

Echinacea angustifolia 메탄올 추출물의 암세포 증식억제 및 항산화 효과

이준경 · 구성자
경희대학교 식품영양학과

Antiproliferative and Antioxidative Activities of Methanol Extracts of *Echinacea angustifolia*

Joon-Kyoung Lee, Seung-Ja Koo
Department of Food & Nutrition, Kyunghee University

Abstract

Echinacea, also known as the purple coneflower, is a herbal medicine that has been used for centuries, customarily as a treatment for the common cold, coughs, bronchitis, upper respiratory infections, and some inflammatory conditions. We investigated the effects of methanol extracts of *Echinacea angustifolia* on the cytotoxicity against cancer cells (HepG₂, 3LL, HL60, L1210) and antioxidative activity. From the test results, each part of *Echinacea* showed a cytotoxic effect against the cancer cell lines, and this cytotoxic effect increased with increasing sample concentration. At 1.0 mg/mL concentration, the relative cytotoxic activities of the flower bud, leaf, stem and root parts were 90.5%, 52.7%, 37.1% and 19.2%, respectively, in HepG₂ cells, and 75.5%, 93.3%, 81.2%, and 75.1%, respectively, in HL60 cells, as evaluated by MTT assay.

IC₅₀(50% inhibitory concentration) of the methanol extracts of the *Echinacea* flower bud was 0.214 mg/mL on HepG₂ cells, and that of the *Echinacea* leaf and root was 0.166 mg/mL and 0.210 mg/mL, respectively, on HL60 cells.

After HepG₂ cells were incubated for 6 days at 37 °C with various concentrations of each part, the cell number increased while the inhibition rate on the HepG₂ cell growth decreased. The antioxidative activities of the flower bud, leaf, stem and root parts were 59.0% (0.75 mg/mL), 80.76% (0.5 mg/mL), 95.5% (0.25 mg/mL) and 98.15% (0.25 mg/mL), respectively, as evaluated by electron donating ability. These results indicated that *Echinacea angustifolia* has strong anticancer and antioxidative effects *in vitro*.

Key words: *Echinacea angustifolia*, cytotoxicity, antioxidative effect, HL60 cells, HepG₂ cells

1. 서 론

암에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해 매우 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 개발 연구는 상당히 진전되어 여러 가지 화학합성 항암제가 임상에서 사용되

고 있으나 심각한 부작용을 보이는 것도 있다. 따라서 부작용이 적은 천연물질을 대상으로 항암성에 관한 검색이 많이 시도되고 있다(Doll R 와 Peto R 1981). 한편, 만성 질병의 징후를 예방하거나 치료를 돕고, 인식 기능 향상과 수명을 증가시키기 위해 대체 의약에 대한 관심이 증가함에 따라 허브에 대한 소비자의 관심이 날로 증가하여, 북미에서는 허브제품의 판매가 매년 약 10~15% 정도 증가하고 있으며 그 중 에키네시아(*Echinacea*) 제품이 가장 인기가 있다고 알려져 있다

Corresponding author: Seung-Ja Koo, Kyunghee University, 1, Hoiki-dong, Dongdaemoon-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel: 82-2-961-0709
Fax: 82-2-968-0260
E-mail: sjkoo@khu.ac.kr

(Barrett B 등 1999).

에키네시아는 캐나다와 미국 평원에서 자생하는 국화과의 다년생 식물로서 여러 종류가 있는데(Li TS 와 Wang LCH 1998), 가장 많이 이용되는 3가지 에키네시아 종(*Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea*) 중에서 *Echinacea angustifolia*는 북아메리카의 초기 이주민들과 원주민들에게 중요한 약용 식물이었으며, 최근까지 북아메리카와 독일의 제한된 지역에서 이용되고 있다(Linert D 등 1998). 최근 에키네시아(*Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea*) 제품은 전세계적으로 면역 증강과 상처 치료에 이용(Wagner HKM 1995, Pamham MJ 1996)되며 purple coneflower로 알려진 에키네시아는 추출물, 차, 강장제, 정제, 연고의 형태로 아메리카 원주민에 의해 1600년대 이래로 이용되어져 왔고, 수세기 동안 감기, 기관지염, 상부호흡기감염, 염증 치료에 민간요법으로 이용되어왔다(Hobbs C 1994). 현재 에키네시아는 면역 촉진제로 가장 잘 알려져 있어 호흡기 감염, 요로감염, 암, 피부질환과 다른 많은 염증과정에 비특이적 면역촉진제로서 이용되며(Dorch W 1996, Foster S 1991, Hobbs C 1995, Lersch C 등 1990) 동물실험에서 phagocytosis, chemotaxis, neutrophils의 oxidative burst(Graisbauer M 등 1990, Wagner H 등 1988), macrophages(Luttig B 등 1989, Stimpel M 등 1984)를 증가시키는 효과가 있었으며 이렇게 증가된 macrophage는 TNF, IL-1, IL-6, IL-10 생산을 증가시켜 tumor cell(WEHI 164 cell)을 죽인다고 알려져 있다(Burger RA 등 1997, Rosler J 등 1991, Steinmuller C 등 1993). 또한 에키네시아의 polyphenol 성분은 콜라겐 III type의 분해를 유도하는 hydroxyl radical(\cdot OH)에 대한 방어효과가 있어 피부의 photodamage를 감소시킨다고 보고되었다(Facino RM 등 1995). *Echinacea angustifolia*의 주요물질은 caffeic acid 유도체(echinacoside), alkamides, polyacetylenes, glycoproteins, polysaccharides로 보고되었고 많은 연구가 에키네시아 종에 의한 면역체계의 조절 기능을 보여주었음에도 불구하고(Rosler J 등 1991, Melchart D 등 1995, Se D 등 1997, Tragni E 등 1988) 에키네시아의 항암 활성에 관한 연구는 적었다.

