韓藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 26(4) : 281 – 290 (2018)
ISSN(Print) 1225-9306
ISSN(Online) 2288-0186
http://www.medicinalcrop.org
http://dx.doi.org/10.7783/KJMCS.2018.26.4.281

국산 한약재로 이용되는 약용식물의 NCI-H1229 인간 폐암 세포주에 대한 성장 억제효과 분석

노종현[1] · 김아현[1] · 정호경 · 이무진 · 장지훈 · 이기호 · 이현주 · 박 호 · 조현우[†]
한약진흥재단

Screening for Growth Inhibitory Effects of Medicinal Plants Used in Traditional Korean Medicine in NCI-H1229 Human Lung Cancer Cells

Jong Hyun Nho[1], A Hyeon Kim[1], Ho Kyung Jung, Mu Jin Lee, Ji Hun Jang, Ki Ho Lee, Hyun Joo Lee, Ho Park and Hyun Woo Cho[†]
National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

ABSTRACT

Background: Lung cancer, the most common malignant disease worldwide, is the predominant cause of cancer deaths, particularly amongst men. Therefore, various researchers have focused on the growth inhibitory effects of medicinal plants used in traditional Korean medicine. This study aimed to investigate the growth inhibitory effects of ethanol extracts of Rubiae radix, Inulae flos, Nelumbinis receptaculum, Astilbe radix, and Lagerstroemia flos on NCI-H1229 cells.
Method and Results: The viability of NCI-H1229 cells was evaluated *in vitro* using an MTS assay. Treatment with the ethanol extracts of the selected medicinal plants at 500 ㎍/㎖ reduced NCI-H1229 cell viability and increased apoptotic cell death and caspase-3 activation. In addition, treatment with ethanol extracts of Inulae flos and Astilbe radix increases DNA fragmentation, as measured by the TUNEL assay.
Conclusions: These results indicated that ethanol extracts of Rubiae radix, Inulae flos, Nelumbinis receptaculum, Astilbe radix, and Lagerstroemia flos exhibited growth inhibitory effects, inducing apoptotic cell death, DNA fragmentation and caspase-3 activation in NCI-H1229 cells. Therefore, these medicinal plant extracts may be used in the development of natural medicines to inhibit the growth of lung cancers. However, further study is needed to determine the active ingredients of the ethanol extracts from medicinal plants that are reposible for the inhibitory effect on lung cancer cell grwoth.

Key Words: *Astilbe Chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat. Var., *Inula Japonica* Thunb, *Lagerstroemia Indica* L., *Nelumbo nucifera* Gaertn, *Rubia Akane* Nakai, Lung Cancer

서 언

여러 종류의 암은 우리나라에서 사망률이 높은 원인 중 하나로, 국내 통계청 2013년 자료에 의하면 여러 암 중 5년간 상대생존율이 위암은 23.5%로 집계되어 높은 사망률을 기록하고 있다.

대부분 암은 초기에 증상이나 통증이 수반되지 않기 때문에 초기진단이 늦는 경우가 많아 치료가 힘든 실정이기 때문에 조기진단과 예방이 무엇보다 중요하다고 알려져 있다 (Sung *et al.*, 2016). 최근 국산 한약재로 사용되는 약용식물을 이용한 연구가 다방면으로 진행되고 있으며, 특히 암세포 성장 억제효과에 대한 연구가 가장 활발히 진행되고 있다 (Jo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012).

전 세계적으로 폐암의 사망률은 다른 암종과 비교하여 1 위

[1]Jong Hyun Nho and A Hyeon Kim are contributed equally to this paper.
[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-860-2841 (E-mail) thej0123@naver.com
Received 2018 April 23 / 1st Revised 2018 May 14 / 2nd Revised 2018 June 28 / 3rd Revised 2018 July 4 / 4th Revised 2018 July 23/ Accepted 2018 July 25
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

로 알려져 있고 상대생존율은 23.5%로, 전체 암종의 상대생존율로 보고되어있는 69.4%에 비해 매우 낮은 것으로 보고되어 있다 (Oh *et al.*, 2016).

이는 폐암이 다른 여러 암종과 비교하여 초기증상이 전혀 나타나지 않아 대부분 환자들은 암이 일정이상 진행된 후에 발견하기 때문인 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 (Chae and Park, 2010), 특이적인 호흡기계 증상에 의해 환자가 심리적으로 크게 영향 받으며 장기 특성상 다른 장기에 전이가 쉽게 이루어지기 때문에 예후에 관리가 가장 중요한 문제로 대두되고 있다 (Sarna *et al.*, 2004; Lee and Han, 2011).

폐암에 대한 약용식물 추출물의 항암효과 연구로는 더위지기의 생즙과 추출물이 폐암세포의 성장을 억제시킨다고 알려져 있으며 (Ham *et al.*, 1998), 어성초 추출물은 인체유래 폐암세포에서 세포자멸사 (apoptosis)를 유도하는 것으로 보고되어 있다 (Choi, 2012). 더욱이 폐암세포주인 NCI-H1229에 대해 당근추출물의 폐암세포 성장 억제효과가 나타내었음을 보고하였다 (Rho and Kim, 2002).

꼭두서니 뿌리 (Rubiae radix)는 꼭두서니 (*Rubia akane* Nakai)의 뿌리부분으로 한국, 일본, 중국, 타이완 등지의 산지 숲에서 쉽게 찾을 수 있으며, 예로부터 천초근으로 불리며 우리나라나 중국에서 약재로 사용되어 왔고, 연구에 따르면 발암성 연구를 위한 안전성 시험 (Kim, 2015)과 혈액암, 식중독균에 관련된 연구가 진행되어 항암효능을 가지는 것으로 알려져 있다 (Bae *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

금불초 꽃 (Inulae flos)은 꼭두서니의 꽃으로 한방에선 선복화라는 이름으로 알려져 있다. 이전 연구에서 금불초 꽃 물 추출물이 산화스트레스 및 대장암 세포 억제효과를 가진다고 보고하였으며 (Nho *et al.*, 2018a)로 사용되는 doxorubicin의 효율을 높인다고 알려져 있을 뿐만 아니라 (Wu *et al.*, 2016a), 혈압조절 작용에 관여한다고 보고되어 있다 (Yun *et al.*, 2003).

꼭두서니 뿌리와 금불초 꽃은 대표적인 항암인자로 알려진 JNK (c-Jun N-terminal kinases)와 p38 (p38 mitogen-activated protein kinases)의 활성화를 유도한다고 알려져 있어, 암세포를 사멸시키는 신호전달경로 관여할 것으로 예상 된다 (Choi *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014; Chou *et al.*, 2015).

