

사매가 위암세포에 미치는 영향

홍상선, 류봉하, 김진성, 윤상협, 류기원
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

The Effects of *Duchesnea india*(Audra.) Foche. on Human Stomach Cancer Cells

Sang-Sun Hong, Bong-Ha Ryu, Jin-Sung Kim, Sang-Hyub Yoon, Ki-Won Ryu

Department of the 3rd Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Background : Nowadays many researches about it's cure are going on world widely since cancer is one of the most human health threatening diseases. In Chinese and North Korean medicine, *Duchesnea india*(Audra.) Foche. is practically used to treat many kinds of cancer, but in Korea it is rarely used. So, we need to scientifically identify anti-tumor effects of *Duchesnea india*(Audra.) Foche.

Objective : We are aimed to identify anti-tumor effects of *Duchesnea india*(Audra.) Foche. on the stomach cancer cells through molecular biologic methods.

Material & Methods : We used AGS as stomach cancer cells from American Type Culture Collection. We added the boiled extract of *Duchesnea india*(Audra.) Foche. 5 μ l (Sample I), 10 μ l (Sample II) to cultural media(ml) for 0, 6, 12, 24, 48 hours. We measured the killing effect on stomach cancer cells through Trypan blue exclusion test and the suppressive effect on viability of stomach cancer cells via MTT assay. the quantitative RT-PCR was used to examine their effect on the revelation of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax, which are genes related to apoptosis. We measured change of mitochondria membrane permeability and membrane potential via flow cytometry.

Result :

1. The killing effect on stomach cancer cells showed that each test groups killed more stomach cancer cells than the control group with a time(6 hours later) and density dependent manner, which was statistical significance.
2. The suppressive effect on viability of stomach cancer cells showed that each test groups had more suppressive effects on viability of stomach cancer cells than the control group with a time(6 hours later), which was statistical significance.
3. In the test about the revelation of genes related to apoptosis, the revelation of Bcl-2 and Bcl-XL decreased with a density manner which was statistical significance. but the revelation of Bax was not changed with statistical significance.
4. As a result of this test, *Duchesnea india*(Audra.) Foche. caused apoptosis by decreasing the absorbance of mitochondria with statistical significance. and also induced apoptosis by decreasing the membrane potential of mitochondria.

Conclusion : This experiment showed that *Duchesnea india*(Audra.) Foche. has anti-tumor effect with statistical significance. This is in vitro experiment and basic experiment on *Duchesnea india*(Audra.) Foche. We hope more progressive researchs on *Duchesnea india*(Audra.) Foche. will go on and its anti-tumor effects will be more practically identified.

Key Words: anti-tumor effects, *Duchesnea india*(Audra.) Foche

I. 緒論

· 접수 : 2003년 3월 19일 · 채택 : 2003년 4월 30일
· 교신저자 : 홍상선, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희
의료원 한방병원 3내과의사실
(Tel: 02-958-9140, E-mail: hss1260@hanmail.net)

癌은 현재 人類의 健康을 威脅하는 주요한 疾病의
하나로, 傳染性 疾患이 基本的으로 解決된 國家에서

는 心腦血管 疾患과 더불어 主要 死亡原因이 되고 있다. 이 중에서 胃癌은 우리나라에서 遺傳的 要因 및 食生活을 포함한 環境的 要因으로 인하여 다른 나라보다 높은 發生頻度を 나타내어¹ 全體 癌發生者 중 胃癌發生者의 比率은 남자의 경우 약 24.5% 정도 이고 여자에서는 약 15.8%를 차지하고 있어 전체로 볼 때는 10명의 癌환자 중 2명은 胃癌인 셈이다.

胃癌에 대한 治療法으로 抗癌劑가 가장 많이 利用되고 있으나, 抗癌劑는 그 作用의 非特異性으로 인해 많은 副作用을 隨伴하고 있는 것이 事實이다. 이러한 점에서 抗癌治療劑의 副作用을 減少시키면서 癌細胞에 대해 特異的 毒性을 나타내는 抗癌劑를 合成物質이 아닌 天然物質에서 開發하려는 勞力이 試圖되고 있다.

蛇莓는 薔薇科 多年生 匍伏草本植物인 蛇莓(*Duchesnea indica*(Audra.) Foché.)의 全草로서 우리나라 각지의 풀숲이나 길가, 밭둑 등 양지바른 곳에서 자란다. 味는 甘酸하고 性은 寒하며 有小毒하다. 실제 임상에서 胃癌, 直腸癌, 鼻咽癌, 食管癌, 喉癌, 子宮頸部癌, 多發性骨髓瘤, 白喉, 細菌性痢疾, 牙根尖周炎, 急性闌尾炎 등의 治療劑로 사용한다고 보고되고 있다^{4,6}.

이에 저자는 蛇莓의 胃癌細胞柱에 대한 抗癌效能을 研究하기 위하여 胃癌細胞柱(AGS)에 蛇莓를 藥物處理한 후 Tryphan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷效果를, MTT assay를 施行하여 胃癌細胞의 增殖抑制效果를, 定量的 RT-PCR을 利用하여 細胞의 增殖 및 apoptosis와 聯關이 있는 遺傳子의 發顯에 미치는 效果를, 미토콘드리아 膜透過度 및 膜電位 變化 등을 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

본 實驗에 사용한 蛇莓(*Duchesnea indica*(Audra.) Foché.)는 國產으로 서울 京東藥市市場에서 購入하여 使用하였다. 檢液의 調劑는 蛇莓 5g을 蒸溜水

100ml에 넣어 30분간 121℃에서 끓인 후 上層液을 取하여 0.2 μ m크기의 syringe filter를 利用하여 濾過하여 檢液으로 하였다. 본 實驗에 사용한 胃癌細胞는 美國 American Type Culture Collection(ATCC, MD)에서 提供하는 AGS로 選定하였다.

