

穿心蓮이 A549 폐암세포에 미치는 영향

范熙邊, 韓孝尙, 李暎鍾*

暎園大學校 韓醫科大學 本草學教室

Effects of Andrographitis Herba in A549 Lung Cancer Cells

Hee-Byun Bum, Hyo-Sang Han, Young-Jong Lee*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study purposed to research the anti-cancer effects of Andrographitis Herba.

Methods : By measuring the cell proliferation, apoptosis, morphology and cytokine level from the extracts, the influence on a A549 cell was compared.

Results : The Andrographitis Herba decoction extract according to the concentration inhibited the proliferation and increased the apoptosis of the A549 cell. Among the various fraction extracts of the Andrographitis Herba decoction, EtOEt showed the greatest increase of the apoptosis of the A549 cell. The Andrographitis Herba decoction extract according to the concentration decreased the secretion of the TGF- β in the A549 cell, and increased the secretion of the TNF- α and the IFN- γ presenting cell population.

Conclusion : It is considered that the total extract and various fraction extracts of Andrographitis Herba decoction inhibit the proliferation of A549 cells.

Key Words : Andrographitis Herba, A549 cell, anti-cancer effects

서론

穿心蓮은 嶺南採藥錄에 “能解蛇毒 又能理內傷咳嗽”라고 하여 처음 수록되었으며¹⁾, 임상에서는 性寒 味苦하고 清熱解毒, 利濕消腫 및 涼血하는 효능이 있어서 感冒發熱, 咽喉腫痛, 口舌生瘡, 頓咳勞嗽, 泄瀉痢疾, 熱淋澀痛, 癰腫瘡毒과 毒蛇咬傷 등의 증상을 치료하는데 상용되고 있다²⁾.

穿心蓮의 기원으로 中華人民共和國藥典²⁾에는 쥐꼬리망초과(爵床科 Acanthaceae) 식물인 穿心蓮 *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees의 건조한 지상부분으로 되어 있고, 秋初 莖葉이 무성할 때 채취

하여 晒乾하여 사용한다고 하였으며, 우리나라 공정서에는 아직 수재되지 않고 있다.

穿心蓮의 성분으로는 葉에는 andrographolide, neo-andrographolide, deoxy-andrographolide, homo-andrographolide, panicolide, andrographan, andrographon, andrographosterin과 andrograpanin 등이 함유되어 있고, 根에는 andrographolide 외에 mono-o-methylwightin, andrographin, panicolin, apigenin-7 등이 함유되어 있으며, 全草에는 이 외에도 14-deoxy-11-oxoandrographolide가 함유되어 있다^{1,3)}.

약리작용으로는 항염작용⁴⁾, 항바이러스작용⁵⁾, 항미

*교신저자 : 이영중, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 본초학교실
· E-mail : garak@kyungwon.ac.kr · Tel : 031-750-5415
· 접수 : 2010년 5월 10일 · 수정 : 2010년 6월 10일 · 채택 : 2010년 6월 22일

생물작용⁶⁾, 항당뇨 효능⁷⁾, 간 보호효능⁸⁾과 항산화 효능⁹⁾, 면역 조절작용¹⁰⁾ 등이 보고되었고, Dua 등¹¹⁾은 穿心蓮의 뿌리에서 분리된 xanthone계 성분에서 anti-malarial 효능을, Shukla 등¹²⁾은 간 보호제로 임상적으로 사용되고 있는 silymarin 보다 andrographolide의 최담효과가 더욱 더 유효하다고 보고하였다. 또한 Rajagopal 등¹³⁾은 andrographolide 성분이 암세포에 대한 직접적인 항암효과를 발휘하며, lymphocyte의 증식과 interleukin-2의 생산을 증가시키므로써 면역 증강효과가 입증된다고 보고하였다.

현재 암 치료에 사용되고 있는 화학요법제는 생체 내의 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 손상을 입혀 골수기능저하, 위장장애, 탈모 등의 부작용을 일으키므로¹⁴⁾, 천연물을 이용하여 면역기능을 높여주거나, 암세포만을 선택적으로 파괴할 수 있는 이상적인 치료제에 대한 연구가 많이 시도되고 있다.

잠재적인 암 치료제 가능성을 제시한 Rajagopal 등¹³⁾의 보고에서와 같이 穿心蓮의 생리활성에 대한 여러 연구가 진행되었으나, 아직 穿心蓮의 폐암세포에 대한 항암효과를 비교한 연구는 보고된 바가 없었다.

이에 著者は 穿心蓮을 전탕 추출과 이로부터 분획별 추출물을 얻은 후, 폐암세포에 대한 영향을 측정하여 穿心蓮의 항암효과에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 穿心蓮(Andrographitis Herba, 이하 AH로 표기)은 2005년 8월 중국 안국시장에서 구입하여, 모든 약재는 추출하기 전에 초음파 세척기를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

(1) 시 약

Absolute alcohol 은 Sigma(U.S.A) 제품, Fetal bovine serum(FBS), Antibiotics 등은 Hyclone(U.S.A) 제품, Phosphate buffer aline은 Gibco(U.S.A) 제품, oligo dt, pre-made primer 등은 Bioneer(U.S.A) 제품, methyl³H (thymidine) 은 Amersham(U.S.A) 제품, Antibody-IFN- γ

-FITC(fluorescein isothiocyanate)는 BD Pharmingen(U.S.A) 제품, IFN- γ ELISA kit, TNF- α ELISA kit, TGF- β ELISA kit 등은 Endogen(U.S.A) 제품을 사용하였다.