연꽃 화탁 (Nelumbinis receptaculum)은 연꽃과 식물인 연꽃 (*Nelumbo nucifera* Gaertn)의 꽃턱 (receptacle)을 건조한 것으로 예로부터 연방이라고 불렀을 뿐만 아니라, 약용식물로 사용되어져 왔다.

연꽃 화탁에서 분리된다고 알려진 hyperoside는 비소포성폐암 세포주로 알려진 A549세포에서 apoptosis를 일으킨다고 알려져 있어, 연꽃 화탁 추출물도 폐암세포 억제 효과를 가질 것으로 예상된다 (Kim, 2013; Fu *et al.*, 2016).

노루오줌 뿌리 (Astilbe radix)는 노루오줌 [*Astilbe Chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat. Var.]의 뿌리로 우리나라 각처의 산에 흔히 발견할 수 있는 다년초로 알려져 있으며, 한방에선 낙신부라는 이름으로 알려져 사용되었다 (Kang, 2008; Hong *et al.*, 2015).

연구에 따르면 노루오줌 뿌리는 인지능을 개선시키고 항산화 작용과 대장암 세포를 억제한다고 알려져 있고 (Kim *et al.*, 2004; Nho *et al.*, 2018b), 노루오줌 뿌리에서 분리된다고 알려진 daucosterol과 beta sotosterol은 폐암세포를 억제한다고 보고되어 있어 노루오줌 뿌리 에탄올 추출물 또한 폐암세포 억제 효과를 가질 것으로 예상된다 (Sun *et al.*, 2002; Rajavel *et al.*, 2017).

배롱나무 꽃 (Lagerstroemia flos)는 배롱나무 (*Lagerstroemia indica* L.)의 꽃을 말린 것으로 한방에선 자미화로 불리며, 일반적으로 감기와 이뇨제로 사용한다 (Woo *et al.*, 2016).

배롱나무 꽃에서 분리된다고 알려진 C-glycosidic ellagitannin은 다양한 형태의 암을 억제한다고 알려져 있어, 배롱나무 꽃 에탄올 추출물이 폐암세포를 억제하는 기능을 가질 것으로 예상된다 (Xu *et al.*, 1991; Ismail *et al.*, 2016).

이들의 공통점은 현재까지의 연구들로 미루어볼 때 우리나라에서 예로부터 치료에 이용된 약용식물이며 국내에서 자생한다는 특징을 가지고 있고 최근 주요 이슈인 생물다양성협약 (convention on biological diversty, CBD)에 따른 나고야의정서 (access to genetic resources and benefit sharing, ABS)에 의해 우리나라의 전통지식에 대한 해외수요가 유전자원 및 관련 전통지식의 물적 범위에 해당함에 따라 전통지식에 이용되어온 국내 자생식물의 연구가 필요한 실정이다.

또한 본 실험에서 에탄올 추출물을 하였는데, 이는 에탄올 통한 추출법이 물 추출에 비해 수율 및 에너지 소비 면에서 이점이 좋을 뿐만 아니라 높은 유전상수를 가짐으로 유효성분의 추출이 이롭다고 알려져 있기 때문에 에탄올 추출법을 이용하였다 (Amashukeli *et al.*, 2007; Won *et al.*, 2015).

이에 따라 본 연구에서는 국내에서 자생하는 토종자원으로부터 폐암세포주에 대한 성장억제효과를 알아보기 위해 꼭두서니 뿌리, 금불초 꽃, 연꽃 화탁, 노루오줌 뿌리, 배롱나무 꽃으로 부터 추출된 에탄올 추출물을 이용하여 인체유래 폐암세포주인 NCI-H1229에 대한 성장억제효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료와 추출물의 제조

본 연구에 사용한 모든 약용식물 [꼭두서니 (*Rubia akane* Nakai) 뿌리, 금불초 꽃 (꼭두서니 꽃), 연꽃 (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 화탁, 노루오줌 뿌리, 배롱나무 (*Lagerstroemia*

Table 1. Summary of medicinal plants used in study.

Extracts	Abbreviation	Sampling place	Sampling area	Date	Sample number
Rubiae radix	REE	Lat. 34.16′60″N Lon. 126.87′87″E	Jeonnam Wando	5/27/2015	TKM-2097
Inulae flos	IEE	Lat. 35.47'97"N Lon. 126.88'79"E	Jeonbuk Jeongeup	8/18/2015	TKM-2042
Nelumbinis receptaculum	LSEE	Lat. 34.67'97"N Lon. 126.90'26"E	Jeonnam Jangheung	9/19/2015	TKM-2014
Astilbe radix	AEE	Lat. 34.53'23"N Lon. 126.91'59"E	Jeonnam Jangheung	8/19/2015	TKM-2108
Lagerstroemia flos	LIEE	Lat. 34.16'90"N Lon. 126.56'76"E	Jeonnam Wando	8/6/2015	TKM-2113

[1)]REE; ethanol extract of Rubiae radix, IEE; ethanol extract of Inulae flos, LSEE; ethanol extract of Nelumbinis receptaculum, AEE; ethanol extract of Astilbe radix, LIEE; ethanol extract of Lagerstroemia flos, [2)]Lon; longitude, Lat; latitude.

indica L.) 꽃] 은 Table 1에 표기하였으며, 전남대학교 생물학과 임형탁교수와 목포대학교 한약자원학과 김휘교수의 동정을 거쳤다. 사용된 시료의 확증표본은 한약진흥재단 한약자원본부에 보관하고 있다. 모든 실험재료는 세척한 후 열풍건조기에서 일주일간 50℃ 조건으로 건조하였다.

건조된 시료들은 분쇄하여 에탄올을 시료 무게의 10 배를 넣은 후, 환류 냉각추출방법을 사용하여 70℃에서 3 시간, 3 회 반복하여 추출하였다. 추출물들은 filter paper (Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 여과한 뒤, 동결건조기를 이용해 건조하였다.

실험재료의 각각의 수율은 꼭두서니 뿌리가 7.3%, 금불초 꽃이 5.2%, 연꽃 화탁은 7.3%, 노루오줌 뿌리는 6.2%, 배롱나무 꽃이 6.3%를 각각 나타내었으며 각각 건조된 파우더는 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 뒤 사용하였다.

2. 세포 배양

NCI-H1229 세포는 America Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, MD, USA)에서 분양 받았으며, 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 1% antibiotics (100 ㎎/ℓ streptomycin, 100 U/㎖ penicillin, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)가 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 5% CO_2, 37℃ 조건하에서 배양하였다.

