 구조에 따른 항산화 활성의 차이는 나타나지 않아 2번 탄소 위치에 있는 주로 -OH 기가 각 플라보노이드 항산화활성에 기여하는 것으로 추정할 수 있었다.

약쭉추출물의 간암세포에 대한 항염증활성을 분석하기 위해 쥐의 간 정상세포에 발암유전자인 ras를 도입하여 암화를 유도한 WB-F344-ras 세포주 모델을 이용하였다. 약쭉 추출물은 농도 의존적으로 염증의 대표적인 지표인 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 저해하였다

약쭉의 유방암세포에 대한 증식억제 활성 및 관련 조절기작을 밝히기 위해 MCF-10A 인체유방상피세포에 ras 종양유전자를 도입한 MCF-10A-ras 세포주 모델을 이용하였다. Jaceosidin과 eupatilin은 농도 의존적으로 유방암세포의 증식을 억제하였으며, jaceosidin의 증식억제 활성이 eupatilin보다 높았다. 이와 같은 세포증식억제 활성 차이는 eupatilin보다 hydroxyl 잔기를 하나 더 가지고 있는 jaceosidin만이 ROS를 더 많이 생성함으로써 일어나는 것으로 추정된다. Jaceosidin에 의한 MCF10A-ras 세포의 증식 억제는 세포사멸 및 세포의 생존을 조절하는 단백질들인 Bcl-2/Bax 비를 감소시키고 PARP와 caspase-3의 cleavage를 일으킴으로써 미토콘드리아를 매개하는 자가사멸을 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 jaceosidin은 ROS를 매개하는 apoptotic signal인 p53과 p21의 발현을 증가시킴으로써 세포증식을 억제하는 것으로 보인다. 아울러 세포증식과 관련된 ERK/MAPK 와 JNK의 인산화를 저해함으로써 세포의 증식을 억제하는 기작도 관여하는 것으로 나타났다.

## 2. 약쭉의 간암, 유방암과 위암 세포에 대한 세포 사멸기작과 세포 간 신호전달 조절기작 탐색

약쭉 추출물의 주요 활성성분인 eupatilin을 유방암 증식억제 활성 및 조절기작을 규명하였다. Eupatilin은 농도 의존적으로 유방암세포의 증식을 억제하였으며, 이는 G1/S 세포주기의 억제를 통해 이뤄지는 것으로 나타났다. Eupatilin은 세포 주기 과정 중 G1기에서 S기 세포 주기 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 단백질인 cyclin D1, cyclin B1, Cdk2 와 Cdc2 의 발현을 저해하였다. 또한 eupatilin은 Raf/MEK/ERK 신호전달 경로를 통해 전사인자인 AP-1의 활성을 감소시켜 cyclin D1의 발현을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 다른 인체유방암 세포인 MCF-7 세포

모델에 있어서도 eupatilin은 Cdk2의 발현을 억제하고, p53, p21의 발현은 증가시킴으로써 암세포 증식으로 억제하는 것으로 나타났다.

약쑥의 위암세포에 대한 증식억제 활성 및 관련 조절기작을 밝히기 위해 AGS 인간 위암세포모델을 이용하여 쑥 추출물의 주요 활성성분인 eupatilin을 증식억제 활성을 측정하였다. Eupatilin은 AGS 위암 세포의 성장을 농도 의존적으로 하였으며 마이트콘리아 손상을 매개하는 자가사멸을 유도하는 것으로 나타났다. Eupatilin은 p53의 발현을 증가시킴으로써 Bcl-2/Bax 비를 감소시키고 순차적으로 caspase-3와 PARP의 cleavage를 일으키는 것을 확인하였다. 또한 eupatilin은 세포주기에 관련된 p21의 발현을 증가시켜 세포주기 조절을 저해함으로써 부분적으로 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다. 이에 더하여 eupatilin은 세포증식과 관련된 ERK/MAPK 경로와 생존에 관련된 Akt 신호전달 경로를 저해하는 것을 확인하였다.

약쑥의 세포간 신호전달 (GJIC) 조절 활성을 규명하기 위해 eupatilin (Eupa), jaceosidin (Jace), 그리고 TMH flavone (TMH)을 이용하여 활성산소 생성물질인 PMS로 억제된 쥐 간 정상세포의 세포 간 신호전달에 대한 조절 효과를 규명하였다. Eupatilin은 농도 의존적으로 PMS로 억제된 GJIC를 회복하였으며, jaceosidin, TMH flavone 또한 PMS로 억제된 GJIC를 회복하였으나 농도 의존적인 경향은 나타나지 않았다. 이 중 eupatilin은 ERK/MAPK의 활성화 경로가 아닌 PMS에 의해 증가된 세포내 활성산소의 농도를 조절함으로써 과산화된 connexin-43을 탈인산화시키는 것으로 나타났다. 따라서 eupatilin은 세포내 증가된 ROS에 의해 과산화된 connexin-43의 탈인산화를 통해 억제된 GJIC를 회복시키는 것으로 나타났다.

### 3. 약쑥의 *in vitro* 간암과 유방암 모델을 이용한 침투 및 전이 억제활성 탐색 및 *in vivo* 동물 모델을 이용한 대장암 종양 증식 억제활성 탐색 및 암예방 식품소재 개발

인체유방상피 (MCF-10A)세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 전이와 관련하여 uPA의 조절 기작에 있어서 eupatilin의 저해 효과에 대하여 알아보았다. Eupatilin은 TNF- $\alpha$ 로 유도한 MCF-10A 세포의 침윤과 uPA의 발현을 저해하였다. 또한 eupatilin은 전이와 uPA의 발현을 조절하는  $\beta$ -catenin의 발현과 핵 내로의 이동성을 저해하였고  $\beta$ -catenin이 매개하는 전사인자인 TCF-4의 DNA 결합능을 저해하는 것으로 확인하였다.

또한 jaceosidin의 유방암 억제 효과를 탐색하기 위해서 인간 정상 유방세포인 MCF-10A 세포에서 잘 알려진 암 촉진제인 TPA 또는 RAS 유전자 도입에 의해 유도된 전이지표에 대한 약쑥 플라보노이드의 조절활성을 규명하였다. Jaceosidin은 TPA로 유도한 MCF-10A의 침윤 및 이동능을 억제하였으며 이는 ERK를 매개로한 전이 단백질인 MMP-9 활성화 및 전이 관련 염증지표인 COX-2 발현의 저해를 통해 이뤄지는 것으로 나타났다. 약쑥의 플라보노이드인 eupatilin, jaceosidin, TMH flavone 모두 MCF-10A-*ras* 세포의 MMP-2 활성화 및 침윤성과 이동을 저해하는 활

성을 나타내었다.

약쑥의 생리활성 성분들이 간암세포의 전이 및 촉진에 대한 효과를 확인하기 위해 MMP-2/9의 활성과 침윤성, 이동성에 대한 실험을 수행하였다. 그 결과 eupatilin, jaceosidin, TMH flavone 모두 MMPs의 활성과 간암세포의 이동능을 저해하지 못하였으나 jaceosidin은 간암세포의 침윤성을 저해함으로써 전이 억제 가능성을 제시해 주었다.

발암물질인 azoxymethane (AOM)과 염증유발물질인 dextran sulfate sodium (DSS)를 처리한 결과 염증이 유발이 대장암 발생 과정을 promotion한다고 알려져 있다. 따라서 AOM과 DSS로 유도한 대장암 모델에서 약쑥 추출물이 지니는 암 예방 효과를 알아보려고 하였다. 그 결과 약쑥 추출물을 DSS 투여 시부터 15주간 지속적으로 사료를 공급한 후 16주 이후에 colon 조직을 적출해본 결과 polyp의 수가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 약쑥추출물은 대표적인 염증인자인 COX-2와 iNOS의 발현을 감소시켰으며 이는 ERK 신호경로와 COX-2의 전사과정을 조절하는 대표적 전사인자인 NF-kappaB의 DNA binding activity의 저해를 매개하여 나타나는 것으로 규명되었다. 따라서 이와 같은 일련의 결과를 볼 때, 약쑥추출물은 AOM과 DSS에 의해 유도된 colon 발암 모델에서 COX-2와 iNOS의 발현 저해를 통해 대장암의 증식을 저해하는 것으로 나타났다.

## SUMMARY

The objectives of this project were to elucidate the chemopreventive mechanisms of mugwort against liver and breast cancer, and develop functional food materials.

Dried *Artemisia argyi* was extracted twice with MeOH at room temperature. After concentration, the EtOAc-soluble extract was subjected to silica gel chromatography. Fractions of similar composition, as determined by TLC analysis, were pooled. The active fraction was further chromatographed on ODS-18 resin, eluting with a stepwise gradient of MeOH from 40% to 100%, in H<sub>2</sub>O. The fraction eluted with 70% MeOH exhibited inhibitory activity on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system, based on binding between onco-proteins and tumor suppressors. Finally, the active fraction was purified by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) (J'sphere ODS-H80, 150 mm × 20 mm i.d., S-4 m, 80 Å, detection at 254 nm) using 75% MeOH to yield eupatilin, jaceosidin, and TMH flavone.

The *Artemisia asiatica* was extracted with methanol, and total phenolic content and antioxidant activity were determined. The extract of *Artemisia asiatica* contained high level of total phenolics (14.54 mg gallic acid equivalents/g of *Artemisia asiatica*, GAE). Total antioxidant activity was measured using 2,2'-dephenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay. The extract of *Artemisia asiatica*, at 50 mg/ml, has 50% DPPH radical scavenging effect. There are three major flavonoids, jaceosidin (4',5,7-trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone), eupatilin (5,7-dihydroxy-3',4', 6-trimethoxy-flavone), TMH flavone (5',6',3',5'-tetramethoxyl 7,4'-hydroxy flavone), in extract of *Artemisia asiatica*. There was no relationship between antioxidant activity and chemical structure of these compounds. Anti-inflammatory activity of *Artemisia asiatica* was investigated on H-*ras* transformed rat liver epithelial cell line (WB-F344-*ras*). The extract of *Artemisia asiatica* inhibited cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in a dose dependent manner.

we examined the ability of jaceosidin to inhibit the proliferation of *ras* transformed human breast epithelial (MCF10A-*ras*) cells. Jaceosidin reduced the viability of MCF10A-*ras* cells to a greater extent than eupatilin. Jaceosidin treatment resulted in increased intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS) in MCF10A-*ras* cells, which was blocked by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC). NAC attenuated jaceosidin-induced cytotoxicity. To



better assess the proapoptotic effects of jaceosidin, we analyzed the treated cells by the flow cytometry. MCF10A-*ras* cells treated with jaceosidin (100 microM) exhibited the increased proportion of hypodiploid or apoptotic cells (48.72% as composed to 7.78% in control cells). Jaceosidin treatment also increased the ratio of proapoptotic Bax to the antiapoptotic Bcl-2 and induced the cleavage of caspase-3 and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Moreover, jaceosidin elevated the expression of p53 and p21, while the compound inhibited the activation of ERK1/2 that is an important component of cell survival signaling.

Eupatilin was shown to be a pharmacologically active ingredient of *Artemisia asiatica*. In the present study, we found that expression of cyclin D1, a key protein that regulates G1/S progression, was decreased in MCF-10A-*ras* cells treated with eupatilin. Downregulation of cyclin D1 expression by eupatilin was accompanied by a reduced expression of c-Jun and the DNA binding activity of the transcription factor AP-1. The expression of p21waf1/Cip1 was also decreased by eupatilin treatment in both protein and the mRNA levels. We concluded that the inhibitory effect of eupatilin on p21waf1/Cip1 expression is likely to be associated with the downregulation of cyclin D1 expression and AP-1 activation, which play an important role in the cell cycle arrest of *ras*-transformed breast epithelial cells.

Also, we examined the ability of eupatilin to induce apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells. Eupatilin induced the apoptosis of AGS cells as revealed by a decrease in the ratio of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2, as well as the cleavage of caspase-3 and poly (ADP-ribose)polymerase (PARP). The pro-apoptotic effects of eupatilin were further verified by its perturbation of the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ). In addition, eupatilin treatment led to an elevated expression of p53 and p21. Eupatilin inhibited the activation of ERK1/2 and Akt, which are important components of cell-survival pathways.

For screening eupatilin, jaceosidin, and TMH flavone with potent cancer preventive activity, we examined the effect of three compounds on the inhibition of gap-junction intercellular communication (GJIC) in WB-F344 rat liver epithelial cell line. Eupatilin, jaceosidin, and TMH flavone exerted protective effect on PMS-induced inhibition of GJIC in WB-F344 rat liver epithelial cells as determined by the scrape-loading/dye transfer assay. Eupatilin inhibited hyper-phosphorylation of connexin 43, while it was not inhibited ERK phosphorylation. Eupatilin scavenges intracellular ROS generated by PMS in

WB-F344 cell line. Therefore, these results suggested that effect of eupatilin on GJIC is caused by dephosphorylated Cx43 through scavenging activity of intracellular ROS generated by PMS but not due to inhibition ERK signal pathway.

Malignant tumors have a capability to degrade the extracellular matrix (ECM) by controlled proteolysis. One of the important components of the proteolytic system involved in such processes is urokinase-type plasminogen activator (uPA). Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  was found to stimulate uPA. TNF- $\alpha$  impaired the ability of cells to aggregate and to attain compaction. Dyscohesion (cell-cell dissociation) induced by TNF- $\alpha$  was associated with the disordered expression of cadherin/beta-catenin at the sites of cell-cell contact. Since TNF- $\alpha$  plays a crucial role in the regulation of uPA expression, the development of molecules capable of modulating TNF- $\alpha$ -induced signaling is an issue of concern. We observed that human breast epithelial (MCF-10A) cells treated with TNF- $\alpha$  transiently up-regulated uPA mRNA and protein expression. In addition, TNF- $\alpha$  induced expression as well as nuclear translocation of  $\beta$ -catenin in MCF-10A cells. Based on these findings, we attempted to examine the role of  $\beta$ -catenin and its partners, Tcf-4 in upregulation of uPA. When MCF-10A cells were transfected with  $\beta$ -catenin siRNA, TNF- $\alpha$ -induced Tcf-4 DNA binding activity and uPA expression were attenuated. TNF- $\alpha$ -stimulated MCF-10A cells exhibited increased intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS). TNF- $\alpha$ -induced expression of  $\beta$ -catenin and uPA appear to be mediated by intracellular accumulation of ROS in MCF-10A cells, as both events were blocked by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC). One of the plausible ways to prevent the ROS-mediated cellular injury is dietary or pharmaceutical augmentation of endogenous antioxidant defense capacity. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia asiatica*, has been shown to possess strong antioxidative activity. Eupatilin inhibited TNF- $\alpha$ -induced uPA expression and  $\beta$ -catenin and Tcf-4 DNA binding activity. Moreover, eupatilin inhibited the TNF- $\alpha$ -induced invasion of MCF-10A cells. Taken together, the above results suggest that eupatilin has chemopreventive and chemotherapeutic potential by targeting TNF- $\alpha$ -mediated tumor invasion and metastasis.

Elevated levels of cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinases (MMPs) are frequently found in various types of cancerous and transformed cells, with recent studies implicating the upregulation of COX-2 and MMPs in the

development of breast cancer. This article investigated the effects of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the upregulation of COX-2 and MMP-9 induced by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in MCF10A human breast epithelial cells (MCF10A cells). Treatment of MCF10A cells with TPA induced the upregulation of COX-2 and MMP-9, and this was attenuated by jaceosidin treatment. Jaceosidin also inhibited the invasive and migrative phenotypes of MCF10A cells induced by TPA. Furthermore, jaceosidin blocked the TPA-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase-1 and -2 (ERK-1 and -2), which is one of the signaling molecules regulating COX-2 and MMP. These results suggest that jaceosidin inhibits the TPA-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 by blocking ERK-1 and -2 phosphorylation in human breast epithelial cells, which may be indicative of its chemopreventive potential.

We examined anti-metastatic effect of jaceosidin, eupatilin and TMH flavone in *ras*-transformed human breast epithelial cells (MCF10A-*ras*). Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-containing endopeptidases that collectively degrade most of the components of the extracellular matrix (ECM). Also, MMPs have been considered to play a key role in matrix degradation for tumor proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis. Eupatilin, jaceosidin, and TMH flavone significantly attenuated MMP-2 activity in a dose dependent manner. These compounds also inhibited the invasive and migrative phenotypes of MCF10A-*ras* cells. We also investigated anti-metastatic effect of jaceosidin, eupatilin and TMH flavone in SK-HEP-1 human hepatocarcinoma cells. MMP-2/9 activity and migratory ability was not affected by these compounds. However, jaceosidin inhibited invasion capability of SK-HEP-1 cells.

Multiple lines of compelling evidence support the causal relationship between inflammation and cancer. Dextran sulfate sodium (DSS) administration has been reported to induce chronic inflammation in mouse colonic mucosa, which markedly enhances the incidence and the burden of polyps. In an attempt to corroborate the contribution of ulcerative colitis to colon carcinogenesis, we treated male ICR mice with a single i.p dose (10 mg/kg body weight) of azoxymethane (AOM) followed by 2% DSS in drinking water for consecutive 7 days. At the 16th week of AOM plus DSS treatment, 83.33% of mice developed tumors, mostly in distal colon, which were verified as the polypoid tumors and adenocarcinomas by histopathological examination. In contrast, only 10% of AOM-treated and none of DSS-treated mice had tumors.

The extract of *Artemisia asiatica* that is one of traditional asian medicine was studied for its possible chemopreventive effects using the same colon carcinogenesis model with minor modification. Male ICR mice were treated with a single i.p dose (10mg/kg body weight) of AOM followed by 2.5% DSS in drinking water for consecutive 7 days. The extract of *Artemisia asiatica* is fed the chow diet during 15 weeks (3% or 10% in food pellet) after AOM injection. Supplementation with The extract of *Artemisia asiatica* inhibited tumor multiplicity, and suppressed the expressions of COX-2, iNOS and  $\beta$ -catenin as well as activities of NF- $\kappa$ B and AP-1 in the colonic tissues. In addition, The extract of *Artemisia asiatica* inhibited activation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases that are upstream regulators of NF- $\kappa$ B and AP-1. In conclusion, DSS administration caused chronic inflammation, which markedly enhanced the incidence and the burden of AOM-initiated colon tumors in mice. In this model, levels of COX-2 and iNOS as well as MMPs were substantially elevated in the AOM-initiated and DSS promoted colon tumors. The DNA binding activities of NF- $\kappa$ B and AP-1 were enhanced in AOM plus DSS-induced colon tumors. Treatment with curcumin or the standardized extract of *Artemisia asiatica* attenuated DSS-induced inflammatory events, which may account for their anti-tumor promoting effects on colon carcinogenesis.

