

노루오줌으로부터 Bergenin의 함량 분석 및 에탄올 추출물의 자궁경부암세포 성장 억제 효과

김아현[#] · 노종현[#] · 우경완 · 강주은 · 심미옥 · 김민석 · 함성호 · 조현우^{*}
한약진흥재단 한약자원본부

Quantitative Analysis of Bergenin in *Astilbe rubra* and Growth Inhibition Effect of Ethanol Extract on Hela Cells

A Hyeon Kim[#], Jong Hyun Nho[#], Kyeong Wan Woo, Ju Eun Gang, Mi Ok Sim,
Min Suk Kim, Seong Ho Ham, and Hyun Woo Cho^{*}

Division of Traditional Korean Medicine Resource, National Development Institute of Korea Medicine,
288, Woodlandgil, Anyangmyeon, Jangheunggun, Jeollanamdo 59338, Korea

Abstract – *Astilbe rubra* (AR) is a perennial, belongs to the Saxifragaceae family, it contains tannin and triterpene. AR has been used in republic korea to improve toxication, fever, pain and convulsion. Recently, number of natural products have been analyzed for potential pharmacological activities including anti-cancer, anti-obesity and anti-diabetic medication. Consequently, we investigated the growth inhibition effect of *Astilbe rubra* water extract (WAC), ethanol extract (EAC) and bergenin on Hela cell (human adenocarcinoma cell). From whole plant of *A. rubra*, bergenin was isolated by column chromatography and its structures were identified by ¹H, ¹³C NMR and IT TOF-ESI MS. High extraction efficiency of bergenin was shown at 0.95% under 60 min reflux extraction with 50% MeOH. The MTS assay showed that EAC (ethanol extract) treatment increased cell death in a dose-dependent manner. Moreover, EAC treatment on Hela cell increased apoptotic cell death and caspase-3 activity. Results suggest that EAC has growth inhibition effect on Hela cells, but not WAC and bergenin. 500 µg/mL EAC treatment inhibited Hela cell at 60.2±1.5%.

Keywords – Saxifragaceae, *Astilbe rubra*, Bergenin, Uterine cervical cancer

자궁경부암(uterine cervical cancer)은 전 세계적으로 여성에게 발병되는 암 중 두 번째로 이로 인한 사망률이 60%를 차지한다고 알려져 있으며, 우리나라에선 위암과 유방암에 이어 다섯 번째를 차지한다.^{1,2)} 현재 자궁경부암의 치료는 병의 진행 정도와 암종의 크기와 조직 형태에 따라 달라진다. 크게 3가지 단계로 나눌 수 있으며, 수술 또는 화학방사선요법을 통해 치료하지만 수술의 경우 화학방사선요법과 다르게 환자의 난소를 유지시킬 수 있을 뿐만 아니라 섬유화가 유발되지 않는다. 또한 치료를 받은 여성의 경우 정신인스트레스가 높게 보고되고있어 치료방법에 대해 향후 많은 연구가 필요한 실정이다.³⁻⁵⁾ 현재까지 개발되어진

항암제는 대개 강한 독성을 보이거나 효과가 뛰어나고, 항암제에 대한 암세포의 내성이 생겨 치료의 한계를 보이고 있다.⁶⁻⁸⁾ 이러한 이유 때문에, 현재 효과가 알려지지 않은 여러 천연분리물질과 추출물을 이용해 암세포 사멸 기전 규명 및 효능에 관련된 여러 연구들이 수행되고 있다.^{9,10)}

Caspase-3 단백질은 일반적인 상태에서 32 kDa 크기의 intact 형태로 inactivation 상태를 유지하고 있으나 세포 외부 또는 내부로부터 특정한 신호전달을 거치면 Asp²⁸/Ser²⁹와 Asp¹⁷⁵/Ser¹⁷⁶ 부분이 절단되면서 activation 상태로 작용하게 된다.¹¹⁾ 또한, 세포 내부에서 apoptosis와 necrosis가 일어나는 동안 PARP-1(Poly(ADP-ribose) polymerase-1)을 불활성화 시켜 DNA repair process를 억제하고 세포 죽음을 초래할 뿐만 아니라 다양한 세포에서 세포사에 관련된 중요 표지자로 사용되고 있다.^{12,13)}

범의귀과(Saxifragaceae)에 속하는 노루오줌(*Astilbe rubra*)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}교신저자(E-mail): johw7@nikom.or.kr
(Tel): +82-61-860-2801

은 한국 전역 산지의 냇가 또는 습지 근처에서 자라는 다년 초로서 초장은 30~70 cm 가량이며, 줄기는 곧게 서고, 갈색의 긴 털이 있다. 잎은 호생이며, 가장자리에 톱니가 있다. 개화는 7~8월에 분홍색이며 원추화서로, 많은 꽃이 달리고 짧은 털이 있다. 수술은 10개, 암술대는 2개이다. 열매는 삭과로 길이는 3~4 mm 정도이며, 끝이 2갈래로 갈라진다. 어린순은 식용, 전초는 약용으로 쓰인다.^{14,15} 뿌리는 적승마(赤升麻) 또는 적소마(赤小麻)라고 하며 전초는 낙신부(落新婦), 소승마(小升麻)라고 하여 거풍(祛風), 청열(淸熱), 지해(止咳), 해열(解熱), 해독(解毒)의 효능이 있으며,^{16,17} 한방에서 노루오줌의 건조된 뿌리는 두통, 만성기관지염, 감기, 발열, 기침, 관절통, 근골통, 위통 등에 효능이 있어 민간생약으로도 많이 이용되고 있다.^{18,19} 기존 식물 화학적 성분 연구로는 노루오줌의 뿌리로부터 cytotoxic triterpenes²⁰⁻²⁸ analgesic compounds¹⁹ 보고되었으나.

