

강황이 수종의 암세포에 미치는 영향

윤주호, 류봉하, 김진성, 윤상철
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Effects of Curcuma longa L. on Some Kinds of Cancer Cells

Jooho Yoon, Bongha Ryu, Jinsung Kim, Sanghyub Yoon
3rd Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to identify anti-tumor effects of Curcuma longa L. on some kinds of cancer cells through molecular biologic methods.

Materials & Methods : We used 4 kinds of cancer cell lines such as glioma cells(A172), cervical cancer cells(HeLa), prostate cancer cells(PC3), lung cancer cells(A549). We injected the boiled extract of Curcuma longa L. 5 μ g, 10 μ g to culture media(ml) for 24 hours. We measured the cytotoxic effect on 4 kinds of cancer cells through trypan blue exclusion test and the suppressive effect on viability of 4 kinds of cancer cells via MTT assay. We measured the change of mitochondria membrane potential via flow cytometry. The quantitative RT-PCR was used to examine the effect on the revelation of Bcl-2 and Bax which genes are related to apoptosis. We examined the effect on the revelation of Bcl-2 protein and Bax protein by western blot analysis.

Results: 1. Extract of Curcuma longa L. showed significant cytotoxic effect on A172, HeLa, PC3 compared to the control group with density dependent manner.

2. Extract of Curcuma longa L. showed significant suppressive effect on viability of A172, HeLa, PC3 compared to the control group with density dependent manner.

3. Curcuma longa L. induced apoptosis by decreasing the membrane potential of mitochondria in A172, HeLa, PC3.

4. In the test about the revelation of genes related to apoptosis, the revelation of Bcl-2 decreased and the revelation of Bax increased in A172, HeLa, PC3 treated with Curcuma longa L. with density dependent manner.

5. In the test about the revelation of protein related to apoptosis, the protein levels of Bcl-2 decreased and the protein levels of Bax increased in A172, HeLa, PC3 treated with Curcuma longa L..

Conclusions: This experiment showed that Curcuma longa L. has anti-tumor effect on glioma, cervical, prostate cancer cells except on lung cancer. We hope that anti-tumor effects of Curcuma longa L. will be more practically identified.

Key words: anti-tumor effect, Curcuma longa L, glioma, cervical, prostate cancer cells

· 접수일 : 2006년 5월 11일 · 채택일 : 2006년 6월 15일
· 교신저자: 류봉하, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지
 경희의료원 3내과 의사실
 전화 : 02-958-9140 Fax : 02-958-9136
 E-mail : rbongh@khu.ac.kr

1. 緒 論

암은 개체를 구성하는 정상 세포가 어떤 자극에 의해 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 악성종양을 지칭하는 것으로¹, 전 세계적으로 암의 발생률과 사망률이 계속 증가하여 인류의 건강을 위협하고 있으며 우리나라에서도 암으로 인한 사망률이 해마다 높아져 암은 국내 사망원인 중 1위를 점하는 중요한 질환이다.

암에 대한 치료법은 수술요법, 항암화학요법, 방사선요법, 면역요법 및 유전자요법 등이 알려져 있는데 수술요법과 방사선요법은 국소적인 병소에는 유의하나 전이된 암의 치료에는 한계가 있고, 면역요법과 유전자요법은 아직까지 뚜렷한 治療 效果를 보이지 못하므로 여전히 항암화학요법에 의존하고 있는 실정이다². 그러나 이러한 항암제는 암세포 외에 정상 세포의 손상을 초래하여 면역기능 저하, 조혈장애, 유전자 손상 등의 부작용을 유발한다. 따라서 부작용을 감소시키면서 암세포에 대한 특이적 독성을 나타내는 항암제를 합성물질이 아닌 천연물질에서 개발하려는 노력이 시도되고 있다^{3,4}.

한의학계에서도 기존 항암치료의 한계를 극복하기 위한 노력으로 각종 한약재와 복합방들에 대한 실험을 통하여 항암효과와 면역증진, 항암제의 부작용억제, 항암제와의 병용요법 등에 관한 연구들을 진행해 오고 있다⁵.

강황은 생강과식물인 강황(*Curcuma longa L.*)의 근경을 건조한 것으로 性味는 溫無毒, 辛苦하고 肝, 脾經으로 歸經하며 破血行氣, 通經止痛 등의 效能으로 心腹痞滿脹痛, 癥瘕, 風濕肩臂疼痛, 跌撲腫痛 등을 치료하며 이담, 자궁수축, 혈압강하, 진통 등의 효과가 있다^{6,7}.

여러 실험을 통한 연구에서 강황의 항산화 효과

⁸, 항균 효과⁹ 등이 규명되었고 강황의 주요 성분인 curcumin의 동맥경화 억제¹⁰, 항염증¹¹ 및 항암 효과¹² 등이 보고되었으며 강황과 기원식물이 동일한 울금의 위암 억제 효과¹³가 규명되어 강황이 항암 효과가 있을 것으로 사료되나 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자는 강황의 항암효능과 기전을 연구하기 위하여 신경교종(A172), 자궁암(HeLa), 폐암(A549) 및 전립선암(PC3) 세포주에 강황을 처리한 후 세포 및 세포핵의 형태학적 변화, trypan blue exclusion test를 통한 암세포 살상효과, MTT assay를 통한 암세포 증식억제효과, mitochondria 막전위 변화, apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 효과 및 apoptosis와 연관된 단백질의 발현에 미치는 효과 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 강황은 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입, 정선하여 사용하였다. 시약은 특별히 명시가 없는 한 Sigma, MO에 제품을 신청하여 사용하였다.

강 황 *Curcuma longa L.* CURCUMAE LONGE RHIZOMA

2) 검액의 조제

강황 5g을 증류수 100ml에 넣고 100℃에서 2시간 동안 밀폐된 유리병에서 끓인 후 상층액을 0.2μm의 시린지 필터로 여과하여 고형성분을 제거한 후 97 ml의 검액을 얻어서 실험에 사용하였다.

3) 암세포주

이 실험에서는 신경교종(A172), 자궁암(HeLa).

폐암(A549), 전립선암(PC3) 등 4종류의 암세포주를 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 암세포주 배양

모든 암세포주를 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, MD)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Precision Scientific Inc. NY)에서 배양하였다.

2) 검액처리

검액의 농도는 배지 1ml당 5 μ g, 10 μ g를 처리하여 24시간 경과 후 항암작용을 측정하였다.

3) 형태학적 변화 관찰

암세포주에 검액을 5 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도로 투입하고 24시간 경과 후 세포 형태의 변화를 inverted microscope(CK2, Olympus optical Co. LTD., Japan) 하에서 관찰하고, 검액을 10 μ g/ml 농도로 투입하여 24시간 경과 후 세포핵의 변화를 fluorescence microscope(Eclipse E800, Nikon, Japan) 하에서 관찰하였다. 대조군은 강황 검액을 사용하지 않은 세포주를 사용하였다.