# CONTENTS

## SUMMARY

Chapter 1. Introduction -----	15
Session 1. Purpose of study -----	15
Session 2. Necessity and contents of study -----	15
Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development -----	19
Chapter 3. Contents and results of study -----	23
Session 1. Contents and methods of study -----	23
Session 2. Results and discussion -----	29
Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study-	58
Chapter 5. Application plan of the study results -----	65
Session 1. Necessity of Additional study -----	65
Session 2. Application on other study -----	65
Session 3. Promotion plan of enterprise conversion -----	66
Chapter 6. Corrected Foreign scientific technology information for studying -	67
Chapter 7. References -----	68

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	15
제 1 절 연구개발의 목적 -----	15
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위 -----	15
1. 기술적 측면 -----	15
2. 경제·산업적 측면 -----	16
3. 사회·문화적 측면 -----	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	19
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황 -----	19
1. 국외 기능성 식품 연구 현황 -----	19
2. 국내 기능성 식품 연구 현황 -----	20
3. 약썩 연구현황 -----	21
제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 -----	22
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	23
제 1 절 연구내용 및 연구수행 방법 -----	23
1. 실험재료 -----	23
2. 항암 활성성분의 추출 -----	23
3. 약썩 추출물의 <i>in vitro</i> 암예방, 항암 활성 검색 -----	23
4. 간암세포인 WB-F344- <i>ras</i> 을 이용한 항염증 활성 검색 -----	23
가. <i>in vitro</i> 항암활성 검색 -----	24
나. <i>in vitro</i> 항암활성 기작 -----	24
5. 인체 유방암 세포를 이용한 약썩의 항산화, 항염증 및 발암 억제 효과 검색 --	25
가. 세포생육에의 영향 -----	25
나. 염증관련 효소 Cyclooxygenase-2의 발현 및 그 생성물 PGE <sub>2</sub> assay -	26
다. 능동적 세포사멸에 대한 연구 -----	26
라. 산화적 손상에 민감한 전사인자 조절기작 규명 -----	27
6. <i>In vivo</i> 동물 모델을 이용한 약썩 추출물의 암전이 억제 활성 탐색 -----	28
제 2 절 연구결과 -----	29
1. 실험 재료 -----	29
2. 약썩 추출물 전체 페놀성 화합물 함량 -----	29
3. 약썩 추출물 및 약썩 플라보노이드의 항산화 및 항염증 활성 -----	29
4. 약썩추출물의 간암세포에 대한 항염증 활성 -----	30

5. 약쑥의 간암세포에 대한 증식 억제 활성화 -----	31
6. 약쑥 (jaceosidin)의 유방암 (MCF10A- <i>ras</i> ) 세포의 증식억제 활성화 및 조절기작-	32
7. 약쑥 (eupatilin)의 유방암 (MCF10A- <i>ras</i> ) 세포의 증식억제 활성화 및 조절기작 ----	35
8. 약쑥 (eupatilin)의 위암 증식 억제 활성화 및 억제 기작 -----	39
9. 약쑥의 세포간 정보전달(Gap junctional intercellular communication, GJIC)의 저해를 회복하는 작용 기작 연구 -----	41
10. 인체유방상피(MCF-10A)세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 전이에 있어서 약쑥 추출물의 억제 효과 및 조절기작-----	45
11. 약쑥 (jaceosidin)의 유방암 세포에 대한 이동 및 전이 억제활성 탐색-----	48
12. 간암 세포주 모델에서 약쑥의 전이 억제 효과 -----	53
13. 위장관 동물모델에서 약쑥 추출물의 발암 억제 효과 및 조절기작 -----	54
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	58
1. 연도별 연구평가의 착안점 -----	58
2. 연구개발 목표에 대한 달성도 -----	60
3. 연구 결과의 대의적 활용 실적 -----	62
4. 관련분야 기술발전 기여도 -----	64
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	65
제 1 절 추가연구의 필요성 -----	65
제 2 절 타연구에의 응용 -----	65
제 3 절 기업화 추진 방안 -----	66
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	67
제 7 장 참고문헌 -----	68

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 약쭉의 간암과 유방암 억제기작을 규명하고 이를 토대로 암 예방 식품소재를 개발하는 것으로 최종적으로 다음 사항을 달성하고자 함

1. 약쭉의 *in vitro* 항산화, 항염증 활성 및 암세포 증식 억제 활성을 규명하여 전통 식품인 약쭉의 효능을 과학적으로 뒷받침함
2. *In vitro* 및 *in vivo* 모델을 이용하여 간암과 유방암의 항암 및 발암 억제 활성과 작용기작을 규명
3. 암 예방 식품 소재로 활용하기 위한 약쭉의 소재화 공정 확립
4. 본 과제 수행을 통해 SCI급 논문을 6 편 이상 발표하고 3 건 이상 특허 출원

## 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

### 1. 기술적 측면

- 약쭉은 우리나라 어느 지역이나 자라는 여러해살이 국화과 쭉쭉의 여러해살이식물로 전초를 말린 것을 애엽 또는 애호라고 하여 생약으로 이용되고 있음. 쭉은 전통적으로 여러 음식과 약 그리고 뜸 등 여러 분야에 이용되었으며 해충제거, 항염증, 부인병 예방과 같은 여러 효능이 있는 것으로 알려졌다.

- 쭉의 식물은 약 세계적으로 약 400~500여종에 이르며 국내의 쭉의 식물도 약 40여종에 이른다. Valant-Vetschera 등에 따르면 같은 쭉의 식물일지라도 함유되어 있는 flavonoid의 종류와 농도가 다름. Flavonoid는 그 구조적 차이에 따라 flavone, flavanol, flavanone, isoflavone 등으로 분류할 수 있으며 각 flavonoid 그룹과 그룹 내 여러 성분에 따라 나타내는 생리활성이 다르며 같은 생리활성을 보여도 그 효과의 정도는 화학물의 구조차이에 따라 커다란 차이를 보임.

- 최근 약쭉의 추출물이 acetaminophen과 사염화탄소에 의해 유도된 간 손상에 보호효과가 있으며 실험적으로 유도된 위장, 간 그리고 췌장의 손상에 대해 항산화 항염증 활성을 나타낸다고 하는 보고가 있으며 또한 암촉진제인 TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate)를 처리한 mouse skin에서는 ornithine decarboxylase (ODC), cyclooxygenase-2 (COX-2), 그리고 nitric oxide synthase



(NOS)와 같은 염증에 관련된 유전자의 발현을 저해하였으며, 이는 이들 유전자 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 전사조절인자인 nuclear factor-kB (NF-kB)와 activating protein-1 (AP-1)의 활성억제를 통해 이루어졌다고 하였음. 그리고 역류성 식도염으로 증가된 malondialdehyde (MDA)와 glutathione이 약쑥 추출물에 의해 감소되었다는 보고가 있음. 약쑥의 위염치료제로서의 효능도 검증되었음.

- 약쑥은 여러 유효성분을 함유하고 있는데 특히 eupatilin은 인간 promyelotic leukemia cell인 HL-60에 caspase-3, 7, 9 등의 단백질을 통해 자가세포사멸을 유도하는 것으로 보고되었으며, 또한 mastocytoma 세포의 5-lipoxygenase의 활성을 저해함으로써 여러 만성질환의 주요원인 중 하나인 염증반응을 예방할 수 있다고 하였음. 국화과의 여러 쑥속에는 apigenin, luteolin 등의 flavone 류와 kaempferol, quercetin 등의 flavonol 류 naringenin, eriodyctiol 등의 flavanone 등의 생리활성 성분인 폴리페놀이 함유되어 있는데 각 종간에 이들 구성성분의 조성과 함량이 다양한 것으로 밝혀졌으며 따라서 약쑥에도 이러한 생리활성성분이 함유되어 있을 것으로 추측됨.

- 본 연구에서 사용한 약쑥은 식품으로 이용할 수 있으며 전국에 자생하여 기능성 식품으로 제조하기 위한 원료의 확보가 쉬움. 또한 기존 연구결과가 매우 적고, 특히 간암과 유방암의 예방에 대한 보고가 이뤄지지 않아 약쑥을 간암과 유방암 예방 소재로 이용하기 위해서는 이에 대한 기초연구가 필요할 것으로 사료됨.

## 2. 경제 · 산업적 측면

- 최근 건강기능식품에 관한 법률이 2002년 8월 26일에 제정되고 건강기능식품에 관한 법률시행령이 2003년 12월 18일자로 공포됨에 따라 건강기능식품과 그 소재의 개발에 관한 관심과 수요가 급격히 높아지고 있음.

- 97 년 650 억불 규모이던 세계 건강기능성식품 시장은 2005 년도에 현재 시장의 10 배 이상 증가되며, 한국의 경우 수 조원 이상, 세계적으로 수 백조원 이상이 될 것으로 예상되고 있음. 미국식품과학회 (IFT)가 최근 미국의 100 대 주요 식품기업체의 CRO (Chief Research Officers)를 대상으로 현재 연구개발영역에 대한 설문을 실시하여 분석, 발표한 결과 건강식품과 기능성식품이 수위를 차지하고 있음.

- 세계 건강기능성식품시장의 분포를 살펴보면 미국은 연유기식품, 기능성식품, 식이보조제, 천연제품을 포함해 99 년 총 445억불의 소비자 판매고를 기록하였으며 2000 년 NBJ 보고에 따르면 미국에 이어 유럽이 422억불, 일본이 231.5억불, 그리고 캐나

다가 36.7억불의 소비자 판매를 보였음. 한국의 경우 2002년도 건강보조식품시장은 전년대비 17%정도 성장한 약 1조 3천 5백억 시장에 이를 것으로 보임.

- 화학적 암예방 (cancer chemoprevention)이란 독성이 없는 안전한 화학물질을 이용하여 발암과정을 인위적으로 억제하거나 지연 또는 역전시킴으로써 정상세포가 암세포로 전환되는 것을 예방하려는 암연구의 새로운 전략으로 기존의 항암제에 의한 치료 (chemotherapy)와는 다른 개념이며 미국에서는 암연구와 예방사업에 많은 투자를 해와 암으로 인한 사망률이 0.5%씩 줄어드는 개가를 올리고 있고, 일본에서도 매년 1조 엔의 거액을 투자해서 암 예방 사업 및 위암 조기 진단 사업 등을 펴, 치료와 예방에 눈에 띄는 효과를 거두고 있음. 따라서 암을 치료보다는 예방에서 그 해결점을 찾는 것이 암의 고통으로부터 벗어나는 보다 근본적이고 이상적인 방법이며 암예방 프로그램 전개 시에 발생하는 비용은 이미 암이 발생한 뒤의 치료에 들어가는 비용에 비해 훨씬 적어 의료비 등의 사회적 비용을 절감할 수 있음.

-농촌에서 작물의 재배기술이나 시설은 많이 발전하였으나 상업성이 확보된 작물이 많지 않으므로 국내에서 대량재배가 가능하고 고부가가치 소재로 개발이 가능하여 농민 소득증대에 기여할 수 있는 작목 개발이 절실한 실정임.

- 약쑥은 전통 식품으로 널리 이용되어 왔으며 현재에도 식품 및 여러 가공형태로 판매, 섭취하고 있음. 약쑥은 우리나라 어느 지역이나 분포하고 있고, 재배가 용이하여 기능성식품의 원료로 이용할 수 있는 커다란 잠재력을 지니고 있음.

- 따라서 본 연구를 통해서 약쑥의 간암과 유방암의 예방효과와 그 기작을 규명하여, 약쑥을 이용한 암예방 식품소재를 개발한다면 약쑥을 이용한 다양한 기능성식품의 개발이 가능하게 되며 약쑥과 관련된 제품에 대한 소비 및 수출이 증가하여 식품산업발전과, 재배 농가의 수입 증진에 기여할 것임.

### 3. 사회·문화적 측면

- 우리나라에서는 전통적으로 醫食同源이라 하여 일상 섭취하는 식품을 통하여 건강을 유지할 수 있다는 생각이 보편화되어 있고 또 전통의약도 식품의 형태를 가진 것이 많은데 이 개념은 현대적인 기능성식품과 아주 흡사한 개념임. 이 전통을 바탕으로 우리나라에는 기능성식품 소재로 활용할 수 있는 한의학, 천연물과학 자료와 소재 등이 오랜 동안 광범위하게 축적되어 왔음.

- 그러나 현재 건강보조식품의 경우 소비자의 신뢰를 크게 받지 못하고 있는 것도

사실인데, 이는 전통의 민간요법과 식품산업이 접목되는 과정에서 과학적인 효능의 입증에 이루어지지 못하였으며, 생리활성 증진 효과를 위한 권장 섭취량의 추정 및 안전성의 확립 등 소비자에게 신뢰를 줄 수 있는 과학적인 자료가 함께 제공되지 못했기 때문임. 이들 자료들을 현대과학으로 재조명하여 원천기술을 확보함으로써, 우리의 국가적 장점으로 살려나갈 수 있다면 국제적으로 강한 경쟁력을 갖는 과학과 산업으로 세계를 선도할 수 있을 것임.

- 암은 우리나라에서 사망률 1위에 해당하는 질병으로 많은 사람에게 고통을 주어 삶의 질을 저하시키고 개인적으로나 국가적으로 막대한 경제적 부담을 주고 있음. 간암은 우리나라 암중 사망률 3위, 유방암은 6위를 나타내고 있는데 암에 의한 사망률은 많은 노력에도 불구하고 낮아지지 않아 식품에 의한 암예방이 매우 중요한 실정임

- 본 연구에서와 같이 한국인이 전통적으로 많이 섭취한 약쑥의 간암과 유방암 예방 효과 탐색은 한국인에게 호발하는 암의 예방 및 치료에 큰 기여를 할 수 있을 것임.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황

#### 1. 국외 기능성 식품 연구 현황

미국: 기능성식품과 관련하여 '89년부터 nutraceutical (nutrient + pharmaceutical) 이라는 용어가 사용되기 시작하였으며 '80년대 후반부터 국공립 연구소, 산업체, 대학 등에서 기능성식품에 관한 연구가 활발하게 이루어졌다. 국립암연구소(NCI)에서는 1990년부터 5년 과제 “항암 기능성 식물성분(phytochemicals)” 연구를 수행하면서 암 예방 성분을 많이 함유한 식품 즉 “designer food”의 개발을 연구목표의 하나로 포함하였다. 미국 보건원의 기능성식품 관련연구 예산은 94년까지도 없었으나 이후 98년까지 3,000만불 수준으로 증가하였으며, 관련 논문은 94년 약 200편에서 98년 약 3,000편으로 5년간 약 15배 급 신장하였다.

암 예방 소재로서는 phenolics, carotenoid, lycopene, monoterpene 등이 발암촉진 인자 활성억제, zingerol, monolactone, quinone reductants 등이 종양세포 증식 억제, anthocyan 등이 암세포 효소 불활성화, carotenoid, flavonoid, coumarin, triterpene, isoflavone, 차의 polyphenol, 마늘 성분들이 항암 효과를 나타내는 것으로 연구되었다.

일본: 어느 나라보다 먼저 기능성식품 관련 연구가 국책 연구로 시작되고, 대학, 연구소, 산업체 등에서 연구가 활성화되어 이루어지고 있다. 기능성식품 관련 연구는 1984년부터 1994년까지 3단계에 걸쳐 문부성특정연구의 형태로 수행되었다. 제 1단계 연구가 진행되면서 식품의 제 3차 기능에 역점을 둔 “기능성 식품”이란 용어가 시작되었고, 1990년 “기능성 식품” 대신 “특정보건용 식품”이라는 용어가 제시되었다. 이 “특정보건용 식품”은 영양개선법 제 12조에 반영되어 1991년부터 시행되었는데 2001년에 특정보건용식품과 영양기능식품을 망라하는 보건기능식품 제도로 통합되어 운영되고 있다. 특정보건용식품은 각각의 품목을 허가 받는 개별허가형 제품인데 2001년의 시장규모는 224개 품목에 2,000억엔 정도이다. 일본에서 상업화되고 있는 기능성식품 소재로서는 식이섬유, 올리고당, 당 알코올, 다가불포화지방산, 펩타이드 및 단백질, 배당체, 비타민류, 기타 식물성분, 미네랄류 등이 있다.

유럽: 각 나라마다 규정이 달라 EU 차원에서 통일된 기능성식품 규정은 없으나 많은 검토를 진행 중에 있다. 현재 EU에서 개발되어 제품화 된 기능성식품 소재로는 오메가-3 지방산/어유, 요구르트, 유산균, 올리고 과당, 식물성 스테롤, 식이 섬유 등이 있다.

기능성식품의 특허출원 동향: 1980년 이후 2000년까지 미국, 일본, 유럽, 한국 지

역에서 출원된 기능성식품 분야 특허출원은 5,469건으로 분석되었는데 (특허청 신기술동향보고서, 2000), 일본이 1984년부터 특허가 출원되어 시기적으로도 앞서 있고 출원건수도 2,256 건으로 가장 많다. 다음은 미국 1,218건, 유럽이 692 건 순이다. 또한 기능성식품 특허출원 상위 10대 출원인에는 P&G 등 미국 업체 6개, Ajinomoto 등 일본 업체 2개 등이 포함되어 있다.

## 2. 국내 기능성 식품 연구 현황

우리나라에서는 80년대 말부터 각 대학 및 연구소에서 건강기능성 식품소재 또는 식품에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재 식품 및 관련 산업에 설치된 부설 연구소는 2001년도 현재 57개로 집계되고 있으며 이들 업체 대부분은 기능성식품 관련 연구를 주요 연구과제로 수행하고 있다. 또한 전국 약 40여 개 4년제 대학에 식품관련 학과 또는 전공이 설치되어 있는데 이들 대부분의 대학 연구실에서는 기능성식품에 관한 연구를 수행하고 있다.

1980년 이후 2000년까지 우리나라에서 출원된 기능성식품 분야 특허출원은 1,303건으로 분석되었다 (특허청 신기술동향보고서, 2000). 또한 한국, 미국, 일본, 유럽의 기능성식품 특허출원 상위 10대 출원인에는 우리나라의 제일제당과 롯데제과 등 2개 업체가 포함되어 우리나라도 기능성식품 분야의 기술개발이 활발히 이루어지고 있는 것으로 나타났다.

국내의 암 예방 식품소재에 관한 연구는 최근 들어서 활발하게 연구되고 있으며, 주로 학계를 중심으로 이루어지고 있다. 그러나 주로 약학, 생명공학, 의학과를 중심으로 제약회사가 참여하여 암을 억제하는 특정 물질의 분자생물학적 작용 기작에 관한 학문적인 연구가 이루어지고 있으며, 연구 투자도 암 예방 식품소재 보다는 암 치료에 이용할 수 있는 약품 개발 및 작용 기작에 관한 분야에 우선되고 있다. 이에 따라 식품에 이용할 수 있을 만큼 안전성이 입증되고 또한 산업적으로 이용할 만한 암 예방 소재의 개발은 거의 이루어지지 않았다. 또한 실제 식품 산업에 응용할 때에는 특정 단일 성분보다는 여러 성분이 혼합되었을 때의 효과와, 기호도가 높을 것으로 예상되는 원료로부터 암 예방 효능 식품소재를 탐색하는 것이 필요하다. 특정한 물질의 암 억제 효능 탐색과는 달리 여러 성분이 포함되어 있는 암 예방 식품소재의 탐색을 위해서는 식품소재 전체의 효능을 측정할 수 있는 탐색법, 그리고 예상되는 물질의 구조적 특성 및 정량 분석이 요구되고, 이를 토대로 효율적인 분리, 정제, 생산을 위한 최적 생산 공정이 이루어져야 하는데, 현재까지 이러한 다단계 기술의 개발이 미진하여 산업현장에 응용되기 힘들 실정이다. 최근 일부 연구팀의 결과는 식품생명공학 관련 업계에 기술이 이전되어 암 예방 식품 및 식품소재로서 이용되기 시작하고 있다.