(2) 기기

기기명	제조사	제조국
Rotary evaporator	Eyela	
Spectrophotometer	Shimazu	
Digital thickness gauge	Mitutoyo Corp	
Research microscope	Nikon	Japan
Bio-freezer	Sanyo	
Micrometer	Mitutoyo	
Camera	Canon	
Microscope	Leica	
Primus 96 thermocycler system	MWG BiotARh	Germany
Electric chemical balance	Mci	
Ultrasonic cleaner	Brason	
Homogenizer	Omni	
Plate shaker	Lab-Line	U.S.A
Flow cytometry	BD biosciences	
β -counter	Beckman	
ELISA reader	Tecan	Canada
Ice maker	Vision science	
Cytological centrifuge	Hanil	Korea
Pulverizer	Rong tsong	Taiwan

2. 방법

1) 약물

(1) 전탕 추출

穿心蓮을 100 g 씩에 각각 1 l 의 증류수를 가지고 약탕기(웅진약탕기, 한국)를 이용하여 3시간 동안 끓인 다음 여과지로 여과한 후 감압농축장치를 이용하여 수분을 제거하여 분말로 만들었다.

(2) 분획 추출

전탕액 분말을 Fig 1과 같은 방법으로 분획하였다. 穿心蓮 전탕 추출물 분말과 증류수 400 ml를 넣고 극성이 다른 여러 가지 용매 (n-hexane, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol)를 이용하여 단계적으로 분획하였다. 극성에 의해 얻어진 분획 추출물 들은 감압농축장치를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

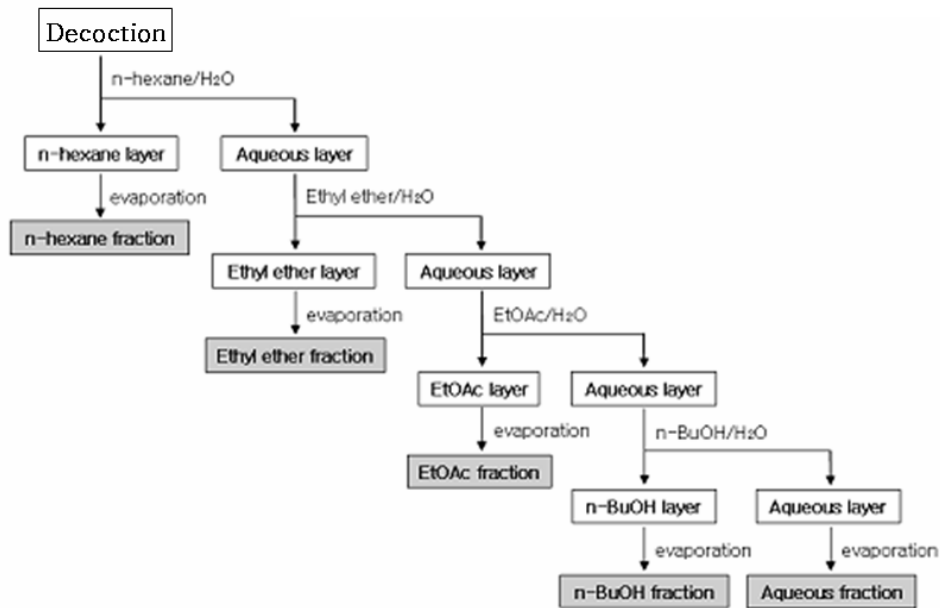


Fig. 1. Procedure of various solvent fractions from decoction extract of Andrographitis Herba.

2) 암세포에 대한 영향 측정

(1) Cell proliferation¹⁵⁾

한국 세포주은행으로부터 분양받은 폐암세포(A549)를 RPMI1640 media에 10% FBS와 antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml)를 첨가하여 배양을 실시하였다. 폐암세포를 12 well plate에 5 × 10⁵ cell/well로 분주한 다음, 穿心蓮 전탕을 농도를 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml로 달리하여 72시간 동안 36℃에서 배양하게 된다. 72시간 동안 배양된 세포의 harvest 하는 시간 12-18시간 전에 [³H]-thymidine을 1 µ Ci 처리해준다. 그리고 세포를 β-counter (Beckman)에 사용하는 safe cuvette에 500 µl씩 분주한다. 다음으로, cocktail solution을 2 ml 첨가 한 후, thymidine의 uptake를 β-counter로 확인하였다.

(2) Apoptosis¹⁶⁾

穿心蓮 전탕 추출물 및 분획 추출물을 처리한 A549을 72시간 동안 배양을 실시한 후, 세포를 취합한다. Annexin V와 반응시켜 flow cytometry를 이용하여 cell population을 확인하였으며, FACs calibur의 software를 이용하여 분석하였다.

(3) Morphology

한국 세포주은행으로부터 분양받은 A549를 DME media에 20% FBS와 antibiotics(penicillin 100 U/

ml, streptomycin 100 µg/ml)를 첨가하여 배양하였고, 12 well plate에 5 × 10⁵ cell/well로 분주하였다. 穿心蓮 전탕 추출물 및 분획 추출물을 1 mg/ml의 농도로 희석하여 폐암세포에 처리한 후, 72시간 동안 36℃에서 배양한다. 배양이 끝난 후에 100배 혹은 200배율로 현미경에서 관찰을 하였으며, 사진 촬영을 실시하였다.

