ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2015 Vol. 25. No. 1. 44~52 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2015.25.1.44

Anti-oxidant, Anti-inflammatory and Anti-cancer Effect of Methanol Extract of *Pogostemon cablin*

Seung Geun Yun[1], Soojung Jin[2], Hyun Young Jeong[2], Hee Jung Yun[2], Mi young Do[1], Byung Woo Kim[1,2] and Hyun Ju Kwon[1,2*]

[1]*Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences and Human Ecology, Dong-Eui University Graduate School, Busan 614-714, Korea*
[2]*Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea*

Received October 8, 2014 / Revised December 19, 2014 / Accepted January 16, 2015

In the present study, the substance that show anti-proliferation of cancer cells as well as anti-oxidant and anti-inflammatory effect was searched. As a results, the methanol extract of *Pogostemon cablin* (*P. cablin*), is a well-known herb for traditional medicine in Korea and China for treating the digestive disorders, less of appetite, vomiting and diarrhea, inhibited the growth of various cancer cells such as A549, HepG2, MCF7 and HT29 cells. Cytotoxic effect of methanol extraction of *P. cablin* was excellent in A549 cells. *P. cablin* extract induced cell cycle arrest at G1 phase of A549 in a dose dependent manner. And it induced phosphorylation of p38 and Cdc25A and reduced expression of Cdc25A, Cdks, Cyclins and phospho-Retinoblastoma (Rb) proteins. Therefore, *P. cablin* extract seems to act through the p38 - Cdc25A - Cdk - Cyclin - Rb pathway in A549 cells. In addition, *P. cablin* extract showed anti-oxidant effect by DPPH free radical scavenging assay and anti-inflammation effect by inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells in a dose-dependent manner. Taken together, these results suggest that *P. cablin* may be used as not only candidate materials for anti-cancer, anti-inflammatory and anti-oxidant, moreover, it would be possible utilized in various health functional food materials.

Key words : Anti-cancer effect, anti-inflammatory effect, anti-oxidant effect, G1 arrest, *Pogostemon cablin*

서 론

암은 흡연, 자외선, 방사선, 화학물질, 기타 환경인자 등 매우 다양한 요인에 의해 발생한다[34]. 또한 지속적인 염증유발 환경 및 활성산소에 의해서도 유전자의 손상이나 발현에 이상을 초래해 암세포를 유발시키는 것으로 알려져 있다[3]. 이렇듯 암은 현대인의 건강과 생명을 위협하는 주요 원인 중 하나로, 21세기에 들어 전 세계적으로 암 발병률 및 사망률이 꾸준히 증가하고 있다[20, 33]. 이에 암 치료를 위한 연구가 지속적으로 이루어져 왔고 보다 효율적인 암 치료제를 개발하기 위해 막대한 자본과 인력이 투자되어 항암제 또한 꾸준히 진화해왔다[32]. 그러나 암의 다양한 유발원인 및 발생부위에 따른 치료제의 효과 차이 등에 의해 이상적인 항암제의 개발은 아직 이루어지지 않고 있다. 따라서 정상세포에의 독성이나 내성 등 기존 화학항암제에 대한 한계를 극복하기 위하여 부작용이 적으면서 항암 효능이 높은 천연소재의 항암제 개발에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다[7, 30]. 뿐만 아니라 한방치료나 민간요법에 기초한 식품의 섭취 등 암을 극복하기 위해 다방면의 노력이 이루어지고 있는 것이 현실이다.

생물은 세포분열을 통해 생명을 유지하고 성장하고 생식한다. 세포는 세포 내·외의 신호에 반응하여 세포 내 DNA를 완전히 복제하고 복제된 DNA를 정확하게 나누어 두 개의 완전한 딸세포로 분리되는데, 이러한 일련의 과정을 세포주기라 한다. 정상적인 세포는 여러 가지 환경 상황에 맞게 세포주기를 조절하여 항상 일정한 수의 세포를 유지하는데, 세포주기는 S기를 준비하는 G1기와 DNA를 합성하는 S기, 복제된 DNA의 확인 및 M기를 준비하는 G2기와 복제된 DNA의 분배 및 체세포 분열을 일으키는 M기로 구분된다. 세포는 자외선, IR, X-ray 등의 방사선이나 다양한 화학물질, 감염뿐 아니라 세포 내에서 생긴 활성산소 등에 의해 지속적인 자극을 받게 된다[3, 34]. 정상적인 세포는 이러한 자극들에 적절히 반응하여 세포주기를 조절하며 항상성을 유지하지만, 조절 시스템에 이상이 생기면 세포의 변이가 생기고, 변이된 세포가 과하게 증식되어 암이 발생할 수 있다[10]. 세포주기 조절 관점에서 보았을 때, 암세포는 세포주기의 비정상적인 진행에 기인된

***Corresponding author**
Tel : +82-51-890-1519, Fax : +82-51-890-1532
E-mail : hjkwon@deu.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

질병으로 정의할 수 있으므로, 세포주기 진행의 차단이 암세포 증식 억제 연구의 한 방법으로 인식되고 있다[39].

Nitric oxide (NO)는 잘 알려진 염증 매개물질로 정상 생리적 조건하에서는 혈관확장, 신경전달 등 생체에 긍정적인 기능을 하지만, 비정상적으로 과다 생성될 경우 산화적 스트레스 및 세포괴사를 야기할 수 있는 부정적인 기능도 있다[1, 8, 25, 29]. 최근 들어 NO는 발암(carcinogenesis), 종양의 진행(tumor progression), 침윤(invasion)에 관여할 뿐만 아니라, 암의 성장과 전이에 필요한 결정적 단계인 신생혈관형성(angiogenesis)을 유발하여 종양 형성을 촉진하는 중요한 인자 중 하나로 인식되고 있다[19, 35, 37]. NO는 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며 농도에 따라 세포 기능 유지에 중요한 작용을 하거나 세포 독성을 일으키기도 한다[28]. 포유동물 세포의 경우, endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS) 등 3가지 종류의 NOS가 존재하며 이중 eNOS, nNOS는 칼슘 농도 의존적으로, 자극에 대한 반응이 아닌 구성성분으로, 일시적이며 소량 발현된다. 반면 iNOS는 칼슘농도에 상관없이 interferon-γ, lipopolysaccharide (LPS), 그리고 여러 가지 염증 cytokine의 자극에 의해 지속적으로 다량 생성이 유도됨으로써 염증반응에 기여한다[24]. 따라서 염증매개물질인 NO의 생성 및 iNOS의 발현을 억제하는 물질에 관한 연구는 항 염증의 효과와 더불어 새로운 항암제 발굴을 위한 표적으로 인식되고 있다[36].

