

## 山慈菇가 위암세포에 미치는 영향

김선량, 류봉하, 류기원, 박동원  
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

### Study of Anti-Cancer Effects of *Cremastrae Appendiculatae Tuber* on Stomach Cancer Cells

Seon-Ryang Kim, Bong-Ha Ryu, Ki-Won Ryu, Dong-Won Park

Department of 3rd Internal Medicine, Oriental Medicine, Kyunghee University

In order to investigate anti-cancer effect of *Cremastrae Appendiculatae Tuber*, this experiment was performed, in vitro. The results are as follows:

1. The MTT assay demonstrated that cell viability was decreased by *Cremastrae Appendiculatae Tuber* without statistical significance
2. The Apoptosis assay demonstrated that apoptosis was induced by *Cremastrae Appendiculatae Tuber* without statistical significance
3. In quantitative RT-PCR analysis, there were no remarkable changes in expression levels of apoptosis-related genes, Bcl-2, Bax, P53. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(2):75-83)

**Key Words:** *Cremastrae Appendiculatae Tuber*, MTT assay, Apoptosis assay, RT-PCR analysis

## 서론

위암의 치료법에는 크게 외과적 수술, 방사선조사, 내과적 항암제 투여 등이 있다<sup>1,2)</sup>. 전이되기 이전 초기 단계의 위암은 외과적 절제로 높은 치료효과를 보이지만 방사선조사와 내과적인 항암제 투여는 정상세포까지 독성을 나타내어 소화장애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역기능저하, 골수조혈장애, 생식기 장애,

유전인자장애 등의 부작용을 초래하고 있다<sup>3)</sup>. 이러한 부작용을 극복하고자 최근 한약제로부터 추출한 항암물질을 위암 치료법에 활용하려는 연구가 이루어지고 있다.

한의학에서 사용되는 항암제, 특히 위암의 치료에 이용되는 한약제는 이제까지 임상적 경험을 통하여 그 효능 및 치료효과가 어느 정도 인정되고 있으나 약물의 작용기전에 관한 과학적인 근거 자료가 부족한 실정이다. 실험에 의해 부작용은 최소화하면서 효과는 탁월한 한방 항암제가 개발될 수 있다는 점에서 이에 대한 과학적인 분석이 필요하다고 본다. 그러나 한방 항암제에 대한 기존의 연구는 단편적으로

· 접수 : 2001년 4월 20일 · 채택 : 5월 21일  
· 교신저자 : 김선량, 경희대학교 한의과대학 비계내과학교실  
서울시 동대문구 회기동 1번지  
(Tel. 02-958-9140, Fax. 02-958-9136,  
E-mail : ksr96@unitel.co.kr)

실험동물에 암세포를 투여한 후 항암제에 대해 실험 동물의 수명이 연장됨을 확인하는 수준에 머물러 왔다. 이러한 단편적인 연구는 항암제의 작용기전을 밝히기에는 부족하다고 생각되며, 최근 각광받고 있는 분자생물학적 연구가 한방 항암제 연구 방법을 다양화시키며 심도있게 한다고 본다<sup>4)</sup>.

산자고는 임상에서 항암효과가 인정되는데도 불구하고 국내에서는 산자고에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 과거의 연구로서 <sup>5)</sup>의 산자고가 암세포 감수성에 미치는 영향, <sup>6)</sup>의 산자고가 흰 쥐의 자연살해 세포활성에 미치는 영향에 관한 실험보고가 있었지만 산자고의 항암 효과를 분자생물학적으로는 입증하지 못하였다.

이에 저자는 산자고의 항암효과 여부와 그 분자생물학적 기전을 알아보고자 위암세포에 산자고를 약물 처리한 후, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue(MTT) 반응실험을 시행하여 위암세포 활성도의 변화를 검토하였으며, 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 염색을 하여 apoptotic body를 형성한 세포 수를 측정하여 apoptosis 여부를 검색하였고 apoptosis 관련 유전자의 mRNA 발현 양상을 정량적 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용하여 분석 실험 관찰한 결과를 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1) 재료

#### (1) 약재

본 실험에 사용한 산자고(*Cremastrae appendiculatae tuber*)는 경희대학교 부속한방병원 약제과에서 구입하여 사용하였다.

#### (2) 검액의 조제

증류수 100ml에 산자고 각 5g, 10g, 15g을 가하여 125℃에서 20분간 끓인 후 0.2μm의 syringe filter를 이용하여 여과하였다.

#### (3) 위암세포

본 실험에 사용한 위암세포는 미국 American Type

Culture Collection (ATCC, MD)에서 제공하는 AGS 로 선정하였다.

