

선복화 에탄올 추출물의 Nitric Oxide 생성, 산화스트레스 및 대장암 세포 억제효과

노종현¹ · 정다은¹ · 정호경 · 이무진 · 장지훈 · 심미옥 · 정자균 · 조현우[†]
한약진흥재단

Inhibitory Effect of an Ethanol Extract of *Inulae Flos* on Nitric Oxide Production, Oxidative Stress and Human Colorectal Cancer Cell Lines

Jong Hyun Nho¹, Da Eun Jung¹, Ho Kyung Jung, Mu Jin Lee, Ji Hun Jang, Mi Ok Sim, Ja Kyun Jung and Hyun Woo Cho[†]

National Development Institute of Korean Medicine, Janghung 59338, Korea.

ABSTRACT

Background: *Inula japonica* Thunb. is a plant belonging to the family Compositae. *Inulae flos* (flower of *I. britannica* var. *chinensis* Regal.) is the dried flower of *I. japonica* Thunb. and contains various flavonoids (patulitrin, nepitrin and kaempferol), which have been utilized in traditional oriental medicine to treat nausea, phlegm, and coughs. However, ethanol extract of *I. britannica* (IJE) has not been previously studied for its use in cancer treatment, and its effects on oxidative stress, or inflammation. Thus, the present study investigated the anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-colorectal cancer effects of IJE using RAW264.7 and HCT-116 cells, which are human colorectal cancer cell line.

Methods and Results: IJE contained flavonoids (80.95 ± 5.3 mg/g) and polyphenols (310.53 ± 10.6 mg/g). Moreover, it reduced lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production and H₂O₂-induced oxidative stress by decreasing reactive oxygen species (ROS) levels. Additionally, the 500 μ g/ml IJE treatment increased caspase-3 activity and apoptotic cell death in HCT-116 cells.

Conclusions: These results demonstrate that the anti-cancer effect of IJE against human colorectal cancer cells involves caspase-3 activation and apoptotic cell death. IJE also inhibited LPS-induced NO production, and H₂O₂-induced oxidative stress in RAW264.7 cells. However, further studies are required to explore how IJE treatment regulates signal transduction in NO and ROS production.

Key Words: *Inula britannica* var. *chinensis* Regal., Colorectal Cancer, Nitric Oxide, Oxidative Stress

서 언

금불초 (*Inula japonica* Thunb.)는 국화과 (Compositae)에 속하는 식물로 영문명으로는 Asian meadow-alant 또는 Asian yellow-starwort라고 알려져 있다. 우리나라, 일본, 중국에 많이 분포해있는 것으로 알려져 있다 (Lee, 2003).

선복화 (*Inula britannica* var. *chinensis* Regal., *Inulae flos*)는 금불초의 꽃봉오리를 건조시킨 것이며, patulitrin,

nepitrin, kaempferol과 같은 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 알려져 있고 (Kim *et al.*, 2002), 거담, 진해, 건위, 구토의 효과가 있어 예로부터 약으로 사용되었다 (Song, 2003).

현재까지 연구된 바로 금불초 전초 에탄올, 아세톤 추출물은 여러 암세포를 억제 하는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 (Cha *et al.*, 2006), 선복화 에틸아세테이트 분획은 여드름 유발균 (*Propionibacterium acnes*)을 억제하고 (Kim *et al.*, 2009), 고지혈증 억제 (Shan *et al.*, 2006), 주름개선 효능을

¹Jong Hyun Nho and Da Eun Jung are contributed equally to this paper

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-860-2873 (E-mail) thej01234@gmail.com

Received 2017 November 13 / 1st Revised 2017 November 28 / 2nd Revised 2018 January 22 / 3rd Revised 2018 January 29 / Accepted 2018 January 30

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.

가지고 있다 (Han *et al.*, 2013).

