대한한방내과학회지 제26권 1호(2005년 3월)
Korean J.Orient.Int. Med. 2005:26(1):48-59

瓦松이 HepG2 cell의 세포분열 및 관련유전자 발현에 미치는 영향

문영훈, 김영철, 이장훈, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of *Orostachys japonicus* on HepG2 Cell Proliferation and Oncogene Expression

Young-Hun Moon, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objectives : The aim of the study was to evaluate the effect of WS on HepG2 cell cycle and expression of related genes.
Methods : The MTT assay, Cell counting analysis, [^{3}H]-Thymidine Incorporation Assay, Flow cytometric analysis, Quantitative RT-PCR were studied.
Results : WS inhibited HepG2 cell proliferation in low concentration(1-10$\mu g/m\ell$) which did not cause direct cytotoxicity, with dose-dependant manner. WS in-hibited DNA synthesis as well. Flow cytometric analysis on the HepG2 cell showed G2/M phase arrest.
Conclusion : These results suggest that WS inhibits HepG2 cell proliferation not by the gene regulation but by G2/M phase arrest in the cell cycle. Thus further studies on the effect of WS in G2/M phase regulation are thought to be needed.

Key Words: *Orostachys japonicus*, HepG2, cell cycle

Ⅰ. 緖 論

우리나라에서 간암은 2003년 인구 10만 명당 22.8명으로 신생물에 의한 사망(133.1명) 중 폐암(26.4명), 위암(24.3명)과 더불어 3대 원인으로 분류되고 있다[1]. 또한 폐암, 췌장암 등과 함께 간암은 진행속도나 예후가 비교적 불량하여 이에 대한 대책이 시급한 실정이다[2].

간암에 대한 최근의 연구는 분자생물학적으로 많은 시도가 있었다. 암형성에 관련되어진 p53, RB1, PTEN같은 tumor suppressor gene[3-5]과 cyclin D1, CDK, c-Fos, c-Jun 등의 oncogene[6]에 관한 연구가 계속되어 왔고, Myc라는 oncogene의 활성을 제거할 경우 간에 종양이 발생하는 과정을 거꾸로 역전개 시킬 수 있다고 하였다[7]. 그리고 B형 간염이 간암으로 진행하는 과정에 특이적으로 작용하는 유전자가 보고되기도 하였다[8].

瓦松은 꿩의비름과의 여러해살이풀 바위솔(*Orostachys japonicus*), 둥근바위솔 (*Orostachys malacophyllus)*의 지상부이다. 味酸苦하고 性은 凉無毒하며, 淸熱解毒, 止血, 利濕, 消腫하는 효능을 갖고 있으며, 민간에 항암효과가 있음이 알려져 많이 사용되고 있다[9].

瓦松에 관한 연구로는 黃[10], 田[11]의 항암효과와 면

· 접수 : 2005. 1. 20 · 채택 : 2005. 2. 22
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118 Fax. 02-958-9120
E-mail : hjwoo@khu.ac.kr)

역반응에 관한 영향, 吳[12]의 암세포감수성에 미치는 영향, 梁[13]의 자연살해세포활성에 미치는 영향에 관한 연구등이 있었다. 그러나 瓦松과 간암에 관한 직접적인 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 저자는 瓦松이 HepG2 cell에 미치는 영향을 관찰하고자, 세포의 증식과 DNA 합성, 세포분열 및 관련유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하여, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 瓦松(WS)은 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해[14]에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였다.

韓藥名	學名
瓦 松	*Orostachys japonicus*

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 瓦松 100g을 3차 증류수 500㎖에 혼합하여 90㎖가 될 때까지 가열, 농축시키고 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Osterode, Germany)를 이용하여 건조추출물 21.5g을 얻었다(수율 21.5%). 얻어진 추출물을 DMEM 배지 110 ㎖에 더하여 37℃에서 3시간 동안 녹였다. 원심분리하여 남아있는 시료를 제거한 상층액을 0.45㎛ 필터(Millipore, USA)로 여과하여 멸균하고 4℃에 저장하였다.

2. 방법

1) 세포배양

인체 간암세포주 HepG2는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockvelle, MD)에서 구입하여 DMEM 90%와 fetal bovine serum 10%의 혼합배지를 이용하여 5%의 CO_2 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

2) HepG2 cell에 대한 검액의 처리

瓦松의 HepG2 cell 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1 x 10^5 cells/well의 밀도로 배양한 후 瓦松을 1, 10, 25, 50, 100 ㎍/㎖의 농도로 12, 24, 48시간동안 처리하였다.

3) MTT assay

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5㎍/㎖을 PBS에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22㎛의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1 × 10^5개의 세포를 포함하고 있는 100㎕의 cell suspension에 10㎕의 MTT stock solution을 첨가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 보존한 후 100㎕의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals을 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570nm에서 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) reader로 optical density(OD)를 측정하였다.

4) Cell counting analysis

瓦松의 HepG2 cell증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1 x 10^5 cells/well의 밀도로 배양한 후 瓦松을 1, 5, 10㎍/㎖의 농도로 24, 48, 72, 96시간동안 처리하였다. 瓦松을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조군 세포는 trypsinization을 통해 회수하였으며 cell counter(Coulter Corp., USA)를 이용하여 세포수를 측정하였다.

