

## 종양이식 생쥐모델에서 刀豆, 牛蒡根 추출물의 대장암 억제 효과

장지혜<sup>1#</sup>, 지건영<sup>1</sup>, 최형석<sup>2</sup>, 양원경<sup>2</sup>, 김한영<sup>3</sup>, 김근희<sup>3</sup>, 강형식<sup>1</sup>, 이영철<sup>4</sup>, 김승형<sup>2\*</sup>

1 : 전남대학교 생물과학·생명기술학과, 2 : 대전대학교 동서생명과학연구원  
3 : 애경중앙연구소, 4 : 상지대학교 한의과대학

### Suppression of colon cancer by administration of *Canavalia gladiata* D.C. and *Arctium lappa* L., Redix extracts in tumor-bearing mice model

Ji-Hye Jang<sup>1#</sup>, Kon-Young Ji<sup>1</sup>, Hyung-Seok Choi<sup>2</sup>, Won-Kyung Yang<sup>2</sup>, Han-Young Kim<sup>3</sup>, Kun-hoae Kim<sup>3</sup>, Hyung-Sik Kang<sup>1</sup>, Young-Cheol Lee<sup>4</sup>, and Seung-Hyung Kim<sup>2\*</sup>

1 : School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea  
2 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon 34520, Republic of Korea  
3 : Central Research Laboratories of Aekyung industrial Co.Ltd., Daejeon, Republic of Korea  
4 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Sangji University, Wonju 220-702, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objective** : In the present study, we examined whether *Canavalia gladiata* D.C. (CG) and *Arctium lappa* L., Redix (AL) mixture (CGAL), their components, lupeol and chicoric acid, regulate immune system and suppress the tumor *in vitro* and *in vivo*.

**Methods** : LPS-induced reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) were measured after treatment with CG extract (CGE), CGAL, lupeol, chicoric acid and lupeol and chicoric acid mixture (lupeol+CA) in Raw264.7 cell. To determine the effect of CGE on immune responses, immune cell population and IgG production were assessed in mice. To investigate the effect of CGAL and their component on anti-tumor activity, tumor volume and weight were measured, cell cycles and immune cell population were analyzed in MC38 injected tumor bearing mice. Also, NK cell activity was determined in splenocyte isolated from tumor bearing mice.

**Results** : CGE, CGAL, lupeol, chicoric acid and lupeol+CA decreased the LPS-induced ROS and NO production without cell toxicity in RAW264.7 cells, CGE increased the immune cell populations of CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T and macrophages in various immune organ of mice. In tumor bearing mice, CGAL, lupeol, chicoric acid and lupeol+CA suppressed tumor volume and weight. In cell cycle analysis, they decreased the percentages of S phase. In addition, CGAL, lupeol, chicoric acid and lupeol+CA immune cell populations of CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>Tcell, NK cell and macrophage in tumor as well as NK cell activity.

**Conclusion** : CGAL and its compounds may enhance immune responses and suppress tumor growth, and may be capable of developing health functional foods.

**Key words** : *Canavalia gladiata* D.C., *Arctium lappa* L., Redix, Enhancement of immune response, Tumor suppression, Natural Killer

\*Corresponding author : Seung-Hyung Kim, Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-280-2642 · Fax : +82-42-274-2600 · E-mail : sksh518@dju.kr

#First author : Ji-Hye Jang, School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea.

· Tel : +82-62-530-0315 · Fax : +82-62-530-0300 · E-mail : jihye1684@naver.com

· Received : 17 August 2017 · Revised : 31 August 2017 · Accepted : 15 September 2017

## I. 서 론

2015년 국내 사망원인 통계자료에 의하면 국내 3대 사망 원인 암, 심장 질환, 뇌혈관 질환 중 하나로, 암의 발병률 및 암으로 인한 사망은 세계적으로 증가하고 있으며 인구의 고령화, 식습관 서구화 등 생활 환경적인 요인의 변화로 인해 국내에서도 암 발생률은 점점 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 그러나 현대의학의 발달에도 불구하고 암을 치료하는데 효과적인 치료제의 개발은 아직까지 미비한 실정이다. 또한 암 치료를 위해 외과적 수술, 방사선 요법, 화학요법이 사용되고 있으나 화학요법의 경우, 오심과 구토뿐만 아니라 암 세포에 대한 낮은 선택성으로 정상 세포에도 부작용을 유발하는 문제점이 있다<sup>2)</sup>. 한편, 방사선, 화학요법 이외에 암을 치료하는 방법의 하나로 면역요법이 있으며, 이는 생체 내의 면역세포를 이용하는 방법으로 부작용이 적은 치료방법으로 인정되고 있다<sup>3)</sup>. 면역반응이란 병원체나 바이러스, 세균, 곰팡이 등 다양한 경로로 인한 감염에 대하여 신체가 방어하는 기작으로 항원에 노출되었을 때 즉각적으로 반응하는 선천적 면역반응과 선천적 면역반응 후에 일어나는 후천적 면역반응으로 이루어져 있다. 후천적 면역반응은 항원 특이적인 반응으로 항원을 제거하는 반응에 따라 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나뉜다. 체액성 면역반응은 B 세포에서 노출된 항원에 대한 구조 특이적인 항체를 생성하는 항체 매개 반응이며, 세포성 면역 반응은 helper T세포 (CD4+), cytotoxic T세포 (CD8+) 등 T세포, B세포 및 항원제시세포 (Antigen presenting Cell)의 조절을 통한 세포 간 상호작용에 의해 발생되는 면역반응으로 감염으로부터 생체를 보호하거나 암의 성장을 억제하고, 다양한 사이토카인들을 분비하여 면역 체계를 활성화한다<sup>4,5)</sup>. 선천적 면역반응에 관여하는 세포로는 natural killer cell (NK)와 macrophages가 있으며, macrophages는 다양한 사이토카인을 생산하여 면역세포의 활성화로 간접적으로 암세포 억제에 기여하고, NK세포는 직접적으로 암세포에 대하여 살해활성을 가져 암세포의 증식을 억제한다<sup>6,7)</sup>. 따라서 면역반응은 건강을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하고 있으며 면역 체계와 질병 사이에는 밀접한 연관이 있으며<sup>8)</sup> 면역세포들을 활성화를 통한 생체의 면역기능의 증진은 암과 같은 질병으로부터 생체의 방어력을 증진시킬 수 있다. 한편, 염증반응은 외부의 물리적, 화학적 원인, 감염에 대한 생체의 방어 반응의 하나로 손상된 조직을 재생하려는 기전이지만, 만성으로 진행된 염증반응은 조직에서 중세를 더욱 악화시키고 지속적인 조직손상을 유도해 그 결과 일부에서는 암으로의 진행을 유도하게 된다<sup>9,10)</sup>. 염증반응이 일어나면 nitric oxide (NO)와 reactive oxygen species (ROS)와 같은 염증 매개물질이 분비된다. 비록 macrophages에서 생성되는 NO와 reactive ROS가 면역반응에 관여한다고 알려져 있으나, LPS나 염증성 사이토카인에 의해 유도된 과도한 NO와 ROS 생성은 면역 조절 측면에서 염증반응을 심화시켜 조직을 손상시키고 염증성장질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)과 같은 자가면역질환의 원인으로 작용하기도 한다<sup>11,12,13)</sup>. 최근 천연 추출물들이 면역 조절 효과가 많이 연구되면서 암을 치료하기 위하여 전통적인 약초 등의 천연물들의 면역 조절 효과에 대한

관심이 높아지고 있다<sup>14)</sup>.

刀豆 (*Canavalia gladiata* D.C.)은 장미목콩과 한해살이 덩굴성 식물로, 잭콩 (Jack bean), 칼콩 (Sword bean) 등으로 알려져 있다. 刀豆의 원산지는 동아시아가 열대지방으로 알려져 있으며 국내에서도 재배가 되고 있으나 아직 刀豆에 대한 생산, 소비량에 대한 정확한 통계는 없는 실정이다<sup>9,10,15)</sup>. 한의학에서 刀豆의 열매는 애역, 구토, 복창, 신장질환, 담천 등의 치료에 한약재로 사용되고 있으며 민간요법에서는 축농증, 치질, 종기 등 화농성 염증을 치료하는 데 사용되어 왔다<sup>16,17)</sup>. 또한, 刀豆가 항암, 항산화, 항당뇨, 만성신장염 등 효능이 있다고 보고된 바 있다<sup>18,19,20,21)</sup>. 또한, 최근 연구에 따르면 刀豆는 아토피 피부염에 있어 CD4<sup>+</sup> T세포와 CD8<sup>+</sup> T세포의 균형을 향상시켜 항염증 효과를 나타낸다고 보고되어 있다<sup>22,23)</sup>. 牛蒡根 (*Arctium lappa* L., Radix)은 초롱꽃목 국화과에 속하는 여러해살이식물로 중국북동부, 유럽, 시베리아 등지에서 분포하였으며 현재는 세계 각지에서 재배되고 있는 야생초이다. 우영의 잎 (惡貫莖)은 항균성이 뛰어난 것으로 알려져 있으며 태워서 찜질제로 이용할 경우 궤양이나 염증에 의한 고통, 발열을 완화시키는 효능이 있다고 알려져 있다<sup>24,25,26,27)</sup>. 우영의 뿌리 (牛蒡根)와 씨 (牛蒡子)는 이노 작용을 촉진하고 해열제로 이용하는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>. 또한 牛蒡根의 추출물들도 항염증, 항산화효과, 항암, 항당뇨, 항염증 효과 등 다양한 효능을 가지고 있다고 알려져 있다<sup>29,30)</sup>. 刀豆와 牛蒡根의 각각의 효능에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있고 여러 효능이 있음이 밝혀져 있지만 아직까지 刀豆와 牛蒡根의 혼합에 의한 면역조절 효과에 대한 연구가 되어있지 않다. 또한, 이러한 刀豆와 牛蒡根의 다양한 효능에 대한 활성 성분에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 刀豆와 牛蒡根의 추출물의 혼합물과 그들의 성분의 항염증, 면역 활성 등 면역조절에 대한 효과와 항암 효과를 평가하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 刀豆, 牛蒡根추출물, 성분 분류

