

斑蝥 가 대장암세포에 미치는 영향

김현일, 김진성, 윤상협, 류봉하, 류기원
경희대학교 의과대학 의료원 3내과

Effect of *Mylabris phalerata* on colorectal adenocarcinoma cells (SNU-C5 cell lines)

Hyeon-Yil Kim, Jin-Sung Kim, Sang-Hyub Yoon, Bong-Ha Ryu, Ki-Won Ryu

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

The study examines the anti-cancer effects of the hot water extract of *Mylabris phalerata*(MP) using SNU-C5 cell lines. Microscopic analysis showed that 12 hours after MP treatment, the number of dead cells increased prominently. Significant cell death was observed 12, 24, and 48 hours after MP treatment through trypan blue exclusion testing. This suggests that MP is time-dependently cytotoxic. Mitotracker Red CMXRos staining and flowcytometry revealed that MP decreased mitochondrial membrane potentials. The absence of peaks on PI staining showed that DNA damage occurred in MP treated cells. Taken together, measurements suggest that MP has a strong anti-cancer effect on SNU-5 cell lines, and that this is likely to be due to the destruction of mitochondria and DNA damage.

Key Words: *My labris phalerata*, membrane potentials.

1. 緒 論

대장암은 2002년 통계청 자료에 의하면 암 사망률이 4위로 나타나 인구 10 만명당 9.6명이 대장암으로 사망하는 것으로 보고되어 있으며, 최근 식생활 및 생활습성의 변화로 그 발생 빈도는 점차 증가하는 추세이다.

대장암에 대한 치료법으로는 외과적 수술요법, 약물요법, 방사선요법 등이 시행되고 있고 최근에는 분

자생물학의 발달에 힘입어 유전자 치료법이 개발 중이나 아직 실용화단계에 들어서지 못하고 있다. 수술요법과 방사선요법은 국소적인 병소에는 유용하나 전이된 경우에는 여전히 약물요법에 의존하고 있으며 4 치료에도 한계가 있다. 또한 현재의 화학요법은 항암제가 암세포 외에도 정상 세포에도 손상을 초래하는 부작용 때문에 면역기능저하, 골수 기능 장애, 유전인자 손상 등을 야기한다. 따라서 부작용을 감소시키면서 암세포에 대한 특이적인 독성을 나타내는 항암제를 합성물질이 아닌 천연물질에서 개발하려는 노력이 시도되고 있다.

韓醫學에서는 '大腸癌' 이라는名稱은 없으나 下焦濕熱, 腸風, 鎖肛痔, 腸覃, 腸癰, 積聚, 便血, 下痢, 腸

· 접수 : 2004년 4월 10일 · 채택 : 2004년 5월 6일
· 교신저자 : 김현일, 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 3내과 의사실
(Tel. 02-958-9140 Fax. 02-958-9136, E-mail : khymkm@haumir.com)

癰疽 등을 대장암의 범주로 볼 수 있다⁶. 大腸癌의 治法으로는 清熱解毒, 祛濕攻積, 健脾化濕, 溫補脾胃, 養陰清熱, 補氣養血 하는 방법으로 분류되며, 크게 扶正法과 祛邪法 및 扶正과 祛邪를 併用하는 扶正祛邪法 등으로 요약할 수 있다. 이중 扶正法에 대한 한방 약제와 방제는 다양하게 개발되어 왔으나 祛邪效能 이 강한 약제의 개발은 아직 미진한 상태이므로 祛邪藥材의 개발이 시급하다.

斑蝥는 異名으로 斑猫라고도 하며, 芫青科에 屬한 昆蟲의 乾死體로서 破血散結, 攻毒蝕癬, 逐瘀하는 效能이 있다. 실험적으로는 斑蝥가 위암세포에 대하여 증식억제효과 및 殺傷 효과가 있고¹⁰, 黑生腫에 대해 항암효과가 있으며¹⁰ 斑蝥湯劑와 물 추출물에 항암작용을 유도하는 유의한 성분이 존재한다고 보고되었으나¹¹ 斑蝥가 대장암세포주에 대한 효과나 작용기전에 대한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 斑蝥의 항암효과를 실험적으로 연구하기 위하여 인체의 대장암세포주 SNU-C5를 이용하여 대장암세포의 형태학적 변화, trypan blue exclusion test를 이용하여 암세포에 대한 살상효과, mitochondria 막전위에 미치는 영향 및 세포주기에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

이 실험에 사용한 약재는 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입, 정선한 후 사용하였다.

약명	학명	생약명
斑蝥	<i>Mylabris phalerata</i> Pall.	<i>Mylabris phalerata</i>

2) 검액의 조제

5g의 斑蝥를 증류수 100ml에 넣어 125℃에서 30분간 끓인 후 0.2m의 syringe filter로 여과하여 검액

을 얻어 실험에 사용하였다.

3) 대장암세포

이 실험에서 사용한 細胞柱는 한국세포주은행으로부터 구입한 SNU-C5 (human colorectal adenocarcinoma)이다.

2. 방법

1) 대장암세포 배양

세포를 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37℃, 5% CO2 incubator에서 배양하였다.

2) 약물 처리

검액은 5g/100ml의 농도로 사용하였고 세포 배지 ml당 검액 10 μl를 투여하여 비교시간대별로 약물작용을 관찰하였다. 이때 대조군은 대장암세포에 아무런 처리도 하지 않은 것을 사용하였다.

