

변행초 추출물의 항염증 및 종양억제 효과

최혜정¹, 이성태², 권기석³, 주우홍^{1*}

¹창원대학교 생물화학융합학부

²순천대학교 약학대학

³안동대학교 생약자원학과

Received: September 1, 2015 / Revised: December 4, 2015 / Accepted: December 4, 2015

Anti-inflammatory and Anti-tumor Effects of *Tetragonia tetragonoides* Extracts

Hye Jung Choi¹, Sung-Tae Yee², Gi-Seok Kwon³, and Woo Hong Joo^{1*}

¹Department of Biology and Chemistry, Changwon National University, Changwon 641-773, Republic of Korea

²College of Pharmacy, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Republic of Korea

³Department of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

We examined the anti-inflammatory effect and anti-tumor activity of *Tetragonia tetragonoides* crude extracts and fractions. The anti-inflammatory activity of *T. tetragonoides* was exerted through the inhibition of lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/ml), induced nitric oxide (NO) and interleukin (IL)-1β production. The production of IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)-α also decreased in LPS induced RAW264.7 cells after treatment with polysaccharide (PS) fraction. Furthermore, the hexane (HX) fraction strongly inhibited the granulocytes macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) production. In ICR mice previously inoculated with Sarcoma 180, the life prolongation effects were 16.67% with an intraperitoneal injection of methanol (MeOH) extract and polysaccharide fraction at a dose of 100 mg/kg/day. The results are an important preliminary step toward the development of effective anti-inflammatory and anti-tumor agents using *T. tetragonoides*.

Keywords: Anti-inflammatory, anti-tumor, RAW264.7 cells, ICR mice, *Tetragonia tetragonoides*

염증반응은 병원체와 같은 외부 항원이 체내로 침입하거나 세포 조직이 손상받았을 때 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 생체 방어를 위한 필수적인 반응이다. 그러나 이런 반응이 지속적일 경우 외부자극과 염증 매개인자에 의해 활성화된 대식세포는 다양한 염증성 cytokine, chemokine, NO 및 prostaglandin E₂(PGE₂)를 생성하고 다른 면역세포들을 염증부위로 유도하며[9, 14], 그로 인해 인슐린 저항성 증가, 종양세포의 성장 촉진, 동맥경화 및 류마티스와 같은 다양한 질병이 유발된다[1, 5]. 따라서 염증성 사이토카인의 생성을 조절할 수 있는 물질은 만성염증 및 자가면역질환에 대한 치료제로 사용될 수 있다. 한편 항암 화학요법은 암세포에 대한 처방으로 세포의 DNA 복제, 전사 및 번역 등 세포 생존을 억제함으로써 효과를 나타낸다. 그러나 전신의 세포에 영향을 미치므로 구토, 탈모, 면역력 저하 등 부작용을 유발하

고, 장기간 약물 처방에 따른 내성으로 암세포의 완전한 치료를 어렵게 한다[7]. 천연물 소재를 이용한 생리활성 및 약리학적 연구는 새로운 약물개발을 위한 기초연구로서 잠재적으로 가능성이 있는 소재를 발굴하며 나아가 그 기능을 확인함으로써 신약 개발에 필수적으로 중요한 과정이다. 특히 식품이나 약물로서 사용해오던 식품소재나 약용작물로부터 추출한 성분은 기본적으로 안전성이 입증되어 있으며, 활성분획물의 정제로 기능성을 증대시킬 수 있다는 점에서 연구의 주요 대상이 되고 있다.

변행초는 서양에서 “New Zealand spinach”로 불리는 식용작물로 샐러드나 나물로 섭취할 수 있으며, 예로부터 위궤양, 위염 등 위장병에 좋은 약용작물로 잘 알려져 있다[8, 15]. 또한 수용성 다당성분은 항염증 활성이 있는 것으로 보고되어 있으며[8, 13], 본 연구진의 기 연구에서 변행초 분획물이 항균, 항산화 및 항당뇨 기능이 있음을 보고한 바 있다[2, 3, 10]. 따라서 본 연구에서는 변행초에 대한 기능성 연구의 일환으로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 변행초 추출물 및 분획물을 처리하여 항염증 효능을 검증하였으며, Sarcoma-

*Corresponding author

Tel: +82-55-213-3453, Fax: +82-55-213-3459

E-mail: whjoo@changwon.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

180을 복강에 투여한 마우스에서 종양에 대한 생명연장 효과를 측정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

번행초 건조 1 kg를 methanol(MeOH)과 1:3 비율로 혼합하여 실온에서 6시간 동안 진탕하여 3회 반복 추출하였고, 회전 진공 농축하여 MeOH(70.0 g) 추출물을 얻었다. 유기용매 계통분획법에 따라 hexane(HX, 14.35 g), dichloromethane(DCM, 8.97 g), ethylacetate(EA, 6.99 g), 그리고 butanol(BuOH, 5.15 g) 순으로 용매 분획하여 분획물을 순차적으로 얻었다. 여과과정에서 MeOH에 녹지 않는 다당류(58.0 g) 성분도 분리하였으며, 각 시료는 DMSO 또는 증류수에 녹여 0.22 μ m로 필터하여 4°C에 보관하며 사용하였다.