실험에 사용한 에탄올은 삼전순약공업주식회사 (Pyeongtek, Korea)에서, acetonitrile은 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)에서, lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2-7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA), chicoric acid, lupeol은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin B (Antibiotics), phosphate buffered saline (PBS), 0.25% trypsin-EDTA (TE)는 Gibco (Carlsbad, CA, USA)에서 구매하여 사용하였다. FACS 분석용 항체는 R-Phycoerythrin (PE) anti-mouse CD3e (145-2C11, hamster IgG), Fluorescein (FITC) anti-mouse CD4 (RM4-5, rat IgG2a), PE anti-mouse CD8 (53-6.7, rat IgG2a), PE anti-mouse CD69 (H1.2F3, rat IgG2a), FITC anti-mouse CD11b<sup>+</sup>F4/

80<sup>+</sup>(aM, RatIgG2b), PE-cy5.5anti-mouseB220(RA3-6B2, ratIgG2b), 그리고 FITC anti-mouse NK1.1 (PK136, rat IgG2b)는 Biosciences (Franklin Lakes, USA)에서 구매하였고, NO (KGE001, R&D system, USA)와 IgA ELISA (ab137980, abcam, USA)을 구매하여 사용하였다. 또한 실험에 사용한 刀豆 (*Canavalia gladiata* D.C.)는 (주)콩세상 (충북제천, 한국)에서 구입하여 사용하였으며, 牛蒡根 (*Arctium lappa* L., Radix)은 갑당약초 (충북제천, 한국)에서 정선하여 구입한 후, 상지대학교 본초학교실 이영철 교수가 최종검정하였다. 검정된 刀豆와 牛蒡根추출물은 이지은 등<sup>31)</sup> 논문에 의거하여 추출하였다. 추출한 刀豆와 牛蒡根추출물을 대전대학교 한의과대학 중앙공동의학실 초저온냉동고 (-84℃)에 보관 (표본시료: CGS-70EtOH & AL-70EtOH)하면서 일정 농도로 희석하여 사용하였다. 그리고 MC38 대장암세포 이식실험에서 刀豆지표성분 (lupeol, 10 mg/kg), 牛蒡根지표성분 (chicoric acid, 10 mg/kg), 刀豆지표성분 : 牛蒡根지표성분 (lupeol : chicoric acid, 1:4) (10 mg/kg)을 투여하였다. 刀豆에 함유된 lupeol 1.87%와 牛蒡根에 함유된 chicoric acid 0.351%일 때 刀豆 lupeol (1/5 × 1.87 = 0.374)와 牛蒡根 chicoric acid (4/5 × 0.351 = 0.281)을 1:4비율로 혼합하면 혼합 성분 [10 mg/kg, Lupeol (5.7 mg) + Chicoric acid (4.4 mg)/kg]을 계산하여 투여하였다.

## 2. HPLC 분석

Time (min)	Acetonitrile (A)	0.1% TFA (B)
	10	90
10	10	90
50	50	50
52	100	0
62	100	0
65	10	90
75	10	90

HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 water는 HPLC용 특급 용매로, trifluoroacetic acid (TFA)는 분석등급의 용매로 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. Lupeol (L5632)과 Chicoric acid (C7243) 표준품들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC 분석은 Waters 2695 및 996 photodiode array detector에 의하여 수행하였다. 刀豆추출물 (*C. gladiata* D.C.)과 牛蒡根추출물 (*A. lappa* L., Radix)을 각각 20 mg/ml로 70% 에탄올에 용해한 후, PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 분석에 사용하였다. Optima pak C18 column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼의 온도는 40℃로 유지하였고, 검출은 PDA detector를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile (A) 및 0.1% TFA 함유 water (B)를 이용한 gradient system으로 table 1과 같이 최적화하였고, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μl로 하였다.

## 3. 동물실험대상

본 연구는 대전대학교의 실험동물윤리 위원회의 심사를 통하여 승인 (승인번호: DJUAR2017-038)을 받은 후 규정에 따라 실행하였다.

## 4. 세포주배양

RAW264.7 (ATCC<sup>®</sup>TIB-71<sup>™</sup>)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)에서 구입하였으며, DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Grand Island, USA) 배지에 10% Fetal bovine serum (Gibco, USA)과 Antimycotic-Antibiotics (Gibco, USA)를 첨가하여 사용하였다. C57BL/6 murine colon adenocarcinoma cells인 MC38 (CVCL\_B288) 세포주는 RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, USA) 배양액에 10% Fetal bovine serum (Gibco, USA)과 Antimycotic-Antibiotics (Gibco, USA)를 첨가하여 사용하였다. 두 세포주 모두 항온 (37℃)과 항습 (95%)을 유지하는 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

## 5. 마우스 및 사양관리

수컷6주령 C57BL/6 마우스는 대한바이오링크 (Daehan-bio, Eumseong Dukho-ro 277, Korea)에서 구입하였다. 할란사료 (2018S, Harlan, USA)와 음수는 케이지에 비치하여 자유섭식하도록 하였으며 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 수컷6주령정상 C57bl/6 마우스에 3주간 刀豆추출물 (CGE, 200 mg/kg)을 매일 경구투여하였고, MC38 종양이식 마우스모델에서는 刀豆와 牛蒡根추출물 (ALE)의 혼합물 (CGAL) (100 mg/kg), lupeol (10 mg/kg), chicoric acid (10 mg/kg), lupeol + chicoric acid (lupeol+CA, 10 mg/kg)등에 대한 면역증진능력을 확인하기 위해 각각의 시료를 5주간 매일 경구투여 후 마우스를 희생하여 실험을 진행하였다. 경구투여 2주차에 마우스대장암세포주인 MC38 세포를 1 × 10<sup>6</sup>cell/개체의 조건으로 피하 (subcutaneous)에 주입한 후 5주차에 마우스를 희생하여 각각의 종양크기 (무게)와 실험을 진행하였다.

## 6. 세포증식분석

96 well plate에 RAW264.7세포 (1 × 10<sup>4</sup>cell/well)를 37℃, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 1 시간 배양한 후 각각 CGE와 ALE (최종 농도 400, 200, 100, 50, 25 μg/ml)을 24시간동안 다시 배양하였다. 배양한 후에 MTS와 PMS를 20:1의 비율로 섞어준 후 동량의 배지와 혼합하였다. 96 well의 배지를 제거하고 MTS와 PMS, 배지가 섞인 시약을 각 well 당 100 μl씩 분주해준 후 CO<sub>2</sub>배양기를 이용하여 37℃, 30분동안 암실 배양하였다. 배양한 후 490 nm 흡광도에서 발색을 확인하여 분석하였다. 시간 간격을 두고 지속적으로 흡광도를 측정하여 분석하였다.

## 7. ROS/NO 방출량측정

12 well plate에 RAW264.7세포 ( $1 \times 10^5$  cell/well)의 조건으로 분주하고,  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 LPS를 처리한 후 각각의 CGE (최종농도 100, 50,  $10 \mu\text{g/ml}$ ), 그리고 CGAL를 1:0, 1:2, 1:4로 처리하여 24시간동안 다시 배양하였다. 또한, CGAL 1:4 혼합물 (CGAL 14,  $100 \mu\text{g/ml}$ ), chicoric acid ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), lupeol ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), lupeol+CA ( $10 \mu\text{g/ml}$ )를 처리하여 24시간동안 다시 배양하였다. 상층액을  $30 \mu\text{l}$ 씩 96 well plate에 분주한 후 sulfanilamide solution을  $30 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 암실상태의 상온에서 5~10분동안 반응시켰다. 반응시킨 후 NED solution을  $30 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 암실상태의 상온에서 5~10분간 반응시킨 후에 550 nm 흡광도에서 발색을 확인하여 NO 방출량을 측정하였다. 12 well plate의 세포를 모두 모은 후 PBS로 2번 세척한 다음 DCF-DA 시약을 처리한 후 상온에서 암실상태로 15분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 유세포분석기 (flow cytometry)를 이용하여 분석하여 ROS 방출량을 histogram으로 나타내었다.