3) 대장암세포의 형태학적 변화 관찰

배지 1 ml당 10 μl의 검액을 투여하여 24시간 경과 후 세포를 도립현미경 하에서 형태학적 변화를 관찰하였다.

4) 대장암세포의 殺傷효과 측정

배지 1 ml당 10 μl의 검액을 투여하여 0, 6, 12, 24, 48시간 경과 후 세포를 회수하여 1 × 10⁶ /ml의 농도로 세포부유액을 만들었다. 세포부유액, HBSS, 0.4% trypan blue를 각각 0.5 ml, 0.3 ml, 0.2 ml의 비율로 섞은 후 5분간 放置한 후 10분 이내에 푸르게 염색된 세포의 비율을 도립현미경 하에서 측정하였다.

5) Mitochondria 막전위 측정

배양중인 각각의 세포에 배지 1 ml당 10 μl의 검액을 투여하여 24시간 경과 후 400 nM의 Mitotracker (Mitotracker Red CMXRox, M-7512, Molecular Probes)로 20분간 incubation하였다. 세포를 회수한 후 PBS로 3번씩 세척하고 형광현미경과 flowcytometer(FACScalibur, Becton Dickinson, CA)로 fluorescent intensity를 측정하였다.

6) 대장암세포의 세포주기 측정

대장암세포의 세포주기에 미치는 영향을 측정하기 위해서 세포를 배지 1 ml당 10 μl의 검액을 투여하여

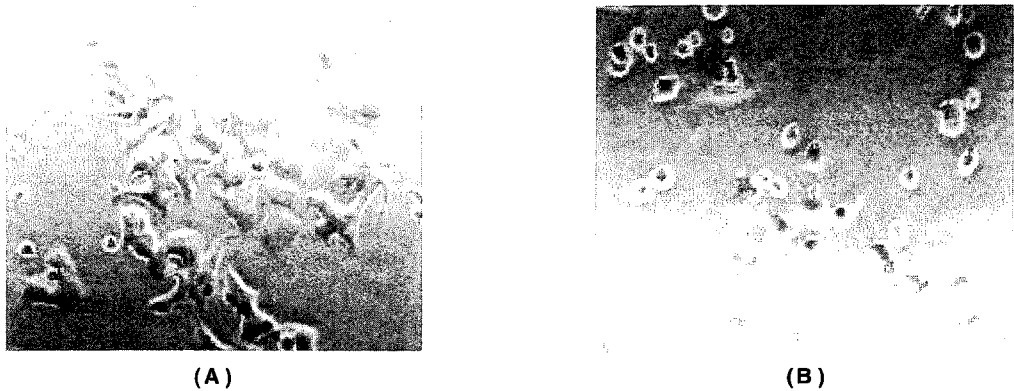


Fig. 1. Microscopic appearances of SNU-C5 cells by Mylabris phalerata.

A: Control group

B: Experimental group treated by Mylabris phalerata for 24 hr.

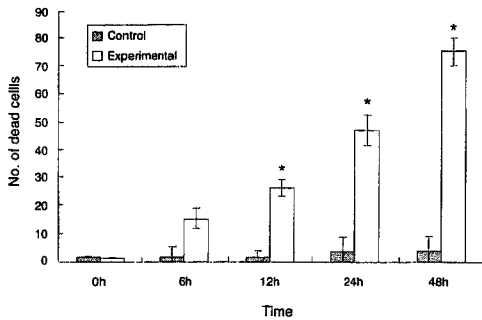


Fig. 2. Time dependent cell death effects of Mylabris phalerata on SNU-C5 cells. The number of dead cells was determined by trypan blue assay. (*: $p < 0.05$)

48 시간 경과 후 세포를 회수하여 PBS에 5분간 3회 세척한 후 propidium iodide (100 $\mu\text{g/ml}$)로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 incubation한 후 flow cytometry를 이용하여 세포주기를 측정하였다.

3. 통계처리

각 실험군과 대조군 사이의 유의성 검사는 paired Student's t-test, -test를 시행하였으며 $p < 0.05$ 를 유의성 있는 결과로 판정하였다.

III. 成績

1. 대장암세포의 형태학적 변화 소견

斑蝥 가 대장암 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 배지 1ml당 10 μl 의 검액을 투여하여 24 시간 경과 후 세포를 독립현미경하에서 관찰하였다. 대조군의 경우 세포는 부착성 세포이기 때문에 dish의 late에 온전한 모양대로 부착되어 있으나 검액을 투여한 실험군에서는 세포가 손상을 입어 둥그란 모양으로 오그라들어 plate에서 떨어져 나와 浮遊되면서 죽어 가는 전형적인 세포 소견이 관찰되었으며 약물 처리 24시간 후 형태학적 변화는 Fig. 1과 같다. 이러한 변화로 볼 때 斑蝥은 대장암세포에 대한 殺傷효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. 대장암세포의 殺傷효과

독립현미경으로 확인한 斑蝥의 대장암세포에 대한 殺傷효과가 시간이 경과함에 따라 어떤 효과를 보이는지 알아보기 위해 대장암세포에 검액을 처리하고 6, 12, 24, 48시간동안 배양하였다. 시간이 경과 후 대조군과 실험군의 세포를 회수하여 trypan blue exclusion test를 하였다. Trypan blue exclusion test는 살아있는 세포의 경우 trypan blue에 염색되지 않고 투명하게 보이며 죽은 세포의 경우 파란색으로 염색

