大韓韓方腫瘍學會誌
J. of Kor. Oriental Oncology
Vol.5, No.1, 1999

수종 한약제의 위암세포에 대한 항암작용 효능 검색 및 약리작용에 관한 분자생물학적 연구[1)]

김진성 · 이지향 · 류봉하* · 박재훈 · 지성길** · 유진화***[2)]

Molecular analysis on the pharmacological actions of oriental medicines in stomach cancer cells

Jin-Seong Kim, Ji-Whyang Lee, Bong-Ha Ryu*, Jae-Hoon Park, Sung-Gil Ji**, Jin-Hwa Yoo***

*Dept. of Oriental internal medicine, College of Oriental Medicine
**Dept. of Pathology, College of Medicine
***Dept. of Anatomy, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Traditional oriental medicines have been used for treatment of various kinds of human cancers for long times and some of them proven to be effective clinically. However, the pharmacological actions and mechanisms related to cancer treatment are generally unknown. In an effort to clarify the action mechanisms of several oriental medicines used for cancer treatments, we planned this experimental procedures.

We selected *Cordyceps sinensis* (冬蟲夏草), *Punellae Herba* (夏枯草), *Rehmanniae Radix* (熟地黃), *Paeoniae Radix* (白芍藥), *Oldenlandiae Herba* (白花蛇舌草), *Portulacae Herba* (馬齒莧), *Scolopendra subspinipes mutilans* (蜈蚣), *Mylabris Phalerata* (斑蝥), Phellinus igniarius(桑黃), Ganodermae Lignum(靈芝) for evaluation, which have been used for patients of gastric cancers. The twenty grams of medicines were boiled in 100*ml* of water for 1 hour and filtered with 0.2 ㎛ pore-sized filter unit to remove insoluble particles.

Initially we evaluated the effects oriental medicines on growth inhibition in stomach cancer cells. The gastric cancer cell line, AGS, was cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal

1) 본 논문은 한국한의학연구원에서 시행한 한방치료기술연구개발사업의 연구결과임
2) *경희대학교 한의과대학 비계내과학교실
**경희대학교 의과대학 병리학교실
***경희대학교 의과대학 해부학교실

bovine serum and treated with 10㎕ oriental medicines per 1㎖ of medium up to 48 hours. The specimens were subjected to MTT assay for evaluation of growth inhibition. We found that Mylabris phalerata (斑蝥) markedly suppressed the growth of cancer cells as shown in results.

Next, we checked the effects of oriental medicines on cancer on cell cycles and apoptosis. Mylabris phalerata (斑蝥) inhibited cell cycle progression of cancer cells as compared with control cells and cells treated with other medicines. In addition, Mylabris phalerata (斑蝥) induced apoptosis in 30-40% of stomach cancer cells within 24 hours. Other oriental medicines used for this experiments did not show apoptosis-inducing effects on cancer cells.

Finally, we determined the expression levels of genes associated with cell cycle and apoptosis. The expressions of Bcl-2 and bcl-XL were downregulated by the treatments of Mylabris phalerata (斑蝥). However, the expression levels of genes related to cell cycles were not altered significantly.

In conclusion, we found that Mylabris phalerata (斑蝥) has in vitro growth-inhibiting and apoptosis-inducing effects on stomach cancer cells. However, we think that at least animal experiments are necessary for evaluations.

Ⅰ. 緖　論

우리 나라 사람에서 소화기암, 특히 위암의 발생은 유전적 요인, 음식물을 포함한 환경적 요인에 의해 다른 나라 사람에 비교하여 월등히 높은 발생 빈도를 보이고 있으며 사망률에 있어서도 전체 암으로 인한 사망률 중 가장 높은 원인을 차지하고 있다[1,2]. 위암은 높은 발생 빈도 및 사망률에도 불구하고 치료적인 측면에서는 이제 까지 많은 연구 및 치료방법의 개발에 많은 노력을 기울여 왔으나 과거에 비해 만족스러운 결과를 얻지 못하고 있다. 위암에 대한 치료는 크게 외과적인 절제술, 내과적인 항암제의 투여 및 방사선조사 등으로 이루어진다. 외과적인 절제술은 주로 초기단계의 위암에 높은 치료효과를 볼 수 있다. 즉 위암세포가 병변부위를 벗어나 주변의 장기나 임파절로 전이되기 이전에 병소를 제거함으로 완치를 유도하는 방법이다. 내과적인 항암제의 투여는 외과적으로 절제가 불가능 할 경우나 외과적인 치료와 병합하여 사용된다. 따라서 항암제는 위암뿐만 아니라 모든 종양의 치료에 가장 보편적으로 사용되는 치료방법이라 할 수 있다. 위암의 치료에 사용되는 항암제의 작용기전은 주로 암세포의 DNA에 손상을 초래하여 암세포의 세포 분열을 차단하거나, 세포가 성장하는데 반드시 필요한 영양물질과 경쟁관계를 형성함으로 영양물질의 흡수를 차단하여 세포의 성장을 차단하는 기능을 가지고 있다. 그러나 현재까지 개발된 항암제의 가장 큰 단점은 항암제의 비특이적 작용이라 할 수 있다. 즉 항암제가 암세포뿐만 아니라 정상적인 세포에도 같은 작용을 함으로서 정상세포의 세포분열 및 성장을 방해하여 이로 인한 부작용이 초래되는 것이다. 현재까지 개발된 항암제는 공통적으로 이와 같은 문제점을 가지고 있다[3,4]. 이러한 부작용을 극복하고자 최근 합성물질이 아닌 천연물질에서부터 항암물질을 추출하려는 연구가 이루어지고 있다. 한방에서 사용되는 항암제, 특히 위암의 치료에 이용되는 약물은 이제까지