광곽향(*Pogostemon cablin*)은 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하며 한국, 중국, 일본, 인도네시아 등지에서 서식하며, 다른 이름으로는 해곽향, 곽향, 두루파향 등으로 불린다. 한약재로 널리 사용되는 광곽향은 *Pogostemon cablin (Blanco) Benth*의 지상부를 건조시킨 것으로 식욕부진, 소화불량, 복통, 토사, 유행성 감기 예방 등의 치료에 이용되고 있다[40]. 광곽향의 정유 성분은 화장품이나 방향제, 치약 등의 향기 성분으로 주로 사용되고 있고, 항구토, 항균, 항진균 활성 등의 약리작용이 보고 되어있다[26]. 최근 광곽향 추출물의 mouse 모델에서의 항염증 효과에 대한 보고가 있었고[22, 26], 항산화 활성에 대한 보고도 있었다[18, 26]. 그러나 광곽향의 항암활성에 대한 보고는 광곽향의 정유성분에 의한 것만 보고되어 있는 등 아직 미비한 실정이다[13].

본 연구에서는, 지속적인 염증, 활성산소의 과다 생성 등 암의 원인이 다양하므로 항염증, 항산화 활성을 가지면서 동시에 암세포의 세포 사멸을 유도할 수 있는 물질이 있다면 항암제로써 개발 가능성이 더 클 뿐 아니라, 기능성 식품소재 등 다양한 생리활성물질로서 응용 가능할 것이라 생각하고 다양한 생리활성을 가지는 물질을 탐색하였다. 그 결과, 광곽향 메탄올 추출물이 암세포 사멸효과와 더불어 LPS로 염증을 유발한 RWA 264.7세포에서의 NO 생성 억제 효과, DPPH를 사용한 항산화 효과를 동시에 가짐을 확인하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

실험에 사용된 인체 폐암 세포주 A549 (human lung adenocarcinoma cell), 인체 유방암 세포주 MCF7 (human breast cancer cell), 인체 대장암 세포주 HT29 (human colon adenocarcinoma cell), 인체 간암 세포주 HepG2 (human hepatic carcinoma cell), 마우스 대식세포주 RAW 264.7 (mouse macrophage cell) 및 인간 섬유아세포주 IMR90 (human lung primary fibroblasts cell)은 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS (Fetal bovine serum) 및 penicillin/streptomycin을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 37°C, 5% CO_2 조건으로 배양하였다.

추출물 제조

본 실험에서 사용한 광곽향(*P. cablin*)은 인도네시아산이며 ㈜대한생약(부산광역시 소재)에서 구입하였다. 광곽향 10 g을 파쇄하여 분말로 만든 후 시료의 8배의 메탄올 용매를 가하여 75°C에서 3회 반복 추출하였다(수율: 4.4%). 획득한 메탄올 추출물(methanol extract of *P. cablin*)을 Whatman No.2 (Whatman international Ltd., England)에 여과 후 감압농축기로 농축하여 0.44 g을 얻었으며, 동결건조(FDU-2100, EYELA, Japan)하여 200 mg/ml의 농도로 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, MO, USA)에 용해시켜 상온에 보관하고 세포에 처리 전 배지에 희석하여 사용하였다.

WST assay에 의한 세포독성 관찰

광곽향 메탄올 추출물이 암세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 WST (water soluble tetrazolium salt) assay를 수행하였다. 암세포인 A549, HT29, MCF7, HepG2 및 정상세포인 IMR90을 24-well culture plate에 2.5×10^4 cells/well로 분주한 다음 24시간 후 광곽향 메탄올 추출물을 농도별(0-200 μg/ml)로 첨가하여 37°C, 5% CO_2에서 24시간동안 배양하였다. 각각의 well에 WST solution (TAKARA Bio Inc., Shiga, Japan) 50 μl를 첨가하여 30분간 반응시킨 다음, multi-plate reader (Molecular Devices, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험을 하여 평균값으로 나타내었으며, 본 실험결과를 바탕으로 이후 적정처리농도를 결정하였다.

A549의 세포 형태 변화 관찰

광곽향 메탄올 추출물의 처리에 따른 A549의 세포 형태 변화를 관찰하기 위하여 6-well culture plate에 1×10^5 cells/well의 A549를 분주하고 24시간 뒤 광곽향 메탄올 추출물을 농도별(0-200 μg/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후

도립현미경을 사용하여 A549의 형태변화를 관찰하였으며, Axio Vision program을 사용하여 촬영을 하였다.

Flow cytometry에 의한 세포주기 분석

광곽향 메탄올 추출물이 A549의 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CycleTES™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, CA, USA)로 세포주기를 분석하였다. A549를 6-well culture plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 뒤 광곽향 메탄올 추출물을 농도별(0-200 μg/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 well의 세포를 회수한 다음 PBS로 세척 후, ribonuclease A를 실온에서 추가 10분간 처리하였다. 이후 propidium iodide (PI) 용액을 첨가하여 4°C에서 10분간 염색하였다. 염색된 세포의 세포주기는 Flow cytometry (Cell Lab Quanta SC; Beckman Coulter, CA, USA)로 측정하고 Flowjo program을 사용하여 분석하였다.