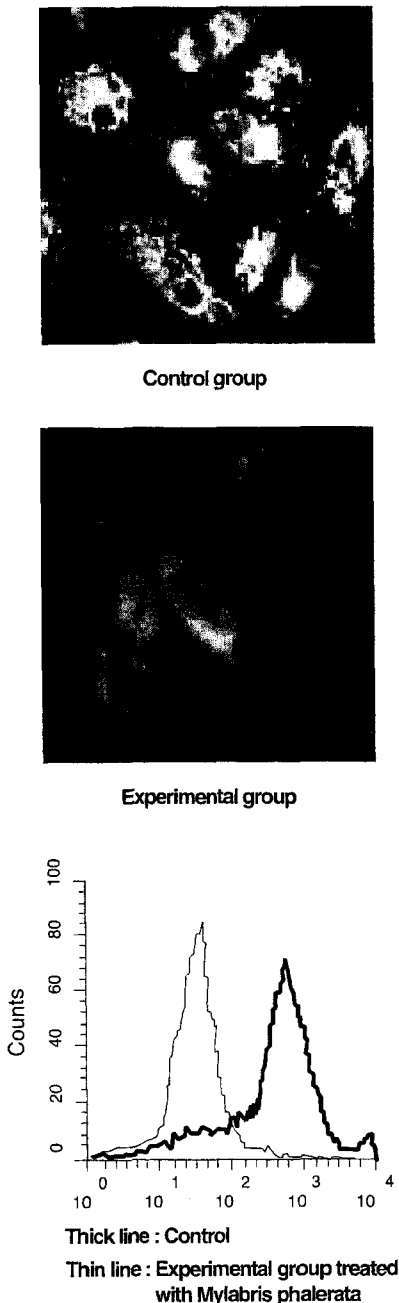


Fig. 3. MitoTracker Red CMXos staining of SNU-C5 cells. SNU-C5 cells were incubated with the dye for 30 min at 37°C and then washed and measured by fluorescent microscopy and flowcytometer.

되므로 염색된 세포 수를 세어 통계처리 하였다.

그 결과 斑蝥는 검액 처리 후 12 시간 제 통계적으로 의미 있는 殺傷효과를 보였으며 24 시간에는 53%, 48 시간에는 80%의 殺傷효과를 보였다. 즉 斑蝥는 시간이 경과함에 따라 대장암 세포에 대해 높은 殺傷효과를 나타냈다(Fig. 2).

3. Mitochondria 막전위 변화에 대한 효과

斑蝥가 대장암세포에 높은 殺傷효과를 갖는다는 점을 확인한 후 斑蝥가 어떤 기전으로 대장암세포에 독성을 보이는지 알아보기 위해 mitochondria의 막전위변화를 측정하였다.

세포를 mitotracker로 염색하면 세포가 손상을 받지 않은 경우 mitochondria는 mitotracker에 염색되어 형광현미경하에서 붉은 색으로 보이게 된다. 그러나 어떠한 이유로 세포의 mitochondria가 손상되면 mitochondria의 막전위가 감소하여 mitotracker로 염색했을 때 염색이 되지 않고 어둡게 보이게 된다.

본 실험에서 대조군 세포는 손상을 입지 않아 세포안의 mitochondria가 붉게 염색이 되어 있지만 斑蝥를 처리하여 손상을 입은 세포는 mitochondria가 염색되지 않아 어둡게 보였다.

斑蝥에 의해 막전위가 감소하는 것을 다시 한번 확인하기 위해 flowcytometry로 측정해 보았다. Flowcytometry로 막전위도를 측정하게 되면 그래프의 가로축 오른쪽으로 갈수록 막전위도가 높은 것인데 실험 결과 실험군은 대조군의 왼쪽에 분포함으로써 실험군이 대조군에 비해 현저히 막전위도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 斑蝥가 대장암세포의 mitochondria에 손상을 주어 결국 대장암 세포에 殺傷효과를 갖는다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

4. 대장암세포의 세포주기에 대한 효과

斑蝥가 갖는 殺傷효과의 기전을 더 알아보기 위해 Propidium iodide로 세포주기를 분석하였다. Propidium iodide (PI)는 DNA binding dye로서, PI로 염색한 세포를 flowcytometry로 측정하게 되면 각각

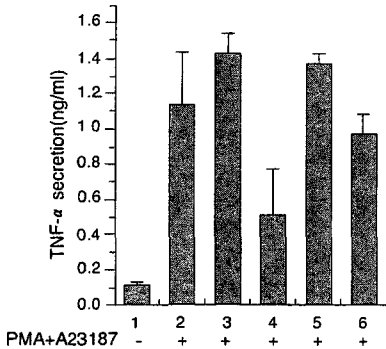


Fig. 4. PI staining of cell cycle measured by flowcytometry. SNU-C5 cells were incubated with medium or medium containing MP for 48 h and stained with PI.

(Thin line : Control group, Thick line : Experimental group treated with Mylabris phalerata)

의 세포에 대한 DNA 양에 따라 세포 주기의 단계인 G1, S, G2, M phase의 특징적인 peak가 보이게 된다. 본 실험에서 실험군과 대조군의 세포주기를 분석한 결과 대조군은 보통의 암세포와 같이 2개의 peak를 보이는데 실험군은 그러한 peak가 사라지고 그래프의 가로축 왼쪽이 두껍게 나타났다. 즉 斑蝥의 독성 때문에 대장암세포의 DNA들이 깨졌음을 알 수 있었다(Fig.4).