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 利用하여 37℃, 5% CO₂ incubator(NAPCO, precision scientific Inc.)에서 培養하였다. 細胞의 回收는 0.1% trypsin-EDTA를 利用하여 37℃에서 5분간 處理한 후 回收하였다.

2) 藥物處理

蛇莓 5g을 蒸溜水 100ml에 넣어 30분간 121℃에서 끓인 후 上層液을 取하여 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, 24, 48時間동안 投與하였다.

3) 胃癌細胞의 殺傷效果 測定

Tryphan blue exclusion test는 細胞를 回收한 후 10⁶/ml의 濃度로 細胞液을 만든 후 細胞液, HBSS(Hanker's balanced salt solution), 0.4% tryphan blue를 각각 0.5ml, 0.3ml, 0.2ml의 比率로 섞은 후 5분간 放置한 후 10분 이내에 푸르게 染色된 細胞의 比率을 inverted microscope下에서 測定하였다. 본 實驗은 3회에 걸쳐 施行하였다.

4) 胃癌細胞의 增殖抑制效果 測定

胃癌細胞 增殖抑制效果를 檢證하기 위하여 MTT assay를 施行하였다. MTT 溶液製作 및 處理는 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide) 5mg/ml을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 調節한 후 0.22 μ m filter로 濾過하여 MTT stock solution을 만들었다. 그리고 10 μ l MTT를 100 μ l의 cell suspension에 추가하였다. 酵素反應과 免疫螢光測定은 MTT stock solution에 cell

suspension을 添加한 狀態로 37℃에서 3時間 放置하여 보라색 formazan crystals가 形成된 후 absolute isopropanol에 녹아있는 100 μ l 0.04M HCl을 넣어보라색formazancrystals가完全히溶解된 후ELISA reader를 이용하여 570nm의 波長에서 吸光度(O.D.,optical density)를 測定하였다.

5) 胃癌細胞의 apoptosis와 聯關된 遺傳子의 發顯에 대한 效果 測定

胃癌細胞의 增殖 및 apoptosis와 聯關된 遺傳子의 發顯에 미치는 影響을 檢證하기 위하여 quantitative RT-PCR을 施行하였다. RNA 抽出은 각각의 檢液이 投與된 胃癌細胞를 回收하여 遠心分離한 후 solution D 200 μ l, 2M sodium acetate, pH 4.2, 20 μ l, water-saturated phenol 200 μ l, chloroform-isoamyl alcohol (49:1) 40 μ l를 넣은 후 20분간 얼음에 보관한다. 20분 후 12,000 \times g에서 10분간 遠心分離한 후 上層液을 回收하여 同量의 isopropanol을 넣은 후 -20℃에서 12時間 동안 보관한다. 다음날 다시 12,000 \times g, 20분간 遠心分離한 후 上層液을 버리고 ethanol 200 μ l를 넣어 RNA를 洗滌한다. cDNA 合成은 42℃에서 30분간 incubation하여 製作하였다. 遺傳子 連鎖重合反應(PCR)24은 GAPDH primer(sense; 5'-atgtctcagacaaccgggag-3', antisense; 5'-tttccgactga agagtgcg-3')에 대하여 施行하였고, 電氣泳動은 PCR product 10 μ l를 2% agarose gel에 loading하여 80V에서 20분간 施行하였다. 定量化는 Gel-doc system(Bio-Rad, CA)과 densitometry를 利用하였다.

위의 結果를 바탕으로 band의 밝기에 따라 template cDNA의 量을 增減하여 相對的으로 cDNA의 量을 同一하게 調節하였다. 이후 Bcl-2 primer (sense; 5'-actctgctcagtttcgccct-3', antisense; 5'-ttgtggctcagataggcac-3'), Bax primer(sense; 5'-atggacgggtccggggagca-3', antisense; 5'-tgttactgtccagttgtcc-3'), Bcl-XL primer(sense; 5'-atgtctcagacaaccgg-3', antisense; 5'-tcttccgactgaagagtgcg-3')를 使用하여 각각 다음의 條件으로 PCR 反應과 電氣泳動을 施行하여 gel-doc system(Bio-Rad, CA)과 densitometry를 利用하여 定量化(quantitation)한 후,

定量化 값을 GAPDH에 대한 값으로 나누어 각 遺傳子의 發顯 程度를 比較하였다. 이 實驗의 結果는 3회 反復하여 平均値로 나타났다.

6) 미토콘드리아 膜透過度 및 膜電位 變化 測定

細胞 培養 배지에 100 μ M의 rhodamine 123을 넣은 후 30분간 37℃ CO₂ incubator에 保管하였다. 이후 PBS로 3회 洗滌한 후 flow cytometry로 螢光을 測定하였다.

3. 統計處理

각 藥物의 藥效 持續 時間의 有意性 檢定은 paired student T-test로 統計處理하였으며, p<0.05를 有意性 있는 結果로 判斷하였다.

III. 成 績

1. 胃癌細胞의 殺傷效果

實驗結果 Sample I 에서는 0時間, 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間의 dead cells의 比率이 각각 1.3%, 26.7%, 40.0%, 59.7% 및 72.3%로 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 有意性있게 높아지는 傾向을 보였다.