3. MTS Assay

96 well plate에 5×10^4 cells/well의 NCI-H1229 세포를 분주하고 3 시간 동안 배양한 후 에탄올 추출물을 각각 첨가하고 24 시간 동안 배양한 다음 10 ㎕의 MTS solution (CellTiter 96 Aqueous one solution reagent, Corporation, Madison, WI, USA)을 첨가한 후 CO_2 배양기 (37℃, 5% CO_2) 에서 3 시간 더 배양시킨 후, 즉시 570 ㎚에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 암세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

4. Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 활성은 caspase-3 colorimetric detection kit (Enzo Life Sciences International, Plymouth Meeting, PA, USA)를 사용하였다. 실험방법은 제품 프로토콜에 준하여 활성의 증감 여부를 조사하였다.

농도별로 처리된 배지에서 24 시간 배양된 세포를 모은 뒤 단백질을 추출하고 정량하여 각각 20 ㎍의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 μM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-dithiothreitol] 50 ㎕에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 ㎕가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이며, 준비된 plate를 37℃에서 2 시간 동안 incubation 시킨 후 ELISA reader (Infinite 200 pro, TECAN GmbH, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 405 ㎚의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

5. 세포분석기 (flow cytometry)를 이용한 암세포 사멸 효과 측정

세포를 24 well plates에 1×10^6 cells/well 농도로 1 ㎖ 분주한 뒤 3 시간 동안 배양한 후 시료를 처리하고 37℃에 24 시간 동안 배양하였다. 그 후에 세포를 수확하여 PBS로 wash를 2 회 세척한 다음, Annexin V를 30 분간 염색 시킨 뒤, 다시 PBS로 wash를 2 회 세척한 다음, PI를 세포내에 형광염색될 수 있게 30 분 처리 후 flow cytometry (CytoFLEX,

Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 관찰하였다.

6. 통계처리

통계처리는 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리하였고, 평균값과 표준편차를 구하였다. 군 간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석 (One-way ANOVA)을 한 후, Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 변인 간의 차이를 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 약용식물 에탄올 추출물이 NCI-H1229 세포생존율에 미치는 영향

앞에서 언급된 각각의 약용식물의 에탄올 추출물이 폐암세포주인 NCI-H1229 세포의 생존에 미치는 영향을 측정하기 위해 각각 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ㎍/㎖ 의 농도로 처리하여 MTS Assay를 통하여 암세포 생존율을 측정하였으며, 여러 추출물에 대한 농도결정은 식물 추출물을 이용한 여러 연구결과를 바탕으로 정하였다 (Ko *et al*., 2017; Park *et al*., 2017; Um *et al*., 2017).

꼭두서니 (*Rubia akane* Nakai) 뿌리 에탄올 추출물 (REE)을 여러 농도로 처리하였을 때 폐암세포주의 세포생존율은 최소 농도부터 농도의존적인 효과를 나타냈으며 (31.25 ㎍/㎖; 78.33 ± 1.88%, 62.5 ㎍/㎖; 68.39 ± 3.36%, 125 ㎍/㎖; 62.58 ± 1.30%, 250 ㎍/㎖; 52.44 ± 1.12%), 최고 농도인 500 ㎍/㎖에서 30.44 ± 2.17%로 나타났다 (Fig. 1A).

금불초 꽃 에탄올 추출물 (IEE)는 125 ㎍/㎖ 농도부터 사멸효과가 나타났으며 (31.25 ㎍/㎖; 96.26 ± 1.17%, 62.5 ㎍/㎖; 94.1 ± 1.17%, 125 ㎍/㎖; 62.58 ± 1.30%, 250 ㎍/㎖ 에서 43.01 ± 1.29%), 최고 농도인 500 ㎍/㎖ 를 처리하였을 때 세포생존율은 39.26 ± 1.32%로 확인되었다 (Fig. 1B).

연꽃 (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 화탁 에탄올 추출물 (LSEE)은 금불초 꽃 에탄올 추출물과 마찬가지로 125 ㎍/㎖의 농도부터 사멸효과가 나타났으며 (31.25 ㎍/㎖; 99.76 ± 2.29%, 62.5 ㎍/㎖; 94.87 ± 2.33%, 125 ㎍/㎖; 81.66 ± 3.8%, 250 ㎍/㎖; 57.58 ± 2.29%), 최고 처리 농도인 500 ㎍/㎖에서 25.76 ± 2.29%의 세포생존율을 나타냈다 (Fig. 1C).

노루오줌 뿌리 에탄올 추출물 (AEE)은 125 ㎍/㎖ 농도부터 세포생존율을 감소시켰고 (31.25 ㎍/㎖; 96.33 ± 1.25%, 62.5 ㎍/㎖; 90.67 ± 1.79%, 125 ㎍/㎖; 79.09 ± 1.37%, 250 ㎍/㎖; 68.61 ± 1.97%), 최고농도인 500 ㎍/㎖에서 폐암세포의 세포생존율을 35.18 ± 1.51% 까지 낮추었다 (Fig. 1D).

배롱나무 (*Lagerstroemia indica* L.) 꽃 에탄올 추출물

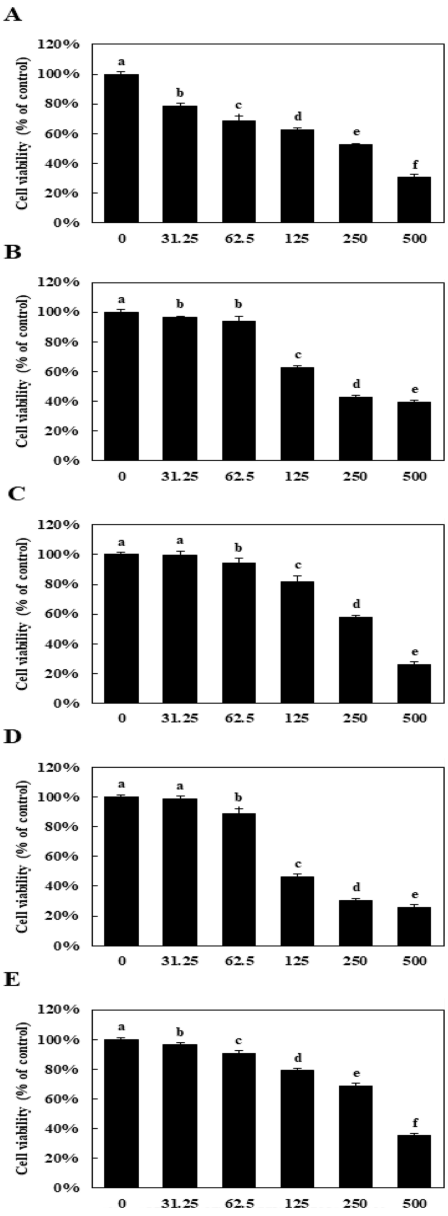

Fig. 1. Ethanol extracts of medicinal plants increase cell death on NCI-H1229 cells. (A-E) NCI-H1229 cells were treated with various concentration (31.3, 62.5, 125, 250, and 500 ㎍/㎖) for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. A; REE (ethanol extract of Rubiae radix), B; IEE (ethanol extract of Inulae flos), C; LSEE (ethanol extract of Nelumbinis receptaculum), D; AEE (ethanol extract of Astilbe radix), E; LIEE (ethanol extract of Lagerstroemia flos). Means values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