IV. 考 察

암이란 세포의 증식을 조절하는 기전이 파괴되어 무분별한 세포 증식에 의해 세포 덩어리가 형성되고 결국 주변의 조직을 침범하거나 혈관을 통해 몸의 다른 부위로 전이하는 질병이다¹². 암의 발생원인은 부모로부터 물려받는 유전적 원인도 있으나 대부분 암을 일으키는 물질 (carcinogen), 흡연, 식이, 바이러스 감염 등에 의해 일어나며 오랜 기간에 걸쳐 여러 가지 요인들이 복합적으로 작용하기 때문에 나이가 들면서 급격히 발생하게 된다.

대장암은 일반적으로 '선진국형' 암으로 인식되어 왔으나 우리 나라에서도 생활수준이 서구화되어 감에 따라 1980년대 이후 그 발병률이 꾸준히 증가하

고 있으며 99년도 이후 지금까지 전체 암에서 차지하는 비율이 4위를 차지하고 있는 실정이다'. 대장암의 발병은 유전적 요인보다 식이, 환경적 요인이 크게 작용할 것으로 추측되고 있는데 식이 습관의 차이에 따라 발병률이 다르며 육체적 활동량이 많은 직업에서 대장암 발병률이 낮아진다는 보고도 있다.¹³ 또한 환경 요인이나 식이 요인이 중요한 것으로 인식되는 증거로는 일본에 거주하는 일본인보다 하와이나 캘리포니아에 거주하는 이민간 일본인 1세와 2세에서 대장암의 발병률이 높거나 아시아나 아프리카에 사는 유대인보다는 유럽에 거주하는 유대인에게 발병률이 높다는 점을 들 수 있다¹⁴.

한의학문헌에 '大腸癌'이라는 명칭은 없으나, 일찍이 <內經>에 나타나는 '腸癰(腸澼)'이라는 말이 이와 상응하는 병증으로 보여지며⁵. 대장암의 대표적인 임상증후 및 특징인 便血, 粘液便, 疼痛, 便通異常 등에 근거하면, <內經>, <外科正宗> 등의 下焦濕熱, 腸風, 鎖肛痔, 腸覃, 腸癰, 積聚, 臟毒, 便血, 下痢, 腸癰疽 등을 大腸癌의 範疇로 볼 수 있다. 대장암은 고문헌의 痔?病症에 관한 묘사중에서 많이 보이고 있는데, 이에 대해 陳實功은 <外科正宗·痔瘡論>중에서 '積毒深者, 其形異而頑惡; ...終至傷人'이라 하였으며 이것은 항문 및 직장의 惡性腫瘍을 가리키고 있음을 알 수 있다.

한편, 한의학에서의 발병개념을 살펴보면, 어떤 발병인자의 영향아래 인체의 '陰平陽秘'한 정상생리의 평형이 파괴되어 '陰陽失調'가 된 것으로 인식하고 있다. 즉, 질병의 발생은 正邪相爭의 결과인데, 정기의 虛弱은 발병의 내적 조건이 되고 邪氣의 強弱은 외적 조건이 된다고 보았으니, 이에 대하여 <內經>에서는 '正氣存內 邪不可干' '邪氣所湊 其氣必虛'라 하였다^{14,15}. 따라서 한방적 원인은 주로 臟腑氣血 陰陽의 失調에 기인하는데 正氣虛의 內的 條件하에서 外邪侵入 혹은 痰, 濕, 氣, 瘀 등이 搏結하여 오래되면 積滯가 형성된 것이다.

대장암의 증상은 발생부위, 크기, 진행 정도 및 합병증에 따라 차이가 있는데 그중 해부학적 위치가 가장 큰 관건이 된다¹⁶. 일반적인 증상은 피로감, 무기

력, 체중감소, 빈혈, 혈변, 하복부둔통, 배변습관의 변화, 혈변 등이 나타난다. 대장암의 진단방법은 직장수지검사, S-결장검사, 대장 X-선 조영술, 대장내시경검사, 직장초음파 검사, 분변잠혈검사, 및 CEA 수치검사 등이 있는데 전암성 병변인 선종 단계에서 발견, 제거하면 예방이 가능하고 조기에 진단하면 완치도 가능하다¹⁷.

대장암에 대한 양의학적 치료방법은 수술요법, 방사선요법, 약물요법 등이 사용된다². 수술요법은 가장 효과적인 대장암 치료방법이며 수술요법이 불가능한 경우에 방사선 요법과 약물 요법이 중심이 된다. 약물요법은 cytotoxic drug를 경구나 주사로 투여하여 암세포의 증식에 필요한 DNA나 관련된 효소를 파괴하거나 억제하는 방법이다. 약물요법이 방사선 치료나 수술요법에 비해 몸의 어느 부위라도 약물이 도달하고 전이된 암을 치료할 수 있기 때문에 재발 또는 전이성 암에 광범위하게 사용되고 있다. 약물요법은 크게 화학요법제와 생물요법제로 분류되는데 화학요법제로는 알킬화제(alkylating agent), 대사 길항제(antimetabolite), 항생제, 식물유래 알칼로이드, 호르몬제가 있으며 생물요법제에는 면역치료제인 사이토카인 및 재조합 단일클론 항체가 있다.