4) 살상효과 측정

암세포주의 살상효과를 측정하기 위해 trypan blue exclusion test¹⁴를 시행하였다. 세포를 회수한 후 10⁶/ml의 농도로 세포액을 만들고 세포액, PBS, 0.4% trypan blue를 각각 0.5ml, 0.3ml, 0.2ml의 비율로 섞은 후 5분간 방치한 다음 10분 이내에 푸르게 변색된 세포의 수를 inverted microscope 하에서 측정하였다. 검액은 각각 5 μ g/ml, 10 μ g/ml씩 투입하고 24시간 후에 관찰하였다. 대조군은 강황 검액을 사용하지 않은 세포주를 사용하였다.

5) 증식억제효과 측정

암세포주의 증식억제효과를 검증하기 위하여 MTT assay¹⁵를 시행하였다. 10 μ l MTT stock solution(MTT 5mg/ml in PBS, pH7.5)을 100 μ l의 cell suspension(10⁶/ml)에 넣은 후 37°C에서 3시간

방치한 다음 isopropanol에 녹아있는 100 μ l의 0.04M HCl을 넣고 잘 섞어주고 곧 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader(Molecular device, CA)를 이용하여 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 검액은 5 μ g/ml, 10 μ g/ml의 농도로 암세포주에 넣어주고 24시간 경과 후 측정하였다. 대조군은 강황 검액을 사용하지 않은 세포주를 사용하였다.

6) Mitochondria 막전위 변화 측정¹⁶

세포배양 배지에 150nM의 mitotracker red를 넣은 후 20분간 37°C incubator에 보관하였다. 이후 PBS로 3회 세척한 후 형광현미경과 flowcytometer(FACScaliver, Becton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 막전위 변화를 관찰하였다.

검액의 농도는 10 μ g/ml로 하였고 대조군은 강황 검액을 사용하지 않은 세포주를 사용하였다.

7) Apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 효과 측정^{17,18}

암세포주의 증식 및 apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 영향을 검증하기 위하여 RT-PCR을 시행하였다. 검액은 5 μ g/ml, 10 μ g/ml씩 각 세포주에 투입하고, 대조군은 강황 검액을 사용하지 않은 세포주를 사용하였다.

(1) RNA 추출

강황이 처리된 세포를 회수하여 solution D (250g guanidine isothiocyanate in 293ml water, 0.75M sodium citrate 17.6ml, 10% sarcosyl 26.4ml, 0.1M 2-mercaptoethanol) 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 보관하였다. 20분후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 넣은 후 20°C에서 1시간 보관하면서 RNA를 침전시켰다. 다음 13,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 200 μ l의 ethanol을 넣어 RNA를 세척한 후 RNA를 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

(2) cDNA 제작

5x reverse transcription buffer (Gibco BRL, MD) 4 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 10mM dNTP mixture 2 μ l, RNase inhibitor (Promega, WI) 0.5 μ l, AMV Reversetranscriptase (8U/ μ l) (Gibco BRL, MD) 2 μ l, Oligo dT (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l, RNA 1 μ g (1 μ g/yk), H₂O 5.5 μ l의 시료를 혼합한 후 37°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 제작하였다.

(3) RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

cDNA 1 μ l를 template로 하여 GAPDH primer (sense 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC-3', antisense 5'-AACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3')를 10 pmole, 10x PCR amplification buffer 10 μ l, 1.25Mm dNTP 16 μ l, H₂O 30 μ l를 넣어 94°C에서 45초간 변성, 58°C에서 30초간 가열 냉각시켜 primer가 template에 붙을 수 있도록 해주고, 72°C에서 45초간 중합반응을 36cycle 시행하였다. 시료를 2% agarose gel에서 20분간 전기영동한 후 ethidium bromide에 10분간 염색하여 Gel-doc system (Bio Rad, CA)으로 정량화하였다. 이것을 바탕으로 band의 밝기에 따라 template cDNA의 양을 증감하여 상대적으로 cDNA의 양을 동일하게 조절하였다.

그 다음으로는 Bcl-2 primer (sense 5'-ATGGCGCAGCTGGGAGAAC-3',

antisense 5'-CTTGTGGCTCAGATAGGCAC-3')와 Bax primer (sense 5'-ATGGACGGTCCGGGAG-3', antisense 5'-GCCCATCTTCTTCCAGAT-3')를 사용하여 36cycle의 PCR 반응을 시행하고 Gel-doc system(Bio-rad, CA)으로 정량한 값을 GAPDH에 대한 값으로 나누어 유전자의 발현 정도를 정량화하였다.

8) Apoptosis와 연관된 단백질의 발현에 미치는 효과 측정¹⁹⁾

각 암세포주에 10 μ g/ml의 검액을 처리하고 이 세포들로부터 단백질을 추출하여 Bcl-2, Bax에 대

한 western blot을 시행하였다. 대조군과 검액을 처리한 세포주로부터 얻은 단백질을 Biuret 방법으로 정량한 후 각각 30 μ g의 단백질을 12% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하여 단백질을 크기별로 분리하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane을 1차 항체인 Tubulin, Bax, Bcl-2 항체로 3시간동안 반응시킨 후 2차 항체를 1시간 동안 반응시키고 ECL (electrochemoluminiscent)을 이용하여 band를 검출하였다.

3. 통계 처리

암세포주 살상효과와 증식억제효과에 대한 실험의 유의성 검정은 paired student's t-test로 통계처리하였으며, p<0.01을 유의한 결과로 판단하였다.

III. 成績

1. 형태학적 변화

신경교종(A172), 자궁암(HeLa), 폐암(A549) 및 전립선암(PC3) 세포주에 검액을 5 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도로 투여하고 24시간 경과 후 세포들의 형태학적 변화를 inverted microscope 하에서 관찰하여 Fig. 1에 나타내었다. 또한 검액을 10 μ g/ml 농도로 투여한 암세포주의 핵을 DAPI로 염색하여 세포핵의 변화를 fluorescence microscope하에서 관찰하여 Fig. 2에 나타내었다.

사용된 세포주들 중 A172, HeLa, PC3에서 강황에 의한 세포손상으로 형태학적 변화가 크게 나타나고 있었고 A549에서는 세포손상이 거의 일어나지 않았다. 사용된 강황의 농도에 비례하여 5 μ g/ml보다 10 μ g/ml에서 더 현격한 세포손상이 일어나고 있었는데, 대조군의 경우 세포배양 plate에 온전한 모양으로 부착되어 있었으나 실험군에서는 동그란 모양으로 오그라들며 plate에서 떨어져 나와 부유되면서 죽어가는 세포가 많았다.

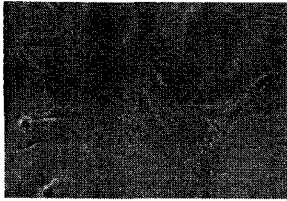
세포핵의 경우 A172, HeLa, PC3의 실험군에서 핵의 크기가 작아지며 외형이 주그리드는 형태가 관찰되었지만 A549에서는 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 1, Fig. 2).