## 8. 유세포분석

정상 C57bl/6 마우스와 MC38 대장암세포주이식 마우스를 희생 후 분리한 비장 (spleen), 림프소절 (lymph nodule), 그리고 장간막림프절 (mesenteric lymph node)은 각각 조직을 RPMI-1640 배지와 함께 갈아주었다. 세포를 원심분리하여 pellet을 실험에 이용하였다. 그리고 복강침출세포 PEC (partial elastic component) 분리는 마우스를 희생시킨 다음 안쪽의 내막이 터지거나 상하지 않도록 잘라주었다.  $10 \text{ ml}$  주사기를 이용하여 장기 손상되지 않도록 하여 복강투여 후 2% RPMI-1640 배지를 복막이 부풀어 오르도록 주입해주고 다시 추출하였다. 3~4회 반복하여 복강의 세포들을 모아 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 pellet만을 10% FBS DMEM에 풀어서 ice에 보관하고 이후 실험에 이용하였다. 각각 분리한 세포들을 FACS buffer로 2회 세척 후 조직의 세포를  $5 \times 10^5$  cells /ml 세포로 조정된 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각 조직에 anti-CD69-PE, anti-CD11b-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-FITC, anti-NK1.1-PE, 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30분간 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 FACScalibur® (BD Bioscience, San Jose, CA)로 측정하고, Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, 그리고 B220<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 백분율 (%)로 분석하여 각 세포에서 발현되는 파장을 dot plot으로 나타내었다.

## 9. IgA 생산량측정

실험종료 후 정상 C57bl/6 마우스의 대변 (fecal)을 채취하여 각각의 무게를 측정한 후  $100 \text{ mg/ml}$ 의 농도가 되도록 0.5% sodium azide 및 protease inhibitor가 첨가된 PBS를 넣어 주었다. 원심분리한 후 상층액을 새로운 microcentrifuge

tubes에 옮겨준 후 다시 원심분리하고 같은 과정을 2회 더 반복하여 시료를 얻었다. 대변으로부터 추출한 시료를 1:5000으로 희석하여 96-well plates (Nunc Maxisorb, Roskilde, Denmark)에 2시간동안 실온에서 코팅시켰다. 0.05% Tween-20이 포함된 PBS로 세척해준 후 5% bovine serum albumin (BSA)이 포함된 PBS로 2시간동안 실온에서 blocking을 진행하였다. wash buffer로 세척한 후 anti-mouse IgA-HRP 항체를 1:5000으로 희석시켜서 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 세척 후 tetramethylbenzidine (TMB) substrate를 넣어주고 30분간 상온에서 반응시킨 후 발색이 진행되면 10% 황산이 포함된 stop buffer를 이용하여 발색을 중단시키고 450 nm에서 발색의 정도를 측정하여 분석하였다.

## 10. 세포주기분석법

실험종료 후 마우스의 MC38대장암세포조직으로부터 세포를 분리한 후 FACS tube에 분주한 후 70% 에탄올로 4시간동안 고정시켜준다. PI ( $50 \mu\text{g/ml}$ )와 RNase A ( $100 \mu\text{g/ml}$ )가 포함된 FACs buffer 0.5 ml로 상온에서 반응시키고, 유세포분석기 (FACScalibur®, BD Bioscience, San Jose, CA)를 이용하여 세포주기를 측정한 후 Modifit LT 3.0 software (Verity Software House, San Diego, CA)로 분석하였다.

## 11. NK 세포독성능분석법

MC38종양이식 마우스모델의 비장으로부터 NK (Natural Killer) 세포를 분리한 후 NK 세포를 rIL-2 ( $100 \text{ U/ml}$ )로 처리하여 활성화시켰다. 표적암세포주인 Yac-1 세포 ( $1 \times 10^5$  cell/ml)를 활성화된 NK 세포와 20:1 (E:T ratio) 비율로 동시 배양하여 반응시켰다. 배양액으로부터 젖산탈수소효소 (lactate dehydrogenase; LDH)를 측정하여 NK 세포독성능을 분석하였다.

## 12. 통계처리

모든 측정결과는 독립적인 실험에서 도출된 대푯값의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation; SD)로 나타내었다. 데이터분석은 SPSS (statistical package for the social sciences, version 14.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였고, 각 군의 유의성은  $p < 0.05$  수준으로 Duncan's multiple range test와 t-test에 의해 검정하였다.

# III. 결 과

## 1. CGE의 세포생존율, ROS 및 NO 생성에 미치는 영향

CGE의 항염증 효과를 조사하기 위하여 RAW264.7 세포에서 LPS 유도에 의해 생성되는 ROS와 NO에 대한 억제 효과를 관찰하였다. ROS 생성량은 DCF-DA의 산화에 따른 DCF-DA의

형광도 측정방법을 이용하여 측정하였고 그 결과, LPS 처리군의 DCF-DA 형광도는  $82.29 \pm 2.00$ 로 RAW264.7 세포만 배양한 대조군의 DCF-DA 형광도  $47.33 \pm 2.82$ 에 비해 유의하게 ROS생성이 증가된 것을 확인하였다 ( $p < 0.001$ ). CGE 15, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 DCF-DA 형광도는 각각  $78.55 \pm 2.77$ ,  $82.05 \pm 2.60$ ,  $61.55 \pm 1.10$ 로 측정되었으며, LPS 처리군과 비교시 CGE 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 ROS 생성이 유의하게 감소되었다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1A and B). NO 방출량을 측정할 결과, RAW264.7 세포만 배양한 대조군의 NO농도는  $9.96 \pm 0.22 \mu\text{M}$ , LPS 처리군의 NO 농도는  $27.32 \pm 0.47 \mu\text{M}$ 로 LPS 자극에 의해 통계적으로 유의하게 NO 생성 증가한 것을 확인하였다

( $p < 0.001$ ). CGE은 10, 50, 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )에서 각각  $25.19 \pm 0.73 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ),  $24.93 \pm 0.20 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ),  $23.97 \pm 0.27 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ )로 나타나, LPS 처리군과 비교시 유의하게 NO 방출이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 1C). CGE의 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CGE을 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리 후, 세포 생존율을 측정할 결과 대조군의 세포생존율 100% 기준으로 CGE 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $97.83 \pm 1.53\%$ ,  $98.55 \pm 3.70\%$ ,  $86.88 \pm 3.70\%$ ,  $89.31 \pm 3.38\%$ ,  $86.34 \pm 7.50\%$ 의 세포 생존율을 나타내 세포의 생존율에 변화가 없었다 (Fig. 1D).

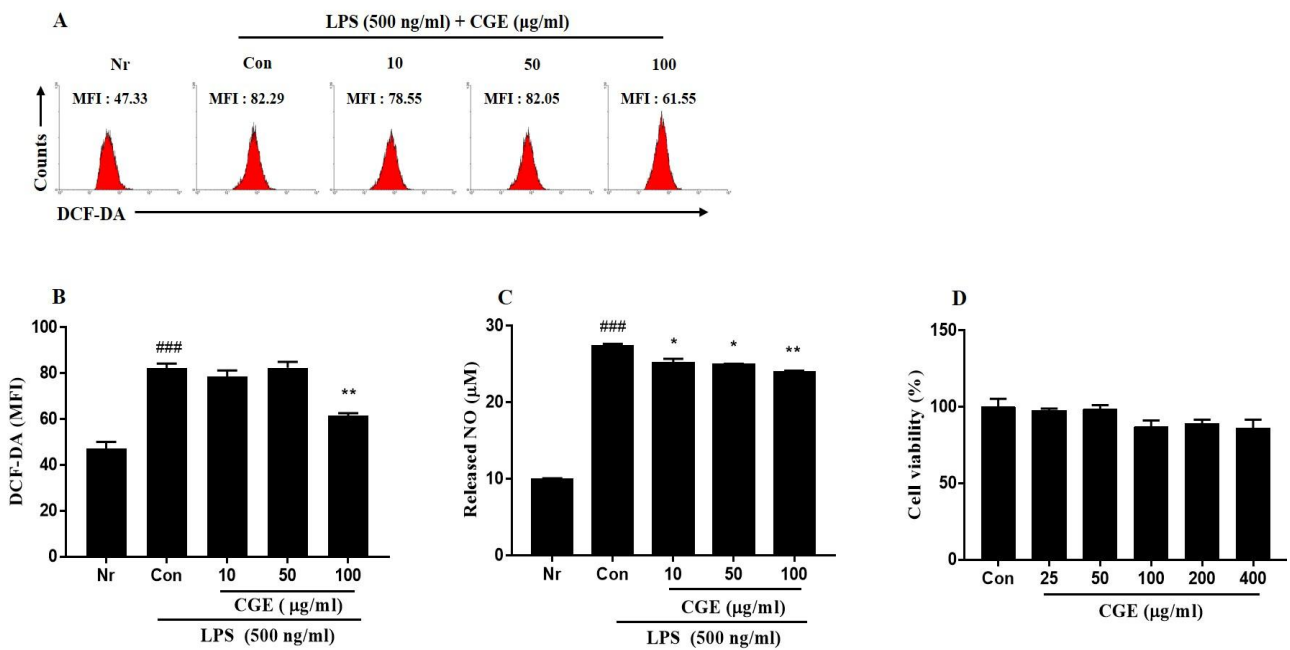


Fig.1. The effects of CGE on the LPS-induced ROS and NO production, and cell viability in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with CGE at various concentration in absence or presence of 500 ng/ml LPS for 24h. (A) Flow cytometry and (B) fluorescence intensity of ROS were analysed by flow cytometry after staining with DCF-DA. (C) Released NO was analyzed by Griess reagent. (D) Cell viability was measured using MTS assay. Nr: normal; Con: control; CGE: *Canavalia gladiata* extract. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD. ### $p < 0.001$  vs. Nr; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Con