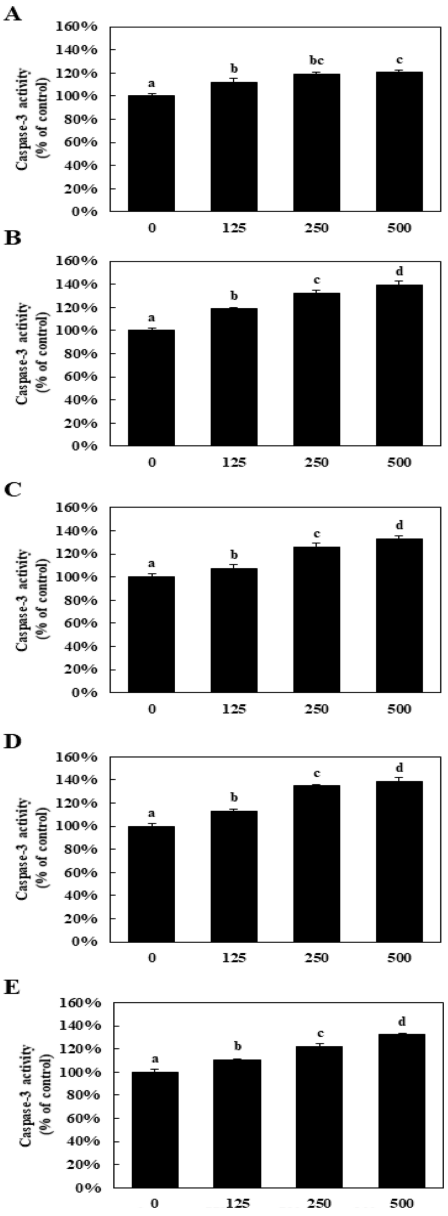

Fig. 2. Ethanol extracts of medicinal plants induced caspase-3 activation on NCI-H1229 cells. (A-E) NCI-H1229 cells were treated with various concentration (125, 250, and 500 ㎍/㎖). Caspase-3 activity was measured by capspase-3 activity assay. A; REE (ethanol extract of Rubiae radix), B; IEE (ethanol extract of Inulae flos), C; LSEE (ethanol extract of Nelumbinis receptaculum), D; AEE (ethanol extract of Astilbe radix), E; LIEE (ethanol extract of Lagerstroemia flos). Means values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

(LIEE)도 다른 추출물과 비슷하게 125 ㎍/㎖의 농도에서 효과가 나타났으며 (31.25 ㎍/㎖; 98.9 ± 1.88%, 62.5 ㎍/㎖; 88.96 ± 3.36%, 125 ㎍/㎖; 46.3 ± 1.92%, 250 ㎍/㎖; 30.16 ± 1.85%), 최고농도인 500 ㎍/㎖에선 25.58 ± 1.88%까지 세포생존율을 감소시켰다 (Fig. 1E).

결과를 종합하였을 때, 꼭두서니 뿌리, 금불초 꽃, 연꽃 화탁, 노루오줌 뿌리 및 배롱나무 꽃 에탄올 추출물은 125 ㎍/㎖ 농도 이상에서 폐암세포주의 생존률을 감소시키는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, 이 중 NCI-H 1229 세포주에 대하여 연꽃 화탁 에탄올 추출물 (LSEE)과 배롱나무 꽃 에탄올 추출물 (LIEE)의 세포생존율 감소비율이 가장 높게 나타났다.

최근 연구결과에 따르면, 비소세포 폐암에 대해 항암제투여 및 방사선 치료 후 옻나무 물추출물을 위주로 투여했을 때 환자의 생존기간 증진 및 암의 재발률을 감소시킬 수 있다는 가능성을 보고함에 따라 (Kim *et al*., 2012), 연꽃 화탁 및 배롱나무 꽃 추출물이 폐암의 재발률을 감소시키거나 암세포의 성장을 억제할 수 있는지에 대한 심도있는 추가실험이 필요하다고 생각된다.

2. 약용식물 에탄올 추출물이 caspase-3 단백질 활성화에 미치는 영향

각각의 에탄올 추출물이 NCI-H 1229 세포주에 대하여 caspase-3 단백질 활성화를 유도하는지에 대해 알아보기 위해, NCI-H 1229 세포주에 추출물을 각각 125, 250 그리고 500 ㎍/㎖ 농도로 24 시간 동안 처리하고 caspase-3 단백질의 활성도를 측정하였다.

Caspase-3 단백질은 평소 세포내부에서 비활성화 (inactivation) 상태로 존재하다, 특정한 자극이 주어지게 되면 종양억제인자로 알려져 있는 p53과 같은 단백질에 의해 활성화 (activation) 상태가 되어 apoptosis (세포자멸사)를 유발한다고 알려져 있다 (Alnemri *et al*., 1996; Choi, 2007).

이에 근거하여 MTS assay에서 세포 성장억제효과를 나타내었던 농도를 기준으로 하고 에탄올 추출물을 NCI-H1229 세포에 각각 125, 250, 500 ㎍/㎖의 농도로 24 시간 동안 처리하였으며, 세포내부의 caspase-3 단백질 활성정도를 ELISA assay를 통해 측정하였다.

Caspase-3 단백질 활성도를 측정한 결과, 꼭두서니 뿌리 에탄올 추출물 (REE)은 정상대조군과 비교하였을 때 유의적으로 증가된 활성도를 나타내었으며 (125 ㎍/㎖; 12 ± 3.03%, 250 ㎍/㎖; 18.79 ± 1.88%), 최고농도인 500 ㎍/㎖를 처리하였을 때 20.43 ± 2.33%로 증가하였다 (Fig. 2A).

금불초 꽃 에탄올 추출물 (IEE)은 위와 같은 농도로 처리하였을 때 농도의존적으로 caspase-3 단백질 활성도를 증가시켰으며 (125 ㎍/㎖; 18.68 ± 0.78%, 250 ㎍/㎖; 32.24 ± 2.67%),

최고 농도인 500 ㎍/㎖ 처리군은 최대 39.64 ± 3.05%까지 증가되었다 (Fig. 2B).