2. 살상효과

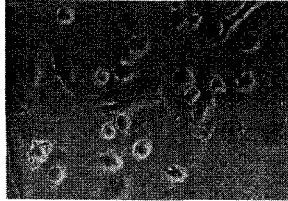
강황의 암세포에 대한 살상효과를 농도에 따라

측정하기 위해서 trypan blue exclusion test를 시행하였다. 세포를 회수한 후 10^6 /ml의 농도로 세포액을 만든 후 세포액, PBS, 0.4% trypan blue를 각각 0.5ml, 0.3ml, 0.2ml의 비율로 섞고 5분간 방치한 후 10분 이내에 푸르게 염색된 세포의 비율을 inverted microscope 하에서 측정하고 dead cells의 개수를 백분율로 환산하여 나타내었다.

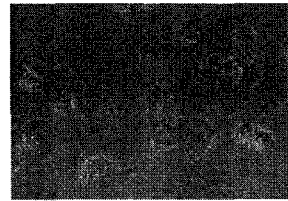
A172



0/ ml



5 μ g/ ml



10 μ g/ ml

HeLa



0 μ g/ ml



5 μ g/ ml



10 μ g/ ml

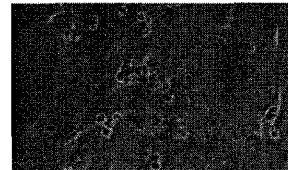
PC3



0 μ g/ ml



5 μ g/ ml



10 μ g/ ml

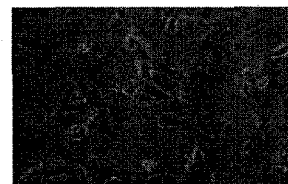
A549



0 μ g/ ml



5 μ g/ ml



10 μ g/ ml

Fig. 1. Morphological changes of each cell lines.

A172(glioma cells), HeLa(cervical cancer cells), PC3(prostate cancer cells), A549(lung cancer cells) treated with Curcuma longa L. 5 μ g/ ml, 10 μ g/ ml after 24hr.

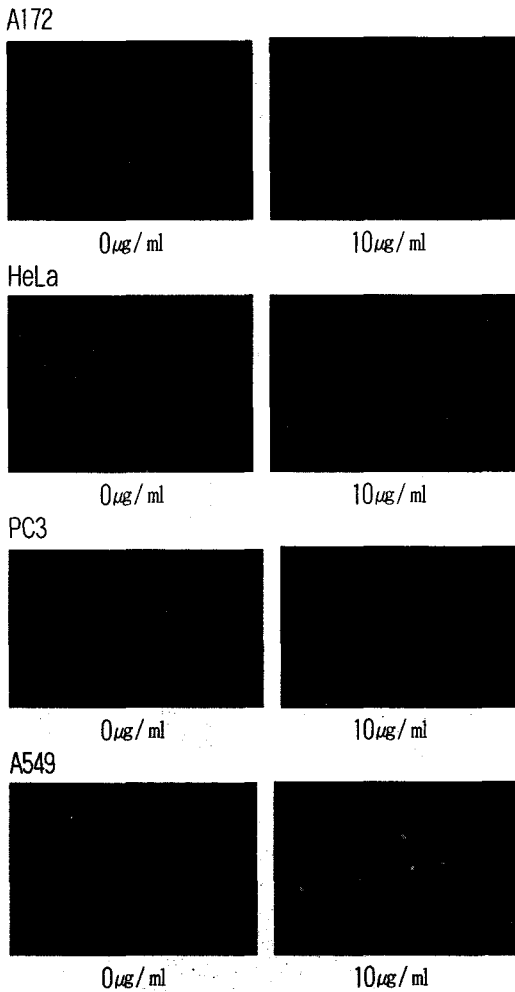


Fig. 2. Morphological changes of each nucleus.

A172, HeLa, PC3, A549 treated with Curcuma longa L. 10 μg/ml after 24hr.

실험결과, A172, HeLa, PC3에서 검액의 농도에 비례하여 세포살상 효과가 나타났고 통계적 유의성을 나타내었다. 반면, A549에서는 사멸된 세포의 비율이 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다(Table I).

Table I. Trypan Blue Exclusion Analysis on Dead Cells of Cancer Cells Induced by Curcuma longa L.

Group	Dead cell count (%)			
	A172	HeLa	PC3	A549
0 μg/ml	3.3±1.5 ^a	1.7±1.2	2.3±1.2	2.3±1.5
5 μg/ml	50.3±7.1 [*]	53.7±9.5 [*]	47.3±7.1 [*]	22.3±6.8
10 μg/ml	75.3±9.1 [*]	75.3±9.1 [*]	80.3±9.3 [*]	33.7±10.1

a : MEAN ± S.D.

* : Statistically significant compared with control data (* : p<0.01)

Cancer cells treated with Curcuma longa L. 0 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml.

3. 증식억제효과

10 μl MTT stock solution (MTT 5mg/ml in PBS, pH7.5)을 100 μl의 cell suspension (10⁶/ml)에 넣은 후 37°C에서 3시간 반응시킨 다음 100 μl의 0.04M HCl in isopropanol을 넣은 후 잘 혼합하고 곧 ELISA reader를 이용하여 540nm의 파장에서 흡광도(Optical density)를 측정하였다.

A172, HeLa, PC3의 경우 optical density(O.D.)가 검액의 농도에 비례하여 감소하였고 통계적으로 유의한 세포증식억제효과를 보였다. A172, HeLa의 경우, 5 μg/ml와 10 μg/ml에서 모두 통계적으로 유의한 O.D.값의 감소를 보였다. PC3의 경우, 10 μg/ml에서 유의한 O.D.값의 감소를 보였지만 5 μg/ml에서는 통계적 유의성이 없었다. A549의 경우, O.D.값이 미미한 감소를 보여 세포증식억제효과를 보이지 못했다(Table II).

4. Mitochondria 막전위 변화에 대한 효과

Mitochondria permeability transition pore (MPTP)는 apoptosis의 과정에 있어서 결정적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Mitochondria가 손상을 입지 않고 온전한 상태에서는 mitotracker가 mitochondria 막사이로 들어가서 염색이 되지만

mitochondria가 손상을 입어 막전위가 변하게 되면 mitochondria 막사이로 들어갔던 mitotracker가 다시 흘러나와 손상여부에 따라 염색이 되지 않거나 약하게 염색이 되어 현미경하에서 막전위 변화 여부를 확인할 수 있다.

Table II. Effect of Curcuma longa L. on the Cellular Viability of Cancer Cells.

Group	O.D.(Optical Density)			
	A172	HeLa	PC3	A549
0 μ g/ml	97.3 \pm 1.5 ^a	96.7 \pm 2.5	96.7 \pm 1.5	98.3 \pm 1.2
5 μ g/ml	52 \pm 9.5 [*]	41.7 \pm 10.5 [*]	54.0 \pm 14.1	81.3 \pm 9.5
10 μ g/ml	25.0 \pm 11.4 [*]	25.3 \pm 11.5 [*]	21.3 \pm 10.7 [*]	73.3 \pm 11.9

a : MEAN \pm S.D.

* : Statistically significant compared with control data (* : p<0.01)

Cancer cells treated with Curcuma longa L. 0 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml.