5) [^{3}H]-Thymidine Incorporation Assay

세포의 DNA 합성에 미치는 瓦松의 영향을 조사하기 위하여 [^{3}H]-Thymidine Incor-poration Assay를 시행하였다. HepG2 cell을 1 x 10^5 cells/well로 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 새로운 배지로 교환함과 동시에 瓦松 1, 5, 10㎍/㎖을 처리하였다. 瓦松 처리 20시간 후에 1.0 μCi/㎖의

[^{3}H]-Thymidine(Amersham, Arlington Heights, IL)을 4시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양(Count per minute:CPM)은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

6) Flow cytometric analysis

Cells pellete(5 × 10^5)를 0.2 ㎖ PBS에 현탁시킨 후 2㎖의 ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정시켰다. PBS에 강력하게 재현탁시킨 후 100 ㎍/㎖ RNase와 40㎍/㎖ propidium iodide(PI)가 포함된 PBS에서 37℃로 30분간 배양한 후 세포를 회수하여 FACScan(FACS Caliber cellquest program [Becton Dikinson])을 이용하여 cell cycle을 측정하였다.

7) Quantitative RT-PCR analysis

(1) Total Cellular RNA의 추출

Total RNA는 배양된 세포로부터 single-step method에 의해 추출하였다. RNA 추출을 위한 solution D는 GSS solution(250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6㎖의 0.75M sodium citrate, 26.4 ㎖의 10% sarkosyl 그리고 293㎖의 3차 증류수)에 0.1M 농도의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 만들었다. 배양 후 회수된 세포들에 500㎕ solution D와 2M의 50㎕ sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 vortexing 하였다. 500㎕ water-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)을 혼합하여 20초간 vortexing한 후 15분간 얼음에서 방치하였고 20분간 15000g로 원심분리한 후 상층액에 1000 ㎕ cold isopropanol을 혼합하여 -70℃에서 24시간동안 저장한 후 침전시켰다. RNA를 20분간 15000g로 원심분리한 후 RNA pellets을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척하였다. RNA는 30㎕의 RNase-free water에 용해시켰다. 추출된 RNA의 농도는 흡광도 260㎚과 280㎚에서 spectrophotometric measurement (Schimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 측정하였다.

(2) cDNA의 합성

추출된 1 ㎍의 RNA는 M-MLV(Gibco)와 random hexamer를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 1㎍의 추출된 RNA를 2㎕의 reverse transcriptase buffer, 1㎕의 random hexamer(10pM), 1㎕의 M-MLV RT (10U/㎕), 1㎕의 dNTP(10pM), 그리고 0.5㎕의 RNase inhibitor와 혼합하였다. 이 혼합물은 23℃에서 15분간, 42℃에서 1시간 그리고 95℃에서 5분간 반응시켰다. 각각의 RNA로부터 얻어진 2개의 분리된 cDNA는 1:4 또는 1:8로 sterile H_20로 희석하여 PCR 반응에 이용하였다.

(3) PCR 시행

유전자 발현에 대한 정량적 분석을 위하여 cycle numbers(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, and 42 cycles)를 증가시키면서 연속적으로 희석된 cDNAs (1:0, 1:2, 1:4, and 1:8)에 대한 PCR을 시행하였다. 각각의 cycle은 95℃로 1분간의 denaturation, 58-62℃로 45초간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간의 polymerization으로 구성하였다. 50㎕의 PCR 반응에서 12.5-25*ng*의 cDNA는 26-34cycle을 시행하는 동안 housekeeping gene인 GAPDH을 포함한 모든 유전자들의 증폭이 대수적으로 증가함이 확인되었다. RT-PCR 산생물은 1시간동안 110 Volts로 2% agarose gel(FMC, Rockland, ME)을 이용하여 전기영동하였다. Agarose gel은 30분간 ethidium bromide(0.5 ㎍/㎖ of 1 X TBE)로 염색한 후 15분간 1 X TBE로 탈색하였다. PCR 산생물은 자외선을 이용하여 가시화한 후 사진촬영하였다. 사진영상의 음영이 깨끗해지도록 증류수에 적시고 나서 건조시켰다. Unspliced RNA 또는 genomic DNA의 PCR 산생물과 spliced mRNA의 PCR 산생물의 감별을 위하여 3'과 5' primer는 적어도 하나의 intron에 의해 분리되어 각각 다른 exons에 놓여지도록 제작하였다.

(4) RT-PCR 산생물의 densitometric analysis

유전자 발현에 대한 정량화는 ethidium bromide-stained gel을 laser densitometry로 scanning하여 얻었다. Signal intensity의 측정은 Molecular Analyst Program(version 2.0)을 이용하여 laser densitometer(Bio-Rad)로 실행하였다.

RT-PCR 산생물 사진영상의 음영조절부는 지속적으로 scanning하고, 배경의 intensity를 감산한 후 housekeeping gene(GAPDH)의 intensity에 대한 각각의 유전자 발현 intensity의 비율을 계산함으로써 유전자의 발현을 정량화하였다. 각각의 준비된 cDNA는 최소 2회의 정량적 RT-PCR을 반복 시행하였다.