### 2) 방법

#### (1) 위암세포의 배양

위암세포주 AGS (ATCC, MD)를 10% Fetal bovine serum (Gibco BRL, MD). 1% broad-spectrum antibiotics (Gibco BRL, MD)가 함유된 RPMI-1640 (Gibco BRL, MD)배지를 이용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Precision Scientific Inc., NY)에서 배양하였다. 세포의 회수는 0.1% Trypsin-EDTA (Sigma, MO)를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

#### (2) 검액의 투여

증류수 100ml에 산자고 각 5g(sample A), 10g (sample B), 15g(sample C)을 가하여 125℃에서 20분간 끓인 후 0.2μm의 syringe filter를 이용하여 여과하여 배지 1ml당 약물 20μl를 가하여 약리작용을 관찰하였다.

#### (3) MTT assay

##### ① MTT 용액 제작 및 처리

MTT 5mg/ml을 phosphate buffer saline(PBS)에 녹여 pH 7.5로 조절한 후 0.22μm filter로 여과하여 MTT stock solution을 만들었다. 그리고 10μl MTT를 100 μl의 cell suspension에 추가하였다.

##### ② 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 가한 상태로 37℃에서 3시간 방치하여 보라색 formazan crystals가 형성된 후 absolute isopropanol에 녹아있는 100μl의 0.04M HCl을 넣어 보라색 formazan crystals가 완전히 용해된 후 microplate reader (Molecular device, CA)를 이용하여 570nm의 파장에서 OD (optical density)를 측정하였다.

#### (4) Apoptosis assay

위암세포주에 각 농도별 산자고를 20 μl/ml 씩 가하여 6, 12, 24 시간 뒤에 세포를 회수하여 DAPI 염색을 한 후 형광현미경하에서 apoptotic body가 형성된 세포의 수를 관찰하였다.

#### (5) Apoptosis 연관된 유전자의 발현 (quantitative

RT-PCR)

① RNA 추출

각 약물이 처리된 세포를 회수하여 원심분리한 후, solution D 200  $\mu$ l를 넣고 잘 혼든 후 2M sodium acetate, pH 4.2 20  $\mu$ l, water-saturated phenol 200  $\mu$ l, chloroform- isoamyl alcohol(49:1) 40  $\mu$ l를 넣고 20분간 얼음에 보관하였다. 20분 후 12,000 Xg, 10분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 넣은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 12 시간 보관하였다. 다음날 다시 12,000Xg, 20 분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 200  $\mu$ l의 ethanol을 넣어 얻어진 RNA를 세척하였다. 세척한 RNA를 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

② cDNA 합성

다음의 조성으로 시료를 혼합한 후 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA는 연쇄중합반응의 민감도를 높이기 위하여 1:4로 희석하였다(Table 1).

③ 유전자 연쇄중합반응 (PCR)

cDNA 1  $\mu$ l를 template로 하여 GAPDH primer (sense; 5' -atgtctcagagcaaccgggag-3', antisense; 5' -tttcgactgaagagtgagc-3') 각 10pmoles, 10x PCR amplification buffer 10  $\mu$ l, 1.25mM dNTP 16  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 30  $\mu$ l를 넣어 94 $^{\circ}$ C에서 45초간 denaturation, 58 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 polymerization을 36 cycle 시행하였다. 시료를 2% agarose gel에서 20분간 전기영동한 후 ethidium bromide에 10분간 염색하여 Gel-doc system (Bio-Rad, CA)으로 정량화 하였다. 이 결과를 바탕으로 band의 밝기에 따라 template cDNA의 양을 증감하여 상대적으로 cDNA의 양을 동일하게 조절하였다. 이후 Bcl-2 primer (sense; 5' -actctgctcagtttcgccct-3', antisense; 5' -ttgtgctcagataggcac-3'), Bax primer (sense; 5' -atggacgggtccgggagca-3', antisense; 5' -tgttactgtccagttctgcc-3'), p53 primer (sense; 5' -tccgggtcactgccatggag-3', antisense; 5' -gcctgtggcattctctgggagc-3')를 사용하여 각각 36, 38 cycle의 PCR반응을 시행하여 Gel-doc system (Bio-Rad, CA)으로 정량한 값을 GAPDH에 대한 값으

Table 1. The Composition of cDNA

Reaction Mixture	Volume	Final Concentration
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	4 $\mu$ l	5mM
Reverse Transcriptase Buffer(x5)	4 $\mu$ l	1x
10mM dNTP mixture	2 $\mu$ l	1nm each
RNase inhibitor	0.5 $\mu$ l	1U/ $\mu$ l
AMVReversetranscriptase(8U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l	15U/ $\mu$ g of RNA
Oligo-dT(0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ g/ $\mu$ g of RNA
RNA	1 $\mu$ l	50ng/ $\mu$ l
Water	5.5 $\mu$ l	

로 나누어 각 유전자의 발현 정도를 정량화 하였다.