본 연구에서는 민간생약으로 사용중인 노루오줌의 품질 평가를 위한 기준 설정을 위해 지표성분 분리, 함량 분석 및 확인시험을 실시하여 제안하고자 하였다. 또한 노루오줌 MeOH 추출물에서 췌장암 세포주(AsPC-1 cell)에 농도의존적으로 유의성을 나타내어,¹⁷ 자궁경부암 세포주(Hela cel)에 노루오줌 물 추출물, 에탄올 추출물과 지표 성분인 bergenin을 처리하여 Hela 세포에 대한 세포성장억제 효과 및 기전을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 노루오줌 전초는 2015년 8월 전남 장흥(위도: 34.53'23"N, 경도: 126.91'59"E)에서 채취하였으며, 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수에게 의뢰하여 동정하여 사용하였다. 표본(TKM-2108)은 한약진흥재단 한약재연구팀에서 보관하였다.

기기 및 시약 - 추출 및 분획용 시약, TLC 및 column용 시약 등은 특급시약을 사용하였다. Thin layer chromatography 용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F_{254S} plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 사용하였으며, UV의 검색은 254와 365 nm에 측정하였다. Column chromatography의 충전제는 YMC gel ODS-A(50 μm)와 YMC gel ODS-A(20 μm)를 사용하였다. 지표성분의 분리에 사용된 preparative HPLC는 Agilent A1200 series(Agilent, U.S.A)이며, 단일 화합물의 구조를 규명하기 위해 이용한 NMR(Nuclear magnetic resonance) spectrum은 Varian 500 spectrometer(¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz)를 사용하여 측정하였고, NMR 용매는 Sigma. Inc(USA)의 CD₃OD를 사용하였다. 분자량 확인을 위해 이용한 ESI-mass spectra는 shimadzu LCMS-IT-TOF mass

spectrometer를 사용하였다. 일반성분 분석을 위한 건조기(VS-1202D3, Jeitech, Korea), 회화로(MF-21G, Daehan, Korea), 초음파추출기(UC-20, Branson, USA)이며, 확인시험에는 반자동박층크로마토그래프(ATS4&ADC2, Camag, Swiss)를 사용하였다. 함량 분석은 UPLC(Acquity UPLC System, Waters, USA)를 사용하였으며, column은 ACQUITY UPLC HSS T3(C₁₈) column(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm, Waters)을 이용하였다.

추출 및 분획 - 지표 성분 분리에 사용된 MeOH 추출물은 노루오줌 전초 2.0 kg을 1.0 kg씩 methanol 20 L를 가하여 3시간 동안 3회 환류 냉각 추출 후 감압 농축하여 methanol 추출물 166 g을 얻었다. 이를 H₂O에 현탁시킨 후, *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol 순으로 분획하고 각 분획물을 감압, 농축하여 *n*-hexane 분획물 34 g, methylene chloride 분획물 5 g, ethyl acetate 분획물 24 g, *n*-butanol 분획물 43 g, H₂O 분획물 57 g을 얻었다. 생리활성 실험에 사용된 물 추출물과 에탄올 추출물은 각각 시료 100 g을 500 mL 증류수와 70% 에탄올을 가하여 100°C에서 3시간, 3회 반복 환류 냉각 추출하여 동결 건조 후 사용하였다.

지표물질 분리 - LC-MS 및 TLC로 확인한 후 주요성분이 함유되어 있는 ethyl acetate 분획물(24 g)을 ODS gel(50 μm, 0.8 kg, YMC, Japan)이 충전된 glass column(16 cm×80 cm)을 이용하여 H₂O(in 0.02% formic acid)-ACN 혼합용매(80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 0:100)로 open column chromatography를 진행하였으며, LC-MS 및 TLC로 스크리닝하여 11개의 소분획물(NRE 1~11)로 나누었다. 이 중 NRE 4(4 g)를 glass column(4 cm×60 cm)에 ODS gel(20 μm, 0.4 kg, YMC, Japan)을 충전시키고 H₂O(in 0.02% formic acid)-ACN 혼합용매(90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50)를 사용해 column chromatography를 진행하여 7개의 소분획물(NRE 4-1~7)을 얻었다. 이 중 소분획물 NRE 4-3(410 mg)을 ODS column(30 mm×250 mm, 5 μm, phenomenex, USA)가 장착된 preparative LC(Agilent, infinity 1260, USA)를 사용하여 10-25% ACN, 24 mL/min의 조건으로 270 nm에서 화합물 1(240 mg)을 분리하였다.

Bergenin (1) - white powder; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.08 (1H, s, H-7), 4.95 (1H, d, *J*=10.5 Hz, H-10b), 4.10 (1H, dd, *J*=10.5, 10.0 Hz, H-4a), 4.02 (1H, dd, *J*=10.0, 9.0 Hz, H-4), 3.95 (3H, s, OCH₃), 3.81 (1H, dd, *J*=9.0, 5.5 Hz, H-2), 3.68 (2H, m, H-11), 3.42 (1H, dd, *J*=9.5, 9.0 Hz, H-3); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 165.8 (C-6), 152.4 (C-8), 149.5 (C-10), 142.3 (C-9), 119.5 (C-6a), 117.3 (C-10a), 111.1 (C-7), 83.1 (C-2), 81.5 (C-4a), 75.7 (C-4), 74.3 (C-10b), 71.9 (C-3), 62.7 (C-11), 60.9 (OCH₃); LC ESI IT-TOF MS: *m/z* 327 [M-H]⁻.

