

## 丹蔘 추출액이 Urethane으로 유발된 생쥐의 폐암에 미치는 영향

박재석, 김희철  
동신대학교 한의과대학 간계내과학교실

### Effect of *Salvia miltiorrhiza* Extract in Urethane-induced Lung Tumorigenesis in A/J Mice

Jae-seok Park, Hee-chul Kim

Department of Hepatic Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-shin University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The aim of this study was to determine the effects of *Salvia miltiorrhiza* (SM) extract in urethane-induced lung tumorigenesis in A/J mice.

**Methods** : We examined change of body weight, histological, apoptosis, immunohistochemical and gene expression of cyclooxygenase (COX-2) in lung tumors. Mice were divided into 3 groups: normal, saline, and experimental group administered SM extract after injection with urethane.

**Results** : Histological observation showed shrunken alveoli in the control group, but recovered from damage in the SM extract administered group. The COX-2 positive materials were observed in the smooth muscle of terminal bronchiole and alveoli from the control group, but these positive materials decreased in the SM extract treatment group. The results of electron microscopical observation, dilated capillary and degenerated endothelia were observed in the control group. The apoptotic nuclei increased more in the control group compared with the normal and SM extract administered groups. Serial sections of the whole lung showed solid and papillary tumors. The size and number of tumors decreased in the SM groups compared with the control groups.

**Conclusions** : These results suggest the possibility that SM may exert an anti-tumor effect on urethane-induced lung tumorigenesis.

**Key words** : *Salvia miltiorrhiza*, Lung Tumorigenesis, Urethane

## 1. 서론

우리나라의 2000년 이후 암 사망 원인 질환 중 1위를 차지하는 폐암의 발생 빈도는 흡연 인구의 증가, 산업장과 주거 환경에서 발암물질의 피폭 등에 의하여 증가 추세를 보이고 있고 사망률도 높다<sup>1</sup>.

폐암의 서양의학적 치료는 가능하면 외과적 수술로서 종양을 제거하고, 남아 있는 암세포의 제거와 전이 및 재발 방지를 위해서 화학요법과 방사선치료를 실시하게 되는데, 폐암은 대부분이 3-4기에 이르러서야 확진되므로 수술이 가능한 경우는 25%에 불과하다<sup>2-3</sup>.

한의학에서 폐암은 咳嗽, 胸痛, 咯血, 發熱, 胸悶, 氣短 등의 주요증상에 근거하여 그 발생과정 및 증상에 따라 肺癰, 肺積, 肺疽, 息貫 등에서 그 유사점을 찾을 수 있다<sup>4</sup>.

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)의 性味는 苦·微

· 교신저자: 박재석 전라남도 목포시 상동 834번지  
동신대학교 목포한방병원  
TEL: 061-280-7921 FAX: 061-280-7788  
E-mail: windboyz@hanmail.net

寒·無毒하고 心·心包·肝 三經에 작용한다. 生用 혹은 炒하여 사용한다. 活血調經·涼血消癰·養血安神 등의 효능이 있어 癥瘕積聚, 瘡癰腫痛, 月經不調, 血滯經閉, 產後腹痛, 心悸失眠 등의 병증을 치료한다<sup>5</sup>.

단삼의 항암효과에 대한 연구는 김 등<sup>6</sup>이 단삼과 그 외 여러 천연물을 분획별로 추출하여 암세포주에 대하여 SRB법으로 비교 검토한 결과 단삼이 항암작용이 높다고 보고하였고, 정 등<sup>7</sup>은 단삼 추출물의 암세포 증식억제 효과에 관한 연구에서 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통하여 에탄올 추출물 중에 항암활성을 갖는 성분이 존재한다고 발표한다 있다.

실험에 사용된 단삼은 積聚나 瘡癰에 효과가 있고 月經異常, 產後腹痛, 癥瘕에 사용되고 있지만 단삼의 효과에 대한 세포 생물화학적, 조직학적 연구는 미비하였다. 이에 저자는 단삼 추출물이 폐암 유발 억제에 미치는 영향을 확인하기 위해서 urethane으로 폐암을 유발시킨 A/J mouse에 단삼 추출물을 각각 적용하여 체중의 변화, 폐의 육안적 관찰, 광학현미경 관찰, 면역조직화학적 관찰, Apoptosis 관찰, 종양의 크기 및 개수의 변화, 전자현미경 관찰, Total RNA 추출 및 RT-PCR (역전사중합효소연쇄반응) 등을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### 1) 실험 동물 및 사육 조건

체중 26 g 내외의 6주령 생쥐(A/J strain)를 다물사이언스(주)로부터 구입한 후 동신대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 : 21±2℃, 습도 : 50-60%)으로 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 단삼 약물 추출

실험에 사용한 약제는 동신대학교 부속한방병원

에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

단삼(*Salvia miltiorrhiza*, SM) 40 g을 물 600 mL에 넣고 약탕기로 3 시간 동안 가열한 다음 50 ml로 농축하였다. 동결건조(Samwon, SFDSM006, 한국)하여 10.6 g의 건조 분말을 얻었다.

### 2. 방 법

#### 1) 폐암 유발

실험에 사용한 모든 생쥐는 정상적인 사육환경에서 1주 이상 적응시킨 후 0.9% 식염수에 용해된 urethane(Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 1 mg/g of body weight을 8주까지 복강 투여하였다.

#### 2) 실험군 설정 및 약물 투여

정상군은 보통 식이를 하였으며, 대조군 생쥐는 폐암 유발을 위하여 urethane을 투여한 10주부터 생리식염수 0.1 mL을 4주간 매일 구강 투여하였고, 실험군은 10주부터 단삼추출액 건조분말 0.12 g/kg을 4주간 48시간 간격으로 구강 투여하였다.

### 3. 관 찰

#### 1) 체중 측정

대조군과 실험군의 체중은 2주 간격으로 실험기간 동안 측정하였으며, 체중 측정 12 시간 전에 절식시켰다.