실험동물은 (주)대한바이오링크(충청북도, 음성군, 한국)에서 생후 6주령의 암컷 ICR 마우스를 공급받아 폴리카보네이트 사육상자(18×20 cm)당 5개체의 밀도를 유지하였고 온도 21±2°C, 습도 55±10%의 환경에서 실험동물용 고품사료와 여과된 멸균 정제수를 충분히 공급하면서 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하여 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하였다. 모든 동물실험은 순천대학교 동물실험윤리위원회의 승인(SCNU IACUC permit Number: 2013-1)을 받은 후에 수행하였다.

RAW264.7 세포, 인간 혈액암계열 세포주 HL-60, 폐암계열 세포주 A-549 및 종양세포 Sarcoma-180은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학 암연구소)에서 구입하였다. 세포배양은 sodium bicarbonate(NaHCO₃, 2 g/l), 10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 units/ml streptomycin sulfate, 25 μ g/ml amphotericin B, 50 μ M 2-mercaptoethanol(2-ME), 10% fetal bovine serum(FBS)가 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하였다. Nitric oxide(NO) 생성량 측정은 Griess 시약을 이용하여 산화물인 NO₂⁻ 농도를 측정함으로써 확인하였다. RAW264.7 세포 5×10⁴에 추출물을 농도별로 첨가하고 30분간 전처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액에 동량의 Griess 시약 첨가하여 10분간 반응시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, nitrite의 농도는 sodium nitrite의 표준 곡선과 비교하여 계산하였다.

또한 사이토카인 생성량 측정을 위해 동일한 조건에서 RAW264.7 세포를 배양하였고, 배양액 내의 염증성 사이토카인 interleukin(IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- α 및 granulocytes macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)의 양은 효소항체법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 측정하였다. 즉, 1차 항체 goat anti-human cytokine을 50 μ l/well로 분주하고 4°C에서 overnight 한 다음, 10% FBS가 첨가된 PBS로 blocking하였다. 적당한 비율로 희석한 세포 배양 상층액과 biotin이 부착된 2차 항체 100 μ l/well를 분주하고 일정시간 상온에서 반

응시킨 뒤 avidin-peroxidase 100 μ l/well와 2,2'-azino-bis를 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 cytokine의 농도는 표준곡선을 이용하여 환산하였고 측정 농도의 한계치는 10 pg/ml이었다. 수명 연장 시험은 마우스를 무작위로 10마리씩 나누어 대조군, MeOH 처리군 및 다당류 처리군으로 나누고 이들 마우스 복강에 Sarcoma-180(3×10⁶)을 주입한 후, 각 추출물을 100 mg/kg/day 용량으로 400 μ l의 PBS에 희석하여 경구투여하였다. 3일 간격으로 30일까지 체중을 측정하였고, 생존일수 중앙치(median survival time, MST)로 다음 식과 같이 연명률(increase in life span, % ILS)을 계산하였다.

$$\% \text{ ILS} = (T/C - 1) \times 100$$

[T: 처치군의 MST, C: 대조군의 MST]

번행초 추출물 및 분획물의 항염증 효능 측정을 위해 0.1–100 μ g/ml 농도로 세포 생존도를 측정한 결과, 영향이 없는 것으로 확인되었으며 활성을 보이는 최저농도인 10 μ g/ml을 실험농도로 설정하였다. RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증 매개인자인 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 1 μ g/ml의 LPS 처리시 증가된 NO는 다당류보다는 MeOH 추출물에 의해 생성이 억제됨이 관찰되었으며, 특히 HX 분획물에 의해 현저히 감소되는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 염증성 효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 생성되는 NO는 과다 생성시 염증 반응을 심화시켜 조직손상 및 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다[12]. 황금 열수추출물과 고삼 에탄올 추출물은 각각 40 μ g/ml, 20 μ g/ml의 농도에서 NO 생성을 약 40% 저해하는 것으로 보고되고 있으나[6, 16], 번행초의 HX 분획물은 10 μ g/ml의 저농도에서 약 60% 억제하는 것으로 나타나 염증매개인