그러나 현재까지 개발된 항암제의 가장 큰 단점은 항암제의 비특이적 작용이라 할 수 있는데 정상세포까지 영향을 미치기 때문에 원하지 않는 부작용을 나타내는 경우가 많다. 항암제는 왕성하게 증식하는 세포에 영향을 주기 때문에 인체에서 항상 새롭게 증식하는 골수, 모낭, 위장관 내피세포는 항암제의 영향을 많이 받아 면역에 관계하는 백혈구, 적혈구, 혈소판 등이 감소하여 세균감염, 출혈, 탈모, 오심 구토 등의 부작용을 겪게 된다. 따라서 최근 여러 새로운 방향의 연구들이 이루어지고 있는데 그 중 한의학의 암치료의 장점과 서양의학의 암치료의 장점을 결합한 동서의 결합치료도 연구되고 있다.

암에 대한 한의학에서의 治法을 살펴보면, 扶正培本, 活血化瘀, 清熱解毒이 매우 중요한 기본원칙이 되고 있으며, 각각의 腫瘍에 대해서는 辨證論治에 따라 治療가 시행되고 있다¹⁸.

대장암의 변증분류 및 치법으로는 濕熱蘊毒型, 脾虛蘊濕型, 脾腎兩虛型, 寒濕凝滯型, 肝腎陰虛型, 氣血虛損型으로 나눌 수 있으며, 濕熱蘊毒型에는 清熱解毒, 祛濕攻積하고, 脾虛濕熱型에는 健脾化濕, 清熱解毒하며, 脾腎兩虛, 寒濕凝滯型에는 溫補脾腎, 祛濕化濁하고, 肝腎陰虛型에는 滋補肝腎, 養陰清熱하며, 氣血虛損型에는 補氣養血, 扶脾益腎하는 것으로 요약된다^{7,18}. 즉, 內因 및 外因의 작용으로 濕熱蘊毒되어 腫이된 것이 대장암의 標이고, 脾腎虧虛로 正氣不足한 것이 대장암 原因의 根本으로 요약된다. 이는 암세포의 성장 억제 및 면역 기능 활성화를 통한 부작용 억제 등 전체적인 생체 조절효과를 기대하는 治療法이다.

이에 따라 한의학계에서는 직접적인 증양치료에 관한 연구가 많이 이루어졌으며 항암요법의 부작용을 경감시키고 환자의 면역기능을 강화하는 방면의 연구 역시 활발히 이루어져 왔다^{19,20,21,22}.

斑蝥은 芫青科에 屬한 昆蟲의 乾死體로써, 일반적으로 크기와 產地에 따라 大斑蝥와 小斑蝥로 분류된다⁸. 이번 실험에 사용된 斑蝥은 大斑蝥로써, 性味는 辛寒有毒하며, 歸經은 肝胃腎이다. 斑蝥의 주성분은 cantharidin(C₁₀H₁₂O₄)으로 약 1.2%가 함유되어있으며, 이외에도 脂肪, 樹脂質, 蟻酸, 色素 등을 함유하고 있으나 그 함량은 종류와 산지에 따라 다르다. 그 效能 및 主治는 《本草求真》에서 '外用하면 攻毒死瘡를 治하고, 內服하면 破瘀散結한다' 하였다²³. 斑蝥은 攻毒蝕瘡, 破血散結, 逐瘀하는 효능이 있어 임상적으로 原發性肝癌, 胃癌, 食道癌, 乳腺癌, 肺癌, 皮膚癌등을 치료하고 또한 癰疽, 頑癬, 狂犬咬傷, 斑禿, 風濕痛, 神經痛을 治療하는데 사용하기도 한다²³.

그러나 斑蝥은 有毒하여 東醫寶鑑에서는 "生用則吐瀉"²⁴라 하였고, 많은 문헌에서 體弱者, 孕婦에게 금해야 한다고 하였으며, 消化管과 腎臟機能에 강렬한 자극이 있기 때문에 消化性潰瘍患者, 腎氣能不全患者는 服用을 금한다²³.

斑蝥은 부작용을 유발하는 毒性이 있지만 최근에 斑蝥가 위암세포에 대하여 增殖抑制效果 및 殺傷效

과가 있음이 보고되었고^{9,11,25}. 최근 斑蝥 부탄을 분획물이 human monocytic leukemia U937 cell에서 apoptosis를 유발하여 항암 작용을 발휘했다는 보고가 있다²⁶.

그러나 아직 대장암세포에 대한 斑蝥의 항암작용에 관한 보고가 없기에 저자는 인체 대장암세포주 SNU-C5를 대상으로 대장암세포의 살상효과, 그리고 항암작용의 기전을 밝히기 위한 일환으로 mitochondria의 막전위변화 및 세포주기에 대한 효과를 관찰하였다.

항암제의 작용기전을 밝히기 위해서는 먼저 대상 약제가 암세포의 생존에 미치는 효과를 측정하는 것이 일차적이다. SNU-C5는 부착성 세포인데 세포가 죽으면 배양액에 부유한다. 24 시간 경과 후 세포를 倒立顯微鏡下에서 관찰한 결과 斑蝥를 처리한지 12 시간이 경과하면서 부유하는 세포가 크게 증가하였다. 斑蝥의 살상효과를 정량화하기 위해 trypan blue assay를 수행하였다. 살아있는 세포의 경우 trypan blue에 염색되지 않고 투명하게 보이나 죽은 세포의 경우 파란 색으로 염색되는데 전체 세포수와 염색된 세포 수를 세어 살상율을 측정하고 斑蝥를 처리한지 12 시간 경과 후부터 통계적으로 유의성 있는 殺傷效果를 보였으며 24 시간에는 53%, 48 시간 후에는 80%의 殺傷效果를 보였다. 斑蝥는 시간이 경과함에 따라 대장암 세포에 대해 높은 殺傷效果를 갖는다는 것을 알 수 있었다.