확인시험 - 박층크로마토그래프법을 진행하였으며 분말 시료 약 1.0 g에 메탄올 10 mL을 첨가하여 30 분간 초음파 추출하여 여과 후 검액으로 하였고, 지표 물질 bergenin을 1.0 mg을 정밀하게 달아 메탄올 10 mL로 녹여 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 10 µL를 박층크로마토그래프용 실리카겔(형광제 첨가)을 써서 만든 박층판에 점적하였다. 전개 용매 ethyl acetate·acetic acid·formic acid·water(50:5:5:7.5)에 약 10 cm 전개한 후 365 nm에서 관찰하였다.

일반성분 - 대한한국약전(제 11개정) 일반시험법 중 28. 생약시험법에 준하여 각각의 건조감량, 엑스함량(붉은에탄올엑스), 회분, 산불용성회분 시험법에 따라 실시하였다.

표준액 조제 - 노루오줌 전초로부터 분리한 지표 물질 bergenin을 MeOH 에 녹여 750 µg/mL~46.875 µg/mL의 다섯 농도에 이르는 표준액을 제조하여 사용하였다.

검액 조제 - 건조된 노루오줌 전초를 분쇄하여 18호 체로 친 후 약 1.0 g을 칭량하고, 추출 용매별(MeOH, 50% MeOH, H₂O, EtOH)로 각각 10 mL을 첨가하여 30분간 초음파 추출, 여과 후 사용하였다. 각 용매에 따른 추출 효율은 3회 반복 분석하였다. 추출 조건(초음파 30분, 30분 2회, 60분과 환류 30분, 30분 2회, 60분 추출)에 따른 함량 분석은 동일한 방법으로 칭량 후 추출 효율이 가장 좋았던 용매를 25 mL 첨가, 여과 후 정확하게 25 mL로 하여 검액으로 하였다.

HPLC 분석 조건 - 노루오줌에서 분리된 지표 물질 bergenin의 함량 분석을 위해 Table I과 같이 조건을 설정하였다.

검량선 및 직선성(Linearity) - 지표 물질 bergenin의 표준액 750, 375, 187.5, 93.75, 46.875 µg/mL 농도를 이용하여 UPLC로 실험하였으며 농도에 따른 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였다. 검량선은 $y=ax+b$ (y: peak 면적, x: 시료농도, a: 직선의 기울기, b: y절편)의 형태로 작성하였

다. 작성된 검량선의 상관계수를 이용하여 직선성을 검토하였다.

세포배양 - 실험에 사용된 Hela 세포(human adenocarcinoma cell)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. RPMI 1640 배지(Thermo, Waltham, MA, USA)에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5%, CO₂ 조건에서 배양하였다.

MTS Assay - 세포생존율은 CellTiter 96[®] aqueous one solution Cell proliferation assay kit(Promega, Fitchburg, WI, USA)를 사용하여 측정하였다. Hela 세포를 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL 농도가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 배양기에서 24시간 배양한 후 추출물을 31.25, 62.5, 125, 250 그리고 500 µg/mL 농도로, 분리 물질을 6.25, 12.5, 25, 50 그리고 100 µM 농도로 24시간 동안 처리하고 배양하였다. 24시간 뒤 MTS 시약 20 µL를 넣고 2시간 동안 배양한 후 microplate reader infinite[®] 200 PRO(TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 정상대조군에 대한 생존율로 표시하였다.

Caspase-3 Activity Assay - Caspase-3 colorimetric detection kit(Enzo, Farmingdale, NY, USA)를 이용해 실험을 진행하였다. 약물 처리 후 배양이 끝난 Hela 세포는 PBS로 2회 세척하고 Pierce[™] protease and phosphatase inhibitor mini tablets(Thermo, Waltham, MA, USA)가 포함된 RIPA cell lysis buffer 2(Enzo, Farmingdale, NY, USA)로 2시간 동안 4°C에서 용해하였다. 세포용해액은 원심분리기로 4°C, 13,000×g 조건에서 20분간 원심분리 하였고, 단백질 농도를 bradford assay를 이용하여 측정하였다.²⁹⁾ 총 20 µg의 단백질 샘플을 사용하여 제조사가 제시한 protocol에 따라 실험을 수행하였다.

FACS Analysis - Annexin V-FITC apoptosis detection kit(Enzo, Farmingdale, USA)를 사용하였다. Apoptosis의 비율을 측정하기 위해 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 annexin V-FITC와 propidium iodide(PI) 형광다이오드 염색시켰으며, 염색된 세포는 Novocyte flow cytometer(ACEA, San diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

통계 처리 - 통계 처리는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었고, 군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS(Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 사용하였다. 일원변량분석(one way ANOVA)을 실시하였으며, 유의성이 있는 경우 $p<0.05$ 수준에서, Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

화합물의 구조 - LC ESI-IT TOF MS에서 molecular ion

Table I. UPLC condition of bergenin

Instrument	UPLC (Acquity Waters 20 AD)		
Flow rate	0.5 mL/min		
Injection volumn	2 µL		
UV length	272 nm		
Mobile solvent	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in ACN		
Mobile phase	Time	A (%)	B (%)
	0.0	95	5
	1.5	86.7	13.3
	2.5	86	14
	3.0	80	20
	5.5	80	20