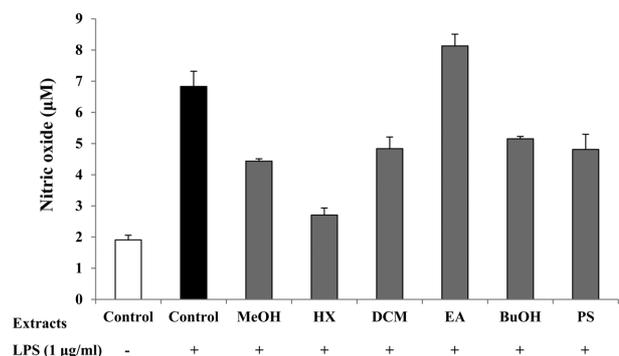


Fig. 1. Effects of solvent extracts or PS fraction on LPS-induced NO production in RAW264.7 macrophages. Cells were pretreated with the indicated concentrations of solvent extracts or PS fraction for 30 min before 1 μ g/ml LPS treatment for 48 h. NO in culture medium was determined using the Griess reagent.

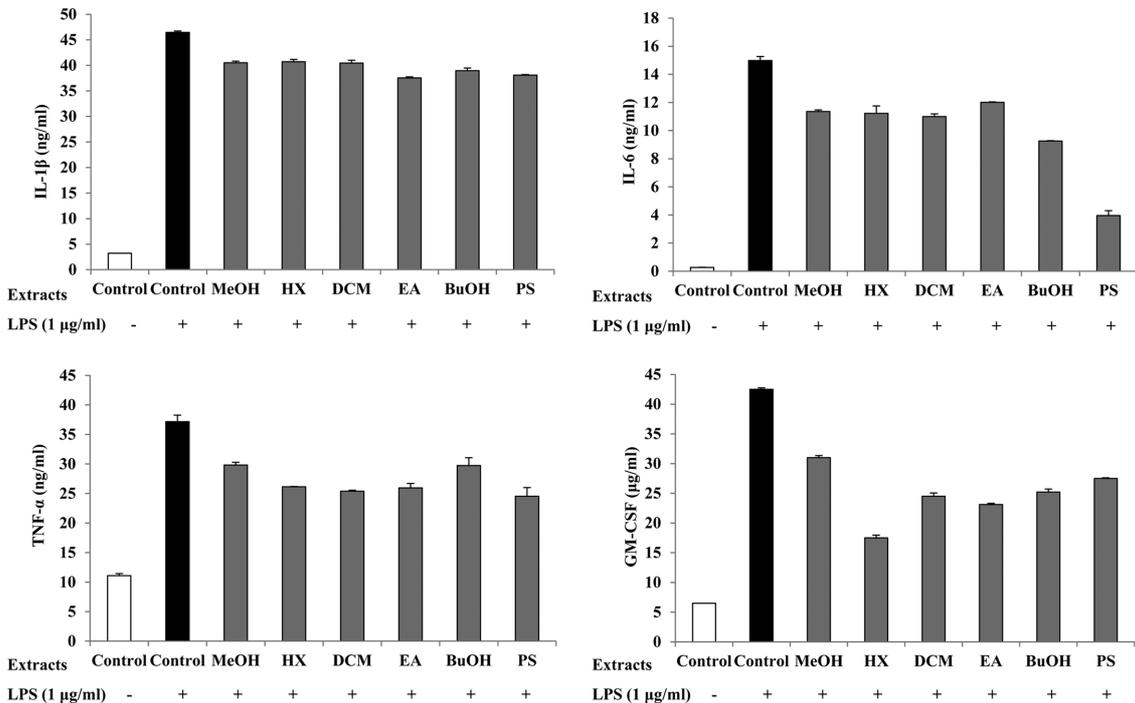


Fig. 2. Effects of solvent extracts or PS fraction on LPS-induced production IL-1 β , IL-6, TNF- α and GM-CSF in RAW264.7 macrophages. Cells were pretreated with the indicated concentrations of solvent extracts or PS fraction for 30 min before 1 μ g/ml LPS treatment for 24 h. The amounts of IL-1 β , IL-6, TNF- α and GM-CSF were next determined using the ELISA test.