## 2. CGE의 면역증진에 미치는 영향

CGE의 면역 증진에 대한 영향을 조사하기 위해 CGE을 경구투여한 마우스에서 비장, 림프절, 장간막림프절 및 복강침출세포 (PEC)에서 각각 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 면역세포의 population을 확인하였다. 대조군과 CGE 200 mg/kg 투여군의 비장세포에서  $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$ T세포는 각각 2.64%와 3.11%로,  $\text{CD8}^+/\text{CD69}^+$ T세포는 각각 1.05%와 1.33%로,  $\text{NK1.1}^+/\text{CD69}^+$ 세포는 각각 1.93%와 2.46%로,  $\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+/\text{CD69}^+$ 세포는 각각 27.4%와 34.8%로 나타났으며,  $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$ T세포와  $\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+/\text{CD69}^+$ 세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 2A). 림프절세포에서 대조군과 CGE 200 mg/kg 투여군의  $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$ T세포는 6.40%와 6.93%를,  $\text{CD8}^+/\text{CD69}^+$ T세포는 3.03%와 4.02%,  $\text{NK1.1}^+/\text{CD69}^+$ 세포는 0.53%와 0.77%를,  $\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+/\text{CD69}^+$ 세포는 33.5%와 50.0%를 각각 차지하였으며,  $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$ T

세포,  $\text{CD69}^+/\text{CD8}^+$ T세포와  $\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+/\text{CD69}^+$ 세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 2B). 장간막림프절 세포에서 대조군과 CGE 200 mg/kg 투여군의  $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$ T세포는 7.08%와 12.3%로,  $\text{CD8}^+/\text{CD69}^+$ T세포는 2.00%와 5.81%로,  $\text{NK1.1}^+/\text{CD69}^+$ 세포는 0.52%와 0.72%로,  $\text{CD11b}^+\text{F4}/80^+/\text{CD69}^+$ 세포는 46.1%와 51.2%로 나타났으며, 림프절세포에서와 유사하게  $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$ T세포,  $\text{CD8}^+/\text{CD69}^+$ T세포와 활성화된 대식세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 3C). 하지만 NK세포는 대조군과 비교하여 CGE 200 mg/kg 투여에 의한 population의 차이는 관찰되지 않았다. PEC에서의 B세포는 대조군과 刀豆 투여군 각각 8.61%와 15.3%로 나타났으며, 대조군과 비교하여 CGE 200 mg/kg가 PEC복강침출세포에서 B세포를 증가시키는 것을 확인하였다 (Fig. 2D). 또한, 대변에서 CGE 200 mg/kg 투여군의 IgA의 농도는 대조군을 기준으로  $123.32 \pm 14.41\%$ 로 유의하게 증가되는 것을 확인하였다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2E).

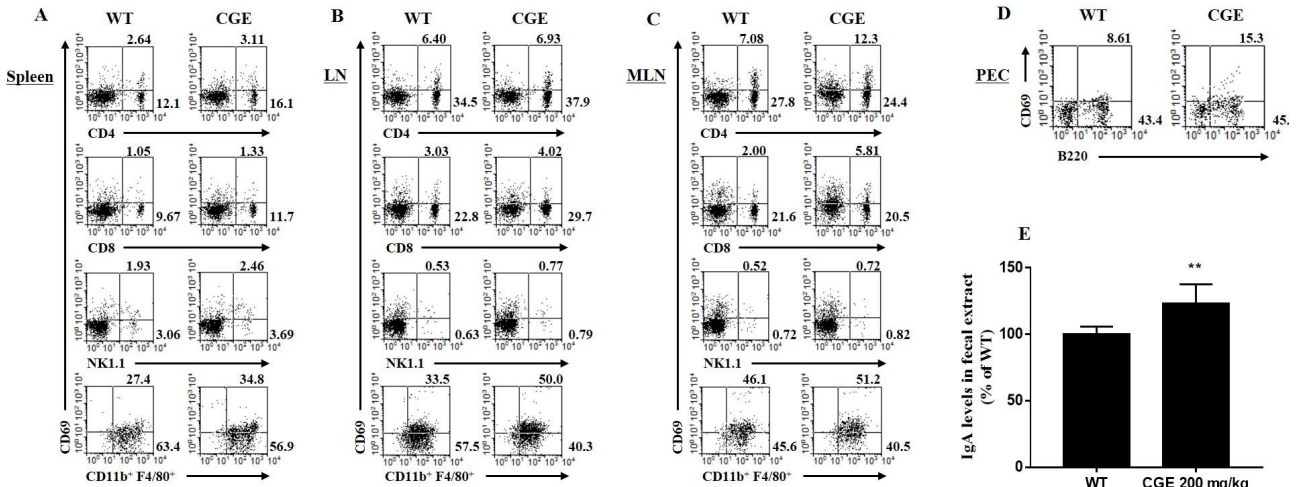


Fig.2. The distributions of immune cells in the various immune tissues and production of immunoglobulins of mice administered with CGE. The total cells were isolated from (A) Spleen, (B) Lymph node (LN), (C) Mesenteric lymph node (MLN), (D) Peritoneal exudate cells (PEC) of CGE-treated mice. The flow cytometry analysis was performed after staining with the indicated antibodies. The numbers in each quadrant indicate the cell percentages. (E) IgA levels in feces extract were measured by ELISA assay after interacting with anti-mouse IgA-HRP antibody. WT: normal mice; CGE: *Canavalia gladiata* extract. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$  vs. WT.

### 3. CGE와 ALE의 혼합물 (CGAL)에 의한 ROS 및 NO 생성에 미치는 영향

CGE와 ALE의 혼합 비율을 확정하기 위하여, RAW264.7 세포에서 ROS와 NO 생성을 측정하였다. CGE와 ALE의 혼합 비율을 1:0, 1:2, 1:4의 비율로 처리하였다. ROS 생성량을 측정된 결과 LPS 처리군의 DCF 형광도는 94.75로 RAW 264.7세포만 배양한 대조군의 DCF 형광도 55.23 수치에 비해 ROS생성이 증가된 것을 확인하였다. CGE와 ALE의 1:0, 1:2, 1:4의 비율 혼합 처리 시 DCF 형광도는 각각 72.34, 62.08, 59.35로 측정되었으며, LPS 처리군과 비교 시 CGE와 ALE을 1:4의 비율로 혼합하여 처리하였을 때 ROS의 생성량이 확연히 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 3A). NO 방출량을 측정된 결과, RAW264.7세포만 배양한 대조군의 NO 농도는  $0.62 \pm 0.05 \mu\text{M}$

였고, LPS 처리군의 NO 농도는  $8.46 \pm 0.09 \mu\text{M}$ 로 LPS 자극에 의해 유의하게 NO 방출이 증가되었다 ( $p < 0.001$ ). CGE와 ALE을 1:0, 1:2, 1:4 비율로 혼합하여 처리하였을 때 NO 방출량은 각각  $8.46 \pm 0.20 \mu\text{M}$ ,  $8.21 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ,  $7.18 \pm 0.52 \mu\text{M}$ 로 측정되었고 LPS 처리군과 비교 시 NO방출량 또한 CGE와 ALE를 1:4의 비율로 혼합하여 처리하였을 때 유의적으로 감소함을 확인하였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3B). ALE의 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 牛蒡根 추출물을 25, 50, 100, 200, 400 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 대조군 100%를 기준으로 ALE 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $100.59 \pm 0.94\%$ ,  $102.29 \pm 4.19\%$ ,  $105.58 \pm 3.52\%$ ,  $100.20 \pm 1.50\%$ ,  $99.24 \pm 3.91\%$ 로 세포의 생존율에 변화가 없었다 (Fig. 3C).

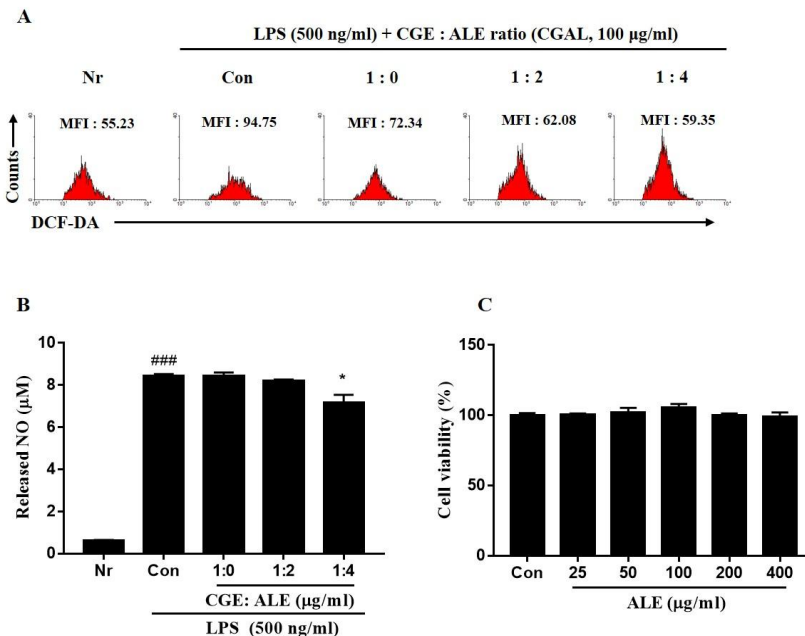


Fig.3. The effects of CGE and ALE mixture (CGAL) on ROS and NO production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with CGE and ALE (CGAL) at various mixture ratio in absence or presence of 500 ng/ml LPS for 24h. (A) The production of ROS was analysed by flow cytometry after staining with DCFH-DA. (B) The released NO was analyzed by Griess reagent systems. Nr: normal; Con: control; CGE: *Canavalia gladiata* extract. ALE: *Arctium lappa* extract. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD. ### $p < 0.001$  vs. Nr; \* $p < 0.05$  vs. Con.