우리나라에서도 허브 제품들이 인기를 얻고 있는 추세이지만, 에키네시아는 관상용으로 강원도 농장에서만 일부 재배하고 있는 실정이다. 본 연구는 에키네

시아의 생리 활성을 확인하기 위하여 *Echinacea angustifolia*를 꽃봉오리, 잎, 줄기 및 뿌리의 부위별로 메탄을 추출한 다음 이 추출물의 암세포에 대한 항암 활성과 전자공여능을 검색하여 기능성 식품 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 에키네시아는 강원도 평창군 허브나라농원에서 계약 재배하여 2000년 10월에 채취한 2년생 *Echinacea angustifolia*(Compositae family)로 꽃봉오리, 잎, 줄기 및 뿌리의 부위별 메탄추출물을 얻어 암세포(HepG₂, 3LL, HL60, L1210)에 대한 세포독성효과와 전자공여능 측정에 사용하였다. 암세포의 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM)과 RPMI 1640 medium이며, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA 등은 GIBCO사(Grand Island Biologic Co. NY U.S.A) 제품을 사용하였다. 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT), dimethylsulfoxide(DMSO) 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 Sigma 사로부터 구입하였으며, 기타 시약들은 특급 또는 일급 시약을 사용하였다.

2. 시료의 조제

에키네시아(생시료)의 꽃봉오리(578 g), 잎(398 g), 줄기(1,146 g) 및 뿌리(416 g)는 흙을 증류수로 씻어 가제로 물기를 제거한 후 세절하여 중량의 10배 메탄올로 실온에서 3일 간 추출한 후 2000 × g에서 40분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 상층액을 rotary evaporator(Heidolph, VV2000, Germany)를 이용하여 감압농축 한 것을 각각 꽃봉오리(72.53 g), 잎(44.09 g), 줄기(65.18 g) 및 뿌리(28.96 g) 메탄올 추출물로 하여 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였으며, 실험시 DMSO에 용해시키고, PBS로 희석하여(≤0.025% DMSO), 0.22 μm membrane filter로 여과한 후 사용하였다.

3. 세포주 및 배양

본 실험에 이용한 암세포주는 human promyelocytic leukemia(HL60), mouse leukemia(L1210) 및 human

hepatocellular carcinoma(HepG₂)는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 사용하였고, lung carcinoma(3LL)는 경희대학교 약학대학에서 분양 받아 사용하였다. HL60, L1210, 3LL 암세포주는 RPMI 1640 배지에 10% FBS와 1% antibiotics(penicilline G/streptomycin)를 첨가하여 배양하였고, HepG₂ cell은 DMEM 배지에 10% FBS, 1% antibiotics(penicilline G/streptomycin)를 첨가하여 배양하였으며, 이들 세포주는 37 °C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. HepG₂ cell과 3LL cell은 일주일에 2~3회 새로운 배지로 교환하고 phosphated buffered saline(PBS, pH 7.0)으로 세척한 후, 0.05% trypsin-0.002% EDTA를 사용하여 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후, 집적된 암세포에 배지를 넣고 암세포가 골고루 분산되도록 피펫으로 잘 혼합하여 T-75 mL cell culture flask에 일정량 분할하여 주입하고, 3~4일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. HL60 cell과 L1210 cell은 원심분리한 후, 집적된 암세포에 배지를 넣고 암세포가 골고루 분산되도록 피펫으로 잘 혼합하여 T-75 cell culture flask에 일정량 분할하여 주입하고, 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