#### 2) 육안적 관찰

실험쥐는 urethane으로 폐암을 유발한 일로부터 14주 경과 후 흉곽을 해부하여 노출시킨 다음 폐를 카메라로 촬영하였다.

#### 3) 광학현미경 관찰

생쥐의 폐 조직을 적출하여 10%의 포르말린을 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100 I %, 100 II %와 같이 알코올 농도를 상승시켜 탈수를 한 다음 xylene으로 투명화 과정을 거친 후 paraffin으로 포매 하였다. 포매된 조직은 microtome을 사용하여 5 μm 두께로 절편하였다. 종양의 크기와 개수를 확인하기 위하여 폐 전부를 연속절편으로 제작하였다. 절편한

조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene으로 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 함수과정을 거치게 하였다. Hematoxylin과 Eosin으로 이중염색을 한 다음 탈수를 하였다. Canada balsam으로 봉합한 후 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

#### (1) 면역조직화학 관찰

생쥐의 폐 조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5  $\mu$ m 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 paraffin을 제거한 다음 100%, 90%, 80% ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 함수과정을 거치게 하였다. 12시간 후 pH 7.2, 0.1 M의 phosphate buffer saline(PBS, 0.9% NaCl) 용액에 24시간 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 polyclonal anti mouse COX-2 항체(Cayman Chemical Co.)를 각각 처리하고 일정한 조건(온도 : 25°C, 습도 : 55~60%)의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 그리고 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 30분간 배양시킨 후 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex(ABC) reagent(Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS용액에서 15분간 세척하였다.

DAB 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시키고 난 후 흐르는 물에 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51,

Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

#### (2) Apoptosis 관찰

폐 조직의 절편에 존재하는 세포사멸은 ApopTag<sup>®</sup> *in situ* apoptosis detection kit (chemicon, Co.)를 사용하였다. 조직 절편을 slide glass에 부착시킨 다음 xylene으로 파라핀을 제거한 다음 농도가 낮은 순으로(100%, 90%, 70%) 함수과정을 거친 다음 5분 동안 PBS에서 배양하였다. 염색은 proteinase K(20  $\mu$ g/ml; sigma)에서 15분 동안 배양한 후, 증류수로 세척하고, 그 다음 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(vol/vol, in PBS)에서 5분 동안 배양하여 endogenous peroxidase의 활성을 억제하였다. Equilibration 완충액을 30초 동안 처리 한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) enzyme를 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. Stop 완충액을 처리 한 다음 slide glass를 수세하였다. DAB 발색시약을 5분 동안 처리한 다음 methyl green으로 대조 염색한 다음 탈수과정을 거친 후 coverslips를 봉합하였다. 이후 동일한 방법으로 사진을 촬영하였다.

#### (3) 종양의 크기 및 개수의 측정

대조군과 실험군 각각 3마리의 파라핀 블록을 제작한 후 각 블록마다 약 50개의 절편을 연속으로 제작한 다음 각각의 실험군마다 관찰되는 암조직을 고형종(solid tumor)과 유두종(papillary tumor)으로 구분하여 동일한 방법으로 사진을 촬영하여 크기 및 개수를 측정하였다.

#### 4) 전자현미경 관찰

전자현미경 관찰을 위하여 광학현미경 시료와 동일한 부위의 조직을 절취하여 전고정액 속에서 1 mm크기로 세절한 후 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (phosphate buffer, pH 7.4)로 2시간 동안 전고정하였다. 전고정이 끝난 조직은 동일 완충액을 사용 10분 간격으로 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide(OsO<sub>4</sub>)로 2시간 후 고정 한 다음 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 세척 후 시료들은 상승농도 순의 에탄올로 탈수하여 propylene

oxide로 치환한 후 Epon-Araldite 혼합액으로 포매하였고 60°C 오븐에서 30시간 중합시켰다. 포매된 조직들을 LKB-V형 ultramicrotome을 사용 1 μm 두께로 절편을 제작하여 1% toluidine blue로 hot plate(60°C)상에서 염색하였다. 염색된 시료를 광학현미경으로 관찰하여 조직을 확인한 다음 동일한 부위에서 60 μm 두께로 초박절편을 제작하여 silver grid에 부착하였고, uranyl acetate 와 lead citrate로 이중 염색한 다음 JEM 100 CX-II 투과형 전자현미경(80KV)으로 관찰하였다.

5) Total RNA 추출 및 RT-PCR (역전사중합 효소연쇄반응)

생쥐의 폐를 획득하여 trisol (Sigma, USA)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. Reverse transcription은 DEPC-DW로 최종부피를 50 μl로 맞춘 후 total RNA에 RT-premix (바이오니아,

USA) 혼합용액을 사용하여 cDNA를 합성하였다. RT 반응은 65°C에서 10분 동안 RNA를 변성시키고, 42°C에서 1시간 동안 역전사하여 cDNA를 합성하고, 95°C에서 5분 동안 MuLV reverse transcriptase를 불활성화시키는 과정으로 진행되었다. PCR 반응은 10 mM Tris-Hcl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 1 unit Taq polymerase, 10 pmol 5' 과 3' COX-2 primer 그리고 RT product를 첨가하고 PCR을 수행하였다. PCR 사이클은 95°C, 10분동안 denaturation, annealing 온도는 60°C에서 40초, 72°C에서 40초동안 extention과정을 거쳐 PCR product를 얻었다. GAPDH는 internal control로 수행하였다. 이렇게 얻어진 product는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV (Kodak, USA)에서 관찰하였다.

Table 1. Primers designed for amplification of the COX-2 mRNA in RT-PCR

Gene product	Forward(F) and Reverse(R) primer sequences	PCR product size
COX-2	F 5'-AGAAGGGTTCCCAATTAAG-3' R 5'-ATAATTTTTCCCTCCAAAGG-3'	500bp

6) 통계처리

결과에 대한 통계처리는 SAS(statistical analysis system)program에 의하여 각 실험군별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, p-value가 최소한 0.05이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 체중 측정

체중을 2주 간격으로 7회 측정한 결과 실험군은 정상군에 비하여 8주까지는 약 2 g 정도 적었으나 10주부터는 약 3 g 정도 저체중을 나타냈다. 그러나 대조군에 비하여 10주 까지는 다소 높았으나 10주와 12주는 비슷하였다(Fig. 1).