#### 4. CGE와 ALE의 HPLC 분석

CGE와 ALE의 HPLC 성분분석결과는 Fig. 4에 나타내었으며, CGE에서 lupeol이, ALE에서 chicoric acid가 확인되었으며 이들의 함량은 각각 18.7 mg/g와 0.351 mg/g으로 나타났다.

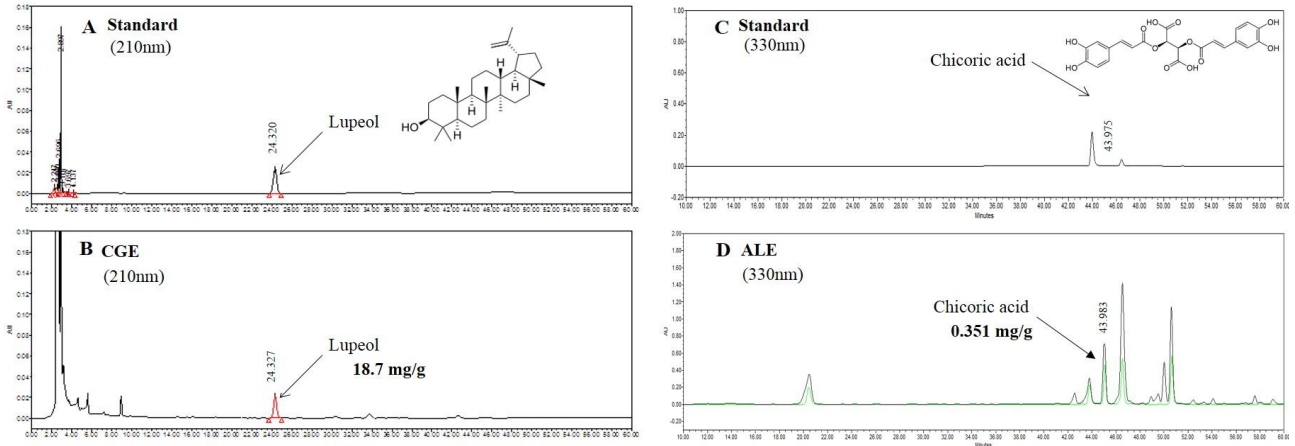


Fig.4. HPLC chromatogram. (A) Lepol standard, (B) CGE, (C) Chicoric acid standard, (D) ALE. UV peaks of lupeol and chicoric acid were detected at 210 nm and 330 nm, respectively.

#### 5. CGAL14 및 성분 lupeol, chicoric acid, lupeol 과 chicoric acid의 혼합물 (lupeol+CA) 의 ROS 및 NO 생성에 미치는 영향

Fig. 4의 결과에서 확인된 CGE 및 ALE의 성분인 lupeol과 chicoric acid의 ROS와 NO 생성에 미치는 영향을 확인 한 결과, LPS 처리군의 DCF 형광도는 75.7로 대조군의 DCF 형광도 15.8에 비해 현저하게 ROS생성이 증가된 반면, CGAL14에서 DCF 형광도 42.9로 유의하게 ROS 생성이 감소함을 확인하였다. 또한, lupeol, chicoric acid, lupeol과 chicoric acid의 1:4 혼합물 (lupeol+CA)에서 각각 42.2, 24.4, 21.1로 나타나 ROS의 생성량이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 5A). ROS 생성 결과와 유사하게 NO 방출량 역시 대조군을 기준으로 LPS 유도에 의해 NO 방출량이 175 ± 1.19%로 증가하였고 (p<0.001), CGAL14 100 µg/ml, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA 100 µg/ml 농도에서 각각 156.80 ± 0.48% (p<0.01), 132.76 ± 7.88% (p<0.01), 171.18 ± 0.38% (p<0.05), 135.05 ± 3.88% (p<0.01) 로 NO방출량이 LPS 처리군과 비교 시 유의적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 5B).

B

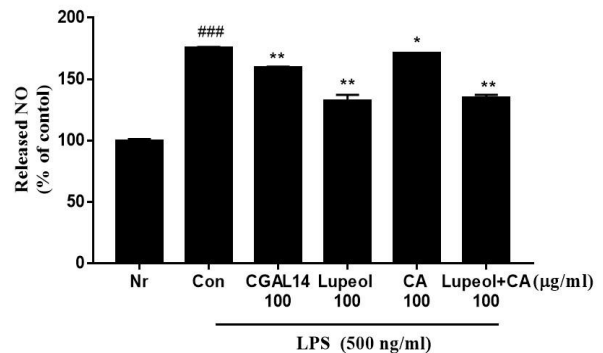
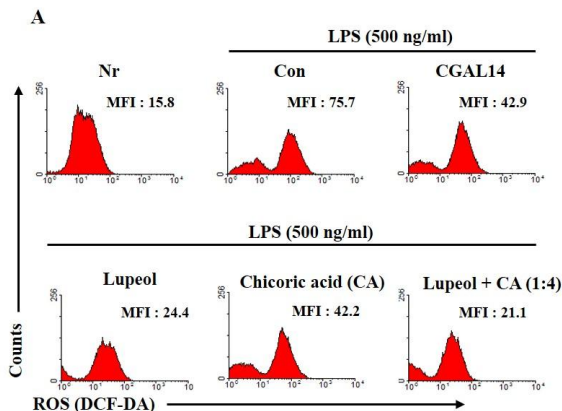


Fig.5. The effects of CGAL, lepeol, chicoric acid, and lepeol+CA on ROS and NO production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with CGAL, lepeol, CA, and lepeol and CA mixture (lupeol+CA) contractionin absence or presence of 500 ng/ml LPS for 24h. (A) The production of ROS was analysed by flow cytometry after staining with DCFH-DA. (B) The released NO was analyzed by Griess reagent systems. Nr: normal; Con: control; CGAL14: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. CA: chicoric acid, CA: chicoric acid. lepeol+CA: lepeol and chicoric acid mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean ±SD. ###p<0.001 vs. Nr; \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. Con



#### 6. 대장암 모델에서 CGAL14, 성분 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA의 항암 효과

대장암 세포주 MC38를 이식한 대장암 동물모델에서 CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA투여에 의한 종양 부피와 종양의 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 종양의 부피는 종양 대조군 과 비교 시 CGAL14 100 mg/kg, lupeol 10 mg/kg, chicoric acid 10 mg/kg, lupeol+CA 10 mg/kg 투여 후 감소를 나타내어 투여21일 후에는 유의성 있는 종양 부피가 감소됨을 확인하였다 (Fig. 6A). 종양의 무게는 종양대조군에서 3.55 ± 0.27g,

CGAL14 100 mg/kg 투여군에서는  $2.25 \pm 0.18g$  ( $p < 0.01$ )를 보여 종양 무게가 유의하게 감소되었다. lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각  $1.83 \pm 0.18g$  ( $p < 0.001$ ),  $3.04 \pm 0.10g$  ( $p < 0.1$ ),  $1.57 \pm 0.24g$  ( $p < 0.001$ )을 나타냈으며 이들의 투여에 의해 종양대조군과 비교 시 유의하게 종양 무게가 감소됨을 확인하였다 (Fig. 6B, 6C). CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA를 투여한 동물의 암 조직에서 분리한 세포에서 세포주기 분석한 결과, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기는 대조군에서 43.19%, CGAL14 100 mg/kg 투여군에서는 50.13%를 보였으며, lupeol 100 mg/kg 투여군, chicoric acid 100 mg/kg 투여군, lupeol+CA 100 mg/kg 투여군에서 각각 70.76%, 54.35%,

76.59%를 나타내 이들의 투여에 G<sub>1</sub>의 세포 분포가 증가하는 것을 확인하였다. S기는 대조군에서 45.54%를, CGAL14 100 mg/kg 투여군에서는 32.35%를 보였으며, lupeol 투여군 10 mg/kg, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 17.09%, 34.53%, 12.87%를 보였으며, 이들의 투여에 의해 S기 세포가 감소함을 확인하였다. G<sub>2</sub>/M<sub>1</sub>기는 대조군에서 11.26%를, CGAL14 100 mg/kg 투여군에서는 17.52%를 보였으며, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 12.15%, 11.12%, 10.54%로 투여군간 차이가 없음을 확인하였다 (Fig. 6D).

