

黃藥子の 胃癌細胞에 對한 抗癌 效能 檢索

김성희, 류봉하, 류기원, 윤상협, 김진성

경희의료원 부속한방병원 3내과

An Anti-Tumor Effects of *Dioscorea bulbifera* L. on Stomach Cancer Cells

Sung-Hee Kim, Bong-Ha Ryu, Ki-Won Ryu, Sang-Hyub Yoon, Jin-Seong Kim

Dept. of 3rd Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Background : Nowadays a lot of research is based on natural substances or materials world wide since many kinds of side effects are accompanied by anti tumor chemotherapy. In Chinese medicine, *Dioscorea bulbifera* L is widely used to treat many kinds of cancer, but in Korea it is rarely used. Therefore, we need to scientifically identify anti tumor effects of *Dioscorea bulbifera* L.

Objective : We aimed to identify anti tumor effects of *Dioscorea bulbifera* L on the stomach cancer cells through molecular biological methods.

Materials & Methods : We used AGS, a stomach cancer cell from American Type Culture Collection. We injected the boiled extract of *Dioscorea bulbifera* L 5 ul(sample 1), 10ul(sample 2) to cultured media(ml) for 0,6,12,18,24 hours. We measured the killing effect on stomach cancer cells through Tryphan blue exclusion test and suppressive effect on viability of stomach cancer cells via MTT assay.

Results : Tryphan blue exclusion test showed that each test group killed more stomach cancer cells than the controlled group with a dosage-dependent, but not significantly. MTT assay showed that each test group had a more suppressive effect on viability of stomach cancer cells than the controlled group without a dosage-independent, but not significantly.

The cell cycle analysis via flow cytometry showed that the test group extended cell cycle, and there was no peak in M phase, the number of subG1, G0, G1 phase cells increased a little, but not significantly.

Conclusion : This experiment showed that *Dioscorea bulbifera* L. has an anti-tumor effect, but not significantly. This is in vitro experiment and basic experiment on *Dioscorea bulbifera* L. We hope more progressive researches on *Dioscorea bulbifera* L. will be conducted and its anti tumor will be more accurately identified.

Key Words : *Dioscorea bulbifera* L., Stomach Cancer Cells

1. 緒 論

胃癌의 발생빈도는 세계적으로 감소하고 있지만 우리나라의 경우 남자에서는 1위, 여자에서는 2위를 차지할 정도로 흔한 癌이며, 여전히 癌에 의한 사망률 제 1위를 차지하고 있다.

현재 사용하고 있는 抗癌劑들은 생체에 대한 毒性이 심하여 정상적인 세포의 대사를 크게 억제하거나 세포의 돌

연변이 및 癌化를 조장할 수 있기 때문에 抗癌劑의 사용에 커다란 장애로 지적되고 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 선진국들은 부작용이 적은 새로운 抗癌劑의 개발에 중점을 두고 있으며, 특히 천연물로부터 유용한 抗癌劑를 탐색하려는 노력을 시도하고 있다.

黃藥子是 薯蕷科 植物인 黃獨(*Dioscorea bulbifera* L.)의 塊莖으로 中國에서는 주로 癌症, 甲狀腺腫, 咳喘 등에 多

用⁵⁻¹⁵되고 있으나 韓國에서는 거의 사용되지 않고 있는 藥材로 性味는 苦寒 有小毒하고 肺, 肝經에 歸經^{6-8,11}하며 消痰軟堅, 散結消癭, 清熱解毒, 涼血止血的 作用이 있어 癭瘤結腫, 瘡瘍腫毒, 咽喉腫痛, 毒蛇咬傷, 各種腫瘤를 治療하며, 性寒하므로 血熱로 인한 各種 出血 즉 吐血, 衄血, 咯血 等症에 응용된다.

그러나 黃藥子를 抗癌劑로서 개발하기 위해서는 黃藥子의 抗癌效果가 과학적으로 규명되어야함에도 불구하고 이에 대해서는 全無하다. 따라서 黃藥子의 抗癌效能을 확인하기 위해서는 분자생물학적 항암효능 檢索이 필수적이라 할

수 있다.

이에 저자는 黃藥子が胃癌세포에 미치는 영향을 알아보고자 胃癌細胞柱(AGS)에 黃藥子を 약물 처리한 후 Tryphan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷效果를 측정하였고 MTT assay를 시행하여 胃癌細胞의 증식억제 효과를 측정하였으며 또한 flow cytometry를 이용하여 胃癌細胞의 細胞週期에 대한 자극을 관찰하였던 바 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

(1) 藥材

본 實驗에 사용한 黃藥子(Dioscorea bulbifera L.)는 中國産으로 서울 경동 약령시장에서 구입하여 사용하였다. 試藥은 Sigma. MO에 製品을 신청하여 사용하였다.

(2) 檢液의 調劑

黃藥子 5g을 蒸溜水 100ml에 넣어 15분간 121℃에서 끓인 후 上層液을 취하여 0.2 μ m크기의 syringe filter를 이용하여 여과하였다. 實驗에 사용될 때까지 檢液은 4℃에 냉장 보관하였다.

(3) 胃癌細胞

본 實驗에 사용한 胃癌細胞는 美國 American Type Culture Collection (ATCC, MD)에서 제공하는 AGS로 선정하였다.

