

산지별 더덕 추출물의 폐암 및 난소암에 대한 항암 효능

조영락 · 김수현 · 윤현재 · 홍삼열 · 고희영 · 박은희¹ · 김명동¹ · 서동완*
강원대학교 의생명과학대학 분자생명과학과, ¹강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공

Anti-tumor Effects of *Codonopsis Lanceolata* Extracts on Human Lung and Ovarian Cancer

Young-Rak Cho, Soo Hyeon Kim, Hyun Jae Yoon, Sam Yeol Hong, Hee-Young Ko,
Eun-Hee Park¹, Myoung-Dong Kim¹, and Dong-Wan Seo*

Department of Molecular Bioscience, College of Biomedical Science, Kangwon National University
¹Department of Food Science and Biotechnology, School of Biotechnology and Bioengineering,
Kangwon National University

Abstract

Codonopsis lanceolata L. (Campanulaceae) has long been used in traditional Korean medicine to treat bronchitis, cough, and inflammatory diseases, however, the efficacy of anti-tumor activities remains to be defined. In this study the effects of *Codonopsis lanceolata* (*C. lanceolata*) on proliferation, migration and adhesion in lung (A549, H1299) and ovarian cancer (SKOV-3) cells were investigated. To assess and compare the pharmacological effects and production places of *C. lanceolata*, the ethanolic extracts of *C. lanceolata* from different places in Korea (Hongseong, Yecheon, Yeongwol, Yanggu, Gangjin, and Hoengseong) were prepared. The extract from Hoengseong county did have only marginal anti-proliferative activity in all the cell lines tested, however, other extracts had little or no effect on cell proliferation. The extracts from Hongseong, Gangjin or Hoengseong county had partial anti-migratory activity in lung cancer cells, but not in ovarian cancer cells. In addition, the extract from Hoengseong county had partial anti-adhesive activity in ovarian cancer cells, however, other extracts did not affect cell adhesion in both lung and ovarian cancer cells. Taken together, these findings provide the first description of anti-tumor efficacy of *C. lanceolata* from different production places in Korea, and suggest that *C. lanceolata* from Hoengseong county may have therapeutic potential in lung and ovarian cancers.

Key words: *Codonopsis lanceolata*, ovarian cancer, lung cancer

서 론

최근 우리나라는 고령화 사회가 급속히 진행되는 가운데 국민들의 건강한 삶을 살고자 하는 욕구가 한층 강화됨에 따라, 질병이 발생한 후 치료하기 보다는 미리 질병을 예방하려는 생활 패턴으로 진행하고 있다. 녹차, 김치, 적포도주, 버섯, 청국장 등의 식품이 다양한 생리 활성으로 건강을 유지하고 질병 예방에 도움을 주고 있는 것으로 보고되고 있다(Goldberg, 1995; Jeong et al., 1995; Kim et al., 1996; Kim & Kim, 1999; Link et al., 2010).

더덕(*Codonopsis lanceolata* L., Campanulaceae)은 다년생 초본으로 도라지와 함께 식용으로 이용되고 있다. 더덕은 갈슘과 철분, 식이섬유, 당질, 수용성 비타민이 비교적 풍부하고, spinasterol, stigmasterol, oleanolic acid, albigenic acid, apigenin, saponin 및 inulin 등의 생리 활성 성분을 함유하고 있으며, 진해, 거담, 알콜성 지방간에 대한 보호, 항산화 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Chang et al., 1986; Cho et al., 2009; Kim et al., 2005; Oh & Kim, 2006). 또한 더덕은 임파구 및 대식세포에 의한 면역 활성을 증강시키고 염증 반응을 조절하는 것으로 보고되었으며 (Byeon et al., 2009; Lee, 2002; Lee et al., 2007), 급성 전골수구성 백혈병 세포주(HL-60)의 세포 사멸을 유도함으로써 항암 효과를 나타낸다고 보고되었다(Lee et al., 2005).