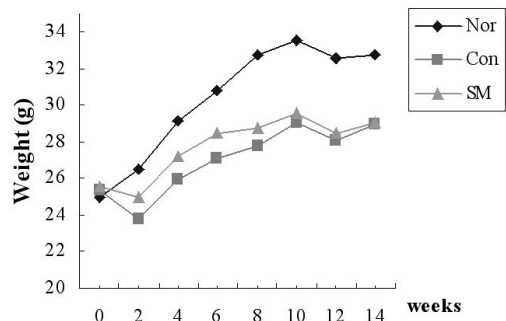


Fig. 1. The changes of body weight during 14 weeks.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after urethane treatment; SM, SM 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks after urethane treatment.

## 2. 육안적 관찰

정상군 실험쥐의 흉강을 열고 폐를 육안으로 관찰하여 비교한 결과(Fig. 2A) 대조군은 전반적으로 고르지 못할 뿐만 아니라 약 5개에서 10개 이상의 유두종(papillary tumor)을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 실험군은 유두종이 관찰되었으나 대조군에 비하여 소수의 작은 유두종이 관찰되었다(Fig. 2C).

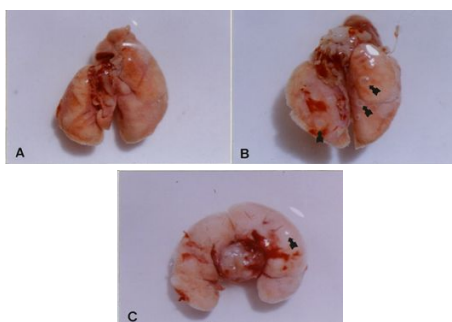


Fig. 2. Gross appearance of lung adenomas induced by urethane for 8 weeks.

Arrows indicate tumors in the characteristic pleural surface location. Arrows indicate papillary tumors. Nor, administered saline; Con, control group administered saline after urethane treatment; SM, SM 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks after urethane treatment.

## 3. 광학현미경 관찰

폐암 유발 14주 후 A/J mouse의 폐에서 관찰되는 선종(adenomas)은 고형종(solid tumor)과 유두종(papillary tumor) 2가지 형태로 나타났다. 고형종과 유두종은 암세포의 조직학적인 차이는 관찰되지 않았으나 종양의 위치에 따라 구분하였다. 대조군과 실험군 모두에서 유두종과 고형종이 관찰되었는데 암 조직은 폐포 조직에 비해 대체로 강한 염색성을 보였다(Fig. 3. B2 & C2). 대조군은 정상군의 폐 조직(Fig. 3A)에 비하여 종말세기관지(terminal bronchiole)와 허파파리주머니(alveoli)는 매우 위축된 소견을 보였다(Fig. 3. B1). 실험군의

폐조직은 종말세기관지와 허파파리주머니의 형태는 정상군에 비하여 다소 위축되었으나 대조군에 비하여 허파파리주머니와 종말세기관지의 형태학적인 병변은 뚜렷이 관찰되지 않았다(Fig. 3. C1).

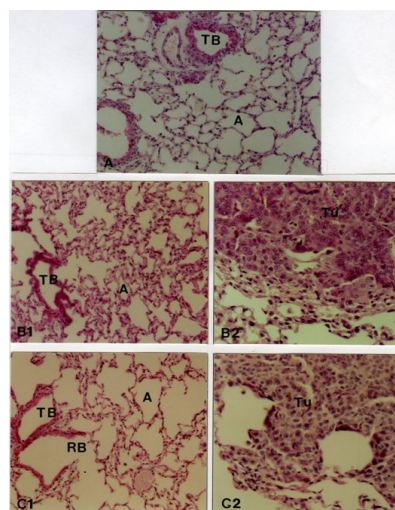


Fig. 3. Comparative histopathology of lung cancer from A/J mouse induced by urethane.

Light micrographs of normal group(A) showing lung tissue(Fig. 3. B1, B2) and 1 solid tumor(Tu), and narrowing terminal bronchiole (TB) and alveolar sac (A). A, normal group administered saline; B, control group administered saline after urethane treatment; C, SM 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks after urethane treatment. RB, respiratory bronchiole; Tu, tumor. × 200, H-E stain.

### 1) 면역조직화학적 관찰

COX-2 면역조직화학 검색 결과 정상군에서는 종말세기관지의 평활근과 호흡세기관지의 일부에서 면역 양성반응을 보였으며, 허파파리 조직에서는 아주 미약하게 나타났다(Fig. 4A). 대조군에서는 종말세기관지의 평활근과 호흡세기관지에서 아주 높은 면역반응성을 보였을 뿐만 아니라 허파파리세포의 대부분에서 COX-2에 높은 면역반응성을 보였다(Fig. 4. B1). 암조직을 구성하는 세포들은 세포분열이 활발하여 hematoxylin에 염색된 다수

의 핵들이 규칙적으로 정렬된 구조를 보였으며, 대체로 COX-2에 대한 면역 반응성은 약하나 일부에서는 강한 면역반응성을 보였다(Fig. 4. B2). 실험군에서는 정상군에서처럼 종말세기관지의 평활근 조직에서 COX-2에 대한 면역 반응성이 높게 나타났으나, 허파파리세포의 면역반응성은 낮았다(Fig. 4. C1). 암조직에서 관찰되는 핵은 대조군에 비하여 적었으며, 불규칙적인 배열양상을 보였다. COX-2에 대한 면역반응성 또한 대조군에 비하여 낮았다(Fig. 4. C2).