2. 方法

(1) 胃癌細胞의 培養

胃癌細胞柱 AGS(ATCC, MD)를 10% Fetal bovine serum(Life technology. CA), 1% broad-spectrum

antibiotics(Life technology. CA)가 함유된 RPMI-1640(Life technology. CA)培地를 이용하여 37℃, 5% CO₂ incubator(NAPCO, precision scientific Inc.)에서 배양하였다. 細胞의 回收는 0.1% Trypsin-EDTA를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

(2) 藥物處理

黃藥子(Dioscorea bulbifera L.) 5g을 蒸溜水 100ml에 넣어 15분간 121℃에서 끓인 후 上層液을 취하여 0.2 μ m크기의 syringe filter로 濾過한 후 培地 ml당 5 μ l(이하 Sample I), 10 μ l(이하 Sample II)의 藥物을 각각 0, 6, 12, 18, 24시간동안 투여하였다.

(3) 胃癌細胞 殺傷效果 測定(Tryphan blue exclusion test)

Tryphan blue exclusion test는 약물을 처리한 細胞液, HBSS(Hanker's balanced salt solution), 0.4% Tryphan blue를 각각 0.2ml, 0.3ml, 0.2ml의 比率로 섞은 후 푸르게 염색된 細胞의 비율을 Inverted microscope 下에서 측정하였다.

(4) 胃癌細胞 增殖抑制效果 測定(MTT assay)

胃癌細胞 增殖抑制效果를 檢證하기 위하여 MTT assay를 시행하였다.

본 實驗은 3회에 걸쳐 施行되었다.

① MTT 溶液製作 및 處理

MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) 5mg/ml을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 조절한 후 0.22 μ m filter로 여과하여 MTT stock solution을 만들었다. 그리고 10 μ l MTT를 100 μ l의 cell suspension에

추가하였다.

② 酵素反應과 免疫螢光測定

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 방치하여 보라색 formazan crystals가 形成된 후 absolute isopropanol에 녹아있는 100 μ l 0.04M HCl을 넣어 보라색formazan crystals가 완전히 용해된 후 ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay) reader(E-max, Molecular device, USA)를 이용하여 570nm의 파장에서 O.D.(optical density)를 측정하였다.

(5) 胃癌細胞 分裂週期에 미치는 영향 측정(Cell cycle analysis)

黃藥子煎湯液 10 μ l/ml를 투여한 實驗群과 對照群의 세포를 회수한 후 70% ethanol에 1시간 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 0.5ml의 PBS에 resuspension하여 RNase 50 μ g/ml를 넣은 후 가볍게 혼합하였다. 여기에 100 μ g/ml Propidium Iodide(PI)를 넣은 후 室溫에서 15분간 반응시킨 후 flow cytometry (FACS caliver, BD califomia, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. 統計處理

위의 實驗結果들에 대한 有意性 檢證은 SPSS 8.0 컴퓨터 프로그램을 이용하여 비모수적 檢證법인 Kruskal-Wallis test로 통계처리하였으며 p<0.05인 경우를 有意性 있는 것으로 간주하였다.

III. 成績

1. 胃癌細胞 殺傷效果(Tryphan blue exclusion test)

Tryphan blue exclusion test는 약물

을 처리한 세포액, HBSS(Hanker's balanced salt solution), 0.4% trypan blue를 각각 0.2ml, 0.3ml, 0.2ml의 比率로 섞은 후 푸르게 염색된 세포의 비율을 Inverted microscope下에서 측정하였다. 胃癌細胞는 약 500개정도 사용되었으며 對照群과 實驗群에서 dead cells의 개수를 %로 換算하여 나타내었다.

실험결과 Sample I에서는 0시간, 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간의 dead cells의 비율이 각각 1%, 3%, 8.8%, 15.4% 및 18%로 시간이 경과함에 따라 殺傷效果가 높아지는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

Sample II에서는 0시간, 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간의 dead cells의 비율이 각각 2%, 9.2%, 16.7%, 20% 및 24.6%로 시간이 경과함에 따라 殺傷效果가 높아지는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

또한 Sample I 과 Sample II 를 비교해 볼 때 黃藥子의 용량이 많아짐에 따라 癌細胞의 殺傷效果가 높아지는 것으로 나타났다(Table I, Fig. 1, Fig. 2).

2. 胃癌細胞 增殖抑制效果(MTT assay)

檢液이 癌細胞의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 人體 胃癌細胞柱(AGS)를 이용하여 MTT assay를 시행한 결과 Optical Density(O.D.)는 對照群과 비교하여 sample I에서는 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간에 각각 31.0%, 41.7%, 41.9% 및 27.3%의 抑制效果를 나타내었고 sample II에서는 對照群에 비해 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간에 각각 20.7%, 25.0%, 51.6% 및 40.9%의 억제효과를 나타내었다.

Sample I에서는 6시간, 12시간까지

는 O.D.가 0.2, 0.14로 시간경과에 비례적으로 증식이 억제되다가 18시간에는 0.18로 다소 높아졌으며 24시간에는 0.16으로 다시 增殖力이 낮아지는 것으로 나타났다.

Table 1. Trypan Blue Exclusion Analysis on Dead Cells of Stomach Cancer Cells Induced by Sample I and Sample II.

Group	Dead Cells(%)				
	0hrs	6hrs	12hrs	18hrs	24hrs
Control	2±1 ^a	3±1	2±1	1±1	2±1
Sample I	1±1	3±1	8.8±3	15.4±6	18±5
Sample II	2±1	9.2±2	16.7±4	20±5	24.6±6

a: Mean ± S.D.
 Control: Stomach Cancer Cells Not Treated.
 Sample I : Stomach Cancer Cells Treated with Dioscorea bulbifera L. 5µl/ml.
 Sample II : Stomach Cancer Cells Treated with Dioscorea bulbifera L. 10µl/ml.