### 3. 약쭈 연구현황

약쭈에 대한 2004년 과제 시작시점에서의 국내 연구결과는 약 3건으로 각각이 Escherichia Coli KCTC 2441의 생육억제와 약쭈의 생리활성성분 분석, 알츠하이머병에 대한 효과에 관한 것이며, 최근 국외 연구결과는 총 13건으로 간 손상보호, mouse skin에 대한 염증관련 유전자 발현억제 등의 결과를 포함하고 있다.

현재까지 약쭈의 간암과 유방암에 대한 예방효과에 대한 연구는 이뤄지지 않았으며 약쭈의 생리활성에 대한 연구자체가 적어 약쭈의 생리활성에 대한 기초연구가 부족한 실정이다. 따라서 약쭈를 기능성 식품소재로 활용하기가 어려운 상황이다.

## 제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구과제는 다양한 생리활성을 갖는 약쑥을 소재로 하여 본 과제를 통해 확립된 방법을 통하여 제조한 추출물의 항산화·항염증 활성을 검색하여 추출물 및 약쑥 플라보노이드의 암 예방 기능성 소재로서의 가능성을 제시하고, 이들의 *in vitro*, *in vivo* 모델을 이용하여 간암 및 유방암에서의 다양한 항암 기작을 밝히고자 하는 유기적인 창의적 공동연구로서 국내 전통자원인 약쑥의 기능성 소재로서의 학문 및 산업적 활용기반을 한 단계 심화시키는 연구이다. 약쑥은 전통 식품 및 민간요법으로 널리 이용되어 왔으며 특히 본 연구에서 사용되는 약쑥 *Artemisia asiatica* Nakai (Asteraceae)은 전국에 자생하여 원료의 확보가 용이한 작물이므로 본 연구에서 목적하는 약쑥의 간암과 유방암 억제기작 규명 및 암 예방 식품소재 개발이 이루어진다면, 국내 작물이 고부가가치 소재로 발돋움 하여 농가 소득증대에 기여할 수 있으리라 예상된다. 또한 이는 본 과제를 통해 확립된 기술을 다른 작목 개발로의 활용을 유도하여 고령화/선진화/세계화에 들어서 있는 국내 시장에 수입의존도 탈피 및 미활용 식물자원 활용에 의한 고부가가치화 상품의 생산이라는 발전으로 이어질 수 있을 것으로 예상된다. 산업적으로는 웰빙 시대에 부합하는 건강 지향 nutraceutical 시장의 확대가 더욱 가속화될 것으로 예상된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구내용 및 연구수행 방법

#### 1. 실험재료

실험재료로 사용하는 약쭉은 생태학적 특성이 규명되어 있고, 상업적으로 시장에서 판매하는 것을 구입하여 사용하며 시료의 동정은 서울대학교 수목원에 의뢰함.

#### 2. 항암 활성성분의 추출

약쭉을 물(열수), ethanol, acetone 등의 여러 가지 용매로 추출한 후 농축 여과하여 얻은 조추출물을 XAD-4 or Diaion HP2MG or MCI gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography 등으로 유효활성 분획을 선별함. 유효활성 분획은 다시 여러 종류의 cellulose 및 silica gel based TLC, 역상 및 순상 HPLC, gel permeation HPLC 등으로 분리하여 사용함.

#### 3. 약쭉 추출물의 *in vitro* 암예방, 항암 활성 검색

가. 페놀함량 측정

Folin's method : 시료에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 첨가한 후 실온에서 3분간 반응시킨 후, 여기에 포화된  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 첨가한 후 다시  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응시키고, 반응액을 원심 분리한 후, 상층액을 취하여 725nm에서의 흡광도를 측정하였으며, (+)-gallic acid를 표준물질로 하여 농도를 결정한 후 함량을 계산함.

나. 항산화 활성 검색

ABTS assay: ABTS에 대한 전자 공여능을 측정하는 Kim's method를 이용하는 것으로 ABTS 20 mg을 PBS에 녹여 만든 ABTS 용액에 여러 농도의 시료용액 1 ml을 넣고 5초간 진탕시킨 후 30분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도의 변화를 측정함.

DPPH assay: DPPH에 대한 전자 공여능을 측정하는 Blis's method를 이용하는 것으로 DPPH 20 mg을 ethanol에 녹여 만든 DPPH 용액에 여러 농도의 시료용액 1 ml을 넣고 5초간 진탕시킨 후 30분 동안 방치한 후 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정함.

#### 4. 간암세포인 WB-F344-ras을 이용한 항염증 활성 검색

염증관련 효소인 COX-2의 발현 및 그 생성물  $\text{PGE}_2$  assay : WB-F344-ras 세포에 발암촉진 물질인 TPA를 처리하고 4시간 후 PBS wash 한 후 scrapper로 cell을 긁어내어 ice cold RIPA buffer를 사용하여 단백질을 추출함. 단백질 정량 후 30  $\mu\text{g}$ 의



단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후 PVDF paper에 electroblotting 함. COX-2 protein에 대한 antibody를 사용하여 반응시키고 ECL로 detection 함. COX-2의 생성물인 prostaglandin PGE<sub>2</sub>의 생성량 측정은 Amersham EIA kit를 이용하여 측정함.

가. *In vitro* 항암활성 검색

*In vitro* 세포증식 억제효과 측정: 각 세포주는 서울대 세포주 은행 및 American Type Culture Collection을 이용하여 그 특성이 명확히 규명된 것으로, 사람의 간암 세포주 SK-HEP-1 (ATCCHTB52)를 구입하여 이용하며, <sup>3</sup>H-Thymidine uptake, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay 등을 통하여 암세포주의 세포증식 억제효과를 측정.

나. *In vitro* 항암활성 기작

1) 세포예정사(apoptosis) 유도 효과

Flow cytometer로 annexin-V와 7-AAD 두 가지 염색 시약을 이용하거나, DNA fragmentation을 이용하여 암세포의 apoptosis를 유도하는 메커니즘을 확인함.

2) 세포분열 억제 효과

세포분열 단계에서는 BrdU를 이용한 non-isotope 방법으로 세포분열 정도 및 flow cytometer를 이용한 cell cycle변화를 측정함. Flow cytometer로 propidium iodide 염색시약을 이용하여 DNA 세포주기를 분석하여 세포증식 억제가 일어나는 단계를 확인하고, 관여하는 유전자들의 발현의 억제를 확인하여 세포주기 조절에 의한 암세포의 증식을 억제하는 기작을 확인함.

3) 세포간 정보전달(Gap junctional intercellular communication, GJIC)의 저해를 회복하는 작용기작 연구

GJIC assay: Scrape Loading/ Dye Transfer (SL/DT) assay가 이용되는데 정상 간상피세포에 생체 내에서 중요한 암촉진 역할을 하는 과산화수소와 시료를 동시 처리한 후 세포가 90%이상 채워졌을 때 lucifer yellow 염색액을 이용하여 GJIC이 회복되는지를 형광으로 확인하는 Scrape Loading/ Dye Transfer (SL/DT) 방법을 이용함.

Western blot analysis: 단백질을 Laemmli buffer에서 끓여 추출하고, 단백질 정량을 하여 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel에서 전기영동을 한 뒤, nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell)으로 transfer 함. 이 membrane을 5% skim milk로 blocking하고,

anti-phosphorylated p38-1 등의 primary antibody등을 부착시키고, 2차 항체를 붙여 준 후, ECL reaction solution으로 1분 동안 반응시킨 뒤 X-ray film에 노출시켜 autoradiography를 하고, 각각의 band의 상대적인 농도는 Imaging Analyzer로 정량화함.

4) 암세포를 이용한 약축의 matrix metalloproteinase (MMP), invasion, migration 억제 효과 측정

Zymography를 이용한 MMP활성 측정 : 세포를 24 시간 배양한 후, PBS로 씻어내고 serum free media로 48 시간동안 배양하는데, 이때 효과를 보고자하는 시료를 함께 처리하여 배양함. 상층액을 모아서 원심분리(vision, DN-5500)하여 정량(Beckman, DU650)한 후 동량의 total protein을 0.1% gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동함. gel은 2.5% triton X-100으로 세 번 씻어내고, 40 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 용액을 넣고 37°C에서 18 시간동안 배양한 후, 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하면 전체적인 배경은 푸른색이고 gelatin이 분해된 부분은 흰색 밴드로 나타남.

Invasion assay : Chemicon 사의 Cell Invasion Assay kit를 이용함. Invasion chamber를 상온에 맞춘 뒤 ECM층을 적시기 위해 serum free media 300 $\mu$ l를 insert 안쪽에 첨가함. Serum free media에 0.5-1.0\*10<sup>6</sup>cell/ml 의 농도로 준비한 세포를 준비한 뒤 insert 하층부는 혈청을 함유한 배지를 첨가하고 상층부에는 준비한 세포를 첨가하고 24시간 동안 배양함. 면실봉을 이용하여 상층부의 비침투성 세포를 조심스럽게 제거한 뒤 약 20분간 염색시킴. 염색약을 제거하고 세척한 뒤 말리고 현미경을 이용하여 세포를 관찰함.

Wound migration assay : 세포를 6 well plate에 100% 꽉 차도록 배양한 뒤 세포주기 억제제인 mitomycin 25 $\mu$ g/ml을 30분간 처리하고 세포 위에 injury line을 만듦. Well을 PBS를 이용하여 세척한 뒤 배지 존재 하에 이동하도록 한 뒤 지정된 시점에서 현미경을 이용하여 관찰함.

## 5. 인체 유방암세포 MCF10A-ras를 이용한 약축의 항산화, 항염증 및 발암 억제 효과 검색

가. 세포생육에의 영향

MTT reduction assay : MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 정량적으로 측정함. MCF10A-ras cell을 48-well dish에 1 $\times$ 10<sup>4</sup>개/well의 density로 간 다음 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) F12 배지에서 배양한 뒤 시약을 적정

농도로 처리한 후 여기에 MTT solution (최종농도 1 mg/ml)을 가하고 2시간 동안 배양함. Dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해시킨 후 540 nm에서 optical density를 microplate reader로 측정함.

나. 염증관련 효소 Cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 및 그 생성물 PGE<sub>2</sub> assay  
MCF10A-ras 세포에 발암촉진 물질 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 처리하고 4시간 후 PBS wash 한 후 scrapper로 cell을 긁어내어 ice cold RIPA buffer를 사용하여 단백질을 추출함. 단백질 정량 후 30µg의 단백질량을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후 PVDF paper에 electroblotting 함. COX-2 protein에 대한 antibody를 사용하여 반응시키고 ECL로 detection 함. COX-2의 생성물인 prostaglandin PGE<sub>2</sub>의 생성량 측정은 Amersham EIA kit를 이용하여 측정함.

다. 능동적 세포사멸에 대한 연구

TUNEL staining (in situ nick-end labeling) : MCF10A-ras cell (105 cells/ 1 ml) 을 chamber slide에 넣고 60-70%의 confluency가 될때까지 배양한 다음 시약을 처리함. 배지를 덜어낸 후 4% neutral buffered formalin (100 µl)을 넣어 1시간 동안 고정시킴. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3% in methanol)로 실온에서 1시간 방치하여 endogenous peroxidase를 차단한 후, 4°C에서 0.1% Triton X-100 in sodium citrate로 2분간 처리하여 cells을 permeable하게 함. TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT, digoxigenin-11-dUTP)를 50 µl 가하고 37°C에서 1시간동안 배양하여 label시킨 후, peroxidase-conjugated anti-goat antibody를 50 µl 가하고 37°C에서 30분 동안 배양함. 이후 DAB solution 을 50-100 µl 넣고 10분간 incubation한 후 50% glycerol로 mounting 함.

Mitochondria membrane permeability 변화 측정 : Mitochondria membrane potential 을 측정하기 위하여 JC-1 dye를 사용함. MCF10A-ras (5x10<sup>4</sup> cells/1 ml) 세포를 chamber slide에 넣고 시약을 처리하고 37 C에서 배양하고, 배지를 덜어낸 후 PBS 로 2회 세척한 뒤 10 mg/ml JC-1을 가하여 37°C에서 30분간 반응을 시킨 후 형광의 변화를 JC-1 monomer는 excitation 파장 485 nm 및 emission 파장 530 nm에서, aggregate는 excitation파장 540 nm 및 emission 파장 590 nm에서 confocal microscope로 측정함. 별도의 실험에서는 정량을 위해 PBS로 2회 세척한 뒤 DMSO 로 lysis 시킨 후 microplate fluorescence reader로 측정하여 JC-1aggregate/monomer의 비를 구하여 비교함.

Western blot analysis of poly(ADP-ribose) polymerase, caspase-3, Bcl<sub>2</sub> : 시약을

처리한 MCF10A-ras cell을 RIPA bufer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitor cocktail)로 0°C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취함. 단백질을 BCA reagent로 정량을 한 뒤, 30 µg을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동함. 전개시킨 gel을 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 tranfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시킴. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-Poly(ADP-ribose) polymerase, caspase-3, Bcl2 primary antibody (Transduction Laboratories, KY)를 overnight으로 붙이고, PBST용액으로 5분간 3회 washing 한 후 horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간동안 붙인 다음 PBST용액으로 5분간 3회 washing함. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응한 뒤 x-ray 필름에 노출시킴.

라. 산화적 손상에 민감한 전사인자 조절기작 규명

전사인자 NF-κB와 AP-1 활성화 측정 : MCF10A-ras 세포 (1x10<sup>7</sup> cells/100Φdish)에 시약을 농도별로 처리함. buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT) and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))에서 10분간 반응시킨 후 원심분리함. pellet을 다시 buffer C (20 mM HEPES (pH 7.9), 20 % glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT and 0.2 mM PMSF)에 현탁시키고, 20분 동안 반응시킨 뒤 원심분리하여 상등액을 얻어 단백질을 정량함. 위에서 얻은 nuclear extract (20 µg)에 incubation buffer (4 % glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, (pH 7.5) and 0.1 mg/ml sonicated salmon sperm DNA)를 가하고 25분 반응시킨 후 nick spin column을 이용하여 정제한 32P-end labeled-double strand oligonucleotide를 2 µl 가하고 상온에서 50분 반응시킴. 6% polyacrylamide gel 상에서 free oligonucleotides와 DNA-protein complex를 분리하고 gel을 건조시킴. 2시간 정도 phosphorimager plate에 노출시킨 다음 phosphorimager (Fuji Film BSA-2500, Japan)로 확인하고, X-ray film을 cassette에 넣어 70°C에서 24시간 노출시킨 후 현상함.

Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) 활성화 측정 : MCF10A-ras cell에 TPA를 처리한 4시간 후 단백질을 얻어낸 다음, p38 MAP Kinase, ERK1,2 그리고 JNK1,2에 대한 antibody와 활성화 형태에 선택적인 antibody를 이용하여 MAPK 활성화를 Western blot를 통해 확인함.

## 6. *In vivo* 동물 모델을 이용한 약속 추출물의 암전이 억제 활성 탐색

Metastasis 연구에 많이 사용되는 동물모델을 이용하면, melanoma cancer cell을 culture하여 B16-F10 mouse tail vein에 injection함. Injection 5주 후에 동물을 희생시켜 lung 조직을 적출하여 ice-cold RIPA buffer로 균질화 하여 단백질을 얻어낸 다음, 앞서 소개한 방법으로 일련의 실험을 수행함.

## 제 2 절 연구결과

### 1. 실험 재료

약쑥을 채취한 뒤 세척, 분쇄 후 메탄올을 이용하여 추출물 (약쑥추출물)을 제조하였다. 약쑥 추출물로부터 활성 성분을 분리하기 위하여 메탄올 추출물로부터 에틸아세틸 분획물을 분리한 뒤 silica gel chromatography를 수행하여 분획물들을 제조하였다. 분획물들의 TLC 분석을 통해 유사한 조성의 분획 물로 구분 하였고, 그 중 활성을 갖는 분획 물을 ODS-18 resin으로 분리하였고 70% 메탄올로 elution한 분획물에서 최종 활성 분획을 분리하였다. 이 활성분획으로부터 동정된 플라보노이드인 eupatilin, jaceosidin 그리고 TMH flavone (Figure 1)를 이용하여 암 예방 활성을 규명하였다.

### 2. 약쑥 추출물 전체 페놀성 화합물 함량

약쑥 추출물 중에서 대표적 암 예방 식물성화합물인 페놀성 성분들의 함량을 분석하기 위해 folin ciocalteu assay를 사용하여 gallic acid와 비교분석하였다. 약쑥추출물은 1 그램의 추출물 당 14.54 mg의 gallic acid에 해당하는 페놀성 화합물을 포함하고 있는 것으로 분석되었다 (Figure 2).

### 3. 약쑥 추출물 및 약쑥 플라보노이드의 항산화 활성

약쑥 추출물의 항산화활성을 측정하기 위해 DPPH 라디칼에 대한 소거능을 측정하였고 그 결과 농도 의존적으로 DPPH 라디칼에 대한 소거능을 나타내었으며 약 50 mg/ml에서 50 % 라디칼 소거능을 나타내었다. 또한 약쑥 플라보노이드의 구조적 차이에 따른 항산화활성을 비교 분석하기 위해 각각의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정 한 결과 구조에 따른 항산화활성의 차이는 나타나지 않아 2번 탄소 위치에 있는 주로 -OH 기가 각 플라보노이드 항산화활성에 기여하는 것으로 추정할 수 있었다 (Figure 3).

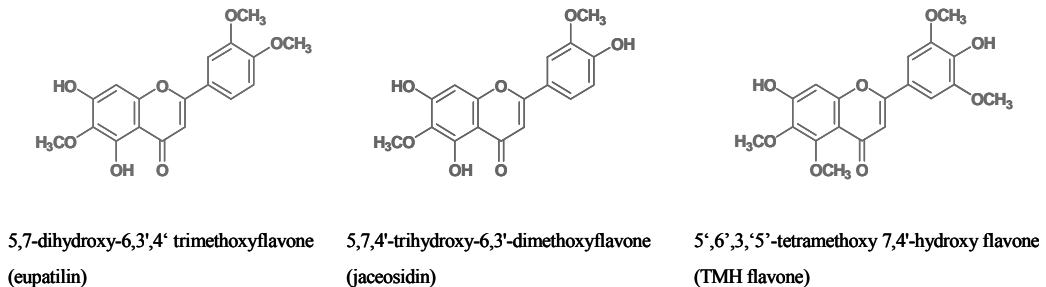


Figure 1. Chemical structures of phytochemicals in *Artemisia asiatica* Nakai.