(4) Cytokine level¹⁷⁾

① ELISA

암세포의 증식 중에 나타나는 TGF-β와 TNF-α의 cytokine의 변화는 암세포의 배양액에서 ELISA kit를 사용하여, 각 cytokine level을 측정하였다. 항 cytokine 항체가 코팅된 96 well plate에 serum을 가하여 반응시킨 후 4번 세척하고, 다시 biotin이 표식된 항cytokine 항체를 가하여 반응시킨 후 4번 세척하였다. 여기에 streptavidin-HRP를 가하고 ELISA-reader를 이용하여 측정하였다.

② Flow cytometry

암세포의 증식 중에 나타나는 IFN-γ의 cytokine의 변화는 flow cytometry를 이용하여 확인하였다. IFN-γ kit를 사용하여, 약물을 처리한 A549의 세포에 FITC-mouse anti-human IFN-γ 표적 항체를 intracellular staining으로 실시하여 flow cytometry를 이용하여 확인하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 ANOVA multi t-test(JAVA, Bonferroni Ver II)로 분석하여 p값을 구했다. 각 Control과 비교하여 p값이 0.05 미만일 경우에 유의성을 인정하였다.

성적

1. 폐암세포에 미치는 영향

1) Cell proliferation

(1) 농도별

폐암 세포주인 A549에 穿心蓮 전탕 추출물을 농도별로 처리한 뒤에 72시간동안 37℃에서 배양한 후, 세포의 증식을 [³H]-thymidine을 이용하여 uptake 정도를 확인하였다. 穿心蓮을 10 mg/ml의 농도로 처리한 경우에 폐암세포의 증식이 가장 낮았다(Fig.2).

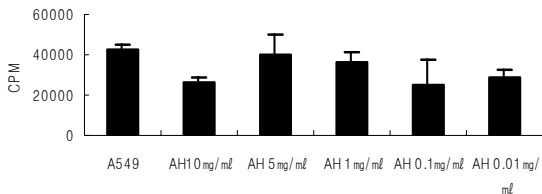


Figure 2. A549 cell proliferation with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract. A human lung cancer cell line A549 was seeded at a suspended density of 5×10^5 cell/well on 12 well cell culture plates. The medium was RPMI1640 media with 10% FBS, antibiotics, and 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml and 0.01 mg/ml Andrographitis Herba decoction extract, with 1 μ Ci/ml [³H]-thymidine, in replicates of four in 12-well cell culture plates. After 72h, the cells were harvested and counted with a β -counter. Values represent the means \pm SEM of 3 experiments.

2) Apoptosis

(1) 농도별

穿心蓮 전탕 추출물을 농도별로 폐암세포 배양액에 처리한 후, 폐암세포에 나타나는 apoptosis의 정도를 FACs를 이용하여 확인하였다. 穿心蓮 전탕 추출물은 농도 의존적으로 폐암세포의 apoptosis를 증가시켰다 (Fig. 3).

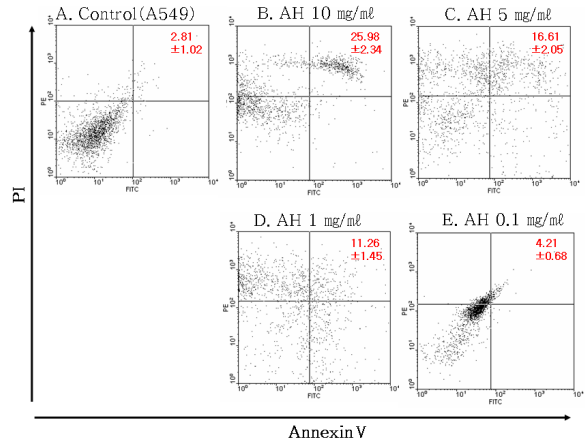


Figure 3. Apoptosis of A549 cells treated with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract. The A549 cells were seeded at a suspended density of 5×10^5 cell/well on 12 well cell culture plates. The medium was RPMI1640 media with 10% FBS, antibiotics, and 10, 5, 1, 0.1 mg/ml Andrographitis Herba decoction extract.

(2) 분획별

穿心蓮 전탕 추출물의 total extract 및 분획물들을 폐암세포 배양액에 처리한 후 apoptosis의 정도를 FACs를 이용하여 확인하였다. 穿心蓮 전탕 추출물의 total extract 및 EtOEt 분획을 제외한 대부분의 분획 추출물들은 폐암세포의 apoptosis에 거의 영향을 미치지 않았다. 반면, EtOEt의 분획 추출물을 처리하였을 때에는 폐암세포의 apoptosis가 현저하게 증가하였다(Fig. 4).

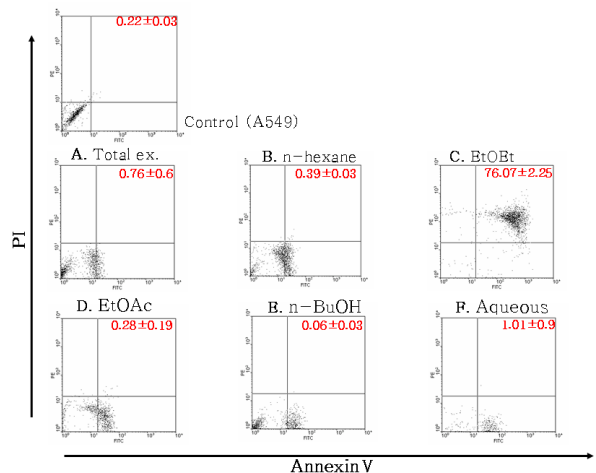


Figure 4. Apoptosis of A549 cells treated with total ex. or various fraction extracts of Andrographitis Herba decoction. The A549 cells were seeded at a suspended density of 5×10^5 cell/well on 12 well cell culture plates. The medium was RPMI1640 with 10% FBS, antibiotics, and total ex. or various fraction extracts of Andrographitis Herba decoction.(1 mg/ml) ; A: Total ex. B: n-hexane C: EtOEt D: EtOAc E: n-BuOH F: Aqueous.