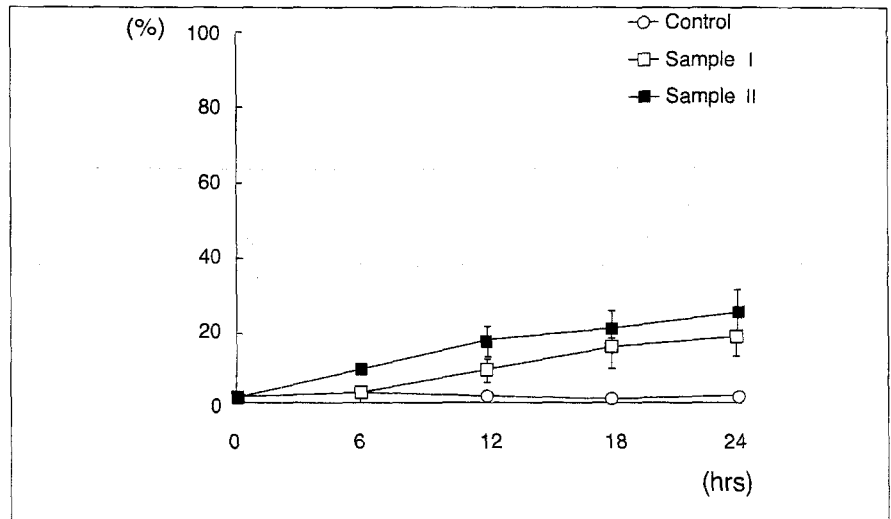


Fig. 1. Trypan Blue Exclusion Analysis on Dead Cells of Stomach Cancer Cells Induced by Dioscorea bulbifera L.

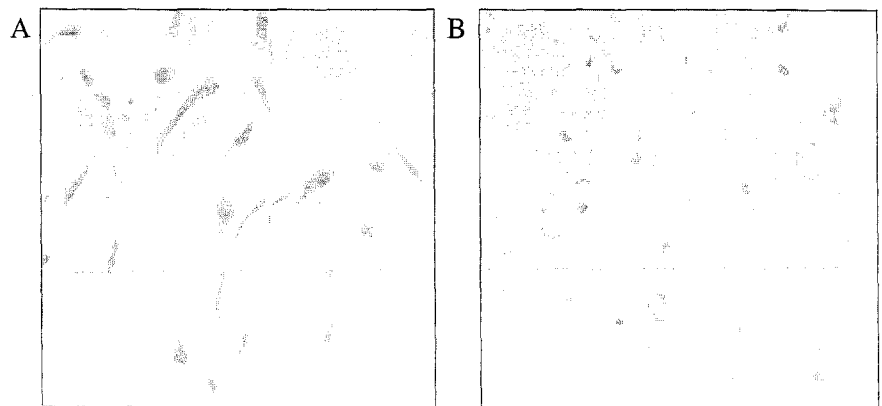


Fig. 2. Apoptotic Cell Induced by Dioscorea bulbifera L. 10µl/ml for 12 hrs.
 A: Normal Control.
 B: Apoptotic Cells.

로 나타났.

시간 및 24시간까지의 O.D.가 0.23,

Sample II 에서는 6시간, 12시간, 18 0.18, 0.15 및 0.13으로 시간이 경과할

Table 2. Effects of Sample I and Sample II on the Cellular Viability of Stomach Cancer Cells.

Group	O.D.(Optical Density)				
	0hrs	6hrs	12hrs	18hrs	24hrs
Control	0.25±0.05 ^a	0.29±0.04	0.24±0.07	0.31±0.05	0.22±0.06
Sample I	0.22±0.03	0.2±0.03	0.14±0.04	0.18±0.02	0.16±0.03
Sample II	0.25±0.05	0.23±0.04	0.18±0.02	0.15±0.01	0.13±0.03

a: Mean ± S.D.

Control: Stomach Cancer Cells Not Treated.

Sample I : Stomach Cancer Cells Treated with Dioscorea bulbifera L. 5 µl/ml.

Sample II : Stomach Cancer Cells Treated with Dioscorea bulbifera L. 10 µl/ml.

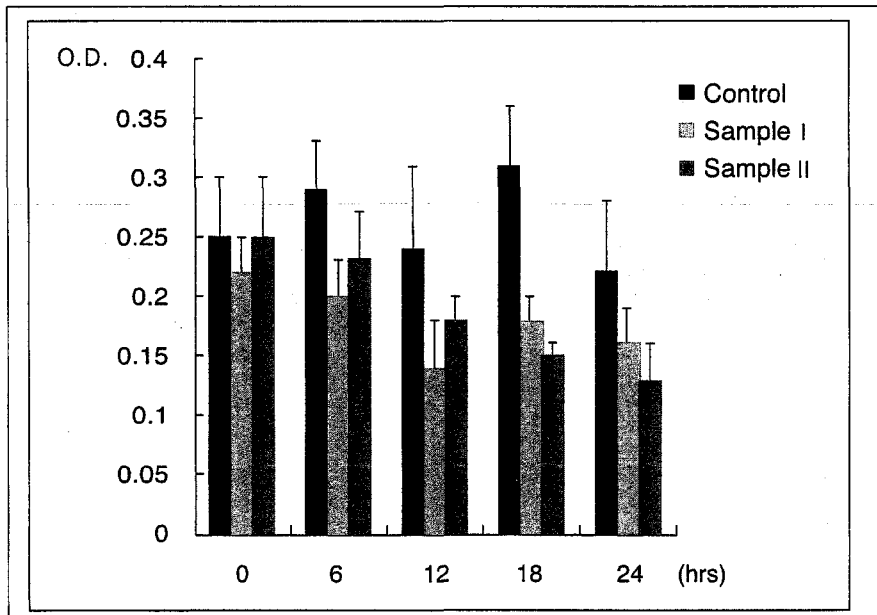


Fig. 3. Effects of Dioscorea bulbifera L. on the Cellular Viability of Stomach Cancer Cells

