

선학초(짚신나물) 경구투여시 항암효과 탐색 및 약물 대사효소의 변화

이시형¹⁾ · 정 희²⁾ · 이주아³⁾ · 고희연³⁾ · 최유경¹⁾ · 박종형¹⁾ · 김지혜²⁾ · 고성규²⁾ · 전찬용¹⁾*

¹⁾경원대학교 한의과대학 내과학교실, ²⁾경희대학교 한의과대학 예방의학교실

³⁾세명대학교 한의과대학 내과학교실

The Anticancer Effects and Drug Metabolic Enzyme Change by Oral Intake of *Agrimonia Pilosa* Ledeb

Sihyung Rhee,¹⁾ Hee Jung,²⁾ Juah Lee,³⁾ Hoyeon Go,³⁾ Yukyung Choi,¹⁾ Jonghyung Park,¹⁾

Ji Hye Kim,²⁾ Seongkyu Ko²⁾ & Chanyong Jun¹⁾*

¹⁾Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

²⁾Department of preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

³⁾Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University

Abstract

Objective: This research was aimed to investigate the anti-tumor effect, safety, mechanism and metabolizing enzyme of *Agrimonia pilosa* LEDEB(APL) in female C57B/L mouse.

Methods: At first, to evaluate the anti-tumor activity of APL, we divided into four groups, normal, control, APL100(100mg/kg), APL150(150mg/kg). LLC obtained American Type Culture Collection was used. LLC had been inoculated to induce tumor. To measure the anti-tumor effect of APL, we calibrate tumor size and weight. To study for mechanism of anti-tumor in APL, we used western blotting and to know metabolizing enzyme in APL we used to real-time PCR.

Results: APL100, APL150 inhibited tumor growth after medicine injected. APL did not only induced caspase-dependent apoptosis in LLC-bearing mouse tumor. In APL100, it were decreased 72% in CYP3A11. In APL150, it were decreased 62%, 75% in CYP3A11 and MRP1a respectively.

· 접수: 2009년 7월 2일 · 수정접수: 2009년 8월 7일 · 채택: 2009년 8월 10일

* 교신저자: 전찬용, 경원대학교 한의과대학 내과학교실

Tel : 032-770-1231, Fax : 032-764-9990, E-mail : joncy@kyungwon.ac.kr

Conclusion : These results suggests that APL has some anti-tumor effects in female C57B/L mouse tumor. APL should be careful use with other drugs related with CYP3A11 or MRP1a.

Key words : *Agrimonia pilosa* LEDEB(APL), Antitumor, CYP3A11, Metabolizing Enzyme

I. 서론

현재 암은 전세계적으로 사망원인 수위를 차지하고 있고, 국내 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 50대, 60대 사망자의 30%가 암으로 죽어가고 있다^{1),2)}. 암은 이렇듯 우리의 건강과 생명을 위협하는 무서운 질환으로, 일단 발병하면 치료가 어렵고, 높은 의료비용을 필요로 하며, 이로 인하여 환자와 가족뿐만 아니라 사회적, 국가적으로 부담을 주는 질병으로 국내에서도 유병율이 꾸준히 늘고 있는 형편이다^{3),4)}.

이러한 암의 특성 때문과 기존 치료에 대한 부작용 및 내성 등으로 인하여 새로운 항암제의 개발이 필요한 상황이며, 따라서, 항암 효과가 뛰어난 한약재 및 한의학적 치료법을 개발할 필요가 있다.

장미과에 속하는 짙신나물의 전초를 선학초 (*Agrimonia pilosa* LEDEB, APL)라고 하는데, 우리나라의 경우 야산의 길가, 들판 등에서 흔히 자라며, 선학초, 용아, 용아초, 황아초, 황용초, 지선초, 짙신나물 등으로 불리기도 한다⁵⁾⁻⁷⁾. 키는 15~60cm쯤 자라고 전체에 흰 털이 있으며, 벼들잎 모양 또는 긴 타원 꼴의 쪽잎이 어긋나게 붙고, 6~8월에 꽃대위에 노란색의 작은 꽃이 모여서 피는 식물이다⁷⁾.

선학초는 한의학에서는 수렴작용이 강하여 지사제 및 지혈제로 사용되어 왔으며, 민간에서는 간암, 폐암, 통증에 효과가 있다고 알려져 민간요법으로 활용되고 있다^{5),7)}.