(6) 통계처리

위의 실험결과들에 대한 유의성 검증은 SPSS 8.0 컴퓨터 프로그램을 이용하여 비모수적 검증법인 Kruskal-Wallis test로 통계처리하였으며 P<0.05인 경우를 유의성 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) MTT 반응실험 결과

산자고의 위암세포 활성화도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조군과 검액을 투여한 실험군 위암세포주에 각 농도별 산자고를 20  $\mu$ l씩 가하여 6, 12, 24 시간 뒤에 세포를 회수하여 MTT 반응실험을 한 결과 optical density가 처음에는 대조군이 0.78 $\pm$ 0.03, sample A가 0.83 $\pm$ 0.05, sample B가 0.72 $\pm$ 0.08, sample C가 0.77 $\pm$ 0.12 였으며, 6 시간 경과 후 대조군이 0.84 $\pm$ 0.04, sample A가 0.72 $\pm$ 0.1, sample B가 0.71 $\pm$ 0.13, sample C가 0.67 $\pm$ 0.11 였으며, 12 시간 경과 후 대조군이 0.89 $\pm$ 0.07, sample A가 0.68 $\pm$ 0.14, sample B가 0.6 $\pm$ 0.17, sample C가 0.61 $\pm$ 0.06 였으며, 24 시간 경과 후 대조군이 0.79 $\pm$ 0.02, sample A가 0.64 $\pm$ 0.09, sample B가 0.51 $\pm$ 0.15, sample C가 0.53 $\pm$ 0.18 로 각 농도별 실험군은 대조군에 비하여 시간이 경과함에 따라 위암세포 활성화도가 억제되었다. 통계학적 유의성(P<0.05)은 없었다(Fig. 1).

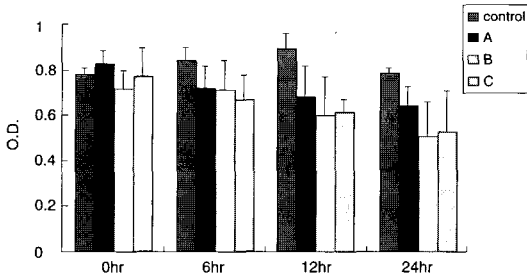


Fig. 1. The effect of *crematrasae appendiculatae tuber* on cancer cells viability in MTT assay.

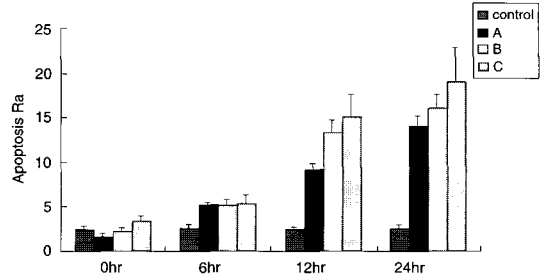


Fig. 2. The effect of *crematrasae appendiculatae tuber* on apoptotic cell death canaer cells in apoptosis assay using DAPI.

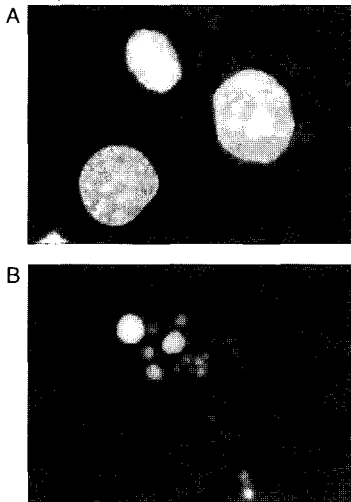


Fig. 3. Apoptotic cell induced by *crematrasae appendiculatae tuber*(A: normal control, B: apoptotic cells).