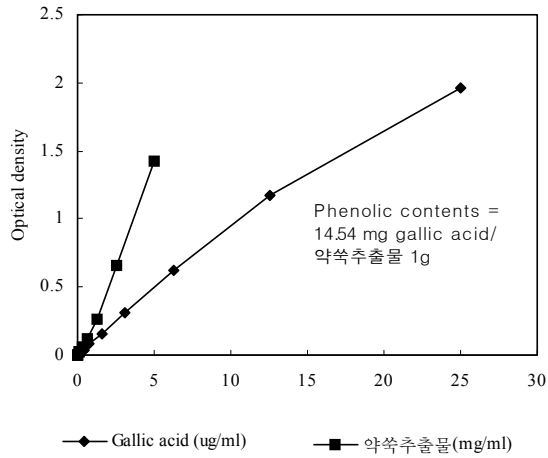


Figure 2. Total phenolic contents of extract of *Artemisia asiatica* nakai

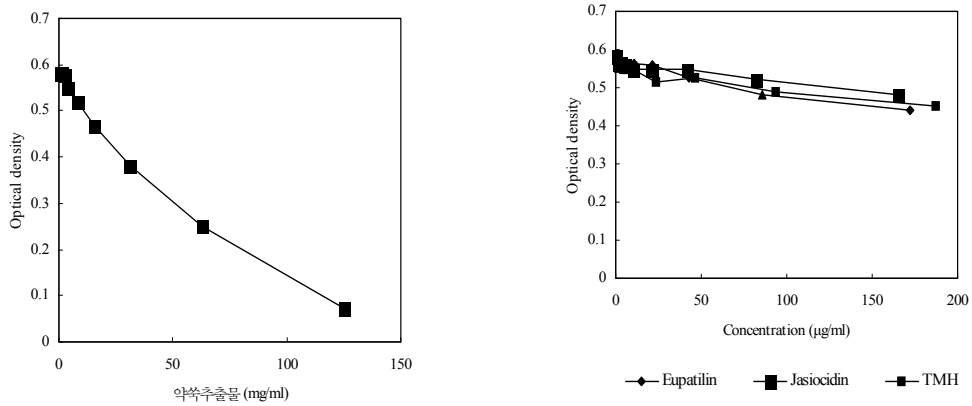
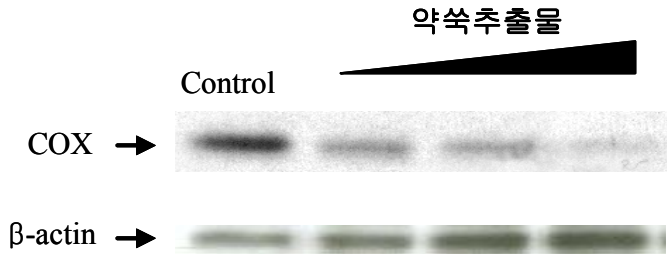


Figure 3. Antioxidant capacity of extract of *Artemisia asiatica* nakai and its major flavonoids

#### 4. 약쭈추출물의 간암세포에 대한 항염증 활성

약쭈추출물의 간암세포에 대한 항염증활성을 분석하기 위해 쥐의 간 정상세포에 발암유전자인 ras를 도입하여 암화를 유도한 WB-F344-ras 세포모형을 이용하였다. 염증의 대표적인 지표인 COX-2 (cyclooxygenase-2)발현에 있어 약쭈추출물은 농도의존적으로 COX-2의 발현을 저해하였다 (Figure 4). 그러나 세포증식억제 규명에

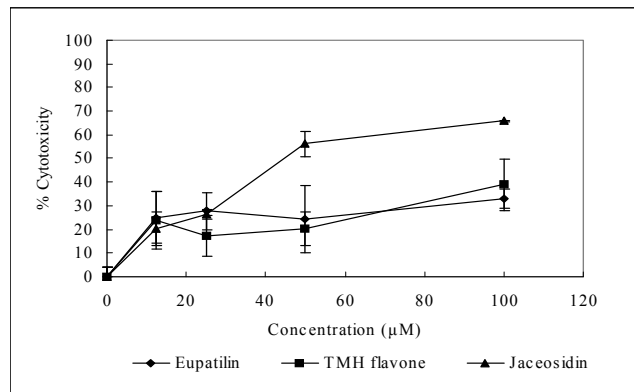
사용한 SK-HEP-1 세포에 있어 COX-2의 발현이 관찰되지 않았다 (data not shown).



**Figure 4.** Effects of *Artemisia asiatica* Nakai on Expressions of COX-2 in WB-F344-*ras* cells

#### 5. 약쑥의 간암세포에 대한 증식 억제 활성

약쑥추출물의 간암세포에 대한 세포증식억제 활성을 분석하기 위해 약쑥 플라보노이드를 이용하여 MTT assay를 수행하였다. eupatilin, TMH flavone, jaceosidin 모두 농도 의존적으로 간암세포 증식을 억제하였으나 jaceosidin의 활성이 제일 뛰어났으며 50 % 세포증식 저해 농도는 약 40  $\mu$ M이었다.



**Figure 5.** Antiproliferative effects of *Artemisia asiatica* Nakai on SK-HEP-1 cells



## 6. 약쑥 (jaceosidin)의 유방암 (MCF10A-*ras*) 세포의 증식억제 활성 및 조절기작

약쑥의 유방암세포에 대한 증식억제 활성 및 관련조절기작을 밝히기 위해 MCF-10A 인체유방상피세포에 *ras* 종양유전자를 도입한 MCF-10A-*ras* 세포주 모델을 이용하여 약쑥 추출물의 주요 활성성분인 eupatilin과 jaceosidin을 유방암 증식억제 활성을 측정하였다. Jaceosidin과 eupatilin은 농도 의존적으로 유방암세포의 증식을 억제하였으나 Jaceosidin의 증식억제 활성이 eupatilin보다 높았다. Jaceosidin의 세포증식 50 % 저해 농도는 약 75  $\mu$ M이었으며 같은 농도의 eupatilin치리에 의해서는 50 % 저해 활성이 나타나지 않았다 (Figure 6).

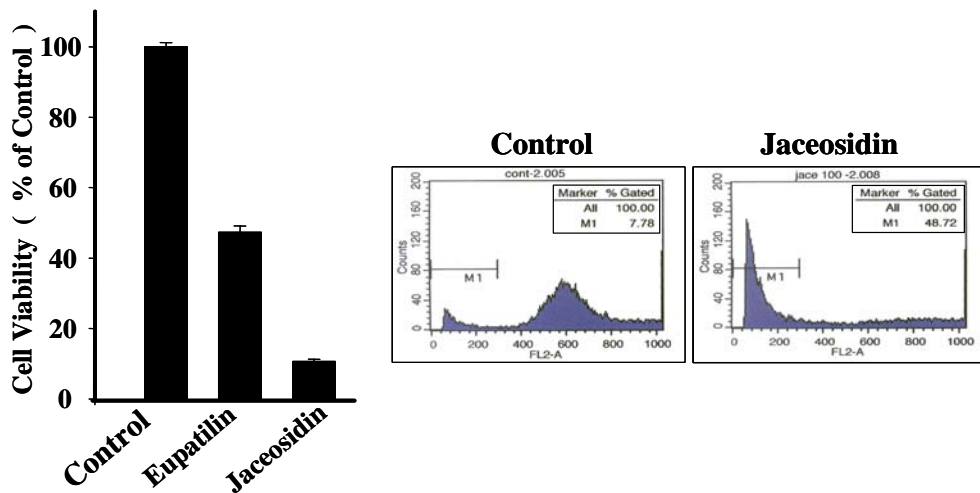


Figure 6. Effects of Jaceosidin on the Proliferation of MCF10A-*ras* Cells (2day)

이와 같은 세포사멸의 차이는 eupatilin보다 hydroxyl 잔기를 하나 더 가지고 있는 jaceosidin만이 ROS를 더 많이 생성함으로써 일어나는 것임을 확인하였다. 즉, DCF-DA 염색을 통하여 알아본 결과 jaceosidin은 ROS를 생성하지만 eupatilin은 생성하지 않았다. 뿐만 아니라 ROS scavenger인 N-acetylcysteine(NAC)을 jaceosidin과 함께 처리한 결과 세포 사멸이 억제되는 반면 eupatilin에 의한 세포사멸은 영향을 받지 않았다 (Figure 7). Jaceosidin이 유방암세포의 형태적 특성에 미치는 영향을 관찰한 결과 50, 100  $\mu$ M 농도에서 세포의 morphology가 변하는 것을 확인하였다 (Figure 8).

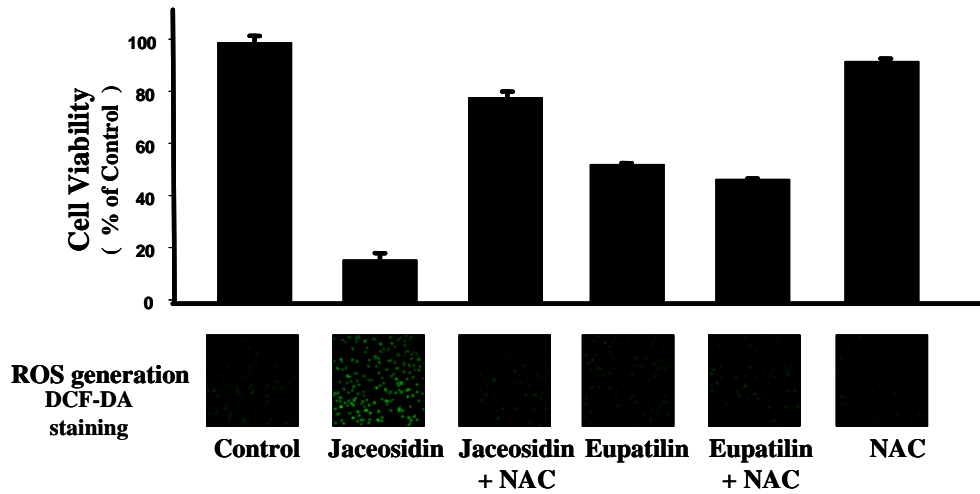


Figure 7. Effects of NAC on Jaceosidine-induced MCF10A-*ras* Cell Death

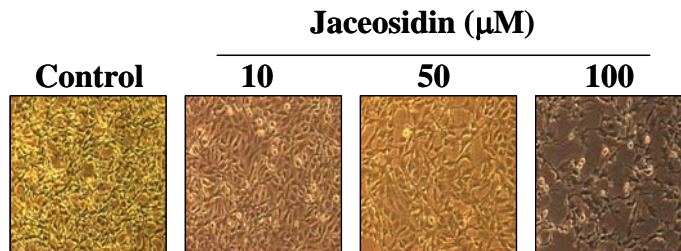
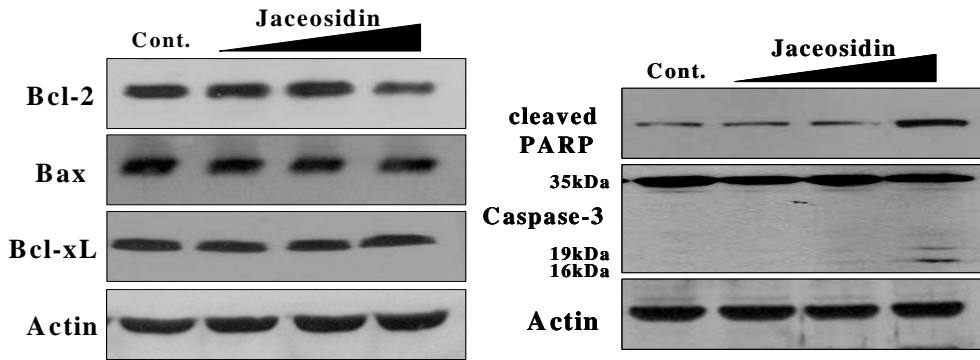


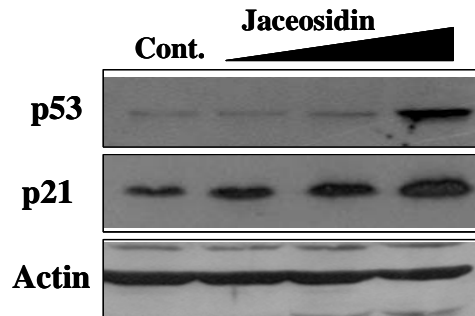
Figure 8. Morphological Changes in Jaceosidin-Treated MCF10A-*ras* Cells

Jaceosidin에 의한 MCF10A-*ras* 세포의 증식 억제 조절기작을 규명하기 위해 세포사멸 및 세포의 생존을 조절하는 단백질들의 발현을 알아보았다. Jaceosidin은 세포 자가 사멸(apoptosis)을 저해하는 Bcl-2의 발현을 감소시켰으나 bcl-xL의 발현에는 차이가 나타나지 않았다. 또한 세포 자가 사멸을 촉진하는 Bax의 발현에도 큰 영향을 주지 않았다. 그러나 아포토시스 관련된 주요지표인 Bcl-2/Bax 비를 감소시킴으로써 미토콘드리아를 매개하는 세포 자가사멸을 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 PARP과 caspase-3의 cleavage를 일으키는 것을 확인하였다 (Figure 9).

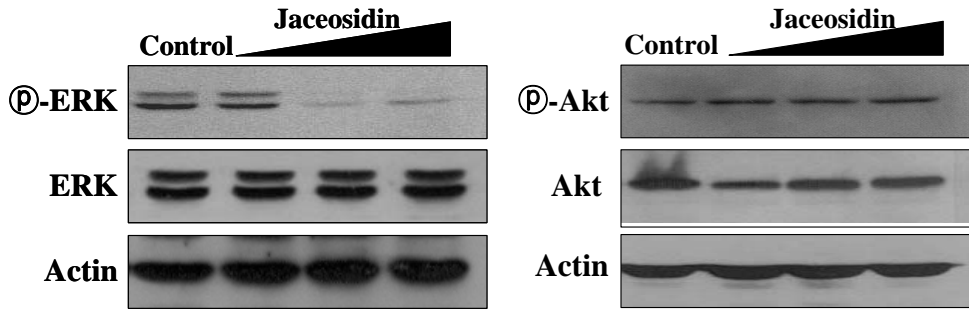


**Figure 9.** Effects of jaceosidin on the expression of the apoptosis markers in MCF10A-*ras* cells.

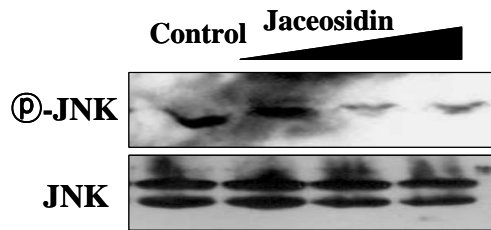
또한 jaceosidin은 ROS에 의한 스트레스 signal로 알려진 p53과 p21의 발현을 증가 시킴으로써 세포증식을 억제하는 것으로 보인다 (Figure 10). 아울러 세포증식과 관련된 ERK/MAPK (extracellular signal-regulated protein kinase mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 저해함으로써 세포의 증식을 억제하는 기작도 관여하는 것으로 사료되나 Akt의 발현에는 영향을 주지 않음을 확인하였다 (Figure 11). JNK는 세포의 생존과 성장을 증가시키며 일부 암세포에서는 매우 활성화되어 있다. Jaceosidin이 MCF10A-*ras* cell에서 세포 사멸을 유도함에 JNK활성의 저해를 수반하는 것으로 보인다 (Figure 12).



**Figure 10.** Effect of jaceosidin on p53 and p21 activation in MCF10A-*ras* cells



**Figure 11.** Effects of jaceosidin on activation of Akt and MAP kinases in MCF10A-*ras* cells



**Figure 12.** Effects of jaceosidin on activation of JNK in MCF10A-*ras* cells

**7. 약쑥 (eupatilin)의 유방암 (MCF10A-*ras*) 세포의 증식억제 활성 및 조절기작**  
 약쑥의 유방암세포에 대한 증식억제 활성 및 관련조절기작을 밝히기 위해 MCF-10A 인간 정상 유방 상피세포에 *ras* 종양유전자를 도입한 MCF-10A-*ras* 세포 주 모델을 이용하였으며 약쑥 추출물의 주요 활성성분인 eupatilin을 유방암 증식억제 활성을 측정하였다. Eupatilin (10, 50, 100  $\mu$ M)은 농도 의존적으로 유방암세포의 증식을 억제하였으며 (Figure 13) eupatilin이 유방암세포의 형태적 특성에 미치는 영향을 관찰한 결과 100  $\mu$ M 처리 시 시간에 따라 유의적으로 세포의 수가 감소하였다 (Figure 14). Eupatilin의 유방암 증식 억제 조절기작을 규명하기 위해 FACS analysis를 이용하여 세포의 주기 변화와 세포사멸의 척도를 보여주는 sub G0기의 변화를 살펴보았다. 그 결과 Sub G0기의 변화는 없었으며 세포 주기 조절에 있어서 G1기에서 S기로 넘어가는 과정에서 세포의 증식이 억제되었다 (Figure 15). 따라서 세포 주기 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 세포 주기 조절 인자들의 발현을 알아

보았다. 그 결과 eupatilin은 cyclin D1, cyclin B1, Cdk2 와 Cdc2의 발현을 저해하였다(Figure 16). 한편, cyclin-dependent kinase (Cdk)의 활성 억제를 담당하는 p53 과 p27의 발현이 증가하였다 (Figure 17). Ras 신호 전달 과정은 cyclin D1의 발현에 있어서 중요한 역할을 한다. MCF10A-ras 세포에서 eupatilin은 ERK1/2의 활성 뿐만 아니라 Ras와 Raf-1의 발현을 저해하였다 (Figure 18). 그러므로 eupatilin이 cyclin D1의 발현 저해효과는 Raf/MEK/ERK 신호전달을 통한 것으로 보인다. 하지만 eupatilin은 세포 생존에 있어서 중요한 역할을 하는 Akt의 활성화에는 변화를 주지 않았다 (Figure 18). 따라서 MCF10A-ras 세포에서 eupatilin의 세포 성장 억제 효과는 주로 ERK1/2활성의 저해를 통한 세포 주기 진행 차단과 관련되는 것으로 보인다. MCF10A-ras 세포에서 eupatilin의 세포 성장 억제 효과는 ERK1/2 활성 저해를 통하여 주기 진행 차단과 관련됨을 MEK 활성 저해제 (U0126)를 통하여 확인하였다 (Figure 19). 뿐만 아니라 cyclin D1의 발현을 조절하는데 있어서 중요한 전사인자로 알려진 AP-1의 활성 또한 eupatilin에 의해서 MCF10A-ras 세포에서 저해됨을 확인할 수 있었다 (Figure 20).

다른 종류의 세포 성장 조절에도 영향을 주는지 알아보기 위하여 인체유방암 세포인 MCF-7 세포 모델을 또한 이용하였다. 그 결과 MCF-7 세포에서 eupatilin (10, 50, 100  $\mu$ M)은 Cdk2의 발현을 억제하는 한편 (Figure 21) cyclin-dependent kinase인 p53, p21의 발현은 증가시켰다 (Figure 22).