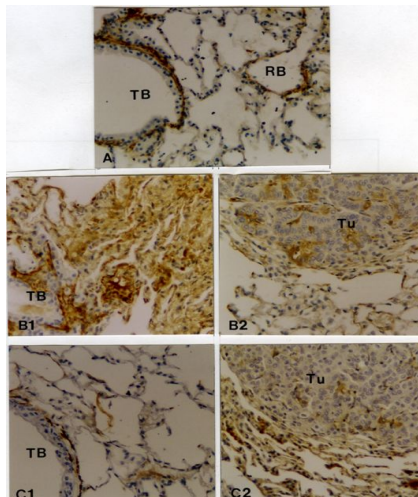


Fig. 4. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-2 in A/J mouse.

The COX-2 positive materials are observed in the tumor(Tu), alveoli, and smooth muscle of terminal bronchiole(TB) in the control group(A). The COX-2 positive materials of the SM group observed weakly compared with control group. A, normal group administered saline; B, control group administered saline after urethane treatment; C, SM 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks after urethane treatment. RB, respiratory bronchiole. COX-2 immunohistochemistry,  $\times 200$ .

## 2) Apoptosis 관찰

세포사멸을 관찰한 결과 정상군에서는 종말기관

지와 허파파리를 구성하는 상피세포에서 소수의 세포사멸 핵들이 관찰되었다(Fig. 5A). 대조군에서는 허파파리를 구성하는 상피세포에서 다수의 세포사멸 핵들이 관찰되었다(Fig. 5B). 실험군에서는 정상군에서와 같이 암조직이 관찰되지 않은 허파조직의 대부분에서 세포사멸 핵들이 소수 관찰되었다(Fig. 5C).

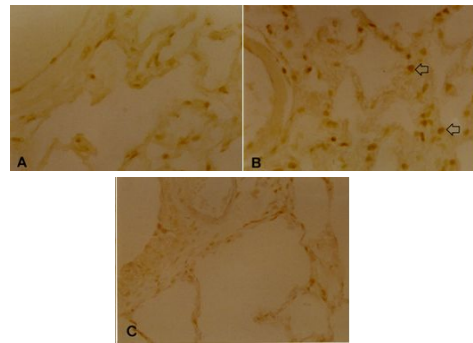


Fig. 5. A, normal group administered saline; B, control group administered saline after urethane treatment; C, SM 0.12g/kg/day administered group during 14 weeks after urethane treatment.

Arrows indicate apoptotic cells.  $\times 400$

## 3) 종양의 크기 및 개수의 측정

종양의 크기를 관찰한 결과 대조군 고형종의 평균크기는  $74.7 \mu\text{m}$ 이었으며, 실험군은  $66.0 \mu\text{m}$ 이었다. 실험군이 대조군에 비하여 대체로 작았으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 6). 한편, 유두종은 대조군이  $89.7 \mu\text{m}$ 이었으며, 실험군은  $87.3 \mu\text{m}$ 로 다소 작았으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 6).

종양의 수는 유두종과 고형종으로 구분하여 계수하였다. 고형종의 수는 대조군은  $9.7 \pm 2.31$ 이었으며, 실험군은  $9.0 \pm 1.7$ 로 실험군이 약간 작게 나타났다(Fig. 7). 유두종은 대조군이  $12.3 \pm 5.77$ 이었으며, 실험군은  $9.3 \pm 1.15$ 로 평균 3개 정도 적었으나 이와 같은 결과는 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 7).

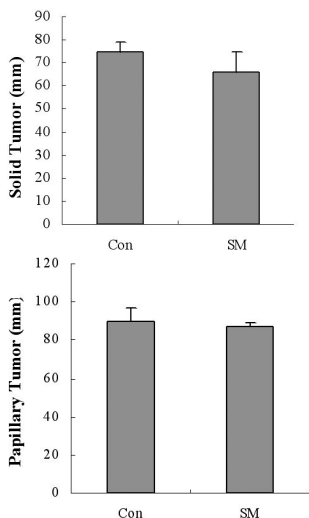


Fig. 6. Size of solid tumor from 14 weeks control, SM groups. Con, control group administered saline; SM, SM 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks; Values are Mean±SE, Standard error; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

Size of papillary tumor from 14 weeks control, SM groups. Con, control group administered saline; SM, SM 0.12g/kg/every other day administered group during 6 weeks; Values are Mean±SE, Standard error; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

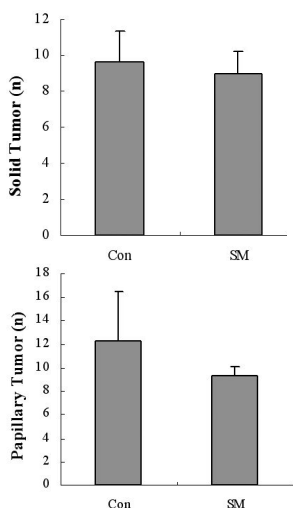


Fig. 7. Number of solid tumor from 14 weeks

control and SM groups. Con, control group administered saline; SM, SM 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks; Values are Mean±SE, Standard error; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01.

Number of papillary tumor from 14 weeks control and SM groups. Con, control group administered saline; SM, 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks; Values are Mean±SE, Standard error; Prob > |T|, Values in the 0.05 and 0.01

#### 4. 전자현미경 관찰

정상군에서는 제2형 허파파리세포(type 2 pneumocyte)의 핵은 비교적 둥글고 세포질에는 다수의 층판소체들이 함유되어 있었다. 허파파리사이막(inter-alveolar septum)에서는 탄력섬유가 관찰되었다(Fig. 8A). 제 1형 허파파리세포(type 1 pneumocyte)는 편평상피세포, 모세혈관의 내피세포, 두 상피세포 사이에 있는 바닥막으로 구성된 호흡막의 형태가 뚜렷하였다. 모세혈관 속에서는 적혈구가 관찰되었다(Fig. 8B).