최근에는 항균작용, 항염증작용, 강심작용, 진통작용, 항암작용 등 다양한 작용들이 밝혀지고 있으며, 약품원재료, 농약, 산채 등 다양하게 활용되고 있으며, 매년 소비량이 증가하고 있는 추세이다⁵⁾⁻¹³⁾.

그럼에도 불구하고 선학초에 대한 항암효능에 대한 기초적인 실험연구들이 잘 되어있지 않다. 따라서 저자는 Lewis lung carcinoma(이하 LLC)를 피하주사하여 암을 유발한 생쥐에 선학초를 경구투여하여 암 증식억제효과, 간독성, 신독성, 기전, 약물대사효소, 다중약물내성 단백질 발현량 변화를 살펴본 결과 유의한 결과가 있기에 보고하고자 한다.

II. 연구방법

1. 재료 및 동물

1) 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 5주령의 C57BL/6 암컷 마우스(체중 18~20g)를 중앙실험동물(주)(서울, 대한민국)에서 구입하여 이용하였다. 마우스는 실내온도 24±2°C, 습도 40~60%,晝夜 12시간 교대로 150~300Lux 조명상태를 유지하면서, 정화 멸균된 증류수와 고형사료(조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.6% - 퓨리나(주), 경기도, 대한민국)를 충분히 공급하고, 동물사육 cage(20×26×13cm)에 넣고, 매주 3회 갈짚을 교체하여 청결을 유지하며, 건강상태를 관찰하면서 1주간 적응시켰다¹²⁾.

2) 세포주

쥐 폐암세포주 Lewis lung carcinoma(이하 LLC)는 미국 세포주은행(American Type Culture Collection, USA)을 통하여 구입하였으며, LLC는 DMEM(Gibco)배지에 10%(v/v) 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum(Gibco BRL))과 1% 항생제(penicillin-streptomycin, (Gibco BRL))를 넣어 5% CO₂가 공급된 37°C humidified incubator에서 키웠다.

3) 약재

실험에 사용된 약재인 선학초 APL은 옴니허브(Omniherb, Korea)에서 구입하여 100g을 정량 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 얻었다. 얻어진 추출액은 지름 185mm 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과 한 후 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축한 액은 다시 동결 건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 분말 5.7g(수율 5.7%)의 APL 분말을 얻어 saline에 vortexing하여 녹였다. 그 후 37°C shaking incubator에서 12시간 녹여준 다음 syringe filter(0.20µm, Sartorius, Germany)을 이용하여 여과한 후 실험에 사용하였다¹²⁾.

2. 방법

1) 군 설정 및 시료의 투여

대조군 및 실험군에 대하여 실험 시작일에 LLC 세포주를 5×10⁵ cell/mouse 농도로 피하 주사하여 암종을 유발하였으며, 정상군은 동일한 용량의 saline(50µl)를 피하주사하였다.

일주일 후에, 쥐의 등에 생긴 종양의 크기별로 정상군, APL100, APL150의 3군으로 나누었다. 정상군(N=11)과 암유발대조군(N=4)은 0.2ml saline을 경구투여하였으며, APL100(N=3)군은 100mg/kg APL을, APL150(N=2)군은 150mg/kg APL을 각각 12일 동안 매일 경구투여 하였다. 전반적인 실험 스킴은 Fig. 1과 같다.

2) 체중과 섭취량 측정

체중과 식이, 물 섭취는 이틀에 한 번 48시간 섭취량을 측정하였다. 각 섭취량은 음식 및 음료 제공량에서 남은 잔류량을 제외한 값을 구하였다.

3) 혈액채취

혈액 채취는 약물투여 첫날인 day 0과 실험 마지막 날인 day 12일 쯤 정상군과 대조군, APL100군은 각 2마리를 APL150군에서는 1마