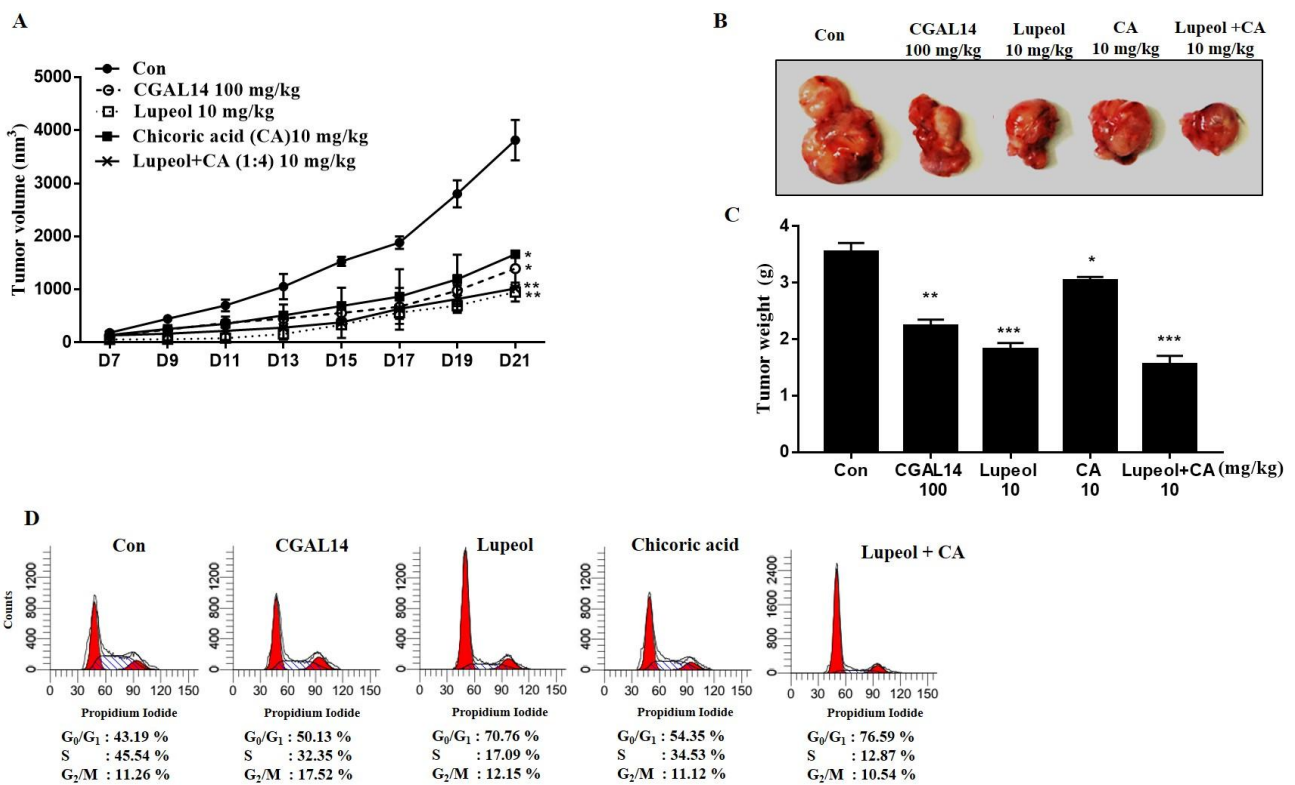


Fig.6. The effects of CGAL, lupeol, chicoric acid, and lupeol+CA on tumor volume, weight and cell cycles in tumor bearing mice. The mice were injected subcutaneously with MC38 murine colon cancer cell lines. (A) Tumor volume, (B) Representative picture of tumor, (C) Tumor weight. (D) The cell cycle progression was analyzed by flow cytometry after staining with PI. The cells were isolated from MC38 tumor. Con: tumor bearing mice injected with murine colon cancer cell lines MC38; CGAL14: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. CA: chicoric acid. lupeol+CA: lupeol and chicoric acid mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean  $\pm$ SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Con

### 7. 대장암 모델에서 CGAL14, 성분 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA에 의한 암 조직의 면역 활성에 미치는 영향

CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA 투여에 의한 대장암 조직으로 침윤된 면역세포의 population 결과를 Fig. 7에 제시하였다. CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T세포는 대조군에서 6.58%이었고 각각 8.17%, 8.53%, 8.76%, 10.1%로 나타나 이들의 투여에 의해 CD8<sup>+</sup>T세포 population이 증가됨을 확인하였다. CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T세포는 대조군에서 1.80%, CGAL14 100 mg/kg 투여군,

lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 3.01%, 2.01%, 2.75%, 2.22%를 차지하고 있는 것이 관찰되었고 이들의 투여에 의해 CD4<sup>+</sup>T의 population이 증가됨을 확인하였다. CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T 세포는 대조군에서 2.29%이었고 CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군에서 각각 4.23%, 2.86%, 3.59%, 4.35%로 이들 투여에 의해 CD8<sup>+</sup>의 활성이 증가된 것을 확인하였다. B220<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 대조군이 1.76%, CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid



10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각 1.75%, 1.26%, 2.14%, 1.80%로, chicoric acid 투여에 의해 B세포가 활성화됨을 확인하였다. CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 대조군이 23.4%, CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각 32.4%, 36.9%, 35.2%, 37.2%를 나타내어 이들 투여에 의해 활성화된 대식세포가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 7A). NK1.1<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포는 대조군에서 7.58%이었고 CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각 12.9%, 11.5%, 8.61%, 10.7%로 이들의 투여에 의해 활성화된 NK 세포가 증가함을 확인하였다 (Fig. 7B). 또한, CGAL14 100

mg/kg, lupeol 10 mg/kg, chicoric acid 10 mg/kg, lupeol+CA 10 mg/kg를 투여한 동물의 비장에서 분리한 NK세포와 NK-sensitive 세포인 YAC-1세포를 동시에 배양 후, YAC-1의 살해 활성을 측정된 결과 정상대조군에서 37.65±2.13%, 중양대조군에서 17.39±1.61% (p<0.001)를 보였으며 CGAL14 100 mg/kg 투여군, lupeol 10 mg/kg 투여군, chicoric acid 10 mg/kg 투여군, lupeol+CA 10 mg/kg 투여군은 각각 29.22±1.31% (p<0.001), 25.35±0.86% (p<0.01), 25.83±2.57% (p<0.01), 25.54±1.79% (p<0.01)를 보여 정상대조군과 비교시 중양세포의 세포 독성 능력이 유의하게 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 7C).

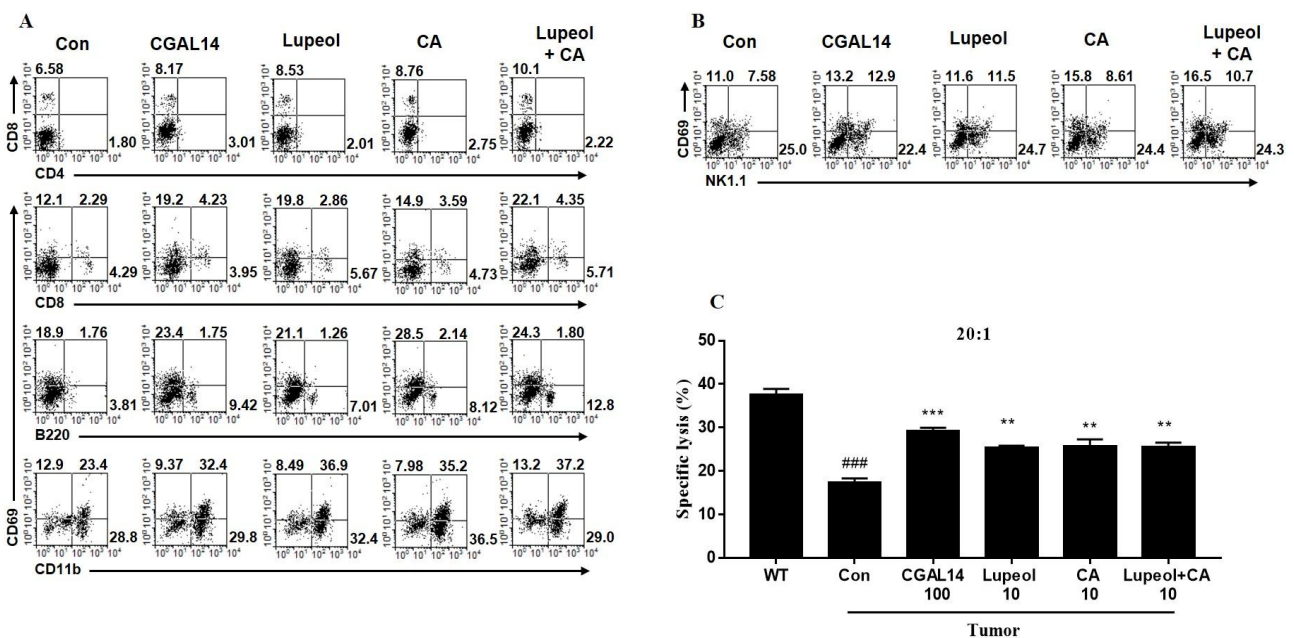


Fig.7. The effects of CGAL, lepeol, chicoric acid, and lepeol and chicoric acid mixture on distributions of immune cells in the tumor of and NK cell activity in spleen of tumor bearing mice. The mice were injected subcutaneously with MC38 murine colon cancer cell lines. The infiltrated cells were isolated from MC38 tumor at 21day after tumor injection.(A) The flow cytometry analysis ofCD4<sup>+</sup>T,CD8<sup>+</sup>T cell B cell and macrophages was performed after staining with the indicated antibodies. (B) The flow cytometry analysis of NK cell. The numbers in each quadrant indicate the cell percentages. (C) NK cell activity was determined by lactate dehydrogenase assay after splenocyte isolated from tumor bearing mice and YAC-1 cell were incubated for 4h. WT: normal mice;Con: tumor bearing mice injected with murine colon cancer cell lines MC38; CGAL14: CGE and ALE mixture at 1:4 ratio. CA: chicoric acid, lepeol+CA: lepeol and chicoric acid mixture at 1:4 ratio. Data were expressed as the mean ±SD. ###p<0.001 vs. WT; \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 vs. Con