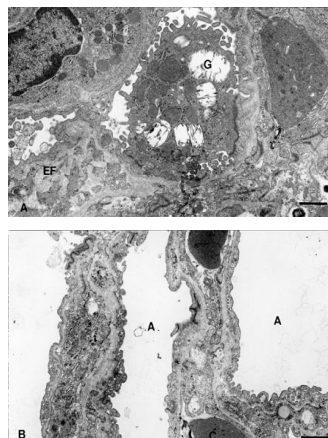


Fig. 8. Electron micrographs of normal lung tissue from normal A/J mouse.

A lot of surfactant containing granules(G) and elastic fiber(EF) are observed in the type 2 pneumocyte. A, alveolus; C, capillary vessels. Bar indicates 1 μm.

대조군에서 관찰되는 제2형 허파파리세포의 세포질에는 다수의 층판소체들이 함유되어 있었으며, 전자밀도가 높은 다수의 물질을 함유하고 있었다. 세포의 형태는 다소 변형되어 많은 세포질 돌기를 갖고 있었다. 정상군의 허파파리사이막에서 관찰되었던 탄력섬유는 거의 관찰되지 않았으며 교원섬유들이 다수 관찰되었다(Fig. 9A). 제 1형 허파파리세포는 정상군에 비하여 세포질의 전자밀도가 높게 나타났으며 전반적으로 세포가 손상되어 있었다. 모세혈관은 전반적으로 매우 팽창되어 있었으며, 모세혈관 내피세포는 매우 편평하게 관찰되었다(Fig. 9B).

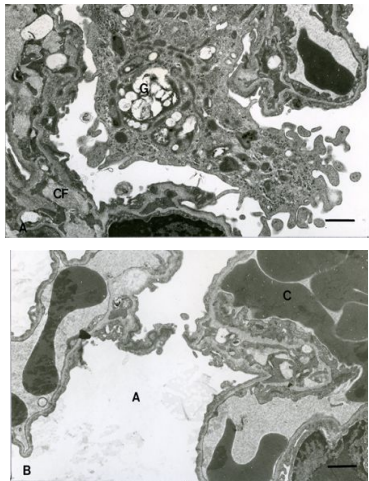


Fig. 9. Electron micrographs of lung tissue from control A/J mouse.

A lot of surfactant containing granules(G) and collagenous fiber(CF) are observed in the type 2 pneumocyte. A, alveolus; C, capillary vessels. Bar indicates 1  $\mu$ m.

실험군 생쥐의 허파파리의 허파파리 속 공간에서는 큰포식세포(macrophage)가 관찰되었다. 큰포식세포의 핵은 핵막이 매우 불규칙하고 핵질은 고르게 관찰되었다. 큰포식세포는 전자밀도가 높고 크기가 다양한 물질들을 다수 함유하고 있었다(Fig. 10A). 제1형 허파파리세포의 형태는 대부분

정상군과 유사한 소견을 보였으나 일부분에서는 다소 손상된 소견을 보였다. 모세혈관 또한 직경이 정상군과 비슷한 것도 있었으나, 사진의 우측에서 관찰되는 것은 직경이 다소 팽대되어 있었으며, 모세혈관 내피세포 또한 정상군에 비하여 보다 편평하게 관찰되었다(Fig. 10B).

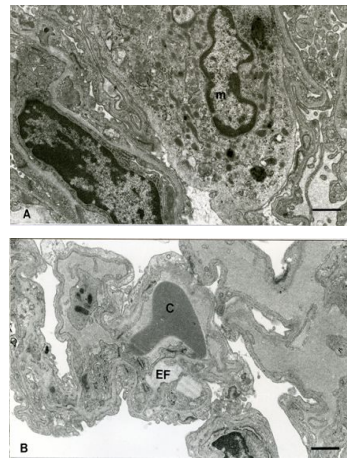


Fig. 10. Electron micrographs of lung tissue from SM group.

A lot of surfactant containing granules(G) and elastic fiber(EF) are observed in the type 2 pneumocyte. A, alveolus; C, capillary vessels, M, macrophage. Bar indicates 1  $\mu$ m.

### 5. Total RNA 추출 및 RT-PCR

대조군은 Urethane을 8주간 투여하여 폐암을 유발한 다음 6주 동안 생리식염수를 투여하였으며, 실험군은 폐암 유발 후 단삼 추출물을 동일 기간 투여하였다. 그리고 14주 후 정상군, 대조군, 실험군 모두에서 폐조직을 적출하여 total RNA를 추출한 다음 COX-2 cDNA primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 정상군과 폐암 유발군들에서 COX-2 mRNA 발현 정도를 살펴본 결과, 정상군에 비해 폐암을 유발한 대조군과 실험군에서 COX-2의 mRNA 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 폐암 유발후 6주간 단삼을 투여한



실험군에서의 경우 COX-2 mRNA 발현이 대조군에 비해 다소 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 11).

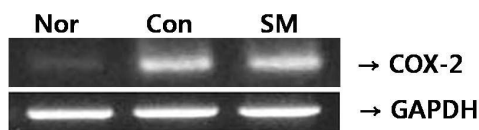


Fig. 11. Expression of Cyclooxygenase-2 in lung cancer in A/J mice.

Nor, administered saline; Con, control group administered saline after urethane treatment; SM, SM 0.12g/kg/day administered group during 6 weeks after urethane treatment. Total RNA was isolated and analysed for COX-2 and GAPDH mRNA by RT-PCR. SM inhibited COX-2 expression in a dose-dependent fashion.

#### IV. 고찰

서양의학에서 폐암의 발암요소로는 흡연 및 석면 노출, 공해, 이온화방사선 등이 대표적이는데 흡연 시에 노출되는 폐암의 병인학적 인자 중에서 미립자상에서는 benzpyrene, benzofluoranthenes, dibenzanthracene, nicotine, catechol, nickel, cadmium 등이 있고, 증기상에는 nitrogen oxides, formaldehyde, hydrzine과 이번 연구에 사용된 urethane 등이 포함되어 있다.<sup>8</sup>

동물 실험을 위한 악성 신생물의 유발 방법 중에서는 알킬화 발암제인 urethane(ethyl carbamate;  $\text{NH}_2 \cdot \text{COOEt}$ )을 이용한 방법이 일반적이다. urethane을 이용한 실험적 모델에서 urethane은 생체 내에서 alkylation을 일으켜 염색체에 손상을 주고 변이를 유도하며 여러 장기에 암 발생을 촉진하지만<sup>9-10</sup> 특히 다른 장기보다 주로 폐에 종양을 일으키고 인체에서 발생하는 폐선암종과 형태학적으로 유사한 병변을 발생시킨다. 이러한 이유로 변연부에 위치한 폐종양 발생 과정을 추적 관찰하는데 이상적인 모델로 이용되고 있다<sup>11-12</sup>.