2) Apoptosis assay 결과

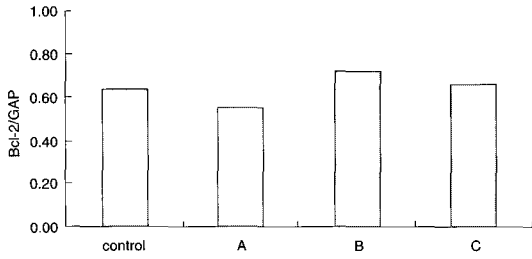
대조군과 검액을 투여한 실험군 위암세포주에 각 농도별 산자고를 20µl씩 加하여 6, 12, 24 시간 뒤에 세포를 회수하여 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 한 후 형광현미경하에서 apoptotic body가 형성된 세포의 수를 관찰한 결과 처음에는 apoptosis rate가 대조군이 2.3±0.4, sample A가 1.6±0.4, sample B가 2.1±0.7, sample C가 3.3±0.6 였으며, 6 시간 경과 후 대조군이 2.5±0.4, sample A가 5.2±0.14, sample B가 5±0.89, sample C가 5.2±1.3 였으며, 12 시간 경과 후 대조군이 2.3±0.3, sample A가 9±0.83, sample B가 13.2±1.4, sample C가 15±2.5 였으며, 24 시간 경과 후 대조군이 2.4±0.5, sample A가

14±1.2, sample B가 16±1.6, sample C가 19±3.8 로 각 실험군에서 시간이 경과함에 따라 농도 의존적으로 apoptosis에 의한 cell death rate 실측치가 증가함을 보였다. 통계학적 유의성 (P<0.05)은 없었다(Fig. 2,3).

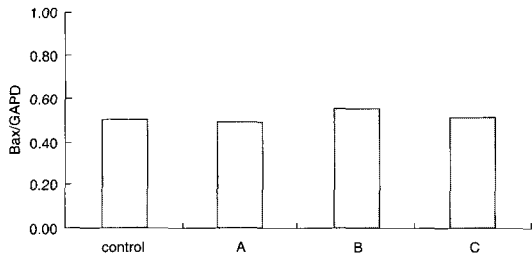
3) apoptosis 와 연관된 유전자의 발현에 미치는 효과  
세포의 유전자 발현에 있어서 대조군과 검액을 투여한 실험군 세포의 유전자 발현양상을 알아보기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다. 세포의 유전자 발현에 있어서 중요한 역할을 하는 RNA를 추출하고 이것을 이용하여 cDNA를 합성하고 primer를 제작하여 PCR 반응을 시행하였고, 만들어진 PCR product를 전기영동을 거쳐 densitometry를 시행하였다. apoptosis와 관련이 있는 bcl-2, bax, p53 등의 발현에는 유의할 만한 수치상의 변화가 없었다(Fig. 4,5, 6,7,8,9).

고 찰

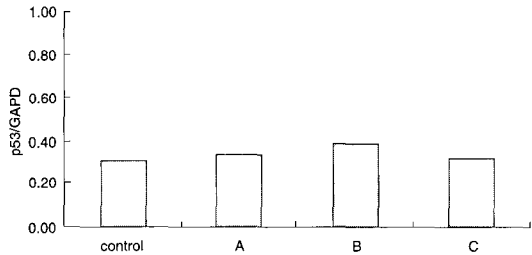
우리나라 사람의 소화기암, 특히 위암의 발생은 유전적 요인, 음식물을 포함한 환경적 요인에 의해 다른 나라 사람과 비교하여 월등히 높은 발생 빈도를 보이고 있으며 사망률에 있어서도 전체 암으로 인한 사망률 중 가장 높은 원인을 차지하고 있다<sup>7,8)</sup>. 위암은 높은 발생빈도 및 사망률에도 불구하고 치료적인 측면에서는 이제까지 연구 및 치료 방법의 개발에



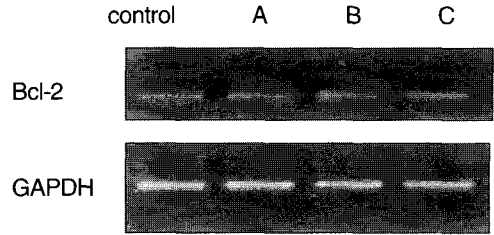
**Fig. 4.** Bcl-2 regulation of *cremastrae appendiculatae tuber* on cancer cells by RT-PCR.



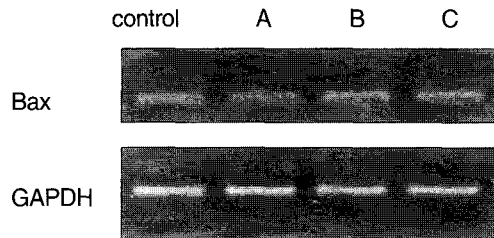
**Fig. 6.** Bax regulation of *cremastrae appendiculatae tuber* on cancer cells by RT-PCR.