4. MTT assay를 이용한 세포독성 실험

세포주에 대한 시료의 독성효과는 MTT colorimetric assay 방법(Kim JH 등 1993, Scudiero DA 등 1988)으로 실험하였다. 세포주와 시험물질이 접종된 plate를 CO₂ incubator에서 48시간 배양시킨 후 MTT 시약(5 mg/mL)을 각 well에 50 µL씩 첨가하여 MTT가 생존 암세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4시간 더 배양하였다. 각각의 실험군은 3개 well을 동일 조건으로 사용하였다. 배양 종료시 원심분리(450×g, 10 min)하여 상등액을 제거하고 하층부에 DMSO 100 µL를 첨가해 생성된 formazan(blue) 결정을 용해시켜 540 nm에서 microplate reader(Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하였다. 대조군으로서는 cell suspension 100 µL에 sample 대신 배지 100 µL를 첨가한 것을, blank는 각 농도별 sample 100 µL에 배지 100 µL를 넣은 흡광도를 측정하며 다음과 같은 식으로 cytotoxicity ratio(%)를 나타내었다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan으로 분해된 양을 나타내고 따라서 각 well의 viable cell 수와 비례하며 cytotoxicity ratio(%)로 나타내었다(Barbara G 등 1988, Carmichell J 등 1985).

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}}\right) \times 100$$

5. Hemacytometer에 의한 암세포 증식억제 효과

암세포 배양방법과 동일하게 HepG₂ cell은 10%의 FBS가 함유된 DMEM 배지에서 배양하여 0.05% trypsin-EDTA로 분리시켜 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 4×10⁴ cells/mL 농도로 seeding하여 24시간 동안 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후 시료를 배지에 첨가하여 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL 농도로 조정된 후 각 농도별로 시료를 첨가한 배지를 48시간마다 한번씩 교체하면서 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 1, 3, 6일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-EDTA로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식억제 효과를 관찰하였다.

7. 암세포의 형태학적 관찰

HepG₂ cell의 형태학적 관찰을 위해 암세포 증식 억제 실험방법과 동일하게 하여 배양 6일 후에 암세포의 모양을 inverted microscope로 관찰하였다. 24시간 배양된 HepG₂ cell에 에키네시아 메탄올추출물(0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL)을 첨가하여 배양하면서 1일, 3일, 6일 경과후의 암세포의 모양을 관찰하였다(Franceschi RT 등 1985).

8. DPPH에 의한 전자공여능의 측정

DPPH에 의한 전자 공여능을 Mitsuda 등의 방법(Mitsuda H 등 1966)으로 측정하였다. 시료 0.2 mL에 0.1 M 인산 완충액(PBS, pH 6.5) 2.0 mL, 99% 에탄올 1.5 mL, 5×10⁻⁴ M DPPH 알코올 용액 1.0 mL를 각각 섞은 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 EDA(Electron donating ability)값을 구하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}}\right) \times 100$$

9. 통계분석

모든 실험결과와 통계처리는 SAS 통계 프로그램을

이용하여 분석하였으며, 그 결과는 표준오차와 함께 평균값으로 표시하였다. 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료간의 유의성은 general linear model(GLM)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. MTT assay에 의한 세포독성 효과

1) 간암 세포주(HepG₂ cell)

에키네시아 메탄올 추출물들이 암세포주에 대해 나타내는 세포독성을 항암작용의 한 지표로 삼았다. HepG₂ cell에 대한 MTT assay 실험결과는 Fig. 1에서와 같이 꽃봉오리, 잎, 줄기 및 뿌리 메탄올 추출물을 0.125~1.0 mg/mL 농도로 했을 때 꽃봉오리는 35.6~90.5%였고 잎은 2.6~52.7%, 줄기는 8.0~37.1%를 나타냈으며 뿌리는 11.4~19.2%의 세포독성을 보였다. HepG₂ cell의 경우 전체적으로 추출물의 농도가 증가할수록 세포독성 효과가 높아지는 경향을 나타냈으며 에키네시아 꽃봉오리 추출물의 세포독성 효과가 가장 높게 나타났다.

2) 폐암 세포주(3LL cell)

3LL cell에 대한 MTT assay 실험결과는 에키네시아의 각 부위별 메탄올 추출물을 0.0625~1.0 mg/mL 농

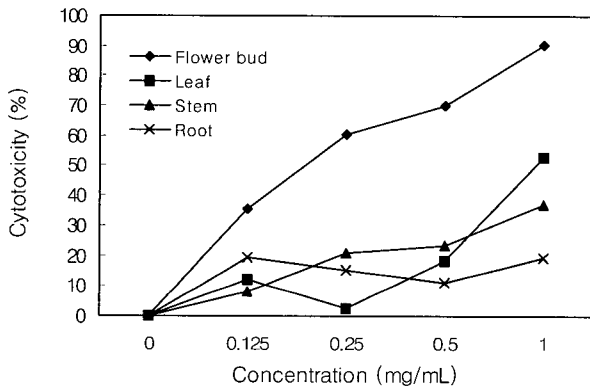


Fig. 1. Cytotoxicity of methanol extracts from the each part of *Echinacea angustifolia* on the growth of HepG₂ human hepatoma cells in MTT assay. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated from two times experiments. Results were presented as mean±S.D., (n=6). X axis is log scale.

