

인동초 추출물이

인체 전립선암 세포주에 미치는 영향

Effects of *Lonicera japonica* Extracts

on Prostate Cancer Cells

2011년 8월

조선대학교 보건대학원

대체의학과

이 형 진

인동초 추출물이
인체 전립선암 세포주에 미치는 영향

Effects of *Lonicera japonica* Extracts
on Prostate Cancer Cells

지도교수 문 경 래

이 논문을 대체의학 석사학위 신청 논문을 제출함

2011년 4월

조선대학교 보건대학원

대체의학과

이 형 진

이형진의 대체의학 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 서재홍



위원 조선대학교 교수 박상학



위원 조선대학교 교수 문경래 (인)



2011년 5월

조선대학교 보건대학원

목 차

도표 목차	5
영문 초록	6
I. 서 론,	9
II. 재료 및 연구 방법	12
1. 실험을 위한 재료		
2. 시 약		
3. 세포 배양 및 화학적 처리		
4. 시료 준비		
5. MTS 분석		
6. Western blot 분석		
7. 통계 처리		
III. 결 과	17
1. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (72시간, 메탄올 추출물에서 MTS assay에 의한 세포생존율)		
2. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (72시간, 열수 추출물에서 MTS assay에 의한 세포생존율)		
3. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (48시간, 열수, 메탄올 추출물, MTS assay에 의한 세포생존율)		
4. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (메탄올 추출물, Western Blotting, iNOS 및 COX-2 발현량)		
5. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (열수 추출물, Western Blotting, iNOS 및 COX-2 발현량)		
IV. 고 찰	22
V. 결 론	25
VI. 참 고 문 헌	27

도 표 목 차

도표 1. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (메탄올 추출물에서 MTS assay에 의한 세포생존율)	17
도표 2. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (열수 추출물에서 MTS assay에 의한 세포생존율)	18
도표 3. 인동초 열수 및 메탄올 추출물의 인체 전립선암 세포주의 세포성장율 억제에 관한 효과 (농도 0, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 48시간 경과)	19
도표 4. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (메탄올 추출물에서 Western blotting에 의한 iNOS와 COX-2 발현량 측정)	20
도표 5. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (열수 추출물에서 Western blotting에 의한 iNOS와 COX-2 발현량 측정)	21

ABSTRACT

Effects of *Lonicera japonica* Extracts on Prostate Cancer Cells

Lee Hyung-jin

Advisor: Prof. Moon Kyung-Rye, M.D., Ph.D

Graduate School of Health Science

Chosun University

Objective : This study is on the effects of the anti-cancer activity of *Lonicera japonica* extract in prostate cancer cells.

Methods : MTS assay was used to detect the effects of *Lonicera japonica* extracts on prostate cancer cells viability. And Western Blotting was used to see the effects of *Lonicera japonica* extracts on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression.

Results : Methanol extracts of *Lonicera japonica* reduced prostate cancer cells depending on time and concentration. Also it reduced iNOS expression in 600 μ g/ml concentration.

MTS assay results,

1. Methanol extracts of *Lonicera japonica* reduced prostate cancer

cells depending on time.

2. Methanol extracts of *Lonicera japonica* reduced prostate cancer cells depending concentration. Cell survival rate decrease depending on time and concentration especially, it reduced significantly at 800 and 1000 μ g/ml.

3. Hot water extracts of *Lonicera japonica* do not reduced prostate cancer cells depending on time.

4. Hot water extracts of *Lonicera japonica* do not reduced prostate cancer cells depending concentration. Cell survival rate do not decrease depending on time and concentration especially.

Western blot results,

5. Methanol extracts of *Lonicera japonica* reduced dramatically inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in 600 μ g/ml concentration.

6. Hot water extracts of *Lonicera japonica* do not reduced inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in various concentrations.

Conclusion : Methanol extracts of *Lonicera japonica* reduced significantly 97% cell viability of human prostate cancer cell lines at 800 and 1000 μ g/ml concentration and 92% expression of iNOS in 600 μ g/ml concentration. Hot water extracts of *Lonicera japonica* did not reduce the expression of iNOS at all concentrations.

Methanol extracts of *Lonicera japonica* implied that it was expected that isolation and purification test bring out more various clinical effects.

Key words: *Lonicera japonica*, prostate cancer, MTS, iNOS, COX-2

I. 서 론

전립선암은 다른 부위의 암 종에 비하여 그 발현빈도는 낮으나¹⁾ 악성도가 높아²⁾ 현저한 기능적, 심리적 손상과 이에 따른 사회심리학적인 장애로 보다 적극적이고 효과적인 치료법이 절실히 요구되는 질병이다.³⁾

최근 들어 여러 가지 질환⁴⁾ 특히 암 예방과 치료에 천연물이 많이 이용되고 있으며 많은 연구가 진행되고 있는데,⁵⁾⁶⁾ 특히 인동초에 관한 연구가⁷⁾ 활발하여 다양한 임상실험 결과에서 여러 가지 증금속 유발 질환⁸⁾ 및 *in vivo* 수준에서의⁹⁾ 폐암¹⁰⁾ 등 여러 종류의 암을 상당량 억제하거나 파괴했음을 보이고 있다.¹¹⁾

인동초에 관한 많은 선행연구를 고찰해 보면, 폐질환¹²⁾, 항염증 및 항알러지¹³⁾¹⁴⁾, 간질환 치료¹⁵⁾, 근육질환 치료 및 예방¹⁶⁾ 등 다양한 연구가 진행되었음을 알 수 있으며, 특히 폐암 세포의 사멸에 관한 다양한 연구가 진행되었음을 알 수 있었고¹⁷⁾, 항암 연구와 관련이 매우 깊은 항염증¹⁸⁾에 관한 다양한 선행연구가 있었음을 알 수 있었다.