임상적 경험을 통하여 여러 단계의 위암 환자에서 그 효능 및 치료효과가 인정되고 있으나 약물의 작용기전에 관한 체계적이며 과학적인 근거 자료가 부족한 실정이며 또한 그 약리작용도 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 따라서 실험을 통한 과학적인 근거를 통하여 새로운 한약물이 개선 내지 개발될 수 있다는 점에서 이에 대한 과학적인 분석이 필요하다. 그러나 기존의 약리작용에 대한 연구는 단편적으로 실험동물에 암세포를 투여한 후 항암제에 의해 실험동물의 수명이 연장됨을 확인하는 수준에서 머물러온 것이 사실이다. 이러한 단편적인 연구는 항암제의 작용기전을 밝히기에는 매우 부족하다고 생각되며 약리작용에 대한 유전자적 수준 및 세포 분열주기에 미치는 영향에 관한 연구가 반드시 필요하다고 생각된다. 본 연구는 이제까지 위암에 효과가 있는 것으로 알려진 冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등이[5,6,7,8] 사람 위암 세포의 세포 분열주기(cell cycle)에 미치는 영향 및 세포분열 및 억제유전자, 세포의 죽음과 연관된 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하고자 한다.

대상약물	생약명	용량
冬蟲夏草	*Cordyceps sinensis*	20g
夏枯草	*Punellae Herba*	20g
熟地黃	*Rehmanniae Radix*	20g
白芍藥	*Paeoniae Radix*	20g
白花蛇舌草	*Oldenlandiae Herba*	20g
馬齒莧	*Portulacae Herba*	20g
蜈蚣	*Scolopendra subspinipes mutilans*	20g
斑蝥	*Mylabris phalerata*	20g
桑黃	*Phellinus igniarius*	20g
靈芝	*Ganodermae Lignum*	20g

Ⅱ. 실 험

1. 재 료

1) 세포주

국내 암환자의 위암세포인 SNU-1, SNU-5, SNU-16과 미국 American Type Culture Collection (ATCC)에서 제공하는 AGS, Kato 등의 위암세포중 screen과정을 통하여 적합한 세포를 선정한다. 이중 AGS가 가장 적합한 세포로 판명되었다.

2) 약 재

오랜 임상적 경험과 기존의 실험을 통하여 항암작용이 있을 것으로 알려진 冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등을[5,6,7,8] 대상으로 하여 시중 건재약국에서 원산지가 확실한 것을 구입, 정선한 후 사용하였다.

2. 실험방법

1) 위암세포의 배양

위암세포주인 AGS는 ATCC (Manassas, VA)로부터 구입하였으며 위암세포를 RPMI 1640와 10% fetal bovine serum를 섞은 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양한다.

2) 약물처리

冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등을 각각 20g을 물 100ml에 넣고 끓인 후 이를 0.2㎛의 filter로 filtering한 후 배지 *ml*당 10㎕의 약물을 12, 24, 36, 48시간 동안 투여한다.

3) 위암세포증식 억제효과

위암세포 증식 억제효과를 검증하기 위하여 MTT 반응실험을 시행하였다.

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 5㎎/㎖을 PBS (phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 조절한 후 0.22㎛ filter로 여과하여 MTT stock solution을 만들었다. 그리고 10㎕ MTT를 100㎕ 의 cell suspension에 추가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 방치하여 보라색 formazan crystals가 형성된 후 absolute isopropanol에 녹아있는 100㎕의 0.04M HCl을 넣어 보라색 formazan crystals가 완전히 용해된 후 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader를 이용하여 570㎚의 파장에서 OD (optical density)를 측정하였다.

4) 위암세포 분열주기에 미치는 영향 (cell cycle analysis)

검액을 투여한 실험군세포와 대조군세포의 DNA를 Propidium Iodide(PI)로 염색한 후 fluoresceine activated cell sorter(FACS)를 사용하여 DNA의 양을 정량분석하여 수종의 한약물이 세포분열주기에 미치는 영향을 분석하였다.

5) 세포의 증식과 연관된 유전자의 발현(quantative RT-PCR 이용)

(1) RNA 추출

세포를 회수하여 원심분리한 후, Solution D 200㎕를 넣고 잘 흔든 후 2M sodium acetate, pH4.2, 20㎕, water-saturated phenol 200㎕, chloroform-isoamyl alcohol(49:1) 40㎕ 를 넣고 20분간 얼음에 보관한다. 20分 후 12,000×g, 10분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 넣은 후 -20℃에서 12시간 보관한다. 다음날 다시 12,000×g, 20분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 200㎕의 ethanol을 넣어 얻어진 RNA를 세척한다. 세척한 RNA를 spectrophotometer를 이용하여 정량한다.

(2) cDNA 합성[9]

다음의 조성으로 시료를 혼합한 후 15분간 42℃에서 incubation한다.