연꽃 화탁 에탄올 추출물 (LSEE)을 처리하였을 때 125 ㎍/㎖ 처리군에서 caspase-3 단백질 활성도가 유의적으로 증가했지만 이는 미미하였으며, 250 ㎍/㎖ 농도부터 효과를 나타내었다 (125 ㎍/㎖; 7.07 ± 3.73%, 250 ㎍/㎖; 26.21 ± 3.12%). 최고농도인 500 ㎍/㎖ 처리군은 32.81 ± 2.55%로 증가하였지만 금불초 꽃 에탄올 추출물 (IEE)에 비해 효과가 떨어지는 것으로 나타났다 (Fig. 2C).

노루오줌 뿌리 에탄올 추출물 (AEE)도 마찬가지로 연꽃 화탁 에탄올 추출물 (AEE)과 같이 125 ㎍/㎖ 농도부터 caspase-3 단백질 활성도가 증가하는 것으로 나타났고 (125 ㎍/㎖; 13.31 ± 1.45%, 250 ㎍/㎖; 34.69 ± 1.37%), 최고농도인 500 ㎍/㎖ 처리군은 38.47 ± 3.92%까지 증가하였다 (Fig. 2D).

배롱나무 꽃 에탄올 추출물 (LIEE)은 농도의존적으로 caspase-3 단백질 활성도를 증가시키는 것으로 나타났으며 (125 ㎍/㎖; 10.46 ± 0.85%, 250 ㎍/㎖; 21.95 ± 2.41%), 최고농도인 500 ㎍/㎖ 처리군은 32.28 ± 1.16%까지 증가시켰다 (Fig. 2F).

결과를 종합하였을 때, 꼭두서니 뿌리, 금불초 꽃, 연꽃 화탁, 노루오줌 뿌리, 배롱나무 꽃 에탄올 추출물은 250 ㎍/㎖ 이상의 처리농도부터 caspase-3 단백질 활성효과가 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 에탄올 추출물들이 caspase-3 단백질 활성화를 통해 폐암세포의 성장 억제에 관여할 수 있다는 가능성을 나타낸다고 생각되지만, 추출물과 caspase-3 inhibitor로 흔히 알려진 Z-DEVD-FMK와 같은 pharmacological inhibitor (Kim *et al*., 2003)를 이용해 추출물처리가 caspasae-3 신호 전달경로를 직접적으로 경유하는지에 대한 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

3. 약용식물 에탄올 추출물의 세포사멸에 미치는 영향

Caspase-3 단백질은 세포내부에서 여러 신호전달 경로를 통해 세포자멸사 (apoptosis)와 세포괴사 (necrosis)에 관여한다고 알려져 있다 (Yuan *et al*., 2016; Park *et al*., 2017). 이에 따라 약용식물 에탄올 추출물이 폐암세포주인 NCI-H1229에 대해 세포자멸사와 세포괴사 중 어떤 세포사멸과정을 통해 성장억제효과를 나타내는 것인지 확인하기 위해 Annexin V & PI staining을 진행하였다.

보고에 따르면, 정상적으로 생존하는 세포에는 phosphatidyl serine (PS)이 세포질 안쪽에 존재하지만 apoptosis가 진행되면 세포막의 바깥쪽으로 이동하게 되어 Annexin V와 결합하게

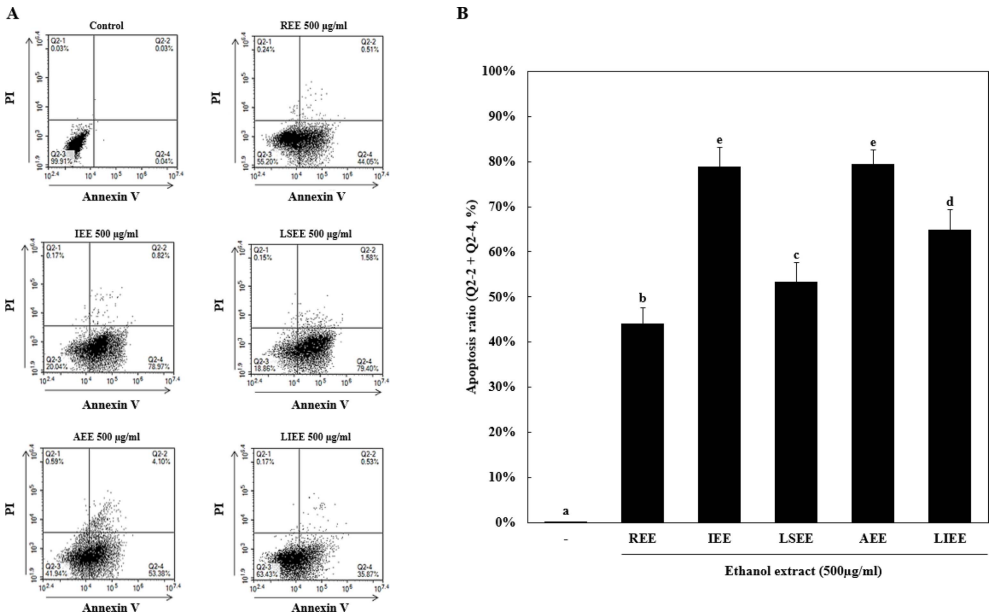

Fig. 3. Flow cytometry analysis of NCI-H1229 cells treated with ethanol extracts of medicinal plants. A; NCI-H1229 cells were treated with ethanol extract of medicinal plant at 500 ㎍/㎖ for 24 h. Cells were stained with Annexin V and propidium iodide (PI), analyzed by flow cytometry. Control; non-treated, REE; ethanol extract of Rubiae radix, IEE; ethanol extract of Inulae flos, LSEE; ethanol extract of Nelumbinis receptaculum, AEE; ethanol extract of Astilbe radix, LIEE; ethanol extract of Lagerstroemia flos. B; Apoptosis ratio (early apoptosis; Q2-4 + late apoptosis; Q2-2) was summarized by graph. Means values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