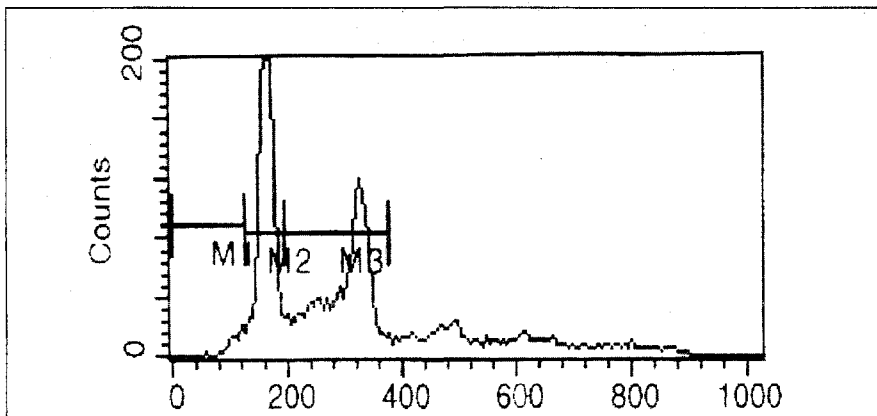


Fig. 4. Cell Cycle Analysis of AGS with Not Treated.

수록 癌細胞에 對한 增殖抑制效果가 높아지는 것으로 나타났으나 통계학적으로 유의하지 않았다. 또한 黃藥子 煎湯液의 用量多少와 增殖抑制效果는 比例하지 않았다.

이 결과로 보아 黃藥子是 胃癌細胞에 對한 增殖抑制效果는 있으나 통계학적으로 유의한 수준은 아닌 것으로 사료된다(Table II, Fig. 3).

3. 胃癌細胞 分裂週期에 미치는 영향(Cell cycle analysis)

Fig. 4는 胃癌細胞柱인 AGS의 세포 주기를 分析하여 도표화한 것이다. 도표에서는 M期의 peak가 명확히 나타나며 分裂期인 S/M期의 세포가 많고 subG1, G0, G1期의 細胞의 數值가 작은 것을 알 수 있다.

Fig. 5는 黃藥子 煎湯液 10 µl/ml로 胃癌細胞柱 AGS를 藥물처리한 후 세포의 세포주기를 分析한 결과이다. 이 도표는 對照群과 비교했을때 分裂期인 M期의 peak가 없으며 休止期인 subG1, G0, G1期의 세포가 늘어나 세포주기가 길어진 것을 보여준다. 그러나 파괴된 세포의 형태로 보아 黃藥子煎湯液으로 인해 胃癌細胞가 Apoptosis에 빠진 것이라기보다는 Necrosis에 의한

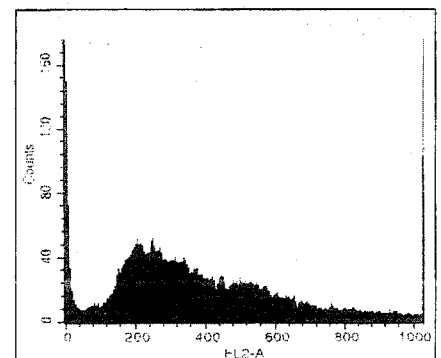


Fig. 5. Cell Cycle Analysis of AGS Treated by Dioscorea bulbifera L. 10 µl/ml

細胞破壞인 것으로 보인다.

따라서 胃癌細胞에 대하여 黃藥子가 그 細胞週期的 pattern을 변화시킨 것을 알 수 있으며 이는 黃藥子の 항암작용을暗示하는 것이지만 통계학적으로 유의하지는 않았다.

IV. 考 察

최근 韓藥을 이용한 종양치료 연구는 東西醫結合治療法을 이용하여 韓藥에 化學療法, 放射線療法 및 수술을 結合하거나 西醫療法の 毒副作用 치료, 種양합병증 치료 등에 韓藥이 미치는 영향을 연구하는 추세에 있다.

방사선요법과 화학요법에 병용할 수 있는 약물은 방사선요법, 화학요법 때에 나타나는 高熱과 각종 염증성 반응에 淸熱解毒藥을, 방사선요법 중 口燥咽乾, 舌絳 등의 熱毒傷陰, 津液受損에 生津潤燥藥을, 방사선요법 후 氣血虧虛, 熱毒過盛에 淸補氣血藥을, 放射線療法과 화학요법 중 氣血雙虧에 溫補氣血藥을, 화학요법 중 消化器 障礙에 健脾和胃藥을 全身衰弱, 精神不振, 心悸氣短, 백혈구 및 혈소판 감소에 滋補肝腎藥 등 각각 일정한 효과가 있는 藥物을 선택하여 사용할 수 있다³.

黃藥子是 薯蕷科 植物인 黃獨(Dioscorea bulbifera L.)의 塊莖으로 中國에서는 주로 癌症, 甲狀腺腫, 咳嗽등에 多用⁵⁻¹⁵되었으나 韓國에서는 거의 사용되지 않고 있는 藥材로 性味는 苦寒 有小毒하고 肺, 肝經에 歸經한다^{6-8,11}.