인동초는 오래 전부터 항염증제로 알려져 왔는데, 최근연구에서 인동초 열수 추출물을 가지고, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)방법에 의해서 TNF-alpha 와 Tryptase production^{o]} 조사하고, Western blot에 의해서 Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation을 고찰한 바에 따르면, 인동초 추출물은 Trypsin-Induced Mast Cell Activation을 억제하는 것으로 나타났

다.¹⁹⁾

하지만 이러한 선행연구에도 불구하고, 전립선암에 대한 항암 작용을 나타내는 인동초의 연구는 아직 확인 된바가 없어 인동초에 대한 전립선암에 대한 효과 검증의 필요성이 증대 되고 있다.²⁰⁾ 선행연구의 결과 TNF-alpha등을 살펴볼 때²¹⁾ 인동초는 전립선암의 예방과 치료에도 탁월한 효능을 나타낼 것이라는 예측이 가능해지기 때문이다.²²⁾²³⁾ 특히 인동초에서 추출한 Three Pyridinium Inner Salt Alkaloids는 그러한 가능성을 더욱 높여주고 있다고 판단된다.²⁴⁾ 또한 인동초 추출물을 가지고 RAW 264.7 cells에서 Nitric Oxide (NO) 생성물 억제 및 Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha)등에 의한 Anti-inflammatory activity가 확인 되었고,²⁵⁾ 뿐만 아니라, 인동초에서 추출한 생리활성물질로 Western and Northern blot 방법으로 실험 했을 때 COX-2에 대한 Trifunctional inhibition이 나타났음이 밝혀져 더욱 높은 가능성을 보이고 있다.²⁶⁾

인동초는 중요한 한약재로써 지금은 손쉽게 구하여 차로 끓여 먹거나 술에 우려내어 먹는 사례들이 늘어나고 있는데 이는 인동초의 생리활성 성분 때문이다. 에탄올 추출물에서의 Toxicity²⁷⁾ 등에 관한 이러한 인동초의 생리활성 성분의 효과들이 매우 강력하기 때문에 또한 인동초 추출물은 비교적 누구나 손쉽게 구할 수 있기 때문에, 급속히 증가하고 있는 대한민국의 남성 초고령 인구를 생각해 볼 때, 전립선암에 대한 인동초 추출물에 대한 과학적 고찰이 더욱 필요하다고 생각하여 본 연구를 진행

하게 되었다.²⁸⁾²⁹⁾

본 연구에서는 인체 전립선암 세포주에 인동초 천연추출물 두 종류 (열수추출물 Hot-Water Extracts 와 메탄올추출물 Methanol Extracts)을 처리하여 1. 암 세포주 억제 효과와 2. 암 표적인자 발현 억제능 (COX-2 or iNOS)을 확인하고자 한다.³⁰⁾

II. 재료 및 연구 방법

1. 실험을 위한 재료

인동초는 전남 화순군 일대에서 채취하여 수집된 것으로 절단 후 충분히 건조한 상태에서 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

2. 시약

본 실험에 사용한 메탄올 시약은 1급 시약을 사용하였다. LPS, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymeh-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) 및 1% penicillin과 streptomycin 등은 Sigma사(USA)로부터 구입하였다. 더불어 10% FBS, 1% 항생제 (Gibco, USA), minimum essential medium (MEM)과 serum free media 등은 Gibco사(USA)의 시약을 구입하여 본 실험에 사용하였다.

3. 세포 배양 및 화학적 처리

전립선암 세포주는 American Tissue Culture Collection (Manassas, VA)에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 전립선암 세포주는 5% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 U/ml streptomycin 등을 첨가한 DMEM으로 5% CO₂의 상태에서 배양하였다.

4. 시료 준비

1) 열수 추출

인동초의 분말 100g과 증류수 1.3L를 이용하여 약탕기(대웅, DWP-5000M)에서 3시간 동안 가열하여 열수 추출을 하였다, 추출이 끝나고 나면, 부직포 여과지를 이용하여 압착 여과하였다. 여과된 추출물을 50ml 투브로 나누어 담고 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 여분의 분말 찌꺼기를 침전시켰다.

원심분리 후 상층액 만을 두 겹의 여과지 (Whatman No.1)를 이용하여 감압여과 하였다. 감압 여과된 추출물을 회전증발농축기를 이용하여 농축한 후, 동결건조기를 이용하여 동결 건조하였다. 동결건조가 끝난 후 곱게 분쇄하여 실험에 사용하도록 하였다.

2) 메탄올 추출

99% 메탄올 1L에 인동초 분말 100g을 24시간 침지시켰다. 이 때 2~3 시간 단위로 교반하여 시료가 골고루 섞이도록 하면서 추출물을 유도하였다. 추출 후 두 겹의 여과지를 이용하여 감압 여과한 후 1차적인 메탄올 추출액을 만들었다. 여과된 추출액을 회전증발농축기를 이용하여 감압 농축하였다. 이 때 water bath 의 온도를 35~37 °C를 유지하여 메탄올을 제거하며 농축하였다.

추출농축액을 chloroform과 1:1의 비율로 혼합하여 강하게 vortexing 한 후 4,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 엽록소 및 여분의 잔여 미세 시료를 총 분리하였으며, 하층의 chloroform이 무색이 될 때까지 3회 이상 반복적으로 과정을 수행하였다.