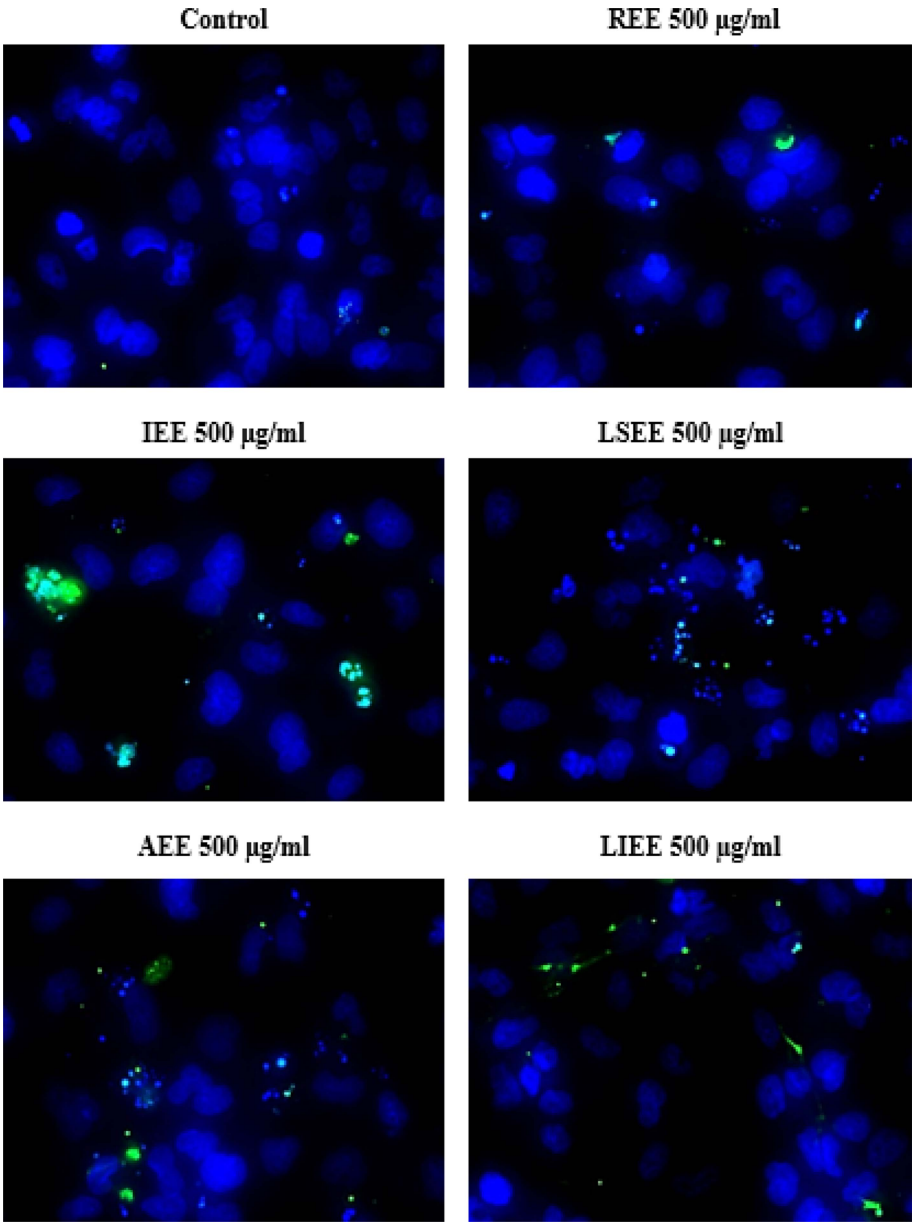

Fig. 4. Ethanol extracts of medicinal plants induced DNA fragmentation on NCI-H1229 cells. NCI-H1229 cells were treated with ethanol extract of medicinal plant at 500 ㎍/㎖ for 24 h. Cells were analyzed by TUNEL assay. Control; non-treated, REE; ethanol extract of Rubiae radix, IEE; ethanol extract of Inulae flos, LSEE; ethanol extract of Nelumbinis receptaculum, AEE; ethanol extract of Astilbe radix, LIEE; ethanol extract of Lagerstroemia flos. Representative emages were taken from at least three independent experiments.

된다, 또한 apoptisis에 의해 세포의 죽음이 급진적으로 진행되거나 necrosis로 진행되었을 때 세포핵이 노출되고 PI (propidium iodide)는 핵에 염색되는 원리를 이용하여 apoptosis와 necrosis를 구분하고 측정하게 된다 (Rieger *et al*., 2011; Thomas *et al*., 2016).

MTS assay와 caspase-3 단백질 활성도 측정실험에서 가장 효과가 좋게 나타난 500 ㎍/㎖ 농도를 세포에 처리해 실험을 진행하였다. 사용된 모든 에탄올 추출물에 대하여 125, 250 ㎍/㎖ 처리한 군에서 세포사멸효과가 나타났지만 (data not shown), 폐암세포주의 사멸률이 가장 높게 나타난 500 ㎍/㎖ 처리 군을 각각 비교하였을 때, 꼭두서니 뿌리 에탄올 추출물 (REE)은 대조군과 비교하여 early apoptosis (Q2-

4) 비율이 약 44.05%로, 금불초 꽃 에탄올 추출물 (IEE)은 약 78.97%, 연꽃 화탁 에탄올 추출물 (LSEE)은 약 53.38%, 노루오줌 뿌리 에탄올 추출물 (AEE)은 약 79.4%, 마지막으로 배롱나무 꽃 에탄올 추출물 (LIEE)은 약 64.96%로 증가하였다 (Fig. 3A). 각각 추출물에 대해 early apoptosis (Q2-4)와 late apoptosis (Q2-2)의 비율을 합하여 그래프로 나타냈을 때, 금불초 꽃 에탄올 추출물 (IEE)과 노루오줌 뿌리 에탄올 추출물 (AEE)이 가장 효과가 좋은 것으로 나타났을 뿐만 아니라 모든 에탄올 추출물이 세포자멸사 (apoptosis)를 통해 폐암세포의 성장을 억제시키는 것이 확인되었다 (Fig. 3B).

결과를 종합했을 때, 실험에 사용된 에탄올 추출물이 인간 폐암세포주인 NCI-H1229 세포에 500 ㎍/㎖ 농도로 처리될 때, caspase-3 단백질 활성화와 세포자멸사를 통해 성장억제효과를 가지는 것으로 나타났다.

4. 약용식물 에탄올 추출물의 DNA 단편화에 미치는 영향

DNA 단편화는 세포자멸사 과정에서 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA를 단편화시킴에 따라 일어나는 전형적인 특징이다.

CAD (caspase-3 activated DNase)와 EndoG (endonuclease G)는 DNA 단편화에 직접적으로 관여하는 중요 인자로 알려져 있으며, 세포자멸사 과정이 활성화 되었을 때 cytochrome C, procaspases, smac/DIABLO, AIF와 같은 많은 apoptotic factor들이 영향을 미친다고 알려져 있다 (Nagata, 2000).

이와 같은 근거에 따라 약용식물 에탄올 추출물을 폐암세포주에 처리하여 DNA 단편화 정도를 측정한 결과, 금불초 꽃 에탄올 추출물 (IEE)과 노루오줌 뿌리 에탄올 추출물 (AEE)이 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다 (Fig. 4).