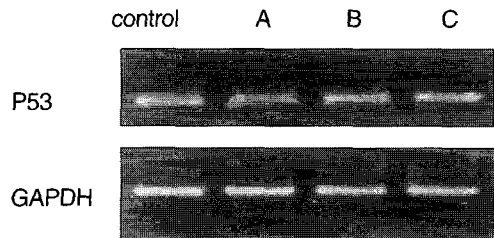
**Fig. 8.** P53 regulation of *cremastrae appendiculatae tuber* on cancer cells by RT-PCR.



**Fig. 5.** Quantitative analysis of bcl-2 expression induced by *cremastrae appendiculatae tuber*.



**Fig. 7.** Quantitative analysis of Bax expression induced by *cremastrae appendiculatae tuber*.



**Fig. 9.** Quantitative analysis of P53 expression induced by *cremastrae appendiculatae tuber*.

많은 노력을 기울여 왔으나 아직까지 만족스러운 결과를 얻지 못하고 있다. 위암에 대한 치료는 크게 수술요법, 내과적인 항암제의 투여 및 방사선 요법 등으로 이루어진다. 수술요법은 전이되기 이전의 초기 단계의 위암에서 높은 치료효과를 볼 수 있다. 방사선 조사와 내과적 항암제 투여는 항암제가 암세포뿐만 아니라 정상적인 세포에도 같은 작용을 함으로서 소화장애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역기능저하, 골수조혈장애, 생식기 장애, 유전인자장애 등의 부작용을 초래하고 있다<sup>6)</sup>. 이러한 부작용을 극복하고자 최근 천연 물질에서부터 항암물질을 추출하려는 연구가 이

루어지고 있다.

한방에서 사용되는 항암제는 이제까지 임상적 경험을 통하여 그 효능 및 치료효과가 어느 정도 인정되고 있으나 약물의 작용기전에 관한 체계적이고 과학적인 근거 자료가 부족한 실정이다. 따라서 실험을 통해 새로운 한방 항암제가 개선 내지 개발될 수 있다는 점에서 이에 대한 과학적인 분석이 필요하다. 그러나 한방 항암제에 대한 기존의 연구는 단편적으로 실험동물에 암세포를 투여한 후 항암제에 대해 실험동물의 수명이 연장됨을 확인하는 수준에 머물러 온 것이 사실이다. 이러한 단편적인 연구는 항암

제의 작용기전을 밝히기에는 부족하다고 생각되며 항암제의 악리 작용에 대한 분자생물학적 연구가 필요하다라고 생각된다<sup>9)</sup>.

산자고는 임상에서 그 효능 및 치료 효과가 인정되는데도 불구하고 국내에서는 산자고에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 산자고의 항암효과에 대한 실험적 연구로는, 吳<sup>3)</sup>의 산자고가 암세포 감수성에 미치는 영향, 梁<sup>6)</sup>의 산자고가 흰 쥐의 자연살해세포활성에 미치는 영향에 관한 실험보고가 있었지만 산자고의 항암효과를 입증하지 못했다. 이에 저자는 분자생물학적 방법을 통하여 산자고의 항암효과를 규명해 보고자 하였다.

산자고는 蘭科(난초과; *Orchidaceae*)에 속한 다년생 초본인 악난초(杜鵑蘭) *cremastrae appendiculatae tuber*의 假鱗莖을 건조한 것으로 5-7月경에 假球莖, 鱗莖을 채취하여 鬚根을 제거하여 그늘에서 말려서 사용하며 기미가 辛·寒有小毒하고 肝·胃 2經에 작용하여 清熱解毒, 消腫散結, 抗癌 하는 清熱藥으로 유선암, 피부암, 백혈병, 호지킨씨병, 자궁경부암, 식도암, 폐암, 위암, 비인두암, 타액선암, 癰疽發背, 疔腫惡瘡, 임파결핵, 급성통풍 등이 적응증이다<sup>9)</sup>.

항암제의 작용기전을 밝히기 위해서는 대상 항암제가 암세포의 증식에 미치는 효과를 먼저 분석하는 것이 필요하다. 암 억제 효과를 분석하기 위해서 암세포를 배양기에 배양하면서 다양한 농도의 항암제를 투여하여 세포의 증식정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 억제효과를 객관적으로 분석하였다.

MTT는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium 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. MTT 반응실험을 시행한 결과 각 농도별 실험군은 대조군에 비하여 시간이 지남에 따라 위암세포 활성도의 실측치 감소를 관찰할 수 있었으나 통계학적 유의성은 없었다.