Sample II 에서는 0時間, 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間의 dead cells의 比率이 각각 1.7%, 43.0%, 58.7%, 73.7% 및 89.0%로 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 有意性있게 높아지는 傾向을 보였다.

또한 Sample I 과 Sample II 를 比較해 볼 때 蛇莓의 用量이 많아짐에 따라 癌細胞의 殺傷效果가 높아지는 것으로 나타났다(Table 1).

2. 胃癌細胞의 增殖抑制效果

實驗結果 Sample I 에서는 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間까지의 O.D.가 0.59, 0.34, 0.22, 0.17로 時間이 經過함에 따라 癌細胞에 대한 增殖抑制效果가 有意性있게 높아지는 것으로 나타났다.

Sample II 에서는 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間까지의 O.D.가 0.50, 0.39, 0.20 및 0.17로 時間이 經過함에 따라 增殖抑制效果가 有意性있게 높아지는 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(%) | | | | |
|-----------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0hr | 6hrs | 12hrs | 24hrs | 48hrs |
| Control | 1.7±0.6 [*] | 2.7±0.6 | 2.3±0.6 | 2.3±1.5 | 2.7±0.6 |
| Sample I | 1.3±0.6 | 26.7±6.5* | 40.0±8.0* | 59.7±6.1* | 72.3±7.0* |
| Sample II | 1.7±0.6 | 43.0±6.6* | 58.7±6.0* | 73.7±4.2* | 89.0±4.6* |

*: Mean ± S.D.

* : Statistically significant compared with control data(* : p<0.05)

Control: Stomach cancer cells not treated

Sample I: Stomach cancer cells treated with *Duchesnea indica*(Audra.) Foche. 5µl/ml

Sample II: Stomach cancer cells treated with *Duchesnea indica*(Audra.) Foche. 10µl/ml

Table 2. Effects of SampleI and SampleII on the Cellular Viability of Stomach Cancer Cells

| Group | O.D.(Optical Density) | | | | |
|----------|------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0hrs | 6hrs | 12hrs | 24hrs | 48hrs |
| Control | 0.73±0.05 [*] | 0.74±0.03 | 0.68±0.04 | 0.69±0.05 | 0.70±0.05 |
| SampleI | 0.69±0.05 | 0.59±0.08* | 0.34±0.09* | 0.22±0.04* | 0.17±0.03* |
| SampleII | 0.67±0.06 | 0.50±0.09* | 0.39±0.10* | 0.20±0.05* | 0.17±0.02* |

*: Mean ± S.D.

* : Statistically significant compared with control data(* : p<0.05)

Control: Stomach cancer cells not treated

Sample I: Stomach cancer cells treated with *Duchesnea indica*(Audra.) Foche. 5µl/ml

Sample II: Stomach cancer cells treated with *Duchesnea indica*(Audra.) Foche. 10µl/ml

Table 3. Gene Revelation of *Cremastrae Appendiculatae* Tuber on Human Stomach Cancer Cells by RT-PCR

| Group | Gene Revelation | | |
|-----------|-----------------|--------------|-----------|
| | Bcl-2/GAPDH | Bcl-XL/GAPDH | Bax/GAPDH |
| Control | 0.79 | 0.76 | 0.51 |
| Sample I | 0.48* | 0.63* | 0.54 |
| Sample II | 0.41* | 0.45* | 0.51 |

* : Statistically significant compared with control data(* : p<0.05)

Control: Stomach cancer cells not treated

Sample I: Stomach cancer cells treated with *Duchesnea indica*(Audra.) Foche. 5µl/ml

Sample II: Stomach cancer cells treated with *Duchesnea indica*(Audra.) Foche. 10µl/ml

또한 蛇莓 煎湯液의 用量多少와 增殖抑制效果는 比例하지 않는 것으로 나타났다.

이 結果로 보아 蛇莓의 胃癌細胞에 대한 增殖抑制效果가 時間의 경과에 따라 有意性있게 增加함을 알 수 있었다(Table 2).

3. 胃癌細胞의 apoptosis와 聯關된 遺傳子의 發顯에 대한 效果

實驗結果 apoptosis를 억제하는 Bcl-2과 Bcl-XL의 發顯이 有意性있게 濃度에 比例하여 減少하였으나,

apoptosis를 유도하는 Bax의 發顯에 대해서는 有意한 變化가 觀察되지 않았다(Table 3).

그러므로, 蛇莓는 apoptosis를 유도하는 Bax보다 는 apoptosis를 억제하는 Bcl-2과 Bcl-XL의 發顯에 影響을 주어 apoptosis를 誘發한다고 볼 수 있다.

4. 미토콘드리아 膜透過度 및 膜電位 變化

The mitochondria permeability transition pore (MPTP)는 apoptosis의 과정에 있어서 決定的 役割을 하는 것으로 알려져있다. 이 MPTP의 開放은 apoptosis를 誘發하는 미토콘드리아 基質要素의 滲透壓적 膨脹을 惹起하고 이어서 미토콘드리아 外膜이 破壞되어 cytochrome c.의 非特異的 流出을 惹起한다. 또한 미토콘드리아의 膜電位에도 影響을 줌으로써 cytochrome c.의 非特異的 流出을 惹起하여 細胞死滅을 誘導한다고 알려져 있다.

미토콘드리아가 膨脹하게 되었을 때 빛을 쪼이면 投射되는 量은 늘어나고 吸光되는 量은 줄어든다.