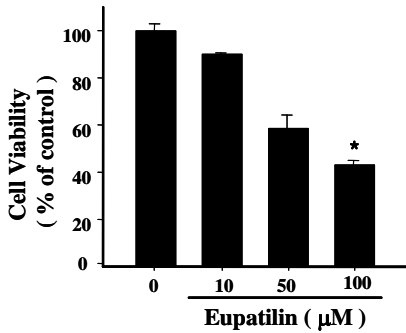


Figure 13. Effects of eupatilin on the proliferation of MCF10A-ras cells(2 day)

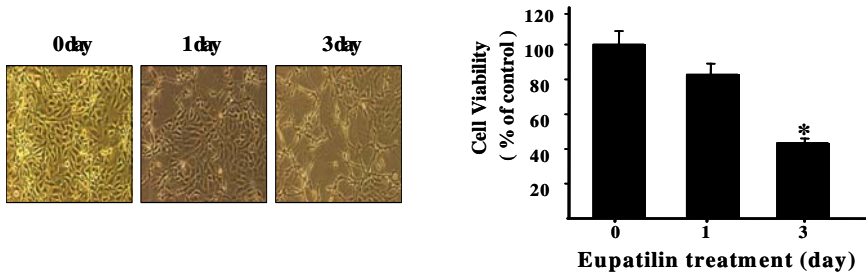


Figure 14. Morphological changes in eupatilin-treated MCF10A-ras cells

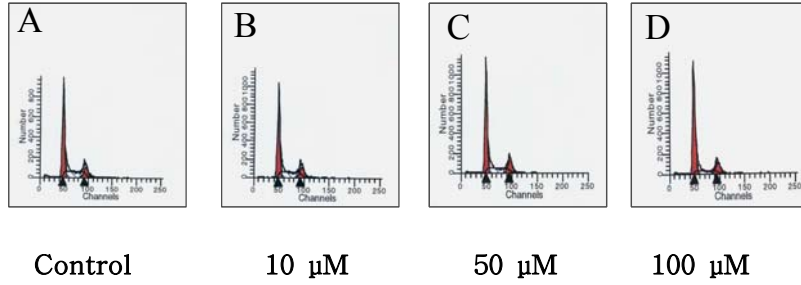


Figure 15. Effects of eupatilin on cell cycle distribution in MCF10A-*ras* cells

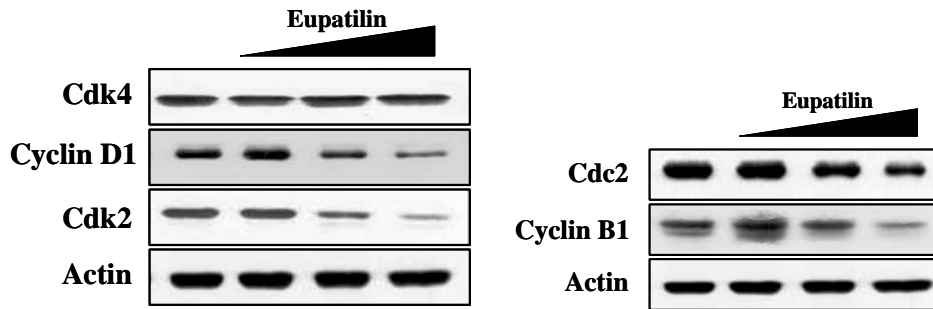


Figure 16. Effects of eupatilin on expression of the selected cell cycle regulators in MCF10A-*ras* cells.

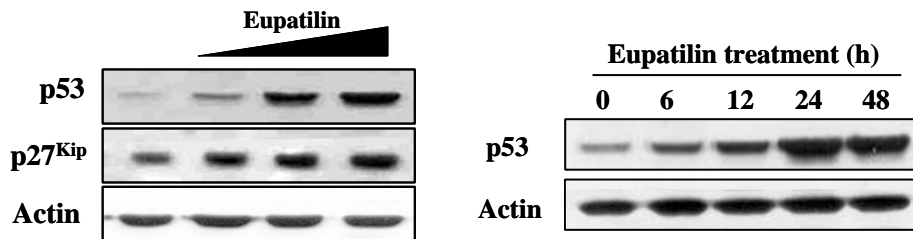
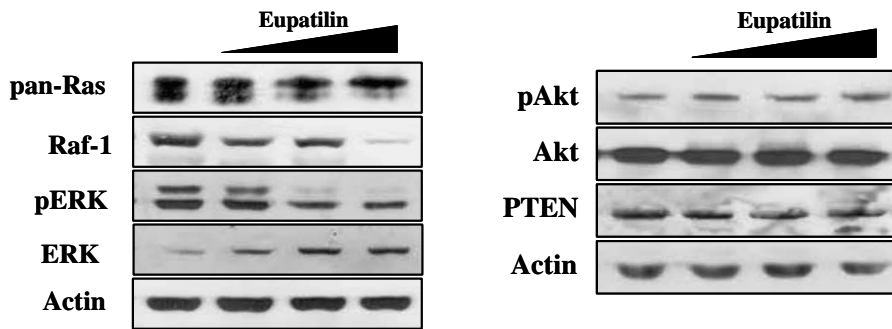
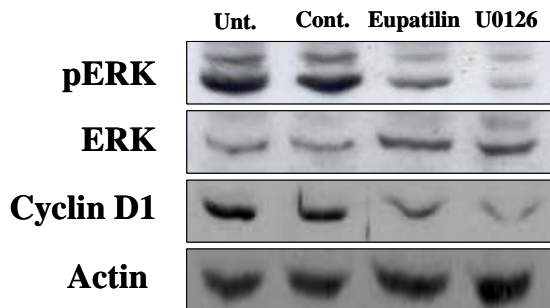


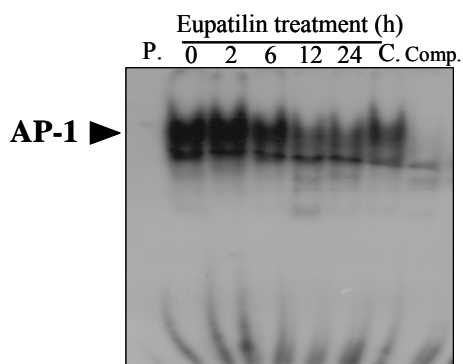
Figure 17. Effects of eupatilin on expression of CKIs in MCF10A-*ras* cells.



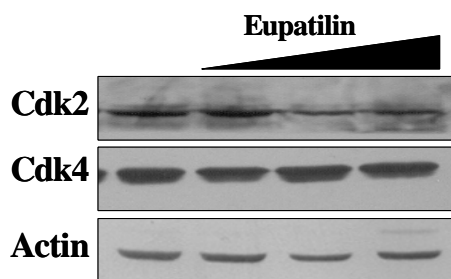
**Figure 18.** Effects of eupatilin on the Ras/Raf/MAPK and PI3K/Akt signaling in MCF10A-*ras* cells.



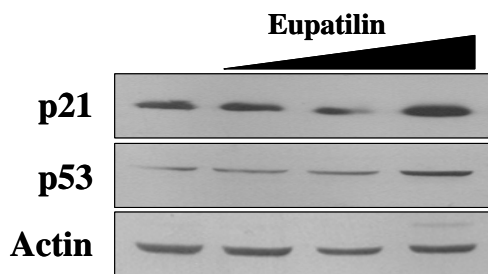
**Figure 19.** Effects of eupatilin on the cyclin D1 expression in MCF10A-*ras* cells.



**Figure 20.** Effects of eupatilin on DNA-binding of AP-1 in MCF10A-*ras* cells.



**Figure 21.** Effects of eupatilin on expression of the selected cell cycle regulators in MCF-7 cells.



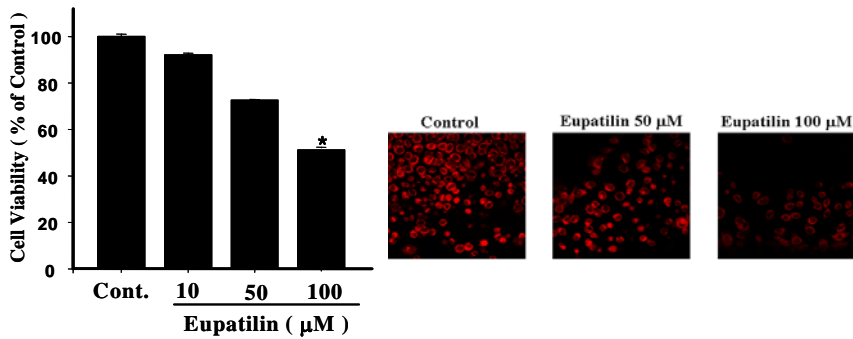
**Figure 22.** Effects of eupatilin on expression of CKIs in MCF-7 cells.

### 8. 약쑥 (eupatilin)의 위암 증식 억제 활성 및 억제 기작

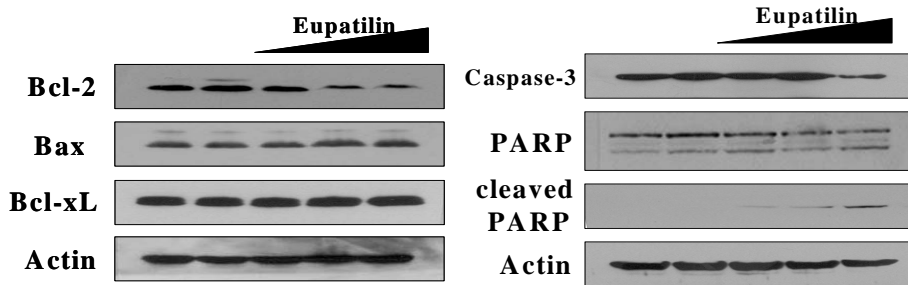
약쑥의 위암세포에 대한 증식억제 활성 및 관련조절기작을 밝히기 위해 AGS 인간 위암세포모델을 이용하여쑥 추출물의 주요 활성성분인 eupatilin을 증식억제 활성을 측정하였다. Eupatilin (10, 50, 100  $\mu$ M)은 AGS 위암 세포의 성장을 농도 의존적으로 하였으며 미토콘리아의 불균형을 가져왔다 (Figure 23). Eupatilin의 위암 증식 억제 대한 세포 사멸 조절 기작을 알아보기 위하여 세포 자가 사멸 및 세포의 생존을 조절하는 Bcl-2, Bax, 그리고 Bcl-xl의 발현을 측정하였다. Eupatilin은 세포 자가 사멸을 저해하는 Bcl-2의 발현을 감소시켰으나 Bcl-xl의 발현에는 차이가 나타나지 않았다. 또한 세포 자가사멸을 촉진하는 Bax의 발현에도 큰 영향을 주지 않았다. 그러나 세포 자가사멸 관련된 주요지표인 Bcl-2/Bax 비를 감소시킴으로써 미토콘드리아를 매개하는 세포 자가사멸을 촉진하는 것으로 나타났을 뿐만 아니라 caspase-3와 PARP의 cleavage를 일으키는 것을 확인하였다 (Figure 24). 또한 eupatilin은 Bcl-2와 Bax의 발현을 조절하는 상위 조절물질인 p53의 발현을 증가시킴으로써



Bcl-2의 발현을 감소시키는 것으로 나타났으며 동시에 세포주기에 관련된 p21의 발현을 증가시켜 세포주기 조절을 저해함으로써 부분적으로 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다(Figure 25). 이에 더하여 세포증식과 관련된 ERK/MAPK (extracellular signal-regulated protein kinase mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 저해함으로써 세포의 증식을 억제하는 것으로 보였으며 Akt 신호전달은 세포 생존에 있어서 중요한 타겟으로서 세포 성장을 촉진하는데, eupatilin은 이를 저해하는 것을 확인하였다 (Figure 26).



**Figure 23.** Effects of eupatilin on cell viability and mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\Psi_m$ ) in AGS cells.



**Figure 24.** Effects of eupatilin on the expression of the apoptosis markers in AGS cells.

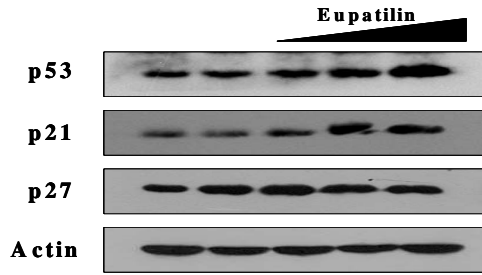


Figure 25. Effects of eupatilin on the expression of p53 and p21 in AGS cells.

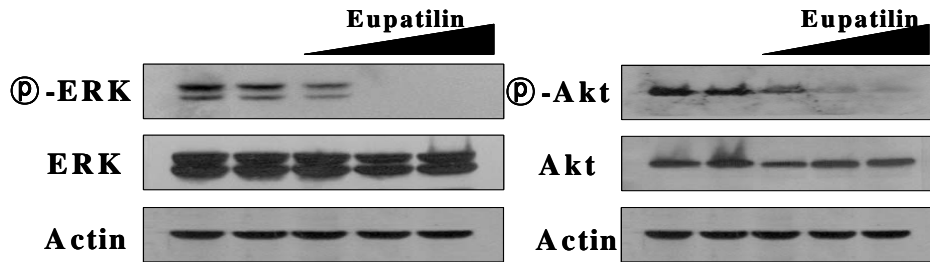
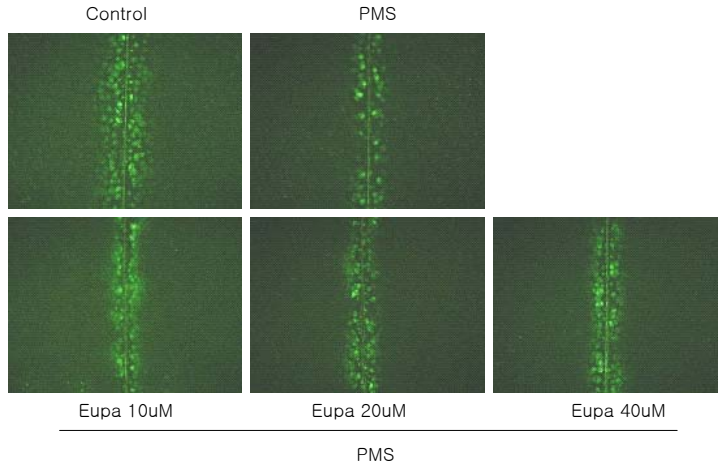


Figure 26. Effects of eupatilin on the expression and phosphorylation of ERK and Akt.

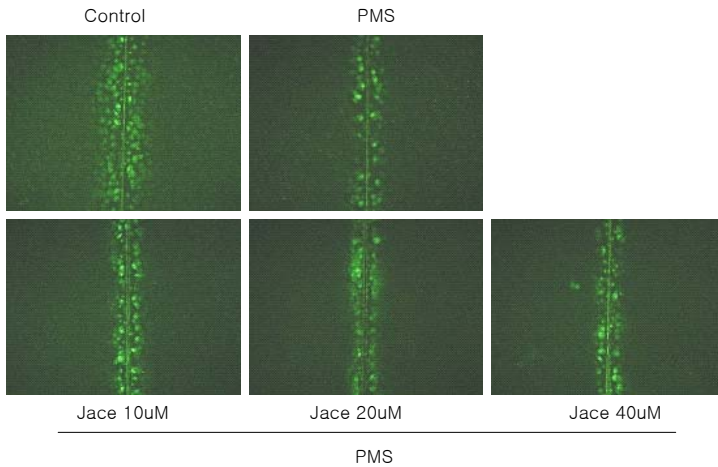
### 9. 약쑥의 세포간 정보전달(Gap junctional intercellular communication, GJIC)의 저해를 회복하는 작용기작 연구

약쑥이 세포간 신호전달 (GJIC)을 조절하는 활성을 규명하기 위해 약쑥의 대표적인 생리활성 성분인 eupatilin (Eupa), jaceosidin (Jace), 그리고 TMH flavone (TMH)을 이용하여 활성산소 생성물질인 PMS로 억제된 쥐 간 정상세포의 세포간 신호전달에 대한 조절 효과를 규명하였다. Eupatilin은 농도 의존적으로 PMS로 억제된 GJIC을 회복하였으며 (Figure 27), jaceosidin (Figure 28), TMH flavone (Figure 29) 역시 PMS로 억제된 GJIC를 회복하였으나 농도 의존적인 경향은 나타나지 않았다. 이러한 약쑥 생리활성성분에 의한 GJIC 조절활성을 규명하기 위해 GJIC 구성단백질인 connexin-43의 과인산화에 미치는 영향을 측정된 결과 PMS는 connexin-43의 과인산화를 유도하였으며, eupatilin (Figure 30)과 TMH flavone (Figure 31)은 과인산화된 connexin-43을 탈인산화시키는 것으로 나타났으나 jacosidin은 connexin-43 과인산화에 대한 저해활성이 없는 것으로 나타났다 (Figure 30). Connexin-43의 과인산화는 ERK를 비롯한 다양한 protein kinase 에 의해 조절되므로 약쑥 생리활성 성분이 ERK/MAPK의 활성화에 미치는 영향을 측정하였으나 그 인산화된 ERK/MAPK를 억제하는 활성은 나타나지 않았다 (Figure 32). 약쑥 생리활성성분에 의한 GJIC 조절활성이 PMS에 의해 증가된 세포내 활성산소의 농도를 조절하는 활성성분에 의한 것인지 알아본 결과

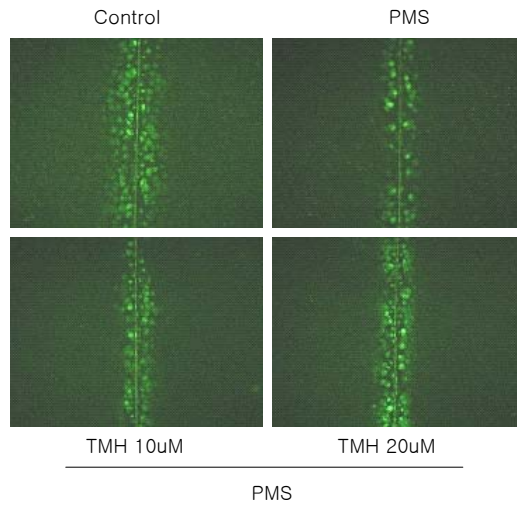
eupatilin은 농도의존적으로 세포내 활성산소를 감소시켰다 (Figure 33). 따라서 약속 생리활성 성분은 세포내 증가된 ROS에 의해 과 인산화된 connexin-43의 탈인산화를 통해 억제된 GJIC를 회복시키는 것으로 나타났다.