3) Morphology

(1) 농도별

穿心蓮 전탕 추출물을 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml의 농도로 하여 폐암세포에 처리 한 후, 72시간 동안 배양을 하고 세포의 형태를 확인 하였다. Control은 폐암세포인 A549에 약물을 처리 하지 않은 것이다. A549는 배양그릇의 바닥에 붙어서 자라는 경향을 보였다. Control에 비해 穿心蓮 추출 물을 처리한 경우 폐암세포의 수가 현저히 감소되었 으며, 농도가 높을수록 세포가 더욱 많이 감소한 것으 로 나타났다(Fig. 5).

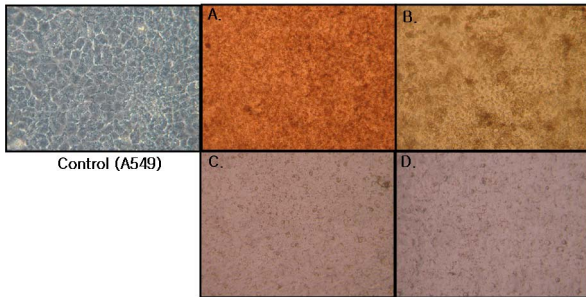


Figure 5. Photomicrograph of A549 cells cultured with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract. The A549 cells were seeded at a suspended density of 5×10^5 cell/well on 12 well cell culture plates. The medium was RPMI1640 media with 10% FBS, antibiotics, and 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml Andrographitis Herba decoction extract. After 72h, a picture of the A549 cells were taken by fluorescence microscope ($\times 100$). A: 10 mg/ml, B: 5 mg/ml, C: 1 mg/ml, D: 0.1 mg/ml Andrographitis Herba decoction extract.

(2) 분획별

穿心蓮 전탕 추출물 및 분획 추출물들을 1 mg/ml 농도로 희석하여 폐암세포에 처리한 후, 72시간 동안 배양하고 세포의 형태를 확인하였다. Control은 폐암

세포인 A549에 약물을 처리 하지 않은 것이다. Control에 비해 穿心蓮 추출물을 처리한 경우 세포의 수가 현저히 감소하였으며, EtOEt 혹은 EtOAc 분획 추출물을 처리한 경우에는 폐암세포의 사멸이 현저히 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 6).

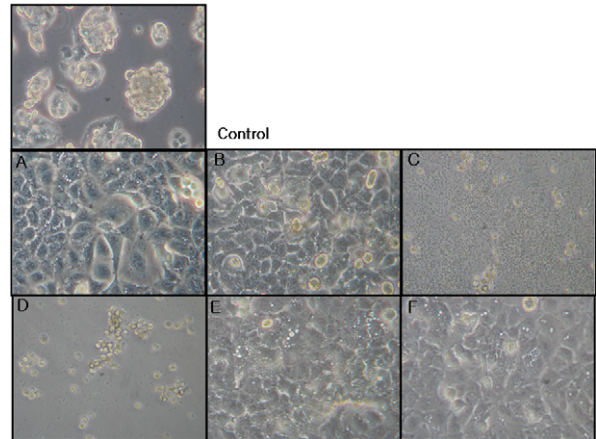


Figure 6. Photomicrograph of A549 cells cultured with total ex. and various fraction extracts of Andrographitis Herba decoction extract.

The A549 cells were seeded at a suspended density of 5×10^5 cell/well on 12 well cell culture plates. The medium was RPMI1640 with 10% FBS, antibiotics, and 1 mg/ml Andrographitis Herba decoction extract. After 72h, the A549 cells take a picture by fluorescence microscope ($\times 100$ or $\times 200$); A: Total ex. B: n-hexane C: EtoEt D: EtoAc E: n-BuOH F: Aqueous.

4) Cytokine

폐암세포인 A549의 배양액에 穿心蓮 전탕 추출물 을 10, 5, 1, 0.1 mg/ml의 농도로 희석하여 처리하 고, 72시간 동안 배양한 후, cytokine의 변화를 ELISA로 확인하였다. A549에 약물을 처리하지 않은 것을 Control로 하여 비교하였다(Table 1).

Table 1. Level of TGF- β and TNF- α in A549 Cell Culture Treated with Various Concentrations of Andrographitis Herba Decoction Extract

	Control	AH 10 mg/ml	AH 5 mg/ml	AH 1 mg/ml	AH 0.1 mg/ml
TGF- β	0.730 \pm 0.04	0.467 \pm 0.04	0.493 \pm 0.01	0.507 \pm 0.02	0.520 \pm 0.05
TNF- α	0.163 \pm 0.04	0.347 \pm 0.01	0.270 \pm 0.03	0.126 \pm 0.00	0.155 \pm 0.02

The A549 cells(5×10^5 cell/well) were cultured with 10% FBS, a RPMI1640 medium and various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract. After 72 hr, the cells were harvested and the cell culture supernatant was used to measure the concentrations of TGF- β and TNF- α by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 experiments.