암에 대한 치료법은 수술요법, 항암화학요법, 방

사선요법, 면역요법 및 유전자요법 등이 알려져 있는데 그 중 사용빈도가 높은 화학요법과 방사선요법은 정상세포까지 독성을 나타내어 소화 장애, 간장 장애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역 기능 저하, 조혈장애, 유전자 손상 등의 부작용을 초래하고 있다<sup>13-14</sup>. 이에 최근에는 서양의학적인 암치료법의 부족한 점을 극복하기 위해 서양 의학적 치료에 한약물을 병행하는 치료를 함으로써 암치료의 효율을 높이고 생존율을 증가시키며<sup>15-16</sup>, 화학요법이나 방사선요법의 부작용을 줄이기 위한 많은 노력들이 이루어지고 있다.

한약재와 폐암과의 관계에 관한 선행 연구로는 桔梗<sup>17</sup>, 附子<sup>18</sup>, 桑黃<sup>19</sup>, 冬蟲夏草<sup>20</sup> 등의 단미제에 관한 연구를 포함하여, 전<sup>21</sup>이 폐암을 병기별로 구분하여 千金葦莖湯, 桔梗湯, 蔘蘇飲, 銀翹散 등 수종의 처방이 폐암세포에 미치는 영향을 연구하였고, 이<sup>22</sup>는 폐암세포주 H460에 補中益氣湯이 미치는 세포 괴사 효과 및 기전을 보고하였으며, 원<sup>23</sup>은 A549 폐암세포와 Sarcoma-180 복강암에 대한 홍삼 증류약침의 영향을 보고하였고, 강<sup>24</sup>은 潤肺散 투여에 의한 폐암세포 증식억제기전에 관한 연구를 하였고, 최<sup>25</sup>는 抗癌丹이 抗癌 및 免疫增進 목적으로 활용가능하다는 보고 등을 하였으나, 단삼과 urethane으로 유발된 폐암과의 관계에 대한 실험적 연구는 보고된 바가 없었다.

본 실험에 사용한 丹蔘(Danshen, *Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과에 속하는 다년생 식물로 한방에서는 부인의 生理不順, 生理痛, 產後腹痛 및 瘀血性의 心腹部疼痛, 打撲傷의 치료와 不眠症, 皮膚發疹 등의 약재로 쓰인다<sup>26</sup>. 단삼의 주요 화학성분으로는 tanshinone I, IIA, IIB 등을 포함하는 diterpene 화합물과, danshensu(salvianic acid A), protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B 등을 포함하는 phenolic 화합물등, 그 외에 baicaline, b-sitosterol, ursolic acid, vitamin E와 tannin 등이 알려져 있다<sup>27</sup>. 단삼의 밝혀진 생리활성으로는 항균<sup>28</sup>, 항산화<sup>29</sup>, 항돌연변이<sup>30</sup> 효과가 알려져 있으며,

항혈전 효능에 대해서는 항응고제로 많이 사용되는 warfarin의 작용을 증진시키는 것<sup>31</sup>이 있다.

일반적으로 종양 환자의 경우 식욕부진, 전신쇠약, 심한 병감, 체력소모, 탈수 증상 등과 동반되며 종국엔 체중감소가 초래되는데<sup>32-33</sup>, 실험에서 측정된 체중의 변화는 정상군의 체중이 가장 높은 경향을 보였고, 실험군은 정상군에 비하여 10주까지는 2 g 정도 적게 측정되었으나 10주 이후부터는 3 g 정도 저체중을 나타내었고 10주 이후부터는 대조군과 비슷하게 측정되어 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었다.

흉강을 열고 시행한 육안적 관찰에서 대조군은 폐의 표면을 관찰한 결과 전반적으로 고르지 못할 뿐만 아니라 약 5~10개 이상의 유두종(papillary tumor)을 관찰할 수 있어 urethane으로 인하여 폐암이 유발된 것을 확인할 수 있었다. 이에 반하여 실험군은 폐에서 유두종이 관찰되었으나 대조군에 비하여 소수의 작은 유두종이 관찰되었다.

광학현미경의 관찰에서 대조군과 실험군 모두에서 유두종과 고형종이 관찰되었는데 정상군의 폐조직에 비해 대조군의 종말세기관지와 허파파리주머니는 매우 위축된 소견을 보여주었지만 실험군의 폐조직은 종말세기관지와 허파파리주머니의 형태는 정상군에 비하여 다소 위축되었으나 대조군에 비해서는 허파파리주머니와 종말세기관지의 형태학적인 병변은 뚜렷이 관찰되지 않았다. 이는 육안적 관찰의 결과와도 일치하는 것으로 단삼추출물이 폐암증식 억제와 항암효과를 나타냄을 알 수 있다.

COX-2 면역조직화학적 검색 결과 정상군의 경우 종말세기관지의 평활근과 호흡세기관지의 일부에서 면역 양성 반응이 나타났고 허파파리 조직에서는 아주 미약하게 나타났다. 대조군에서는 종말세기관지의 평활근과 호흡세기관지에서 높은 면역반응성을 보여주었고 허파파리세포의 대부분에서도 높은 면역반응성을 보였다. 반면, 실험군의 경우 정상군의 경우와 같이 종말세기관지의 평활근 조

직에서 면역 반응성이 높게 나타났으나 허파파리세포의 면역 반응성은 낮았다. 이는 단삼추출물의 투여가 폐암 세포의 증식을 억제에 관여하였음을 확인할 수 있다.