원심분리를 통하여 엽록소를 완전히 제거한 후 상층액 만을 수거하여 회전 증발 농축시켰다. 증발 농축 시킬 때 소량의 메탄올을 넣어 농축 효율을 증대시켰다. 농축 추출액을 동결 건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다.

또한 ethyl acetate 처리를 위하여 상기 방법으로 동일하게 처리한 후 chloroform 층이 무색이 되면, 상층액 만을 새로운 튜브로 옮긴 후 ethyl acetate와 1:1의 비율로 혼합한 후 4,000 rpm에서 2분간 원심분리 하였다.

상층액 만을 새로운 용기로 옮겨 담고 원심분리 후 남겨진 하층부에 다시 ethyl acetate를 처리하여 상기 방법으로 반복하여 상층부만을 기준에 옮겨 담은 용액이 있는 용기로 수합하였다. 상기 과정을 총 3회 반복하여 ethyl acetate를 이용한 폴리페놀화합물을 완전히 얻어내도록 하였다.

옮겨져서 수합된 상층부액을 회전 감압 농축기를 이용하여 감압농축하고 ethyl acetate를 완전히 제거되고 얻어진 고체 화합물의 질량을 측정하여 DMSO를 이용 100 mg/ml이 되도록 희석하여 사용하도록 하였다.

5. MTS 분석

인동초 추출물을 이용한 세포생존율(Cell Viability) 측정은 Cell titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI)로 제작사의 실험 매뉴얼에 따라 측정하였다.

전립선암 세포들은 96-well plate에 분주하고 인동초 추출물의 농도별 처리 후에 24, 48, 72 시간 후에 시간 경과에 따른 세포생존율 반응을 조사하였다.

MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-20yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) solution을 첨가하여 ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 492 nm와 690 nm에서 흡광도와 변화를 측정하여 대조구에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

각 농도별로 약재가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조구와 실험구의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

6. Western blot 분석

인동초 추출물은 처리한 후 전립선암 세포들을 수확하고 분쇄하였다. 단백질 상등액 fraction은 SDS-로 전기영동한 후 membranes로 옮기고 5% skim milk로 blocking하였으며, indicated antibodies로 hybridization 하였다. Horse radish peroxidase-conjugated secondary anti-body 된 protein bands는 chemiluminescence detection kit로 관찰 측정하였다.

7. 통계 처리

각각의 실험들은 3 반복 이상으로 실험 하였으며 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 계산하여 측정하였다. 실험결과의 통계분석은 Student's *t*-test를 이용했으며, *p*값이 0.05 이하인 경우에 실험결과가 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (72시간) (메탄올 추출물에서 MTS assay에 의한 세포생존율)

인체 전립선암 세포주의 세포독성(Cytotoxicity)을 알아보기 위하여, 인동초 메탄올 추출물을 농도를 달리하여 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 72시간 경과한 다음 암세포 생존율을 측정하였다. 도표 1과 같이 농도 800과 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 72시간 경과 후 97%의 암세포 성장 억제율을 보였다. 이 결과로 인동초 메탄올 추출물은 농도와 시간의 의존성을 가진다고 보여 진다.

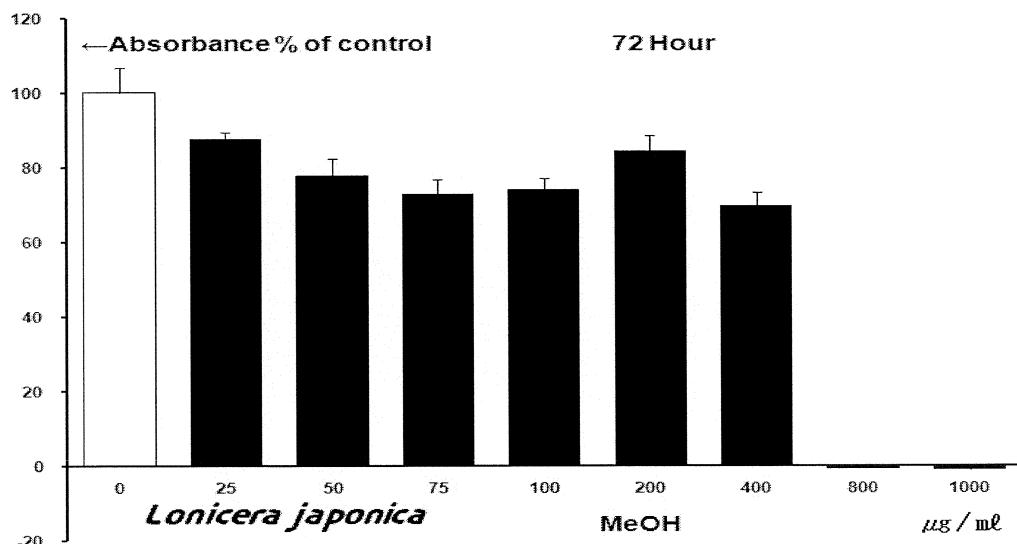


도표 1. 인동초 메탄올 추출물의 인체 전립선암 세포주의 세포성장을 억제에 관한 효과 (농도 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 72시간 경과)

2. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (72시간) (열수 추출물에서 MTS assay에 의한 세포생존율)

인체 전립선암 세포주의 세포독성(Cytotoxicity)을 알아보기 위하여, 인동초 열수 추출물을 농도를 달리하여 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 처리 후 72시간 경과한 다음 암세포 생존율을 측정하였다. 도표 2와 같이 각 농도에서 72시간 경과 후 각각 암세포 성장 억제율을 측정하였으나 그 억제율은 10% 내외로 미미하였다. 이 결과로 인동초 열수 추출물은 농도와 시간의 의존성을 가지지 않는다고 보여진다.