Western blotting에 의한 단백질 발현 분석

광곽향 메탄올 추출물을 처리한 A549의 세포주기에 관련된 단백질의 발현양상 및 RAW 264.7의 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현양상을 확인하기 위하여 Western blotting을 수행하였다. 광곽향 메탄올 추출물을 처리한 세포를 회수하여 적정량의 lysis buffer [10 mM PIPES (pH 6.8), 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1% Triton X-100, 1 mM ATP, 1% Protease inhibitor Cocktail (BD Pharmingen)]를 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시키고 sonication한 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 상등액을 취하였다. 상등액에서 얻은 단백질은 BCA법으로 정량한 다음, 30 μg의 단백질을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동 후 gel 내의 단백질을 PVDF membrane에 transfer한 후 blocking buffer [0.15 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Triton X-100, 5% BSA]를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking하였다. 이후 1차 항체를 넣고 4°C에서 24시간 반응시켰으며, HRP (horse radish peroxidase)가 부착된 2차 항체를 상온에서 4시간 처리하였다. 반응이 끝난 membrane을 세척 후 단백질은 화학발광 시스템(Chemi-luminescence system; WesternBright ECL HRP substrate, Advansta, Menlo Park, CA, USA)으로 검출하였다. 본 실험에 사용된 Cdk2, Cdk4, Cdk6, Cyclin D, Cyclin E, Cdc25A, p-Cdc25A, p38, Actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였고 p-p38, p-Rb 항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)에서 구입하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석

전자공여능은 인체 내에서 생성되는 free radical의 전자를 공여하여 free radical에 의한 노화와 질병을 억제하므로 항산화 작용의 지표로 사용된다. 따라서 광곽향 메탄올 추출물의 항산화능 분석을 위하여 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical 소거능 분석을 수행하였다. 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 40 μl와 메탄올에 녹인 광곽향 메탄올 추출물을 농도별(1.25-320 μg/ml)로 160 μl씩 96-well plate에 분주하여, 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 저해농도(Inhibitory concentration, IC_{50})를 계산하였다. 양성 대조군으로는 널리 사용되는 ascorbic acid를 사용하였으며, 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. 억제능의 백분율 공식은 다음과 같다.

DPPH radical scavenging activity (%)={1-(A-B)/C} ×100

A: sample absorbance $_{520nm}$

B: color control absorbance $_{520nm}$

C: control absorbance $_{520nm}$

Lipopolysaccharide (LPS)-induced Nitric Oxide (NO) 생성 억제 효과 분석

광곽향의 항염증 활성을 알아보기 위하여 마우스 대식세포주 RAW 264.7을 사용하여 LPS에 의해 유도된 NO 생성 억제 효과를 분석하였다. 염증을 유발시키기 위해 RAW 264.7을 24-well culture plate에 4×10^4 cells/well 농도로 분주하고 24시간 뒤 LPS (1 μg/ml)를 처리하였으며 이때 음성 대조군은 LPS를 처리하지 않았다. 또한 LPS를 처리한 세포에 광곽향 메탄올 추출물을 농도별(0, 10, 25, 50, 75 μg/ml)로 처리하여 24시간 배양하였다. RAW 264.7의 배양 상등액 100 μl를 96-well plate에 넣고 100 μl의 Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid)를 첨가한 다음 상온에서 10분간 반응시킨 후 multi-plate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험을 하여 평균값으로 나타내었다.

통계분석

모든 결과는 mean ± SD (Standard deviation)로 나타내었으며, 분석된 실험 데이터의 통계적 유의성은 대조군과 각 시료처리군의 실험데이터로부터 Student's *t* test를 통하여 검증하였다.

결과 및 고찰

광곽향 메탄올 추출물에 의한 암세포 사멸 효과 및 정상세포 독성 확인

광곽향 메탄올 추출물이 다양한 암세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 A549, HT29, MCF7, HepG2를 이용하여 광곽향 메탄올 추출물을 적정 농도로 24시간 동안 처리한 후 WST assay를 실시하였다. 그 결과 Fig. 1A에서 나타낸 바와 같이 대부분의 암세포에서 광곽향 메탄올 추출물 농도

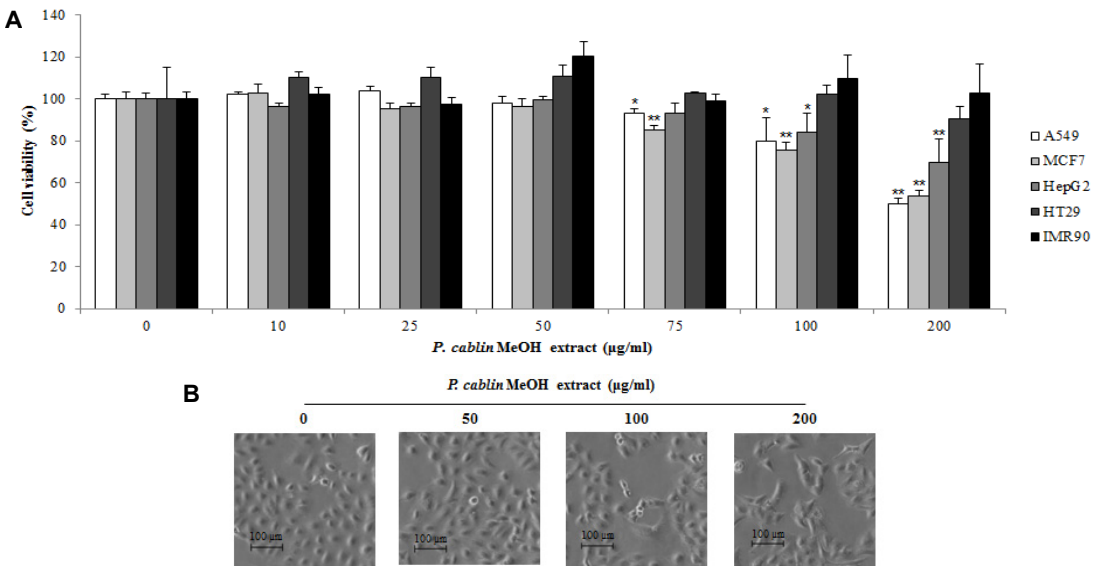
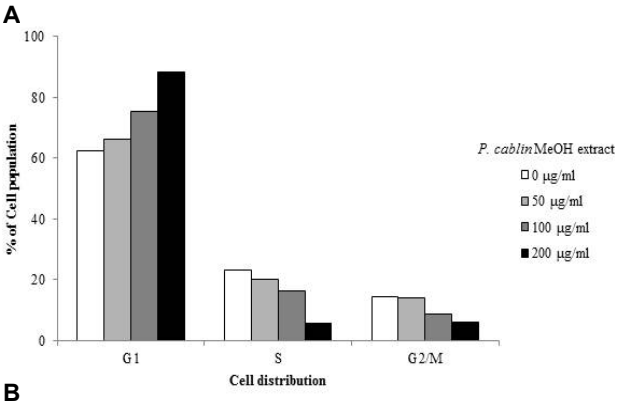