Reaction Mixture	Volume	Final Concentration
$MgCl_2$, 25mM	4㎕	5mM
Reverse Transcriptase Buffer(×5)	4㎕	1×
10mM dNTP mixture	2㎕	1㎜ each
RNase inhibitor	0.5㎕	1U/㎕
AMVReversetranscriptase (8U/㎕)	2㎕	15U/㎍ of RNA
Oligo-dT(0.5㎍/㎕)	1㎕	0.5㎍/㎍ of RNA
RNA	1㎕(1㎍/㎕)	50ng/㎕
Water	5.5㎕	

(3) 유전자 연쇄중합반응(PCR)[10]

① 멸균된 0.5㎖ microtube에 다음의 시료를 혼합한다.

sterile H_2O	30㎕
10×amplification buffer	10㎕
mixture of dNTP, each at a concentration of 1.25 mM	16㎕
primer 1 (in 5㎕ of H_2O)	100pmoles
primer 2 (in 5㎕ of H_2O)	100pmoles
template DNA (up to 2㎍)	

H_2O to a final volume of 100㎕

② 시료혼합물을 5분간 94℃에서 가열하여 DNA를 denaturation한다.

③ 0.5㎕ of Taq DNA polymerase (5units/㎕)를 첨가한다.

④ 100㎕ of light mineral oil를 넣는다.

⑤ PCR반응을 시행한다.

Cycle	Denaturation	Annealing	Polymerization
First	5min at 94℃	2min at 50℃	3min at 72℃
Subsequent	1min at 94℃	2min at 50℃	3min at 72℃
Last	1min at 94℃	2min at 50℃	10min at 72℃

(4) 전기영동

PCR product를 2% agarose gel에 10㎕를 loading하여 80V에서 20분간 전기영동을 시행한다. 다시 EtBr solution에서 염색한 후 UV transilluminator로 관찰한다.

(5) Densitometry를 이용하여 Quantitation한다.

Ⅲ. 성 적

1. 冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등의 인체 위암세포 증식 억제효과에 대한 MTT assay

항암제의 작용기전을 밝히기 위해서는 대상 항암제가 암세포의 증식에 미치는 효과를 먼저 분석하여야 한다. 암억제 효과를 분석하기 위해서 암세포를 배양기에서 배양하면서 다양한 농도의 항암제를 투여하여 세포의 증식정도를 알 수 있는 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 통하여 억제 효과를 객관적으로 분석하였다<Table 1, Fig. 1>.

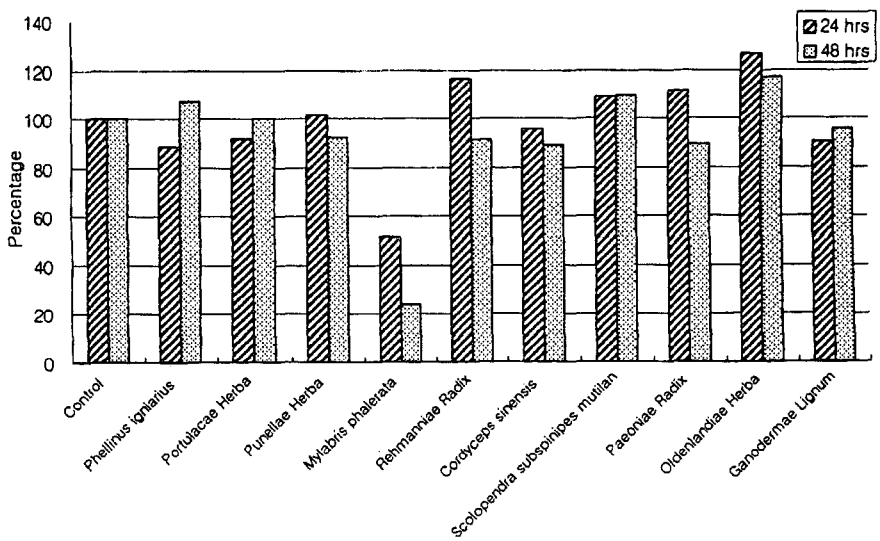

Fig. 1. Effects of oriental medicines on stomach cancer cell line, AGS using MTT assay

Table 1. MTT assay of Phellinus igniarius, Portulacae Herba, Punellae Herba, Mylabris phalerata, Rehmanniae Radix, Cordyceps sinensis, Scolopendra subspinipes mutilans, Paeoniae Radix, Oldenlandiae Herba, Ganoderae Lignum.

Time (hrs)	0	12	24	36	48
Control	0.450±0.040	0.480±0.040	0.440±0.050	0.410±0.010	0.430±0.040
Phellinus igniarius	0.420±0.030	0.450±0.020	0.390±0.030	0.440±0.040	0.460±0.030
Portulacae Herba	0.346±0.020	0.317±0.040	0.351±0.030	0.317±0.030	0.380±0.030
Punellae Herba	0.246±0.040	0.254±0.030	0.277±0.040	0.284±0.020	0.307±0.010
Mylabris phalerata	0.246±0.020	0.197±0.030	0.137±0.010	0.113±0.040	0.073±0.020
Rehmanniae Radix	0.280±0.030	0.297±0.030	0.285±0.030	0.256±0.010	0.256±0.013
Cordyceps sinensis	0.600±0.030	0.660±0.030	0.640±0.040	0.550±0.050	0.540±0.050
Scolopendra subspinipes mutilans	0.469±0.030	0.554±0.030	0.554±0.040	0.550±0.020	0.540±0.030
Paeoniae Radix	0.270±0.010	0.250±0.030	0.280±0.030	0.240±0.030	0.250±0.030
Oldenlandiae Herba	0.640±0.070	0.720±0.060	0.710±0.050	0.670±0.060	0.690±0.060
Ganodermae Lignum	0.460±0.050	0.420±0.040	0.390±0.040	0.440±0.030	0.470±0.040

2. 冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등의 위암세포의 분열주기에 미치는 영향을 규명함

정상적으로 세포는 G_1 phase, S phase, G_2 phase, M phase의 과정을 통하여 세포분열의 한 주기를 완성하게 된다. 일반적으로 60-70%의 세포는 G_1 phase에 있고 S/M phase에 20-25%의