실험군은 10 μ g/ml 농도의 검액으로 처리하였고 대조군은 강황 검액을 사용하지 않은 세포주로 mitochondria 막전위 변화를 측정하였다.

먼저 형광현미경으로 관찰한 결과, A172, HeLa, PC3의 실험군은 대조군에 비해 훨씬 어둡게 보이며 형태의 구별이 어려운 세포손상 소견을 관찰할 수 있었다. 반면 A549에서는 대조군에 비해 별 다른 변화가 없었다(Fig. 3).

이에 대한 정량적 분석을 위한 flowcytometer를 이용한 막전위도의 측정 결과는 Fig. 4과 같다. 그래프에서 가로축 높은 곳으로 갈수록 막전위도가 높은 것으로 대조군에 비하여 실험군에서 막전위도가 낮아짐을 볼 수 있었다. 막전위도의 경우에서도 A172, HeLa, PC3에서는 막전위도가 감소함을 볼 수 있으나 A549의 경우 막전위도의 감소가 거의 없었다(Fig. 4).

5. Apoptosis 연관 유전자의 발현에 미치는 효과
Apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 효

과를 판정하기 위하여 대조군과 실험군 사이에 RT-PCR을 시행하였다. 세포의 유전자 발현에 있어서 중요한 역할을 하는 RNA를 추출하고 이것을 이용하여 cDNA를 제작한 후 apoptosis와 연관이 있는 Bcl-2, Bax, GAPDH에 대한 primer를 제작하여 PCR 반응을 시행하였고 만들어진 PCR product는 2% agarose gel상에서 전기영동하여 사진을 찍어 밝기를 비교하였다(Fig. 5).

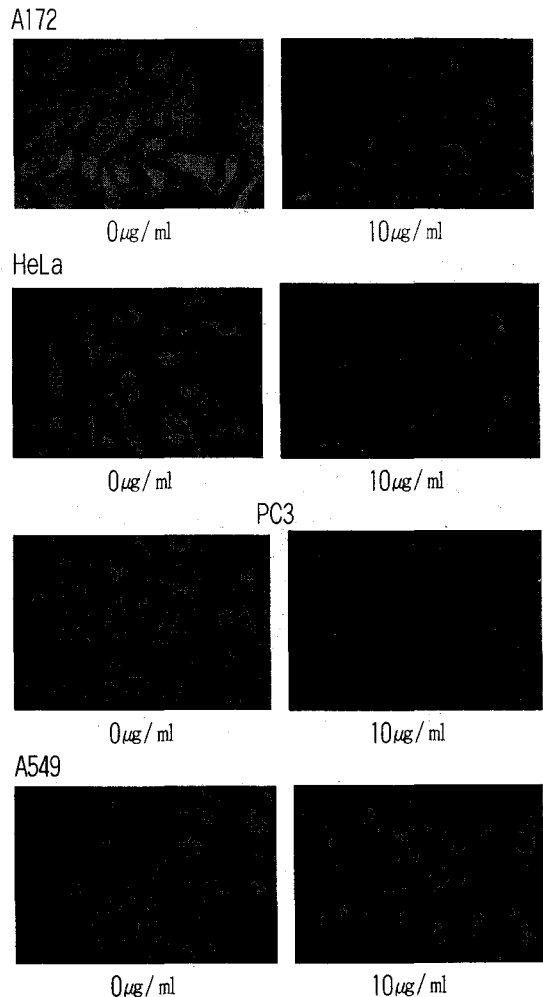
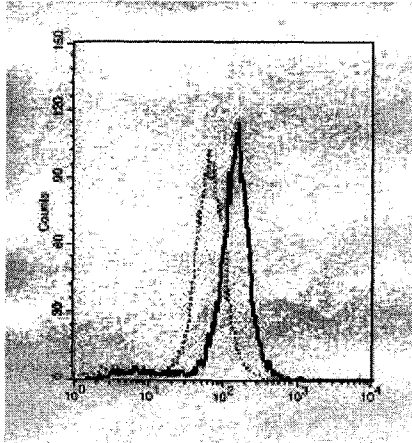


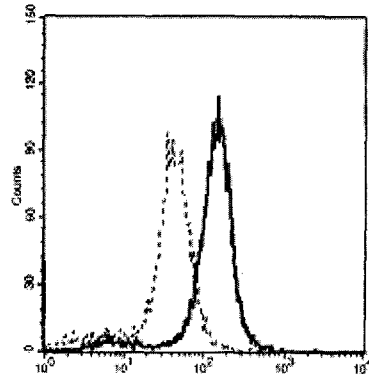
Fig. 3. Effect of Curcuma longa L. on photography of mitochondria membrane potential by fluorescent camera.

강황이 수종의 암세포에 미치는 영향

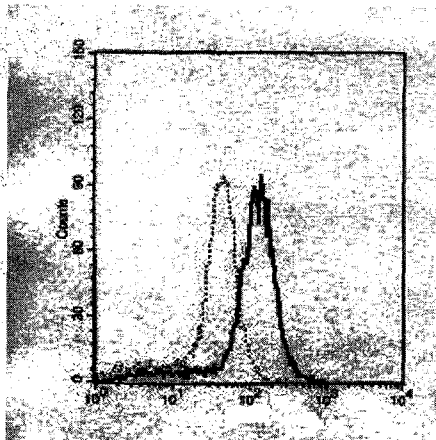
A172



HeLa



PC3



A549

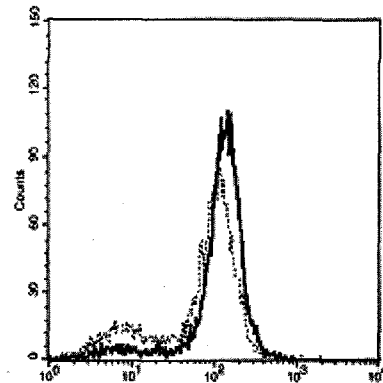


Fig. 4. Effect of *Curcuma longa* L. on mitochondria membrane potential by flowcytometer