최근 항암제가 종양세포를 죽이는 방법 중에서

apoptosis를 유도한다는 연구가 활발히 진행되고 있다. 자기 계획 세포사란 계획된 세포의 죽음이라 할 수 있으며 이는 최근 들어 세포의 생리학, 병리학 적 과정에서 매우 중요한 현상으로 받아들여지고 있다. 태아 발생, 기관 형성, 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<sup>10,12)</sup>. 약물이나 독성 물질 등의 외부 자극으로 인해 발생하는 세포의 죽음인 괴사가 일어나 죽는 세포는 부피가 커지면서 결국에는 세포가 터지고 밖으로 분출된 세포질에 의해 염증 반응을 일으키는 반면, apoptosis에서는 세포 내 기관들이 보존된 상태로 염증을 동반하지 않으면서 세포 부피의 축소, 세포막의 돌출, membrane-bound apoptotic body의 형성, 핵염색질의 농축, DNA의 단편화 등이 일어나고, 죽은 세포는 이웃 세포의 대식 작용에 의해 사라지는 특징이 있다<sup>13,14)</sup>.

DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)는 일종의 DNA binding dye로서, 각각의 세포에 대한 DNA content를 측정한다. 산자고로 처리한 위암세포에서의 cell death가 apoptosis에 의한 것임을 알아보고자 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 한 후 형광현미경하에서 apoptotic body가 형성된 세포 수를 측정하였다. 측정 결과 각 실험군에서 시간이 지남에 따라 apoptosis에 의한 cell death rate가 증가함을 보였다. 이는 산자고의 작용에 의해 위암 세포에 apoptosis가 일어난 것임을 확인시켜 주는 것이지만 통계학적 유의성은 없었다.

산자고의 항암효과 여부를 확인하기 위한 일차적 검색방법으로 MTT assay와 Apoptosis assay한 결과 비록 통계학적 유의성은 없을지라도 실측치의 변화가 유의하다고 보아 항암 관련 유전자인 bcl-2, bax, P53의 정량적 mRNA 발현을 조사해보고자 하였다.

본 실험에서는 유전자의 발현을 분석하는데 있어 quantitative RT-PCR 방법을 사용하였다.

Bcl-2는 follicular type의 악성 임파종에서 처음 발견된 유전자이다. 즉 t(14;18)(q32;q21)사이의

translocation으로 인하여 bcl-2가 존재하는 18q21부위가 면역단백질의 heavy chain을 발현시키는 14q32로 translocation되어 그 발현이 증가되어 발견되었다. 이후 이 계열의 단백질이 계속 발견되었으며 현재 bcl-2 계열 단백질은 크게 세포사멸을 유도하는 단백질과 세포사멸을 억제하는 단백질로 구분할 수 있다<sup>15,16</sup>. 이들은 공통적으로 bcl-2 homology region이라 불리는 BH1, BH2, BH3, BH4를 가지고 있으며 이들은 bcl-2 및 이 계열 단백질의 기능에 매우 밀접한 연관성을 가지고 있다. 세포사멸을 유도하는 bcl-2 계열 단백질에는 bax, bid, bak, bad 등이 있으며 세포사멸을 억제하는 bcl-2 계열단백질에는 bcl-2, bcl-XL등이 있다. Bcl-2 단백질의 작용기전은 아직 확실치 밝혀져 있지 않지만 과도하게 발현이 증가될 경우 세포에서 세포사멸을 차단하여 세포가 오래 동안 죽지 않고 생존하게 함으로서 암세포로 이행할 수 있는 기회가 증가되어 결국 종양이 발생하리라고 생각된다. 따라서 bcl-2 유전자의 발현은 종양의 진행과도 밀접한 관계가 있어 이들이 과도하게 발현될 경우 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 현재는 실험실적으로 진행되고 있지만 bcl-2의 발현을 억제함으로써 종양의 치료효과를 극대화시키려는 연구가 매우 활발히 진행되고 있는 바, 이들의 발현에 영향을 미치는 항암제의 개발 및 발굴은 매우 중요한 과제이라 할 수 있다. 반면에 bax 등 세포사멸을 유도하는 bcl-2 계열 단백질은 미토콘드리아의 막전위에 영향을 줌으로써 미토콘드리아에 존재하는 세포사멸을 유도하는 중요한 단백질인 cytochrome c, procaspase 9등을 세포질내로 유리시켜 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다. 이러한 측면에서 볼 때 이들 유전자의 과도한 발현 및 발현 억제는 암세포의 생존과 밀접한 연관이 있으며 항암제가 이들 유전자의 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다<sup>17-19</sup>.