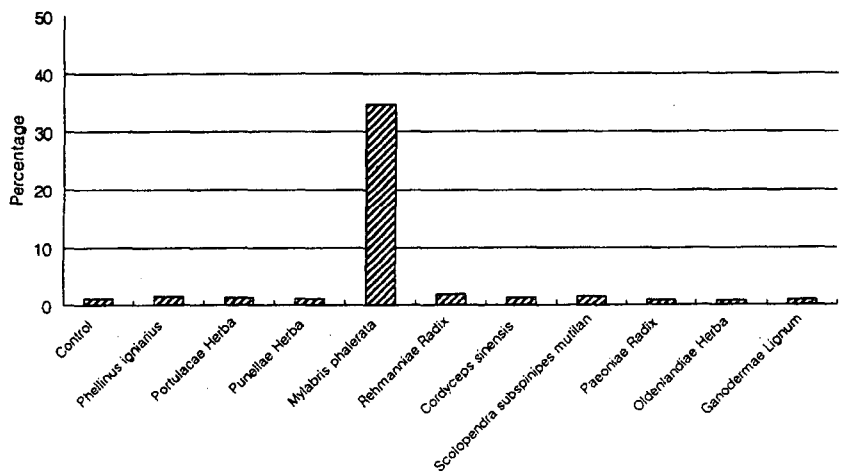

Fig. 2. Apoptotic rates of stomach cancer cell s induced by oriental medicines after 1 day. Sub-G1 fragments plotted

Table 2. Cell cycle and apoptosis analysis of Phellinus igniarius, Portulacae Herba, Punellae Herba, Mylabris phalerata, Rehmanniae Radix, Cordyceps sinensis, Scolopendra subspinipes mutilans, Paeoniae Radix, Oldenlandiae Herba, Ganoderae Lignum.

	Sub-G_0/G_1 percentage	G_0/G_1 percentage	S/M percentage
Control	1.2±0.2	74±0.9	24.8±0.5
Phellinus igniarius	1.5±0.2	69±0.7	29.5±0.7
Portulacae Herba	1.3±0.3	76±1.1	22.7±0.5
Punellae Herba	1.2±0.1	71±1.8	27.8±1.0
Mylabris phalerata	34.6±1.1	49±1.3	16.4±0.6
Rehmanniae Radix	1.8±0.2	77±1.3	21.2±0.7
Cordyceps sinensis	1.4±0.2	73±1.4	25.6±0.6
Scolopendra subspinipes mutilans	1.5±0.1	74±1.8	24.5±0.3
Paeoniae Radix	1.0±0.1	77±1.3	22.0±1.0
Oldenlandiae Herba	0.8±0.08	73±1.6	26.2±1.2
Ganodermae Lignum	0.9±0.03	78±2.1	21.1±1.2

세포가 있다. 그러나 악성종양 세포의 경우에는 세포분열주기가 빨라짐에 따라 S/M phase에 속하는 세포의 비율이 증가하게 된다. 항암제의 작용은 주로 세포분열이 일어나는 S/M phase에 작용하여 DNA의 합성을 방해하여 세포분열주기를 길게하여 세포의 증식을 억제시키거나 또는 DNA에 복구할 수 없는 심한 손상을 가하여 세포를 죽이는 작용을 가지고 있다. 본 실험에 사용되는 冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등의 항암 효과를 검증하고 그 작용기전을 밝히기 위해서는 본 약제가 암세포의 분열주기에 미치는 영향을 분석하고자 한다. 이를 위해서 대조군과 항암제를 투여한 실험군 세포의 DNA를 Propidium iodide로 염색한 후 fluoresceine activated cell sorter (FACS)를 사용하여 분석하여 冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등이 세포분열 주기에 미치는 영향을 분석하였다<Table 2, Fig. 2>.

3. 冬蟲夏草, 夏枯草, 熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등이 다양한 유전자(oncogene)의 발현에 미치는 영향을 규명함

<Table 3, Fig. 3>

Ⅳ. 고 찰

우리 나라 사람에서 소화기암, 특히 위암의 발생은 유전적 요인, 음식물을 포함한 환경적 요인에 의해 다른 나라 사람에 비교하여 월등히 높은 발생 빈도를 보이고 있으며 사망률에 있어서도 전체 암으로 인한 사망률 중 가장 높은 원인을 차지하고 있다[1,2].