Bold lind : control

Dot line : *Curcuma longa* L. 10 μ g/ml, 24hr

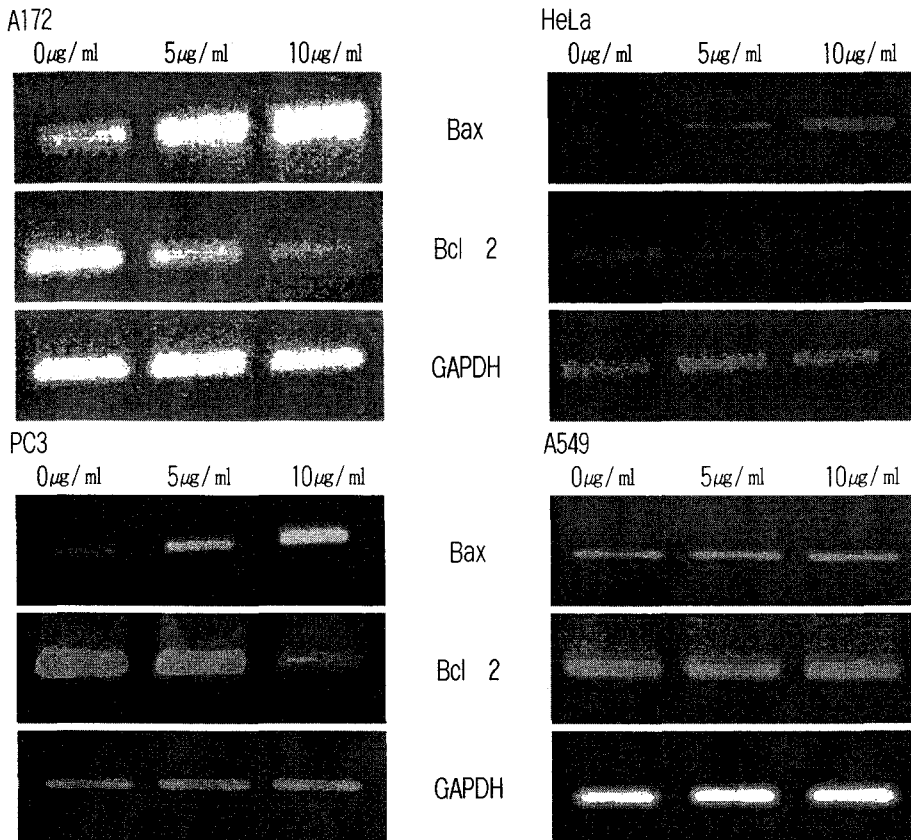


Fig. 5. Quantitative RT-PCR analysis of Bax, Bcl-2 mRNA expression induced by Curcuma longa L..

실험 결과, 강황은 A172, HeLa, PC3에서 세포 손상으로부터 세포를 보호해주는 Bcl-2유전자를 접액의 농도에 비례하여 감소시키는 반면, 세포사를 일으키는 Bax 유전자는 농도에 비례하여 증가 시킴을 알 수 있었다. 그러나 A549의 경우 이들 유전자의 발현에 변화가 없었다.

6. Apoptosis 연관 단백질의 발현에 미치는 효과

이전 실험에서 강황이 세포사멸을 일으키는 Bax 유전자의 발현을 증가시키고 세포를 보호해주는 Bcl-2 유전자는 감소시킴을 확인하였는데, 이들 유전자들이 실제로 단백질로 발현되는 양상

이 어떤지 확인하기 위해 각 암세포주에 10µg/ml의 검액을 처리하고 이 세포들로부터 단백질을 추출하여 Bcl-2, Bax에 대한 western blot을 시행하였다.

이때 단백질의 정량은 Tubulin을 이용하였는데 동일한 양의 tubulin band가 보인다는 것은 단백질량이 동일하다는 뜻이며 동일한 양의 단백질에서 western blot을 했을 때 Bcl-2, Bax 단백질의 band 밝기가 서로 다르다면 이들 단백질에 증감이 있다는 것을 의미한다.

실험결과, A172, HeLa, PC3에서는 유전자 수준에서 발현이 감소했던 Bcl-2는 단백질 수준에서도 발현이 감소하고 있었고 Bax는 발현이 증가되어

있었다. 그러나 A549에서는 이들 단백질의 발현에 변화가 없었다(Fig. 6).

한의학에는 지금의 암과는 완전히 일치하지 않지만 이와 유사한 病證 또는 病名이 있는데 乳岩, 腎岩, 蝨贅, 舌菌, 失榮, 癭瘤 등과 같은 肉眼的으로

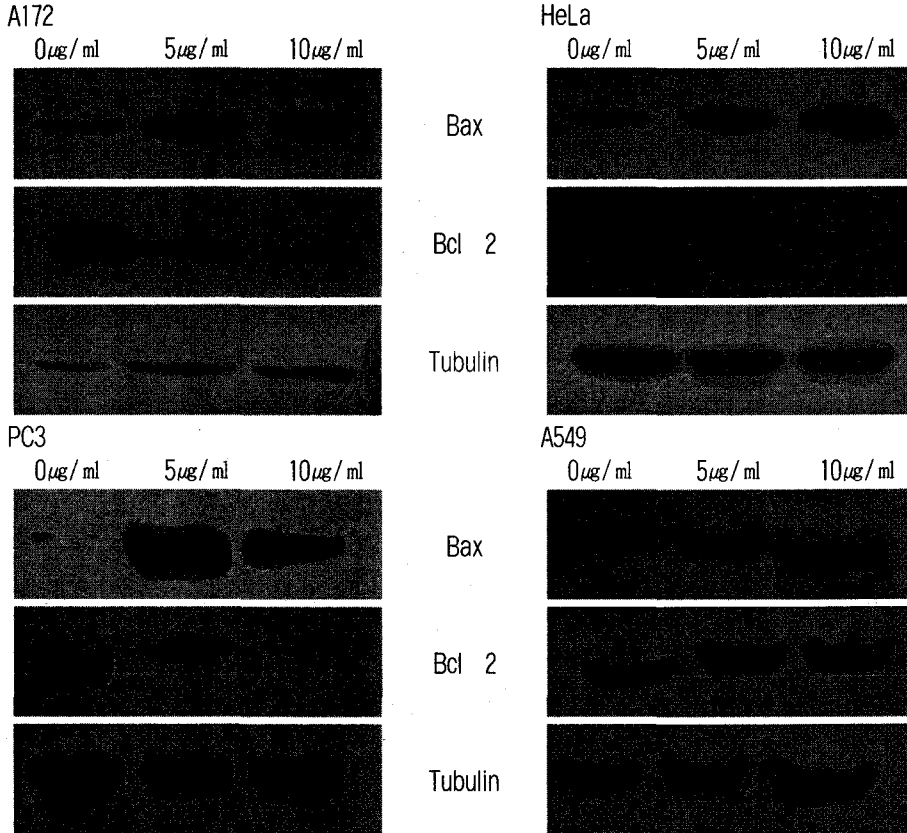


Fig. 6. Quantitative western blot analysis of Bax, Bcl-2 protein expression induced by Curcuma longa L..

IV. 考 察

암은 일종의 전신성 질환으로 국부에서 침윤성장을 하거나 다른 부위로 확산과 전이를 일으켜 정상적인 조직기관을 파괴할 뿐만 아니라 압박, 경조, 감염, 출혈 등을 야기하며, 숙주에게 일련의 대사장애와 영양장애 등을 일으켜 항병력을 약화시켜 대부분 사망에 이르게 하는 질병이다²⁰.

볼 수 있는 癌證과, 積聚, 噎膈, 反胃, 崩漏, 帶下 등과 같이 內臟에 罹患된 癌證에 대한 記錄이 있다²¹.

지금까지 항암작용이 규명된 단미들은 白花蛇舌草, 半支蓮, 一枝黃花, 山慈姑, 敗醬, 黃藥子, 蛇莓 등의 清熱藥과 穿山甲, 鬱金 등의 活血祛瘀藥 및 大黃, 巴豆 등의 瀉下藥 등이고 理氣藥인 木香, 芳香化濕藥인 豬苓, 解表藥인 蘇葉, 破血散結하는 斑蝥, 燥濕解毒하는 雄黃 등도 항암효과가 있는 것으로 報告되었다^{13,22-30}.