도로 했을 때 대체로 세포독성 효과가 없었다(data not shown).

3) 인간유래 백혈암 세포주(HL60 cell)

HL60 cell에 대한 MTT assay 실험결과는 시료를 0.0625~1.0 mg/mL 농도로 했을 때 꽃봉오리와 줄기는 각각 18.9~75.5%와 24.3~81.2%로 농도 의존적으로 세포독성효과가 증가하였고, 잎은 0.0625 mg/mL 농도에서부터 66.2%의 독성효과를 나타내어 점차 증가하다가 1.0 mg/mL 농도에서는 93.3%의 매우 높은 세포독성효과를 보였다. 뿌리는 0.0625 mg/mL의 저농도에서부터 70.2%의 세포독성효과를 나타내었고 0.5 mg/mL 농도에서 75.1%의 최고 독성효과를 보이다가 그 이후의 농도에서는 약간 감소하였다(Fig. 2).

HL60 cell의 경우에 잎과 뿌리 추출물은 저농도에서부터 독성효과가 컸으며 뿌리는 농도 증가함에 따라 독성효과가 약간 감소하는 경향이 나타났고 줄기와 꽃봉오리는 저농도에서는 독성효과가 낮았으나 고농도로 갈수록 독성효과가 커짐을 알 수 있었다.

4) 마우스 백혈병 세포주(L1210 cell)

L1210 cell에 대한 MTT assay 실험결과는 시료를 0.0625~1.0 mg/mL 농도로 했을 때 꽃봉오리는 0.125~1.0 mg/mL 농도에서 22.9%에서 8.9%로 감소하였고 잎과 뿌리는 세포독성효과가 없었으며 줄기는 0.062와

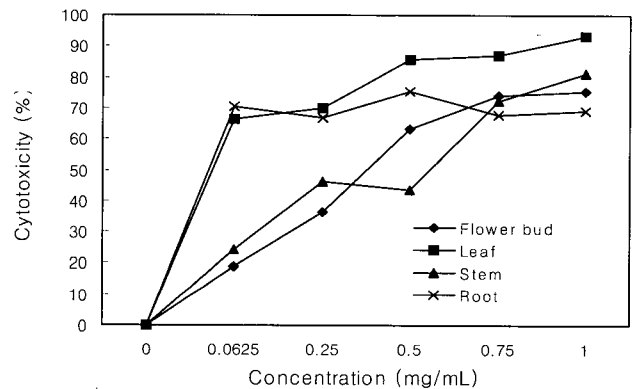


Fig. 2. Cytotoxicity of methanol extracts from the each part of *Echinacea angustifolia* on the growth of HL60 human leukemia cells in MTT assay. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated from two times experiments. Results were presented as mean±S.D., (n=6). X axis is log scale.

0.125 mg/mL 농도에서 4.9%에서 3.7%로 감소하다가 0.25~1.0 mg/mL 농도에서는 세포독성효과가 없었다 (Fig. 3).

50% 억제농도(IC₅₀)는 억제율이 50%가 되도록 하는 시료의 농도로 정의하였으며 이 IC₅₀의 값을 항암효과의 지표로 사용하였다. HepG₂ cell, HL60 cell에 대해 IC₅₀의 값이 0.230 mg/mL 이상으로 나타난 추출물에 대해서는 항암 활성이 없거나 미약한 것으로 간주 할 경우(Hyun JW 등 1994) IC₅₀값이 에키네시아 잎과 줄기 추출물이 HL60 cell에 대해서 0.166 mg/mL와 0.210 mg/mL, 꽃봉오리 추출물이 HepG₂ cell에 대해서 0.214 mg/mL로, 0.230 mg/mL 이하로 나타나 항암효과가 큰 것으로 나타났다(Table 1).

이상의 결과로 보아 에키네시아 각 부위별 메탄올 추출물은 HepG₂ cell에 대하여 농도 의존적으로 세포독성효과가 있으며 그 중에서도 꽃봉오리 메탄

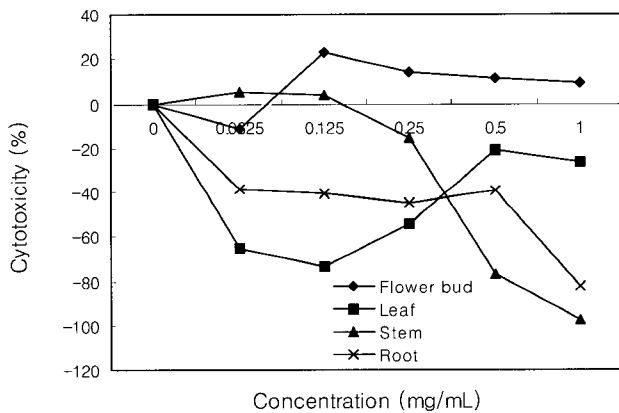


Fig. 3. Cytotoxicity of methanol extracts from the each part of *Echinacea angustifolia* on the growth of L1210 mouse leukemia cells in MTT assay. Results are presented as mean±S.D. (n=6). X axis is log scale.