한의학에서 위암이라는 명칭은 없지만, <素問 · 風論>에 "胃風之狀 頸多汗惡風 飮食不下 塞不通 腹善滿 失衣則腹脹 食寒則泄 診形瘦而

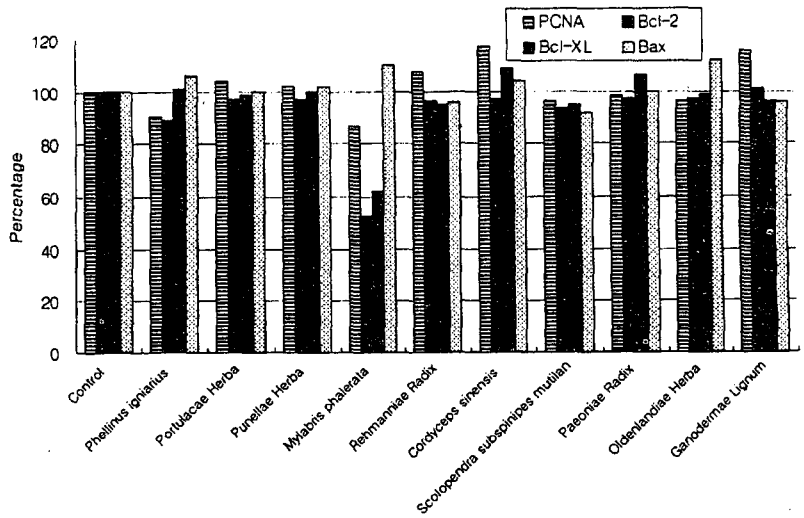

Fig. 3. Gene expressions of stomach cancer cells by oriental medicines

Table 3. Gene regulation of Phellinus igniarius, Portulacae Herba, Punellae Herba, Mylabris phalerata, Rehmanniae Radix, Cordyceps sinensis, Scolopendra subspinipes mutilans, Paeoniae Radix, Oldenlandiae Herba, Ganoderae Lignum.

	Control	Phellinus igniarius	Portulacae Herba	Punellae Herba	Mylabris phalerata	Rehmanniae Radix
GAPDH(GAPDH/GAPDH)	358(1.000)	345(1.000)	376(1.000)	380(1.000)	334(1.000)	357(1.000)
CDKN1(CDKN1/GAPDH)	270(0.754)	258(0.748)	288(0.766)	277(0.729)	235(0.704)	292(0.818)
CDKN2a(CDKN2a/GAPDH)	320(0.894)	309(0.896)	352(0.936)	301(0.792)	304(0.910)	298(0.835)
CDKN2b(CDKN2b/GAPDH)	268(0.749)	244(0.707)	290(0.771)	293(0.771)	287(0.859)	275(0.770)
PCNA(PCNA/GAPDH)	187(0.522)	165(0.478)	205(0.545)	202(0.532)	152(0.455)	201(0.563)
Histone H3(Histone/GAPDH)	297(0.830)	307(0.890)	302(0.803)	254(0.668)	306(0.916)	305(0.854)
Cdc2(Cdc2/GAPDH)	220(0.615)	237(0.687)	257(0.684)	198(0.521)	184(0.551)	238(0.667)
Cyclin D1(CyclinD/GAPDH)	164(0.458)	178(0.516)	158(0.420)	169(0.445)	182(0.545)	176(0.493)
c-myc(c-myc/GAPDH)	335(0.936)	366(1.061)	-	312(0.821)	268(0.802)	349(0.978)
Bcl-2(bcl-2/GAPDH)	370(1.034)	319(0.925)	376(1.000)	380(1.000)	182(0.545)	356(0.997)
Bcl-XL(bcl-XL/GAPDH)	285(0.796)	277(0.803)	294(0.782)	302(0.795)	165(0.494)	270(0.756)
Bax(Bax D/GAPDH)	178(0.497)	182(0.528)	187(0.497)	192(0.505)	182(0.545)	168(0.471)
Bak(Bak/GAPDH)	207(0.578)	222(0.586)	199(0.529)	214(0.563)	214(0.641)	196(0.549)

	Control	Cordyceps sinensis	Scolopendra subspinipes mutilans	Paeoniae Radix	Oldenlandiae Herba	Ganodermae Lignum
GAPDH(GAPDH/GAPDH)	358(1.000)	320(1.000)	392(1.000)	314(1.000)	388(1.000)	340(1.000)

CDKN1(CDKN1/GAPDH)	270(0.754)	261(0.816)	253(0.645)	254(0.809)	276(0.711)	291(0.856)
CDKN2a(CDKN2a/GAPDH)	320(0.894)	352(1.100)	284(0.724)	290(0.924)	354(0.912)	311(0.915)
CDKN2b(CDKN2b/GAPDH)	268(0.749)	287(0.897)	286(0.730)	228(0.726)	288(0.742)	280(0.824)
PCNA(PCNA/GAPDH)	187(0.522)	198(0.619)	198(0.505)	162(0.516)	197(0.508)	205(0.603)
Histone H3(Histone/GAPDH)	297(0.830)	267(0.834)	265(0.676)	254(0.809)	307(0.791)	302(0.888)
Cdc2(Cdc2/GAPDH)	220(0.615)	211(0.659)	211(0.538)	190(0.605)	255(0.657)	261(0.768)
Cyclin D1(CyclinD/GAPDH)	164(0.458)	189(0.591)	149(0.380)	172(0.548)	188(0.485)	176(0.518)
c-myc(c-myc/GAPDH)	335(0.936)	320(1.000)	305(0.778)	307(0.978)	354(0.912)	350(1.029)
Bcl-2(bcl-2/GAPDH)	370(1.034)	332(1.038)	378(0.964)	343(1.092)	390(1.005)	355(1.044)
Bcl-XL(bcl-XL/GAPDH)	285(0.796)	276(0.863)	295(0.753)	265(0.844)	305(0.786)	260(0.765)
Bax(Bax D/GAPDH)	178(0.497)	166(0.519)	180(0.459)	156(0.497)	215(0.554)	162(0.476)
Bak(Bak/GAPDH)	207(0.578)	188(0.588)	212(0.541)	187(0.596)	224(0.577)	187(0.550)

腹大"라 하였고[11], <靈樞 · 邪氣藏府病形篇>에 "爲病者腹X脹 胃脘當心而痛 上支兩脇 咽不通 飮食不下>라는 기록이 있어서[12], 胃癌에 나타날 수 있는 증상과 유사한 것을 발견할 수 있으며, <金匱要略>에서는 "朝食暮吐 暮食朝吐 宿食不化, 名曰胃反, 脈緊而澁其病難治"라 하여서[13] 위암의 말기증상과 유사한 표현을 하고 있고, <醫學入門>에서는 "其槁在上焦賁門者 食不能下 下則胃脘當心而痛 須臾吐出痛乃止 賁門卽胃脘上口, 其槁在中焦幽門者 食物可下 良久復出 幽門與中脘相近, 其槁在下焦闌門者 朝食暮吐 暮食朝吐闌門賸下"라 하여서[14] 종양의 발생 부위별로 특징적인 증상을 나타내고 있는데 이는 위암의 발생부위 및 다른 장기로의 전이로 인한 증상의 차이를 나타내는 것과 유사함을 알 수 있다.