본 실험에서 Sample I 과 Sample II 에서 모두 吸光度가 감소하는 것으로 관찰되어 蛇莓가 癌細胞내

Table 4. Change of Mitochondria Membrane Permeability(permeability transition)

| Group | O.D.(Optical Density) | | | Mean | Ratio |
|-----------|-----------------------|------|------|-------|-------|
| | 1st | 2nd | 3th | | |
| Control | 0.65 | 0.72 | 0.69 | 0.69 | 1.00 |
| Sample I | 0.45 | 0.51 | 0.38 | 0.45* | 0.65 |
| Sample II | 0.34 | 0.23 | 0.33 | 0.30* | 0.43 |

* : Statistically significant compared with control data (* : p<0.05)

Control: Stomach Cancer Cells Not Treated

Sample I: Stomach Cancer Cells Treated with *Duchesnea india*(Audra.) Foche. 5µl/ml

Sample II: Stomach Cancer Cells Treated with *Duchesnea india*(Audra.) Foche. 10µl/ml

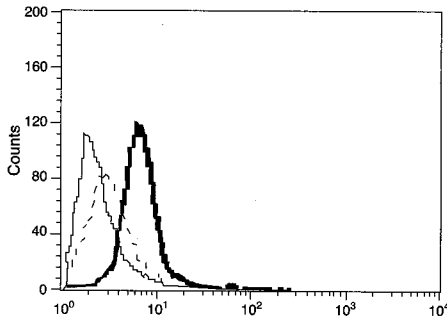


Fig. 1. Effects of *Duchesnea india*(Audra.) Foche. on the membrane potential of mitochondria of stomach cancer cells.

Bold; Stomach Cancer Cells Not Treated

Dot; Stomach Cancer Cells Treated with *Duchesnea india*(Audra.)

Foche. 5µl/ml

Thin; Stomach Cancer Cells Treated with *Duchesnea india*(Audra.) Foche. 10µl/ml

미토콘드리아의 막투과도에 영향을 미쳐 팽창을 유도하는 것으로 나타났다(Table 4).

또한螢光度로써測定한 미토콘드리아의 막電位 결과에서도 Sample I 과 Sample II 에서 用量에 比例하여 미토콘드리아의 막電位를 감소시킴으로써細胞死滅을 誘導하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

IV. 考 察

癌은 組織의 自律的인 過剩 成長이며, 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 대해 破壞的인 것이라고 정의된다⁸. 科學의 發達에 따른 醫學의 進歩와 人間生活의 變化는 過去 傳染性 疾患의 減少를 가져온 반면 心腦血管 疾患과 腫瘍性 疾患의 增加를 가져왔으며, 특히 腫瘍發生의 頻度는

最近 급격히 增加하여 왔다. 특히 胃癌은 國內에서 發生率과 死亡率에 있어서 全體 腫瘍 中에서 높은 比率을 차지하고 있으며 遺傳的 要因 및 食生活을 포함한 環境的 要因으로 인하여 다른 나라보다 높은 發生頻度를 나타내고 있다¹. 우리나라에서 胃癌은 男性에게 많다고 여겨지는데, 男女比는 1.8:1로 男性이 많아⁹ 전체 癌發生者 中 胃癌發生者의 比率은 남자의 경우 약 24.5%정도이고 여자에서는 약 15.8%를 차지하고 있어 전체로 볼 때는 10명의 癌환자 中 2명 정도가 胃癌인 것으로 보고되었다².

胃癌의 一般적인 原因은 食餌的 要因, 環境的 要因, 遺傳的 要因, 先行前驅病變 등으로 區分할 수 있다¹. 胃癌의 初期症狀는 뚜렷하지 않아서 전혀 아무런 症狀를 못 느끼는 경우도 있지만, 주로 食慾不振 體重減少 消化不良 食後의 心窩部膨滿感 貧血 衰弱 등이 나타날 수 있고, 胃癌이 進行되는 過程에서 惡心 嘔吐 胃脘痛 嚥下困難 嘔血 黑糞 등이 나타날 수 있다².

胃癌의 診斷은 症狀이 있을 때 檢査하여 診斷하는 경우와, 症狀는 없으나 檢診時 診斷되는 경우가 있는데, 보통은 放射線撮影과 胃內視鏡 및 胃內視鏡下生檢을 施行함으로써 診斷이 可能하다. 그러나, 우리나라에서는 아직 早期 診斷으로 찾아내지 못하고 癌이 進行된 후에야 診斷이 可能한 境遇가 많은 실정이다¹.

胃癌에 대한 治療法으로는 外科의 手術療法, 抗癌藥物療法, 放射線療法, 免疫療法, 遺傳子療法 등이 알려져 있다. 그러나 免疫療法과 遺傳子療法은 開發中이어서 治療方法이 아직 定立되지 못한 실정이며, 手術療法

法과 放射線療法은 局所의 癌의 治療에는 어느 정도 有效하지만 轉移된 癌에는 治療에 限界가 있다³.