P53은 가장 잘 알려진 종양 억제 유전자로서 염색체 17p13.1에 위치하고 있다. 종양의 50%이상에서 P53의 돌연변이가 보고되고 있으며 특히 폐암, 위암, 대장암, 전립선암 등에서 그 발생 빈도가 높은 것으

로 알려져 있다. P53의 돌연변이로 인한 기능소실이 종양의 발생과 밀접한 연관이 있다는 사실은 P53이 기능상 gatekeeper로서의 역할을 한다는 점과 연관이 있다고 볼 수 있다<sup>20</sup>. P53은 세포의 핵에 위치하며 다른 유전자의 발현을 조절한다. 생리적으로 P53은 20분 정도의 매우 짧은 반감기를 가지고 있으며 따라서 정상세포의 세포주기를 조절하지는 않는다고 볼 수 있다. 그러나 P53은 방사선, ultraviolet light 등의 DNA에 손상을 주는 자극을 받았을 경우 매우 증가되어 여러 가지 유전자의 발현을 통하여 고유한 기능인 세포주기 및 세포사멸을 조절한다. 세포주기의 조절은 cyclin dependent kinase(CDK) 억제 유전자인 P21을 통하여 G1 phase의 후반부에서 조절하며 그밖에도 mdm2, GADD45의 발현을 통하여 이루어진다. P53의 세포사멸 조절은 치료적 측면과 매우 밀접한 관련이 있다. 일반적으로 항암치료에 많이 사용되는 방사선 조사나 항암제는 DNA의 손상을 초래하여 이로 인한 세포사멸을 유도하는 방법이다<sup>21</sup>. 이때 종양세포가 정상적인 P53을 가지고 있는 경우 효과적인 세포사멸이 일어나나, 돌연변이로 인한 비활성화된 P53을 가지고 있는 경우 효율적인 세포사멸이 일어나지 않는다. 따라서 P53의 발현은 종양 치료적 측면에서 매우 중요한 의미를 가지고 있다고 볼 수 있다<sup>22</sup>.

정량적 RT-PCR을 이용하여, 항암 관련 유전자의 정량적 mRNA 발현을 분석한 결과 apoptosis inhibitor인 Bcl-2와 apoptosis promotor인 Bax의 경우 의미있는 수치변화가 관찰되지 않았으며, apoptosis를 유도하면서 종양을 억제하는 P53 유전자의 경우도 별다른 변화가 없었다.

이상의 실험 결과를 종합해보면 산자고는 암세포에 apoptosis를 유발하는 항암작용이 어느 정도 있는 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없었으며, apoptosis 발현 유전자 Bcl-2, Bax, P53에 대한 분자생물학적 연구에서는 수치상의 변화가 없었다. 이상의 성적으로 볼 때, 산자고의 위암세포 증식 억제 효과가 있음을 확인하면서, 임상적 활용 가치가 있는 약물이라고 사려되며 향후에 다른 암세포에 대한 실험이 시도되고 다른 방법에 의해 심도 있는 연구가

필요할 것으로 생각된다. 단, 산자고를 항암제 개발 약물로 연구를 진행함에 있어서, 먼저 산자고의 기원 식물에 대한 본초학적 정리가 선행되어야 한다고 사려된다. 본 실험에서는 한국에서 주로 통용되고 있는 *Cremastrae Appendiculatae Tuber* 일명 藥蘭草를 대상으로 하였다. 중국에서는 산자고를 항암약제로 활용함에 있어서 清熱解毒, 消腫散結의 효능과 함께 '콜히친'이란 항암성분을 중시한다. '콜히친'은 유사분열중기에 방추체 형성을 저지해 염색체가 양극으로 이동하는 것을 방해함으로써 세포 증식을 억제한다<sup>23-26</sup>. 따라서 중국에서는 산자고의 기원식물 중 콜히친 함량이 가장 높은 *lphigenia indica*(麗江山慈菇)를 주로 활용한다. 또 콜히친 성분만을 따로 추출해서 임상에서 응용하기도 한다<sup>27</sup>. 이에 저자는 산자고의 기원식물을 본초학적으로 정리하고, 각 기원식물별로 실험적 연구로 항암효과 순위를 매긴 후 그 중 가장 항암효과가 높은 기원 식물이 임상에서 산자고로 활용될 수 있도록 유통 환경이 개선되어야 한다고 본다. 또한 생체에서의 항암작용 및 정상세포에 미치는 영향과 산자고가 유도하는 apoptosis 기전을 밝히기 위한 보완 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 결 론

산자고의 항암 효과 여부와 그 분자생물학적 기전을 알아보고자, 위암 세포에 산자고를 약물처리한 후, MTT 반응 실험을 시행하여 위암세포 활성도의 변화를 검토하였고, DAPI 염색을 하여 apoptotic body를 형성한 세포 수를 측정하여 apoptosis 여부를 검색하였으며, 그리고 apoptosis 관련 유전자의 mRNA 발현양상을 정량적 RT-PCR을 이용하여 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT 반응 실험을 시행한 결과 각 실험군은 대조군에 비하여 시간이 경과함에 따라 위암세포 활성도가 억제되었으나 통계학적 유의성은 없었다.