ROS (reactive oxygen species, 활성산소종)는 세포활동을 통해 생겨나는 물질들로, superoxide, radical, hydrogen 등이 이에 속하며, DNA 손상, 지방 산화, 세포막 손상과 같은 여러 과정에 작용한다 (Lee *et al.*, 2005). ROS의 증가로 인한 산화스트레스 (oxidative stress)는 여러 질환에 관여하는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 대식세포의 활성화를 유도하여 염증반응을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Kirkham, 2007). 따라서 항산화 효능 또는 유리라디칼 소거효과를 가진 물질을 이용해 염증반응과 산화적 손상을 억제할 수 있는 효과적인 자원식물을 찾기 위해 연구가 활발히 진행 되고 있다.

대장암 (colorectal cancer)은 진행 상태에서 병리학적 기전과 환경적인 요인이 잘 알려져 있으며, 주변 조직간 상호작용이 관여하여 다양한 전이 경로를 초래하는 이질적인 질환이다 (Ogino *et al.*, 2011). 뿐만 아니라 세계적으로 흔한 암 중 하나이고 우리나라를 포함한 아시아 국가에서 발병률이 급속하게 증가하고 있다 (Kim, 2013).

본 연구에서는 선복화의 대식세포에 대한 항산화 효과 및 NO 생성억제 효과와 대장암세포를 억제할 수 있는지 알아보기 위해 RAW264.7 세포주에 H₂O₂를 처리하여 산화스트레스를 유발하고, 휴먼 대장암 세포주인 HCT-116 세포주에 선복화 에탄올 추출물을 직접 처리하여 암세포 억제 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 선복화 (*Imula britannica* var. *chinensis* Regal.)는 2015년 8월 18일에 전북 정읍 (위도35.47°97'N, 경도 126.88°79'E)에서 채취하였으며, 대한민국 약전 (KP)을 근거로 하여 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수님과 전남대학교 생물학과 임형탁 교수님의 식물학적 동정을 거쳤다. 실험에 사용된 시료의 확정표본 (TKM-2102)은 한약진흥재단 한약자원본부에 보관하고 있다.

선복화의 꽃부분을 멸균수로 수세 한 뒤, 50°C 조건으로 열풍건조기에서 일주일간 건조하였다. 건조된 시료는 분쇄기로 분쇄하여, 에탄올을 칭량한 시료 무게의 10 배를 넣고 환류 냉각추출방법을 통해 70°C 조건에서 3 시간 3 회 반복하여 추출하였다. 추출된 시료는 filter paper (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 여과하고, 여과액을 동결 건조하여 시료를 PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 뒤 사용하였다.

2. 세포배양

RAW264.7 그리고 HCT-116 세포주는 한국세포주은행

(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1% penicilin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고 유지하였다.

3. 세포생존율 분석

세포생존율은 CellTiter 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하고 제조사에서 제공한 protocol에 따라 실험을 진행하였다.

HCT-116 세포를 96 well plate에 5 × 10⁴ cells/ml 농도가 되도록 분주하고, RAW264.7 세포를 96 well plate에 2 × 10⁵ cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 배양기에서 24 시간 배양한 후 천연 추출물을 각각 31.3, 62.5, 125, 250 그리고 500 µg/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였으며, MTS 시약 20 µl 를 넣고 2 시간 동안 배양한 후 microplate reader infinite[®] 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군에 대한 생존율로 표시하였고 이에 따라 추출물들의 암세포 사멸효과와 세포생존율을 측정하였다.

4. NO (nitric oxide) 농도 측정

LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에서 각 추출물의 NO 생성 억제효과를 측정하기위해 추출물을 여러 농도로 전처리한 뒤 500 ng/ml LPS (지질다당류, lipopolysaccharide)를 24 시간동안 처리하였다.

RAW264.7 세포주를 96 well plate에 2 × 10⁵ cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 배양기에서 24 시간 배양한 후 추출물을 각각 125, 250 그리고 500 µg/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 세포배양액과 griess reagent (Promega, Madison, WI, USA)를 1:1 비율로 혼합하여 넣고 10 분 동안 반응시킨 다음 microplate reader Infinite[®] 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

5. Caspase-3 활성도 측정

Caspase-3 단백질의 활성은 caspase-3 colorimetric detection kit (Enzo, Farmingdale, NY, USA)를 이용해 실험을 진행하였다.