그러므로 現在의 狀況下에서는 化學療法의 重要性이 強調되고 있는데, 이러한 抗癌劑는 그 作用의 非特異性으로 인해 많은 副作用을 隨伴하고 있는 것이 事實이다. 즉 抗癌劑가 癌細胞 外에 正常的인 細胞에도 역시 DNA의 損傷을 招來하고 細胞가 必要한 營養物質의 吸收를 遮斷하여 正常細胞의 細胞分裂 및 成長을 妨害하는 副作用을 招來하는 경우가 大部分이며³ 이러한 副作用은 消化器系統을 비롯하여 肝臟 障病, 血液學的 異常, 免疫機能 低下, 遺傳因子 損傷 등으로 다양하게 나타나는데⁴, 이러한 점에서 抗癌治療劑의 副作用을 減少시키면서 癌細胞에 대해 特異的 毒性을 나타내는 抗癌劑를 合成物質이 아닌 天然物質에서 開發하려는 勞力이 試圖되고 있다⁵.

韓醫學에서 胃癌은 '胃脘痛', '心下痞', '反胃', '心口痛' 등의 範疇에 속하는데, <內經>에서는 '膈咽不通 飲食不下 邪在胃脘'이라 하였고 <金匱要略>에서는 '暮食朝吐 宿穀不化 名曰反胃'라 하였고 元代의 朱丹溪는 反胃의 病은 '七情六淫遂有火熱上炎 多升不降 津液不布 積而成熱 血液虛耗 胃脘乾燥 大便秘少 上下不通'이라 하였고 明代의 張景岳은 '少年少見此證 而惟中衰耗傷者多有之', '食入反出者 以陽虛不能化也 食不得下者 以氣結不能行也'라 하였다⁶.

胃癌의 韓醫學의 發病機轉은 氣滯鬱結, 情志失調, 飲食不節, 脾胃虛寒, 氣滯血瘀로 要約되며, 辨證分型에 있어서는 肝胃不和, 胃熱傷陰, 脾胃虛寒, 瘀毒內阻, 脾虛痰濕, 氣血雙虧라 區分하여 治療의 基準으로 삼고 있다⁶.

그 治療法은 宿主의 抗癌能力을 增強하는 益氣健脾, 滋陰養血, 養陰生津, 溫補腎陽, 滋補強壯 등의 扶正固本法, 癌細胞를 攻擊하는 意味의 行氣散結, 疏肝理氣, 攻堅破積消脹, 活血化痰, 化痰通絡, 清熱解毒 등의 祛邪法 및 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法으로 大別하고 있다. 그 중에서 扶正培本法과 扶正祛邪法을 가장 效果의인 方法으로 보고 있다⁷.

最近의 韓藥 및 方劑를 利用한 實驗的 研究로는 黃藥子, 山慈菇, 整腸補脾湯, 消癌去痰益氣湯, 四君子

湯 및 四君子湯加斑猫, 四君子湯加山慈菇가 胃癌細胞에 미치는 抗癌效果에 대한 分子生物學的 研究에 관한 實驗報告가 있었으며 앞으로 胃癌의 治療率을 높이기 위하여 韓藥材의 開發이 必要한 實情이다.

蛇莓는 薔薇科 多年生 匍伏草本植物인 蛇莓 (*Duchesnea indica*(Audra.) Foche.)의 全草로서 우리나라 각지의 풀숲이나 길가, 밭둑 등 양지바른 곳에서 자란다. 세계적으로는 중국(동북), 러시아, 일본, 동남아시아의 여러 지역에도 분포되어 있으며⁸, 異名은 蛇泡草, 鷄冠果, 地莓, 龍吐珠, 三瓜龍, 蛇果草이며 味는 甘酸하고, 性은 寒하며 有小毒하다. 效能은 清熱解毒 散結消腫 祛風 定驚 退翳 殺蟲하고, 膀胱腫瘍 肝癌 脾腺癌 腸癌 痢疾 腸炎 蟲垂突起炎 頸部淋巴結核 白喉 疔瘡腫毒 蛇蟲咬傷 小兒驚癇 喉風口瘡 木舌 重舌 目翳內障 疔瘡 癰腫 瘰癧 腮腺癌 結核 蛇蟲咬傷 燙傷 痔漏 疥癬 黃疸性肝炎 月經過多 등을 主治한다. 실제 임상에서 直腸癌, 鼻咽癌, 食管癌, 喉癌, 多發性骨髓瘤, 白喉, 細菌性痢疾, 牙根尖周炎, 急性闌尾炎 등의 治療劑로 사용한다고 보고되고 있다⁶.

蛇莓에 대한 研究報告로는 動物實驗에 依해 抗腫瘍作用이 있다는 事實이 밝혀졌고, 또 다른 實驗에서 人體의 食道癌 細胞生長에 대한 抑制作用, 細胞 DNA 合成에 대한 抑制作用이 있는 것으로 나타났으나⁸, 蛇莓의 胃癌細胞 殺傷에 대한 分子生物學的 檢索은 없었다. 그리고, 蛇莓는 中國과 北韓에서 이미 抗癌劑로 使用되고 있으며 우리나라에서도 쉽게 구입할 수 있는 藥劑이나 아직 抗癌劑로 使用하는 것에 대한 國內 報告는 없는 實情이다.

이에 저자는 胃癌에 대한 治療劑를 開發할 目的으로 蛇莓의 胃癌細胞柱에 대한 抗癌 效能을 研究하기 위하여 胃癌細胞柱(AGS)에 蛇莓를 藥物 處理한 후 Tryphan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷 效果를 測定하였고, MTT assay를 施行하여 胃癌細胞의 增殖抑制效果를 測定하였으며, 定量的 RT-PCR을 利用하여 細胞의 增殖 및 apoptosis와 聯關이 있는 遺傳子의 發顯에 미치는 效果를 觀察하고, 미토콘드리아 膜透過度 및 膜電位 變化 등을 觀察하였다.