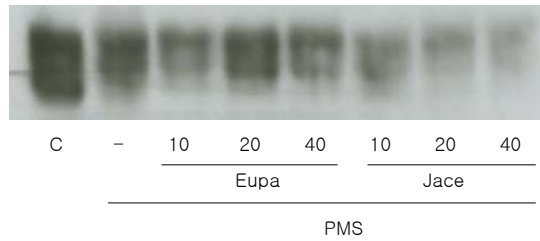
**Figure 27.** Effect of eupatilin on GJIC inhibition by PMS in rat liver epithelial cells



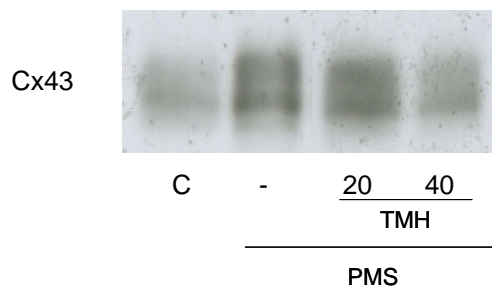
**Figure 28.** Effect of jaceosidin on GJIC inhibition by PMS in rat liver epithelial cells



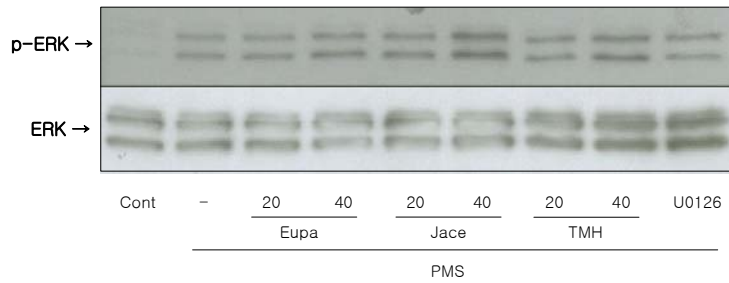
**Figure 29.** Effect of TMH flavone on GJIC inhibition by PMS in rat liver epithelial cells



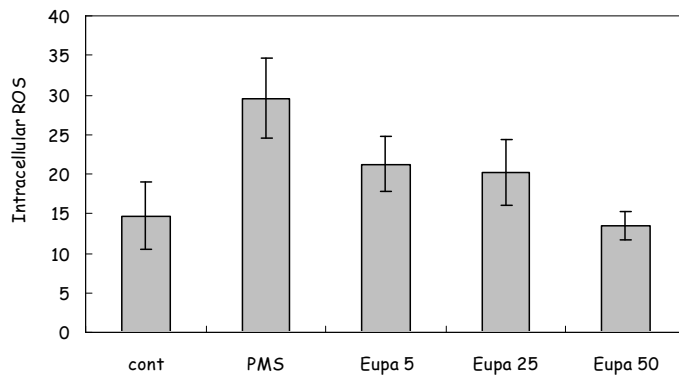
**Figure 30.** Effect of eupatilin and jaceosidin on hyper-phosphorylation of connexin-43 by PMS in rat liver epithelial cells



**Figure 31.** Effect of TMH flavone on hyper-phosphorylation of connexin-43 by PMS in rat liver epithelial cells



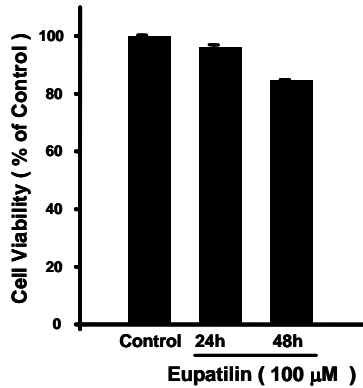
**Figure 32.** Effect of eupatilin, jaceosidin, and TMH flavone on phosphorylation of ERK by PMS in rat liver epithelial cells



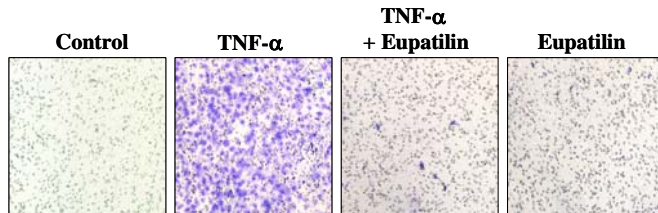
**Figure 33.** Effect of eupatilin on increased intracellular ROS in rat liver epithelial cells

**10. 인체유방상피(MCF-10A)세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 전이에 있어서 약썩 추출물의 억제 효과 및 조절기작**

암세포의 침윤에서 중요한 hydrolase인 urokinase plasminogen activator(uPA)는 기저막과 세포외 기질의 분해를 촉진한다. uPA는 유방, 난소, 전립선, 위장관계암등 대부분의 침윤성 암에서 과발현되고 전이에 필수적인 역할을 한다. 따라서 암세포가 전이하려면 반드시 (uPA)라는 효소가 필요하기 때문에 이 효소를 차단하면 암세포 전이를 막을 수 있다. 본 실험에서는 인체유방상피(MCF-10A)세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 전이와 관련하여 uPA의 조절 기작에 있어서 약썩 추출물, eupatilin의 저해 효과에 대하여 알아보았다. 본 실험에 앞서 eupatilin의 세포독성을 살펴보기 위하여 세포의 생존률을 측정할 수 있는 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, eupatilin 100  $\mu$ M을 처리하였을 때, 48시간까지도 세포의 생존률에는 크게 영향을 미치지 않아 세포독성이 유도되지 않음을 확인하였다 (Figure 34). 인체유방상피(MCF-10A)세포에서 20ng/ml의 TNF- $\alpha$ 에 의해 48시간 후에 유도된 세포의 침윤성이 100  $\mu$ M의 eupatilin에 의해서 저해되는 것을 확인하였다 (Figure 35).

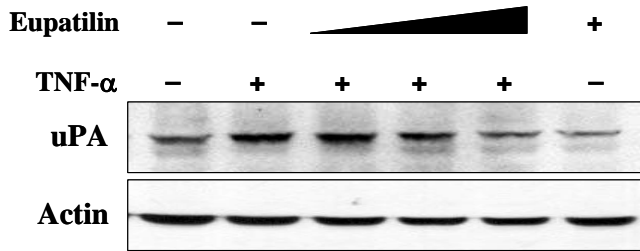


**Figure 34.** Effects of eupatilin on cell viability of MCF10A cells



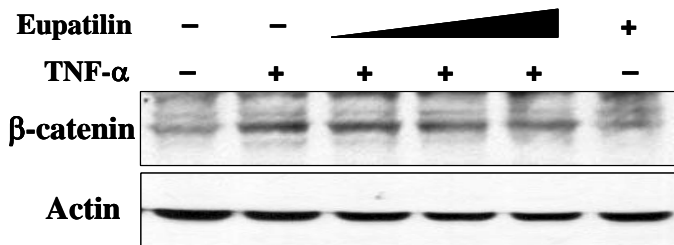
**Figure 35.** Effects of eupatilin on invasiveness of MCF10A cells treated with TNF- $\alpha$ .

뿐만 아니라, 위에서 언급한 바와 같이 invasiveness, metastasis에서 중요한 역할을 하는 uPA의 발현에 eupatilin의 효과를 알아본 결과, MCF-10A세포에 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 uPA의 단백질 발현이 eupatilin에 의해서 저해되는 것을 확인하였다 (Figure 36).



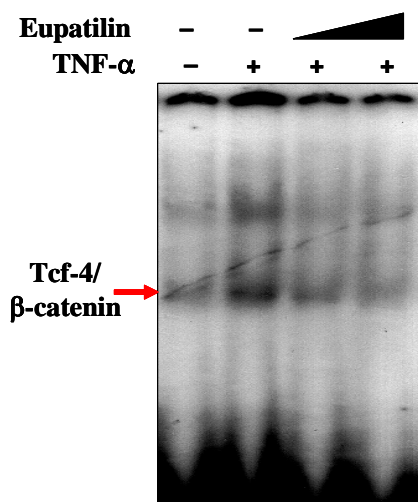
**Figure 36.** Effects of eupatilin on TNF- $\alpha$ -induced uPA expression in MCF-10A cells

$\beta$ -catenin은 항염증 물질을 이용한 암 예방에서 또 하나의 중요한 분자지표이다. 다양한 생리 기능을 갖는  $\beta$ -catenin은 cell-cell adhesion machinery의 구성 단백질로 작용한다. 즉  $\beta$ -catenin은 E-cadherin의 cytosolic tail과 actin filaments와 결합해서 cytoskeleton을 형성한다. 또한  $\beta$ -catenin은 진화과정에서 보존되어온 Wnt signalling pathway에도 연루되어 있으며, 각 기관에서의 발생과정에도 밀접히 관련되어 있다. 한편 전사인자로도 작용하며,  $\beta$ -catenin의 핵 내 이동은 다양한 인체암과도 관련되어 있다. 이에 따라 MCF-10A세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한  $\beta$ -catenin의 발현과 핵 내 이동 정도에 대한 eupatilin의 효과를 알아보았을 때, TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는  $\beta$ -catenin의 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 37).



**Figure 37.** Effects of eupatilin on TNF- $\alpha$ -induced  $\beta$ -catenin expression in MCF-10A cells

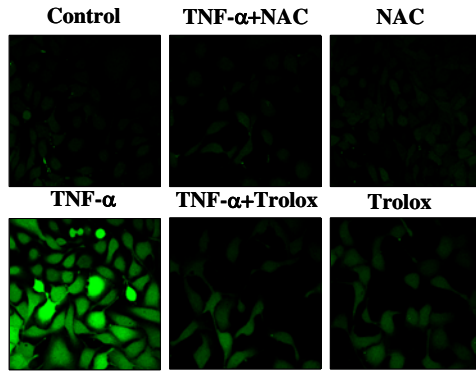
본래  $\beta$ -catenin은 세포부착 물질인 cadherin과 세포 내 골격을 유지하는 actin을 연결하는 structural adaptor protein이지만, 핵 내로 들어가 Tcf/Lef 전사인자와 결합하여 유전자 전사의 기능을 하기도 한다. 즉,  $\beta$ -catenin은 Tcf/Lef로부터 핵 보조억제물질(co-repressor)을 이동시켜 세포주기진행이나 생존에 관여하는 유전자의 발현을 촉진하고 E-cadherin과 관련된 유전자의 발현을 억제시키거나 다른 전사인자와 상호작용을 하기도 한다. 이에 따라 MCF-10A세포에 TNF- $\alpha$ 를 처리 시, 핵 내로의 이동이 증가한  $\beta$ -catenin이 Tcf와의 결합이 eupatilin에 의한 효과를 알아본 결과 Tcf4와 결합하여 DNA-binding activity가 증가하는 것이 저해되는 것을 확인하였다 (Figure 38).



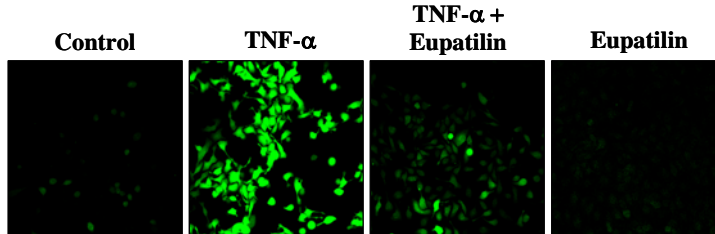
**Figure 38.** Effects of eupatilin on TNF- $\alpha$ -induced Tcf-4 DNA binding activity in MCF -10A cells

TNF- $\alpha$ 는 세포 내 활성 산소 종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 축적한다고 알려져 있다. 그렇다면 TNF- $\alpha$ 에 의한 MCF-10A세포의 전이 효과가 ROS를 통한 것인지 알아보려고 DCF-DA staining을 통하여 ROS의 형성 정도를 알아보았다. 그 결과 TNF- $\alpha$ 에 의해서 MCF-10A 세포에서 ROS가 형성되는 것을 확인하였고 ROS scavenger인 NAC (N-acetylcysteine)과 trolox를 사용하여 저해되는 것을 확인하였다 (Figure 39). 이러한 결과를 바탕으로 eupatilin 또한 같은 조건에서 MCF-10A 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해서 유도된 ROS의 생성을 저해하는지 알아본 결과 현저하게 저해되는 것을 보았다 (Figure 40).





**Figure 39.** TNF- $\alpha$ -induced intracellular ROS accumulation in MCF-10A cells



**Figure 40.** Effect of eupatilin on TNF- $\alpha$ -induced intracellular ROS accumulation in MCF-10A cells

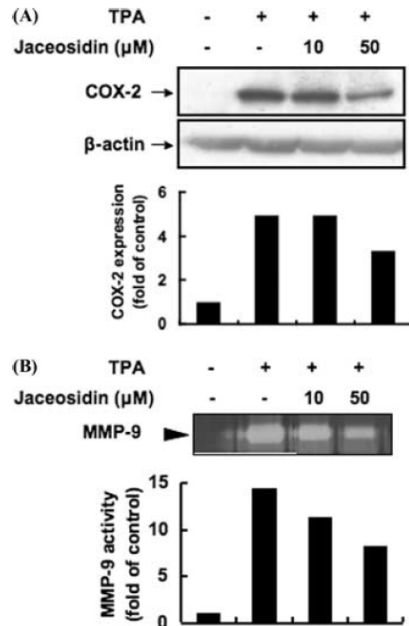
따라서 이와 같은 일련의 과정을 통해 볼 때, eupatilin은 MCF-10A 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 전이에 대한 억제 효과를 가지고 있으며 이는 ROS형성과  $\beta$ -catenin 및 uPA 발현 저해를 통한 것으로 보인다.

### 11. 약썩의 유방암 세포에 대한 이동 및 전이 억제활성 탐색

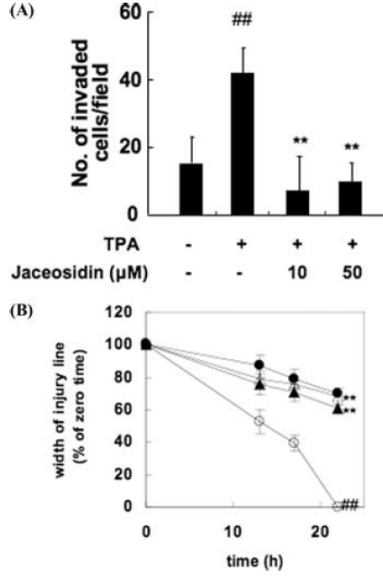
인간 정상 유방세포인 MCF-10A 세포에서 50nM TPA 처리시 COX-2 발현이 4시간에서 최대로 발현 되는것을 확인하였다(data not shown). 이에 jaceosidin과 TPA를 동시처리하였을때 TPA에 의해 유도된 COX-2의 과 발현이 jaceosidin에 의해 농도 의존적으로 저해 되는 것을 확인하였다 (Figure 41A). 최근 연구보고에서 유방암의 촉진과 진행단계에 있어서 MMPs가 중요한 역할을 한다는 것이 제시되고 있다. 따라서 MCF-10A 세포에서 TPA 처리시 MMP-9의 활성이 상당히 증가 된 것을 관찰 할 수 있었고, 이를 jaceosidin이 농도 의존적으로 감소시켰다 (Figure 41B). 또한

TPA 처리시 인간 유방 정상세포의 침윤과 이동능력이 현저히 증가되는 것을 관찰할 수 있었으므로 TPA에 의한 COX-2 발현과 MMP-9 활성의 증가는 유방정상세포가 암화되어 전이에 필수 요건인 침윤과 이동능력을 획득하는데에 기여 한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 TPA를 처리한 MCF-10A의 침윤과 이동능을 jaceosidin이 감소시킴을 확인하였다 (Figure 42A,B).

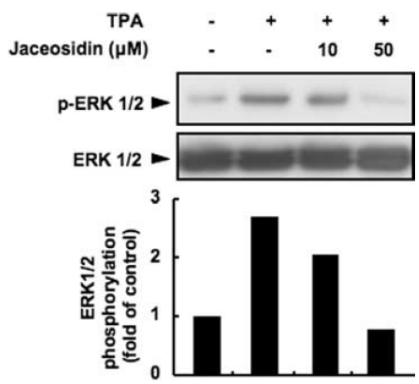
COX-2 발현과 MMPs 활성 증가와 같은 다양한 세포 반응들은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 의해 중요하게 조절된다고 널리 알려져 있으며, 이전 연구에서 TPA에 의해 유도된 COX-2발현과 MMP-9 활성 증가는 ERK의 상위 신호 전달 단백질인 MEK의 저해제로 알려진 U0126 처리시 저해 되었으며 또한 TPA에 의해 증가된 MCF-10A 세포의 침윤과 이동능도 현저히 저해 시키는 결과를 얻어 이를 통해 TPA에 의한 COX-2 발현, MMP-9 활성, 침윤과 이동능의 증가는 ERK 신호전달 경로를 경유함을 알 수 있었다. 이에 jaceosidin이 ERK의 활성화를 줄임을 확인함으로써 jaceosidin의 COX-2 발현, MMP-9 활성, 침윤과 이동능력의 저해는 ERK 신호전달 경로의 활성 저해를 통해 이루어짐을 증명하였다 (Figure 43).



**Figure 41.** Effects of jaceosidin on TPA-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 in MCF 10A cells.



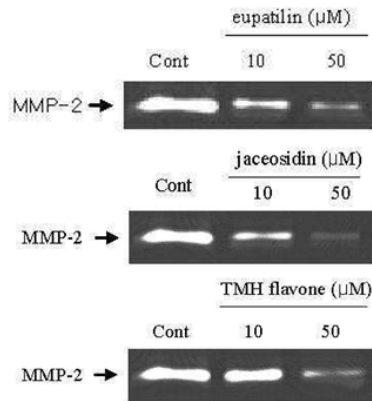
**Figure 42.** Effects of jaceosidin on the TPA-induced invasive and migrative phenotypes in MCF10A cells.



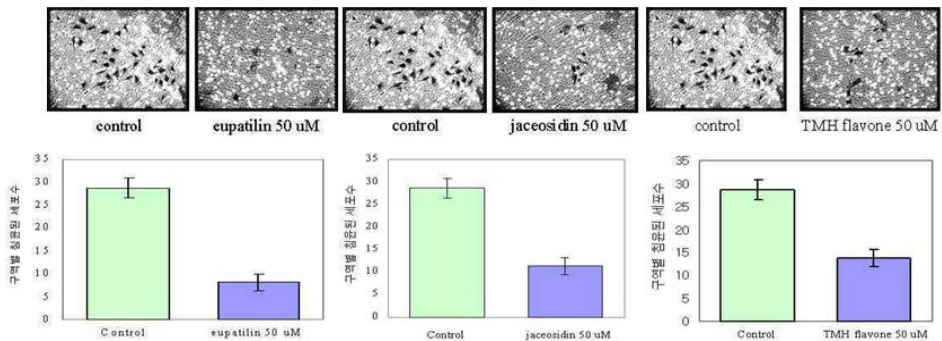
**Figure 43.** Jaceosidin inhibited the TPA-induced phosphorylation of ERK-1 and -2 in MCF10A cells.