黃藥子是 saponins, dioscorecin, dioscoretoxin, tanin과 쓴 맛을 내는 diosbulbin A, B, C, iodine을 含有하고 있어 藥理的으로 요오드 缺乏性 甲狀腺腫과 各種 癌에 效果가 있는 것으로 알려져 있다^{5,7-9,11,12}.

黃藥子の 毒性問題에 있어 <開寶本草>에서는 “苦, 平, 無毒”이라 하였고 <南本草>에서는 “性大寒, 味苦”^{6,8}라하여 그 毒性問題는 언급하지 않았으며 全國 規劃教材第6版 <中藥學>에서는 “苦, 平, 有毒”이라 하였는데 오늘날 中醫學者들은 黃藥子の 性味를 苦寒 有小毒하며 肺, 肝經에 歸經한다고 인정하고 있다⁸. 黃藥子是 그 毒性으로 인해 久服하거나 過量 服用시 吐瀉腹痛 등의 消化器 反應과 함께 肝腎細胞에 毒性作用을 하여 肝腎機能을 損傷시키는 것으로 알려져 있다^{5,6,8,14}. 따라서 肝腎機能에 異常이 있거나 脾胃機能이 虛弱한 患者에게는 禁하는 것이 좋으며 劑量을 신중히 하여 煎湯 分量을 10g 以內로 하는 것이 安全하다^{5,7}.

黃藥子是 消痰軟堅, 散結消癭, 淸熱解毒, 涼血止血의 作用이 있어 癭瘤結腫, 瘡瘍腫毒, 咽喉腫痛, 毒蛇咬傷, 各種 腫瘤를 治療하며, 性寒하므로 血熱로 인한 各種 出血 즉 吐血, 衄血, 咯血 등症에 應用된다. 이외에도 止咳平喘의 效能을 兼하고 있어 急慢性氣管支炎, 氣管支哮喘, 百日咳 등 咳嗽氣喘의 治療方劑로 應用되고 있으며 單方 또는 復方으로 食道癌, 胃癌, 肝癌, 直腸癌 및 甲狀腺腫瘍 등에 일정한 효과가 있다고 알려져 있다^{5-8,10,11}. 中國에서는 各種 腫瘍의 治療에 黃獨單·復方, 黃獨注射液, 復方黃獨注射液, 黃獨藥酒, 復方黃獨片, 復方黃獨丸 등의 製劑로 만들어 응용하고 있다³.

본 實驗에서 黃藥子が 胃癌細胞에 미치는 殺傷效果를 Trypan blue exclusion test를 통하여 살펴본 結果, 黃藥子煎湯液 5μl/ml에서는 0시간, 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간의 dead cells의 比率이 1%, 3%, 8.8%, 15.4% 및 18%로 나타나 시간이 경과함에 따라

殺傷效果가 높아지는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 또한 黃藥子煎湯液 10μl/ml에서는 0시간, 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간의 dead cells의 比率이 2%, 9.2%, 16.7%, 20% 및 24.6%로 시간이 經過함에 따라 殺傷效果가 높아지는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없는 것으로 나타났다.

그러나 胃癌細胞에 대하여 黃藥子の 用量이 많아짐에 따라 癌細胞의 殺傷效果가 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

抗癌劑의 作用機轉을 밝히기 위해서는 對象 抗癌劑가 癌細胞의 增殖에 미치는 效果를 먼저 분석하는 것이 필요하다. 癌細胞 增殖抑制效果를 분석하기 위해서 癌細胞를 培養器에서 배양하면서 다양한 濃度의 抗癌劑를 投與하여 細胞의 增殖정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 억제效果를 객관적으로 분석하였다. MTT assay는 生存 腫瘍細胞의 酵素 作用에 의해 MTT試藥이 환원되어 생기는 formazan 용액의 不安定性으로 인한 단점은 있으나, 실험조작의 자동화가 가능하고 실험결과와 재현성과 객관성도 우수하여 大量檢索이나 初期檢索段階에 적합하다.

본 實驗에서 사용한 MTT assay는 cell의 viability를 測定하는 方法으로 1983년 Mosmann에 의해 처음 試圖¹³되었으며, 1986년 Cole과 1988년 Alley등에 의해 사용되기 시작하여 최근 널리 普及되었다⁴. MTT assay는 細胞內 mitochondria의 tricarboxylic acid cycle에 關與하는 酵素인 succinate dehydrogenase에 의해 黃色의 MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 보라색의 formazan으로 變하는 정도를 比色 定量함으로써 抗癌劑의 感受性을 評價하는 方法이다. 따라서 細胞의

viability에 따라 MTT-formazan의 양이 달라지며 이를 적절한 용매에 작용시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 細胞의 생존능력을 측정한다^{23,35}.

본 實驗의 結果 Optical Density(O.D.)는 對照群과 比較하여 黃藥子煎湯液 5 μ l/ml에서는 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간에 각각 31.0%, 41.7%, 41.9% 및 27.3%의 抑制效果를 나타내었고 黃藥子煎湯液 10 μ l/ml에서는 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간에 각각 20.7%, 25.0%, 51.6% 및 40.9%의 抑制效果를 나타내었다.

黃藥子煎湯液 5 μ l/ml에서는 6시간, 12시간까지는 O.D.가 0.2, 0.14로 比例적으로 增殖이 억제되다가 18시간에는 0.18로 다소 높아졌으며 24시간에는 0.16으로 다시 增殖力이 낮아지는 것으로 나타났다.