III. 結 果

1. MTT assay를 이용한 cell viability 분석

瓦松의 항암효과에 대한 분석에 앞서 약물의 과잉투여에 의하여 유발될 수 있는 세포독성과 실험을 위한 적정 투여농도범위의 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다. 3차 증류수를 이용하여 瓦松을

Oligonucleotide Primers Used for Quantitative RT-PCR Analysis
(All sequences are listed 5′ to 3′)

Gene	Sequences	Orientation
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	sense
	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
p53	TCTGTCCCTTCCCAGAAAACC	sense
	TTGGGCAGTGCTCGCTTAGTGCTCC	antisense
p21/Waf1	AGCTGGGCGCGGATTCGCCGAG	sense
	AGGCTTCCTGTGAGCGGGCCTTTG	antisense
p27/Kip1	CCATAGCCTAGTCAACAGATCAC	sense
	AGGCATAGGCGCTTTAACGAGAGT	antisense
Cyclin D1	TCTAAGATGAAGGAGACCATC	sense
	GCGGTAGTAGGACAGGAAGTTGTTG	antisense
Cdc2	CTAACTATGGAAGATTATAC	sense
	GAGATATAACCTGGAATCCT	antisense
c-Myc	GATTCTCTGCTCTCCTCGACGGAG	sense
	GCGCTGCGTAGTTGTGCTGATGTG	antisense
c-Fos	TTACTACCACTCACCCGCAGACTC	sense
	TGGAGTGTATCAGTCAGCTCCCTC	antisense
c-Jun	GGTACCATGGAACATAAGGATCAAT	sense
	CTTAGATCTGGATAAACTGATCGG	antisense
CDK4	GGTAAGCTGCATCGATCGGCTAC	sense
	AAATCCAGTCACCTAGGTAGCTC	antisense
RB1	AATCCCGTAGATCGAGAGTCCGG	sense
	CCTAACAGTTGATCGAGGTCCCTA	antisense
PTEN	ACATCTCTACTATACATCTTGAT	sense
	ACATCTCTCCTATTTATAGTCGTT	antisense
p16/INK4A	AACATACCATTGGGACATGAGTC	sense
	GACTTGACCGTGCGGTAGTAGTT	antisense

1, 10, 25, 50 100 ㎍/㎖의 농도로 희석한 후 1 x 10^5개의 HepG2 cell에 12시간, 24시간, 48시간 처리하였고 ELISA를 이용하여 MTT assay를 시행하여 세포활성의 변화를 분석하였다.

瓦松은 1 - 10㎍/㎖ 농도로 처리한 경우 뚜렷한 세포활성의 감소가 관찰되지 않은 반면, 25㎍/㎖ 이상의 농도로 처리할 경우 세포활성의 현저한 감소 및 세포사멸의 유발이 관찰되기 시작하였다. 본 실험결과를 토대로 이후 瓦松이 세포증식에 미치는 영향에 대한 실험에 적용될 투여농도는 瓦松의 독성효과를 배제할 수 있는 1-10 ㎍/㎖ 범위로 결정하였다(Table 1, Fig. 1).

2. HepG2 cell의 증식에 미치는 영향

瓦松이 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 瓦松의 처리 시간과 HepG2 cell의 증식과의 관련성 유무를 분석하기 위하여 cell counting을 하였다. 瓦松 처리 후 24, 48, 72 시간 후에 세포를 회수하여 세포의 수를 대조군과 비교하였다. HepG2 cell의 증식은 1, 5, 10 ㎍/㎖ 처리군에서 모두 처리 48시간 후부터 대조군에 비하여 감소되었으며 감소정도는 처리농도에 비례하였다(Table 2, Fig. 2).

Table 1. Effect of WS on HepG2 Cell Viability (MTT Assay)

Herb concentration (㎍/㎖)	12h	24h	48h
0	0.643 [a)]	0.632	0.629
1	0.650	0.643	0.623
10	0.626	0.611	0.602
25	0.541	0.505	0.481
50	0.478	0.440	0.412
100	0.363	0.327	0.305

a) Each value represents the exponent obtained from optic density and cell concentration

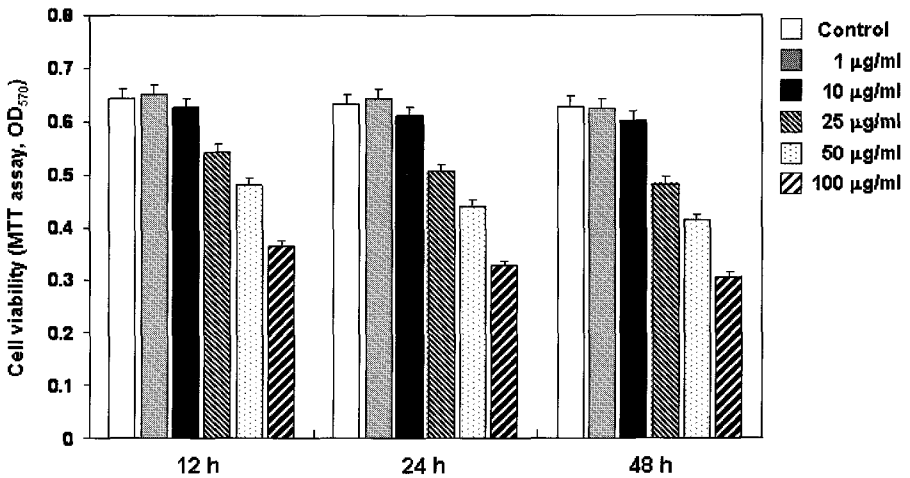

Fig. 1. Effect of WS on cell viability of HepG2, human hepatocarcinoma cells (MTT assay)