그러나 더덕의 다양한 생리 활성에 의한 질환의 개선 및 치료 효능이 국내 재배 지역에 따른 차이가 있는지에 대한 과학적 자료 및 증거는 확보되어 있지 않은 실정이다. 특히 국내 산지별 더덕의 항암 효능 평가는 전무하여, 본 연

Corresponding author: Dong-Wan Seo, Department of Molecular Bioscience, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Biomedical Science Bldg. B-105, Chuncheon 200-701, Korea
Tel: +82-33-250-8549; Fax: +82-33-241-4627
E-mail: dwseomb@kangwon.ac.kr
Received December 1, 2010; revised December 23, 2010; accepted December 23, 2010

구에서는 식용으로 하는 일반적인 중급 더덕을 국내 산지 별로 수집하여 항암 효능 평가를 수행하였으며, 특히 예후가 가장 불량한 악성 종양으로 알려진 폐암과 난소암 관련 세포주를 이용하여 종양의 성장 및 전이에 관련한 세포 증식, 이동 및 부착 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료의 전처리

더덕(*C. lanceolata*)은 홍성, 예천, 영월, 양구, 강진, 횡성 등의 농가에서 재배한 3년생 중품을 구입하였다. 더덕을 깨끗하게 수세한 후 열풍 건조기(동양과학 Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 42°C에서 24 시간 동안 건조시켰다. 추출 플라스크에 건조시킨 더덕 150 g과 용매(증류수 : 에탄올, 2 : 8 (v/v)) 1.5 L를 주입하고 70°C에서 24 시간 동안 추출하였다. 1차 추출을 통하여 얻은 추출액은 여과지(No.2, ADVANTEC, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과하였다. 여과 후 남은 시료를 상기의 비율로 혼합한 용매 1.5 L를 이용하여 1회 추가적으로 24 시간 동안 추출하였다. 추출한 시료는 농축기(NE-1001, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 70°C, 300 mbar, 30 rpm 조건으로 3-4 시간 동안 농축한 후, 26 mL씩 분주하고, 동결 건조기(FD5508, 일신과학, Korea)를 사용하여 48 시간 동안 동결 건조시켰다. 동결 건조된 시료는 분석할 때까지 초저온냉동고(DF8514, 일신과학 Gyeonggi-do, Korea)에 보관하였다.

세포 배양

폐암세포주(A549, H1299)와 난소암세포주(SKOV-3)를 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)으로부터 구입하여 10% fetal bovine serum-Dulbecco's Modified Eagle's Medium(10% FBS-DMEM, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)으로 배양하여 실험에 사용하였다.

세포 증식 분석법

종양 세포주를 6-well plates(150,000 cells/well)에 배양하고, 혈청이 첨가되지 않은 기본 DMEM 배지로 교환하여 세포들을 G_1/G_0 phase로 동기화(24 또는 48 시간)하였다. 새로운 기본 DMEM 배지로 교환한 후, 더덕 추출물 시료(100 µg/ml)를 30분(A549, SKOV-3 세포주) 또는 1시간(H1299 세포주) 전처리하고, 10% FBS 농도로 24 시간 동안 자극시키고 세포 증식 조절 효과를 관찰하였다. 세포 증식 변화를 측정하기 위하여 trypan blue stain 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 현미경(100× 배율)으로 직접 계수하였다(Seo et al., 2008).

세포 이동 분석법

세포 이동 변화는 monolayer wound healing assay(Alper

et al., 2001)를 이용하였다. 종양 세포주를 48-well plates(50,000 cells/well)에 배양한 후, 200 µL pipette-tip으로 중앙부분을 일직선으로 상처를 내고 기본 DMEM 배지로 교환하고 4 시간 동안 안정화시켰다. 새로운 기본 DMEM 배지로 교환한 후, 더덕 추출물 시료(100 µg/ml)를 30분(A549, SKOV-3 세포주) 또는 1시간(H1299 세포주) 전처리하고 10% FBS 농도로 12-14 시간 동안 자극시키고 세포 이동 변화를 관찰하였다. 세포는 phosphate-buffered saline 용액(PBS, pH 7.4)으로 세척하고 메탄올로 10분간 고정 한 후, Giemsa stain 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 염색하고 세포 이동 거리를 측정하였다.