꼭두서니 뿌리, 금불초 꽃, 연꽃 화탁, 노루오줌 뿌리 및 배롱나무 꽃 에탄올 추출물은 250 ㎍/㎖ 농도 이상에서 폐암세포주 NCI-H1229의 성장을 억제시킬 뿐만 아니라 세포자멸사 (apoptosis)에 의해 성장억제효과가 나타나는 것으로 확인되어 여러 연구 분야에 이용될 수 있다고 생각된다.

다른 연구결과에 따르면 금불초에서 분리된다고 알려진 성분인 bigelovin은 대장암세포에 처리하였을 때 산화스트레스에 의한 세포자멸사를 유발하는 것으로 알려져 있고 (Lee *et al*., 2002; Li *et al*., 2017), sesquiterpenoids 계열 화합물인 eupatolide 와 deacetylovatifolin은 폐암세포를 억제하는 활성을 가지고 있다고 보고되어 있다 (Wu *et al*., 2016b).

노루오줌 전초 및 뿌리에서 분리된다고 알려진 coumarin계열의 화합물인 bergenin은 자궁경부암세포에 대해 사멸효과를 가진다고 보고되어있고, triterpene 계열의 daucosterol은 폐암세포를 억제한다고 알려져 있다 (Sun *et al*., 2002; Rajavel *et al*., 2017; Kim *et al*., 2018).

따라서 암세포를 사멸시키는 유효성분이 포함될 수 있는 금불초 꽃과 노루오줌 뿌리가 다른 추출물과 비교했을 때 항암세포에 대한 세포사멸율이 높은 것으로 추측되지만, 이를 알기 위해 금불초 꽃과 노루오줌 뿌리에 존재하는 bigelovin과 daucosterol 등의 함량을 분석하는 추가실험이 필요할 것으로 생각된다.

또한 세포내부 또는 외부에서 세부적으로 조절되는 신호전달경로에 차이에 의한 것으로 사료되어, 이를 밝히기 위해 caspase-3 단백질 이외에 caspase-7, p53 및 MST-1과 같은 여러 단백질들이 관여한다고 밝혀져 있어 (Belloc *et al*., 2000), 위와 같은 주요 인자를 확인하는 실험이 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한국 토종자원의 한약재기반구축사업의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCE

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell. 87:171.

Amashukeli X, Pelletier CC, Kirby JP and Grunthaner FJ. (2007). Subcritical water extraction of amino acids from atacama desert soils. Journal of Geophysical Research. 112:G04S16. https://doi.org/10.1029/2006JG000308 (cited by 2018 may 20).

Bae JH, Jang HJ and Jung JI. (2005). Antimicrobial effect of *Rubia akane* Nakai on food-borne pathogens. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 34:389-394.

Belloc F, Blaud-Rotureau MA, Lavignolle V, Bascans E, Braz-Pereira E, Durrieu F and Lacombe F. (2000). Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells. Cytometry. 40:151-160.

Choi HS, Park JM, Ju SM, Kim SH, Kim DK, Kim WS and Jeon BH. (2008). Influence of rubiae radix extract on the mechanism of apoptosis in HL-60 cells. Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology. 22:548-555.

Choi JH, Park YN, Li Y, Jin MH, Lee J, Lee YJ, Son JK, Chang HW and Lee EK. (2010). Flowers of *Inula japonica* attenuate inflammatory responses. Immune Network. 10:145-152.

Choi JH. (2007). Bax protein in cancer treatment. Journal of the Korean Medical Association. 50:1016-1022.

Choi YH. (2012). Induction of apoptosis and telomerase activity of NCI-H460 human lung carcinoma cells by methanol extract of *Houttuynia cordata* thunberg. Cancer Prevention Research. 17:364-371.

Chou SM, Lai WJ, Hong T, Tsai SH, Chen YH, Kao CH, Chu R, Shen TL and Li TK. (2015). Involvement of p38 MAPK in the anticancer activity of cultivated *Cordyceps militaris*. American Journal of Chinese Medicine. 43:1043-1057.

Fu T, Wang L, Jin XN, Sui HJ, Liu Z and Jin Y. (2016). Hyperoside induces both autophagy and apoptosis in non-small

cell lung cancer cells *in vitro*. Acta Phamacologica Sinica. 37:505-518.

Ham SS, Chung CK, Lee JH, Choi KP, Jung SW and Kim EJ. (1998). Antimutagenicity and cytotoxicity of *Artemisia iwayomogi* kitamura extracts. Journal of Korean Food Science and Nutrition. 27:157-162.

Hong JY, Park HR, Kwon YG, Kwon WY, Kim SY, Park RD and Shin SY. (2015). Anticancer properties of *Astilbe rubra* extracts on AsPC-1 human pancreatic cancer cells. Journal of Basic Sciences. 32:21-28.

Ismail T, Calcabrini C, Diaz AR, Fimognari C, Turrini E, Catanzaro E, Akhtar S and Sestili P. (2016). Ellagitannins in cancer chemoprevention and therapy. Toxins. 13:E151. http://www.mdpi.com/2072-6651/8/5/151/pdf (cited by 2018 may 20).

Jo DH, Min KJ and Cha CG. (2007). The antioxidant and antitumor effects of the extract of *Bulnesia sarmientia*. Journal of Food Hygiene and Safety. 22:120-126.

Kang BH. (2008). Illustrated book of ecology in Korean herbal medicine. Geobook. Seoul, Korea. p.487.

Kim AH, Nho JH, Woo KW, Gang JE, Sim MO, Kim MS, Ham SH and Cho HW. (2018). Quantitative analysis of bergenin in *Astilbe rubra* and growth inhibition effect of ethanol extract on hela cells. Korean Journal of Pharmacognosy. 49:47-54.

Kim DH, Park JH, Kim SH and Sung SH. (2012). Stability test and analysis of *Rubia cordifolia* for carcinogenicity study. Korean Journal of Pharmacognosy. 43:147-151.

Kim GS, Lee SE, Lee HJ, Kim YM, Jeon SY, Park CG, Seong NS and Song KS. (2004). Inhibition activity of plant extracts against prolyl endopeptidase. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 12:1-9.

Kim JH, Ajaz M, Lokshin A and Lee YJ. (2003). Role of antiapoptotic proteins in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and cisplatin-augmented apoptosis. Clinical Cancer Research. 9:3134-3141.

Kim JH, Lee JH, Kim YH and Kim KH. (2009). Apoptotic effect of *Rubia cordifolia* dichloromethane extracts on human acute jurkat T cells. Journal of Life Science. 19:163-168.