세포질의 농축, DNA의 분절을 특징하는 Apoptosis는 정상 발달, 기관 형성, 면역 기능, 조직의 성장 등에서 세포를 제거하는 기능을 한다<sup>34-35</sup>. 종양 형성에 있어서 apoptosis의 역할은 일반적으로 세포사멸을 촉진시키는 유전자와 억제시키는 유전자들 사이에 균형이 깨지면 apoptosis가 억제되며, 결국 발암원에 의해 항구적 DNA 손상 세포가 증식되어 종양이 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>.

Apoptosis를 관찰한 결과, 정상군에서는 종말세기관지와 허파파리를 구성하는 상피세포에서 소수의 세포사멸의 핵들이 관찰되었다. 대조군에서는 허파파리를 구성하는 상피세포에서 다수의 세포사멸 핵들이 관찰되었고 실험군에서는 정상군에서처럼 암조직이 관찰되지 않은 허파조직의 대부분에서 세포사멸 핵들이 소수 관찰되어 단삼추출물의 투여가 폐암 세포 증식의 억제에 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

종양의 크기에 있어서는 고형종과 유두종 둘 다에서 실험군의 경우가 대조군에 대하여 대체로 작았고 종양의 개수에 있어서도 고형종과 유두종에서 실험군이 약간 적게 나타났으나 이 역시 통계적으로 유의성은 없었지만 단삼 추출물이 종양의 성장이나 증식을 억제하는데 어느 정도 효과가 있다는 것은 확인할 수 있다.

전자현미경으로 폐의 허파파리를 중심으로 관찰한 결과 대조군의 허파파리에서 폐포강 내에 위치하여 계면활성제 역할을 하여 호기동안 폐포가 서로 달라붙지 않게 하는 역할을 하는 제2형 허파파리세포(type 2 pneumocyte)인 과립허파파리 세포의 세포질에는 다수의 층판소체들과 전자밀도가 높은 다수의 물질을 함유하고 있었다. 세포의 형태는 다소 변형되어 많은 세포질 돌기를 가지고 있

었으며 정상군의 허파파리사이막(inter-alveolar septum)에서 관찰되었던 탄력섬유는 거의 관찰되지 않았고 교원섬유들이 다수 관찰되었다. 폐포와 기저막을 관통하는 확산에 의하여 공기와 혈액 사이의 가스 교환에 관여하는 제 1형 허파파리세포(type 1 pneumocyte)는 정상군에 비해 세포질의 전자밀도가 높게 나타났으며 전반적으로 세포가 손상되어 있었고, 모세혈관은 전반적으로 매우 팽창되어 있었으며, 모세혈관 내피세포는 매우 편평하게 관찰되었다.

실험군의 허파파리의 허파파리 속 공간에서는 전자밀도가 높고 크기가 다양한 물질을 함유하고 있는 큰포식세포가 관찰되었으며 이 큰포식세포의 핵은 핵막이 매우 불규칙하고 핵질은 고르게 관찰되었다. 제1형 허파파리 세포의 형태는 대부분 정상군과 유사한 소견을 보여주었으며 모세혈관 또한 직경이 정상군과 비슷한 것도 있었다. 다만 모세혈관 중 직경이 다소 팽대되어 있는 것도 있었으며 모세혈관 내피세포 또한 정상군에 비하여 보다 편평하게 관찰되었다.

Total RNA 추출 및 RT-PCR(역전사중합효소연쇄반응)의 결과는 COX-2가 폐암 세포의 증식진행과정동안 현저하게 증가하는 이전의 보고와 일치하였으며, 한편 단삼 추출액 투여군이 대조군 비해 COX-2 mRNA발현이 감소하는 양상을 보여준 것은 단삼이 폐암의 생성을 억제하였다고 사료된다.

이상의 실험결과를 요약하여 보면 실험군은 대조군에 비하여 육안적, 광학현미경적, 세기관지 주변부에 대한 면역조직화학적 검색, Apoptosis 관찰, 전자현미경 관찰과 Total RNA 추출 및 RT-PCR에서 폐암의 증식 억제 효과와 폐기관지 보호 효과 및 면역 효과가 뚜렷한 것으로 나타났다.

본 연구에서는 단삼 추출액이 urethane으로 유발된 폐암의 치료에 효과가 있는 것으로 나타났으나 체중의 변화와 종양의 크기 및 개수의 변화에 있어서 유의성이 명확하게 나타나지 않은 점에서

부족한 면이 있었고 丹蔘 추출물의 구강 투여로 인한 투여량의 불균등성 등에 대한 점, 다른 본초와 병용하여 효과를 상승시키는 점, 항암작용에 있어서 단삼과 다른 약물들의 비교 연구 등에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

단삼 추출액이 urethane으로 유발된 A/J mouse의 폐암 유발과정에 미치는 영향을 밝히고자 폐조직의 형태학적 변화, COX-2 면역조직화학, 세포사멸, 전자현미경관찰을 하였다. 실험군은 3군으로 구분하였다: 정상군, urethane을 투여한 다음 생리식염수를 투여한 대조군, 그리고 단삼추출액을 투여한 군으로 구분하였다.

조직학적 관찰결과 대조군의 허파파리는 정상군에 비하여 매우 오프라들어 있었으나, 실험군에서는 다소 회복되었다. COX-2 면역조직화학결과 대조군의 종말세기관지와 허파파리에서 정상군에 비하여 면역반응성이 매우 높게 나타났으나, 실험군에서는 정상군과 유사한 소견을 보여주었다. 전자현미경관찰결과 대조군의 폐에서 관찰되는 모세혈관은 매우 팽창되어 있었으며, 호흡상피는 다소 손상되어 있었으나, SM 추출액을 투여한 군에서는 다소 회복되어 있었다.

암종의 크기와 수를 비교하기 위하여 폐조직 연속절편으로 제작하여 관찰한 결과 대조군에 비하여 SM 추출액을 투여한 군에서 다소 암조직의 수와 적었고 크기도 작았으나 통계적 유의성은 없었다.