HCT-116 세포는 PBS로 세척한 뒤 Pierce[™] protease and phosphatase inhibitor mini tablets (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)가 포함된 RIPA cell lysis buffer 2 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA)로 1 시간 동안 용해하였다. 세포용해액은 원심분리기로 4°C,

13,000 × g 조건에서 10 분간 원심분리 하였고, 단백질 농도를 Bradford assay를 이용하여 측정하였다.

총 20 µg의 단백질을 사용해 제조사가 제공한 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다.

6. FACS (fluorescence activated cell sorter) 분석

FACS를 이용한 분석에는 annexin V-FITC apoptosis detection kit (Enzo Life Sciences Inc., Farthingale, NY, USA)와 DCFDA cellular ROS detection assay kit (Abcam, Cambridge, England)를 사용하였다.

세포에 약물 처리 후 유도되는 apoptosis의 비율을 구하기 위해 제조사에서 제공한 protocol에 따라 annexin V-FITC와 PI 시약으로 염색시켰으며, 마찬가지로 H₂O₂ 처리에 따른 활성 산소종의 생성을 확인하기 위해 DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, H2DCFDA) 시약으로 염색하였다. 염색된 세포는 CytoFLEX (Beckman Clulter Inc., Brea, CA, USA)를 이용해 분석하였다.

7. DPPH radical 소거활성도 측정

각 시료의 전자공여능은 Blois (1958) 방법에 근거하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 free radical 소거법에 따라 측정하였다.

시료 100 µl에 0.2 mM DPPH 용액 100 µl를 첨가하여 상온에서 30 분간 반응시킨 후 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 IC₅₀ 값을 구하였다.

8. ABTS radical 소거활성도 측정

Pellegrini 등 (1999)의 방법을 일부 변형시켜 사용하였으며, 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 물에 녹여 ABTS 라디칼을 형성시키기 위해 1:1 비율로 섞은 뒤 암실에 12 시간 동안 보관하였다. ABTS 용액은 용액의 흡광도가 0.7 - 0.8이 되도록 희석한 뒤 실험에 사용하였다. 여러 농도의 시료 50 µl와 ABTS 용액 100 µl를 첨가하여 20 분 후에 734 nm에서 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하여 IC₅₀ 값을 구하였다.

9. SOD 유사활성도 측정

SOD 유사활성도 측정은 SOD assay kit-WST (Dojindo Molecular Technologies Inc., Rockville, MD, USA)를 이용하여 측정하였다.

각 시료 추출물을 20 µl와 WST working solution 200 µl을 섞은 후 다시 enzyme solution 20 µl를 넣어 혼합한 후 37°C incubator에서 20 분간 반응시키고 microplate reader

Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 IC₅₀ 값을 구하였다.

10. 폴리페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 Folin 과 Denis (1912)의 방법을 일부 변형시켜 측정하였다.

표준물질의 검량선 작성을 위해 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며, 각각 추출물에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 각각 160 µl를 첨가하고, 3 분간 상온에서 반응시킨 뒤 10% Na₂CO₃ 용액을 160 µl를 첨가하여 1 시간 동안 반응시켰다. 다음 실온에서 10,000 rpm, 10 분 동안 원심분리 하였으며 상등액을 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11. 플라보노이드 함량 분석

Moreno 등 (2000)의 방법을 사용하였으며, 각각 추출물의 플라보노이드 함량은 96 well plate에 시료 10 µl를 넣고, 10% aluminum nitrate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 1 M potassium acetate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 각각 4 µl, methanol 82 µl를 첨가하였다. 40 분간 암소 반응 한 뒤 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용해 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준물질의 검량선 작성을 위해 rutin hydrate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하였다.

12. 통계처리

통계처리는 평균 ± 표준편차 (Means ± SD)로 나타내었고, 그룹 간 유의성을 검정하기 위해 SPSS (Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하였다.