#### IV. 고 찰

암은 현대의학의 발달에도 불구하고 치료에 많은 어려움이 있는 질병으로, 효과적인 치료방법 및 치료제의 개발은 아직 까지 미비한 실정이다. 최근에 면역요법이 암을 치료하기 위한 방법으로 인정되면서 이에 상응하여 암을 치료하기 위하여 천연물의 면역 조절 효과에 대한 연구가 증가되고 있다.

刀豆와 牛蒡根은 항염증과 항산화 등 다양한 효과를 가지고 있다고 알려져 있다<sup>20,29,30</sup>. 면역조절에 대한 연구로는 발효된 刀豆가 아토피피부염 모델에서 Th1/Th2 불균형을 조절하고 염증성 사이토카인을 억제하는 효능이 있는 것으로 보고되었 으며, 刀豆의 성분 lectins이 면역 감작된 동물에서 항염증 효과를 보인다고 알려져 있으니<sup>22,23</sup>, 아직까지 면역조절에 관한

연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서 刀豆의 항염증 효과와 면역조절능력을 평가하고 더 나아가 刀豆와 牛蒡根의 추출물의 혼합물과 그들의 성분 및 성분 혼합물에 의한 항염증, 면역활성 등 면역 조절 능력과 항암 효과를 평가하고자 하였다.

염증반응은 감염으로 인한 손상된 조직을 재생하려는 기전이지만, 염증반응이 장기간 지속될 경우 지속적인 조직손상을 유도해 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 유도하게 되는 요인이 된다<sup>32,33</sup>. 비록 NO와 ROS가 면역 기능 활성화에 관여 한다고 알려져 있으나, 염증반응에서 LPS나 염증성 사이토카인에 의해 유도된 과도한 NO 생성은 면역 조절 측면에서 염증반응을 심화시키고<sup>34</sup>, ROS 역시 면역학적 측면에서 만성적인 염증을 유발하여 염증성장질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)과 같은 자가면역질환의 원인으로 작용하기도

한다<sup>13)</sup>. 따라서 먼저, 본 연구에서는 면역 조절 측면에서 CGE의 염증반응 대해 조사했다. 그 결과, CGE이 세포 생존율의 변화 없이 RAW264.7 세포에서 LPS 자극에 의해 증가된 ROS 생성량과 NO 방출량을 감소시켰다. 이러한 결과는 CGE이 항염증 효과를 가지고 있다는 것을 나타낸다. CGAL의 염증반응에 대한 상승효과를 평가한 결과 RAW264.7 세포에서 LPS 유도에 의해 생성된 ROS는 CGE 단독보다 刀豆 추출물과 牛蒡根 추출물의 혼합비율 1:2와 1:4 혼합물에서 모두 감소하였고, NO 방출량은 刀豆 추출물과 牛蒡根 추출물의 혼합비율 1:4 혼합물에서 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과는 CGE 단독보다 CGAL이 우수한 항염증 효과를 보였으며, 혼합물의 최적의 혼합 비율이 1:4임을 제시한다. CGE과 ALE의 HPLC 성분 분석 결과로부터 CGE에서 lupeol이, ALE에서 chicoric acid가 각각 18.7 mg/g와 0.351 mg/g 함유되어 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 이런 성분들이 CGE과 ALE의 혼합물의 유효성분임을 확인하기 위해 RAW264.7 세포에서 LPS 유도에 의한 염증 반응에 대한 영향을 평가하였다. 그 결과, CGAL14에서 항염증 효과와 마찬가지로 lupeol, chicoric acid와 lupeol+CA는 LPS 유도에 의해 증가된 ROS 생성량 및 NO 생성량을 감소시켜 항염증 효과를 보이는 것을 확인하였다.

면역 반응은 외부 감염에 대한 효율적으로 숙주를 방어하기 위한 기작으로 다양한 면역세포들에 조절에 의해 매개된다. 선천적 면역반응의 대표적인 세포인 NK세포와 macrophage는 직접적으로 암세포에 대하여 살해활성을 가져 암세포의 증식을 억제하고 면역세포를 활성화시킨다고 알려져 있다. 후천적 면역 반응에 관여하는 T세포들은 항원제시세포에 의해 표시된 항원을 인식하여 helper T (CD4+)세포와 Cytotoxic T (CD8+)세포로 분화되고<sup>5,35)</sup> helper T세포는 B세포나 Cytotoxic T세포를 자극하고, macrophage를 활성화시키며 다양한 사이토카인과 항체를 생성한다. 활성화된 Cytotoxic T세포는 목적인 세포를 직접 제거하여 암세포의 증식을 억제한다<sup>5,35)</sup>. CGE의 면역 활성화에 대한 효과를 평가하고자 CGE을 경구 투여한 후 면역기관 (비장, 림프절, 장간막림프절)에서 면역세포들의 수와 활성을 평가하였다. CGE은 마우스의 면역기관에서 B220<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포와 CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포, CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>T세포의 수를 증가시켰고 macrophage의 활성을 증가시킨 것을 확인하였다. 이 결과는 부동화 스트레스 모델에서 보고된 CGE의 면역 증진의 결과와 유사하다<sup>31)</sup>. 따라서 이러한 결과는 CGE이 면역 활성을 증진시킬 수 있다는 것을 제시한다. 추가적으로 대장암 세포 MC38를 이식하여 면역반응과 동반되는 대장암 질환 모델을 제작하여 CGAL14, 이들의 성분의 항암효과 및 면역 활성을 평가하였다. CGAL은 대장암 질환 모델에서 암조직의 부피 및 중량을 감소시켰으며, 그들의 성분인 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA 역시 암 조직의 부피와 중량을 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 CGAL의 항암 효과를 나타낸다. CGAL14의 항암효과와 면역 활성과의 관련성을 살펴보기 위해 암조직에 침윤한 면역세포들 분포를 분석한 결과, CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, C11b<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포의 분포가 증가되었고, NK세포 활성이 증가되었다. 이러한 결과는CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA은 후천적 면역반응인 T세

포를 성숙시킬 뿐만 아니라 T세포와 B세포를 활성화시키며, macrophages와 NK세포의 활성 증가를 통해 선천적 면역 증진에 영향을 줄 수 있음을 제시한다. 결과적으로 CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA에 의한 항암 효과는 T세포와 NK세포활성 등 선천적 면역과 후천적 면역 증진에 의해 매개될 수 있다는 것을 시사한다. 한편, 정상세포는 세포 분열 과정에서 G1, S, G2, M의 주기를 가지며, 각 단계의 checkpoint가 있어 이들 관련인자들의 상호작용을 통하여 세포주기를 조절한다. 그러나 이러한 세포주기 조절 기능이 적절하게 제어되지 못하면 이상 증식을 야기하여 암을 유발하기도 한다<sup>36,37)</sup>.

따라서, 본 연구에서는 CGAL14의 세포 주기에 대한 영향을 평가하였다. 그 결과 CGAL14은 대장암 세포주에서 G0/G1기의 세포를 증가시켰으며 이와 상응하게 S기의 세포를 감소시키는 것으로 나타났다. 게다가 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA도 CGAL14와 유사한 결과를 보였다. 이러한 결과는 CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA의 대장암 세포의 증식 억제 효과는 세포주기 억제 (G1 arrest)에 기인할 수 있음을 나타낸다. 이상의 결과로부터 CGAL14의 항암활성은 면역세포의 증가, 세포 독성에 의한 암세포의 살해 효과 및 세포주기 정지에 의해 나타나는 것으로 사료되며 lupeol과 chicoric acid가 CGE와 ALE의 항암활성에 기여할 수 있음을 제시한다.

## V. 결 론

본 연구는 면역기능에의 불균형에 의한 질병을 예방하기 위해 인체에 안전하면서도 면역기능을 증진시킬 수 있는 식품 소재로 刀豆와 牛蒡根을 선정하여, *in vitro*와 *in vivo*모델에서 CGE, CGAL, 이들의 성분인 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA에 의한 항염증, 면역증진 및 항암효과를 연구한 결과는 다음과 같다.