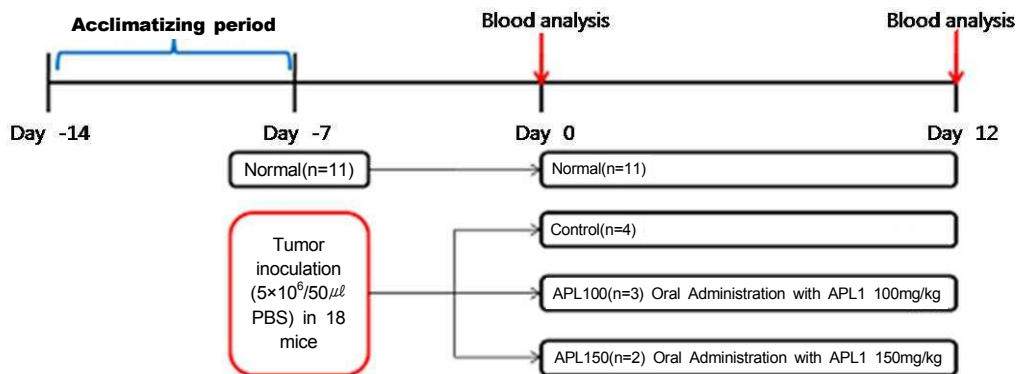


Fig. 1. The process of the entire experimental period

리의 실험동물을 ethyl ether(Duksan Pure Chemical Co. Ltd. Korea)로 마취시켜 심장천자를 통해 600 μ l를 각각 채취하였다¹²⁾.

4) 혈액생화학분석(GOT, GPT, Creatinine)

채취한 혈액 중 전혈 350 μ l을 tube(Axygen Scientific, Inc., USA)에 넣고 2000rpm에서 10분간 원심 분리(Hanil Science Industrial Co., Ltd. Korea)하여 혈청을 얻었다. 원심분리로 얻은 혈청은 생화학 분석기(DRI CHEM 3500, Fuji Photo Film, Co., Japan)를 사용하여 GOT, GPT, Creatinine을 검사하고 측정하였다. 분석기에 사용한 chip은 CRE-PS, GPT-PS, GOT-PS (Fujifilm, Japan) 이었다. 측정은 3회 반복 측정하여 평균값을 데이터로 활용하였다.

5) 혈액내 호중구 함량분석

채취한 혈액 중 전혈 250 μ l을 EDTA 처리된 tube(Becton Dickinson Vacutainer system, USA)에 넣고, 자동혈액분석기(HEMAVET 950, Drew Scientific., LTD. UK)를 이용하여 neutrophil 함량을 조사하였다¹²⁾.

6) tumor 부피 및 무게 측정

마우스에서 종양의 부피를 측정하였으며, 추후 종양을 제거하여 크기 및 무게를 비교하였다. 암 부피와 상대적인 증가율을 조사하였는데, 암 부피의 측정은 caliper(500-181-20, Mitutoyo, Japan)를 이용하였으며, '단축 × 단축 × 장축 × 1/2'을 종양의 부피로 계산하였다. 종양을 무게는 분석용 전자저울(EPG64, CAS, Korea)을 이용하여 측정하였다¹²⁾.

7) Western Blotting

적출된 종양조직을 lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay kit를 이용하였으며, SDS-PAGE시 동량의 단백질을 loading하여 분리하

여 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후, 다양한 1차 항체 -PARP, procaspase-3, cleaved caspase-3, and - α -tubulin(Santa Cruz Biotechnology. Inc., SantaCruz, CA)와 4 °C overnight로 반응시켰다.

1XPBS with 0.1% Tween 20로 1시간동안 washing하고, 2차 항체를 HRP-conjugated secondary antibodies와 1:3,000으로 1시간 정도 반응시켰다. chemiluminescence detection system(Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 사용하여 X-ray film으로 결과를 확인하였다.

8) RNA 분리 및 역전사

간 조직에서 total RNA 분리를 위하여 Qiagen Kit(Qiagen, MD, USA)를 이용하였으며, 실험과정을 간략히 정리하면 다음과 같다. 100mg의 조직을 적출하여, 1ml lysis buffer에 균질기(Diag 100, Heidolph, Germany)를 이용하여 잘게 파쇄한 후 실온에서 30초간 반응시킨 다음 0.2ml 클로로포름을 첨가하고, 4°C, 13,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 분리하여, 0.4ml binding buffer를 섞어 column에 넣은 다음 같은 조건으로 분리 한 후 RNA 침전물을 washing buffer로 세척하고, 건조시킨 다음 diethylpyrocarbonate(DiEPC)로 처리한 증류수에 녹였다.