일원변량분석 (One-way ANOVA)을 실시하였으며, 유의성이 있는 경우 $p < 0.05$ 수준에서, Duncan's Multiple Range Test (DMRT)를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 선복화 에탄올 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 식물에 흔히 포함되어있는 물질로, 식물의 대사를 통해 생성될 뿐만 아니라 항염증, 항비만, 항산화 등 여러 이로운 효과를 가지는 것으로 알려져 있다 (Pandey and Rizvi, 2009). 이에 따라 선복화 (*Inula britannica* var. *chinensis* Regal) 에탄올 추출물에 함유되어있

는 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 rutin과 gallic acid 를 표준물질로 하여 측정된 결과. 선복화의 총 폴리페놀의 함량은 310.53 ± 10.60 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 80.93 ± 5.30 mg/g의 수준을 나타내었다 (Table 1).

금불초 (*Inula britannica*)는 예로부터 한방에서 거담, 진해, 진정 등의 효과가 있다고 흔히 알려져 있으며, 최근 연구된 바로 nitric oxide synthase와 cyclooxygenase-2를 억제함을 통해 항염증 효과를 나타낼 뿐만 아니라 높은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량에 기인하여 항염증 및 항산화 효과를 나타내며 금불초 지상부의 물 추출물에서 폴리페놀 함량이 318.10 ± 20.60 mg/g, 플라보노이드 함량은 335.87 ± 6.02 mg/g으로 나타낸다고 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 2005). 본 연구에서 선복화 에탄올 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하여 비교하여 본 결과, 선복화 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량은 비슷하나 플라보노이드 함량이 금불초 지상부 물 추출물에 비해 약 4 배 이상 적은 것으로 나타났다.

이는 선복화 에탄올 추출물보다 금불초 지상부 물추출물에 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 많이 함유되어 있는 것으로 나타나며, 선복화의 에탄올 추출과 물 추출에 따른 함량 차이가 나타나는지에 대한 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

2. 선복화 에탄올 추출물의 자유라디칼 소거 및 SOD 유사활성도

선복화 에탄올 추출물의 자유라디칼 소거 및 SOD 유사활성도를 확인하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 분석을 수행하였다. DPPH와 ABTS 라디칼의 50% 억제율을 나타내는 농도를 측정할 결과 각각 57.51 ± 3.12 μ g/ml과 406.39 ± 6.65 μ g/ml의 수준을 나타내었다 (Table. 1).

ABTS는 cation radical (양이온 라디칼)이 항산화물질과 반응하여 소거되는 원리를 이용하는 방법으로, DPPH와 함께 항산화활성을 측정하는데 흔히 사용 된다 (Fellegrini *et al.*, 1999). 금불초 지상부 물 추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼의 50% 억제율을 나타내는 농도가 각각 25 μ g/ml과 40 μ g/ml로 나타난다는 보고 (Lee *et al.*, 2009)와 비교하여 선복화 에탄올 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼의 소거능이 다소 낮게 나타났다.

Table 1. Polyphenol, flavonoid contents and free radical scavenging activity of ethanol extract of Inula flos.

Polyphenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)	IC ₅₀ (μ g/ml)		
		DPPH	ABTS	SOD
IJE 310.53 ± 10.60	80.93 ± 5.30	57.51 ± 3.12	406.39 ± 6.65	91.99 ± 4.65

¹⁾IJE; ethanol extract of Inulae flos (flower of *Inula britannica* var. *chinesis* Regal). Means values \pm SD from triplicate separated experiments are shown.

SOD (superoxide dismutase)는 항산화 효소 중 하나로, 산화스트레스의 원인인 free radical을 hydrogen peroxide 와 O₂로 전환시키는 기능을 가지기 때문에 SOD는 항산화활성 지표로 흔히 이용되고 있다 (Kim *et al.*, 2014). 선복화 에탄올 추출물은 91.99 ± 4.65 μ g/ml의 농도에서 50%의 SOD 유사활성을 나타내었는데 (Table. 1) 이러한 결과는 이전 연구에서 백지의 SOD 유사활성도가 2 mg/ml의 농도에서 17.67%, 강황이 23%, 홍화가 13.42%, 백편두가 47.87%를 나타내었다는 보고 (Lim *et al.*, 2004)와 비교하여 볼 때 선복화 에탄올 추출물이 앞서 언급한 약용작물에 비해 SOD 유사활성이 농도 대비 높은 것으로 확인되었다.