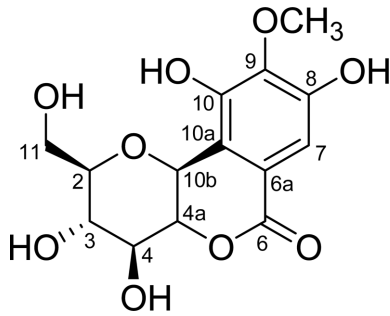


Fig. 1. Chemical structures of bergenin.

peak가 m/z 327에서 확인하였고, formular predictor(Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 $C_{14}H_{16}O_9$ 의 분자식을 얻었다. 1H -NMR spectrum 분석 시 δ 7.08 (1H, s, H-7)에서 1개의 benzene ring proton peak이, δ 4.95 (1H, d, $J=10.5$ Hz, H-10b), 4.10 (1H, dd, $J=10.5, 10.0$ Hz, H-4a), 4.02 (1H, dd, $J=10.0, 9.0$ Hz, H-4), 3.81 (1H, dd, $J=9.0, 5.5$ Hz, H-2), 3.68 (2H, m, H-11), 그리고 3.42 (1H, dd, $J=9.5, 9.0$ Hz, H-3)에서 6개의 oxygenated proton signal이, δ 3.95(3H, s, OCH_3)에서 1개의 methoxy proton을 확인하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서는 1개의 ketone signal δ 165.8 (C-6), 6개의 benzene ring carbon δ 152.4 (C-8), 149.5 (C-10), 142.3 (C-9), 119.5 (C-6a), 117.3 (C-10a), 그리고 111.1 (C-7), 6개의 oxygenated carbon peak δ 83.1 (C-2), 81.5 (C-4a), 75.7 (C-4), 74.3 (C-10b), 71.9 (C-3), 그리고 62.7 (C-11), 1개의 methoxy carbon δ 60.9 (OCH_3)을 관찰하였다. 이상의 결과를 바탕으로 기존의 문헌과 비교하여 화합물 1은 bergenin으로 구조 결정하였다(Fig. 1).³⁰⁾

확인시험 - 지표 물질 bergenin의 표준액과 추출한 검액을 이용하여 박층크로마토그래프 실험을 진행하여 365 nm에서 관찰한 결과 $R_f=0.55$ 에서 푸른색 반점을 확인하였다(Fig. 2).

일반성분 - 노루오줌은 대한약전에 수재되어 있지 않는 민간생약으로 설정된 기준 규격이 없으며, 실험결과 건조감량은 8.3%, 엑스함량(뮌에탄올엑스)은 21.3%, 회분은 7.7%, 산불용성회분은 1.7%의 결과를 확인하였다.

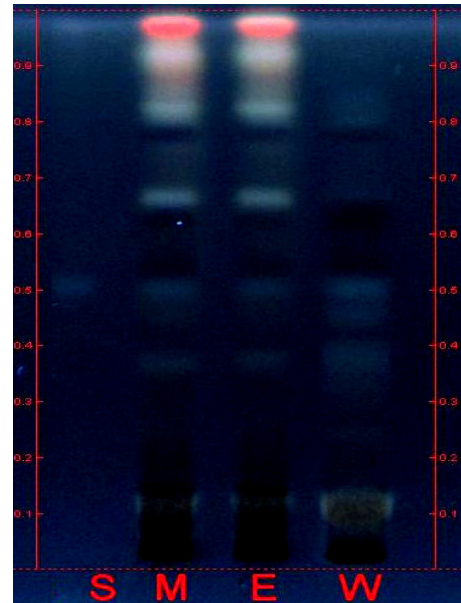


Fig. 2. TLC chromatogram of *A. rubra* and bergenin.

Table II. The contents of bergenin by extract solvents

Solvents	Content (%)			
	MeOH	50% MeOH	H ₂ O	EtOH
	0.405	0.550	0.217	0.465

함량분석 - 노루오줌의 지표 물질 bergenin을 Table I과 같은 조건으로 진행하였다. MeOH, 50% MeOH, H₂O, EtOH의 추출 용매별 지표 성분 함량을 비교한 결과 Table II와 같이 50% MeOH에서 추출 효율이 가장 높은 것을 확인하였고, 추출 효율이 가장 높은 50% MeOH을 추출 용매로 하여 초음파 및 환류 추출 30분, 30분 2반복, 60분의 추출 조건별로 비교한 결과 Table III과 같이 환류 60분 추출이 가장 높은 것을 확인하였다. 지표 물질의 표준액 46.875~750 $\mu g/mL$ 의 범위에서 검량선 상관계수(R^2)은 0.999로 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 그 결과 노루오줌 50% MeOH 추출물에서 bergenin의 함유량은 0.95%로 확인하였다(Table IV).

Table III. The contents of bergenin by extraction time and methods

Extraction method	Sonication			Reflux			
	Time (min)	30	30*2	60	30	30*2	60
Content (%)		0.931	0.916	0.889	0.956	0.952	0.958
		0.905	0.913	0.889	0.948	0.939	0.954
		0.877	0.908	0.887	0.938	0.923	0.946
Average		0.904	0.912	0.888	0.947	0.938	0.953
SD		0.027	0.004	0.001	0.009	0.015	0.006