薑黃은 性味가 溫無毒, 辛苦하고 肝, 脾經으로 歸經하며 破血行氣, 通經止痛 등의 效能으로 心腹 痞滿脹痛, 癥瘕, 風濕肩臂疼痛, 跌撲腫痛 등을 治療하고, 瘀血로 인한 無月經, 產後 瘀血에 의한 腹痛, 打撲傷, 腫氣 등을 治療하며 利膽, 子宮收縮, 血壓 降下, 鎮痛 등의 藥理作用을 보인다^{6,7}. 또한 여러 實驗을 통한 研究에서 薑黃의 抗酸化 效果⁸, 抗菌 效果⁹ 등이 糾明되었고 薑黃의 主要 成分인 curcumin의 動脈硬化 抑制¹⁰, 抗炎症¹¹, 抗癌^{12,19} 效果 등이 報告되었다. 그리고 薑黃과 基源植物이 同一한 鬱金の 胃癌 抑制 效果¹³가 糾明되어 薑黃이 抗癌 效果가 있을 것으로 思料되나 이에 대한 研究은 未洽한 實情이다. 이에 저자는 神經교종(A172), 子宮경부암(HeLa), 폐암(A549) 및 전립선암(PC3) 세포주에 대한 薑黃의 항암 효과와 그 기전을 규명하였다.

薑黃의 이들 암세포주에 대한 항암 효능을 연구하기 위하여 암세포주에 薑黃 검액을 처리한 후 암세포의 형태학적 변화를 관찰하고, trypan blue exclusion test를 통해 암세포 살상효과를 측정하였고, MTT assay를 시행하여 암세포의 증식억제효과를 측정하였으며, mitochondria 막전위 변화를 측정하여 세포사멸의 과정을 관찰하고, 정량적 RT-PCR을 이용하여 세포의 증식 및 apoptosis와 연관이 있는 유전자에 미치는 효과를 관찰하고, western blot을 이용하여 apoptosis 연관 단백질의 발현에 미치는 효과 등에 관해 관찰하였다.

신경교종(A172), 子宮암(HeLa), 폐암(A549) 및 전립선암(PC3) 세포주에 薑黃 검액을 투여한 후 세포의 형태학적 변화를 inverted microscope 하에서 관찰한 결과 A172, HeLa, PC3에서 형태학적 변화가 농도의존적으로 나타나고 있었고 A549에서는 세포손상이 거의 일어나지 않았다. 또한 검액을 투여한 후 암세포의 핵을 DAPI로 염색하여 세포핵의 변화를 fluorescence microscope 하에서 관찰한 결과, A172, HeLa, PC3에서 핵의 크기가 작아지며 외형이 주그러드는 형태가 관찰되었지만

A549에서는 변화를 관찰할 수 없었다. 이러한 성적을 통해 신경교종, 子宮암, 전립선암에 대한 薑黃의 살상효과를 확인할 수 있었지만 폐암에서는 살상효과를 관찰할 수 없었다.

薑黃의 암세포에 대한 살상효과를 농도에 따라 측정하기 위해서 trypan blue exclusion test를 시행하였다. trypan blue exclusion test는 세포의 생존능력을 측정하는 방법으로 사멸되는 세포만 염색되는 특징을 이용하여 그 염색된 정도로 세포의 살상효과를 판단하는 방법이다.

실험 결과, A172, HeLa, PC3에서 검액의 농도에 비례하여 세포살상 효과가 나타났고 통계적 유의성을 나타내었다. 반면, A549의 경우 사멸된 세포의 비율이 대조군에 비해 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 이 결과로 보아 薑黃의 암세포 살상효과는 모든 세포주에서 동일하게 나타나는 것이 아니라 신경교종, 子宮암, 전립선암세포에서는 강한 살상효과를 보이나 폐암세포에서는 살상효과가 미약한 것으로 나타나 薑黃의 살상효과는 세포 특이성이 있음을 알 수 있었다.

암세포 증식억제효과를 분석하기 위해서 암세포를 배양기에서 배양하면서 다양한 농도의 薑黃 製를 투여하여 세포의 증식 정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 억제효과를 객관적으로 분석하였다.

MTT assay는 세포내 mitochondria의 tricarboxylic acid cycle에 관여하는 효소인 succinate dehydrogenase에 의해 황색의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)가 보라색의 formazan으로 변하는 정도를 비색 정량함으로써 薑黃 製의 감수성을 평가하는 방법으로 세포의 viability에 따라 MTT-formazan의 양이 달라지며 이를 적절한 용매에 작용시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 세포의 생존능력을 측정한다.

이 실험의 성적은 A172와 HeLa에서 Optical density(O.D.)가 검액의 농도에 비례하여 감소하였

고 통계적으로 유의한 세포증식억제효과를 보였다. PC3의 경우, 10 μ g/ml에서 유의한 O.D.값의 감소를 보였지만 5 μ g/ml에서는 통계적 유의성이 없었다. A549의 경우, O.D.값이 미미한 감소를 보여 세포 증식억제효과를 보이지 못했다.

이와 같이 강황은 신경교종, 전립선암, 자궁암 세포에서 mitochondria의 탈수소효소작용을 억제시키고 그 세포의 viability를 감소시킴으로써 세포증식억제효과를 보였다. 반면, 폐암세포에서는 세포 증식억제효과가 나타나지 않아서 강황의 세포증식억제효과는 세포특이성을 보임을 알 수 있었다.

최근 항암제가 종양세포를 죽이는 방법 중에서 자기계획 세포사(programmed cell death, apoptosis)를 유도한다는 연구가 활발히 진행되고 있다. Apoptosis는 세포가 죽을 때 사전에 이미 준비된 상태에서 사망 프로그램을 가동시킴으로써 능동적으로 죽음을 맞이한다는 개념으로, 이는 자연사로서 능동적이면서 자발적인 사망기전이다. 이 apoptosis라는 정교한 기전에 의한 능동적 세포사망기전은 몸의 생존을 위한 생명의 고도의 전략중의 하나이며 이의 발견은 20세기 후반의 의·생물학의 엄청난 업적이 아닐 수 없다³¹.

산소호흡을 하는 모든 세포에 들어 있는 mitochondria의 주된 기능은 산소의 존재하에서 호흡기질을 산화시켜 에너지(ATP)를 생산하는 것으로 세포의 종류에 따라 수천 개가 들어 있는 경우도 있다. Mitochondria의 막계는 전자전달계와 산화적 인산화반응에 관계되는 여러 가지 효소가 배열되어 있어서 ATP 생성이 효율적으로 이루어질 수 있게 되어 있으며 이 막전위는 세포의 전위를 기준으로 해서 세포내 전위를 측정할 것이다³².