하지만 선복화 에탄올 추출물이 세포에 직접 처리되었을 때 항산화 과정에 작용하는 단백질인 SOD, CAT (catalase), GST (glutathion s-trasferase) 등의 단백질 또는 유전자 발현량에 어떠한 영향을 미치는지 알지 못하기 때문에 이들을 추가적으로 확인해야 할 것으로 사료된다.

3. 선복화 에탄올 추출물의 항산화 및 NO 생성 억제효과

선복화 에탄올 추출물이 RAW264.7 세포에 대한 자체독성을 가지는지, 또는 H₂O₂처리에 의한 세포사멸에 대한 세포보호효과를 확인하기 위해 MTS assay를 수행하였다.

RAW264.7 세포에 선복화 에탄올 추출물을 여러 농도 (31.3, 62.5, 125, 250, 500 μ g/ml)로 24 시간 동안 처리하였을 때 세포독성은 나타나내지 않았다 (Fig. 1A). 또한 선복화 에탄올 추출물을 125, 250, 500 μ g/ml의 농도로 30 분 동안 전 처리하고 500 μ M H₂O₂를 24 시간 동안 처리했을 때, H₂O₂ 단독처리군은 정상대조군에 비해 세포생존율이 $64.00 \pm 6.08\%$ 로 낮아진 반면 H₂O₂ 처리하고 선복화 에탄올 추출물 동시에 처리한 군은 농도 의존적으로 세포생존율 (500 μ g/ml 농도에서 $88.00 \pm 3.61\%$)이 회복되었다 (Fig. 1B).

다음으로 DCF-DA 염색을 통해 H₂O₂ 처리에 의한 ROS (reactive oxygen species) 억제율을 확인하였을 때, 500 μ M H₂O₂ 단독처리군은 정상대조군에 비해 99.97%가 증가되었지만 H₂O₂를 처리하고 선복화 에탄올 추출물을 500 μ g/ml 수준으로 처리한 경우 ROS 생성이 19.97% 까지 감소하였다 (Fig. 1C). 뿐만 아니라 200 nM LPS를 처리한 경우 NO (nitric oxide)의 생성이 13.8 ± 0.3 μ M로 증가한 반면 동일한 조건에서 선복화 에탄올 추출물을 500 μ g/ml 수준으로 처리한 경우 NO 생성이 2.70 ± 0.60 μ M로 감소되었다 (Fig. 2).

ROS와 NO는 질병 또는 염증과정에서 과도한 혈관 재형성을 초래할 뿐만 아니라 염증매개인자로 작용 할 수 있다고 보고되고 있다 (Hsieh *et al.*, 2014). 따라서 선복화 에탄올 추출물이 항산화 및 항염증 인자로서 작용할 수 있는 가능성이 있는 것으로 생각되지만, 추출물이 NO를 생성하는 NOS (nitric oxide synthase)의 활성을 억제해서 NO형성을 감소시키