黃藥子煎湯液 10 μ l/ml에서는 6시간, 12시간, 18시간 및 24시간까지의 O.D.가 0.23, 0.18, 0.15 및 0.13으로 시간이 경과할수록 癌細胞에 대한 增殖抑制效果가 높아지는 것으로 나타났으나 통계학적으로 유의하지 않았다.

또한 黃藥子煎湯液의 用量多少와 增殖抑制效果는 比例하지 않았다.

이 結果로 보아 黃藥子は 胃癌細胞에 대한 增殖抑制效果는 있으나 통계학적으로 유의한 수준은 아닌 것으로 사료된다.

細胞의 成長 및 分化의 調節은 細胞가 正常的으로 자라는데 필요로 하는 構造로서, 이 과정에 어떤 原因으로 균형이 깨어지게 되면 正常細胞에서 非正常的인 細胞로 되며 無節制한 細胞의 成長은 癌細胞로 發展하는 계기가 된다. 細胞의 成長은 細胞週期에 따라 이루어지며 細胞週期の 進行은 外部의 또는 内部의인 signal의 전달을 이어받아 順

次的으로 進行된다³⁵.

壽命이 짧은 細胞로 構成된 組織, 즉 消化器上皮, 皮膚上皮, 好中球 등으로 構成된 組織의 正常的인 維持를 위해서, 그리고 損傷된 組織의 再生을 위해서는 強하면서도 調節된 細胞의 增殖이 필요하다. 연속적으로 分裂하는 體細胞가 細胞分裂를 시작해서 다음 分裂를 시작할 때까지의 期間을 細胞週期(Cell cycle)라 한다^{36,37}. 細胞週期에 필요한 시간은 生物의 種類에 따라 다르고 환경에 의해 달라지나, 보통 동물세포에서는 18-24시간, 식물세포에서는 10-30시간을 要한다³⁶.

細胞週期는 한 細胞가 성장하여 두 細胞로 분열되는 過程으로 G1期, S期, G2期 및 M期の 4段階로 편의상 나누고 있다. 이들 4段階는 細胞週期の 核部位에서 일어나는 變化를 기준으로 나누어진 것으로 G1期는 첫번째 休止期로 細胞가 分열된 직후 다음의 成長過程을 시작하기 이전에 필요한 細胞內 因子를 具備하고 적절한 크기의 細胞가 되도록 준비하는 기간으로써 이때 다음 過程인 S期로 가기위한 充分한 細胞內 因子들이 만들어지지 않으면 다음 期로 가지 못하게 調節하는 첫번째 check point가 있다. 이 check point를 G1 check point라고 하며 이곳에서는 다음 細胞週期가 시작될 수 있는지 與否를 調査하며 만약 細胞가 준비가 되어 있지 못하면 cell cycle의 進行을 遮斷하여 細胞가 G1期에서 arrest되도록 조절한다. 일단 G1 check point에서 細胞가 成長過程으로 갈 수 있는 조건이 이루어졌다고 판단되면 細胞는 S期로 넘어간다. S期에서는 核에 있는 遺傳情報를 가진 DNA의 複製(replication)가 이루어지는 시기로서 한 염색체에서 두 copy의 염색체가 되는 시기이다. 일단 S期에서

DNA가 複製되어 두 copy가 되면 다음에는 두 細胞로 分裂되기 위해 核 이외에 細胞質 內의 여러 인자들이 複製되어야 한다. S期가 끝나면서 細胞는 제 2休止期인 G2期로 넘어가는데 이때 필요로 하는 細胞質의 인자들이 생산되면서 한 細胞가 두 細胞로 分열되는데 필요한 인자들이 모두 만들어지는 시기이다. G2期에서 M期로 넘어가는 시점에 G2 check point가 있는데 이곳에서는 실제로 細胞의 分열이 일어날 수 있는지 여부를 검토한다. 만약 細胞分裂이 일어날 준비가 안되어 있으면 細胞週期는 G2期에서 멈추게 된다. 일단 G2期에서 한 細胞가 두 細胞로 될 수 있는 모든 준비가 되어지면 細胞週期는 M期로 넘어간다. M期에서는 細胞質의 分열(cytokinesis)이 일어나며 細胞壁이 생기면서 한 細胞가 두 細胞로 실제로 나뉘어지는 시기인 것이다³⁵.

일단 한 細胞週期가 끝나면 한 細胞는 계속 細胞週期를 돌고 다른 한 細胞는 高유의 細胞로 分化한다. 특정한 細胞 즉 幹細胞는 안정세포이므로 한 細胞週期가 끝나면 G0期로 들어가고 特定한 刺戟이 올 때까지는 高유의 기능을 행한다. 적당한 자극이 주어지면 細胞는 G1期로 들어가서 細胞의 周기를 돌게 되며 증식을 하게 된다. 永久細胞는 最終적으로 分化되어 있어 細胞週기로 다시 돌아가지 못한다³⁷.

磁氣 放射線 研究로 S期에서 DNA 複製를 볼 수 있었고 S期の 길이에 대한 情報가 提供되었다. 有絲分裂는 현미경으로 볼 수 있기 때문에 4期の 각각의 시간을 측정할 수 있다. S期和 M期는 직접 測定되고 G1期는 M期和 S期 사이, 그리고 G2期는 S期和 M期 사이의 經過시간을 計算함으로써 測定할 수 있다³⁸.