기존의 한국 한의학계의 1990년이후 암연구 동향을 살펴보면 세포독성연구, 연구와 면역반응연구(세포성면역, 체액성면역, IL-2, IL-6, NK cell, NO)가 주를 이루고 있으며, 그밖에 항암제 부작용 및 상승작용 연구, 폐전이 연구, 방사선 부작용 연구, colnogenic assay, apoptosis(FACS) 연구, 세포분자유도연구, 분자생물학적 연구, 약물간의 상승작용연구 및 angiogenesis에 관한 연구 등이 일부 이루어 지고 있다[15].

한약제의 항암작용에 대한 기존의 약리작용에 대한 연구는 단편적으로 실험동물에 암세포를 투여한 후 항암제에 의해 실험동물의 수명이 연장됨을 확인하는 수준에서 머물러온 것이 사실이다. 이러한 단편적인 연구는 항암제의 작용기전을 밝히기에는 매우 부족하다고 생각되며 그러므로 한약의 약리작용에 대한 유전자적 수준 및 세포 분열주기에 미치는 영향에 관한 연구가 반드시 이루어져야 한다.

항암제의 작용기전을 밝히기 위해서는 대상 항암제가 암세포의 증식에 미치는 효과를 먼저 분석하는 것이 필요하다. 암억제효과를 분석하기 위해서 암세포를 배양기에서 배양하면서 다양한 농도의 항암제를 투여하여 세포의 증식정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 억제효과를 객관적으로 분석하였다. 본 실험에서 사용한 MTT 검사방법은 cell의 viability를 측정하는 방법으로 1983년 Mosmann에 의해 처음 시도되었으며[16], 1986년 Cole과 1988년 Alley등에 의해 사용되기 시작하여 최근 널리 보급되었다[17]. MTT는 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-

diphenyltetrazdium bromide; Thiazolyl blue이며, 100mg, 250mg, 500mg 등 다양한 용량의 yellow water soluble tetrazolium 염색으로 세포의 viability에 따라 MTT-formazan의 양이 달라지며 이를 적절한 용매에 작용시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 세포의 생존능력을 측정한다. 본 실험의 결과 OD값이 24시간 및 48시간에서 斑蝥검액 10㎕/㎖ 투여군은 각각 0.137±0.01, 0.073±0.02으로 대조군의 0.267±0.04, 0.307±0.03에 비하여 뚜렷한 암세포 증식 억제효과를 보였다.

정상적으로 세포는 G_1 phase, S phase, G_2 phase, M phase의 과정을 통하여 세포분열의 한 주기를 완성하게 된다. G_1기는 첫번째 휴지기로서 세포가 분열된 직후 다음의 성장과정을 시작하기 이전에 필요한 세포내 인자를 준비하고 적절한 크기의 세포가 되도록 준비하는 기간이다. S기에서는 핵에 있는 유전정보를 가진 DNA의 복제(replication)가 이루어지는 시기로서 한 염색체에서 두 copy의 염색체가 되는 시기이다. 일단 S기에서 DNA가 복제되어 두 copy가 되면 다음에는 두 세포로 분열되기 위해 핵 이외에 세포질 내의 여러 인자들이 복제되어야 한다. S기가 끝나면서 세포는 제2휴지기인 G_2기로 넘어가는데 이때 필요로 하는 세포질의 인자들이 생산되면서, 한 세포가 두 세포로 분열되는데 필요한 인자들이 모두 만들어지는 시기이다. 만약 이 시기에 세포질의 모든 부분이 충분하게 생성되지 않으면 G_2기에서 다음 세포의 분열이 실제로 일어나는 M기로 진행되지 못한다. 일단 G_2에서 한 세포가 두 세포로 될 수 있는 모든 준비가 되어지면 세포주기는 M기로 넘어간다. M기에서는 세포질의 분열(cytokinesis)이 일어나며 세포벽이 생기면서 한 세포가 두 세포로 실제로 나뉘어지는 시기인 것이다. 일반적으로 60-70%의 세포는 G_1 phase에 있고 S/M phase에 20-25%의 세포가 있다. 그러나 악성종양 세포의 경우에는 세포분열주기가 빨라짐에 따라 S/M phase에 속하는 세포의 비율이 증가하게 된다[18,19,20,21,22,23,24,25,26].

항암제의 작용은 주로 세포분열이 일어나는 S/M phase에 작용하여 DNA의 합성을 방해하여 세포분열주기를 길게 하여 세포의 증식을 억제시키거나 또는 DNA에 복구할 수 없는 심한 손상을 가하여 세포를 죽이는 작용을 가지고 있다[3,4]. 따라서 항암효과를 검증하고 그 작용기전을 밝히기 위해서는 상기 약제가 암세포의 분열주기에 미치는 영향을 분석하는 것이 필요하다.