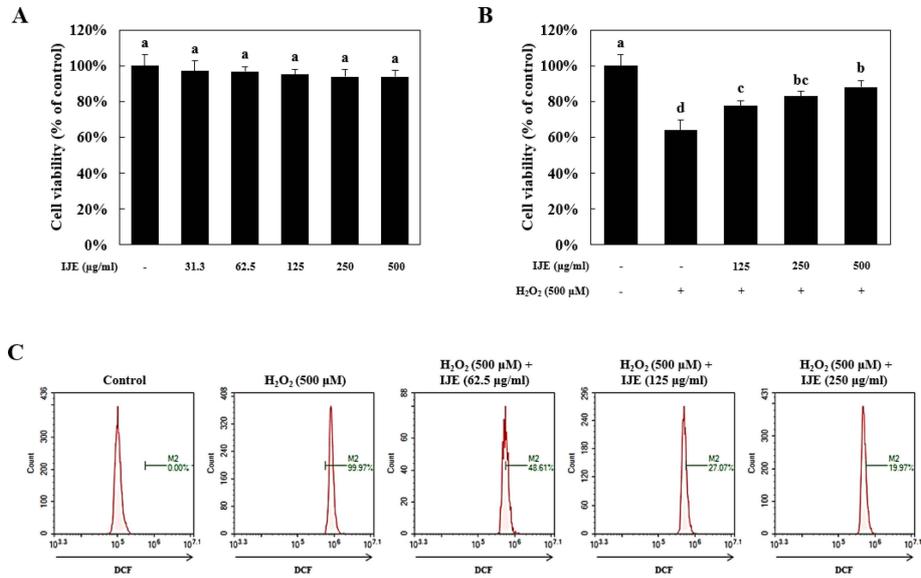


Fig. 1. IJE prevents H₂O₂-induced cell death and ROS production in RAW264.7 cells. (A) RAW264.7 cells were treated with IJE for various concentration. (B and C) After pretreatment with IJE for various concentration, RAW264.7 cells were treated with 500 µM H₂O₂ for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. ROS production was measured by flowcytometry. Means values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

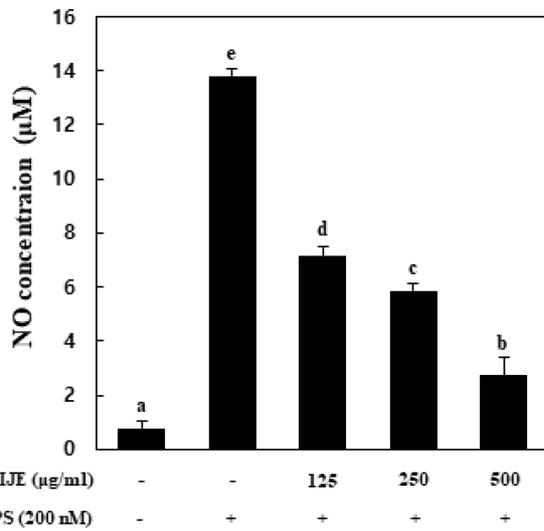


Fig. 2. IJE reduces LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. After pretreatment with IJE for various concentration, RAW264.7 cells were treated with 200 nM LPS for 24 h. *Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

는지, 효소성 항산화제인 SOD, peroxidase, CAT 및 GST와 같은 단백질의 활성을 증가시키는지 또는 비타민 A, C, E, 셀레늄 같은 비 효소성 항산화제와 같이 작용하는지 대해서는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

3. 선복화 에탄올 추출물의 대장암세포 억제효과

HCT-116 대장암 세포주에 대한 선복화 에탄올 추출물의 세포 사멸효과를 확인하기 위하여 MTS assay를 진행하였다. HCT-116 세포주에 선복화 에탄올 추출물을 여러 농도 (31.3, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml)로 24 시간 동안 처리하고 세포 생존율을 측정된 결과 선복화 에탄올 추출물을 500 µg/ml의 수준으로 처리한 경우 HCT-116 대장암 세포주의 세포생존율은 $32.57 \pm 2.50\%$ 의 수준으로 감소하였다 (Fig. 3A).

선복화 에탄올 추출물의 처리에 따른 암세포 사멸 관련 caspase-3 단백질의 발현 변화를 확인해본 결과 선복화 에탄올 추출물을 500 µg/ml의 수준으로 처리한 결과 caspase-3 단백질의 발현이 대조구에 비하여 $123.23 \pm 2.86\%$ 로 증가되었다 (Fig. 3B). 반면 선복화 에탄올 추출물을 125 µg/ml 농도 수준으로 처리한 군의 caspase-3 단백질 발현은 대조구에 비하여 $117.68 \pm 2.14\%$, 250 µg/ml 농도 수준으로 처리군의 caspase-3 단백질 발현은 $118.18 \pm 2.86\%$ 를 나타내어 농도의존적인 차이를 나타내지 않았다.

이러한 결과는 HCT-116 대장암 세포에 대한 선복화 에탄올 추출물의 암세포 사멸 효과가 반드시 caspase-3 단백질의 활성화에 기인하는 것이 아닌 암세포 사멸에 관련하는 MST-1 (mammalian sterile 20-like kinase), P53, PARP (poly ADP-ribose polymerase)와 같은 또 다른 요소의 단백질 발현에 영향을 미칠 수 있다는 것을 생각할 수 있다.