1. CGE은 대식세포 RAW264.7에서 세포 생존율의 변화를 보이지 않았으며, 외부 자극 LPS에 반응하여 항염증관련 인자인 ROS와 NO 생성을 감소시켰다.
2. 동물모델에서 분리한 면역기관 (비장, 림프절, 장간막림프절)의 면역세포 아형을 분석한 결과 CGE는 활성화된 CD4<sup>+</sup>T세포, B세포, 대식세포를 증가시켰다.
3. CGE와 ALE의 혼합비율 1:0, 1:2, 1:4의 혼합물은 대식세포 RAW264.7에서 LPS에 반응하여 항염증관련인자인 ROS의 생성을 감소시켰으며, 혼합 비율 1:4 혼합물에서 유의하게 NO 생성을 감소시켰다. 따라서, CGE와 ALE의 혼합물의 최적의 혼합비율은 1:4로 확정하였다.
4. CGE와 ALE의 HPLC 성분분석에서 CGE에서 lupeol을, ALE에서 chicoric acid를 확인하였다.
5. CGE와 ALE의 성분인 lupeol, chicoric acid, lupeol+CA

의 혼합물은 대식세포 RAW264.7에서 LPS에 반응하여 항염증관련 인자인 ROS과 NO 생성을 감소시켰다.

6. 대장암 모델에서 CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA은 대조군과 비교하여 종양 부피와 중량을 감소시켰다.
7. 대장암 모델에서 암조직에 침윤된 면역세포의 아형을 분리한 결과 CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA는 대조군에 비하여 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, C11b<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>등 세포 수 및 활성세포들이 증가를 나타내었고, 특히 NK세포의 활성이 증가되었다.
8. 대장암 모델에서 CGAL14, lupeol, chicoric acid, lupeol+CA의 혼합물은 세포주기 중G0/G1기를 증가시켰으나 S기를 감소시켰다.

이러한 결과로 CGE, CGAL14, 그들의 성분인 lupeol, chicoric acid, lupeol과 chicoric acid의 혼합물은 항염증 효과, 면역증진활성 및 항암 효과를 확인하였다. CGAL14의 이러한 효과는 lupeol과 chicoric acid의 효과로 기인한다는 것을 시사한다. CGAL14는 면역조절관련 질병의 발생을 예방하고 면역력을 높이는 데 도움이 되는 하나의 천연물질로서의 가능성이 있다고 사료된다.

## 감사의 글

“본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음 (과제번호: 115036-3).”

## References

1. Jin SJ, Yun SG, Oh YN, Lee JY, Park HJ, Jin KS, Kwon HJ, Kim BW. Induction of G2/M Arrest and Apoptosis by the Methanol Extract of *Typha orientalis* in Human Colon Adenocarcinoma HT29 Cells. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2013 ; 41 : 425-432.
2. Oh YN, Jin SJ, Park HJ, Kwon HJ, Kim BW. Anti-oxidative and Anti-cancer Activities by Cell Cycle Regulation of *Salsola collina* Extract. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2014 ; 42 : 73-81.
3. Hur JW, Cho EH, Lee BK, ULee UY, Yoon TJ. The Enhanced Effect of *Oplopanax elatus* Nakai on the Immune System and Antitumor Activity. *Korean J Food Nutr*. 2013 ; 26 : 375-382.
4. Goldby Ra, Kindt TJ, Osborne BA, Kudy J. 2003. *Immunology*. 5th ed. WH Freeman and Company, New York, NY, USA. p 5-11.
5. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 ; 4 : 11-22.
6. Gough MJ, Melcher AA, Ahmed A, Crittenden MR, Riddle DS, Linardakis E, Ruchatz AN, Emiliusen LM, Vile RG. 2001. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res*. 2001 ; 61 : 7240-7247.
7. Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, Wiltrout RH. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 ; 7 : 1705-1721.
8. Mishra KP, Padwad YS, Jain M, Karan D, Ganju L, Sawhney RC. Aqueous extract of *Rhodiola imbricata* rhizome stimulates proinflammatory mediators via phosphorylated I $\kappa$ B and transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Immunopharmacol immunotoxicol*. 2006 ; 28 : 201-212.
9. Pursglove JW. *Canavalia gladiata* (Jacq.) D.C. In *Tropical crops: Dicotyledons 1968* ; 1 : p. 245. London: Longmans & Green.
10. Spoladore DS, João P, Feijão T. Chemical composition of seeds of *Canavalia gladiata* D.C." *Bragantia*. 1987 ; 46 : 133-139.
11. Weiser MM. Concanavalin A agglutination of intestinal cells from the human fetus. *Science*. 1972 ; 177 : 525-526.
12. Vitale G, Stefano S, Claudio F. Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 ; 9 : 228-240.
13. Bronsart L, Nguyen L, Habtezion A, Contag C. Reactive Oxygen Species Imaging in a Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. *Mol Imaging Biol*. 2016 ; 18 : 1-6.
14. Block KI, Mark NM. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: a review. *Integr cancer thera*. 2003 ; 2 : 247-267.
15. Smart J. *Canavalia gladiata* (Jacq.) D.C. (Sword bean). In *Tropical pulses*. 1976 : p. 58. London: Longman.
16. Cho YS, Bae YI, Shim KH. Chemical components in different parts of Korean sword bean (*canavalia gladiata*). *Korean J Postharvest Sci Technol*. 1999 ; 6 : 475-480.
17. Zhong Hua Cao. The Health Department and National Chinese Medicine Management Office, 2nd ed. *Chinese Materia Medica*. Shanghai Science Technology Publication. 1998 ; 385-388.
18. Jeon KS, Na HJ, Kim YM, Kwon HJ. Antiangiogenic activity of 4-O-methylgallic acid from *Canavalia gladiata*, dietary legume. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 ; 330 : 1268-1274.

19. Ekanayake S, Skog K, Asp NG. Canavanine content in sword bean (*Canavalia gladiata*): Analysis and effect of processing. *Food Chem Toxicol.* 2007 ; 45 : 797–803.
20. Kim KA. Screening of Antioxidants from *Canavalia gladiata* D.C. Master thesis, KonKuk Univ, Seoul, Korea, 2000; 22: 7–13.
21. Nimenibo-Uadia R. Effect of aqueous extract of *Canavalia ensiformis* seeds on hyperlipidaemia and hyperketonaemia in alloxan-induced diabetic rats. *Biokemistri.* 2003 ; 15 : 7–15.
22. Jin M, Choi JK, Choi YA, Kim YY, Baek MC, Lee BH, Jang YH, Lee WJ, Lee SJ, Kim do W, Lee HS, Park EK, Lee S, Park ZY, Kim SH. 1,2,4, 5-Tetramethoxybenzene Suppresses House Dust Mite-Induced Allergic Inflammation in BALB/c Mice. *Int Arch of Allergy Immunol.* 2016 ; 170 : 35–45.
23. Kim OK, Chang JY, Nam DE, Park YK, Jun W, Lee J. Effect of *Canavalia gladiata* Extract Fermented with *Aspergillus oryzae* on the Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015 ; 168 : 79–89.
24. Nizamutdinova IT, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Jeong YK, Seo HG, Kim HJ. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2009 ; 47 : 2806–2812.
25. Lou Z, Hong Y, Liu Y, Xinyi S, Ai L, Wang H, Jiao A, Tang Y. Effect of ethanol fraction of burdock leaf on biofilm formation and bacteria growth. *Eur Food Researd Technol.* 2014 ; 239 : 305–311.
26. Foster S, Duke JA. A field guide to medicinal plants and herbs of eastern and central North America. Houghton Mifflin Harcourt. 2000 ; 2 : 186–187.
27. Lou Z, Wang H, Zhu S, Zhang M, Gao Y, Ma C, Wang Z. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. *J Chromatogr A.* 2011 ; 1217 : 2441–2446.
28. Jaiswal, Rakesh, Nikolai Kuhnert. Identification and characterization of five new classes of chlorogenic acids in burdock (*Arctium lappa* L.) roots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food funct.* 2011 ; 2 : 63–71.
29. Chan YS, Cheng LN, Wu JH, Chan E, Kwan YW, LeeSM, Chan SW. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa*. *Inflammopharmacology.* 2011 ; 19 : 245–254.
30. Nizamutdinova IT, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Jeong YK, Seo HG, Kim HJ. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2009 ; 47 : 2806–2812.
31. Lee JE, Roh SS, Kim HY, Kim KH, Kim SH. Enhancement of immune activities of *Canavalia gladiata* & *Arctium lappa* complexes in immobilization stress mouse model. *Kor J Herbol.* 2017 ; 32 : 1–13.
32. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med.* 2000 ; 6 : 347–373.
33. Hofseth LJ, Ying L. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2006 ; 1765 : 74–84.
34. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol.* 1996 ; 10 : 291–316.
35. Liu Y, Jiao F, Qiu Y, Li W, Qu Y, Tian C, Li Y, Bai R, Lao F, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Immunostimulatory properties and enhanced TNF- $\alpha$  mediated cellular immunity for tumor therapy by C60 (OH) 20 nanoparticles. *Nanotechnology.* 2009 ; 20 : 415102.
36. Lee JH, Kim YC, Woo HJ. Study on the anti-cancer effect of *Acanthopanax sessiliflorus*. *J Korean Oriental Med.* 1999 ; 20 : 464–475.
37. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009 ; 9 : 153–166.