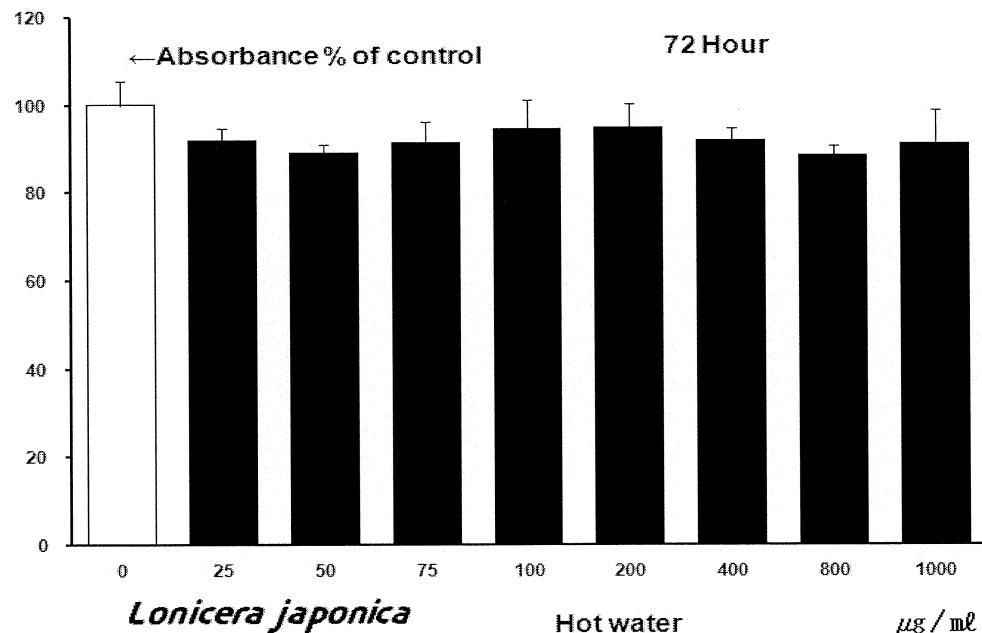


도표 2. 인동초 열수 추출물의 인체 전립선암 세포주의 세포성장을 억제에 관한 효과 (농도 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 처리 후 72시간 경과)

3. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (48시간) (열수 및 메탄올 추출물에서 MTS assay에 의한 세포생존율)

인체 전립선암 세포주의 세포독성(Cytotoxicity)을 알아보기 위하여, 인동초 열수 및 메탄올 추출물을 농도를 달리하여 0, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 48시간 경과한 다음 암세포 생존율을 측정하였다. 도표 3과 같이 열수추출의 경우 농도 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 30% 억제율을 보였고, 메탄올 추출이 경우 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 97% 억제율을 보였다. 이 결과로 인동초 메탄올 추출물은 농도와 시간의 의존성을 가진다고 보여진다.

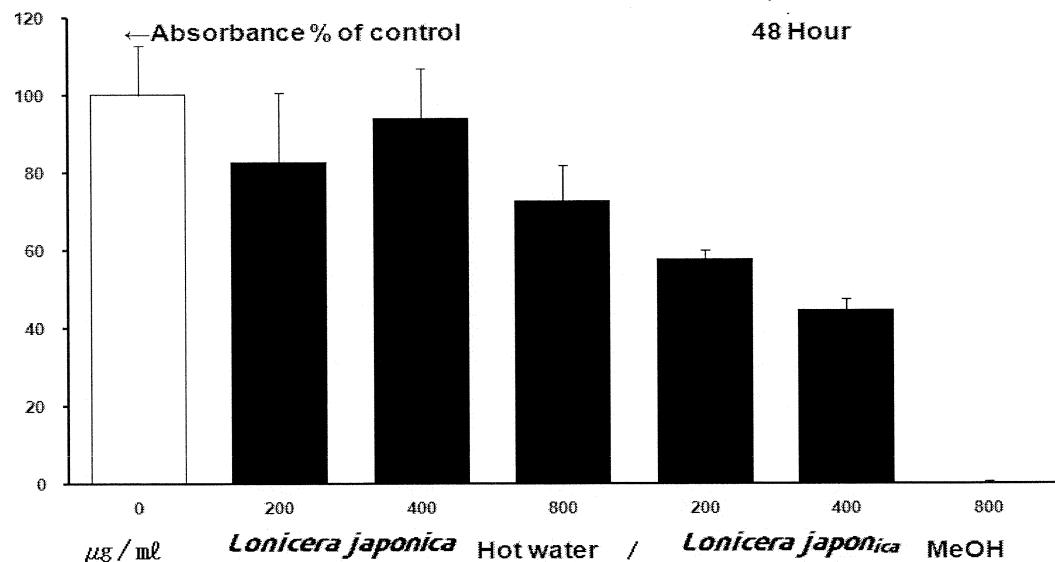


도표 3. 인동초 열수 및 메탄올 추출물의 인체 전립선암 세포주의 세포성장을 억제에 관한 효과 (농도 0, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 48시간 경과)

4. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (메탄올 추출물에서 Western Blotting의 한 iNOS 와 COX-2 발현량)

COX-2 및 iNOS 발현량을 측정하기 위하여, 실험군과 대조군을 나누고, 대조군에서 house keeping gene인 β -actin (indicating non-interference in cellular mechanism) 을 측정하여, 실험군의 COX-2 및 iNOS 발현량과 비교 하였다. 도표 4과 같이 농도 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 92% 이상의 억제효과를 보였다. 이 결과는 인동초 메탄올 추출물의 경우는 농도 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 최적의 조건임을 보여 주는 것이다. COX-2의 발현량은 변화가 없는 것으로 보아 인동초의 항암기작은 COX-2 경로 (pathway)가 아니라 iNOS 경로(pathway)인 것으로 보여 진다.