Table 2. Effect of WS on HepG2 Cell Proliferation

Herb concentration (㎍/㎖)	0h	24h	48h	72h
0	1.00 [a)]	1.48	3.49	6.86
1	1.00	1.32	2.98	5.56
5	1.00	1.15	2.54	5.02
10	1.00	1.10	2.30	4.14

a) Each value represents cell number(x10^5cells)

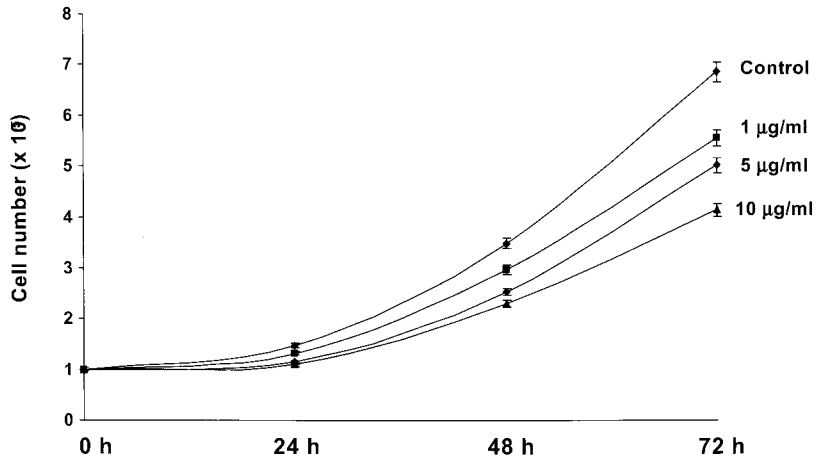

Fig. 2. Dose-dependent effect of WS on inhibition of HepG2 cell proliferation (cell counting assay)

3. HepG2 cell의 DNA synthesis에 미치는 영향

瓦松의 항암효과에 대한 분석을 위하여 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. HepG2 cell 분열능력에 대한 영향을 분석하기 위해 瓦松이 DNA 합성을 억제하는 작용이 있는지의 여부를 [^{3}H]-Thymidine incorporation assay를 시행하여 분석하였다. 약제는 24시간 동안 처리하였으며 세포 회수 4시간 전에 [^{3}H]-Thymidine을 투여하였고 DNA내에 incorporation된 [^{3}H]-Thymidine의 양을 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. HepG2 cell의 DNA 합성능은 瓦松의 투여농도에 비례하여 감소하였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Suppression of DNA Synthesis of HepG2 Cells by WS

concentration (㎍/㎖)	0	1	5	10
CPM	5150 [a)]	5100	4950	4900

a) CPM: count per minute

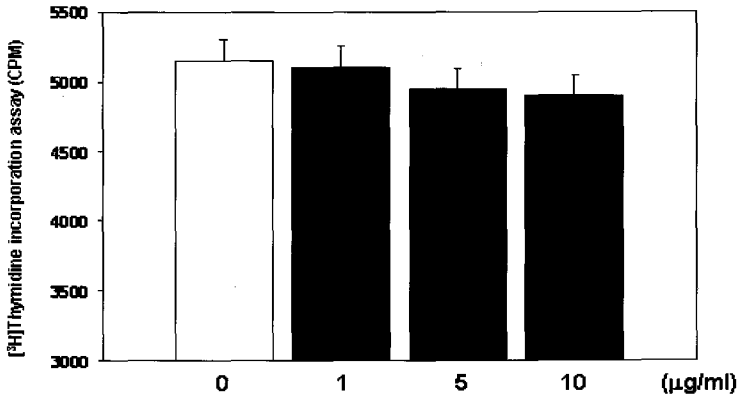

Fig. 3. Suppression of HepG2 cell DNA synthesis by WS ([^{3}H]-Thymidine incorporation assay)

4. Flow cytometric analysis를 이용한 세포분열주기에 대한 분석

Cell counting assay를 통해 확인된 瓦松의 세포 증식억제작용이 세포분열주기의 특정 단계를 조절함으로써 유도되는가를 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 세포분열주기에 대한 분석을 수행하였다. 1-10㎍/㎖의 농도로 HepG2 cell에 48시간 처리한 후에 10,000개의 세포에 대한 DNA

Table 4. Effect of WS on HepG2 Cell Cycle (Flow Cytometric Analysis)

concentration (㎍/㎖) \ cell cycle	G1	S	G2/M(%)
0	66.2 [a)]	15.6	18.2
1	66.9	13.4	19.7
5	69.0	9.00	22.0
10	70.3	6.10	23.6

a) Each value represents cellular percentage in cell cycle.