동물에서는 평균적으로 하루에 한 번 세포분열이 일어난다고 볼 수 있으며 그래서 세포週기를 24시간이라고 할 때 G1期和 S期가 각각 약 9시간, G2期가 약 4시간, 分裂期인 M期가 약 2시간정도 걸린다. S期和 M期の 길이는 비교적 일정하므로 세포週기에 소요되는 시간은 대개는 G1期에 따라 決定된다. 분열이 빨리 이루어지고 있는 세포에서는 G1期가 거의 없고, 骨格筋細胞나 神經細胞 또는 白血球는 大部分이 G1期에서 평생을 보내지만 사람의 心筋細胞는 G2期에서 停止되어 있다. 細胞가 어느 시기에 머물러 있는가 하는 것은 分裂을 中止한 核의 DNA含量을 分析하면 알 수 있다. 즉, 核의 DNA量이 2倍體와 같으면 G1期이고, 2倍體의 2倍면 G2期에 있는 것이다³⁶.

일반적으로 60-70%의 細胞는 G1期에 있고 S/M期에 20-25%의 細胞가 있다. 그러나 악성종양 세포의 경우에는 細胞分裂週기가 빨라짐에 따라 S/M期에 속하는 細胞의 비율이 증가하게 된다. 抗癌劑의 作用은 주로 細胞分裂이 일어나는 S/M期에 작용하여 DNA의 合成을 방해하여서 細胞分裂週기를 길게 하여 細胞의 증식을 억제시키거나 또는 DNA에 복구할 수 없는 심한 손상을 가하여 細胞를 죽이는 作用을 가지고 있다³⁹.

최근 細胞週기를 調節하는 분자적 기전에 관한 지식이 급속도로 증가함에 따라, 癌細胞의 증식을 억제하는 약제들의 작용 기전을 細胞週기의 조절과 관련하여 이해하는 것이 가능하게 되었다. 예를 들면 黑色腫에서 細胞 增殖을 억제하는 TGF-β는 G1段階의 細胞比는 증가시키고 S期和 G2+M期の 細胞比는 감소시켜 細胞週기의 G1段階에서 S段階로 이행하는 過程을 抑制시킨다고

알려져 있으며 또한 胃癌細胞柱에서도 IL-4가 G1段階에서 S段階로의 細胞週期 過程을 抑制한다는 報告가 있다⁴⁰.

따라서 抗癌效果를 檢證하고 그 작용 기전을 밝히기 위해서는 藥材가 癌細胞의 分裂週기에 미치는 영향을 분석하는 것이 필요하다.

본 實驗에서 黃藥子煎湯液 10μl/ml로 胃癌細胞柱 AGS를 藥物處理한 후 細胞의 細胞週기를 分析한 結果, 對照群과 비교해 實驗群에서는 分裂期인 M期の peak가 없었으며 休止期인 subG1, G0, G1期の 細胞가 늘어나 細胞週기가 길어지는 등 黃藥子가 細胞週기의 pattern을 變化시킨 것으로 나타났다. 그러나 破壞된 細胞의 형태로 보아 胃癌細胞가 黃藥子煎湯液으로 인해 細胞가 Apoptosis에 빠진 것이라기보다는 破壞된 細胞의 모양으로 볼 때 Necrosis에 의한 細胞破壞인 것으로 보인다. 이는 黃藥子の 抗癌作用을 暗示하는 것이지만 統計學的으로 有意하지는 않은 것으로 나타났다.

이상의 실험을 종합한 결과 黃藥子是 胃癌細胞에 대하여 抗癌作用의 여부는 확인하였지만 統計學的 有意성을 가지지는 못했다. 하지만 이 실험은 초보적인 단계에 불과하며 韓國에서는 黃藥子에 대한 실험이 진행되지 못했으므로 앞으로 좀 더 나은 연구로 黃藥子の 抗癌作用이 실험적으로 증명되기를 기대하며 또한 黃藥子가 多用되는 甲狀腺腫을 爲始한 기타 癌에 대해서도 抗癌作用에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 思料된다.

V. 結 論

黃藥子の 抗癌效果 여부와 그 分子生物學的 기전을 알아보고자 胃癌細胞에

黃藥子를 藥物 처리한 후 Tryphan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷效果를 측정하고, MTT assay를 시행하여 胃癌細胞의 增殖抑制效果를 측정하였으며 또한 flow cytometry를 이용하여 胃癌細胞의 細胞週기에 대한 影響을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tryphan blue exclusion test結果 각 實驗群은 對照群에 比하여 경과시간에 따라 癌細胞 殺傷率이 높았으며 또한 黃藥子煎湯液의 용량이 많아짐에 따라 癌細胞의 殺傷效果가 높은 것으로 나타났으나 統計學的 有意성(p<0.05)은 없었다.

2. MTT assay를 施行한 結果 黃藥子煎湯液의 用量多少와 增殖抑制效果가 비례하지는 않았으나, 對照群에 比하여 두 實驗群 모두 다소 높은 胃癌細胞의 增殖抑制效果가 나타났다. 그러나 統計學的 有意성(p<0.05)은 없었다.

3. Flow cytometry를 통한 Cell cycle analysis에서 對照群에 比해 實驗群에서는 分裂期인 M期の peak가 없었으며 休止期인 subG1, G0, G1期の 細胞가 늘어나 細胞週기가 길어지는 등 黃藥子가 細胞週기의 pattern을 변화시킨 것으로 나타났다. 이는 黃藥子の 抗癌作用을 暗示하는 것이지만 統計學的 有意성(p<0.05)은 없었다.