Apoptosis (세포자멸사) 또는 necrosis (세포괴사)를 일으키

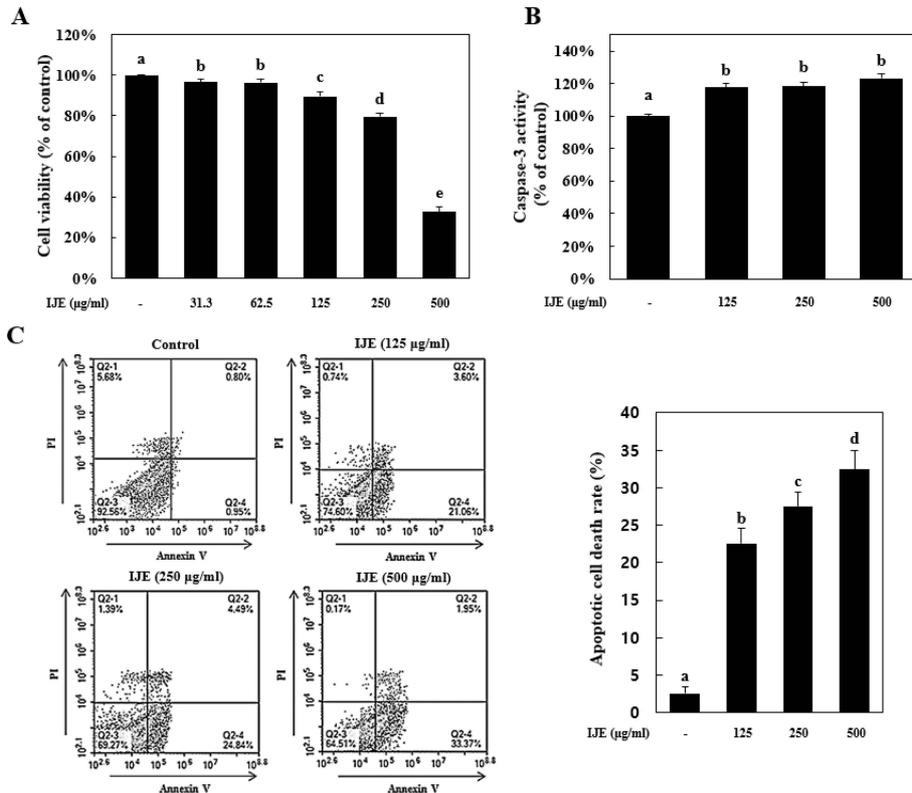


Fig. 3 IJE induced caspase-3 activation and apoptotic cell death in HCT-116 cells. (A, B and C) HCT-116 cells were treated with IJE for various concentration. Cell viability was measured by MTS assay, caspase-3 activation was measured by caspase-3 activity assay, apoptotic cell death was measured by annexin V and PI staining. Means values \pm SD from triplicate separated experiments are shown *Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Representative images were taken from at least three independent experiments.

는지 알아보기 위해, HCT-116 세포주에 선복화 에탄올 추출물을 다양한 농도 (125, 250, and 500 μg/ml)로 24 시간 동안 처리하고 annexin V 와 propidium iodide (PI) 염색 후 유세포 분석기를 이용하여 apoptosis의 비율을 확인하였다. 선복화 에탄올 추출물을 500 μg/ml 의 수준으로 처리한 경우 apoptotic cell death (apoptosis, Q2-4 + cell death, Q2-2) 비율을 35.32% 까지 증가시키는 것을 확인하였으나 (Fig. 3C) 이러한 결과는 개똥쑥 에탄올 추출물이 100 μg/ml 농도에서 HTC-116 대장암 세포주에 대해 생장을 약 40%의 수준으로 억제한다는 결과 (Kim *et al.*, 2015)에 비하면 미미한 수준이었다.