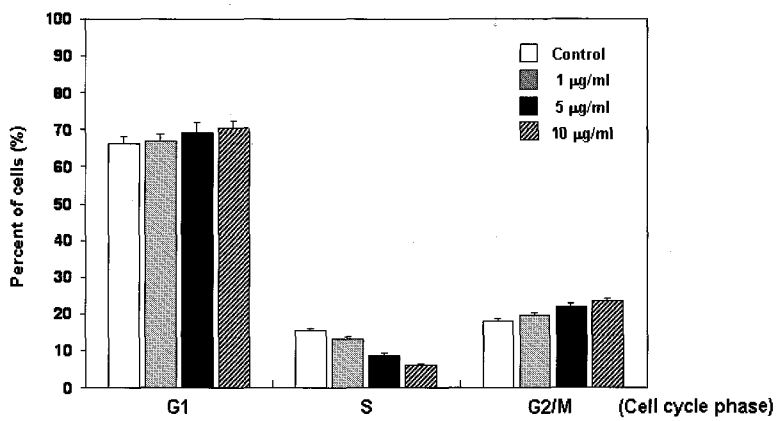

Fig. 4. Induction of G2/M cell cycle arrest by WS (flow cytometric analysis)

content를 분석하였고 대조군과 비교하였다. 瓦松이 처리된 세포의 경우 뚜렷한 세포증식억제가 관찰되었으며 G1기 세포수는 다소의 증가를 보인 반면 G2/M기 세포수의 증가가 뚜렷하게 관찰되었다. G2/M기 세포수의 증가는 세포분열로 진행이 억제됨을 의미하므로 와송에 의한 HepG2 cell증식의 억제는 G1-S 진행보다는 mitosis로의 진행을 억제하는 작용에 보다 밀접하게 연관되어 있음이 확인되었다(Table 4, Fig. 4).

5. 세포분열주기 관련 유전자 발현에 미치는 영향

瓦松의 세포분열 억제효과와 유전자 발현과의 상관성을 파악하기 위하여 세포분열주기의 촉진을 유도함으로서 종양세포의 증식을 촉진하는 것으로 잘 알려진 c-Fos, c-Myc, Cyclin D1, CDC2 유전자와 세포분열을 억제함으로서 종양의 성장을 억제하는 p53, p21/Waf1, p16/INK4a 유전자의 발현이 약제의 투여에 의하여 변화하는 양상을 분석하였다.

瓦松은 세포분열을 촉진하는 것으로 잘 알려진 Cyclin D1, CDK4 등의 유전자는 물론 세포분열을 억제하는 것으로 알려진 p53과 RB1을 포함한 종양억제유전자의 발현에 영향을 미치지 않았다(Table 5, Fig. 5, Table 6, Fig. 6).

Table 5. Effect of WS on mRNA Expression of Proto-oncogenes in HepG2 Cell

Genes	0h	12h	24h	48h
c-Jun	1.00 [a)]	1.01	1.07	1.02
c-Fos	1.00	1.02	1.06	0.99
c-Myc	1.00	1.06	1.02	1.05
Cyclin D1	1.00	1.04	0.99	1.06
CDK4	1.00	1.01	0.96	1.02

a) Each value represents relative quantity of mRNA expression(density of each gene to GAPDH) after treatment with 10㎍/㎖ WS

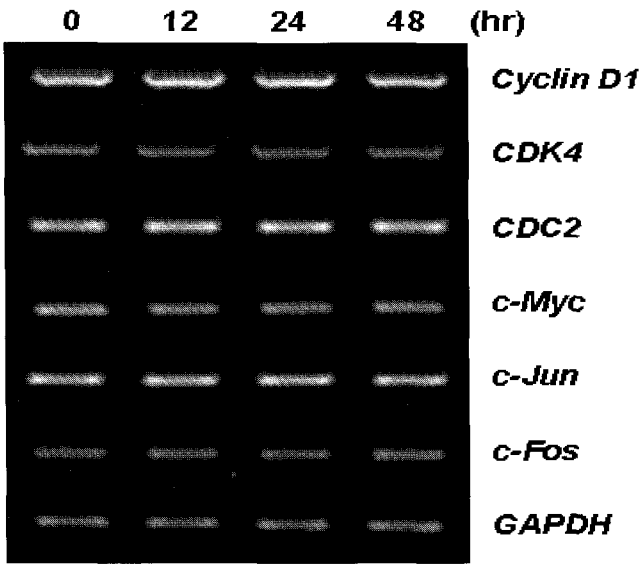

Fig. 5. Inhibitory effect of WS on mRNA expression of proto-oncogenes (quantitative RT-PCR analysis) after treatment with 10㎍/㎖ WS