이상의 결과로 보아 단삼 추출액이 폐암의 발생과 치료에 응용될 수 있을것으로 생각되며 임상에서 치료효과는 다각도의 임상 실험을 통하여 검증하여야 할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. Korea National Statistical Office. 2005 Death rate statistics of Korea. 2006.
2. Monobe Y, Manabe T. Morphological change and proliferative activity of alveolar epithelium in mouse lungs treated with urethane. *Virchows Archiv*. 1995;425:583-8.
3. Re FC, Manenti G, Borrello MG et al. Multiple molecular alterations in mouse lung tumors. *Mol Carcinog*. 1992;5:155-60.
4. 북경중의학원 편. 중의학 임상병리. 서울: 성보사; 1983, p. 572.
5. 신민교. 임상본초학. 서울: 영림사; 2002, p. 519-20.
6. 김옥희, 정수연, 박만기, 류항목, 양지선. 단삼 등 천연물의 항암작용. *한국응용약물학회지*. 1999;7:29-34.
7. 정국찬, 이지영, 김동청, 서성욱, 황우익. 단삼 (*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 암세포 증식 억제 효과에 관한 연구. *한국식품영양과학회지*. 2000;29:726-31.
8. Robert Souhami et al. *Cancer and Its Management*. 2nd edition. United Kingdom: Blackwell Science Ltd; 1995, setrite bound.
9. Mirvish SS. The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-hydroxy-urethane. *Advanc Cancer Res*. 1968;11:1-42.
10. Svensson K. Alkylation of protein and DNA in mice treated with urethane. *Carcinogenesis*. 1988;9:2197-201.
11. Mostofi FK, Larsen CD. The histopathogenesis of pulmonary tumors induced in strain A mice by urethane. *J Natl Cancer Inst*. 1951;11:1187-221.
12. Malkinson AM. Pulmonary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res* 52. 1992:2670-6.
13. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 2003, p. 143.
14. 서울대학교의과대학편. *종양학*. 서울: 서울대학교출판부; 2001, p. 141-88.
15. 황충연. 폐암의 동서의 결합치료에 관한 문헌적 고찰. *대한한의학회지*. 1995; 16(2):177.
16. 李佩文. 6년래 종양과 관련이 있는 논문의 변화로 본 중서의 결합으로 종양을 치료하는 추세. *한글판 중서의결합*. 1993;72.
17. 강락원, 이재원, 감철우, 최병태, 최영현, 박동일. 桔梗 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 성장억제 기전 연구. *동의생리병리학회지*. 2003;17(1):183-9.
18. 권강범, 김은경, 문형철, 송용선, 류도곤. 폐암세포에 대한 附子 추출물의 독성 효과. *동의생리병리학회지*. 2005;19(3):628-32.
19. 박철, 이용태, 강경화, 최병태, 정영기, 최영현. 桑黃을 이용한 보건기능 개선제의 인체폐암세포 apoptosis 유발에 관한 연구. *동의생리병리학회지*. 2004;18(3):759-66.
20. 홍상훈, 오창선. 冬蟲夏草의 인체 폐암세포 증식 억제에 관한 연구. *동의생리병리학회지*. 2004; 18(4):1102-6.
21. 강필구, 박동일, 최원철, 전종철. 수종의 한약처방이 폐암세포에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2000;21(4):621-31.
22. 이승언, 홍재의, 이시형, 신조영, 노승석. 폐암세포주 H460에 대한 補中益氣湯의 세포고사효과 및 기전연구. *대한한방내과학회지*. 2004;25(4-2):274-88.
23. 원승환, 권기록, 이선구. A549 폐암세포와 Sarcoma-180 복강암에 대한 홍삼 증류약침의 영향에 관한 실험적 연구. *대한약침학회지*. 2004;7(2).
24. 강윤경, 박동일, 이준혁, 최영현. 潤肺散에 의한

- 폐암세포 증식억제기전에 관한 연구. 동의생리  
병리학회지. 2002;164:745-55.
25. 최병렬, 손창규. 抗癌丹을 투여한 폐암환자 62  
례에 대한 임상보고. 대전대논문집. 2001;101  
:121-31.
  26. 김재길. 원색 천연약물 대사전. 서울: 남산당;  
1987, p. 160.
  27. Fugh-Berman A. Herb and dietary supplements  
in the prevention and treatment of cardiovascular  
disease. *Prev. Cardiol*, 2000;3:24-32.
  28. 목종수, 박옥연, 김영목, 장동석. 용매와 추출조  
건에 따른 단삼 추출물의 항균력. *한국식품영  
양과학회지*. 1994;23:1001-7.
  29. 김윤화, 한영실, 백재은, 송태희. 단삼추출물의  
항산화능 검색 및 약과에의 첨가효과. *한국식  
품조리과학회지*. 2003;26:24-7.
  30. 최동성, 안병용, 김동길. 유전자 조작 , 균주분  
리:단삼의 항산화적 항돌연변이 효과. *산업미  
생물학회지*. 1999;27:197-202.
  31. Chan TY. Interaction between warfarin and  
danshen(*Salvia miltiorrhiza*). *Ann. Pharmacother*.  
2001;35:501-4.
  32. 문구 외. 암 동서의 결합치료1. 익산: 원광대학  
교출판국; 1999, p. 222-4.
  33. Sodikoff CH. Laboratory profiles of small  
animal diseases. A guide to laboratory  
diagnosis. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year  
Book Inc. 1995.
  34. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV.  
Apoptosis. Its significance in cancer and  
cancer therapy. *Cancer*. 1994;73:2013.
  35. Burger MM, Harris C. UICC study group on  
basic and clinical cancer research:apoptosis in  
normal and tumor cells. *Int J Cancer*.  
1995;60:590.
  36. Cox LS. Multiple pathways control cell growth  
and transformation: overlapping and independent  
activities of p53 and p21. *J Pathol*. 1997;  
183:134-40.