올 추출물이 가장 높은 세포독성효과를 나타냈고, HL60 cell에 대하여는 뿌리와 잎의 추출물이 높은 세포독성효과를 나타냈으며, 3LL cell에 대하여는 뿌리 추출물의 경우 세포독성효과를 나타냈고 나머지는 대체로 세포독성효과가 없었으며 L1210 cell에 대하여는 꽃봉오리와 저농도의 줄기 추출물의 경우 세포독성효과가 미약하였고 나머지는 세포독성효과가 없었다.

2. Hemacytometer에 의한 암세포 증식억제 효과

HepG₂ cell에 에키네시아의 각 부위별 메탄올 추출물을 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL 농도로 첨가하여 암세포 성장에 미치는 효과를 관찰하여 본 결과 농도에 의존하여 암세포 증식억제 효과가 증가되었다. 시료 1.0 mg/mL 농도로 첨가하여 1일 배양 후 꽃봉오리, 잎, 줄기 및 뿌리 메탄올 추출물은 각각 97.7%, 93.49%, 90.04% 및 80.85%의 암세포증식억제 효과를 나타내었으며(Table 2), 잎 추출물의 경우 저농도(0.25 mg/mL, 92.34%)에서부터 높은 암세포 증식 억제효과가 있었다. 초기 세포수 4×10⁴ cells/mL로 1일간 배양 후 대조군의 경우 21.75×10⁴ cells/mL로 증식한 반면 꽃봉오리

Table 1. 50% inhibitory concentration of the *Echinacea angustifolia* methanol extracts on cancer cell lines.

| Echinacea Part | IC ₅₀ (mg/mL) | |
|----------------|--------------------------|-----------|
| | HepG ₂ cell | HL60 cell |
| Flower bud | 0.214 | 0.499 |
| Leaf | 1.290 | 0.166 |
| Stem | 2.467 | 0.502 |
| Root | 3.331 | 0.210 |

The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated from two times experiments. Results are presented as mean±S.D., (n=6).

Table 2. Effects of methanol extracts of *Echinacea angustifolia* on the growth of HepG₂ cells for 1 day at 37°C.

| Part | Concentration (mg/mL) | | | | | | | |
|------------|----------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
| | 0.25 | | 0.5 | | 0.75 | | 1.0 | |
| | Cell number* (×10 ⁴) | Inhibition (%) | Cell number (×10 ⁴) | Inhibition (%) | Cell number (×10 ⁴) | Inhibition (%) | Cell number (×10 ⁴) | Inhibition (%) |
| Control | 21.75±4.0646 ^a | - | 21.75±4.0646 ^a | - | 21.75±4.0646 ^a | - | 21.75±4.0646 ^a | - |
| Flower bud | 19.33±3.18 ^a | 12.64 | 14.50±3.90 ^{ab} | 33.00 | 1.25±0.29 ^b | 94.26 | 0.5±0.29 ^b | 97.70 |
| Leaf | 1.67±0.22 ^b | 92.34 | 0.83±0.46 ^c | 96.17 | 1.83±0.51 ^b | 91.58 | 1.42±0.79 ^b | 93.49 |
| Stem | 17.13±8.44 ^{ab} | 21.24 | 13.00±3.25 ^{ab} | 40.23 | 2.83±1.23 ^b | 79.32 | 2.17±0.96 ^b | 90.04 |
| Root | 8.50±4.65 ^{ab} | 60.92 | 6.33±0.51 ^{bc} | 70.89 | 4.83±1.10 ^b | 77.78 | 4.17±0.65 ^b | 80.85 |

* Values are means±S.E.M. (n=3).

Values with the same letter in the same column are not significantly different (P<0.05).

추출물의 경우에는 1.0 mg/mL 농도에서 결과 0.5×10^4 cells/mL로 증식하여 97.7%로 가장 많이 억제되었다. 3일 배양 후에는 60.01~99.23%의 암세포증식 억제효과를 나타내었는데 대조군의 경우는 76×10^4 cells/mL로 증식한 반면 줄기 추출물(1.0 mg/mL)의 경우 0.58×10^4 cells/mL로 증식하여 99.23%로 가장 많이 억제되었다. 꽃봉오리 추출물을 첨가하여 3일 배양한 후에는 0.25와 0.5 mg/mL 농도에서는 암세포증식억제효과가 높아졌으나(0.25 mg/mL, 60.01%; 0.5 mg/mL, 92.43%) 0.75와 1.0 mg/mL 농도에서는 오히려 암세포증식 억제 정도가 약간 감소함(0.75 mg/mL, 89.69%; 1.0 mg/mL, 93.64%)을 알 수 있었다. 잎 추출물은 3일 배양 후에는 오히려 암세포증식 억제 정도가 약간 감소(0.25 mg/mL, 72.37%; 0.5 mg/mL, 84.10%; 0.75 mg/mL, 88.38%)함을 알 수 있었다. 줄기와 뿌리추출물은 농도 의존적으로 그리고 배양시간이 증가함에 따라 암세포증식 억제효과가 계속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 6일 배양 후에는 대조군의 경우는 1114.5×10^4 cells/mL로 증식하였고 4가지 부위의 모든 농도에서 97.31%에서 99.96%의 높은 암세포 증식 억제 효과가 나타났다(data not shown).