Table 6. Effect of WS on mRNA Expression Inhibiting HepG2 Cell Cycle Progression

Genes	0h	12h	24h	48h
p53	1.00 a)	1.02	0.96	0.99
p21/Waf1	1.00	0.98	1.06	1.02
p27/Kip1	1.00	1.00	1.01	0.98
RB1	1.00	0.96	1.05	1.02
p16/INK4a	1.00	0.99	1.01	0.97
PTEN	1.00	0.96	1.04	0.97

a) Each value represents relative quantity of mRNA expression(density of each gene to GAPDH) after treatment with 10㎍/㎖ WS

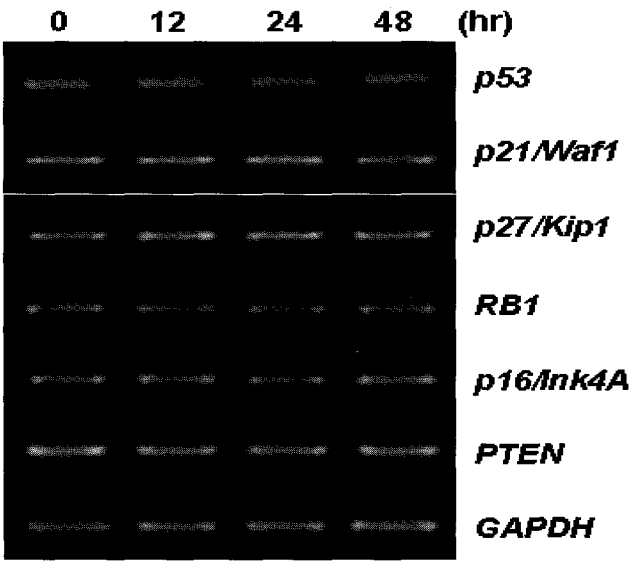

Fig. 6. Inhibitory effect of WS on mRNA expression of tumor suppressor genes (quantitative RT-PCR analysis) after treatment with 10㎍/㎖ WS

Ⅳ. 考 察

우리나라에서 간암은 통계청 사망원인 통계[1]에 의하면 2003년 인구 10만 명당 22.8명으로 신생물에 의한 사망(133.1명) 중 폐암(26.4명), 위암(24.3명)과 더불어 3대 원인으로 파악되고 있다. 2003년 보건복지부 한국중앙암등록사업 연례보고서[15] 2001년 자료 분석에 따르면 암의 원발부위별 발생 빈도는 위(20.3%), 기관지 및 폐(11.9%), 간 및 간내담관(11.8%) 순위였다. 간암으로 인한 사망자수는 1983년도(8000여명)부터 2003년(10000여명)까지 매년 증가하는 추세이고 타부위의 암에 비해 그 진행속도나 예후가 비교적 불량하여[2] 이에 대한 대책이 시급한 실정이다.

간암의 치료법에는 수술적 치료인 간 절제술과 간이식, 비수술적인 치료법인 경도자 동맥 화학색전술(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)과[17,18] 알코올주입술(percutaneous ethanol injection therapy, PEIT), 고주파 열치료[19](radio-frequency ablation, RFA)를 비롯한 다양한 비수술적 국소요법(local ablation therapy) 등이 있다[16].

간암에 대한 최근의 연구는 분자생물학적으로 많

은 시도가 있어왔다. 암형성에 관련되어진 p53, RB1, PTEN같은 tumor suppressor gene[3-5]과 cyclin D1, CDK, c-Fos, c-Jun등의 oncogene[6]에 관한 연구가 계속되어 왔고, oncogene인 Myc의 활성을 제거할 경우 간에 종양이 발생하는 과정을 거꾸로 역전시킬 수 있다는 연구도 있었다[7]. 그리고 B형 간염이 간암으로 진행하는 과정에 특이적으로 작용하는 유전자가 관찰되었고[8] RB1/p130 발현의 손실이 난소암, 간암에 흔히 일어난다는 사실이 보고되었다[20]. 또한 유전자검사에서도 다양한 연구가 있는데 유전적 기원이 상이한 종양 내에서 확인되는 복잡한 유형의 유전자 활성을 규명할 수 있는 기법을 개발했다는 보고가 있다[21]. 이러한 유전자연구는 간암을 포함한 여러 종양의 발병 과정과 치료 방법에 대한 가능성을 제시했다는 점에서 매우 중요한 의의를 갖는다고 할 수 있다.

세포분열을 위한 세포주기는 DNA합성조절 시기에 따라 G1기, S기, G2기, M기로 나눌 수 있다[25]. 보통의 세포주기외에, DNA손상에 의해 R-point 또는 START에서 세포주기가 멈춰지는 현상을 checkpoint라 한다. G1기는 DNA복제를 준비하는 시기로 단백질 합성, 미토콘드리아, 리보솜 등의 세포소기관의 합성과 세포의 성장이 이루어지며 만약 DNA의 손상이 있다면 세포주기를 정지시켜 세포들이 S기나 유사분열로 들어가기 전에 DNA 수선에 필요한 시간을 확보하는 G1 checkpoint가 있다. G1 시기를 무사히 넘긴 세포들은 S기로 넘어간다. S기는 DNA복제가 이루어지는 시기로서 S기 초기에 cyclin D와 E는 ubiquitination이 일어나 proteasome에 의해 분해된다. 이때 cyclin A가 증가해서 CDK2를 활성화시키면 S기로 진행할 수 있게 된다. G2기는 분열을 준비하는 시기로 후기 S기에서 G2기동안 부분적이긴 하지만 cyclin A와 B의 발현증가와 같은 작용을 통해 유사분열을 준비한다. M기는 핵분열과 세포질 분열이 이루어지는 시기로 DNA손상은 G2/M기에서 두 번째 checkpoint를 만들어낸다[26].