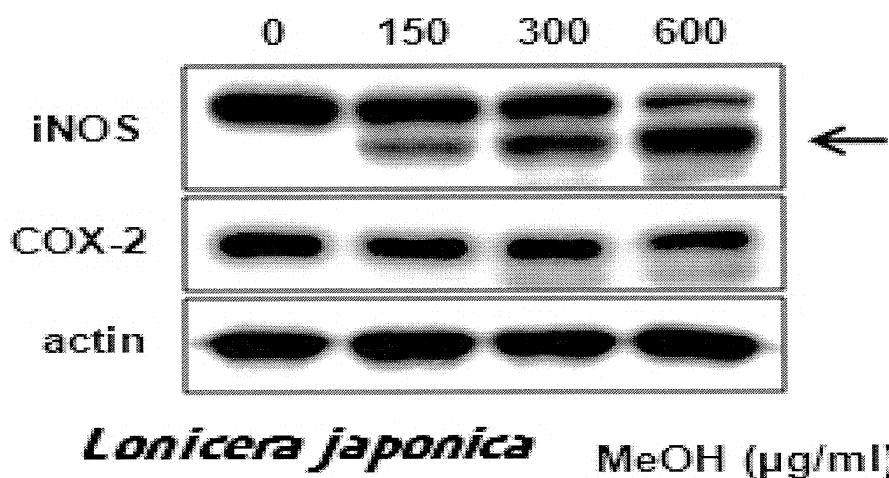


도표 4. 인동초 메탄올 추출물의 인체 전립선암 세포주의 COX-2 및 iNOS 발현량 억제효과 (농도 0, 150, 300, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

5. 인동초 추출물이 인체 전립선암 세포주에 미치는 영향 (열수 추출물에서 Western Blotting에 의한 iNOS 와 COX-2 발현량)

COX-2 및 iNOS 발현량을 측정하기 위하여, 실험군과 대조군을 나누고, 대조군에서 house keeping gene인 β -actin (indicating non-interference in cellular mechanism) 을 측정하여, 실험군의 COX-2 및 iNOS 발현량과 비교 하였다. 도표 5과 같이 모든 농도에서 억제 효과를 보이지 않았다.. 이 결과는 인동초 열수 추출물의 경우는 농도 의존성이 없는 것으로 보여 진다.

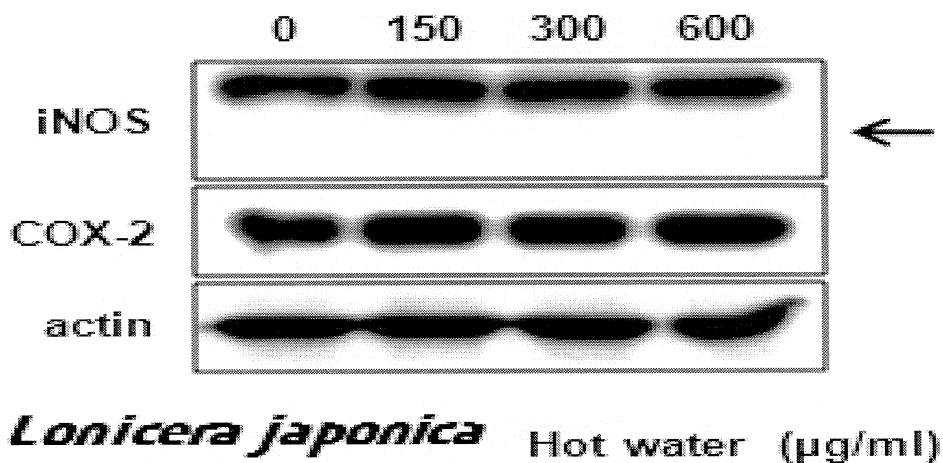


도표 5. 인동초 열수 추출물의 인체 전립선암 세포주의 COX-2 및 iNOS 발현량 억제효과 (농도 0, 150, 300, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

IV. 고 찰

인동초는 인동과에 속하는 초본식물로써 향명으로는 겨우살이라고도 하며, 학명은 *Lonicera japonica*이다. 우리나라에서 흔히 자생하고 있는 데, 꽃은 처음에는 흰색이나 나중에는 노란색으로 변하고, 잎겨드랑이에서 1-2송이씩 붙고, 가지 끝에 밀생하는 것 같다. 포는 잎 모양, 타원형, 난형, 길이 1~2cm이다. 꽃받침통은 텔이 없고, 갈래는 난형, 끝에 텔이 있다. 화관은 길이 3~4cm, 입술 모양으로 곁에는 텔이 있고, 안쪽에는 누운 텔이 있으며, 그 중 1개는 길게 갈라져 뒤로 말린다. 수술은 5개, 암술은 1개이다. 열매는 장과로 둥근 모양이며 검은색으로 익는다. 말린 꽃을 금은화, 말린 줄기/잎을 인동이라고 하고 약용으로 이용된다.³¹⁾