세포 부착 분석법

배양한 종양 세포주를 trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid 용액으로 처리하여 떼어낸 후, 세포의 표면 및 활성을 정상화시키기 위하여 10% FBS-DMEM 배지에 1 시간 동안 반응시키고, 새로운 기본 DMEM 배지로 교환하였다. 더덕 추출물 시료(100 µg/mL)를 30분(A549, SKOV-3 세포주) 또는 1시간(H1299 세포주) 전처리하고 10% FBS 농도로 자극한 후, 96-well plates(15,000 cells/well)에서 2 시간 동안 배양한 후, 부착하지 못한 세포들을 PBS(pH 7.4)로 세척하여 제거하고, Giemsa stain 용액을 이용하여 염색한 후, 세포 부착 정도를 현미경(100× 배율)으로 6 지점 이상을 무작위로 선택한 후, 직접 계수하여 측정하였다.

결과 및 고찰

더덕의 세포 증식 조절 효능 평가

종양억제 유전자 p53을 발현하는 폐암 세포주 A549와 p53을 발현하지 않는 폐암 세포주 H1299 및 난소암 세포주 SKOV-3를 6-well plates에서 배양하고 기본 DMEM 배지로 교환하여 세포들을 G_1/G_0 phase로 동기화한 후, 산지별 더덕 추출물 시료(100 µg/mL)를 30분(A549, SKOV-3 세포주) 또는 1시간(H1299 세포주) 전처리하고, 10% FBS-DMEM 배지로 24 시간 동안 배양시켜 세포 증식 조절 효과를 측정하였다. A549 폐암 세포의 경우, 횡성더덕 추출물만이 10% FBS로 유도된 세포의 증식에 대하여 약 30% 정도의 감소 효과를 나타내었을 뿐, 다른 지역 더덕 추출물은 전혀 조절 효과를 나타내지 않았다(Fig. 1A). p53 종양억제 유전자가 결핍되어 있는 H1299 폐암 세포의 경우에는, 횡성과 강진 더덕 추출물이 약 15-20% 내외의 부분적 저해 효과를 나타냈다(Fig. 1B). SKOV-3 난소암 세포에서는 A549 세포와 유사하게 횡성을 제외한 다른 지역 더덕 추출물들은 세포 증식 조절 효과를 나타내지 않았다(Fig. 1C). 본 세포 증식 조절 효능 평가 결과를 종합하면, 종양억제 유전자 p53 발현 유무 및 세포 종류에 상관없이 부분적 세포 증식 저해 효과를 나타냈던 횡성 더덕 추출물