(1) TGF-β

A549세포에 穿心蓮 추출물을 처리한 경우 transforming growth factor-β (TGF-β) 는 Control 에 비해서 생성이 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

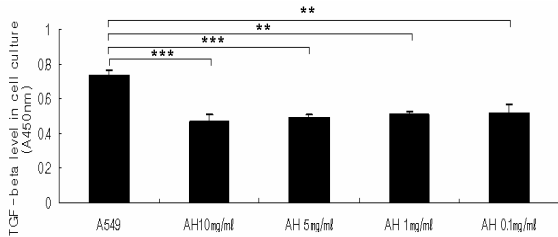


Figure 7. Level of TGF-β in A549 cell culture treated with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract.

The A549 cells(5×10^5 cell/well) were cultured with 10% FBS, a RPMI1640 medium with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract. After 72h, the cells were harvested, and the cell culture supernatant was used. The concentration of TGF-β in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 experiments.
*** : P<0.001, ** : P<0.01 by ANOVA test.

(2) TNF-α

폐암세포인 A549에 穿心蓮 전탕 추출물을 농도별로 처리한 세포 배양액에서 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 의 양을 측정하였다. 5 mg/ml와 10 mg/ml 농도에서 Control에 비하여 TNF-α 의 생성이 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

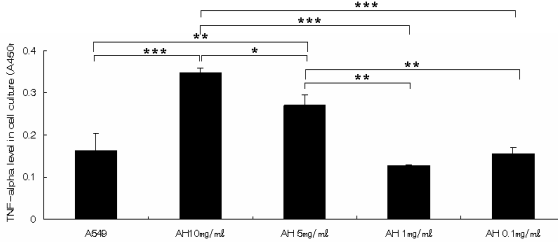


Figure 8. Level of TNF-α in A549 cell culture treated with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract.

The A549 cells(5×10^5 cell/well) were cultured with 10% FBS, a RPMI1640 medium with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract. After 72h, the cells were harvested, and the cell culture supernatant was used. The concentration of TNF-α in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 experiments.
*** : P<0.001, ** : P<0.01, * : P<0.05 by ANOVA test.

5) IFN-γ presenting cell population

A549에 穿心蓮 전탕 추출물을 농도별로 처리하여 배양하고, IFN-γ 를 분비하는 세포의 비율을 FACs

를 이용하여 확인하였다. 穿心蓮의 농도가 증가함에 따라 IFN-γ 의 분비를 나타내는 세포의 비율이 증가하였다(Fig. 9).

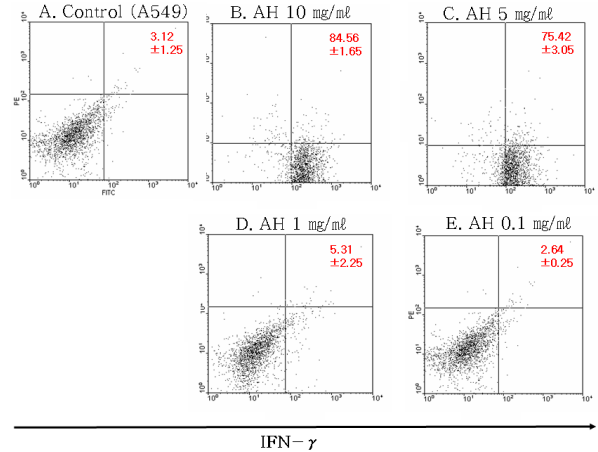


Figure 9. Flow cytometry analysis of IFN-γ presenting A549 cells cultured with various concentrations of Andrographitis Herba decoction extract.

The A549 cells were seeded at a suspended density of 5×10^5 cell/well on 12 well cell culture plates. The medium was DME media with 20% FBS, antibiotics, and 10, 5, 1, 0.1 mg/ml Andrographitis Herba decoction extract. After 24 hr, the IFN-γ presenting A549 cells were measured by flow cytometry.

고찰

穿心蓮의 기원으로 中華人民共和國藥典²⁾에는 쥐꼬리망초과(爵床科 Acanthaceae) 식물인 穿心蓮 *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees의 건조한 지상부분으로 되어 있고, 秋初 莖葉이 무성할 때 채취하여 曬乾하여 사용한다고 하였다.

穿心蓮은 1년생 초본으로, 원산지는 인도, 필리핀, 태국 등 동남아 지방이며, 중국에서는 廣東, 廣西, 福建 등 남방의 모든 지역에서 야생 또는 재배된다^{2,3)}. 키는 0.5-1.0 m이고, 줄기는 진한 녹색으로 사각형이며 마디가 볼록하다. 잎은 對生이며 버들잎 모양으로 뾰족하고 총상화서가 정상 혹은 葉腋에 착생하여, 모여서 대형 원추화서를 이루고, 꽃은 흰색 또는 연분홍빛 꽃잎에 자색 반점이 있다³⁾.