따라서 HepG₂ cell의 경우 전체적으로 추출물의 농도가 증가할수록 암세포증식 억제효과가 높아지는 경향을 나타냈고, 배양시간이 증가함에 따라 암세포증식 억제효과가 계속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 1일 처리한 잎 추출물의 경우 0.25 mg/mL의 농도에서부터 높은 암세포 증식 억제효과가 있었다.

3. 암세포의 형태학적 관찰

에키네시아의 각 부위별 메탄올 추출물이 HepG₂ cell의 형태학적 변화는 inverted microscope로 세포모양을 관찰하였다. 대조군은 암세포가 조밀하게 증첩되어 증식되었으나 시료(0.25~1.0 mg/mL 농도)를 첨가하였을 때 세포의 결속력이 감소되어 세포주위가 흐트러지고 세포가 사멸된 것을 관찰할 수 있었다. 6일 배양후는 모든 시료에서 높은 암세포 증식억제 효과가 나타나 거의 사멸되어가고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

이상에서 HepG₂ cell에 대해 매우 높은 세포독성효과를 보인 에키네시아 꽃봉오리 추출물과 HL60

cell에 대해 높은 효과를 보인 잎과 뿌리에 대하여 항암작용을 갖는 성분의 규명이 뒤따라야 할 것이다.

4. 전자공여능에 의한 항산화 활성

에키네시아의 부위별 메탄올추출물(0.0625~0.25 mg/mL)의 전자공여능은 Fig. 5에서와 같이 뿌리와 줄기는 0.25 mg/mL 농도에서 각각 98.15%, 95.53%, 잎은 0.5 mg/mL에서 87.76%, 꽃봉오리는 0.75 mg/mL농도에서 59.48%의 최고의 전자공여능을 나타냈다. 에키네시아의 메탄올 추출물은 이용부위에 따라 최고의 EDA를 나타내는 농도가 달랐으며, 뿌리와 줄기부위는 저농도(0.25 mg/mL)에서도 95%이상의 전자공여능을 나타내었다.

정 등(Chung HJ 와 Noh KL 2000)은 geranium 메탄올추출물(0.1%(g/v))의 전자공여능을 90.6%이었다고 보고하였고, 또한 강 등(Kang YH 등 1995)은 70% 아세

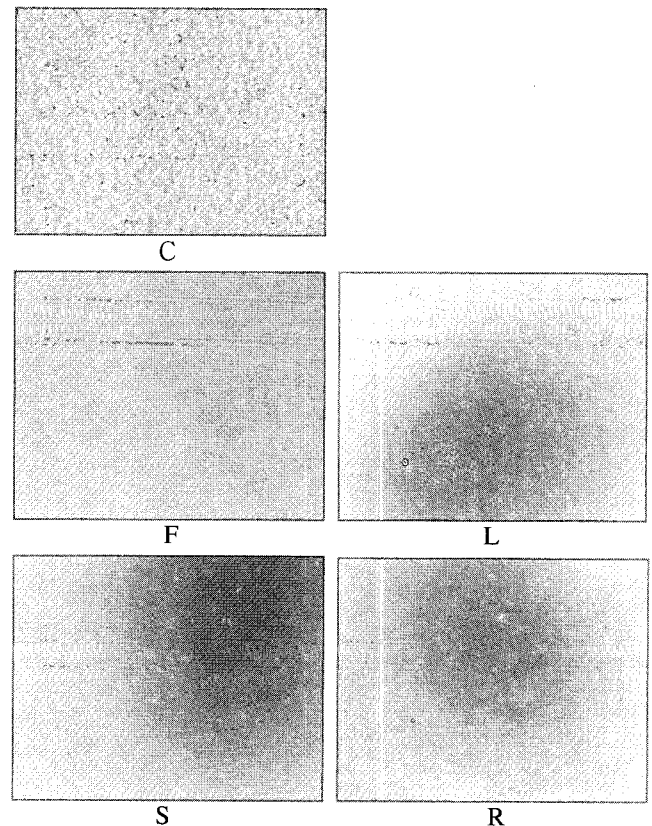


Fig. 4. Photomicrographs of HepG₂ cells incubated for 6 days at 37°C with or without fraction(0.75mg/mL) of methanol extract from the each part of *Echinacea angustifolia* (×400). C: Control F: Flower bud L: Leaf S: Stem R: Root