인동초의 주요 추출성분으로 생리활성물질인 루테올린가 플라보이드에 관한 선해연구를 고찰해보면, Luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone)은 강한 Anti-Tumor Activities을 나타냈고, Flavonoids는 Prooxidant And Antioxidant Action을 보여주었으며,³²⁾³³⁾ 한의학에서는 위장을 튼튼하게 해주고 감기나 타박상을 고치는 약으로 쓸 수 있다. 또한 다른 성분으로 이노시톨, 타닌, 류리세린, 알카로이드, 루테루닌, 사포닌 및 로리세린 등이 있으며, 이 성분들 중에는 Cyclooxygenases-2 and 5-Lipoxygenase의 억제 등에 유효하며,³⁴⁾ Epithelial Cells의 Virus 감염에도 유효하고,³⁵⁾ 한의학에서는 폐경, 비경, 심경에도 작용한다.

이러한 성분들 때문에 인동초는 한의학에서는 임질(淋疾), 간염(肝炎), 감기(感氣), 고운 살결을 원할 때 (美顏:미안), 관절통(關節痛), 괴저병(壞

疽病), 구토(嘔吐), 근골통 (筋骨痛), 농혈리(膿血痢), 당뇨(糖尿), 매독(梅毒), 맹장염(盲腸炎), 목이 쉰데(失音: 실음), 발열(發熱), 방광염(膀胱炎), 부종(浮腫), 설사(泄瀉), 소변 불통(小便不痛), 숙취(宿醉), 연주창(連珠瘡), 열독증(熱毒症), 요통(腰痛), 이뇨(利尿), 이하선염 (耳下腺炎), 자궁내막염 (子宮內膜炎), 정혈(精血), 종독(腫毒), 진통(陣痛), 창종(瘡腫), 출혈(出血), 치질(痔疾), 타박상(打搏傷), 탈항(脫肛), 통경(通經), 통풍(痛風), 피부염 (皮膚炎), 한열왕래(寒熱往來), 해독(解毒), 해열(解熱), 혈변(血便), 화농(化膿), 화상 (火傷), 황달(黃疸) 등에 사용되고 있다.

이러한 인동초의 인체 전립선암 세포주의 세포독성(Cytotoxicity)을 알아보기 위한 실험에서, 도표 1과 같이 농도 $800\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 처리 후 48 및 72시간 경과 후 각각 97% 이상의 암세포 성장 억제율을 보였다는 것은 농도를 달리하여 고농도일 경우 더 강한 억제율이 시사되는 것이라고 할 수 있겠다. 이는 고농도로 했을 경우 항암보조제로써 역할도 기대 된다고 시사된다.³⁶⁾

인동초 메탄올 추출물에서 COX-2 및 iNOS 발현량 측정 결과, 농도 $600\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 92% 이상의 억제효과를 보였다는 것은 인동초 메탄올 추출물의 경우는 농도 $600\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 최적의 조건임을 보여 주는 것이며, COX-2의 발현량은 변화가 없는 것으로 보아 인동초의 항암기작은 COX-2 경로 (pathway)가 아니라 iNOS 경로(pathway)인 것으로 보여 주며³⁷⁾ 이는 인동초 메탄올 추출물을 간암세포 사멸과 비교해 보았을 때³⁸⁾ 전립선암 항암보조제로 사용할 경우 중요한 단서로 작용될 수 있음을 시사한다.³⁹⁾

한편 인동초 열수 추출물에서 COX-2 및 iNOS 발현량 측정 결과, 도표 5와 같이 모든 농도에서 억제 효과를 보이지 않았다는 것은 인동초 열수 추출물의 경우는 농도 의존성이 없는 것이므로 인동초 추출물은 분자량 40,000 KDa 이상에서는 항암효과가 없는 것으로 보여 진다.

V. 결 론

소재 인동초를 가지고 인체 전립선암 세포주 실험에서 MTS assay 방식에 의해 세포 생존율을 측정하였고, Western Blotting 방식으로 iNOS 와 COX-2 발현량을 측정하였던바, 인동초 메탄올 추출물에서 높은 암세포 성장 억제율이 97% 이상으로 측정 되는 놀라운 결과를 얻을 수 있었으며, 또한 인동초의 암세포 성장을 억제하는 열수 추출이 아니라 메탄올 추출이 더욱 효과적이라는 사실을 알 수 있었다.

1. 인동초 메탄올 추출물은, 농도 $800\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 처리 후 72시간 경과 후 97%의 암세포 성장 억제율을 보임으로서 농도와 시간의 의존성을 가진다.
2. 인동초 열수 추출물의 경우, 각 농도에서 처리 후 72시간 경과 후 각각 암세포 성장 억제율은 10% 내외로 미미하였음으로 농도와 시간의 의존성을 가지지 않는다.
3. 인동초 열수 추출의 경우 48시간 경과 후 30% 억제율을 보임으로써 농도와 시간 의존성이 미미 하였고, 메탄올 추출물의 경우 농도 $800\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 처리 후 48시간 경과 후 97%의 암세포 성장 억제율을 보임으로서 농도와 시간의 높은 의존성을 가진다.
4. 인동초 메탄올 추출물에서 COX-2 및 iNOS 발현량 측정의 경우, 농도 $600\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 92% 이상의 억제효과를 보였음으로 농도 $600\mu\text{g}/\text{mL}$

이 최적의 조건임을 알 수 있고, COX-2의 발현량은 변화가 없는 것으로 보아 인동초의 항암기작은 COX-2 경로 (pathway)가 아니라 iNOS 경로(pathway)인 것으로 보여 진다.