斑蝥가 大腸癌細胞에 높은 殺傷效果를 갖는다는 점을 확인한 후 斑蝥가 어떤 기전으로 대장암 세포에 독성을 보이는지 알아보기 위해 mitochondria의 막전위변화를 측정하였다. mitochondria는 세포에 에너지를 만드는 기관으로 mitochondria가 손상을 입어 막전위에 변화가 생기게 되면 세포는 에너지를 생산해 낼 수 없게 되고 따라서 세포는 결국 죽게 되므로 세포가 죽게 되는 다양한 경로를 연구하고자 할 때 mitochondria의 막전위 변화 여부에 대한 조사는 중요한 의미가 있다. mitochondria는 세포 사멸 과정을 조절하는 역할을 하는 細胞內 小器管이다. mitochondria에 의한 세포사멸 조절은 permeability

transition pore (PTP)라는 구조와 밀접한 연관이 있다²⁷. PTP는 mitochondria 내막과 외막이 만나는 부위에 존재하며 voltage dependent anion channel (VDAC), adenosine nucleotide translocator (ANT), cyclophilin D라는 단백질로 구성되어 있다. 만약 PTP가 열리면 cytochrome c가 細胞질 내로 유리되어 caspase-3/9를 活性化시켜 세포사멸이 誘導된다. 세포사멸에 관계하는 bcl-2 계열 단백질은 PTP의 構成成分과 결합하여 pore를 열거나 닫음으로써 mitochondria 간질에 존재하는 cytochrome c의 유리를 調節한다. 예컨대, bcl-2의 경우 VDAC와 결합하여 pore를 닫아 cytochrome c의 유리를 억제함으로써 세포사멸을 억제하고 bax의 경우는 ANT와 결합하여 pore를 열어 cytochrome c이 유입됨으로써 세포사멸을 유도하게 된다. PTP를 조절하는 기전으로는 mitochondria 막전위가 있는데 mitochondria 막전위의 소실은 PTP를 열게 하고 이는 세포사멸을 유도하는 신호가 된다. 따라서 mitochondria 막전위를 조절하는 물질을 이용한 항암제 개발에 관한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.

세포를 mitotracker로 염색하면 세포가 손상을 받지 않은 경우 mitotracker가 mitochondria에 염색되어 형광현미경하에서 붉은 색으로 보이게 된다. 약물을 투여하지 않은 대조군 세포의 경우 막전위가 감소하지 않아 mitotracker가 mitochondria내로 스며들어 염색이 진하게 되지만 약물처리 등으로 세포손상을 입어 mitochondria의 막전위가 감소하게 되면 mitochondria로부터 mitotracker가 빠져나와 염색이 대조군에 비해 약하게 되거나 염색되지 않아 어둡게 보인다. 본 실험에서 대조군에서는 세포에 손상을 입지 않아 세포내 mitochondria가 붉게 염색이 되어 있지만 斑蝥를 처리하여 손상을 입은 세포는 mitochondria가 염색되지 않아 어둡게 보였다.

Flowcytometry로 mitochondria의 막전위도를 측정할 경우 대조군의 막전위도는 높게 나오나 실험군의 경우 대조군에 비해 현저히 막전위도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 SNU-C5에 대한 斑蝥의 살상효과에 mitochondria의 손상이 관여함을 알 수 있었다.

세포는 개체가 살아 있는 동안은 꾸준히 분열, 증식 및 분화를 반복하게 되는데 수많은 세포주기 조절인자들에 의하여 외부환경 및 내부인자들의 상태를 정확히 인지하고 판단하여 적절한 시기에 적절히 분열 혹은 분화하도록 조절되고 있다²⁸. 세포주기는 한 세포가 성장하여 두 세포로 분열되는 과정으로 G1 phase, S phase, G2 phase 및 M phase의 4 단계로 편이상 나누고 있다. 이들 4 단계는 세포주기의 핵에서 일어나는 변화를 기준으로 나누어진 것으로 G1 phase는 첫 번째 휴지기로 세포가 분열된 직후 다음의 성장과정을 시작하기 이전에 필요한 세포내 인자를 구비하고 적절한 크기의 세포가 되도록 준비하는 기간으로써, 이 때 다음 과정인 S phase로 가기 위한 충분한 세포내 인자들이 만들어지지 않으면 다음 phase로 가지 못하게 조절하는 첫 번째 check point가 있다. 이 check point를 G1 check point라고 하며 이곳에서는 다음 세포주기가 시작될 수 있는지 여부를 조사하며 만약 세포가 준비가 되어 있지 못하면 cell cycle의 진행을 차단하여 세포가 G1 phase에서 정지되도록 조절한다. 일단 G1 check point에서 세포가 성장과정으로 갈 수 있는 조건이 이루어졌다고 판단되면 세포는 S phase로 넘어 간다. 최근 들어서 G1 check point 조절에 관한 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 왜냐하면 세포가 S phase로 들어가서 증식할 것인지, 아니면 DNA 손상이나 기타의 장애가 너무 심하여 apoptosis로 죽을 것인지 여부가 주로 이 단계에서 결정되기 때문이다. S phase에서는 DNA의 복제가 이루어지는 시기로서 한 염색체에서 두 copy가 되면 다음에는 두 세포로 분열되기 위해 핵 이외에 세포질내의 여러 인자들이 복제되어야 한다. S phase가 끝나면서 세포는 제 2 정지기인 G2 phase로 넘어가는데 이때 필요로 하는 세포질의 인자들이 생산되면서 한 세포가 두 세포로 분열되는데 필요한 인자들이 모두 만들어지는 시기이다. G2 phase에서 M phase로 넘어가는 시점에 G2 check point가 있는데 이곳에서는 실제로 세포의 분열이 일어날 수 있는지 여부를 검토한다. 만약 세포분열이 일어날 준비가 안 되어 있으면 세포주기는 G2 phase