본 실험에서 사용한 瓦松[27]은 味酸苦하고 性은 凉無毒하며, 淸熱解毒, 止血, 利濕, 消腫하는 效能을 갖고 있으며, 民間에 抗癌效果가 있음이 알려져 많이 사용되고 있다. 黃[10]은 十全大補湯加瓦松, 田[11]은 少陰人補中益氣湯加瓦松으로 복강암생쥐의 생존기간연장과 면역기능저하 유발생쥐의 지연형과민반응, 자연살해세포활성도 측정에서 유의성 있는 결과를 보고하였다. 吳[12] 등은 瓦松이 암세포 감수성에 선학초등에 비해 유의성이 낮다고 보고하였고, 梁[13] 등은 NK(Natural Killer) cell의 activity가 비교적 증진되었다고 보고하였으며, 李[28]는 와송약침이 항암작용 및 면역강화에 효과가 있음을 보고하였다.

瓦松의 항암효과에 대한 분석에 앞서 약물의 과잉투여에 의하여 유발될 수 있는 세포독성과 실험을 위한 적정 투여농도범위의 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다. 瓦松은 1 - 10㎍/㎖ 농도로 처리한 경우 뚜렷한 세포활성의 감소가 관찰되지 않은 반면, 25㎍/㎖ 이상의 농도로 처리할 경우 세포활성의 현저한 감소 및 세포사멸의 유발이 관찰되기 시작하였다. 본 실험결과를 토대로 瓦松의 적정 투여농도는 瓦松의 독성효과를 배제할 수 있는 1-10㎍/㎖ 범위로 결정하였다.

瓦松이 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향은 cell counting을 이용하여 분석하였는데 HepG2 cell의 증식은 1, 5, 10 ㎍/㎖ 처리군에서 모두 처리 48시간 후부터 대조군에 비하여 감소되었으며 감소정도는 처리농도에 비례하였다.

瓦松의 항암효과에 대한 분석을 위하여 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향을 조사하였는데 HepG2 cell 분열능력에 대한 영향을 분석하기 위해 瓦松이 DNA 합성을 저해하는 작용이 있는지의 여부를 [^{3}H]-Thymidine incorporation assay를 이용하여 분석하였다. HepG2 cell의 DNA 합성능은 瓦松의 투여농도에 비례하여 감소하였다.

Cell counting assay를 통해 확인된 瓦松의 세포증식억제작용이 세포분열주기의 특정 단계를 조절함으로써 유도되는가를 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 세포분열주기에 대한 분석을 수행하였는데 1-10㎍/㎖의 농도로 HepG2 cell을 48시간 처리한 후에 10,000개의 세포에 대한 DNA

content를 분석하였고 대조군과 비교하였다. 瓦松이 처리된 세포의 경우 뚜렷한 세포증식억제가 관찰되었으며 G1기 세포수는 다소의 증가를 보인 반면 G2/M기 세포수의 증가가 뚜렷하게 관찰되었다. 따라서 瓦松에 의한 HepG2 cell 증식의 억제는 G1-S 진행보다는 mitosis로의 진행을 억제하는 작용에 보다 밀접하게 연관되어 있음이 확인되었다.

세포증식억제가 瓦松에 의한 유전자 발현의 변화에 의하여 야기될 가능성을 파악하기 위한 실험으로 quantitative RT-PCR을 통한 유전자 발현분석을 수행하였다. 瓦松의 세포분열 억제효과와 유전자 발현과의 상관성을 파악하기 위하여 세포분열주기의 촉진을 유도함으로서 종양세포의 증식을 촉진하는 것으로 잘 알려진 c-Fos, c-Myc, Cyclin D1, Cdc2 유전자와 세포분열을 억제함으로서 종양의 성장을 억제하는 p53, p21/Waf1, p16/INK4a 유전자의 발현이 약제의 투여에 의하여 변화하는 양상을 분석하였다. 瓦松은 세포분열의 촉진유전자(Cyclin D1, CDK4)와 세포분열을 억제하는 것으로 알려진 p53과 RB1을 포함한 종양억제유전자의 발현에는 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과에서 瓦松의 세포증식 억제작용은 유전자발현에 의한 조절보다는 세포주기의 G2/M arrest를 통해서 발휘되는 것임을 시사한다. 따라서 향후 세포주기의 G2/M phase를 조절하는 신호전달물질에 대한 瓦松의 영향에 대하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 結 論

瓦松이 HepG2 cell의 세포분열 및 관련유전자 발현에 미치는 영향을 규명하기 위하여 MTT assay, cell counting assay, [^{3}H]-Thymidine incorporation assay, flow cytometry analysis, quantitative RT-PCR을 시행하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 瓦松은 10㎍/㎖ 이하의 투여군에서 약제에 의한 직접적인 세포독성이 나타나지 않았다.
2. 瓦松은 HepG2 cell의 세포증식을 농도의존적으로 억제하였다.
3. 瓦松은 HepG2 cell의 DNA 합성을 농도의존적으로 억제하였다.
4. 瓦松에 의한 HepG2 cell 증식억제는 세포주기중 G2/M arrest에 기인하였다.
5. 瓦松은 세포분열촉진유전자(Cyclin D1, CDK4, c-Myc)와 종양억제유전자(p53, RB1, PTEN)의 유전자 발현에는 영향을 미치지 않았다.