자로서 중요한 작용을 하는 NO 생성을 보다 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 또한 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 GM-CSF 분비를 조절하는 효과는 다당류 추출물이 LPS에 의해 유도된 IL-6의 생성을 현저하게 억제하였으며, TNF- α 에 대해서도 다른 분획물에 비해 다소 높은 생성 억제효능을 보였다(Fig. 2). 또한 HX 분획물은 대식세포 증식을 조절하는 GM-CSF의 생성을 억제하는데 가장 효과적으로 작용하였으며, TNF- α 의 생성도 DCM 분획물과 같이 유의하게 조절하는 것으로 확인되었다. 따라서 변형초 추출물은 염증반응의 초기 단계부터 만성염증에 이르기까지 관여하는 사이토카인의 분비를 조절하는 것으로 확인되었다. 오미자 HX 분획물에서 항염증 및 면역증강에 효능이 있는 α -iso-cubebene이 분리되어 보고되고 있으며, lignans 등 활성 성분의 함량도 높은 것으로 보고되고 있는 바[4], 본 연구에서도 HX 분획물에서 활성이 높은 것으로 나타났다. 한편 변형초의 수용성 다당류 분획물을 25 mg/kg 농도로 마우스에 처리했을 때 염증반응의 하나인 부종을 약 35% 억제한다고 보고되고 있으며[8], 주요 성분은 α (1, 6) 결합의 3-O-acetyl-D-glucose 반복 구조에 α -L-arabinofuranose와 α -L-rhamnopyranose가 연결되어 있는 구조임이 확인되었다. 또한 분리된 cerebrosides와 steryl glucoside는 위궤양에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[15]. 그러므로 본 연구에서는

부종 억제효과를 보이는 항염증 활성을 입증하기 위하여 구체적인 연구를 진행하였으며 이러한 결과는 변형초의 HX 분획물과 다당성분에 상기 언급한 항염증 등 활성 물질도 다수 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다, 활성물질에 대한 추가적인 자세한 연구가 필요하다.

한편 예로부터 위암 등 항암 효과가 있는 것으로 알려진 변형초의 항암효과를 조사하기 위해 혈액암 세포주, 폐암 세포주 및 복수암에 대한 억제 활성을 조사한 결과, 혈액암과 폐암 세포의 증식에는 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(unpublished data). 마우스 실험을 통한 복수암에 대한 효능은 마우스를 3개의 그룹으로 분류하고 Sarcoma-180을 주사하여 복수암을 유발시킨 뒤, 변형초 추출물을 경구투여 하면서 수명 연장효과를 조사하였다(Fig. 3). 대조군은 종양 증식에 의한 체중 증가가 시료 처리군에 비해 빠른 것으로 조사되었으며, 평균수명은 18일이었고 20일에 모두 죽는 것으로 나타났다. MeOH 처리군은 대조군에 비해 종양 증식 속도가 느렸고 평균수명은 가장 긴 23일이었으며, 다당류 처리군의 종양 증식 속도는 가장 느린 것으로 확인되었다. 18일을 기점으로 체중이 서서히 감소하였고 25일경 모두 죽었으며, 평균수명은 21.7일이었다. 생존 중앙값과 연명률은 Table 1에 나타내었다. 변형초의 MeOH 추출물과 다당류는 지속적인 DNA 복제가 일어나는 종양세포의 분열 속도를 늦

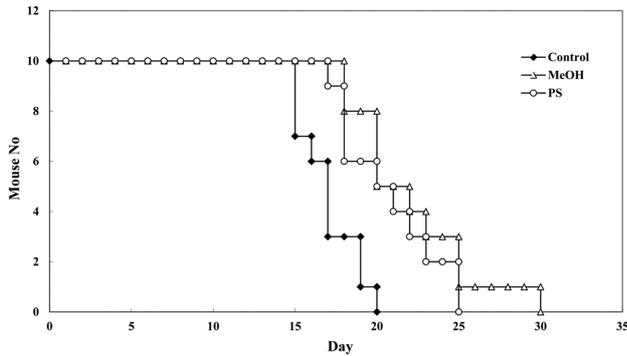


Fig. 3. Kaplan-Meier plot visualizing length of survival by MeOH extract and PS fraction from *Tetragonia tetragonoides* after oral administration in ICR mice pre-inoculated with Sarcoma 180. *n* = 10 animals in each group (*p* < 0.001; Log-rank, Mantel-Cox).

Table 1. Median survival of mice subjected to different treatments.

	Median survival (days)	Life span (%)	Increase of life span (%)
Control	18	100	-
MeOH ¹⁾	21	116.67	16.67
PS ²⁾	21	116.67	16.67

¹⁾MeOH extract
²⁾Polysaccharide fraction

추는 기작으로 수명을 연장시키는 것으로 사료된다. 일반적으로 버섯 유래의 항암성 고분자 다당류는 잘 알려져 있으며, 암세포에 직접 작용하기보다 면역기능을 증강시킴으로써 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다[11]. 변행초의 다당 성분은 *in vitro*에서 위궤양 및 위암세포에 대한 효과가 보고되어 있으나, 본 연구에서 경구투여시 마우스에서 항암 효과를 실증적으로 확인할 수 있었다.