Mitochondria는 apoptosis나 세포괴사의 시작에 있어서 결정적인 역할자로서 세포질내로 cytochrome c를 방출함으로써 세포를 불가역적으로 죽음에 이르게 할 수 있다. 이 과정에 있어서의 주된 역할자는 MPTP(mitochondria permeability transition pore)인데, 이는 정상적인 대사매개에 관

계된 단백질뿐만 아니라 apoptosis를 조절하는 단백질들을 함유하고 있는 다단백 복합체로 1.5kDa이하의 분자에 대해서 투과성을 가지며, 기질내 Ca²⁺의 증가된 상황에서 mitochondria 내막으로 열린다³³. 이 MPTP의 개방은 apoptosis를 유발하는 mitochondria 기질요소의 삼투압적 팽창을 야기하고 이어서 mitochondria 외막이 파괴되어 cytochrome c의 비특이적 유출을 야기한다. 또한 mitochondria의 막전위에도 영향을 줌으로써 cytochrome c의 비특이적 유출을 야기하여 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다³⁴. Mitochondria가 손상을 입지 않고 온전한 상태에서는 mitotracker가 mitochondria 막 사이로 들어가서 염색이 되지만 mitochondria가 손상을 입어 막전위가 변하게 되면 mitochondria 막 사이로 들어갔던 mitotracker가 다시 흘러나와 손상여부에 따라 염색이 되지 않거나 약하게 염색이 되어 현미경하에서 막전위 변화 여부를 확인할 수 있다.

이 실험에서는 10 μ g/ml 농도의 검액을 이용하여 암세포주들의 mitochondria 막전위 변화를 측정하였는데 A172, HeLa, PC3의 실험군은 대조군에 비해 훨씬 어둡게 보이며 세포 형태의 구별이 어려운 세포손상 소견을 관찰할 수 있었다. 반면 A54C에서는 대조군에 비해 별 다른 변화가 없었다.

이에 대한 정량적 분석을 위해 flowcytometer를 이용한 막전위도를 측정된 결과, A172, HeLa, PC3에서 막전위도의 감소가 나타났지만 A549에서는 변화가 없었다. 위의 결과로 볼 때 강황은 신경교종, 전립선암, 자궁암 세포에 있는 mitochondria의 손상으로 막전위도를 감소시킴으로써 세포 증식을 억제시키고 결국 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다.

한편 세포의 자기계획 세포사에는 여러 종류의 단백질 및 유전자가 관여하는데 대표적인 유전자로는 Bcl-2, Bax, Bcl-XL, fas, FAD, CPP32, Bak 등이 있다³⁵. 이들 유전자는 세포의 죽음에 깊이 관여하고 있으며 한 예로서 Bcl-2 유전자의 경우에

이 유전자가 다량으로 표현될 경우 세포는 여러 종류의 유해한 자극으로부터 강력하게 저항할 수 있는 능력을 얻게 된다. 종양세포가 이런 유전자의 발현을 통해 항암제의 공격으로부터 저항하면서 지속적으로 분열·증식할 수 있는 것이다. 일부의 항암제의 경우 이러한 유전자의 발현을 억제하거나 또는 세포에서 죽음을 촉진하는 유전자를 유발함으로써 항암효과를 발휘할 수 있다. 따라서 강황이 이러한 세포의 죽음과 연관된 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는가를 연구하는 것은 강황의 약리작용의 기전을 밝히는데 반드시 필요한 과정이라 할 수 있다.

Bcl-2 유전자는 B세포 림프종 형성에서 발견되는 암유전자로서 단백질 산물은 mitochondria 막과 내형질세망 그리고 핵막에서 발현된다³¹. 현재 Bcl-2 계열 단백질은 크게 세포사멸을 유도하는 단백질과 세포사멸을 억제하는 단백질로 구분할 수 있다³⁶. 세포사멸을 유도하는 Bcl-2 계열 단백질에는 Bax, Bid, Bak, Bad 등이 있으며 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 계열 단백질에는 Bcl-2, Bcl-XL 등이 있다. Bcl-2 단백질의 작용기전은 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않지만 과도하게 발현이 증가될 경우 세포에서 세포사멸을 차단하여 세포가 오래 동안 죽지 않고 생존하게 함으로써 암세포로 이행할 수 있는 기회가 증가되어 결국 종양이 발생하리라고 생각된다³⁷. 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 있는데, 이들의 발현에 영향을 미치는 항암제의 개발 및 발굴은 매우 중요한 과정이라 할 수 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^{38,39}.

Apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 효과를 판정하기 위하여 대조군과 실험군 사이에 quantitative RT-PCR을 시행한 결과, 강황은 신경교종, 전립선암, 자궁암 세포에서 세포를 보호해주는 Bcl-2 유전자를 강황의 농도에 비례하여 감소시키는 반면 세포사를 일으키는 Bax 유전자는 농도에 비례하여 증가시키는 것을 알 수 있었다. 그러나 세포살상효과가 미미했던 폐암세포주의 경우 이들 유전자의 발현에 변화가 없었다.

위의 실험 결과를 통해 강황은 Bax 유전자의 발현을 증가시키고 Bcl-2 유전자는 감소시킴으로써 세포살상효과를 갖게 됨을 확인하였는데 이들 유전자들이 실제로 단백질로 발현되는 양상을 알아보기 위해 western blot을 시행한 결과, 신경교종, 전립선암, 자궁암세포에서 Bcl-2는 단백질 수준에서도 발현이 감소하였고, Bax는 단백질 수준에서도 발현이 증가되었다. 그러나 세포살상 효과가 미미했던 폐암세포에서는 이들 단백질의 발현에 변화가 없었다.

이상의 실험결과를 종합해 보면, 강황은 신경교종, 전립선암 및 자궁암세포에서 Bax 유전자를 증가시키고 Bcl-2 유전자를 감소시키며, mitochondria의 막전위도를 감소시키고 세포의 viability를 감소시켜서 세포 사멸을 유도함으로써 항암효과를 보였으나 폐암세포에서는 항암효과가 미미한 것으로 나타나 강황의 항암제로서의 기능은 세포 특이성을 보였으며 향후 다른 암세포에 대한 추가적인 연구와 함께 임상 적용에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

薑黃의 抗癌 效果를 糾明하기 위하여, 薑黃 檢液을 神經膠腫(A172), 子宮癌(HeLa), 肺癌(A549) 및 前立腺癌(PC3) 細胞株에 處理한 後 細胞 및 細胞核의 形態學的 變化, trypan blue exclusion test를

등한 癌細胞 殺傷效果, MTT assay를 통한 癌細胞 增殖抑制效果, mitochondria 膜電位 變化, apoptosis와 聯關된 遺傳子의 發顯에 미치는 效果 및 apoptosis와 聯關된 蛋白質의 發顯에 미치는 效果 등을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 癌細胞의 形態學的 變化는 A172, HeLa, PC3에서 濃度依存的으로 顯著하게 나타났으나 A549에서는 變化가 거의 없었다.
2. 癌細胞 殺傷效果는 A172, HeLa, PC3에서 濃度依存的으로 有意性있게 나타났으나 A549에서는 有意성이 없었다.
3. 癌細胞 增殖抑制效果는 A172, HeLa, PC3에서 有意性있게 나타났으나 A549에서는 有意성이 없었다.
4. Mitochondria의 膜電位는 A172, HeLa, PC3에서 減少하였으나 A549에서는 減少가 없었다.
5. A172, HeLa, PC3에서 Bax 遺傳子가 增加하였고 Bcl-2 遺傳子가 減少하였으나 A549에서는 이들 遺傳子의 發顯에 變化가 없었다.
6. A172, HeLa, PC3에서 Bax 蛋白質이 增加하였고 Bcl-2 蛋白質이 減少하였으나 A549에서는 이들 蛋白質의 發顯에 變化가 없었다.