에서 멈추게 된다. 일단 G2 phase에서 한 세포가 두 세포로 될 수 있는 모든 준비가 되어지면 세포주기는 M phase로 넘어간다. M phase에서는 세포질의 분열이 일어나며 세포벽이 생기면서 한 세포가 두 세포로 실제로 나뉘어 지는 시기인 것이다.

일단 한 세포주기가 끝나면 한 세포는 계속 세포주기를 돌고 다른 한 세포는 고유의 세포로 분화한다. 특정한 세포 즉 肝細胞는 안정세포이므로 한 세포주기가 끝나면 G0 phase로 들어가고 특정한 자극이 올 때까지는 고유의 기능을 행한다. 적당한 자극이 주어지면 세포는 G1 phase로 들어가서 세포의 주기를 돌게 되며 증식을 하게 되지만 G1 phase에 영구적으로 머무는 세포는 최종적으로 분화되어 있어 세포주기로 다시 돌아가지 못하고 결국 노화에 이르게 된다.

최근 세포주기를 조절하는 기전에 관한 지식이 급속도로 증가함에 따라 암세포의 증식을 억제하는 약제들의 작용기전을 세포주기의 조절과 연관하여 이해하는 것이 가능하게 되었다. 예를 들면 黑色腫에서 세포증식을 억제하는 TGF- β 는 G1 phase에서 S phase로 이행하는 과정을 억제시킨다고 알려져 있으며²⁹ 또한 위암세포에서도 Interleukin-4가 G1 phase에서 S phase로의 세포주기 과정을 억제한다는 보고가 있다³⁰. 따라서 항암효과를 검증하고 그 작용기전을 밝히기 위해서는 약제가 암세포의 세포주기에 미치는 영향을 분석하는 것이 필요하다.

본 실험에서 斑蝥를 처리한 實驗군과 처리하지 않은 對照群의 세포주기를 분석한 결과 對照群은 보통의 암세포와 같이 peak를 보이는데 斑蝥를 처리한 實驗군은 그러한 peak가 사라지고 그래프의 가로축 왼쪽이 두껍게 나타났다. 이러한 현상은 세포내 DNA가 모두 깨져서 나타나는 현상으로 斑蝥의 독성 때문에 대장암세포의 DNA들이 깨진 것이다. 세포가 증식이 억제되어 결국 죽게 될 때는 세포주기가 본 실험에서처럼 DNA가 모두 깨져서 일어나는 경우도 있지만 세포주기 중 어느 한 단계에 정지되어 죽게 되는 경우도 있다. 그런 경우 해당하는 주기의 peak가 대단히 높게 나오게 되는데 斑蝥의 경우

그런 세포주기의 정지가 일어나는 것이 아니라 세포 내 DNA가 깨져서 죽게 된다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과들로 볼 때 斑蝥 대장암세포에 독성을 보이며, 그런 기전으로는 대장암 세포내 mitochondria의 막전위를 떨어지게 하여 세포내 에너지를 만들어내는 중요한 기관인 mitochondria를 손상 시킴으로서 세포를 죽게 하며 또한 세포내 DNA를 파괴하여 결국 세포에 강한 살상효과를 보인다는 것을 알 수 있었다.

V. 結 論

대장암세포주 SNU-C5에 대한 斑蝥 의 항암효과를 규명하기 위하여 대장암세포의 형태학적 변화, trypan blue exclusion test를 통한 대장암세포에 대한 살상효과, mitochondria 막전위 변화에 대한 효과 및 대장암세포의 세포주기에 미치는 영향을 관찰하여 대장암세포 사멸에 대한 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 검액 투여 12시간 이후부터 부유되어 죽어가는 세포가 크게 증가하기 시작하여, 대장암세포 SNU-C5에 대하여 확실한 형태학적 변화를 나타내었다.
2. Trypan blue exclusion test를 통한 大腸癌細胞株 SNU-C5의 死滅效果는 藥物處理後¹⁾ 時間 經過 時부터 統計的으로 의미 있는 殺傷效果를 보였으며²⁾ 時間에는 53%, 48時間 後에는 80%의 殺傷效果를 보였다.
3. 斑蝥 를 처리한 實驗群은 對照群에 비해 현저히 mitochondria의 막전위를 감소시켰다.
4. 對照群은 보통의 암세포와 같이 2개의 peak를 보이는데 斑蝥 를 처리한 實驗群은 그러한 peak가 사라지고 그래프의 가로축 왼쪽이 두껍게 나타났다.