최근 연구 개발되는 항암제는 대부분 복약 순응도를 높이기 위해 경구제로 투여되고 있는 추세이므로, 본 연구를 토대로 변행초 추출물을 이용하여 보다 다양한 인체암에 대해 *in vivo* 실험을 통해 정확한 효능을 검증할 필요성이 있으며, 특히 변행초는 오래 전부터 식용으로 사용되고 있으므로 경구제제로도 개발 가능하다. 또한 건강식품으로의 개별인증을 함으로써 다양한 제제화도 가능할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 변행초의 추출물과 분획물의 항염증 효과 및 항암 활성에 대해 연구하였다. 변행초의 항염증 활성은 1 µg/ml LPS로 유도되는 NO 및 IL-1β의 생성이 억제됨을

통해 확인되었다. IL-6 및 TNF-α도 1 µg/ml LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 다당류 추출물을 처리한 후 생성이 감소되었다. 나아가 HX 분획물은 GM-CSF의 생성을 강력하게 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 Sarcoma 180을 미리 주사한 ICR 마우스에 MeOH과 다당 추출물을 100 mg/kg/day 복강내 투여시 16.67%의 수명 연장 효과가 관찰되었다. 이상의 결과는 변행초를 이용하여 효과적인 항염증 및 항암제 개발을 위한 사전조사로써 중요한 결과를 제공한다.

Acknowledgments

This research is financially supported by Changwon National University in 2015-2016.

References

- Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. 1989. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *The Lancet* **2**: 244-247.
- Choi HJ, Kang JS, Choi YW, Jeong YK, Joo WH. 2008. Inhibitory activity on the diabetes related enzymes of *Tetragonia tetragonoides*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 419-424.
- Choi HJ, Park MR, Kang JS, Choi YW, Jeong YK, Joo WH. 2008. Antimicrobial activity of four solvent fractions of *Tetragonia tetragonoides*. *Cancer Prev. Res.* **13**: 205-211.
- Choi YW, Kim HJ, Park SS, Chung JH, Lee HW, Oh SO, et al. 2009. Inhibition of endothelial cell adhesion by the new anti-inflammatory agent α-iso-cubebene. *Vascul. Pharmacol.* **51**: 215-224.
- Gabay C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **8**: 53.
- Han MH, Lee MH, Hong SH, Choi YH, Moon JS, Song MK, et al. 2014. Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their mixtures in RAW 246.7 murine macrophages. *J. Life Sci.* **24**: 329-335.
- Hofman M, Morrow GR, Roscoe JA, Hickok JT, Mustian KM, Moore DF, et al. 2004. Cancer patients' expectations of experiencing treatment related side effects: a University of Rochester cancer center-community clinical oncology program study of 938 patients from community practices. *Cancer* **101**: 851-857.
- Kato M, Takeda T, Ogihara Y, Shimu M, Nomura T, Tomita Y. 1985. Studies on the structure of polysaccharide from *Tetragonia tetragonoides*. I. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 3675-3680.
- Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, et al. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-α (TNF-α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)-κB activation on cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 617-620.

10. Lee MA, Choi HJ, Kang JS, Choi YW, Joo WH. 2008. Antioxidant activities of the solvent extracts from *Tetragonia tetragonoides*. *J. Life Sci.* **18**: 220–227.
11. Lee KY, Han MJ, Park SY, Kim DH. 2000. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**: 477–480.
12. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. 2009. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of auto-inflammatory disease. *Ann. Rev. Immunol.* **27**: 621–668.
13. Mori K, Kinsho T. 1988. Synthesis of sphingosine relatives, VII. Synthesis of anti-ulcerogenic cerebroside isolated *Tetragonia tetragonoides*. *Liebigs Ann. Chem.* **8**: 807–814.
14. Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell* **78**: 915–918.
15. Okuyama E, Yamazaki M. 1983. The principles of *Tetragonia tetragonoides* having antiulcerogenic activity. II. Isolation and structure of cerebroside. *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 2209–2219.
16. Park HJ, Kim SM, Kwon HJ, Lee HT, Kim BW, Kim TH, *et al.* 2014. Anti-inflammatory effect of *Scutellaria baicalensis* hot water extracts containing baicalin on modulation of the immune system in Raw264.7 cells. *J. Life Sci.* **24**: 219–226.