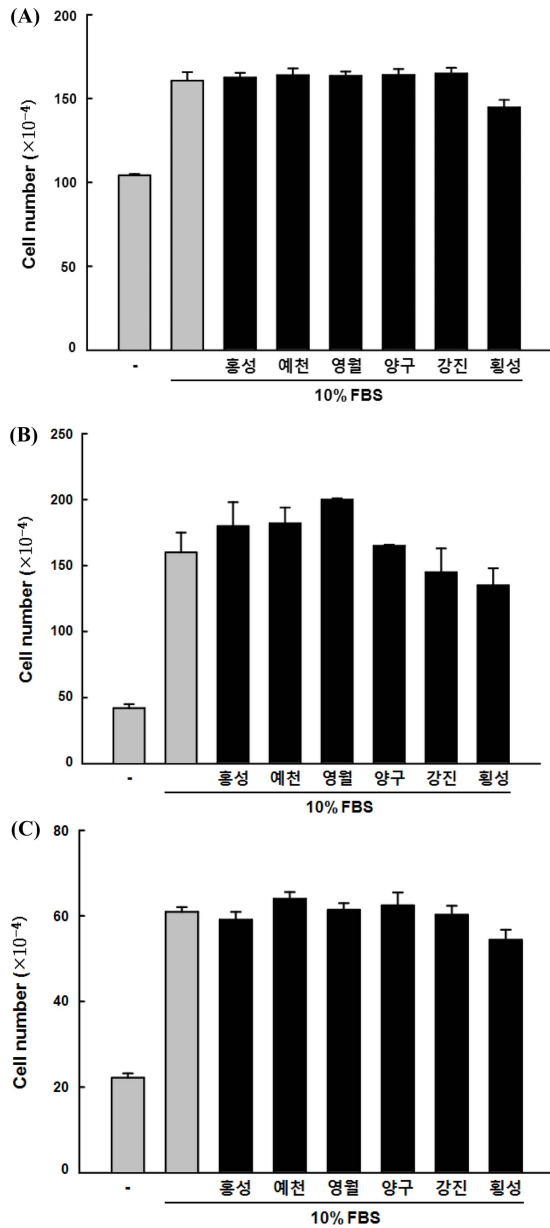


Fig. 1. Effect of *Codonopsis lanceolata* extract on the proliferation of lung and ovarian cancer cells. Quiescent cells (A549 (A), H1299 (B), and SKOV-3 (C)) were pre-treated with or without *Codonopsis lanceolata* extract (100 μ g/mL) from different places of production for 0.5 (A549 and SKOV-3 cells) or 1 hr (H1299 cells), followed by serum stimulation for 24 hr. Cell proliferation results from triplicate determinations (mean \pm S.D.) are presented as the number of viable cells.

을 제외하고는 다른 지역의 더덕 추출물들은 세포 증식 조절 효과를 나타내지 못하였다.