약쑥의 플라보노이드 세가지의 유방암세포에 대한 항전이 활성 및 관련 조절기작을 밝히기 위해 또 다른 유방암 모델인 MCF-10A 인체 유방상피세포에 ras 종양유전자를 도입한 MCF-10A-ras 세포 주 모델을 이용하였다. MMPs는 zinc-dependent proteinases로써 세포외 기질과 기저막을 분해시킴으로써 암세포가 다른 조직으로 전이를 일으키는데 필수적인 효소이다. 특히 MCF-10A-ras 세포주에서는 MMP-2 활성이 전이와 밀접히 관련되어 있으며 따라서 약쑥의 플라보노이드인 eupatilin,

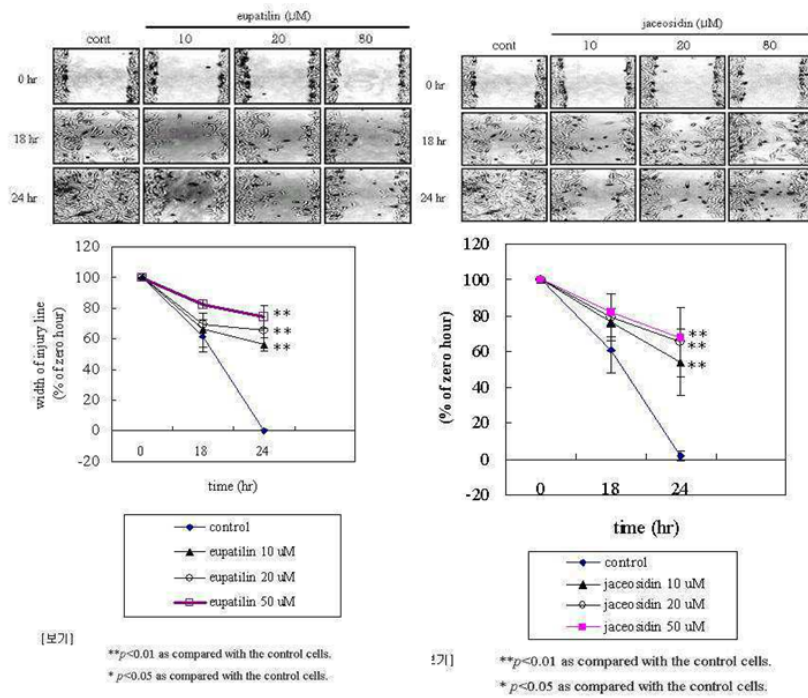
jaceosidin, TMH flavone의 MMP-2 저해 활성을 확인하였다. Eupatilin과 jaceosidin은 10, 50  $\mu\text{M}$  처리시 농도 의존적으로 MMP-2 활성을 현저히 감소시키는 것을 확인하였고 TMH flavone은 50  $\mu\text{M}$ 에서 MMP-2 활성을 저해하였다 (Figure 44). 또한 전이능력을 가진 암세포는 기저막을 통과하는 능력인 침윤성과 혈관을 통해 목적 세포로의 이동에 관여하는 이동성을 가진다. 따라서 이러한 침윤과 이동성을 약속 플라보노이드가 저해하는지 확인한 결과 eupatilin, jaceosidin, TMH flavone 모두 처리 농도인 10, 20, 50  $\mu\text{M}$  모두에서 유의적으로 이동성을 저해시켰으며 (Figure 45), 세 가지 시료 모두 50  $\mu\text{M}$ 에서 침윤성 또한 현저히 저해 시켰다(Figure 46). 따라서 eupatilin, jaceosidin, TMH flavone은 전이에 관련되는 침윤성, 이동성, 그리고 이에 중요하게 관여하는 효소인 MMPs의 활성을 억제함으로써 유방암 전이를 저해하는 식물유래 성분으로써 제시 될 수 있음을 증명하였다.



**Figure 44.** Effect of eupatilin, jaceosidin and TMH flavone on MMP-2 activity in MCF-10A-*ras* cell line



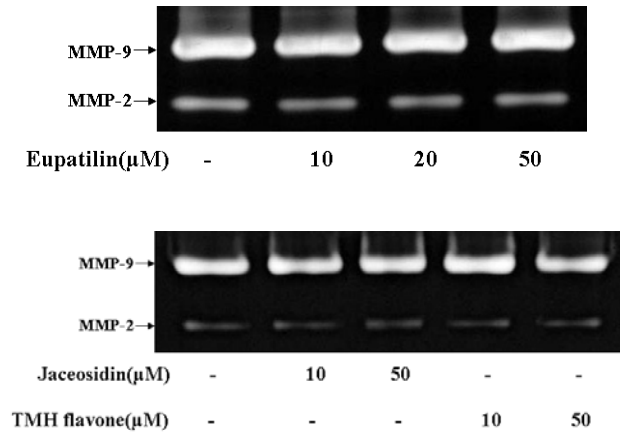
**Figure 45.** Effect of eupatilin, jaceosidin and TMH flavone on migrative phenotype of MCF-10A-*ras* cells



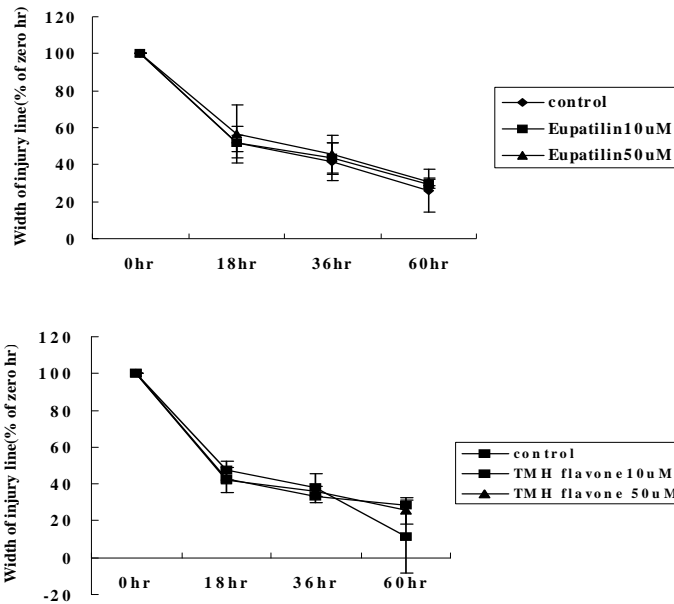
**Figure 46.** Effect of eupatilin, jaceosidin and TMH flavone on invasive phenotype of MCF-10A-*ras* cells.

## 12. 간암 세포주 모델에서 약쑥의 전이 억제 효과

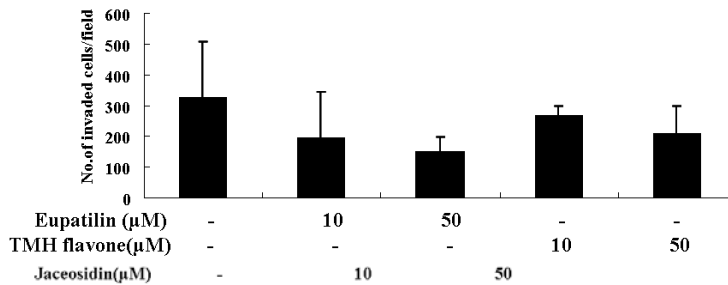
약쑥의 생리활성 성분들이 간암세포의 전이 및 축진에 대한 효과를 확인하기 위해 암의 진행 및 축진에 중요한 역할을 하는 MMP2/9의 활성과 침윤성, 이동성에 대한 실험을 수행하였다. 그 결과 eupatilin, jaceosidin, TMH flavone 은 MMP2/9의 활성과 간암세포의 이동성을 저해하지 못하였으나 (figure 47, 48) jaceosidin은 간암세포의 침윤성을 저해함으로써 전이 억제 가능성 제시해 주었다 (figure 49).



**Figure 47.** Effect of eupatilin, jaceosidin and TMH flavone on MMPs activity in SK-HEP-1 cell line



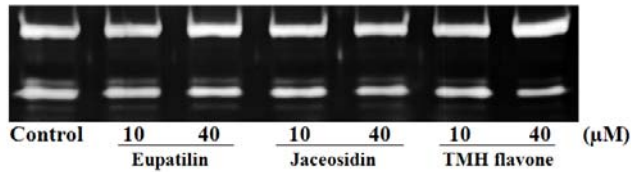
**Figure 48.** Effect of eupatilin, jaceosidin and TMH flavone on migration in SK-HEP-1 cell line



**Figure 49.** Effect of eupatilin, jaceosidin and TMH flavone on invasion in SK-HEP-1 cell line

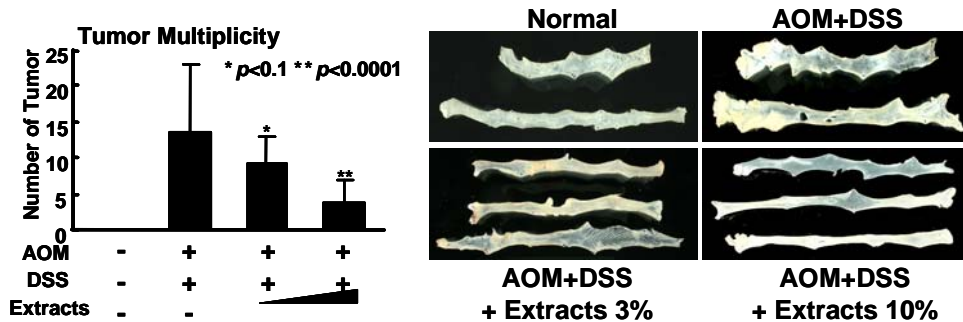
### 13. 위장관 동물모델에서 약쑥 추출물의 발암 억제 효과 및 조절기작

쥐 대장암 세포주인 CT-26 cell line에서 전이의 주요 지표인 MMP9 활성화에 대한 약쑥 플라보노이드의 저해 능이 나타나지 않았으며 (Figure 50) Balb/c mouse에 CT-26 세포를 미정맥 주사하여 폐 전이를 유도하는 *in vivo* 전이 모델로의 적용을 진행하지 않았다.



**Figure 50.** Effect of eupatilin, jaceosidin, and TMH flavone on MMPs activity in CT-26 murine colon cell line

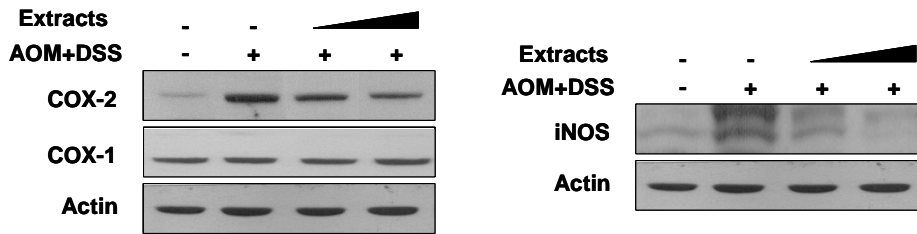
추가적으로 AOM과 DSS로 유도한 대장암 증식 *in vivo* 모델에서 약쑥 추출물이 지니는 종양 증식 억제 효과를 알아보려고 하였다. 발암물질인 azoxymethane (AOM)과 염증유발물질인 dextran sulfate sodium (DSS)를 처리한 결과 염증의 유발이 대장암 발생 과정을 promotion한다고 알려져 있다. 따라서 약쑥 추출물의 종양 증식 억제 효과를 측정된 결과 약쑥 추출물을 DSS 투여 시부터 15주간 지속적으로 사료를 공급한 후 16주 이후에 적출한 colon 조직에서 polyp의 수가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 51).



**Figure 51.** Effects of *Artemisia asiatica* Nakai extracts on mouse colon cancer formation induced by AOM plus DSS

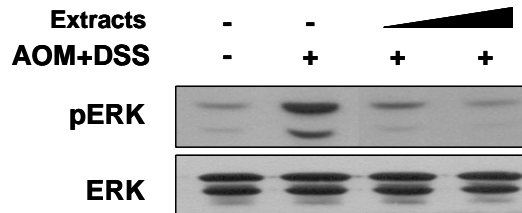
이에 대한 기작을 규명하기 위하여 대표적인 염증인자인 COX-2와 iNOS의 발현을 확인해본 결과, AOM과 DSS 처리에 의해 유도된 COX-2의 단백질 발현이 약쑥 추출물에 의해 감소하였으며 COX-1의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 또한 iNOS의 발현 또한 용량 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 52).





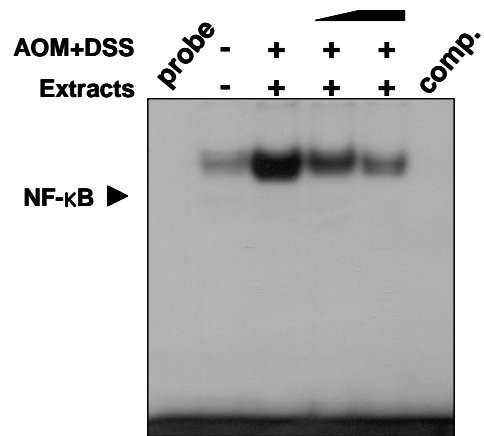
**Figure 52.** Inhibitory effects of *Artemisia asiatica* Nakai extracts on expression of COX-2 and iNOS in mouse colon cancer formation induced by AOM plus DSS

COX-2의 발현은 다양한 상위 인산화 효소에 의하여 조절된다고 알려져 있다. 특히, mitogen-activated protein kinase (MAPKs)가 COX-2 발현을 조절한다고 알려져 있는데, 대표적인 MAPKs에는 ERK, JNK, p38 MAPK가 있다. 그 중 COX-2의 발현과 관련하여 가장 보고가 많이 되어 있는 ERK의 활성화에 대한 약쭉추출물의 효과를 살펴보았다. 그 결과 대장암 모델에서 AOM과 DSS에 의해 ERK가 인산화가 유도됨을 확인하였고, 약쭉 추출물 처리 시, ERK의 인산화를 저해하는 것을 확인하였다 (Figure 53).



**Figure 53.** Inhibitory effects of *Artemisia asiatica* Nakai extracts on ERK phosphorylation in mouse colon cancer formation induced by AOM plus DSS

COX-2와 같이 염증 및 발암과정에 중요한 단백질들은 세포내 신호전달 체계에 의해 그 신호들이 전달되고 이것은 전사과정을 통해 최종적으로 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. 염증 반응을 매개하는 COX-2의 전사과정을 조절하는 대표적 전사인자로는 NF-kappaB가 알려져 있다. 이에 따라 NF-kB에 대한 약쭉 추출물의 영향을 살펴보았을 때, 대장암 모델에서 AOM과 DSS에 의하여 증가된 NF-kB의 DNA binding activity가 약쭉 추출물에 의해서 용량 의존적으로 감소하는 것을 관찰하였다 (Figure 54). 따라서 이와 같은 일련의 결과를 볼 때, AOM과 DSS에 의해 유도된 colon 발암 모델에서 약쭉 추출물은 COX-2와 iNOS의 발현 저해를 통하여 염증 작용을 억제하며 이에 ERK와 NF-kB의 활성 억제가 관여하는 것으로 보인다.



**Figure 54.** Inhibitory effects of *Artemisia asiatica* Nakai extracts on NF-κB DNA binding activity in mouse colon cancer formation induced by AOM plus DSS.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연도별 연구평가의 착안점

구 분	평가 착안점	척도 (점수)
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약쑥 추출물의 <i>in vitro</i> 항산화, 항염증 활성 탐색               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 약쑥의 추출법 확립, 추출물 제조, 추출물의 총 페놀 함량 측정</li> <li>- 약쑥 추출물의 <i>in vitro</i> 항산화, 항염증 활성 검색</li> </ul> </li> <li>○ 인체유방암세포와 간암세포에 대한 약쑥 추출물의 세포증식 억제 및 항염증 효과 탐색               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 약쑥 추출물의 SK-HEP-1 간암세포 증식 억제 효과 탐색 (20)</li> <li>- MCF10A-ras 유방암 세포 증식 억제 효과 검색 (20)</li> <li>- MCF10A-ras COX-2 발현 억제 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과 검색 (20)</li> </ul> </li> </ul>	40 (10) (30)  60  (20) (20) (20)
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약쑥 추출물의 간암과 유방암세포에 대한 사멸 기작 및 효과.               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 약쑥 추출물의 간암세포, 유방암세포 사멸 기작 및 효과 (20)</li> <li>- FACS (flow cytometric cell analysis) 방법으로 약쑥 추출물의 세포주기 조절 효과 탐색 (10)</li> <li>- 약쑥추출물의 cyclin과 cyclin-dependent kinases (Cdk2, Cdk4) 발현 억제효과 탐색 (15)</li> <li>- 약쑥추출물의 Cdk inhibitor 단백질 p21<sup>waf</sup> 와 p53 발현 증가 효과 탐색 (15)</li> </ul> </li> <li>○ 약쑥 추출물의 유방암 및 간암세포 세포내 신호전달 회복효과               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 약쑥 추출물의 간세포 꺾정선 신호전달 회복활성 탐색 - 산화적 손상에 민감한 전사인자 조절기작 탐색 (20)</li> </ul> </li> </ul>	60 (20) (10)  (15)  (15)  40 (20) (20)

3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약쭈 추출물의 간암과 유방암세포에 대한 이동 및 전이 억제 활성 탐색</li> <li>- 약쭈 추출물의 간암과 유방암세포에 대한 MMP 억제활성 탐색</li> <li>- 약쭈 추출물의 간암과 유방암세포에 대한 이동 억제활성 탐색</li> <li>- 약쭈 추출물의 간암과 유방암세포에 대한 전이 억제활성 탐색</li> <li>○ <i>In vivo</i> 동물모델을 이용한 약쭈 추출물의 암전이 억제활성 탐색</li> <li>- Melanoma cancer cell을 tail vain injection 하여 lung metastasis를 유도한 B16-F10 실험동물모델에서 약쭈 추출물의 암전이 억제 효과 탐색</li> <li>○ 약쭈의 암예방 식품 소재의 산업적 응용을 위한 유효 성분의 효율적인 분리, 정제, 생산 기술 확립</li> </ul>	<p>45 (15) (15) (15) 40 (40)  (15)</p>
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약쭈 추출물의 제조 및 추출물의 항산화, 항염증 활성 탐색</li> <li>○ 약쭈 추출물의 간암과 유방암세포의 세포사멸 유도 기작 및 효과 탐색</li> <li>○ 약쭈 추출물의 간암과 유방암 <i>in vitro</i> 모델과 <i>in vivo</i> 동물 모델에서의 암전이 억제 활성 탐색</li> <li>○ 약쭈를 이용한 암예방 식품 소재개발 기술 확립</li> </ul>	<p>30 30 30 10</p>

## 2. 연구개발 목표에 대한 달성도

	목 표	도출된 결과	달성도 (%)
1차 년도 (2004)	약쑥 추출물의 <i>in vitro</i> 항산화, 항염증 활성 탐색	- 약쑥 추출물은 1 g의 추출물 당 14.54 mg의 gallic acid에 해당하는 페놀성 화합물을 포함하고 있으며 농도의존적인 DPPH 라디칼에 대한 소거능 확인함으로써 약쑥의 항산화, 항염증 활성을 검색함	100
	약쑥 추출물의 인간 유방암세포와 간암세포에 대한 약쑥 추출물의 세포증식 억제 및 항염증 효과 탐색	- 쥐의 간 정상세포에 종양유전자인 ras를 도입하여 암화를 유도한 WB-F344-ras 세포 주 모델에서 과도한 염증반응과 세포증식에 관여하는 생화학적 지표인 cyclooxygenase-2(COX-2) 발현을 약쑥추출물이 저해하였음 - 인체유방상피세포에 ras 종양 유전자를 도입하여 암화를 유도한 MCF10A-ras세포에서 약쑥 추출물인 jaceosidin에 의해서 능동적 세포사멸이 유도되는 것을 확인하고 이에 대한 기작을 규명하였음. - 인체유방정상상피세포인 MCF10A에서 약쑥 추출물에 의해서 암 촉진제인 TPA에 의해서 유도된 COX-2의 발현이 저해되는 것을 확인하고 MCF10A-ras세포에서 COX-2의 발현이 저해되는 것을 확인하였음.	100