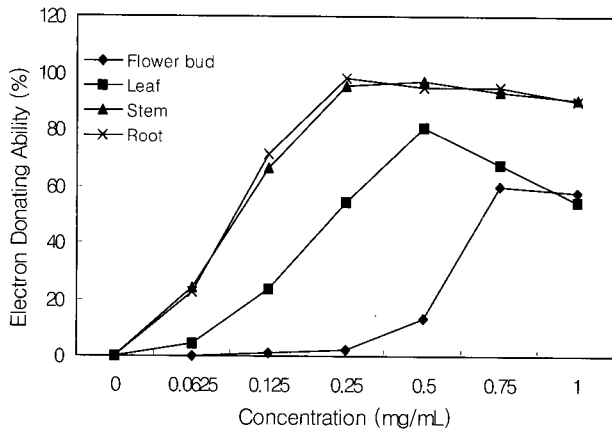


Fig. 5. Electron donating ability of methanol extracts of *Echinacea angustifolia* to DPPH radicals. X axis is log scale.

톤의 잎 및 썩잎 추출물(0.6%(g/v))이 나타낸 전자공여능을 82.6%와 45.8%로 보고하였는데, 에키네시아의 뿌리와 줄기 메탄올 추출물(0.25 mg/mL)은 각각 98.15, 95.53%로 전자공여능이 이들보다 우수하다고 할 수 있다. 에키네시아의 뿌리와 줄기추출물에 DPPH용액을 첨가하자 곧바로 DPPH의 색이 소실되었는데 이는 각 추출물에 전자공여능이 강한 물질이 존재하는 것으로 추정되어 항산화제로 이용될 수 있음을 나타내고 있다. Dziedzic 등(Dziedzic SZ 와 Hudson RJF 1983)은 식물체 중의 polyphenol, flavone 및 isoflavone 유도체를 추출·분리하여 항산화능을 가지고 있음을 보고하였고, Facino 등(Facino RM 등 1995)은 에키네시아에 함유된 caffeic acid의 일종인 cichoric acid가 라디칼 소거능이 큰 것으로 보고하여, 본 연구에서 에키네시아 추출물이 높은 항산화 효과를 나타낸 것은 에키네시아의 polyphenol 성분의 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)에 대한 방어 효과에 의한 것으로 생각된다.

IV. 요약

*Echinacea angustifolia*의 부위별(꽃봉오리, 잎, 줄기 및 뿌리) 메탄올 추출물의 암세포(HepG₂, 3LL, HL60, L1210)를 대상으로 한 항암 활성과 전자공여능을 검색한 결과는 다음과 같다.

1. 에키네시아 메탄올 추출물의 간암세포인 HepG₂ cell에 대한 MTT assay는 농도의존적으로 세포독성

효과가 증가하였으며, 인간유래 백혈암세포인 HL60 cell의 경우에 잎과 뿌리 추출물은 저농도에서부터 독성효과가 컸고, 줄기와 꽃봉오리는 저농도에서는 독성효과가 낮았으나 고농도로 갈수록 독성효과가 커짐을 알 수 있었다. 폐암세포인 3LL cell과 마우스 유래 백혈암세포인 L1210 cell에 대한 경우는 세포독성효과가 없었다.

2. Hemacytometer에 의한 HepG₂ cell의 암세포 성장에 미치는 효과는 배양기간이 증가함에 따라 농도의존적으로 증식억제 효과가 증가되었다.
3. HepG₂ 세포주의 형태학적 변화에서 대조군은 암세포가 조밀하게 증첩되어 증식되었으나 시료를 0.5 mg/mL 이상의 농도로 첨가하였을 때 세포의 결속력이 감소되어 세포주위가 흐트러지고 세포가 사멸된 것을 관찰 할 수가 있었다.
4. 전자공여능의 수준은 부위에 따라 최고의 EDA를 나타내는 농도가 달랐으며, 뿌리와 줄기부위는 저농도에서도 매우 높은 전자공여능을 나타내었다.