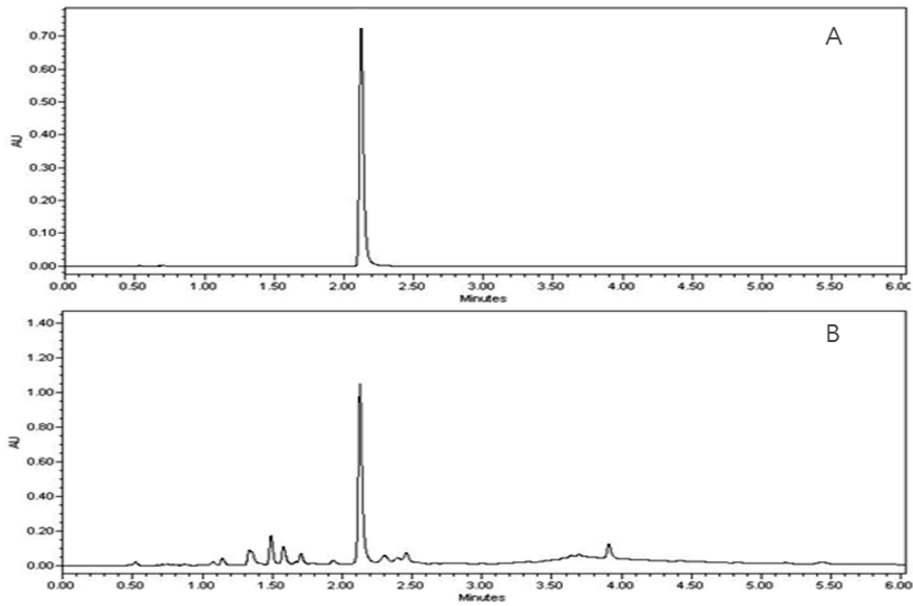


Fig. 3. HPLC chromatogram of bergenin (A) and *A. rubra* (B).

Table IV. Calibration data for analysis of bergenin

Compound	Regression equation $y=ax+b$		Contents (mg/g)	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
	Slope(a)	Intercept(b)				
Bergenin	15.528	182.58	9.53 ± 0.00	0.999	0.05	0.14

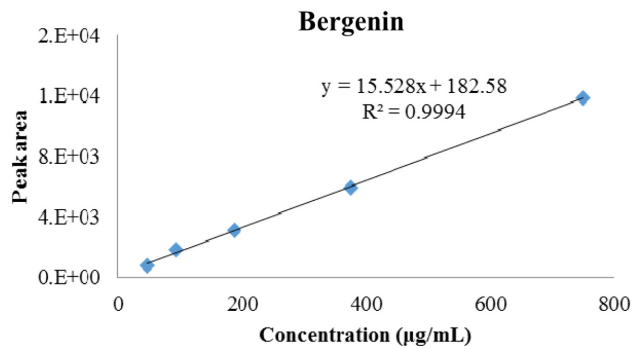


Fig. 4. Calibration curve of bergenin.

세포생존율 분석 - Hela 세포에 대해 노루오줌 물 추출물(WAC), 노루오줌 에탄올 추출물(EAC)과 분리 물질인 bergenin의 암세포 사멸 효과를 확인하기 위해 MTS assay를 수행하였다. 추출물은 31.25, 62.5, 125, 250 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로, 분리 물질은 6.25, 12.5, 25, 50 그리고 100 μM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, WAC와 bergenin은 Hela 세포에 대해 암세포 사멸 효과는 나타나지 않았으며(Fig. 5A, 5C), EAC는 125 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 Hela 세포의 생존율을 $72.5\pm 1.1\%$ 까지 감소시켰을 뿐만 아니라

최종 농도인 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $60.2\pm 1.5\%$ 까지 감소시켰다(Fig. 5B). 실험결과를 요약하면 EAC가 Hela세포에 대해 암세포 사멸 효과를 가지고 있는 것으로 나타났지만, WAC와 bergenin은 유의적인 효과가 나타나지 않았다. 이 결과를 바탕으로 WAC와 bergenin은 Hela 세포주에 대해 항암 효능이 없는 것으로 판단되며, EAC는 실험 농도를 31.25, 62.5, 125, 250 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 로 정하였고, EAC 처리에 따른 apoptosis와 necrosis 중 기전 연구를 진행하였다.

세포자멸사 분석 - EAC가 apoptosis 또는 necrosis Hela cell 세포의 사멸 연구는 다음과 같이 진행하였다. 노루오줌 에탄올 추출물은 125, 250 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 동안 처리한 뒤 annexinV-PI 염색을 통해 flow cytometry에서 apoptosis와 necrosis의 비율을 측정하였다. 결과를 확인했을 때 EAC는 농도의존적으로 Hela 세포의 apoptosis를 증가시키는 것이 확인되었고, 최고 농도인 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 apoptotic death(apoptosis+cell death)비율이 $25.8\pm 2.5\%$ 까지 증가되었다(Fig. 6A). 다음으로 세포자멸사를 유도하는 단백질인 caspase-3의 활성도를 측정하기 위해 caspase-3 activity assay를 수행하였다. EAC를 31.25, 62.5, 125, 250 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 Hela 세포에 24시간 동안 처리한 뒤 확인해본 결과, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 caspase-3 활성도가