2차 년도 (2005)	약쭉 추출물의 유방암과 간암 세포에 대한 사멸 기작 및 효과 탐색	- 인체유방상피세포에 ras 종양 유전자를 도입하여 암화를 유도한 MCF10A- <i>ras</i> 세포와 유방암 세포인 MCF-7세포에서 약쭉 추출물인 eupatilin에 의해서 세포주기에 변화를 줌으로써 세포 성장을 억제하는 것을 확인하고 이에 대한 기작을 규명하였음.	100
	약쭉 추출물의 간암과 유방암 세포에 대한 세포 간 신호전달 조절 활성 탐색	- 쥐 간 정상세포인 WB-F344 세포 주에서 약쭉의 생리활성 성분인 Eupatilin, Jaceosidin, TMH flavone이 지속인 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 생성물질인 PMS에 의해 억제된 세포 간 신호전달의 회복효과를 확인하고 이에 대한 메커니즘을 규명하였음.	100
3차 년도 (2006)	약쭉 추출물의 간암세포, 유방암세포에 대한 이동 및 전이 억제활성 탐색	- 인간 간암 세포인 SK-Hep-1 세포에서 약쭉에 함유된 플라보노이드인 Jaceosidin의 암 세포의 침윤능력을 저해함 - 인체유방상피세포인 MCF10A에서 TNF- $\alpha$ 에 의해서 유도된 침윤성 및 uPA의 발현이 약쭉 추출물인 eupatilin에 의해서 저해되는 것을 확인하였고 이에 대한 기작을 규명하였음	100
	<i>In vivo</i> 동물 모델을 이용한 약쭉 추출물의 암전이 억제활성 탐색	- 쥐 대장암 세포주인 CT-26 cell line에서 전이의 주요 지표인 MMP-2/9 활성에 대한 약쭉 플라보노이드의 저해 능이 나타나지 않아 Balb/c mouse에 CT-26 세포를 미 정맥 주사하여 폐 전이를 유도하는 <i>in vivo</i> 모델로의 적용을 하지 않았음 - 그러나, <i>in vivo</i> 대장암 모델에서 약쭉 추출물이 polyp 증식 억제 효과를 가지는 것을 확인하였고 이에 대한 기작을 규명하였음.	90
	약쭉의 암예방 식품 소재의 산업적 응용을 위한 기능성 식품소재의 생산 조건 확립	- 약쭉 ( <i>Artemisia asiatica</i> )을 채취하여 항암활성이 가장 높은 분획 물을 분리하는 조건을 확립하였으며 상기 분획 물에서 eupatilin, jaceosidin, TMH flavone의 플라보노이드를 분리하였음	95

### 3. 연구 결과의 대의적 활용 실적

#### 가. 국내 특허 등록 1건

- 1) 테트라메톡시하이드록시플라본을 포함하는 유방암 억제용 조성물  
등록번호: 제 10-0700358 (2007. 3. 21)

#### 나. 국내 특허 출원 6건

- 1) 테트라메톡시하이드록시플라본을 포함하는 유방암 억제용 조성물  
(출원번호: 제 10-2005-0043888, 등록번호: 제 10-0700358)
- 2) 자시오시딘을 포함하는 유방암 억제용 조성물  
(출원번호: 제 10-2005-0043889)
- 3) 유파틸린을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 세포 간 갭 결합 장애 매개 질환의 예방용 조성물 (출원번호: 제 10-2005-0043890)
- 4) 유파틸린을 포함하는 유방암 억제용 조성물  
(출원번호: 제 10-2005-0043891)
- 5) 자시오시딘을 포함하는 유방암 전이 억제용 식품 조성물  
(출원번호: 제 10-2007-0023923)
- 6) 유파틸린을 포함하는 유방암 전이 억제용 식품 조성물  
(출원번호: 제 10-2007-0025950)

#### 다. 국외 학술지 논문 게재 3건

- 1) Kim DH, Na HK, Oh TY, Shin CY, and Surh YJ. Eupatilin inhibits proliferation of *ras*-transformed human breast epithelial (MCF-10A-*ras*) cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2005, 24(4), 251-259
- 2) Kim MJ, Kim DH, Lee KW, Yoon DY, and Surh YJ. Jaceosidin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in *ras*-transformed human breast epithelial (MCF10A-*ras*) cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, 1095, 483-295
- 3) Jeong, Min A, Ki Won Lee, Do-Young Yoon, and Hyong Joo Lee. Jaceosidin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia argyi*, inhibits phorbol-ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 by blocking phosphorylation of ERK-1 and -2 in cultured human mammary epithelial cells. *Ann. New York Acad. Sci.* 1095: 458-466 (2007)

라. 국외 학술지 논문 게재 준비 중

- 1) Potent antimetastatic effects of 5,7-dihydroxy-3',4',6-trimethoxy flavone (eupatilin) isolated from *Artemisia* plants on H-ras MCF10A human breast epithelial cells
- 2) Inhibitory effects of 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxy flavone (jaceosidin) on H-ras-induced invasion and migration of human breast epithelial cells
- 3) 5,6,3',5'-tetramethoxy-7,4'-hydroxy (TMH) flavone inhibits H-ras-induced invasion and migration in MCF10A human breast epithelial cells
- 4) Effects of 5,7-dihydroxy-3',4',6-trimethoxy flavone (eupatilin) on phorbol ester-induced invasion and migration of MCF10A human breast epithelial cells
- 5) 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxy flavone (jaceosidin) inhibits phorbol ester-induced invasion and migration in MCF10A cells
- 6) Chemopreventive effects of 5,6,3',5'-tetramethoxy 7,4'-hydroxyflavone isolated from *Artemisia* plants on breast epithelial cells

마. 국내 학술대회 포스터 발표 1건

- 1) Kim MJ, Kim DH, and Surh YJ. TNF- $\alpha$  induces invasion by stimulating urokinase-type plasminogen activator and  $\beta$ -catenin signaling in human breast epithelial(MCF-10A) cells through generation of reactive oxygen species. 대한약학회, 2005. Nov.

바. 국외 학술대회 포스터 발표 4건

- 1) Jeong, Min A, Ki Won Lee, Haeng Jeon Hur, Young-Joon Surh, and Hyong Joo Lee. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, inhibits both H-ras- and TPA-induced upregulation of MMPs in human mammary epithelial cells: ERK1/2 and p38 MAPK as potential molecular targets. "Targeting Carcinogenesis" Symposium. Hormel Institute. Oct. 6-7, 2005. Kahler Grand Hotel. Rochester, MN.
- 2) Kim MJ, Kim DH, and Surh YJ. Eupatilin inhibits TNF- $\alpha$ -induced invasion by blocking urokinase-type plasminogen activator and  $\beta$ -catenin signaling in human



breast epithelial (MCF-10A) cells. Signal Transduction Pathways as Therapeutic Targets, 2006. Jan.

3) Kim MJ, Kim DH, and Surh YJ. Eupatilin inhibits TNF- $\alpha$ -induced invasion by blocking urokinase-type plasminogen activator and  $\beta$ -catenin signaling in human breast epithelial (MCF-10A) cells. The 99th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, U.S.A, 2006. April

4) Jeong, Min A, Ki Won Lee, Haeng Jeon Hur, Nam Joo Kang, Bong Jik Shin, Bo Hyun Kim, Do-Young Yoon, Young-Joon Surh, and Hyong Joo Lee. Polyphenols isolated from Artemisia plants, inhibit both H-ras- and phorbol ester-induced upregulation of MMPs in human mammary epithelial cells by blocking phosphorylation of MAP kinases. Nov. 5-8, 2006. Worldnutra 2006. Reno, Nevada. U.S.A. (우수포스터발표상)

#### 4. 관련분야 기술발전 기여도

가. 전통식품인 약쭈 및 약쭈 가공 식품의 각종 기능성 확보 및 약쭈이용식품의 기능성 평가

나. 약쭈 추출물로부터 신규 생리 활성 기능성소재 개발 및 다른 전통식품으로의 기술 과급효과

다. 약쭈의 암 예방 및 항암활성과 작용기작 등에 대한 새로운 이론과 기술 개발

라. 식품에 고부가가치 부여 하고 약쭈를 가공하여 고부가가치의 원료 생산

마. 유사 식물생리활성물질의 기능성 소재 개발 및 활성 평가에 적용

바. 약쭈를 이용한 암 예방 기능성 식품 소재의 개발을 통해 식품생명공학 관련 기술 발전

사. 약쭈를 이용한 암 예방 기능성 식품 소재 개발에 관련된 기술을 관련 업체에 이전하여 기능성 식품 산업 발전에 기여

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

#### 1. 연구범위의 확대

본 과제를 통해 전통적으로 음식, 생약, 뜸 등의 민간요법으로 이용되던 약쑥의 건강기능성을 간암 및 유방암 모델을 통해 암 예방 효능 및 메커니즘의 기초 결과를 확보함으로써 전통 식품의 건강기능성에 관한 과학적 근거를 마련하였다. 간암 및 유방암의 억제에 있어 관련되었던 생화학적 생체 지표의 활성 저해는 피부 노화, 동맥경화, 치매의 병변현상저해와도 관련되어 있으므로 암 예방 활성 뿐 아니라 성인병 예방, 기능성 화장품으로의 응용을 위한 연구에도 그 효능을 기대할 수 있다.

#### 2. 기능성 제품의 상품화 연구

본 연구를 통하여 *in vitro* 와 *in vivo* 효능에 관련된 기초 결과는 확보 되었으나, 기능성 식품 신소재 개발을 위해서 인체 실험연구가 추가적으로 진행 된다면 제품의 상품화가 보다 용이할 것으로 생각되며 이로 인해 농민 소득 증대에 기여할 수 있으리라 판단된다.

#### 3. 신소재의 대량 생산 연구

본 과제를 통하여 약쑥 및 약쑥 플라보노이드의 새로운 기능성 소재 성공 가능성을 제시하고 있으나, 이를 상업화하기 위해서는 추가적인 대량 생산 및 최적화 공정에 관한 연구가 진행 되어야 할 것으로 생각된다.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

#### 1. 핵심기술 활용분야

- 가. 약쑥 성분의 분석 결과베이스화
- 나. 기능성 소재의 *in vitro* 기능성 screening 기술
- 다. 기능성 소재의 체내 대사 및 기작 연구기법 활용

#### 2. 핵심기술 활용유형 및 산업

- 가. 개발 소재 조성물의 용도에 대한 특허화 및 소재화
- 나. Nutraceutical, Pharmaceutical, Cosmeceutical 소재 응용

#### 3. 식품소재

- 가. 암 예방 식품 및 병원(치료)식의 원료로 사용

나. 건강보조식품의 원료 및 제품으로 사용

### 제 3 절 기업화 추진 방안

#### 1. Scale-up 연구를 통한 상업화 추진

가. 대량 생산 설비 및 공장 적용 검토

나. 수율 증대를 통한 제조 비용의 절감 추진

다. 생산 경제성 평가 및 시장 조사 평가를 통한 상용화 시점 조절

#### 2. 건강기능식품으로 적용 모색

가. 2004년부터 실시된, 건강기능식품법에 따라 소재의 기능성 홍보 및 표시를 위해서는 건강기능식품 인증 절차가 필요함.

나. 본과제의 소재는 건강기능식품 개별 인정형 제품으로 응용이 필요함.

다. 건강기능식품 개별인정을 위해서는 전임상이상의 기능성 평가 결과와 안전성(독성) 평가가 필요함. 이를 위하여 (주) 바이오톡스텍 등 안전성 평가 전문기관에 의뢰하여 독성자료를 보충할 계획임.

#### 3. 확보된 기술에 대한 기술이전 모색

가. 본 과제를 통하여 6건의 특허를 출원하였으며 이 중 1건의 특허가 등록되었음

나. 특허를 통하여 지적 소유권을 확보 후, 기반기술로서 기술 이전 추진이 가능함.

다. 서울대학교 산학협력단과 한국건강기능식품협회 등을 통하여 특허 기술을 홍보하고, 특허등록 성분인 테트라메톡시하이드록시플라본부터 개별인정형 건강기능식품 성분으로 등록하는 방법을 강구할 예정임.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 국화과의 여러 쑥속에는 apigenin, luteolin 등의 flavone 류와 kaempferol, quercetin 등의 flavonol 류 naringenin, eriodyctiol 등의 flavanone 등의 생리활성 성분인 폴리페놀이 함유되어 있는데 각 종간에 이들 구성성분의 조성과 함량이 다양한 것으로 밝혀져 있음
2. 특히, 이러한 생리활성성분이 함유되어 있을 것으로 예상되는 약쑥의 기능성 성분은 항암 및 항산화 효과가 크다는 사실이 밝혀지고 있으므로 이에 초점을 맞춘 기능성, 영양성, 경제성이 높은 소재의 생산 및 가공식품 개발 등의 다양한 각도의 연구가 필요
3. Eupatilin은 위 손상 보호, 항암, 항염증 효과를 가지는 것으로 알려져 있었으나 최근에는 천식과 같은 항 알러지 효과로서의 가능성도 제시되고 있음. 대두의 apigenin과 genistein보다 높은 항 알러지 활성을 보임
4. 최근 약쑥 추출물 중 약쑥 플라보노이드 외에 DA-9601이라는 물질이 새로운 항 케양제로서 연구되고 있으며 이는 생체 내 활성산소 종을 생성시키는 xanthine oxidase activity를 저하시키기 때문으로 알려지고 있음

## 제 7 장 참고문헌

1. Ae Ra Kim et al., *Active components from Artemisia iwayomogi displaying scavenging activity*. 2004. p. 1-7.
2. Pelzer, L.E., et al., *Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids*. Il Farmaco, 1998. **53**(6): p. 421-424.
3. Valentao, P., et al., *Analysis of Vervain Flavonoids by HPLC/Diode Array Detector Method. Its Application to Quality Control*. 1999. p. 4579-4582.
4. D. Kalemba, D.K.K., et al., *Antimicrobial properties of the essential oil of Artemisia asiatica Nakai*. 2002. p. 288-291.
5. Nakasugi, T., M. Nakashima, and K. Komai, *Antimutagens in Gaiyou (Artemisia argyi Levl. et Vant.)*. 2000. p. 3256-3266.
6. Karamenderes, C., et al., *Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from Centaurea hierapolitana*. Phytochemistry, 2007. **68**(5): p. 609-615.
7. Lenferink, A.E.G., et al., *ErbB2/neu Kinase Modulates Cellular p27Kip1 and Cyclin D1 through Multiple Signaling Pathways*. 2001. p. 6583-6591.
8. Kim, J.Y., et al., *Eupatilin Blocks Mediator Release Via Tyrosine Kinase Inhibition in Activated Guinea Pig Lung Mast Cells*. 2005, Taylor & Francis. p. 2063 - 2080.
9. Seo, H.-J. and Y.-J. Surh, *Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2001. **496**(1-2): p. 191-198.
10. Kim, D.-H., et al., *Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces cell cycle arrest in ras-transformed human mammary epithelial cells*. Biochemical Pharmacology, 2004. **68**(6): p. 1081-1087.
11. Gao, N., et al., *G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells*. 2004. p. C281-291.
12. Yakes, F.M., et al., *Herceptin-induced Inhibition of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Akt Is Required for Antibody-mediated Effects on p27, Cyclin D1, and Antitumor Action*.

2002. p. 4132-4141.
13. Lee, H.-G., et al., *Inhibitory effect of jaceosidin isolated from Artemisia argyi on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **98**(3): p. 339-343.
  14. Huh, K., et al., *Inhibitory effects of DA-9601 on ethanol-induced gastrohemorrhagic lesions and gastric xanthine oxidase activity in rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **88**(2-3): p. 269-273.
  15. Hyo-Joung Seo, K.-K.P.S.S.H.W.-Y.C.M.-W.S.W.-B.K.Y.-J.S., *Inhibitory effects of the standardized extract (DA-9601) of Artemisia asiatica Nakai on phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity, papilloma formation, cyclooxygenase-2 expression, inducible nitric oxide synthase expression and nuclear transcription factor  $\beta$  activation in mouse skin*. 2002. p. 456-462.
  16. Kim, M.-J., et al., *Jaceosidin Induces Apoptosis in ras-Transformed Human Breast Epithelial Cells through Generation of Reactive Oxygen Species*. 2007. p. 483-495.
  17. Jeong, M.A., et al., *Jaceosidin, a Pharmacologically Active Flavone Derived from Artemisia argyi, Inhibits Phorbol-Ester-Induced Upregulation of COX-2 and MMP-9 by Blocking Phosphorylation of ERK-1 and -2 in Cultured Human Mammary Epithelial Cells*. 2007. p. 458-466.
  18. Hye Young Ji, H.W.L.H.J.S.S.H.K.W.B.K.H.S.L., *Metabolism of eupatilin in rats using liquid chromatography/electrospray mass spectrometry*. 2004. p. 173-177.
  19. Gajewski, E., et al., *Oxidative DNA base damage in MCF-10A breast epithelial cells at clinically achievable concentrations of doxorubicin*. Biochemical Pharmacology, 2007. **73**(12): p. 1947-1956.
  20. Park, S., B. Dong, and F. Matsumura, *Rapid Activation of c-Src Kinase by Dioxin Is Mediated by the Cdc37-HSP90 Complex as Part of Ah Receptor Signaling in MCF10A Cells*. 2007. p. 899-908.
  21. Cho, J.-H., et al., *The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide*. 2002. p. 1163-1169.
  22. Kim, E.-S., Y.-W. Sohn, and A. Moon, *TGF- $\beta$ -induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating*

- transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells.* Cancer Letters, 2007. **252**(1): p. 147-156.
23. Wu, T., *Cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma.* Cancer Treatment Reviews, 2006. **32**(1): p. 28-44.
  24. Park, J.-W., et al., *Cyclooxygenase-2 (COX-2) is directly involved but not decisive in proliferation of human hepatocellular carcinoma cells.*Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2006. **132**(3): p. 184-192.
  25. Chi-Man Tang, T., R. Tung-Ping Poon, and S.T. Fan, *The significance of cyclooxygenase-2 expression in human hepatocellular carcinoma.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2005. **59**(Supplement 2): p. S311-S316.
  26. Hironori, K., *Hepatocellular carcinoma: Is there a potential for chemoprevention using cyclooxygenase-2 inhibitors?* Cancer, 2003. **98**(4): p. 661-667.
  27. Hu, K.-Q., *Rationale and feasibility of chemoprevention of hepatocellular carcinoma by cyclooxygenase-2 inhibitors.*Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2002. **139**(4): p. 234-243.