더덕의 세포 이동 조절 효능 평가

세포 이동 조절 효능 평가를 위하여 48-well plates에서 배양한 중앙 세포의 중앙 부분을 일직선으로 긁어 제거한

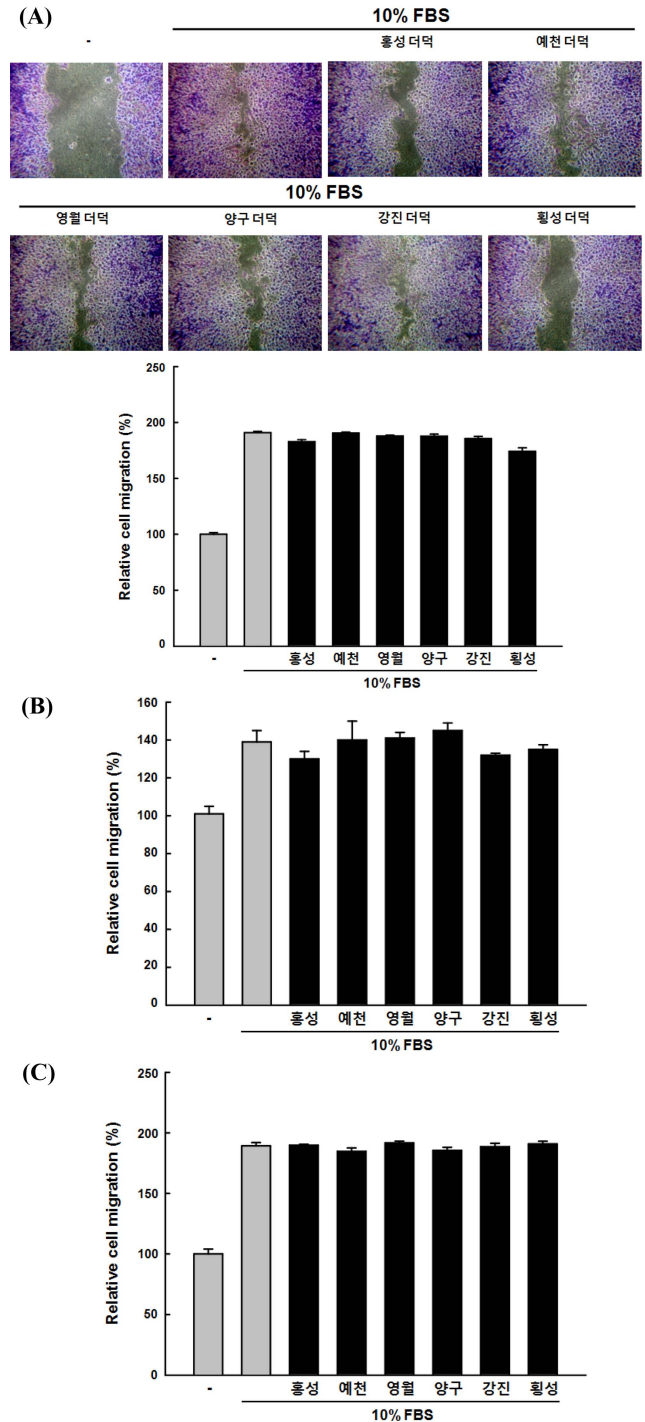


Fig. 2. Effect of *Codonopsis lanceolata* extract on the migration of lung and ovarian cancer cells. Cells (A549 (A), H1299 (B), and SKOV-3 (C)) were grown to confluence, and a wound was introduced by scratching the monolayer with a pipette tip. Cells were pre-treated with or without *Codonopsis lanceolata* extract (100 μ g/mL) for 0.5 (A549 and SKOV-3 cells) or 1 hr (H1299 cells), followed by serum stimulation for 12-14 hr. Migration into the wounded area was quantified by measuring the migration distance of cells from wound edge. Data were represented as the percentage of untreated migration from at least five independent experiments.

후, 세포 증식 조절 효능 평가 실험과 동일한 분류로 설정하여 처리하였고 12-14 시간 후 중앙 부분으로 세포가 이동한 거리를 측정하였다. A549 세포의 경우, 홍성 및 횡성 더덕 추출물만이 10% FBS에 의해 유도된 세포 이동에 대하여 약 10-20% 내의 부분적 감소 효과를 보였을 뿐, 다른 지역 더덕 추출물은 전혀 조절 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 2A). 또한 H1299 세포에서는 홍성, 강진 및 횡성 더덕 추출물이 약 14-23% 내외의 부분적 저해 효과를 나타냈다(Fig. 2B). 반면에 SKOV-3 세포에서는 모든 더덕 추출물들이 세포 이동 조절 효과를 전혀 나타내지 못하였다(Fig. 2C). 본 세포 이동 조절 효능 평가 결과를 종합하면, 실험에 사용한 모든 더덕 추출물은 난소암 세포의 이동에는 영향을 미치지 못하고, 일부 더덕 추출물이 폐암 세포의 이동에 대하여 부분적으로 조절하는 것으로 관찰되었으므로, 더덕 추출물의 세포 이동 조절 효과는 세포의 종류와 유관한 것으로 사료된다. 특히 횡성 더덕 추출물은 2종의 폐암 세포에 대하여 약 14-20%의 저해 효과를 나타내었는데, p53 결핍 H1299 폐암 세포에서 다소 억제 효과가 감소되는 것으로 관찰되었다.

더덕의 세포 부착 조절 효능 평가

산지별 더덕 추출물에 의한 중앙 세포 부착에 대한 조절 효능을 평가하기 위하여, 배양 중인 폐암 및 난소암 세포들을 0.25% trypsin/0.02% EDTA로 처리한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 1 시간 동안 세포 표면 회복을 시켰다. 새로운 기본 DMEM 배지로 교환한 후, 세포 증식 및 이동 조절 효능 평가 실험과 동일하게 분류하여 처리하고, 96-well plates에 각 well 당 15,000 개의 세포를 넣고 37°C에서 2 시간 동안 배양한 뒤 부착 정도를 확인하였다. A549 및 H1299 폐암 세포주를 이용한 세포 부착 조절 효능 평가 실험에서, 모든 더덕 추출물들은 10% FBS에 의해 유도된 세포 부착을 전혀 조절하지 못하였다(Fig. 3A, 3B). 또한 SKOV-3 세포에서도 대부분의 더덕 추출물들이 세포 부착 조절 효과를 전혀 나타내지 않았으나, 횡성 더덕 추출물이 유일하게 약 11% 정도의 미약한 세포 부착 저해 효과를 갖고 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 3C). 세포 부착 조절 효능 평가 결과를 종합하면, 일부 더덕 추출물에서 약한 세포 부착 저해 효과가 관찰되었으나, 대부분의 더덕 추출물은 세포의 부착에는 전혀 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 다양한 산지(홍성, 예천, 영월, 양구, 강진, 횡성)에서 생산된 더덕을 이용하여, *in vitro* 항암 효능 평가 연구를 수행하였다. 폐암 및 난소암 세포의 증식, 이동 및 부착 조절에 대한 효능을 평가함으로써 더덕의 신규 항