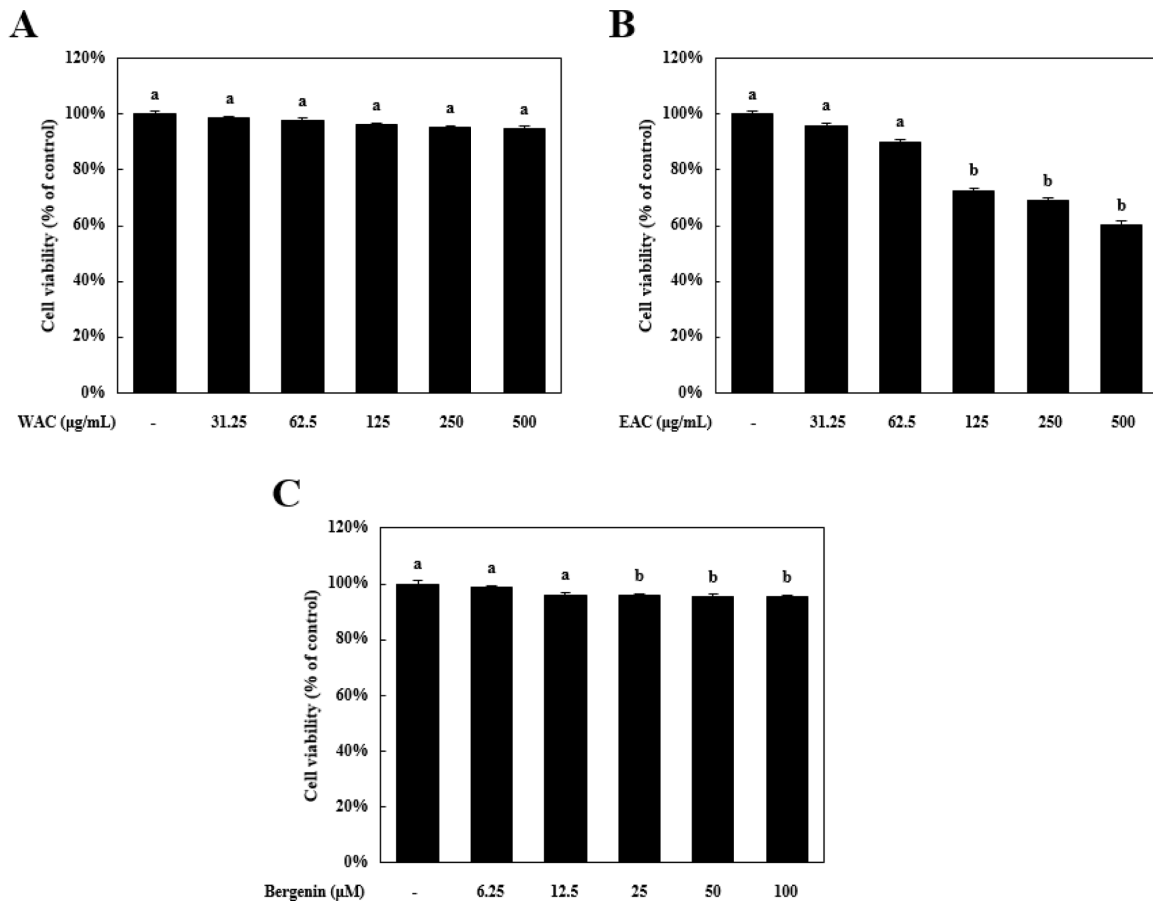


Fig. 5. Cytotoxic evaluation of extracts and bergenin on HeLa cells. (A-C) HeLa cells were treated with extracts and bergenin for various concentration. Cell viability was measured by MTS assay. Means values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

정상대조군에 비해 $125.9 \pm 1.4\%$ 까지 유의적으로 증가되었다 (Fig. 6B). 실험 결과를 종합했을 때, EAC는 HeLa 세포의 세포사멸사를 증가시키는 것으로 나타났을 뿐만 아니라 암 세포 사멸에 관여하는 caspase-3 단백질 활성도를 증가시키는 것으로 확인되었다. 이는 EAC가 HeLa 세포주 내에서 caspase-3 단백질 활성화를 통해 항암효과를 나타내는 것으로 판단된다. 앞서 언급한 것처럼 caspase-3 단백질은 암세포 내부에서 세포사를 일으킬 수 있는 인자로 작용할 수 있기 때문에,^{12,13,31} 이 결과는 EAC가 자궁경부암을 개선할 수 있는 천연 추출물로 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 EAC가 *in vitro*와 *in vivo* 수준에서 정상세포에 대한 독성이 나타나는지 또는 caspase-3 단백질과 연관된 주요 신호전달 경로를 추가적으로 확인하는 실험이 필요하다.

결론

노루오줌의 전초로부터 지표 물질인 bergenin을 colum

chromatography법을 이용하여 분리하였고, ^1H , ^{13}C NMR과 TOF-ESI MS를 이용하여 구조 동정하였다. 50% MeOH 용매로 60분 환류 추출 시 가장 높은 효율을 나타냈으며, 지표 물질은 0.95%의 함유량을 보였다. 노루오줌의 건조감량은 8.3%, 엑스함량은 21.3%, 회분은 7.7%, 산불용성회분은 1.7%로 확인되었다. 노루오줌 에탄올 추출물은 HeLa 세포의 apoptotic death와 caspase-3 단백질 활성도를 증가시키는 것을 통해 HeLa 세포 사멸 효능을 나타내는 것으로 사료된다. 하지만 이는 선학초(*Agrimonia pilosa*) 에탄올 추출물이 HeLa 세포에 대하여 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 $22.64 \pm 0.61\%$ 정도의 세포사멸효과를 나타낸 것에 비해 효과가 좋게 나타났지만,³² 아로니아(*Aronia melanocarpa*) 에탄올 추출물에 비하여 효과가 낮게 나타났다.³³ 에탄올 분획에 존재하는 성분이 HeLa 세포를 사멸시키는 것으로 예상되어, 향후 추가적인 실험을 통해 식물 화학적 성분 연구를 통한 추가 지표 및 활성 물질의 분리, 구조 동정 및 *in-vivo* 실험을 진행하여 한의약으로서 활용방안을 마련하겠다.