穿心蓮은 嶺南採藥錄에 최초로 수록되어 “能解蛇毒, 又能理內傷咳嗽” 라고 하였고¹⁾, 中華本草³⁾에는 “清熱解毒, 瀉火, 燥濕, 主治風熱感冒, 溫病發熱, 肺熱咳嗽, 百日咳, 肺癰, 咽喉腫痛, 濕熱黃疸, 淋症, 丹毒, 瘡瘍癰腫, 濕疹, 毒蛇咬傷” 이라 하였으며, 임상에서는 上氣道炎, 扁桃腺炎, 氣管支炎, 肺炎, 流行性耳下腺炎, 百日咳 등의 호흡기감염증, 急性胃腸炎, 赤

痢 등의 소화기계감염증, 尿道炎, 腎盂腎炎 등의 비뇨기계감염증, 瘡癤 등의 화농성감염증, spirochaeta 감염증 등을 치료하며¹⁸⁾, 急性黃疸型肝炎, 化膿性中耳炎, 血栓閉塞性脈管炎, 神經性皮炎 眼結膜炎 등과 毒蛇咬傷, 癰腫瘡瘍, 濕疹 등의 증상을 치료하는데 상용되고 있다^{1,19)}.

성분으로는 andrographolide를 주성분으로 하여 panicolide, andrographan, andrographon, andrograpanin, andrographin, panicolin 등이 함유되어 있으며^{1,3)}, 성분 연구로 Pramanick 등²⁰⁾은 葉에서 andropanolide와 isoandrographolide, minor diterpenoids를, Qizhen 등²¹⁾은 andrographolide와 neoandrographolide를 각각 분리하였고, Shen 등²²⁾은 6개의 새로운 ent-Labdane diterpenoids를, Reddy 등²³⁾은 지상부분과 뿌리에서 flavone과 23-carbon terpenoid를 분리했다.

약리작용으로는 Wiart 등²⁴⁾은 잎에서 추출된 ent-labdane diterpenes가 herpes simplex virus 1(HAV-1)에 대하여 항바이러스 효과가 있다고 보고하였고, Ji 등²⁵⁾은 andrograpanin 성분이 infection, inflammation, cold, fever, 그리고 diarrhea 등을 치료하는 메카니즘을 규명하였으며, Burgos 등²⁶⁾은 andropanolide 성분이 IFN- γ 와 IL-2 cytokine 생산을 억제하여 면역증강과 항염증 효과가 있다고 보고하였다. 또한 Kumar 등¹⁰⁾은 메탄을 추출물에서 항암효과와 면역 조절효과를 보고하였다.

이 밖에 주성분인 andrographolide의 약리작용에 대한 연구로, Yu 등²⁷⁾은 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 쥐를 이용한 실험에서 저혈당 glucose에 대한 glucose 이용률을 증가시킨다고 보고하였다.

현재 암치료에 사용되고 있는 항암제는 무제한 증식하는 암세포에 작용하여 암세포의 증식과 성장을 억제하는데, 동시에 정상세포에도 손상을 입혀, 일시적인 혈구감소, 구토, 설사, 식욕감퇴, 탈모 등 여러 가지 부작용을 일으킨다²⁸⁾. 따라서 천연물로부터 면역기능을 높여주고 정상세포에 대한 독성없이 선택적으로 암세포만을 파괴할 수 있는 이상적인 치료제에 대한 연구가 많이 시도되고 있다.

잠재적인 암 치료제 가능성을 제시한 Rajagopal 등¹³⁾의 보고에서와 같이 穿心蓮의 항염, 항바이러스, 항당뇨, 간 보호작용과 항산화 효능, 면역 조절작용, 항암작용 등이 보고되었지만, 폐암세포의 항암효과를 직접 비교한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

이에 저자는 穿心蓮을 전탕 추출과 이로부터 분획별 추출물을 얻은 후, 폐암세포에서의 cell proliferation, apoptosis, morphology 및 cytokine level을 측정하였다.

본 실험에서는 穿心蓮 전탕 추출물이 폐암세포의 세포증식에 미치는 영향을 비교하였다. 폐암세포(A549)에 穿心蓮 전탕 추출물을 농도별로 처리한 뒤 세포의 증식을 확인한 결과, Control에 비해 폐암세포에서는 穿心蓮 전탕 추출물을 10 mg/ml의 농도로 처리한 경우 세포증식이 가장 낮았다. 암세포의 증식이 감소되었다는 것은 항암효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다.

세포의 apoptosis(programmed cell death)는 특이 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체 방어기전이며²⁹⁾, 정상적인 조직에서는 apoptosis를 통해 세포의 증식과 사멸이 균형을 이루게 되는데 이런 apoptosis의 조절에 이상이 생김으로 인해 세포의 증식과 사멸의 균형이 깨어지게 되면 악성종양으로의 변형이 일어날 수 있게 된다³⁰⁾. 본 실험에서는 穿心蓮 전탕 추출물이 폐암세포의 apoptosis에 미치는 영향을 농도별, 분획별로 비교하였다. 폐암세포에서는 농도 의존적으로 apoptosis를 증가시켰으며, 또한 EtOEt의 분획 추출물을 처리하였을 때 폐암세포의 apoptosis가 현저하게 증가하였다. 즉 암세포의 apoptosis가 증가한 것은 항암효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다.

폐암세포에 穿心蓮 전탕 추출물을 농도별, 분획별로 처리한 후 세포의 형태를 확인한 결과, 폐암세포에서는 Control에 비해 세포의 수가 현저히 감소하였고, 농도가 높을수록 세포가 더욱 많이 감소하였으며, 분획 추출물들을 처리한 경우는 Control에 비해 세포의 수가 현저히 감소되었고, 특히 EtOEt 혹은 EtOAc 분획 추출물을 처리한 경우 폐암세포의 사멸이 현저히 증가하였다.