선복화 에탄올 추출물을 125 μg/ml의 농도로 처리하였을 때 early apoptosis가 21.06%, late apoptosis가 3.60%, 250 μg/ml 의 농도로 처리한 경우는 early apoptosis가 24.84%, late apoptosis가 4.49%를 나타내었으며 500 μg/ml 농도로 처리하였을 때 early apoptosis가 33.37%, late apoptosis가 1.95%로

증가하였다. 선복화 에탄올 추출물을 저농도 (125, 250 μg/ml)로 처리하는 경우 late apoptosis의 비율이 높아지는 반면 고농도 (500 μg/ml)로 처리하는 경우 late apoptosis의 비율이 감소하였고 early apoptosis의 비율이 증가되는 특성을 나타내어 고농도의 선복화 에탄올 추출물은 early apoptosis를 초기에 더 촉진하는 특성을 가진 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 선복화 에탄올 추출물은 고농도에서 대장암 세포주의 apoptosis를 통해 사멸효과를 나타낼 뿐만 아니라 항산화 및 NO 생성 억제를 통해 항산화 및 항염증효과를 나타낼 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Blois MS.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200.
- Cha MR, Kim JY, Hwang JH and Park HR.** (2006). Cytotoxic activity of the *Inula japonica* extracts against several human cancer cell lines *in vitro*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 37:130-135.
- Fellegrini N, Ke R, Yang M and Rice-Evans C.** (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*. 299:379-389.
- Folin O and Denis W.** (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 12:239-243.
- Han MR, Kim NW and Lee YS.** (2013). Anti-wrinkle and antioxidative effects ethanolic extracts of *Inula flos*, *Chrysanthemi flos* and *Carthami flos*. *Journal of Investigative Cosmetology*. 9:361-369.
- Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AH and Wang DL.** (2014). Shear-induced endothelial mechanotransduction: The interplay between reactive oxygen species(ROS) and nitric oxide(NO) and the pathophysiological implication. *Journal of Biomedical Science*. 21:3. <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1423-0127-21-3> (cited by 2017 November 13).
- Kim BM, Kim GT, Lim EG, Kim EJ, Kim SY, Ha SH and Kim YM.** (2015). Cell cycle arrest of extract from *Artemisia annua* Linnne. via Akt-mTOR signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 30:223-229.
- Kim EH, Kim JE, Kim GH, Na EY, Lee SK, Jung HM, Lee HJ and Park SN.** (2009). Antibacterial and antioxidative activities of *Inula britannica* flower extract. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 35:209-217.
- Kim HS.** (2013). Site-specific colorectal cancer: How is it different? *Korean Journal of Gastroenterology*. 61:63-70.
- Kim JY, Kim SY, Kwon HM, Kim CH, Lee SJ, Park SC and Kim KH.** (2014). Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity on chestnut, chestnut shell and leaves of *Castanea crenata* extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:8-16.
- Kim SR, Park MJ, Lee MK, Sung SH, Park EJ, Kim J, Kim SY, Oh TH, Markelonis GJ and Kim YC.** (2002). Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radical Biology and Medicine*. 32:596-604.
- Kirkham P.** (2007). Oxidative stress and macrophage function: A failure to resolve the inflammatory response. *Biochemical Society Transactions*. 35:284-287.
- Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG and Lee IS.** (2005). Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in ullung island. *Korea Journal of Food Science and Technology*. 37:233-240.
- Lee YM.** (2003). *Hankuk eui yasenghwa*(Korean wild plants). Dareunsesang, Seoul, Korea. p.245-248.
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY and Chung IM.** (2004). Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 12:191-202.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 71:109-114.
- Ogino S, Galon J, Fuchs CS and Dranoff G.** (2011). Cancer immunology-analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 8:711-719.
- Pandey KB and Rizvi SI.** (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2:270-278.
- Shan JJ, Yang M and Ren JW.** (2006). Anti-diabetic and hypolipidemic effects of aqueous-extract from the flower *Inula japonica* in alloxan-induced diabetic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29:455-459.
- Song KY.** (2003). *Yasenghwa shypge chatgi*(Convenient searching for wild plants). Jinsun Corporation, Seoul, Korea. p.355.