2. DAPI 염색으로 apoptotic body를 형성한 세포 수를 측정하여 apoptosis 여부를 검색한 결과 각 실험군에서 시간이 경과함에 따라 농도 의존적으로 apop-

to시스에 의한 cell death rate 실측치가 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다.

3. Apoptosis 관련 유전자의 정량적 mRNA 발현을 분석한 결과 apoptosis inhibitor인 Bcl-2와 apoptosis promotor인 Bax의 경우 의미있는 수치변화가 관찰되지 않았으며, apoptosis를 유도하면서 종양을 억제하는 p53 유전자의 경우도 유의한 변화가 없었다.

## 참고문헌

1. 김원동 編著. '99 內科學의 最新知見. 서울:韓國醫學. 1999:213-214.
2. 서울大學敎 醫科大學 編. 腫瘍學. 서울:大學校出版部. 1992:138,151-153.
3. 김성훈, 김동희. 數種瘀血藥物의 配合에 의한 抗癌 및 癌轉移 效果에 대한 研究. 97國際瘀血심포지움 論文集. 1997:105-134.
4. 김진성, 이지향, 류봉하, 박재훈, 지성길, 유진화. 數種 韓藥劑의 胃癌細胞에 대한 抗癌作用 效能檢索 및 藥理 作用에 관한 分子生物學的 研究. 大韓腫瘍學會誌. 1999;5(1):48.
5. 吳千植. 靈芝, 山慈菇, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響. 慶熙大學校 碩士學位論文. 1987.
6. 梁緒賢. 靈芝, 山慈菇, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 흰 쥐의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響. 慶熙大學校 碩士學位論文. 1987.
7. 대한민국 보건복지부. 한국인 암 등록 자료조사 분석보고서(1982.7.1-1987.6.30). 암학회지. 1987;19:2.
8. 박조현, 김동구, 정상설, 유승진, 이명덕, 김세경, 김진, 고용복, 김인철. 最近 10年間 經驗한 胃腺癌이 臨床分析 및 追跡調査 成績. 外科學會誌. 1992;42:787.
9. 全國韓醫科大學 本草學敎授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1991:228-229.
10. Levine AJ. The p53 tumor suppressor gene and product. Cancer Survveys. 1992;12:59-79.
11. 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. 1992;6:1143-1152.
12. Zelik H, Mousses S, Andrusil IL. Low levels of expression of an inhibitor of cyclin-dependent kinases



- (CIP1/WAF1) in primary breast carcinomas with p53 mutations. *Clin. Cancer Res.* 1995;1:907-912.
13. Jacobson M. P., Weil M. and Raff M.C. programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997;88:347-354.
  14. Wyllie A. H. Apoptosis. *Br. J. Cancer.* 1994;67:205-208.
  15. Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R. Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer.* 1999;6:61-68.
  16. Tsujimoto Y, Shimizu S. FEBS Bcl-2 family: life-or-death switch. *Lett.* 2000;466:6-10.
  17. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM, Andreeff M. Apoptosis: Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 1999;457:217-236.
  18. Park CK, Manning JT Jr, Battifora H, Medeiros LJ. Follicle center lymphoma and Warthin tumor involving the same anatomic site. Report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 2000;113:113-119.
  19. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* 1998;5:372-380.
  20. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.* 1999;18:6145-6157.
  21. Roth JA, Swisher SG, Meyn RE. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Oncology*(1999 10 Suppl). 1999;5:148-154.
  22. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 1999;77:81-137.
  23. 孟琳升等 編著. 中醫治癌大成. 北京:北京科學技術出版社. 1997:235-236.
  24. 李家庚, 屈松柏 主編. 中醫腫瘤防治大全. 北京:科學技術文獻出版社. 1994:595-596.
  25. 李宇彬 主編. 抗癌中藥藥理與應用. 하얼빈시:黑龍江科學技術出版社. 1999:158-162.
  26. 張民慶, 龔惠明 主編. 抗腫瘤中藥臨床應用. 北京:人民衛生出版社. 1998:13-15.
  27. 常敏毅. 抗癌本草. 杭州:湖南科學技術出版社. 1986:35-36.