Cytokine은 혈액속에 함유되어 있는 면역단백의 하나로, 여러가지 면역세포들에 의해 만들어지며, 면역세포의 활성화, 성장, 분화 등에 영향을 미칠 수 있다. 본 실험에서는 전환성장인자(TGF- β), 종양괴사인자(TNF- α)의 양을 측정하여 그 생성량으로 항암효과를 확인하였다.

TGF- β 는 T세포와 macrophage의 표면에서 발현하는 cytokine으로 일반적으로 세포의 성장을 저해하는 경우가 많으나, TGF- β 가 과도하게 발현되는 암세포의 경우에는 TGF- β 신호로 인해 오히려 세포 성장을 촉진시켜 암세포의 증식을 증가시키는 경향을 나타내며, 더불어 백혈구의 증식을 억제하고 활성도를 저하시켜 암세포에 대한 공격성을 감소시키는 결과를 낳는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 본 실험에서는 穿心蓮 전탕 추출물이 폐암세포의 TGF- β 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 폐암세포에 穿心蓮 전탕 추출물을

처리한 경우 Control에 비하여 TGF- β 는 생성이 유의하게 감소하였다. 따라서 穿心蓮 전탕 추출물 처리에 의해서 암세포에서의 TGF- β 가 감소된 것은 穿心蓮 전탕 추출물의 항암효과를 의미한다고 볼 수 있다.

TNF는 종양괴사인자로서 α 와 β 의 2종류가 있는데, TNF- α 는 Th1세포와 Th2세포, 그리고 T세포에서 용해성 세포막 조합 형태로 만들어지고 antitumor activity를 가지고 있어, 암세포를 직접적으로 죽일 수 있는 대식세포에 대한 활성화 신호를 전달한다. TNF 수용체 계열 중 일부는 apoptosis에 의한 세포 죽음을 유발하도록 자극하기도 하며, 낮은 양의 TNF- α 는 염증반응에서 백혈구들이 혈관내피세포에 부착하는 것을 촉진함으로써 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키고, mononuclear phagocytes에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 cytokine을 생산하게 만들어 염증반응을 촉진한다³²⁾. 본 실험에서는 穿心蓮 전탕 추출물이 폐암세포의 TNF- α 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 폐암세포에 穿心蓮 전탕 추출물을 농도별로 처리한 경우, 5 mg/ml와 10 mg/ml 농도에서 TNF- α 의 생성이 유의하게 증가하였다. 穿心蓮 전탕 추출물 처리에 의해서 암세포에서의 TNF- α 가 증가한 것은 antitumor activity의 증가로 해석할 수 있다.

Interferon (IFN)에는 α , β , γ 의 3 종류가 있는데, IFN- α 는 백혈구에서 생성되고, IFN- β 는 virus 감염 섬유아세포에서 생성되며, IFN- γ 는 활성화된 T림프구와 NK세포에서 생성된다. 3 종류의 IFN에 공통으로 나타나는 활성은 virus 감염의 저지, 세포증식의 억제, NK세포, Tc림프구, B림프구의 활성화, MHC 항원발현의 촉진 등인데, 면역계에서 가장 강하게 작용하는 것은 IFN- γ 이며, 이것은 외부 침입자와 후천성 면역 등에 대한 숙주의 방어에 중심적 역할을 가지고 여러 면역세포나 또는 암세포 자신의 암억제 작용기전을 촉진시킨다고 알려져 있다³³⁾. 본 실험에서는 穿心蓮 전탕 추출물이 폐암세포의 IFN- γ 분비에 미치는 영향을 비교하였다. Control에 비해 폐암세포를 穿心蓮 전탕 추출물을 농도별로 처리한 경우, 농도가 증가함에 따라 IFN- γ 를 분비하는 세포가 증가하였다. 여기에서 IFN- γ 를 분비하는 세포가 증가했다는 것은 약물이 암세포 스스로 암 억제기전을 촉진한 것으로 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합하면, 穿心蓮의 전탕 추출물과 분획 추출물이 농도와 분획에 따라 약간의 차이는 있으나 전반적으로 폐암세포에 대한 증식 억제효과가 있다고 사료된다.

결론

穿心蓮을 전탕 추출하여 이로부터 분획별 추출물을 얻은 후, 폐암세포에 대한 영향과 정상 면역세포에 대한 영향을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 穿心蓮 전탕 추출물은 폐암세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다.
2. 穿心蓮 전탕 추출물은 폐암세포의 자연사멸을 농도 의존적으로 증가시켰다.
3. 穿心蓮 전탕 추출물의 분획 추출물 중 EtOEt의 분획 추출물이 자연사멸을 가장 많이 증가시켰다.
4. 穿心蓮 전탕 추출물은 폐암세포에서 농도 의존적으로 TGF- β 분비를 감소시키고, TNF- α 분비를 증가시켰으며, IFN- γ 분비 세포의 비율을 증가시켰다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 경원대학교 연구비 지원을 받았기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社. 1979:1728-31.
2. 國家藥典委員會編. 中華人民共和國藥典 2005年版 1部. 北京:化學工業出版社. 2005:189-90.
3. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社 1999:(7):437-44.
4. Coon JT, Ernst E. *Andrographis paniculata* in the treatment of upper respiratory tract infections: a systemic review of safety and efficacy. *Planta Med.* 2004;70(4):293-8.
5. Gabrilian ES, Shukarian AK, Goukasova GI, Chandanian GL, Panossin AG, Wikman G, Wagner H. A double blind, placebo-controlled study of *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in the treatment of acute upper respiratory tract infections including sinusitis. *Phytomedicine.* 2002;9(7):589-97.
6. Singha PK, Roy S, Dey S. Antimicrobial activity of *Andrographis paniculata*.