Fig. 1. Cytotoxic effect of methanol extract of *P. cablin* on A549 cells. (A) Various cancer cells were treated with *P. cablin* extract for 24 hr and then, cell viability was determined by WST assay. The data was expressed as a percentage of the control value of three independent experiments. (B) A549 cell morphology was visualized after *P. cablin* extract treatment by light microscopy. Magnification, ×100. $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ as compared with the control.

의존적으로 생존율이 감소되었다. 특히 인체 폐암 세포인 A549에서 다른 암 세포에 비해 특이적으로 높은 암세포 사멸 효과를 나타내었다. 또한 광곽향 메탄올 추출물 처리에 따른 A549 세포의 형태변화를 관찰한 결과, 광곽향 메탄올 추출물의 농도가 높아질수록 A549 세포의 형태가 불규칙하게 변화되고 세포 밀도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 그러나 정상세포인 IMR90에서는 광곽향 메탄올 추출물에 의한 세포 독성이 보이지 않는 것으로 나타나(Fig. 1A), 광곽향 메탄올 추출물의 A549에 대한 효과는 항암효과가 분명한 것으로 보인다. 따라서, 이후 A549에 대한 사멸 효과의 기전을 확인하고자 하였다.

광곽향 메탄올 추출물에 의한 폐암세포주 A549의 G1 arrest 유도

암세포에서는 세포 손상에 따른 정상적인 세포주기 제어 기능이 저해되어 비정상적인 세포의 무한 증식이 일어난다[11]. 최근에는 이러한 암세포의 특징을 이용하여 암세포의 비정상적인 세포주기 진행을 제어하여 암세포의 사멸을 유도하는 항암제의 연구 개발이 활발하게 진행되고 있다[39]. 따라서 본 연구에서는 광곽향 메탄올 추출물 처리에 의해 유발되는 A549 사멸효과가 세포주기에 영향을 주는지 확인하기 위하여 적정 농도의 광곽향 메탄올 추출물을 24시간 처리한 후 세포주기 변화를 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 그 결과, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 G1기의 세포분포가 대조군 62.44%에서 농도 의존적으로 증가하여 최고농도인 200 μg/ml에서 88.44%의 세포가 G1기에 정체되어 있었다. 반면 S기 및 G2/M기의 세포 분포수는 광곽향 메탄올 추출물 농도 의존적으로 감소하여 대조군 각각 23.16%, 14.39%에서 200 μg/ml 농도에



P. cablin MeOH extract (μg/ml)	% of cell		
	G1	S	G2/M
0	62.44	23.16	14.39
50	66.02	20.09	13.89
100	75.2	16.28	8.52
200	88.44	5.51	6.05

Fig. 2. G1 arrest induction of A549 cells by *P. cablin* methanol extract treatment. After treatment of *P. cablin* extract, A549 cells were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. (A) Percentage of cell cycle distribution in *P. cablin* extract-treated A549 cells. (B) Cell cycle distribution of A549 cell treated with *P. cablin* MeOH extract.

서는 각각 5.51%, 6.05%로 감소하였다. 이상의 결과들은 광곽향 메탄올 추출물에 의한 A549의 생존율감소가 G1 arrest에 의한 세포주기 정지에 따른 것임을 시사한다.

광곽향 메탄올 추출물에 의한 G1 arrest 유도의 분자 메커니즘

세포주기 분석결과 광곽향이 A549 세포를 G1기에서 정지시킴을 확인하였고, 이러한 결과가 단백질 수준에서도 나타나는지 확인하기 위해 G1기 관련 단백질들의 발현변화를 확인하였다.

세포주기의 조절은 기본적으로 각 주기에서 특정적인 Cyclin이 발현되어 Cyclin-depandent kinases (Cdks)와 복합체를 형성하여 세포주기 진행에 필요한 단백질들을 인산화시켜 세포주기가 진행된다[31]. 세포주기 중 G1기에서는 Cyclin D가 Cdk4 또는 Cdk6과 복합체를 형성하여 retinoblastoma protein (Rb)을 인산화시키고, Rb에 결합되어 있던 E2F가 방출되어 Cyclin E의 발현이 유도된다. 유도된 Cyclin E는 Cdk2와 복합체를 형성하고 이것이 p-Rb를 완전히 인산화시켜 G1기에서 S기로 전환이 일어난다[6, 7]. 따라서 G1기에서 S기로 진행하기 위해서는 Cyclin E와 Cdk2가 충분히 존재하여야 한다.

이에 본 연구에서는 광곽향 메탄올 추출물을 처리한 A549에서 G1기 관련 단백질들의 발현변화를 Western blotting을 통하여 분석하였다. 그 결과, Fig. 3A에서와 같이 Cdk2, Cdk4, Cdk6, Cyclin D 및 Cyclin E의 발현이 농도 의존적으로 감소하였고, Rb의 인산화가 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 Cdk/Cyclin 복합체의 감소에 의하여 G1/S전이에 필요한 Rb 인산화가 감소되고 그 결과 G1 arrest가 일어나는 것으로 사료된다.