Kim KS. (2015). Case study: Regression of a residual tumor and prolongation of overall survival with allergen-removed *Rhus verniciflua* stokes after chemoradiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. Journal of Internal Korean Medicine. 36:200-206.

Kim MJ. (2013). Evaluation of antioxidative effect from Lotus seed and seedpod extracts. Master Thesis. Dongguk University. p.1-63.

Ko HM, Eom TK, Song SK, Jo GY and Kim JS. (2017). Tyrosinase and α-glucosidase inhibitory activities and antioxidant effects of extracts from different parts of *Hypochaeris radicata*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:139-145.

Lee HT, Yang SW, Kim KH, Seo EK and Mar W. (2002). Pseudoguaianolides isolated from *Inula britannica* var. chinenis as inhibitory constituents against inducible nitric oxide synthase. Archives of Pharmacal Research. 25:151-153.

Lee SH, Jeong DW, Kim GT, Park SY, Kim SY, Park OJ and Kim YM. (2012). Quercetin of plants extracts regulates sestrin2 and induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells. Cancer Prevention Research. 17:244-250.

Lee YJ and Han JY. (2011). Current trends in early diagnosis and treatment of lung cancer. Korean Journal of Medicine. 80:529-531.

Li M, Song LH, Yue GG, Lee JK, Zhao LM, Li L, Zhou X, Tsui SK, Ng SS, Fung KP, Tna NH and Lau CB. (2017). Bigelovin triggered apoptosis in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* via upregulating death receptor 5 and reactive oxidative species. Scientific Reports. 7:42176. https://doi.org/10.1038/srep42176 (cited by 2018 May 1).

Nagate S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. Experimental Cell Research. 256:12-18.

Nho JH, Jang JH, Jung HK, Lee MJ, Sim MO, Jeong DE and Cho HW. (2018b). Ethanol extracts from *Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. Et. Savat. exhibit inhibitory activities on oxidative stress generation and viability of human colorectal cancer cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 26:141-147.

Nho JH, Jung DE, Jung HK, Lee MJ, Jang JH, Sim MO, Jung JK and Cho HW. (2018a). Inhibitory effect of an ethanol extract of inulae flos on nitric oxide production, oxidative stress and human colorectal cancer cell line. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 26:19-25.

Oh CM, Won YJ, Jung KW, Kong HJ, Cho H, Lee JK, Lee DH and Lee KH. (2016). Cancer statistics in Korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2013. Cancer Research and Treatment. 48:436-450.

Park CH, Kim JH, Choi SH, Shin YS, Lee SW and Cho EJ. (2017). Protective effects of *Glycyrrhiza uralensis* radix extract and its active compounds on H_2O_2-induced apoptosis of C6 glial cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:315-321.

Rajavel T, Mohankumar R, Archunan G, Ruckmani K and Devi KP. (2017). Beta sitosterol and daucosterol(phytosterols identified in *Grewia tiliaefolia*) perturbs cell cycle and induces apoptotic cell death in A549 cells. Scientific Reports. 7:3418. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03511-4 (cited by 2018 May 10).

Rho SN and Kim DH. (2002). Anti-tumor effect of carrot(*Docus carota* L.) extracts in the human lung cancer cell line NCI-H1229. Journal of the East Asian Society of Dietary Life. 12:289-298.

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD and Barreda DR. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. Journal of Visualized Experiments. 50:2597. https://doi.org/10.3791/2597 (cited by 2018 May 10).

Sarna L, Evangelista L, Tashkin D, Padilla G, Holmes C, Brecht ML and Grannis F. (2004). Impact of respiratory symptoms and pulmonary function on quality of life of ling-term survivors of non-small cell lung cancer. Chest. 125:439-445.

Sun HX, Ye YP and Yang K. (2002). Studies on the chemical constituents in radix *Astilbes chinensis*. China Journal of Chinese Materia Medica. 27:751-754.

Sung KE, Jeong KH, Kim AR and Kim EY. (2016). An analysis on prescribing patterns of antidepressants and their associated factors in lung cancer patients. Korean Journal of Clinical Pharmacy. 26:107-114.

Thomas E, Gopalakrishnan V, Somasagara RR, Choudhary B and Raghavan SC. (2016). Extract of *Vernonia condensata*,

inhibits tumor progression and improves survival of tumor-allograft bearing mouse. Scientific Reports. 6:23255. https://www.nature.com/articles/srep23255.pdf (cited by 2018 May 20).

Um JN, Min JW, Joo KS and Kang HC. (2017). Nitric oxide production and elastase inhibitory activities of extract and its fraction from phellodendri Cortex. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:22-28.

Won BY, Shin KY, Ha HJ, Yun YS, Kim YR and Lee HG. (2015). Changes in nutritional composition of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 44:882-887.

Woo KW, Sim MO, Park EJ, Kim MS, Suh WS, Cho HW, Kwon HC, Park JC and Lee KR. (2016). Chemical Constituents from the stems of *Lagerstroemia indica* and their anti-oxidant effect. Korean Journal of Pharmacognosy. 47:204-210.

Wu M, Li T, Chen L, Peng S, Liao W, Bai R, Zhao X, Yang H, Wu C, Zeng H and Liu Y. (2016a). Essential oils from *Inula japonica* and *Angelicae dahuricae* enhance sensitivity of MCF-7/ADR breast cancer cells to doxorubicin via multiple mechanisms. Journal of Ethnopharmacology. 180:18-27.

Wu XD, Ding LF, Tu WC, Yang H, Su J, Peng LY, Li Y and Zhao QS. (2016b). Bioactive sesquiterpenoids from the flowers of *Inula japonica*. Phytochemistry. 129:68-76. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942216301352 (cited by 2018 May 20).

Xu YM, Tanaka T, Nonaka GI and Nishinoka I. (1991). Tannins and related compounds. CVII. structure elucidation of three new monomeric and dimeric ellagitannins, flosin B and reginins C and D, isolated from *Lagerstroemia flos-reginae* RETZ. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 39:647-650.

Yuan J, Najafov A and Py BF. (2016). Roles of caspases in necrotic cell death. Cell. 167:1693-1704.

Yun JS, Jeong BH, Kim NY, Seong NS, Lee HY, Lee JH and Kim JD. (2003). Screening of 94 plant species show ACE inhibitory activity. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 11:246-251.

Zhao L, Li Y, He M, Song Z, Lin S, Yu Z, Bai X, Wang E and Wei M. (2014). The fanconi anemia pathway sensitizes to DNA alkylating agents by inducing JNK-p53-dependent mitochondrial apoptosis in breast cancer cells. International Journal of Oncology. 45:129-138. https://www.spandidos-publications.com/ijo/45/1/129 (cited by 2018 May 20).