이상에서 瓦松의 HepG2 cell 증식 억제작용은 유전자발현의 조절보다는 세포주기중의 G2/M phase arrest에 의한 것으로 나타났으며 향후 G2/M phase를 조절하는 신호전달물질에 대한 瓦松의 영향에 대하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 통계청. 2004년 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2004.
2. 全國韓醫科大學 肝係內科學敎授 共著. 肝係內科學. 서울: 동양의학연구원; 2001, p.274.
3. Eva G, Alexei AT, Tanel P, Johan E. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. PNAS 2004;101:12165-70.
4. Qihong H, Angel R, Paul D, Sheng-Hao Chao, Kim CQ, Jeremy SC et al. Identification of p53 regulators by genome-wide functional analysis. PNAS 2004;101:3456-61.
5. Michael MW, Robert ES. The proliferation potential protein-related (P2P-R) gene with domains encoding heterogeneous nuclear ribonuc-leoprotein association and Rb1 binding shows repressed expression during terminal differentiation. PNAS 1997;94:1212-7.
6. Matthew AE, Edwin LC, Kristin RS, Abhaya MD. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. PNAS 2001;98:13437-42.

7. Catherine MS, Andrew MK, Constadina A, Shelly B, Stefanie M, Michael HB et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. Nature 2004;431:1112-7.
8. George GC, Juanita LM, Paul BSL, Rocky LKH, Xu H, Morihiro O et al.. Mutation of p53 in Recurrent Hepatoc-ellular Carcinoma and Its Association with the Expression of ZBP-89. Am J Pathol. 2003;162:1823-9.
9. 안덕균. 原色韓國本草圖鑑. 서울: 敎學社; 1998, p.69.
10. 黃奎東. 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯加 瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 관한 硏究. 大韓韓方腫瘍學會誌 1996;2(1):1-23.
11. 田炳旭. 少陰人 補中益氣湯과 瓦松이 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響. 慶熙大大學院論文, 1995.
12. 吳千植. 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 癌細胞感受性에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集 1987;10:99-116.
13. 梁緖賢. 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 흰쥐의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌 1989;10(2):103-14.
14. 지형준. 大韓藥典 및 大韓藥典外 韓藥規格註解. 서울: 한국메디칼인덱스사; 1998.
15. 보건복지부 한국중앙암등록본부. 한국중앙암등록 사업 연례보고(2002.1-2002.12). 서울: 한국중앙암등록본부; 2003.
16. 백승운. 간암치료법의 선택. 대한간학회지 2002: 8(부록);57-65.
17. Tobe T, Kameda H, Okuda M, Ohto M, Ohto Y, Mito M et al. Primary liver cancer in Japan(1st ed.). 1992, p.266.
18. 윤경원, 박창환, 박근수, 손영해, 이완식, 주영은 등. 간동맥화학색전술의 간암치료효과판정기준과 간암환자의 생존률. 대한간학회지 2002;8(2): 28.
19. 배시현,박영민,신제현,변병훈,최종영 등. 비절제성 간세포암에 대한 Gemcitabine과 Heptaplastin 병합요법. 대한간학회지 2001;7(2): 36.
20. Giuseppina D, Valeria M, Luigi B, Tiziana T, Corrado M, Gian FZ et al. Frequent Loss of pRb2/p130 in Human Ovarian Carcinoma. Clin Cancer Res. 2004;10:3098-103.
21. Erich H, Seiichi I, Jennifer P, Holly D, Andrea B, Mark K et al. Gene expression phenotypic models that predict the activity of oncogenic pathways. Nature Genetics 2003;34(2):226-30.
22. 서울대학교 의과대학. 腫瘍學. 서울: 서울대학교출판부; 1989, p.1, 95, 96, 126.
23. 郁仁存. 癌症診治康復 350問. 北京: 金盾出版社; 1989, p.98-105.
24. 이문호, 전종휘, 허인목. 內科學. 서울: 金剛出版社; 1979, p.2458-66.
25. 전국분자생물학교수. 세포학. 서울; 2000, p.599-636.
26. 최혜정, 정정원, 최영현. 암과 세포주기에 관한 최근 연구. 동의한의연 2000;4:173-83.
27. 조창섭, 조종관. 瓦松에 대한 文獻的 考察. 大田大韓醫學論文集 1994;2(2):83-99.
28. 이정화. 瓦松藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 대한 實驗的 硏究. 大韓鍼灸學會誌 1999;16(4): 175-219.