본 實驗에서 蛇莓가 胃癌細胞에 미치는 殺傷效果를 Tryphan blue exclusion test를 통하여 살펴본 結果, 蛇莓 煎湯液 5 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 0時間, 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間의 dead cells의 比率이 1.3%, 26.7%, 40.0%, 59.7% 및 72.3%로 나타나 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 有意性있게 높아지는 傾向을 보였다. 또한 蛇莓 煎湯液 10 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 0時間, 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間의 dead cells의 比率이 1.7%, 43.0%, 58.7%, 73.7% 및 89.0%로 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 有意性있게 높아지는 傾向을 보였다. 그리고, 胃癌細胞에 대하여 蛇莓의 用量이 많아짐에 따라 癌細胞의 殺傷效果가 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

癌細胞 增殖抑制效果를 分析하기 위해서 癌細胞를 培養器에서 培養하면서 다양한 濃度의 抗癌劑를 投與하여 細胞의 增殖정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 抑制效果를 客觀적으로 分析하였다. 본 實驗에서 사용한 MTT assay는 cell의 viability를 測定하는 方法으로 1983년 Mosmann에 의해 처음 試圖되었으며, 1986년 Cole과 1988년 Alley등에 의해 사용되기 시작하여 최근 널리 普及되었다¹⁹.

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 量이 달라지며 이를 適切한 溶媒에 作用시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 細胞의 生存能力을 測定한다²⁰.

본 實驗의 結果 Optical Density(O.D.)는 對照群과 比較하여 蛇莓 煎湯液 5 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間까지는 O.D.가 0.59, 0.34, 0.22, 0.17으로 時間이 經過함에 따라 癌細胞에 대한 增殖抑制效果가 有意性있게 높아지는 것으로 나타났다.

蛇莓 煎湯液 10 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 6時間, 12時間, 24時間 및 48時間까지의 O.D.가 0.50, 0.39, 0.20 및 0.17로 時間이 經過함에 따라 增殖抑制效果가 有意性있게

높아지는 것으로 나타났다.

이 結果로 보아 蛇莓는 胃癌細胞에 대한 增殖抑制效果가 檢液의 濃도와는 比例하지 않았으나, 時間의 경과에 따라 有意性 있게 增加함을 알 수 있었다.

最近 抗癌劑가 腫瘍細胞를 죽이는 方法 중에서 自己計劃 細胞死(programmed cell death, apoptosis)를 誘導한다는 研究가 활발히 進行되고 있다. Apoptosis는 細胞가 죽을 때 事前에 이미 準備된 狀況에서 死亡 프로그램을 可動시킴으로써 能動的으로 죽음을 맞이한다는 概念으로²¹, 이는 自然死로서 能動的이면서 自發적인 死亡機轉이다. 이 Apoptosis라는 正교한 機轉에 의한 能動的 細胞死亡機轉은 몸의 生存을 위한 生命의 고도의 戰略중의 하나이며 이의 發見은 20세기 후반의 醫·生物學의 엄청난 業績이 아닐 수 없다²¹.

한편 細胞의 自己計劃 細胞死에는 여러 種類의 蛋白質 및 遺傳子가 關與하는데 代表的인 遺傳子로는 Bcl-2, Bax, Bcl-XL, fas, FAD, CPP32, Bak 등이 있다²². 이들 遺傳子는 細胞의 죽음에 깊이 關與하고 있으며 한 例로서 Bcl-2 遺傳子의 경우에 이 遺傳子가 多量으로 表現될 경우 細胞는 여러 種類의 有害한 刺戟으로부터 強力하게 抵抗할 수 있는 能力을 얻게 된다. 腫瘍細胞가 이런 遺傳子의 發顯을 통해 抗癌劑의 攻擊으로부터 抵抗하면서 持續적으로 分裂·增殖할 수 있는 것이다. 一部の 抗癌劑의 경우 이러한 遺傳子의 發顯을 抑制하거나 또는 細胞에서 죽음을 促進하는 遺傳子를 誘發함으로써 抗癌效果를 發揮할 수 있다. 따라서 이 研究에서 사용되는 蛇莓가 이러한 細胞의 죽음과 聯關된 遺傳子의 發顯에 어떠한 影響을 미치는가를 研究하는 것은 蛇莓의 藥理作用의 機轉을 밝히는 데 반드시 필요한 過程이라 할 수 있다.

現在 Bcl-2 系列 蛋白質은 크게 細胞死滅을 誘導하는 蛋白質과 細胞死滅을 抑制하는 蛋白質로 區分할 수 있다²³. 細胞死滅을 誘導하는 Bcl-2 系列蛋白質에는 Bax, Bid, Bak, Bad 등이 있으며 細胞死滅을 抑制하는 Bcl-2 系列蛋白質에는 Bcl-2, Bcl-XL 등이 있다. Bcl-2 蛋白質의 作用機轉은 아직 확실히 밝혀져 있지

는 않지만 과도하게 발현이 증가될 경우 세포에서 세포사멸을 차단하여 세포가 오래 동안 죽지 않고 생존하게 함으로서 암세포로移行할 수 있는 기회가 증가되어 결국腫瘍이 발생하리라고 생각된다. 따라서 Bcl-2 遺傳子の 발현은腫瘍의 進行과도 密接한 關係가 있어 이들이 과도하게 발현될 경우 患者의 豫後가 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 現在는 實驗室의 進行되고 있지만 Bcl-2의 발현을 抑制함으로써腫瘍의 治療效果를 極大化시키려는 研究가 매우 활발히 進行되고 있는 바, 이들의 발현에 影響을 미치는 抗癌劑의 開發 및 發掘은 매우 重要한 過程이라 할 수 있다. 이러한 側面에서 볼 때 이들 遺傳子の 過度한 발현 및 발현 抑制는 癌細胞의 生存과 密接한 聯關이 있으며 抗癌劑가 이들 遺傳子の 발현에 미치는 影響에 관한 研究는 매우 重要하다고 할 수 있다²⁴.