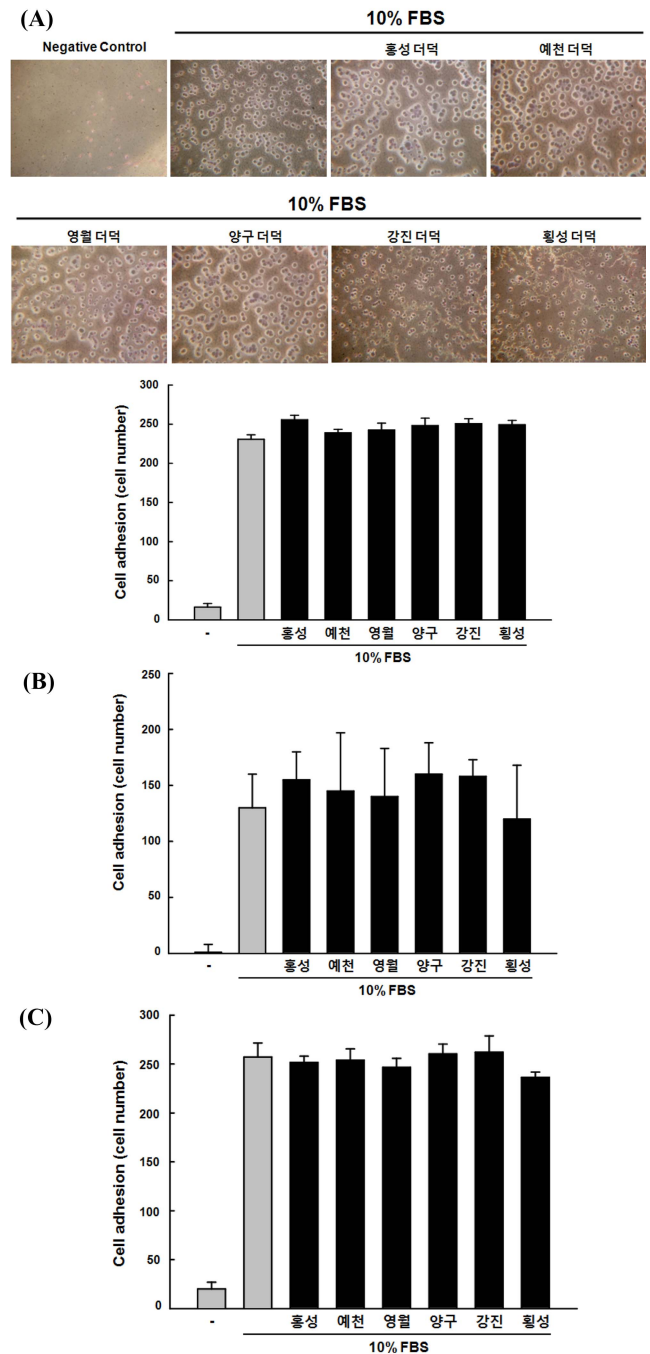


Fig. 3. Effect of *Codonopsis lanceolata* extract on the adhesion of lung and ovarian cancer cells. Suspending cells (A549 (A), H1299 (B), and SKOV-3 (C)) were pre-treated with or without *Codonopsis lanceolata* extract (100 µg/mL) for 0.5 (A549 and SKOV-3 cells) or 1 hr (H1299 cells), followed by serum stimulation and immediately plated on 96-well plates for 2 hr. Cell adhesion results from triplicate determinations (mean±S.D.) are presented as the number of attached cells from at least six independent measurement.