본 실험에서는 DNA를 Propidium Iodide(PI)로 염색한 후 FACScan을 이용하여 cell cycle analysis를 시행하였는데 斑蝥검액 10㎕/㎖ 투여군에서 sub-G_0/G_1 fraction 34.6%, G_0/G_1 fraction 49%, S/M fraction 15%를 나타내어 24시간후 apoptotic rate가 34.6%로 현저한 암세포 살상능력을 나타내었다.

암세포의 빠른 세포분열은 세포의 분열, 증식을 촉진하는 유전자의 발현과 밀접한 관계를 가지고 있다. 즉 정상세포에서 암세포로 변환(transformation)되면서 정상세포에서는 약하게 또는 일시적으로 표현되는 세포증식 유전자가 항시 과도하게 표현되기 때문에 암세포가 빠른 세포분열을 하게 되는 것이다. 암세포에서 세포분열을 촉진시키거나 증식과 연관된 대표적인 유전자에는 CDKN1 (cell cycle을 억제하는 유전자), CDKN2a (cell cycle을 억제하는 유전자), CDKN2b (cell cycle을 억제하는 유전자), PCNA (세포의 분열을 나타내는 유전자), Histone H3 (cell cycle의 진행을 판별하는 유전자), Cdc2 (세포의 분열을 나타내는 유전자), Cyclin D1 (cell cycle을 촉진하는 유전자), c-myc (cell cycle에 관여하는 유전자), c-fos (cell

cycle에 관여하는 유전자) 등이 있다[18,22,24,25]. 최근 항암제가 종양세포를 죽이는 방법 중에서 자기 계획 세포사(programmed cell death, apoptosis)를 유도한다는 연구가 활발히 進行되고 있다. 자기 계획 세포사란 계획된 세포의 죽음이라 할 수 있으며 이는 최근 들어 세포의 생리학적, 병리학적 과정에서 매우 중요한 현상으로 받아들여지고 있다. 태아발생, 기관형성, 세포매개면역, 호르몬에 의한 조직의 퇴화, 종양세포의 퇴화 등 많은 분야에서 자기 계획 세포사가 일어나고 있으며 이러한 과정을 통해 생체는 불필요한 세포를 제거하고 전체적인 항상성을 유지할 수 있다[23,26,27].

또한 인위적인 항암제 투여로 인한 암세포의 파괴과정에서도 역시 이 자기 계획 세포사를 관찰할 수 있다. 현재 항암제로 널리 사용되고 있는 약제 중에서 adriamycin, vinblastin, bleomycin, cis-platinum 등이 종양세포에서 자기 계획 세포사는 유도하는 대표적인 약제로 알려져 있다. 세포의 자기 계획 세포사에는 여러 종류의 단백질 및 유전자가 관여하는데 대표적인 유전자로서는 bcl-2, bax, bcl-xL, fas, FAD, CPP32, bak 등이 있다[21,22,25]. 이들 유전자는 세포의 죽음에 깊이 관여하고 있으며 한 예로서 bcl-2 유전자의 경우, 이 유전자가 다량으로 표현될 경우 세포는 여러 종류의 유해한 자극으로부터 강력하게 저항할 수 있는 능력을 얻게 되고, 종양세포가 이런 유전자의 발현을 통해 항암제의 공격으로부터 저항하면서 지속적으로 분열, 증식할 수 있는 것이다. 일부의 항암제의 경우 이러한 유전자의 발현을 억제하거나 또는 세포에서 죽음을 촉진하는 유전자를 유발함으로서 항암효과를 발휘할 수 있다. 따라서 본 연구에서 사용되는 약제가 이러한 세포의 죽음과 연관된 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는가를 연구하는 것은 각 약물의 약리작용 기전을 밝히는데 반드시 필요한 과정이라 할 수 있다.

본 실험에서는 유전자의 발현을 분석하는데 있어 quantitative RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)방법을 사용하였다. RT-PCR은 전통적으로 특정 유전자의 RNA분석에 사용된 Northern blot의 문제점을 극복하는 방법이다[28,29,30]. 기존 Northern blot 방법의 단점인 일개 유전자분석에 5~10㎍의 RNA를 필요로 한다는 점과 동위원소의 사용이 필수적이라는 문제점을 해결한 방법으로 미량(1㎍이하)의 RNA만으로도 특정 유전자의 분석이 가능하기 때문에 민감도가 뛰어나며, 동위원소의 사용이 필요하지 않다는 점 때문에 최근 대부분의 분자생물학적 연구에 사용되어지고 있다. 그러나 세포 또는 조직 속에 존재하는 핵산의 template가 100만배 이상으로 증폭된다는 사실로 인하여 정량분석은 PCR시행 후에 그 product의 전기영동상의 DNA-band의 강도만으로 결과를 서로 비교할 수 없는 단점은 계속적으로 가지고 있다. 최근에는 표준 RNA를 이용하여 한 시험관에서 역전사가 일어나게 한 후 그 cDNA를 차례로 희석하고 각각을 PCR로 증폭하여 영상밀도계(densitometer)로서 정량화하는 방법등을 이용하여 mRNA 정량방법을 확립하여 단점을 보완하였다[29,31].

이러한 RT-PCR을 이용해 앞서 언급한 각종 유전자의 발현을 분석한 결과 bcl-2의 발현이 대조군에 비해 50%이하로 억제되었다.

이와같이 수종 한약제의 항암효과에 대한 분자생물학적인 실험의 결과를 살펴보면 斑蝥검액의 투여군에서 cell viability와 cell cycle의 유의성 있는 변화가 있었으며 cell cycle, 혹은 apotosis에 관여하는 유전자의 발현에 있어서도 역시 유의성 있는 변화가 관찰되었다.