5. 인동초 열수 추출물에서 COX-2 및 iNOS 발현량 측정의 경우, 모든 농도에서 억제 효과를 보이지 않았음으로 농도 의존성이 없는 것으로 보여 진다.

VI. 참 고 문 헌

- 1) Kim MY, Kim CS, Lee SH, Kim JW, Jang HJ: "A clinicostatistical analysis of oral cancer patients for recent 8 years." *J. Kor. Oral Maxillofac. Surg.* 2007;33:660-668
- 2) Park HS, Min KJ, Cha CG, Song JW, Son JC: "Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell by extract of *Paeonia lactiflora*." *Korean J Environ Health* 33: 21-29.
- 3) Lee EJ, Kim MJ, Myoung H: "Change of the invasiveness with selective Cox-2 inhibition in an oral squamous cell carcinoma cell line,: preliminary in vitro study" *The Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Journal.* 2007;33: 11-70
- 4) Kwon SH, Hong SI, Kim JA, Jung YH, Kim SY, Kim HC, Lee SY, Jang CG.: "The neuroprotective effects of *Lonicera japonica* THUNB. against hydrogen peroxide-induced apoptosis via phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt in SH-SY5Y cells." *Food Chem Toxicol.* 2011;49:1011-9.
- 5) Ku KM, Kim KU, Lee SC, Kang YH: "Screening of Cancer Preventive Activities from Medicinal Plants." *Proceedings of the Korean Society of Crop Science Conference,* 2006.51(s): 590-591
- 6) Lee YS, Cha JD, Kim GS, Ban SH, Jeon JG, Chang KW: Preventive dentistry : "Induction of apoptosis in human gingivo-fibroblast and induction of necrosis in oral epidermoid carcinoma cells from tea-tree." *J Korean Acad Dent Health* 2007;31:340-346

- 7) Lee G, Kim S, Jung J, Auh CK, Choi E, Chang M, Lee S. : "Agroinoculation of *Nicotiana benthamiana* with cloned honeysuckle yellow vein virus isolated from *Lonicera japonica*." Arch Virol. 2011 ;156:785-91.
- 8) Liu Z, He X, Chen W. : "Effects of cadmium hyperaccumulation on the concentrations of four trace elements in *Lonicera japonica Thunb.*" Ecotoxicology. 2011;20:698-705.
- 9) Hatip-Al-Khatib I, Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Iwasaki K, Kurauchi K, Inui K, Ikeda T, Fujiwara M. : "Determination of the effectiveness of components of the herbal medicine *Toki-Shakuyaku-San* and fractions of *Angelica acutiloba* in improving the scopolamine-induced impairment of rat's spatial cognition in eight-armed radial maze test." J Pharmacol Sci. 2004 ;96:33-41.
- 10) You BJ, Wu YC, Bao BY, Wu CY, Yang YW, Chang YH, Lee HZ. : "Rottlerin Inhibits *Lonicera japonica*-Induced Photokilling in Human Lung Cancer Cells through Cytoskeleton-Related Signaling Cascade." Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011: 193842.
- 11) Jeong JB, Park JH, Lee HK, Ju SY, Hong SC, Lee JR, Chung GY, Lim JH, Jeong HJ. : "Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect." Food Chem Toxicol. 2009 ;47:525-9.
- 12) Chen CY, Peng WH, Wu LC, Wu CC, Hsu SL. : "Luteolin ameliorates experimental lung fibrosis both in vivo and in vitro: implications for therapy of lung fibrosis." J Agric Food Chem.

2010;58:11653-61.

- 13) Ryu KH, Rhee HI, Kim JH, Yoo H, Lee BY, Um KA, Kim K, Noh JY, Lim KM, Chung JH. : "Anti-inflammatory and analgesic activities of SKLJI, a highly purified and injectable herbal extract of *Lonicera japonica*." Biosci Biotechnol Biochem. 2010 ;74:2022-8.
- 14) Kang M, Jung I, Hur J, Kim SH, Lee JH, Kang JY, Jung KC, Kim KS, Yoo MC, Park DS, Lee JD, Cho YB. : "The analgesic and anti-inflammatory effect of WIN-34B, a new herbal formula for osteoarthritis composed of *Lonicera japonica Thunb* and *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE in vivo." J Ethnopharmacol. 2010;131:485-96.
- 15) Sun C, Teng Y, Li G, Yoshioka S, Yokota J, Miyamura M, Fang H, Zhang Y. : "Metabonomics study of the protective effects of *Lonicera japonica* extract on acute liver injury in dimethylnitrosamine treated rats." J Pharm Biomed Anal. 2010 ;53:98-102.
- 16) Jeong JJ, Ha YM, Jin YC, Lee EJ, Kim JS, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Kang SS, Kim YS, Chang KC. : "Rutin from *Lonicera japonica* inhibits myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in vivo and protects H9c2 cells against hydrogen peroxide-mediated injury via ERK1/2 and PI3K/Akt signals in vitro." Food Chem Toxicol. 2009;47:1569-76.
- 17) Leung HW, Hour MJ, Chang WT, Wu YC, Lai MY, Wang MY, Lee HZ. : "P38-associated pathway involvement in apoptosis induced by photodynamic therapy with *Lonicera japonica* in human lung squamous carcinoma CH27 cells." Food Chem Toxicol.