이러한 결과들로 볼 때 斑蝥 는 대장암세포에 독성을 보이며, 그런 기전으로는 대장암 세포내 mitochondria의 막전위를 떨어지게 하여 세포내 에너지를 만들어내는 중요한 기관인 mitochondria를 손상 시킴으로서 세포를 죽게 하며 또한 세포내 DNA를

파괴하여 결국 세포에 강한 殺傷 效果를 보인다는 것을 알 수 있었다.

參考文獻

1. 통계청. 사망원인통계. 042-481-2259,61. Available at http://www.nso.go.kr/cgi-bin/sws_777pop.cgi?A_REPORT_ID=MA&A_CONTENTS=1502&..A_LANG=1.
2. 안순길. 항암제 연구개발 동향. 보건산업기술동향. 2003(여름):10-19.
3. Wu L, Sato MD. Integrated, Molecular Engineering Approaches to Develop Prostate Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther* 2003;3(5):452-67.
4. 김홍태, 서창인, 김시영, 허대석, 방영주, 김노경. 진행 대장암환자에 대한 5-fluorouracil 및 재조합 감마 인터페론 병용요법의 치료효과. *대한암학회지*. 1992; 24(5): 743-58.
5. 김정범, 안규석. 대장암의 동서의학적 비교연구. *동의병리학회지*. 1995;10:89-126.
6. 전병욱. 癌에 대한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 관한 考察. *대한한방중앙학회지*. 1995;1(1):47-61.
7. 김병주, 문구. 大腸癌의 東西醫 結合 診治 近況. *대한한방중앙학회지*. 1999;5(1):1-17
8. 이상인. 본초학. 서울 : 수서원; 1981, p.326-7.
9. 류봉하, 김진성, 이지향, 박재훈, 지성길, 유진화. 수종 한약재의 위암세포에 대한 항암작용 효능 검색 및 약리작용에 관한 분자 생물학적 연구. *대한한방중앙학회지*. 1995;5(1):47-60.
10. 장성은. 山慈姑, 蟾酥, 斑蝥 가 TXM18 흑생종에 미치는 항암효과에 대한 연구. *경희대학교 대학원*. 2001.
11. 朴宰民. 斑蝥 分割成分의 胃癌細胞에 대한 死滅效果 및 作用機轉에 關한 研究. *경희대학교 대학원*. 2002.
12. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease*. USA:Saunders; 1994, p. 241-2.
13. 김미숙, 전점이, 손경희. 대장암 환자의 생활양상에 관한 연구. *성인간호학회지*. 2002;14(3):390-400.
14. 최승훈. 內經병리학, 서울:통나무; 1993, p.54-5, 77-8, 99, 169-70, 221-35, 301-2, 398-403, 477-83.
15. 문준진, 안규석, 최승훈. *동의병리학*. 서울: 고문사; 1990, p.78-90.

16. 최영상, 안승익. 청장년에서 대장 및 직장암의 임상적 고찰. 대한암학회지. 1991;23(2):357-65.
17. 정승용. 대장암 조기검진을 위한 권고안. 대한소화기내시경학회지. 2002;24:317-20.
18. 최승훈. 한의학의 腫瘍에 대한 認識과 病理論. 대한한방중앙학회지. 1995;1(1):11-28.
19. 李太業. 加味香砂六君子湯이 생쥐 소장에서 방사선 조사 후 保護效果와 Apoptosis에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 2000.
20. 강재만. 半夏厚朴湯이 抗癌및 免疫調節作用에 미치는 影響. 대한한방중앙학회지. 1996;2(1):57-73.
21. 김진성. 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸의 抗癌效果와 免疫反應에 관한 研究. 대한한방중앙학회지 1997;3(1):1-27.
22. 전우현 류기원 류봉하 윤상협. 整腸補脾湯의 胃液分泌, 腸管輸送能 및 抗癌效果에 관한 研究. 경희한의대논문집. 2000;23(1):17-34.
23. 박미형. 조충관. 斑蝥에 관한 문헌적 고찰. 대한한방내과학회지. 1995;15(2):912-6.
24. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大成出版社; 1995, p.570.
25. 김병주, 문구. 胃癌의 東西醫學的診治概括. 대한한의학회지. 1996;17(2):100-16.
26. Jeong-Eun Huh, Kyng-Sun Kang, Kyoo-seok Ahn, Dong-hee Kim, Ikuo Saiki, Sung-Hoon Kim. Myalabris phalerlata induces apoptosis by caspase activation following cytochrome c release and Bid cleavage. Life Sciences. 2003; 73:2249-62.
27. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J. 1999;341:233-49.
28. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD. Molecular Biology of The Cell. USA: Garland Publishing. 1994, p.863-70.
29. Florenes VA., Bhattacharya N., Bani MR., Ben-David Y., Kerbel RS., Slingerland JM. TGF-beta mediated G1 arrest in a human melanoma cell line lacking p15INK4B; evidence for cooperation between p21Cip1/WAF1 and p27Kip1. Oncogene. 1996;13(11):2447-57.
30. Essner R., Huynh Y., Nguyen T., Rose M., Kojima M., Hoon DS. Functional. interleukin-4 receptor and interleukin-2 receptor common gamma chain in human gastric carcinoma: a possible mechanism for cytokine-based therapy. J Gastrointest Surg. 2001;5(1):81-90.