이 研究에서는 蛇莓에 의해 이러한 遺傳子들 중 어떤 遺傳子の 발현이 抑制 또는 促進되는 지를 quantitative RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) 方法을 利用하여 測定함으로써 遺傳子の 變化에 대한 이 藥劑의 作用機轉을 살펴보고있다.

定量的 RT-PCR을 利用하여, 抗癌 關聯 遺傳子の 定量的 mRNA 발현을 分析한 結果 apoptosis를 억제하는 Bcl-2과 Bcl-XL의 발현이 濃度에 比例하여 有意性있게 減少하였으나, apoptosis를 유도하는 Bax의 발현에 대해서는 有意한 變化가 觀察되지 않았다. 그러므로, 蛇莓는 apoptosis를 유도하는 Bax보다는 apoptosis를 억제하는 Bcl-2과 Bcl-XL의 발현에 影響을 주어 apoptosis를 誘發한다고 볼 수 있다.

酸素呼吸을 하는 모든 細胞에 들어 있는 미토콘드리아는 模樣이나 크기가 매우 多樣하지만 一般의 直徑이 0.5-1.0 μ m, 길이가 7 μ m 정도인 顆粒狀이나 管狀을 이루고 있다. 미토콘드리아는 外膜과 內膜의 二重膜으로 되어 있으며, 外膜은 細胞質에 面해 있고, 內膜은 미토콘드리아 內部로 깊게 접혀져 주름진 형태의 크리스테(cristae)를 형성한다. 그 결과 內外膜에 의해 두 개의 區劃으로 나누어지는데 하나는 內膜으로 둘러싸인 液體로 가득한 매트릭스(matrix)라

불리는 內部區劃으로 크리스테가 주름잡혀 突出되어 있다. 다른 하나의 區劃은 두 膜사이의 空間으로 膜間空間인 外部區劃을 말한다. 미토콘드리아의 주된 機能은 산소의 存在하에서 呼吸基質을 酸化시켜 에너지(ATP)를 生産하는 것으로 細胞의 種類에 따라 수천 개가 들어 있는 경우도 있다²⁵. 또한 미토콘드리아의 膜係는 電子傳達係와 酸化的 磷酸化反應에 關係되는 여러 가지 酵素가 排列되어 있어서 ATP 生成이 效率의 由로 이루어질 수 있게 되어 있다²⁶.

膜電位는 細胞外 電位를 基準으로 해서 細胞內 電位를 測定한 것으로²⁷, 生物의 細胞膜이나 미토콘드리아 膜의 안팎에는 이러한 膜電位가 생기고 있다. 生體의 에너지 通화라 일컬어지는 ATP의 合成은 呼吸에 의하여 생긴 膜電位를 써서 이루어진다. 또 神經內에서의 興奮의 傳導도 膜電位의 變化를 利用해서 이루어지고 있다.

미토콘드리아는 apoptosis나 細胞壞死의 始作에 있어서 決定的인 役割者로서²⁸ 細胞質內로 cytochrome c를 放出함으로써 細胞를 不可逆的으로 죽음에 이르게 할 수 있다. 이 과정에 있어서의 주된 役割者는 MPTP인데, 이는 正常的인 代謝媒介에 關係된 蛋白質뿐만 아니라 apoptosis를 調節하는 蛋白質을 含有하고 있는 多蛋白 複合體로 1.5kDa이하의 分子에 대해서 透過性을 가지며, 基質內 Ca²⁺의 增加된 狀況에서 미토콘드리아 內膜으로 열린다²⁹. 이 MPTP의 開放은 apoptosis를 誘發하는 미토콘드리아 基質要素의 滲透壓의 膨脹을 惹起하고 이어서 미토콘드리아 外膜이 破壞되어 cytochrome c의 非特異的 流出을 惹起한다. 또한 미토콘드리아의 膜電位에도 影響을 줌으로써 cytochrome c의 非特異的 流出을 惹起하여 細胞死滅을 誘導한다고 알려져 있다.

본 실험에서 對照群과 比較하여 蛇莓 煎湯液 5 μ l/ml와 10 μ l/ml에서 모두 吸光度가 有意性있게 減少하는 것으로 觀察되어 癌細胞內 미토콘드리아 膜透過度에 影響을 미쳐 膨脹을 誘導하는 것으로 나타났다. 또한 螢光度로써 測定한 미토콘드리아의 膜電位 결과에서도 對照群과 比較하여 蛇莓 煎湯液 5 μ l/ml와 10 μ l/ml에서 用量的 增加에 比例하여 미토콘드리아

의 膜電位를 減少시킴으로써 細胞死滅을 誘導하는 것으로 나타났다.