암 효능에 대한 탐색 및 소재 개발 가능성을 검토하였다. 다양한 산지별 더덕 중 횡성 더덕 추출물이 중앙 세포의

증식, 이동 및 부착에 대하여 부분적 저해 효과를 나타내었으나, 본 연구 결과로는 더덕 추출물이 세포 증식, 이동 및 부착 조절에 관련한 항암 효과는 거의 없거나 미약한 것으로 판단된다. 그러나 더덕 추출물의 항암 효능은 세포 또는 조직 특이적일 수 있고, 특정 유전자 발현 및 변이와의 상관관계 등 여러 인자가 관여할 수 있기 때문에, 이를 규명하기 위하여 더덕의 유효 성분 분리를 포함한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 강원도 시군 신성장동력산업 발굴육성 지원사업 및 울춘재단의 식품분야 기초연구과제사업의 지원으로 수행되었고, 2단계 BK21 사업으로부터 대학원생 인력을 지원받았으며, 강원대학교 생명공학연구소의 시설을 사용하였다.

참고문헌

- Alper O, Bergmann-Leitner ES, Bennett TA, Hacker NF, Stromberg K, Stetler-Stevenson WG. 2001. Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 1375-1384.
- Byeon SE, Lee YG, Cho JY. 2009. Regulatory effects of *Codonopsis lanceolata* on gene expression of GM-CSF in macrophage-like cells. *J. Ethnopharmacol.* 123: 185-189.
- Chang YK, Kim SY, Han BY. 1986. Chemical studies on the alkaloidal constituents of *Codonopsis lanceolata*. *Yakhak Hoeji* 30: 1-7.
- Cho K, Kim SJ, Park SH, Kim S, Park T. 2009. Protective effect of *Codonopsis lanceolata* root extract against alcoholic fatty liver in the rat. *J. Med. Food* 12: 1293-1301.
- Goldberg DM. 1995. Does wine work? *Clin. Chem.* 41: 14-16.
- Jeong YK, Yang WS, Kang JO, Kong IS, Kim JO. 1995. Fibrinolysis of fermented Kimchi. *Kor. J. Life Sci.* 5: 203-210.
- Kim JH, Kim YS. 1999. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 2130-2136.
- Kim JH, Oh HS, Choi MY. 2005. Change of fibrinolytic and antioxidative activities of *Codonopsis lanceolata* according to various storage conditions, and heat or salt treatments. *J. Exp. Biomed. Sci.* 11: 63-69.
- Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y, Oh H, Kwon I, Lee S. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 screened from ChungkookJang. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2482-2488.
- Lee JH. 2002. Immunostimulative effect of hot-water extract from *Codonopsis lanceolata* on lymphocyte and clonal macrophage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 732-736.
- Lee KW, Jung HJ, Park HJ, Kim DG, Lee JY, Lee KT. 2005. Beta-D-xylopyranosyl-(1→3)-beta-D-glucuronopyranosyl echinocystic acid isolated from the roots of *Codonopsis lanceolata* induces caspase-dependent apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 854-859.
- Lee YG, Kim JY, Lee JY, Byeon SE, Hong EK, Lee J, Rhee MH, Park HJ, Cho JY. 2007. Regulatory effects of *Codonopsis lanceolata* on macrophage-mediated immune responses. *J. Ethnopharmacol.* 112: 180-188.
- Link A, Balaguer F, Goel A. 2010. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* 80: 1771-1792.
- Oh HS, Kim JH. 2006. Characterization of physiological functionalities of *Codonopsis lanceolata*, *Cornus officinalis* S. et Z, and their mixtures. *J. Exp. Biomed. Sci.* 12: 393-398.
- Seo DW, Kim SH, Eom SH, Yoon HJ, Cho YR, Kim PH, Kim YK, Han JW, Diaz T, Wei BY, Stetler-Stevenson WG. 2008. TIMP-2 disrupts FGF-2-induced downstream signaling pathways. *Microvasc. Res.* 76: 145-151.