Ⅴ. 결 론

熟地黃, 白芍藥, 白花蛇舌草, 馬齒莧, 蜈蚣, 斑蝥, 桑黃, 靈芝 등의 항암효과에 대한 분자생물학적인 연구를 위해 위암세포를 대상으로 암세포증식억제효과 및 세포의 분열주기에 미치는 영향, Apotosis 및 Cell cycle과 관련이 있는 다양한 oncogene의 발현에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 斑蝥검액 10㎕/㎖ 투여군의 OD(optical density)값이 24시간 및 48시간에서 각각 0.137±0.01, 0.073±0.02으로 나타나 대조군의 0.267±0.04, 0.307±0.03에 비하여 뚜렷한 암세포 증식 억제효과를 보였다.
2. 斑蝥검액 10㎕/㎖ 투여군에서 sub-G0/G1 fraction 34.6%, G0/G1 fraction 49%, S/M fraction 15%를 나타내어 24시간후 apoptotic rate가 34.6%로 현저한 암세포 살상능력을 나타내었다.
3. 斑蝥검액 10㎕/㎖ 투여군의 bcl-2의 발현이 대조군에 비해 50%이하로 억제되었다.

이상의 실험 결과로 보아 수종의 한약제중에서 斑蝥의 경우 실험실에서 배양된 위암세포의 성장을 억제시키고 세포살상능력을 가지고 있으며, 또한 세포의 생존과 밀접한 연관성이 있는 bcl-2 유전자의 발현을 억제시키는 효과가 있음이 판명되었다.

참 고 문 헌

1. 대한민국 보건복지부 : 한국인 암등록 조사자료 분석보고서(1982. 7. 1~1987. 6. 30), 암학회지 19(2), 1987
2. 박조현, 김동구, 정상설, 유승진, 이명덕, 김세경, 김진, 고용복, 김인철 : 최근 10년간 경험한 위선암이 임상분석 및 추적조사 성적, 외과학회지 42: 787, 1992
3. 김원동 : 99 내과학의 최신지견, 서울, 한국의학, pp213-214, 1999
4. 서울대학교의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, p138, pp151-153, 1992
5. 전국한의과대학 본초학교수 공편저, 본초학, 서울, 영림사, pp217-218, 223-224, 498-499, 508-509, 580-583, 646-647, 1991
6. 강소신의학원 편, 중약대사전, 상해, 상해과학기술출판사, pp307-308, 706-709, 754-756, 1180-1182, 1967, 2280-2282, 2473-2475, 2626-2628, 1994
7. 유춘안 팽명 주편 : 항암중초약대사전, 호북 홍호시, 호북과학기술출판사, pp127, 322, 367, 570, 984, 1076, 1116, 1994
8. 홍성범 역 : 임상항암중초약, 서울, 성보사, pp42, 100, 103, 1990
9. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal. Biochem 162: 156-159, 1987
10. Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E, Ullrich SJ: Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1958-1962, 1991
11. 王琦 外4人 : 黃帝內經素問今釋, 서울, 성보사, p43, 146, 203, 353, 380, pp433-436, 1983
12. 葉桂 : 臨證指南醫案, 臺北, 旋風出版社, 券三 p3-4, 中華民國67
13. 張機 : 金匱要略, 서울, 동남출판사, p164-

165, 1982

14. 李梃 : 醫學入門, 南昌市, 江西科學技術出版社, p846, 847, 848, 1988
15. 김성훈 : 한방제제의 가능성있는 암연구 방향에 대한 연구, 1998
16. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of immunologic methods, 65(1-2): 55-63, 1983
17. Cole SP: Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, Cancer chemother Pharmacology, 17(3): 259-263, 1986
18. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987
19. El-Deiry WS, Harper JW, O' Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Brrrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis, Cancer Res. 54: 1169-1174, 1994
20. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, Cell 75: 817-825, 1993
21. Kane SE, Pastan I, Gottesman MM: Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. J. Bioenerg. Biomembr. 22: 593-618, 1990
22. Kim JH, Takashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK, Lee HD, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF: Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumor and cell lines, J. Natl. Cancer Res. 83: 938-943, 1991
23. Levine AJ: The p53 tumor suppressor gene and product. Cancer Surveys 12: 59-79, 1992
24. Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E, Ullrich SJ: Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1958-1962, 1991
25. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D: Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway, Cancer Res. 54: 3391-3395, 1994
26. Zambetti G, Bargonetti J, Walker K, Prives C, Levine AJ: Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element, Genes Dev. 6: 1143-1152, 1992
27. Zelik H, Mousses S, Andrulis IL: Low levels of expression of an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CIP1/WAF1) in primary breast carcinomas with p53 mutations, Clin. Cancer Res. 1: 907-912, 1995
28. 김대곤, 임수일, 안득수 : Hep G2 간암세포주에서 Retinoic Acid가 p53 단백, Ki-67 및 PCNA/Cyclin 발현에 미치는 효과, 대한내과학회지, 49(2): 210-220, 1995
29. Ferre F: Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth, PCR Methods and Applications, 2: 1-9, 1992
30. Wang AMW, Doyle MV and Mark DF: Quantitation of mRNA by polymerase chain

reaction, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(24): 9717-9721, 1989

31. 정현채, 김정목, 송인성, 김정룡 : 인체 대장 상피세포 및 대장점막에 발현된 여러 Cytokine 유전자의 정량분석을 통한 인체 숙주 방어기전에 관한 硏究-합성 RNA를 이용한 정량적 역전사 PCR법의 응용, 대한내과학회지 49(1): 1-13, 1995