- Fitoterapia. 2003;74(7-8):692-4.
7. Reyes BA, Bautista ND, Tanquilut NC, Anunciado RV, Leung AB, Sanchez GC. Anti-diabetic potenciales of *Momordica charantia* and *Andrographis paniculata* and there effect on estrous cyclicity of alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2006;21:105(1-2):196-200.
 8. Ram VJ. Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents. *Drug News Perspect*. 2001;14(6):353-63.
 9. Trivedi NP, Rawal UM. Hepatoprotective and anti-oxident property of *Andrographis paniculata* (Nees) in BHC induced liver damage in mice. *Indian J Exp Biol*. 2001;39(1):41-6.
 10. Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol*. 2004;92(2-3):291-5.
 11. Dua VK, Ojha VP, Roy R, Joshi BC, Valecha N, Devi CU. Anti-malarial activity of some xanthone isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol*. 2004;95(2-3):247-51.
 12. Shukla B, Visen PK, Patnaik GK, Dhawan BN. Choleric effect of andrographolide in rats and guinea pigs. *Planta Med*. 1992;58(2):146-9.
 13. Rajagopal S, Kumar RA, Deevi DS, Satyanarayana C, Rajagopalan R. Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *J Exp Ther Oncol*. 2003;3(3):147-58.
 14. Mervyn J, Mary D, Gerald M C. Antitumor activity of 1-naphthol against L1210 leukemia in vivo and enrich ascites tumor cells in vivo and in vitro. *Cancer letters*. 1986;33:347-54.
 15. Pellegrion M, Ferrone S and Theofilopoulos A. Isolation of human T and B cells by rosette formation with 2-aminoethylisothiuronium bromide(AET)-treated sheep red blood cells and with monkey red blood cells. *J Immunol Meth*. 1976;11:273-7.
 16. Kishimoto T, A E G, von dem Brone. *Leucocytotyping VI: White cell differentiation antigens*. London:Garland publishing Inc. 1998.
 17. Thibaut, E, Amigorena S, Moncuit J, Fridman W H, and Teilaud J L. Software for the quantitative evaluation of in vitro monoclonal antibody production from ELISA data. *J Immunol Meth*. 1987; 104:15-24.
 18. 이상인, 안덕균, 신민교 편역. *한약임상응용*. 서울:정보사. 1982:151.
 19. 劉壽山. *中藥研究文獻摘要*. 北京:科學出版社. 1979:500-5.
 20. Pramanick S, Banerjee S, Achari B, Das B, Sen AK Sr. Andropanolide and isoandropanolide, minor diterpenoids from *Andrographis paniculata*: structure and X-ray crystallographic analysis. *J Nat Prod*. 2006;69(3):403-5.
 21. Qizhen D, Jerz G, Winterhalter P. Separation of andropanolide and neoandropanolide from the leaves of *Andrographis paniculata*, using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 2003;984(1):147-51.
 22. Shen YH, Li RT, Xiao WL, Xu G, Lin ZW. ent-Labdane diterpenoids from *Andrographis paniculata*. *J Nat Prod*. 2006;69(3):319-22.
 23. Reddy MK, Reddy MV, Gunasekar D, Murthy MM, Caux C, Bodo B. A flavone and an unusual 23-carbon terpenoid from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*. 2003;62(8):1271-5.
 24. Wiart C, Kumar K, Yusof MY, Hamimah H. Antiviral properties of ent-Labdane diterpenoids of *Andrographis paniculata* nees, inhibitors of herpes simplex virus type1. *PhytotherRes*. 2005;19(12):1069-70.
 25. Ji LL, Wang Z, Dong F, Zhang WB, Wang ZT. Andrograpanin, a compound isolated from anti-inflammatory traditional Chinese medicine *Andrographis paniculata*, enhances chemokine SDF-1 α -induced leukocytes chemotaxis. *J Cell Biochem*. 2005;95(5): 970-8.
 26. Burgos RA, Seguel K, Perez M, Meneses A,

- Ortega M. Andropanolide inhibits IFN- γ and IL-2 cytokine production and protects against cell apoptosis. *Planta Med.* 2005;71(5):429-34.
27. Yu BC, Hung CR, Chen WC, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of andrographolide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* 2003;69(12):1075-9.
28. Mervyn J, Mary D, Gerald M C. Antitumor activity of 1-naphthol against L1210 leukemia in vivo and Ehrlich ascites tumor cells in vivo and in vitro. *Cancer letters.* 1986;33:347-54.
29. Evans VC. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int.* 1993;17(5):461-76.
30. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Adv Cancer Res.* 2005;94:143-96.
31. Gajdusek CM, Luo Z, Mayberg MR. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1: Synergistic mediators of angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol.* 1993;157:133-44.
32. Roit IM, Brostoff J, Male DK, Livingstone C. *Immunology.* London:Gower Medical Publishing. 1989:9.6-9.13.
33. Kakimi K, Guidotti L, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med.* 2000;192:921-30.