2008;46:3389–400.

- 18) Chan BC, Hon KL, Leung PC, Sam SW, Fung KP, Lee MY, Lau HY. : "Traditional Chinese medicine for atopic eczema: PentaHerbs formula suppresses inflammatory mediators release from mast cells." *J Ethnopharmacol.* 2008;120:85–91.
- 19) Kang OH, Choi YA, Park HJ, Lee JY, Kim DK, Choi SC, Kim TH, Nah YH, Yun KJ, Choi SJ, Kim YH, Bae KH, Lee YM.: "Inhibition of trypsin-induced mast cell activation by water fraction of *Lonicera japonica*." *Arch Pharm Res.* 2004 Nov;27(11):1141–6.
- 20) Yoo HJ, Kang HJ, Song YS, Park EH, Lim CJ. : "Anti-angiogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* extract." *J Pharm Pharmacol.* 2008 Jun;60(6):779–86.
- 21) Suh SJ, Jin UH, Kim SH, Chang HW, Son JK, Lee SH, Son KH, Kim CH. : "Ochnaflavone inhibits TNF-alpha-induced human VSMC proliferation via regulation of cell cycle, ERK1/2, and MMP-9." *J Cell Biochem.* 2006 Dec 1;99(5):1298–307.
- 22) Jiang K, Pi Y, Hou R, Zeng H, Huang Z, Zhang Z, Sun X, Tang K. : "Molecular cloning and expression profiling of the first specific jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase from *Lonicera japonica*." *Mol Biol Rep.* 2009 ;36:487–93.
- 23) Wang T, Jiang X, Yang L, Wu S. : "pH-gradient counter-current chromatography isolation of natural antioxidant chlorogenic acid from *Lonicera japonica* Thunb. using an upright coil planet centrifuge with three multi-layer coils connected in

series." J Chromatogr A. 2008;1180:53-8.

24) Song W, Li S, Wang S, Wu Y, Zi J, Gan M, Zhang Y, Liu M, Lin S, Yang Y, Shi J. : "Pyridinium alkaloid-coupled secoiridoids from the flower buds of *Lonicera japonica*." J Nat Prod. 2008 ;71:922-5.

25) Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Schuller-Levis G.: "Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor-alpha secretion in an activated macrophage-like cell line." Am J Chin Med. 2005;33(3):415-24.

26) Xu Y, Oliverson BG, Simmons DL. : "Trifunctional inhibition of COX-2 by extracts of *Lonicera japonica*: direct inhibition, transcriptional and post-transcriptional down regulation." J Ethnopharmacol. 2007;111:667-70.

27) Thanabhorn S, Jaijoy K, Thamaree S, Ingkaninan K, Panthong A. : "Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica Thunb.*" J Ethnopharmacol. 2006 Oct 11;107(3):370-3.

28) Seo YW, Lee YS. : "Role of Diet in the Cause of Digestive System Cancers." Annals of Plant Resources Research, 2007; 16: 27-40

29) Kim JY, Park BW. : "Anticancer Activities against Oral Cancer Cells and Immuno-stimulating Activity of Mistletoe Lectin(*Viscum album var. coloratum agglutinin*, VCA)." Journal of Natural Science 2008;20: 81-91

30) Min-Geun Kim, Kang-Mo Ku, Young-Hwa Kang : "Cytotoxicity

of the Rhizomes extract of *Alpinia galanga* in murine hepatoma cell line." Proceedings of the Korean Society of Crop Science Conference 2007; 7-175

- 31) Henmi S, Honma N, Hatakeyama Y. : "Cultivation experiments of *Lonicera japonica*." Eisei Shikenjo Hokoku. 1967;85:105-7.
- 32) Leung HW, Kuo CL, Yang WH, Lin CH, Lee HZ. : "Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis." Eur J Pharmacol. 2006 Mar 18;534(1-3):12-8.
- 33) Kumar N, Singh B, Bhandari P, Gupta AP, Uniyal SK, Kaul VK. : "Biflavonoids from *Lonicera japonica*." Phytochemistry. 2005 Dec;66(23):2740-4.
- 34) Son MJ, Moon TC, Lee EK, Son KH, Kim HP, Kang SS, Son JK, Lee SH, Chang HW. : "Naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, inhibits cyclooxygenases-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells." Arch Pharm Res. 2006 Apr;29(4):282-6.
- 35) Ko HC, Wei BL, Chiou WF. : "The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells." J Ethnopharmacol. 2006 Sep 19;107(2):205-10.
- 36) Jeong JB, Park JH, Lee HK, Ju SY, Hong SC, Lee JR, Chung GY, Lim JH, Jeong HJ. : "Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect." Food Chem Toxicol. 2009 ;47:525-9.

- 37) Chang MC, Ho YS, Lee PH, Chan CP, Lee JJ, Hahn LJ, Wang YJ, Jeng JH. : "*Areca nut* extract and arecoline induced the cell cycle arrest but not apoptosis of cultured oral epithelial cells: association of glutathione, reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential." *Carcinogenesis.* 2001;22:1527-35
- 38) Yip EC, Chan AS, Pang H, Tam YK, Wong YH. : "Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism." *Cell Biol Toxicol.* 2006 Jul;22(4):293-302.
- 39) Kim SJ, Kwon do Y, Kim YS, Kim YC. : "Peroxyl radical scavenging capacity of extracts and isolated components from selected medicinal plants." *Arch Pharm Res.* 2010;33:867-73.