以上の 實驗結果를 要約하여 보면, Tryphan blue exclusion test를 이용한 胃癌細胞 殺傷效果 측정에서 蛇毒의 胃癌細胞에 대한 殺傷效果가 有意性있게 높아지는 것으로 나타났고, MTT assay를 이용한 胃癌細胞 增殖抑制效果 測定에서 蛇毒의 胃癌細胞에 대한 增殖抑制效果가 有意性 있게 增加하는 것으로 나타났고, quantitative RT-PCR을 이용한 實驗에서 apoptosis를 억제하는 Bcl-2과 Bcl-XL의 發顯이 濃度에 比例하여 有意性있게 減少하였으나, apoptosis를 유도하는 Bax의 發顯에 대해서는 有意한 變化가 觀察되지 않았으며, 미토콘드리아의 膜透過度 및 膜電位를 減少시켜 細胞死滅을 誘導하는 것으로 나타났다.

위의 實驗結果를 보아서 蛇毒은 胃癌 細胞에 대한 治療效果가 있는 것으로 評價할 수 있으며, 臨床의으로도 胃癌 治療에 活用할 수 있을 것으로 思料된다.

V. 結 論

胃癌細胞에 대한 蛇毒의 效能을 糾明하기 위하여, 胃癌細胞에 檢液을 處理한 후 Tryphan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷效果를, MTT assay를 施行하여 胃癌細胞의 增殖抑制效果를, apoptosis와 聯關이 있는 遺傳子의 發顯에 미치는 效果를, 미토콘드리아 膜透過度와 膜電位 變化 등을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 胃癌細胞 殺傷效果는 濃度依存的으로 有意性 ($p<0.01$)있게 나타났다.
2. 胃癌細胞 增殖抑制效果는 經時的으로 有意性 ($p<0.01$)있게 나타났다.
3. 遺傳子 發顯에 대한 效果는 Bcl-2과 Bcl-XL에서 有意性($p<0.01$)이 각각 認定되었고, Bax에 대해서는 認定되지 않았다.
4. 미토콘드리아의 膜透過度 및 膜電位는 有意性 ($p<0.01$)있게 減少하였다.

參考文獻

1. 조완규. 消化器學. 서울: 서울대학교출판부; 1990, p.87-98.
2. 한국중앙암등록 사업 연례 보고서(2000.1.-2000.12.). 보건복지부 한국중앙암등록본부.
3. 김동희, 김성훈. 항암제 부작용에 대한 한방요법. 대전대학교 한의학 연구소, 한의학편 1993;2(1);33-51.
4. 조종관. 한방임상중양학. 대전: 주민출판사; 2001, p.400,1076.
5. 임록재, 김현삼, 광종송, 라웅철, 리용재, 리관필 등. 조선식물지. 평양: 과학기술출판사; 1997, p.235-6.
6. 劉春安, 彭明 主編. 抗癌中草藥大辭典. 湖北洪湖市: 湖北科學技術出版社; 1994, p.934-6.
7. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. FASEB J. 2002;16:607-9.
8. 심범상, 최승훈, 박재경. 행인제제의 독성 및 항암효과와 자연살해세포 활성화에 미치는 효과. 대한한방중양학회지 2000;6(1):19-28.
9. 김진성, 류봉하, 박동원, 류기원. 은화사간탕과 은화사간탕가축용의 항암효과와 면역반응에 관한 연구. 대한한방중양학회지 1997;3(1):1-28.
10. 서만정. 최신치료 위암. 서울: 고려의학; 1991, p.146.
11. 金柄住, 文九. 胃癌의 東西醫學의 診治 概況. 大韓韓醫學會誌 1996;17(2):100-16.
12. 황규동, 류기원. 열격·반위와 위암과의 상관성에 대한 문헌적 고찰. 대한한방중양학회지 1995;1(1):129-40.
13. 서울대학교의과대학 편. 腫瘍學. 서울: 서울대학교 출판부; 1998, p.138, 149-53,168,182-4,225-7.
14. 의학교육연수원. 약물요법. 서울: 서울대학교 출판부; 1993, p.327-31.
15. 전병욱, 류봉하, 박동원, 류기원. 암종의 병인병리에 대한 문헌적 고찰. 대한한방중양학회지 1995;1(1): 83-102.
16. 沈範相, 崔昇勳. 胃癌에서의 辨證分型에 關한 文獻의 考察. 東醫病理學會誌 1993;8권:295-303.
17. 백태현, 류봉하, 박동원, 류기원. 반하백출천마탕과 반하백출천마탕가미방의 항암효과와 면역반응에 관한 실험적 연구. 대한한방중양학회지 1995;1(1):141-66.

18. 責編組. 中藥辭海. 北京: 中國醫學技術出版社; 1997, p.353-5.
19. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer chemotherapy and Pharmacology* 1983;17(3):259-63.
20. 정경석, 홍창걸, 문성하, 이재정, 최창식, 이계숙. MTT Assay를 이용한 위선암의 항암제 감수성 검사. *외과학회지* 1995;49(4):479-83.
21. 서정선. 20世紀末의 醫 · 生物學의 새로운 비전 apoptosis · 몸의 效率的 生存을 위한 細胞의 能動的 死亡기전. 서울: 醫學研究의 最新 動向; 1998, p.30-2.
22. Kane SE, Pastan I, Gottesman MM. Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1990;22:593-618.
23. 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;6:61-8.
24. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* 1998; 5:372-80.
25. 권영명, 김훈수, 박순직, 이진범, 임옥빈, 현재선. 최신 일반생물학. 서울: 교문사; 2000, p.63.
26. 생물교재편찬회 역. 존슨 생물학. 서울: 탐구당; 1990, p.29.
27. 민병일. 최신생리학. 서울: 신광출판사; 2000, p.2-5~2-6.
28. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 2002;84(2-3):153-66.