다양한 연구결과에 의하면, 세포는 DNA 손상을 유도하는 화학물질이나 UV, IR, 산화적 스트레스 등의 자극에 대한 반응으로 세포주기의 진행을 지연시키는 checkpoint를 활성화시킨다. 이들 checkpoint는 G1/S, S, G2/M 등 세포주기의 각 단계에서 활성화 될 수 있고, 다양한 단백질들에 의해 조절된다. 광곽향 메탄올 추출물에 의한 A549의 G1 arrest가 유도되는 분자 기전을 확인하기 위해 G1/S checkpoint 관련 단백질의 발현 변화를 확인하기로 하였다. 먼저, G1/S checkpoint를 유도하는 기전은 크게 p53 의존형과 비의존형으로 분류할 수 있다[23]. p53 의존형 G1/S checkpoint는 DNA 손상 등의 자극으로 인해 p53이 활성화되고, 이로 인해 Cdk inhibitor인 p21의 발현이 증가된다. 증가된 p21은 Cdk와 결합하여 Cdk/Cyclin 복합체의 활성을 억제함으로써 세포주기의 진행을 저해하고 G1 arrest가 유도되는 것으로 알려져 있다[27]. p53 비의존형 G1/S checkpoint는 Cell Division Cycle 25 homolog A (Cdc25A)에 의해 매개되는 경로가 알려져 있다. Cdc25A는 Cdk에 있는 불활성형의 인산기를 제거시켜 Cdk의 활성화를 유도함으로써 세포주기 진행을 촉진시키는 탈인산화 효소로, 다양한 종류의 암에서 과발현된다고 알려져 있다[17]. Cdc25A는 G1/S 전이기에서 Cdk2/Cyclin E 복합체를 활성화시켜 세포주기를 진행시키는데, genotoxic stress 등의 문제가 생길 경우 Cdc25A의 인산화가 이루어지고, 인산화된 Cdc25A는 ubiquitination 반응으로 분해되어 세포주기의 진행이 지연된다. 광곽향 메탄올 추출물을 처리한 A549에서 p53 및 p21 단백질의 발현변화는 관찰되지 않았고(data not shown), Cdc25A의 농도 의존적인 발현 저하를 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 따라서, Cdc25A를 조절하는 단백질의 발현변화를 확인하고자 하였다. Cdc25A의 인산화를 유도하여 G1 arrest 유발에 관여하는 상위단백질은 Chk1/2와 p38이 있다. Chk1/2는 주로 DNA damage에 의해 활성화되는 ATM/ATR에 의해 인산화되어 활성화되고, 활성화된 Chk1/2가 Cdc25A를 인산화시켜 세포주기를 정지시킨다. p38은 mitogen activated protein kinases (MAPKs)의 하나로 DNA damage, osmotic stress, ROS 등에 의해 자극되어 Cdc25A를 인산화하여 분해를 촉진시킴으로써

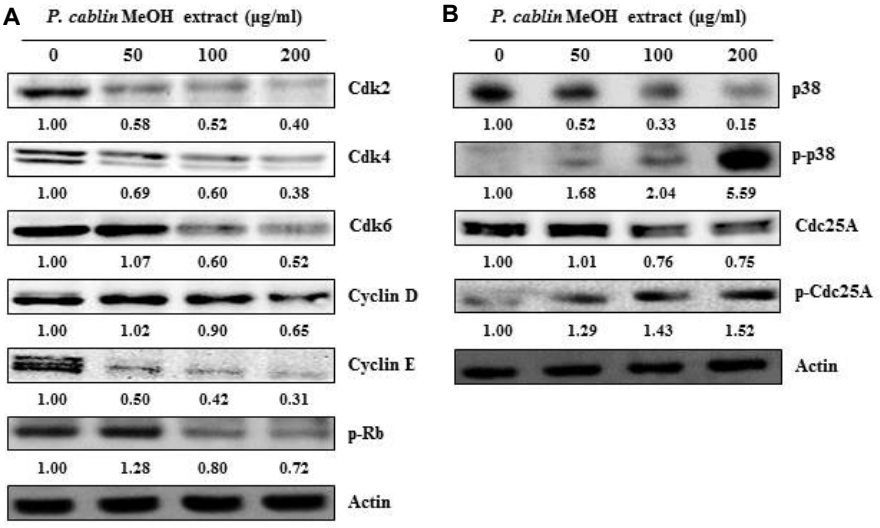


Fig. 3. Effects of *P. cablin* methanol extract on the expression of cell cycle-related proteins. A549 cells were treated with various concentration of *P. cablin* extract for 24 hr, followed by Western blot analysis using indicated antibodies. Numerical bottom panel of each band indicates the fold change in the band intensity compared with that of control. (A) The expression of the G1 phase-related Cdks, Cyclin and p-Rb proteins. (B) The expression of proteins regulating activity of Cdks such as p38, p-p38, Cdc25A and p-Cdc25A.

G1 arrest를 유도하는 것으로 알려져 있다[38]. 광곽향 메탄올 추출물에 의한 A549의 Cdc25A 분해가 어떤 단백질에 의해 유도되는지 확인해 본 결과, osmotic stress나 genotoxic stress, UV 등에 의해 활성화되는 p-p38 (Thr180/Thr182)의 발현 증가를 확인할 수 있었다. 이들 결과에 의해, 광곽향 메탄올 추출물은 p38 MAPK의 활성화에 의해 Cdc25A의 분해반응이 유도되고 Cdk, Cyclin 및 p-Rb의 발현저하를 통해 G1 arrest가 유도되는 것으로 사료된다.