참고문헌

- Barbara G, Campling JP, Peter RG, Susan PCC (1988) : Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemia Res.*, 12 : 823-831
- Barrett B, Kiefer D, Rabago D (1999) : Assessing the risks and benefits of herbal medicine: An overview of scientific evidence. *Altern. Ther.*, 5 : 40-49
- Burger RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG (1997) : *Echinacea*-induced cytokine production by human macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.*, 19 : 371-379
- Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE, Glastein E, Minna JD (1985) : Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. Cancer*, 57 : 540-547
- Chung HJ, Noh KL (2000) : Screening of electron donating ability, antibacterial activity and nitrite scavenging effect of some herbal extracts. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 16 : 372-377
- Doll R, Peto R (1981) : The cause of cancer; quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66 : 119
- Dorch W (1996) : Clinical application of extracts of *Echinacea purpurea* or *Echinacea pallida*. Critical evaluation of controlled clinical studies. *Z. Arztl. Fortbild.*, 90 : 117-122
- Dziedzic SZ, Hudson RJF (1983) : Hydroxy isoflavones as

- antioxidants for edible oil. *Food Chem.*, 11 : 161
- Facino RM, Carh M, Aldini G, Saibene L, Pietta P, Mauri P (1995) : Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med.*, 61 : 510-514
- Foster S (1991) : *Echinacea: Nature's Immune Enhancer*. Healing Arts Press.
- Franceschi RT, James WM, Zerlauth G (1985) : 1 α , 25-dihydroxy vitamin D3 specific regulation of growth, morphology and fibronectin and a human osteosarcoma cell line. *J. Cell Physiol.*, 123 : 401-409
- Graisbauer M, Scheleich T, Stickl HA, Wilczek I (1990) : The effect of *Echinacea purpurea* Monk on phagocytosis in granulocytes measured by chemiluminescence. (In German.) *Arzneimittelforschung*, 40 : 594-598
- Hobbs C (1994) : *Echinacea: a literature review*. HerbalGram 30 : 34-48
- Hobbs C (1995) : *Echinacea: The Immune Herb*. Botanica Press.
- Hyun JW, Lim KH, Shin JE, Sung MS, Won YJ, Kim YS, Kang SS, Chang IM., Woo WS, Paik WH, Kim HJ, Woo ER, Park HK and Park JG (1994) : Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (in Korean). *Kor. J. Pharmacol.*, 25(2) : 171-177
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD (1995) : Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27 : 978-984
- Kim JH, Kim KM, Yoo NC, Choi JH, Lim HY, Roh JK, Lee KS, Kim BS (1993) : Effects of verapamil, tamoxifen and cyclosporin A for the modulation of multidrug resistance in human lung cancer cell lines. *J. Kor. Cancer Assoc.*, 25 : 225-230
- Lersch C, Zeuner M, Bauer A, Siebenrock K, Hart R, Wagner F, Fink U, Dancygier H, Classen M (1990) : Stimulation of the immune response in outpatients with hepatocellular carcinomas by low doses of cyclophosphamide (LDCY), *Echinacea purpurea* extracts (Echinacin) and thymostimulin. *Arch. Geschwulstforsch*, 60 : 379-383
- Li TS, Wang LCH (1998) : Physiological components and health effects of ginseng, *Echinacea*, and sea buckthorn. In *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*, Maza G. Ed., Technomic Publishing, Lancaster, PA, 329-356
- Linert D, Anklam E, Panne U (1998) : Gas chromatography-mass spectral analysis of roots of *Echinacea*, species and classification by multivariate data analysis. *Phytochem. Anal.*, 88-98
- Luetig B, Steinmuller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1989) : Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81: 669-675
- Melchart D, Linde K, Worku F, Sarkady L, Holzmann M., Jurcic K, Wagner H (1995) : Results of five randomized studies on the immuno-nomodulatory activity of preparations of *Echinacea*. *J. Alternative Complementary Med.*, 1 : 145-160
- Mitsuda H, Yasumoto K, Iwaki K (1966) : Antioxidative action of linoleic acid. *Nippon Eiyu Shokuryo Gakkaish*, 19 : 210
- Pamham MJ (1996) : Benefits-risks assessment of the squeezed sap purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation. *Phytomedicine*, 3 : 95-102
- Rosler J, Steinmuller C, Kiderlen A, Emmendorffer A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1991) : Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. *Int. J. Immunopharmacol.*, 13 : 27-37
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) : Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48 : 4827
- Se D, Broumand N, Sahl L, Tilles JG (1997) : In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*, 35 : 229-235
- Steinmuller C, Rosler J, Grottrup E, Franke G, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1993) : Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed(?) mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Immunopharmacol.*, 15 : 605-614
- Stimpel M, Proksh A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1984) : Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infect. Immun.*, 46 : 845-849
- Tragni E, Galli CL, Tubaro A, Del NP, Della LR (1988) : Antiinflammatory activity of *Echinacea angustifolia* fractions separated on the basis of molecular weight. *Pharmacol. Res. Commun.*, 20(suppl 5) : 87-90
- Wagner H, Stuppne, H, Schafer W, Zenk M (1988) : Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. *Phytochemistry*, 27 : 119-126
- Wagner HKM (1995) : Immunostimulants and adaptogens from plants. In *Photochemistry of Medicinal Plants*. Armason T, Ed., Plenum Press, New York, p 1-18

(2005년 3월 2일 접수, 2005년 6월 23일 채택)