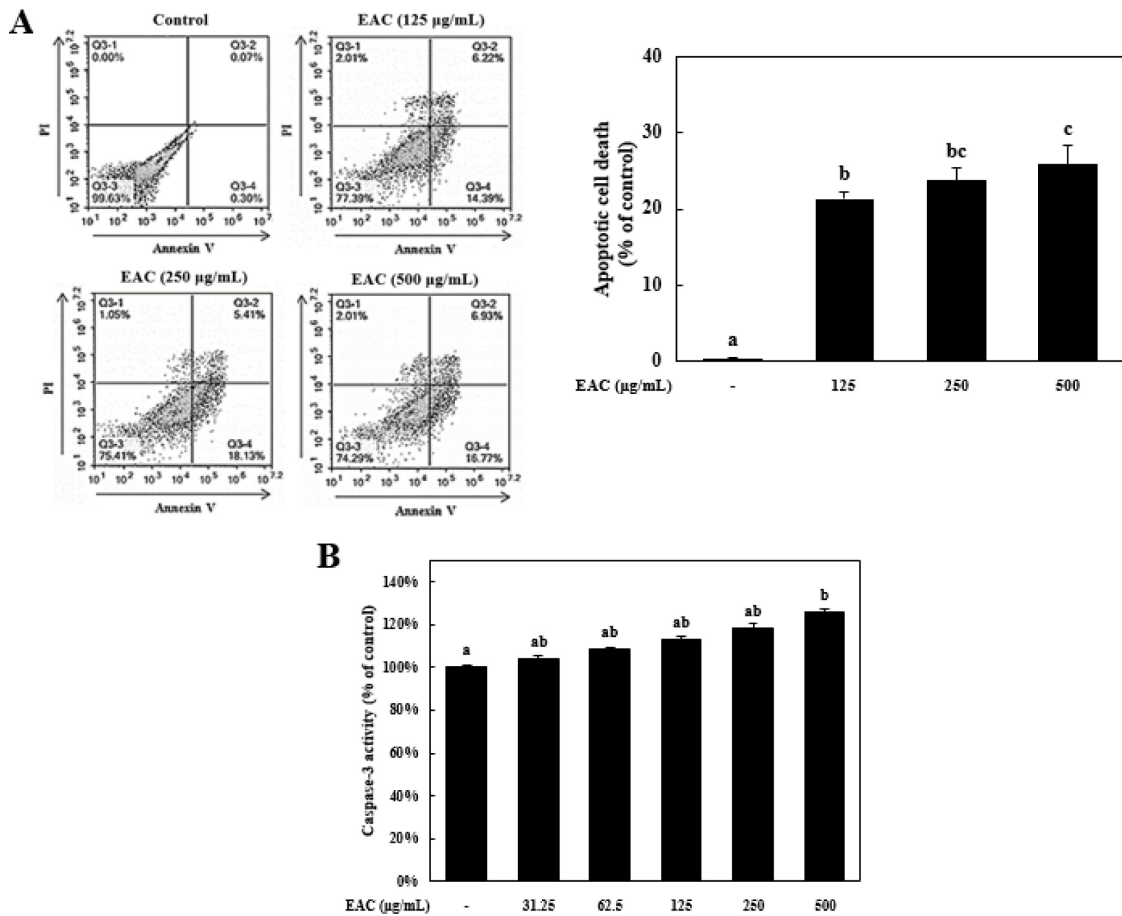


Fig. 6. EAC increases apoptotic cell death and caspase-3 activity in Hela cells. Hela cells were treated with various concentration for 24 h. (A) Hela cell visualized by Annexin V and propidium iodide staining analyzed by flow cytometry. Representative images were taken from at least three independent experiments. (B) Cell extracts were subjected to caspase-3 activity assay, caspase-3 activity measured by caspase-3 activity assay. Means values±SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

사 사

이 연구는 2016년도 보건복지부 한의약 산업 육성을 위한 기반구축(한국 토종자원의 한약재 기반구축사업) 결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

인용문헌

- Lee, K. W. and Song, J. W. (2007) Epidemiology of cervical cancer. *J. Korean Med. Assoc.* **50**: 762-768.
- Kang, S. B. (2007) Treatment of cervical cancer. *J. Korean Med. Assoc.* **50**: 785-795.
- Vistad, I., Fossa, S. D. and Dahl, A. A. (2006) A critical review of patient-rated quality of life studies of long-term survivors of cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* **102**: 563-572.
- Bergmark, K., Avall-Lundqvist, E., Dickman, P.W., Hen-

- ningsohn, L. and Steineck, G. (1999) Vaginal changes and sexuality in women with a history of cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **340**: 1383-1389.
- Frumovitz, M., Sun, C. C., Schover, L. R., Munsell, M. F., Jhingran, A., Wharton, J. T., Eifel, P., Becers, T. B., Levenback, C. F., Gershenson, D. M. and Bodurka, D. C. (2005) Quality of life and sexual functioning in cervical cancer survivors. *J. Clin. Oncol.* **23**: 7428-7436.
- Yoon, G. A., Chae, S. Y. and Kim, K. H. (2012) Synergistic anticancer activity on mouse sarcoma by mixture of doxorubicin and water extract of *Albizia julibrissin*. *Cancer Prev. Res.* **17**: 239-243.
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, Crjns, H. J. and Moens, A. L. (2012) Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms therapeutic strategies. *J. Mol. Cell Cardiol.* **52**: 1213-1225.
- Tacar, O., Sriamornsak, P. and Dass, C. R. (2013) Doxo-

- rubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**: 157-170.
9. Choi, S. R., Kim, M. J., Ahn, M. S., Song, E. J., Seo, S. Y., Choi, M. K., Kim, Y. S., Choi, D. G. and Song, Y. J. (2014) Cytotoxicity of extracts from Korean pepper (*Capsicum annuum* L.) by extraction solvents and plant parts. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **22**: 369-377.
 10. Yang, J., Kwon, Y. S., Lim, J. D., Yu, C. Y. and Kim, M. J. (2015) Antioxidant and anticancer properties of the extracts from *Lepisorus thunbergianus* (KaulF.) Ching. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **23**: 324-333.
 11. Han, H. M., Kwon, Y. S. and Kim, M. J. (2015) Antioxidant and antiproliferative activity of extracts from water chestnut (*Trapa japonica* flerow). *Korean J. Med. Crop. Sci.* **24**: 14-20.
 12. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K. and Tavernarakis, N. (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**: 3448-3489.
 13. Ko, W. C. and Lee, S. R. (2015) Effect of immature *Citrus sunki* peel extract on neuronal cell death. *Korean J. Med. Crop Sci.* **23**: 144-149.
 14. 이영노 (2007) 한국식물도감(상), 498. 교학사, 서울.
 15. 이창복 (2003) 원색 대한식물도감(상), 469. 향문사, 서울.
 16. 강병화 (2008) 한국생약자원생태도감(1), 487. 지오북, 서울.
 17. Hong, J. Y., Park, H. R., Kwon, Y. G., Kwon, W. Y., Kim, S. Y., Park, R. D. and Shin, S. Y. (2015) Anticancer properties of *Astilbe rubra* extracts on AsPC-1 human pancreatic cancer cells. *J. Basic Sciences* **32**: 21-28.
 18. Moon, T. C., Lin, C. X., Lee, J. S., Kim, D. S., Bae, K. H., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S., Song, J. K. and Chang, H. W. (2005) Antiinflammatory activity of astilbic acid from *Astilbe chinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 24-26.
 19. Oh, K. J., Choi, Y. S., Choi, I. S., Park, S. K., Lee, K. H., Chung, S. G. and Cho, E. H. (1992) Analgesic components of the rhizoma of *Astilbe chinensis* var. *dauidii*. *Yakhak Hoechi* **36**: 474-480.
 20. Xu, Y. Q., Pang, S., Hu, J. Y. and Duan, H. Q. (2013) A new triterpene from *Astilbe chinensis*. *Chem. Nat. Compd.* **49**: 268-270.
 21. Cai, X. F., Park, B. Y., Ahn, K. S., Kwon, O. K., Lee, H. K. and Oh, S. R. (2009) Cytotoxic triterpenoids from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *J. Nat. Prod.* **72**: 1241-1244.
 22. Hu, J. Y., Yao, Z., Xu, Y. Q., Takaishi, Y. and Duan, H. Q. (2009) Triterpenes from *Astilbe chinensis*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **11**: 236-242.
 23. Tu, J., Sun, H. X. and Ye, Y. P. (2008) Immunomodulatory and antitumor activity of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *J. Ethnopharmacol.* **119**: 266-271.
 24. Sun, H. X. and Peng, X. Y. (2008) Protective effect of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis* on cyclophosphamide-induced toxicity in tumor-bearing mice. *J. Ethnopharmacol.* **119**: 312-317.
 25. Zhang, Y. B., Peng, X. Y. and Sun, H. X. (2008) A new cytotoxic, apoptosis-inducing triterpenoid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *Chem. Biodivers.* **5**: 189-196.
 26. Sun, H. X., Zheng, Q. F. and Tu, J. (2006) Induction of apoptosis in HeLa cells by 3 β -hydroxy-12-oleanen-27-oic acid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 1189-1198.
 27. Sun, H. X., Ye, Y. P. and Pan, Y. J. (2004) Cytotoxic oleanane triterpenoids from the rhizomes of *Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. et Savat. *J. Ethnopharmacol.* **90**: 261-265.
 28. Sun, H., Zhang, J., Ye, Y., Pan, Y. and Shen, Y. (2003) Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from the rhizome of *Astilbe chinensis*. *Helv. Chim. Acta* **86**: 2414-2423.
 29. Bradford, M. M. (1970) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
 30. Kwon, O. K., Kim, C. S., Suh, W. S., Park, K. J., Cha, J. M., Choi, S. U., Kwon, H. C. and Lee, K. R. (2016) Phenolic compounds from the twigs of *Corylopsis coreana* uyeki and their cytotoxic activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**: 1-6.
 31. Yoon, H. H., Sohn, S. H., Lee, E. Y., Kim, G. S., Lee, S. E., Lee, D. Y., Seo, K. H., Lee, S. W. and Kim, H. D. (2015) Protective effect of *Saururus chinensis* ethanol extract against styrene in mouse spermatocyte cell line. *Korean J. Med. Crop Sci.* **17**: 239-243.
 32. Min, K. J., Song, J. W. and Cha, C. G. (2008) The antioxidative and antitumor activity of extracts of *Agrimonia pilosa*. *J. Fd. Hyg. Safety* **23**: 149-156.
 33. Park, H. M. and Hong, J. H. (2014) Physiological activities of *Aronia melanocarpa* extracts on extraction solvents. *Korean J. Food Preserv.* **21**: 718-726.

(2017. 9. 11 접수; 2017. 10. 30 심사; 2018. 1. 18 게재확정)