이러한 결과는 Jin 등의 결과와 유사하다[13]. Jin 등은 광곽향에서 추출한 정유성분인 Patchouli alcohol(PA)이 인간 대장암 세포주인 HT29 에서 Cyclin D와 Cdk4의 발현을 감소시키고 G1 arrest 를 유도한다고 보고한 바 있다[13]. 이 결과와 유사하게 광곽향 메탄올 추출물 또한 A549에서 G1 arrest를 유도하였고 Cyclin D와 Cdk4의 발현을 감소시켰다. 그러나 Jin 등과는 다르게 A549에서의 광곽향 메탄올 추출물에 의한 G1 arrest는 p53 및 p21의 발현이 유도되지 않았고, p38의 활성화와 Cdc25A 발현 저하가 확인되었으며, Apoptosis의 유도 없이(1%이하), G1기에서의 세포주기 정지만 유도되었다. 본 연구에서도 HT29를 포함한 다양한 암세포주에서의 증식 억제 활성을 확인하였고, 그 결과 A549에서 가장 높은 활성을 보였으며 HT29에서는 증식억제활성이 높지 않았다(Fig. 1A). 이러한 차이는 추출물의 차이에 의한 것으로 사료되며, 따라서 광곽향의 암세포 증식 억제 효과는 세포주 특이적이고 물질 특이적인 것으로 보인다

광곽향 메탄올 추출물의 항산화능 분석

생체 내에서 일어나는 대사과정에서는 superoxide ($^1O^{2-}$), hydroxy radical (·OH), 과산화수소(H_2O_2) 등의 활성산소가 발생하게 되며 대부분의 활성산소는 항산화 방어체계에 의해 분해된다. 그러나 활성산소와 항산화 방어체계의 균형이 깨지는 경우, 활성산소가 축적되어 여러 질병들이 유발될 수 있다[4, 15, 21]. 축적된 활성 산소로 인한 산화적 스트레스는 세포 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등에 대한 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 하여 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌 질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병 및 노화의 주원인이 된다고 알려져 있다[2, 5, 9, 16]. 따라서 다양한 생리활성, 특히 항암활성을 보유하는 후보 소재의 항산화능 보유 유무의 확인은 매우 중요하다[3].

체내에 존재하는 활성 라디칼에 전자나 수소 원자를 공여하여 안정한 형태의 라디칼로 전환시켜 산화를 막는 것을 항산화 작용이라고 하며 이러한 라디칼 소거능이 큰 경우 높은 항산화 활성을 가진다고 할 수 있다. 본 연구에서는 광곽향 메탄올 추출물의 항산화능을 확인하기 위하여 DPPH를 사용하여 free radical 소거 정도를 분석하였다. 그 결과, Table 1에서 나타낸 바와 같이 광곽향 메탄올 추출물을 농도별로 DPPH와 반응시켰을 때, 농도 의존적으로 free radical 소거능을 보였다. 즉 광곽향 메탄올 추출물 12.8, 64, 320 μg/ml 농도에서 DPPH radical 소거능이 각각 33.61, 72, 94.57%였으며, 50% 저해농도를 나타내는 IC_{50}값은 34.65 μg/ml이었다. 이러한 결과는 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid의 IC_{50}인 5.83 μg/ml에 비해서는 다소 높았으나, 추출물인 것을 감안할 때 광곽향 메탄올 추출물은 우수한 항산화능을 보유하고 있다고 할 수 있다. 이러한 효능은 mouse 모델에서도 유사한 효능을 나타내는 것으로 보고되어 있다[18, 22, 26]. 따라서 광곽향은 강력한 항산화 활성을 가지는 것으로 사료된다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity by methanol extract of *P. cablin*

	Concentration (μg/ml)	Inhibition (%)	IC_{50} (μg/ml)
P. cablin MeOH extract	12.8	33.61±0.92	34.65
	64	72.00±0.72	
	320	94.57±1.28	
Ascorbic acid	0.51	8.78±1.88	5.83
	2.56	28.03±0.46	
	12.8	96.78±0.13	

대식세포에서 광곽향 메탄올 추출물의 NO 생성 저해능 분석

NO는 생체 내에서 생성되는 활성 질소종(reactive nitrogen species)으로 생체 내에서 중요한 세포 신호 전달 물질로 작용하며, 다양한 NO synthase (NOS)에 의해 생성된다. 특히 염증성 NOS인 inducible NOS (iNOS)에 의한 NO의 과잉생산은 산화적 스트레스를 유발하여 세포손상 및 염증 유발의 원인이 된다[14]. 최근 들어 NO의 과다생산은 많은 암종의 발생과 진행을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 특히 지속적인 염증의 진행에 따른 암세포의 형성 촉진 인자 중 하나로 인식되고 있다. 따라서 iNOS의 차단에 의한 NO 생성 억제는 염증억제뿐 아니라 암 예방을 위해서도 긍정적인 결과를 나타낼 수 있다[12]. 본 연구에서는 광곽향 메탄올 추출물이 iNOS에 의해 유도되는 NO 생성억제와도 관련 있는지 알아보기 위하여, LPS로 자극한 마우스 대식세포주 RAW 264.7에 농도별 광곽향 메탄올 추출물을 처리하여 NO 생성량을 분석하였다. Fig. 4A에서 알 수 있듯이 LPS 처리에 의하여 약 30 μM의 NO가 RAW 264.7 세포 배양액 내에 축적되었으며, 유도된 NO 양은 광곽향 메탄올 추출물 처리(50, 75 μg/ml)에 의해 유의적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 이러한 광곽향 메탄올 추출물에 의한 NO의 감소는 세포사멸에 의한 효과가 아님을 WST assay를 통하여 확인하였다(Fig. 4B). 또한 LPS에 의해 유도되는 NO 생성은 NO synthase 중에서도 염증성 NOS인 iNOS에 의하여 일어나며 이러한 iNOS의 과다생성은 많은 암 종의 생성 및 진행을 촉진하는 것으로 알려져 있다[41]. 따라서 광곽향 메탄올 추출물에 의한 iNOS 발현 변화를 Western blot analy-