以上的 結果로 보아 薑黃은 神經膠腫, 子宮癌 및 前立腺癌에서 抗癌效果를 보이거나 肺癌에서는 抗癌效果가 微微한 것으로 나타나 薑黃의 抗癌劑로서의 機能은 細胞 特異성을 보였다.

參考文獻

1. 대한병리학회. 病理學. 서울: 고문사; 2003, p143.
2. 서울대학교의과대학편. 腫瘍學 제2전정판. 서울: 서울대학교출판부; 2001, p141-88.
3. 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):470-99.
4. Kronenberg F, Mindes J, Jacobson JS. The future of complementary and alternative medicine for cancer. Cancer Invest. 2005;

- 23(5):420-6.
5. Wicke RW, Cheung CS. Principles for applying traditional chinese medicine to cases of cancer. Integr Cancer Ther. 2002;1(2):175-8.
6. 韓醫科大學本草學編纂委員會. 本草學. 서울: 영림사; 2004, p457-8.
7. 中약대사전편찬위원회. 完역중약대사전. 서울: 정담; 1999, p106-12, 3282-7.
8. 임대관, 최응, 신동화. 국내산 약용식물 추출물의 항산화 효과 검색과 용매 분획물 비교. Korean J. Food SCI. Technol. 1996;28(1):83-9.
9. 김무성, 이동철, 홍종언. 국내 및 인도네시아산 식물의 에탄올 추출물의 항균효과. Korean J. Food SCI. Technol. 2000;32(4):949-58.
10. 김태균, 김승희, 강석연. 고콜레스테롤혈증 토끼에서 Curcumin의 항동맥경화 효과. 약학회지 2000;44(1):71-9.
11. Wessler S, Muenzner P. The anti-inflammatory compound curcumin inhibits Neisseria gonorrhoeae-induced NF-kappaB signaling, release of pro-inflammatory cytokines/chemokines and attenuates adhesion in late infection. Biological Chemistry 2005;386:481-90.
12. Sharma RA, Gescher AJ. Curcumin: The story so far. European Journal of Cancer 2005;41:1955-68.
13. 曹裕炅, 柳基遠, 柳逢夏, 尹相協, 金珍成. 鬱金이 胃癌細胞에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌 2003;9(1):15-38.
14. Jennifer M. Jones, Jack W. Anderson. Relative potencies of PAHs and PCBs based on the response of human cells. Environmental Toxicology and Pharmacology 1999;7:19-26.
15. 정경석, 홍창걸, 문성하. MTT Assay를 이용한 위선암의 항암제 감수성 검사. 의과학회지 1995;49(4):479-483
16. Anthony Mathur, Ying Hong, Barbara K.Kemp. Evaluation of fluorescent dye for the

- detection of mitochondrial membrane potential change in cultured cardiomyocyte. *Cardiovascular Research* 2002;46:126-138.
17. 김정옥, 조준형, 문철, 허철행, 장세경. 위암의 DPC4 유전자 돌연변이. *대한암학회지* 1999;31(1):1-8.
 18. 김시영, 이종인, 문난모, 백남선. 위암환자에서 암배아성항원에 대한 역전사연쇄 증합효소반응 검사를 이용한 복강내 유리암세포의 진단. *대한암학회지* 1999;31(1):24-30.
 19. 김은지, 이선화, 이현숙, 조한진, 윤정한. Curcumin의 유방암 세포인 MCF-7 세포 증식 억제 효과. *대한암예방학회지* 2004;9(4):244-52.
 20. 李眞華, 沈範相, 安圭錫, 崔昇勳. 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 影響. *大韓韓方腫瘍學會誌* 1999;5(1):61-76.
 21. 崔昇勳. *東醫腫瘍學*. 서울: 행림서원; 1995. p37-8, 84-93, 142.
 22. 金賢兒 外. 韓藥을 利用한 抗癌 實驗研究의 傾向에 關한 考察. *大韓韓方腫瘍學會誌*, 1998; 4(1):211-32.
 23. 常毅敏. *抗癌本草*. 서울: 도서출판 바람과 물결; 1992. p171-97.
 24. 金東默, 柳基遠, 柳逢夏. 石雄黃의 試驗管内 胃癌細胞 抗癌作用에 關한 研究. *大韓韓方內科學會誌* 2003;24(3):426-40.
 25. 鄭命采, 柳基遠, 柳逢夏. 蛇莓가 數種의 人體 癌細胞에 미치는 影響. *大韓韓方內科學會誌* 2004; 25(2):202-13.
 26. 金倫寬, 柳基遠, 柳逢夏. 蛇莓가 數種의 癌細胞에 미치는 影響. *大韓韓方內科學會誌*. 2005; 26(2):320-32.
 27. 朴宰民, 柳基遠, 柳逢夏. 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. *大韓韓方內科學會誌* 2002;23(4):569-78.
 28. 오희라, 고성규. 木香과 車前草가 胃癌細胞의 活性, 增殖, 自己殺害能 및 細胞週期 關聯 遺傳子 發顯에 미치는 影響. *大韓韓方腫瘍學會誌* 2001;7(1):1-18.
 29. 金星姬, 柳基遠, 柳逢夏, 尹相協, 金珍成. 黃藥子의 胃癌細胞에 對한 抗癌 效能 檢索. *大韓韓方內科學會誌* 2002;23(1):99-106.
 30. 김선량, 류봉하, 박동원, 류기원. 山慈菇가 胃癌細胞에 미치는 影響. *大韓韓醫學會誌* 2001; 22(2):75-83.
 31. 서정선. 20世紀末의 醫·生物學의 새로운 비전 apoptosis·몸의 效率의 生存을 위한 細胞의 能動的 死亡기전. 서울: 醫學研究의 最新 動向; 1998, p30-2.
 32. Martin Crompton. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999;341:233-49.
 33. Victor J. Thannickal, Barry L. Fanburg. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Mol Physiology* 2000;279:1005-28.
 34. Paolo Bernardi, Luca Scrrano, Raffaele Colonna. Mitochondria and cell death. *Eur. J. Biochem*. 1999;264:687-701.
 35. Gupta S. HBP60, Bax, Apoptosis and the Heart. *J. Cell. Mol. Med* 2005;9:51-8.
 36. 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.
 37. Tsujimoto Y, Shimizu S. FEBS. Bcl-2 family: life-or-death switch. *Lett* 2000;466:6-10.
 38. Park CK, Manning JT, 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;113:113-9.
 39. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*. 1998;5:372-80.