參考文獻

1. Kim IS. Current status and change of 5 most common causes of death in Korea. J Korean Medical Assoc 1995; 22: 132-145
2. 鄭鉉雨. 數種의 韓藥材가 人體 癌細胞柱에

- 에 미치는 細胞 毒性. 大韓韓方內科學會誌 1997; 18(1): 231-240
3. 金柄住, 文九. 胃癌의 東西醫學的 診治 概. 大韓韓醫學會誌 1996; 17(2): 100-116
 4. 한중현, 유광석, 강성용. 紅花가 人體의 癌 細胞柱에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌 1996; 17(2): 303-240
 5. 楊倉良. 毒藥本草. 北京: 中國中醫藥出版社; 1995, pp87-90
 6. 顏正華. 中藥學. 北京: 人民衛生出版社; 1991, pp624-625
 7. 國家中醫藥管理局. 中華本草. 上海: 上海科學技術出版社; 1998, pp2103-2107
 8. 雷載權, 張廷模. 中華臨床中藥學. 北京: 人民衛生出版社; 1998, pp1357-1361
 9. 蔡永敏, 任玉讓, 王黎, 張國泰. 最新中藥藥理與臨床應用. 北京: 華夏出版社; 1999, pp363-364
 10. 常敏毅. 抗癌本草. 湖南: 湖南科學技術出版社; 1986, pp263-265
 11. 季宇彬. 抗癌中藥藥理與應用. 哈爾濱: 黑龍江科學技術出版社; 1999, pp1106-1107
 12. 盛展能. 抗癌治驗本草. 重慶: 重慶出版社; 1994, pp542-545
 13. 張民慶, 龔惠明. 抗腫瘤中藥的臨床應用. 北京: 人民衛生出版社; 1998, pp316-317
 14. 張秀成. 現代實用抗癌中藥. 北京: 北京科學技術出版社; 1999, pp133-136
 15. 徐增榮, 丁志遠. 黃藥子的本草研究. 中國中藥雜誌 1999; 24(8): 496-498
 16. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 1991, pp183-185, 196, 197, 225, 239-252, 256-259, 269, 270
 17. 조완규. 증양학. 서울: 서울대학교출판부; 1989, pp1, 73, 77, 78, 85, 86, 126, 127, 130, 131, 140
 18. 金鎮福. 위암(胃癌). 서울: 의학출판사; 1999, pp1-9
 19. 박민희, 진윤태, 전훈재, 이성준, 이구, 김광희 등. Interferon- γ 가 인체 위암細胞의 성장과 細胞주기에 미치는 영향. 대한소화기학회지 1999; 33권: 38-50
 20. 黃奎東, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 위암에 대한 고찰. 大韓韓方腫瘍學會誌 1995; 1(1): 103-127
 21. 沈範根, 崔昇勳. 胃癌에서의 辨證分型에 關한 文獻的 考察. 東醫病理學會誌 1993; 8권: 295-303
 22. 尹誠佑, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 胃癌의 韓醫學 및 東西醫結合 治療에 關한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌 1996; 2(1): 177-191
 23. 정경석, 홍창걸, 문성하, 이재정, 최창식, 이계숙. MTT Assay를 이용한 위선암의 항암제 감수성 검사. 외과학회지 1995; 49(4): 479-483
 24. 金聖勳. 韓醫學界의 癌研究動向과 研究戰略에 대한 研究. 大韓韓醫學會誌 1998; 19(1): 470-499
 25. 安鍾雄. 藥用植物로부터 新規抗癌劑 探索 및 開發. 大田大論文集 1996; 4(2): 331-332
 26. 林成祐. 噎膈, 反胃, 胃癌의 治療에 關한 文獻的 考察. 大韓韓方內科學會誌 1994; 15(2): 209-217
 27. 朴贊國. 懸吐黃帝內經講義. 서울: 慶熙大學校 出版局; 1998, p346, 420
 28. 中國中醫研究院 原著. 正統 金 要略. 서울: 醫學研究社; 1996, p344
 29. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울: 행림출판; 1993, p179
 30. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울: 大星文化社; 1983, p385-386
 31. 陳義文 外. 中西醫結合腫瘤防治手冊. 北京: 新華出版社; 1992, pp97-105
 32. Beeby DF GC, Gazet JC, Grigor K, Neville AM. An assessment of the effects of hormones on short term organ cultures of human breast carcinomata. Br J cancer 1975; 31: 317
 33. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunologic methods 1983; 65(1-2): 55-63
 34. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. Cancer chemother Pharmacology 1983; 17(3): 259-263
 35. 강우성, 이장훈, 우홍정. 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 肝細胞活性, 細胞週期 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌 1999; 20(1):91-105
 36. 권영명, 김훈수, 박순직, 이진범, 임옥빈, 현계선. 최신 일반생물학. 서울: 교문사; 1998, pp137-138
 37. 송계용, 지재근, 함의근. 핵심병리학. 서울: 고려의학; 1998, p101
 38. 金成俊, 朴映淳, 李元鎬, 李浩子, 秋鍾吉. 細胞構造와 機能. 서울: 文運堂; 1994, pp520-521
 39. 全宇鉉, 金珍成, 柳逢夏, 朴東源, 柳基源. 整腸補脾湯의 消化管機能 및 胃癌細胞 增殖抑制能에 關한 研究. 慶熙韓醫大論文集 2000; 23(1): 17-34
 40. Morisaki T, Uchiyama A, Yuzuki D, Essner R, Morton DL, Hoon DSB. Interleukin 4 regulates G1 cell cycle progression in gastric carcinoma cells. Cancer Res 1994; 54: 1113-1118