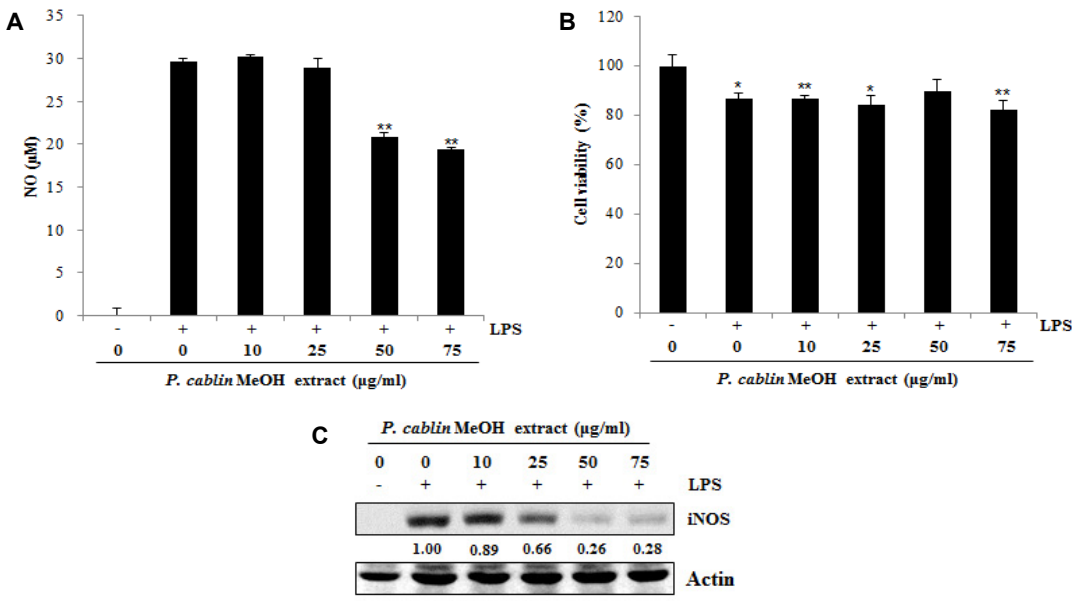


Fig. 4. Effects of *P. cablin* methanol extract on LPS-induced NO production and LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 murine macrophages. Cells were treated with 1 μg/ml LPS and various concentration of *P. cablin* methanol extract for 24 hr. NO production in culture supernatant (A) and cell viability (B) were measured using the Griess method and WST assay, respectively. Data represent the mean ± SD. (C) LPS-induced iNOS expression was determined by Western blot analysis. Numerical bottom panel of each band indicates the fold change in the band intensity compared with that of control. $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ as compared with the control.

sis를 통하여 확인하였으며, 그 결과 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현양은 광곽향 메탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 4C). 이때 iNOS 발현양의 감소는 NO 생성량의 감소 양상과 일치하였으며, 50, 75 μg/ml의 광곽향 메탄올 추출물 처리시 매우 유의적으로 감소하였다. 이와 같은 결과로부터 광곽향 메탄올 추출물이 iNOS 발현을 억제하여 NO 생산을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 이러한 결과는 mouse 모델에서 광곽향 추출물에 의한 항염증 결과와 유사한 결과이다[22, 26]. 따라서 광곽향은 생체 및 *in vitro*에서도 염증성 cytokine 억제를 통해 항염증 효과를 나타낸다.

암을 유발하는 원인은 매우 다양하며, 따라서 다양한 암 유발원인들을 제어할 수 있는 물질이 있다면 보다 궁극적인 암 예방 및 완화가 가능하지 않을까 생각하였다. 즉, 지속적인 염증환경의 완화 및 활성산소의 제거, 산화억제를 통해 암의 발병 가능성 및 진행속도를 낮춰줄 수 있을 것이다. 본 연구에서는 광곽향 메탄올 추출물이 다양한 암세포 사멸효과를 나타내며, 그 중 폐암세포에서 G1 arrest를 유도하여 세포의 증식을 억제하는 것을 확인하였다. 또한 대식세포에서 과발현된 NO 생성을 억제하고, 항산화 활성도 나타냄을 확인하였다. 본 연구결과를 바탕으로 광곽향 메탄올 추출물 내 항암 활성 성분의 분리, 동물실험 등 실질적인 항암 활성 연구와, 보다 다양한 생리활성연구를 통해 항산화, 항염증, 항암 후보물질 소재로 활용 가능할 뿐 아니라 다양한 건강기능성 식품소재로도 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부·부산광역시 지원 지역혁신센터 사업(RIC08-06-07) 동의대학교 블루 바이오 소재 개발 및 실용화 지원 센터의 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. and Lipton, S. A. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7162-7166.
2. Bouayed, J. and Bohn, T. 2010. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell Longev.* **3**, 228-237.
3. Choi, I. P. 2013. Reactive oxygen species and cancer. *Hanyang Med. Rev.* **33**, 118-122.
4. Choi, P. S., Kim, H. S. and Chin, K. B. 2013. Antioxidant activities of water or methanol extract from cherry (*Prunus yedoensis*) and its utilization to the pork patties. *Kor. J. Food Sci. An.* **33**, 268-275.
5. Dicker, E. A., Crum, A. D. and Calvert, J. T. 1992. Differences in the antioxidant mechanism of carmosine in the prescence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 756-759.
6. Donzelli, M. and Draetta, G. F. 2003. Regulating mammalian

checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* **4**, 671-677.
7. Dorai, T. and Aggarwal, B. B. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **215**, 129-140.
8. Enukidze, M. G., Machavariani, M. G., Intskirveli, N. A., Bezhitashvili, N. D. and Sanikidze, T. V. 2009. Cell death in Jurkat cells induced by oxygen/nitrogen stress. *Georgian Med. News* **167**, 109-113.
9. Halliwell, B. H. and Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
10. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-65.
11. Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828.
12. Hirst, D. G. and Robson, T. 2010. Nitrosative stress as a mediator of apoptosis: implications for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 45-55.
13. Jeong, J. B., Choi, J., Lou, Z., Jiang, X. and Lee, S. H. 2013. Patchouli alcohol, an essential oil of *Pogostemon cablin*, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *Int. Immunopharmacol.* **16**, 184-190.
14. Kalyanaraman, B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* **1**, 244-257.
15. Kang, H. J., Kim, H. J., Jeong, S. I., Kim, H. S., Jeon, I. H., Mok, J. Y., Shim, J. S. and Jang, S. I. 2013. Antioxidant and antihemolytic activities of ethanol extracts of *Carpesii fructus* and *Farfarae flos*. *Kor. J. Herbology* **28**, 25-31.
16. Kawashima, S. 1970. The possible role of lipoperoxide in aging. *Nagoya J. Med. Sci.* **32**, 303-326.
17. Kim, H. Y., Kim, J. W., Kim, S. K., Kim, Y. T., Kim, J. H., Kim, S. H., Kim, S. W., Yoon, B. S., Nam, E. J. and Cho, H. J. 2006. Expression of Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C in cervical carcinoma. *Obstet. Gynecol. Sci.* **49**, 2156-2165.
18. Kim, H. W., Cho, S. J., Kim, B. Y., Cho, S. I. and Kim, Y. K. 2010. *Pogostemon cablin* as ROS Scavenger in Oxidant-induced Cell Death of Human Neuroglioma Cells. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **7**, 239-247.
19 Kostourou, V., Cartwright, J. E., Johnstone, A. P., Boult, J. K., Cullis, E. R., Whitley, G. and Robinson, S. P. 2011. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br. J. Cancer* **104**, 83-90.
20. Kwon, S. J., Lee, J. H., Kim, J. Y., Moon, K. D., Yee, S. T. and Seo, K. I. 2014. Anticancer activity of methyl gallate in RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 367-373.
21. Lee, S. Y., Lee, J. S. and Park, S. K. 2013. Effects of acorn powder on lifespan and a resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 670-674.
22. Li, C. W., Wu, X. L., Zhao, X. N., Su, Z. Q., Chen, H. M., Wang, X. F., Zhang, X. J., Zeng, H. F., Chen, J. N., Li, Y. C. and Su, Z. R. 2013. Anti-inflammatory property of the ethanol extract of the root and rhizome of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Scientific World Journal* **2013,** 434151.
23. Lopez-Contreras, A. J. and Fernandez-Capetillo, O. 2012. *Protein Phosphorylation in Human Health*, pp. 233-262, 1st ed, intech: Rijeka, Croatia.
24. Lowenstein, C. J. and Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707.
25. Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. and Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* **120**, 227-237.
26. Lu, T. C., Liao, J. C., Huang, T. H., Lin, Y. C., Liu, C. Y., Chiu, Y. J. and Peng, W. H. 2011. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Methanol Extract from *Pogostemon cablin*. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 671641.
27. Masui, Y. and Markert, C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**, 129-145.
28. Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
29. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Bátkai, S., Kashiwaya, Y., Haskó, G. and Liaudet, L. 2009. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, 466-483.
30. Neergheen, V. S., Bahorun, T., Taylor, E. W., Jen, L. S. and Aruoma, O. I. 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* **278**, 229-241.
31. Nevins, J. R. 1998. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* **9**, 5850593.
32. Oh, Y. N., Jin, S. J., Park, H. J., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2014. Anti-oxidative and anti-cancer activities by cell cycle regulation of *Salsola collina* extract. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 73-81.
33. Park, S. Y., Kim, J. Y., Park, K. W., Kang, K. S., Park, K. H. and Seo, K. I. 2009. Effects of thiosulfinates isolated from *Allium tuberosum* L. on the growth of human cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1003-1007.
34. Peter, B. and Bernard, L. 2008. World cancer report. *IARC.*
35. Pratheeshkumar, P. and Kuttan, G. 2011. Nomilin inhibits tumor-specific angiogenesis by downregulating VEGF, NO and proinflammatory cytokine profile and also by inhibiting the activation of MMP-2 and MMP-9. *Eur. J. Pharmacol.* **668**, 450-458.
36. Rao, C. V. 2004. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat. Res.* **555**, 107-119.
37. Singh, S. and Gupta, A. K. 2011. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**, 1211-1224.
38. Thornton, T. M. and Rincon, M. 2009. Non-classical p38 map kinase functions cell cycle checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 44-52.
39. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131-149.
40. Wu, Y. G., Guo, Q. S., He, J. C., Lin, Y. F., Luo, L. J. and

Liu, G. D. 2010. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**, 63-72.

41. Yang, G. Y., Taboada, S. and Liao, J. 2009. Induced nitric oxide synthase as a major player in the oncogenic transformation of inflamed tissue. *Methods Mol. Biol.* **512**, 119-156.

초록 : 광곽향 메탄올 추출물의 항산화, 항염증 및 암세포 증식 억제 효과

윤승근[1] · 진수정[2] · 정현영[2] · 윤희정[2] · 도미영[1] · 김병우[1,2] · 권현주[1,2]*
([1]동의대학교 일반대학원 자연생활과학대학 생명응용학과, [2]동의대학교 블루바이오 소재개발센터)

본 연구에서는, 암세포 증식 억제효능과 항산화, 항염증 효능을 동시에 가지는물질을 탐색하였다. 그 결과, 광곽향 메탄올 추출물이 A549, HepG2, MCF7, HT29 등 다양한 암세포에 대하여 세포성장억제효과를 보였고, A549에 대해 특이적으로 뛰어난 사멸효과를 보였다. 광곽향 메탄올 추출물에 의한 A549에서의 항암 효과는 p38 - Cdc25A - Cdk - Cyclin - Rb pathway를 통해 G1 arrest 유도로 연결되는 것으로 사료된다. 또한 DPPH를 통한 free radical의 소거능 확인 결과 항산화 효과를 가지고 있는 것을 확인하였고, 대식세포(RAW 264.7)의 iNOS 발현을 감소시켜 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 유의적으로 억제함을 확인했다. 이러한 결과들로부터 광곽향 메탄올 추출물이 항산화, 항염증, 항암 후보물질 소재로 활용가능 할 뿐 아니라, 다양한 건강기능성 소재로 활용가능할 것이라 사료된다.