정제된 RNA를 nanodrop(Nanodrop spectrophotometer NanoDrop Technologies, USA)으로 정량하고, 1% 환천 겔에 전기영동하여 RNA의 quantification을 재확인하였다. 정제된 RNA 4 μ g, random hexamer 4 μ g(Amersham Biosciences, USA)과 DEPC-증류수를 65°C, 10분간 반응시킨 뒤 얼음에서 2분간 식혔다. 그 후 5 x first strand buffer, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP, 200 unit M-MLV reverse transcriptase(Invitrogen, USA), DEPC-증류수를 가하고 42°C에서 2 시간동안 반응시키고,

Table 1. Primer Sequences for real time PCR

Gene Name	Oligonucleotide Sequences	Size (bp)	References
CYP3A11	5'-CTC AAT GGT GTG TAT ATC CCC-3' 5'-CCG ATG TTC TTA GAC ACT GCC-3'	429 bp	Toxicology 2005, 211: 242-252
MDR1a	5'-CCA GCA GTC AGT GTG CTT ACA-3' 5'-CAT AAG TGG GAG CGC CAC-3'	116 bp	AAPS Pharmsci 2000, 2: article 27
GAPDH	5'-GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC-3' 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG-3'	340 bp	Toxicology 2005, 211:242-252

다시 95°C에서 5 분간 가열하였다. Polymerase chain reaction(PCR)은 5µl cDNA 주형과 주형에 특이적인 primer 25µM, 1x PCR buffer, 2.5mM MgCl₂, 2.5 unit Taq. DNA polymerase(TaKaRa Korea, Seoul, Korea)를 혼합하여 시행하였다. MJ Mini #1148(BioRad, California, US)을 이용하여 유전자 증폭을 시행하였다. 반응액 중 cycle 별로 각각 5µl를 취해서 2.0% 한천 겔에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

9) Real-time PCR

Real-time quantitative PCR은 이중 DNA에 특이적으로 결합하는 dye인 SYBR Green II (# RR081A, SYBR Premix Ex Taq II from Takara)을 사용하였고, Light Cycler 2.0 Carousel-Based System Instrument(Roche, USA) 기계를 이용하여 지속적으로 형광을 모니터링하여 실험을 수행하였다. 실험을 위한 시료의 준비는 10µl Takara SYBR Green Mix(2x), 2µl ½ diluted cDNA, 0.8µl 10 pmol/ml gene specific F primer, 0.8µl 10 pmol/ml gene specific R primer, 6.4µl H₂O를 첨가하여 총 부피가 20µl 가 되도록 맞춘다. PCR 반응은 총 40회 수행하며, denaturation은 95°C, 45초에서 annealing은 56°C, 45초 조건으로 수행한다. 결과는 Data

was analyzed by LightCycler Software 4.x (Roche)를 이용하여 분석하였고, 결과는 상대 정량법인 2-ΔΔCT 방법을 이용하여 계산하였다. PCR을 수행하기 위한 primer sequences는 아래와 같다(Table 1).

3. 통계처리

실험결과에 대한 분석은 SPSS version 8.5 프로그램을 이용하였다. 각 값은 mean±standard deviation으로 표시하였고, Mann-Whitney U Test로 분석하고, 유의수준은 0.05로 하였다.

III. 실험 결과

1. 종양 증식 억제효과

대조군은 day 6에 9.1배, day 12에 약 23배 증가하였으나, APL100군과 APL150군은 day 6에 약 7배, day 12에 약 16배 정도로 대조군에 비하여 증가비율이 낮았다(Table 2).

종양의 부피는 기준일에 대조군 70.76mm³, APL100군 66.40mm³, APL150군 63.74mm³이었으며, day 6에는 646.81, 483.90, 449.51 mm³, day 12에는 1639.04, 1124.49, 1018.36 mm³이었다(Fig. 2).

Table 2. The Relative Ratio of Tumor Volume Increment(%)

Day	0	2	4	6	9	12
Control(N=4)	100 ^{a)}	225.45	526.50	910.00	1568.40	2316.35
APL100(N=3)	100	169.92	440.89	728.72	1038.82	1693.40
APL150(N=2)	100	167.91	308.39	705.17	1227.50	1597.55

^{a)} Values were represented as percentage of normal.

Relative ratio of tumor volume increment

= tumor volume of chek-up day / tumor volume of day 0

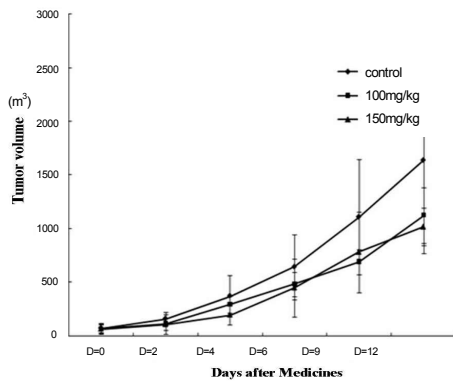


Fig. 2. An ethanol extract of *Agrimonia Pilosa* Ledebour(APL) inhibits tumor growth in LLC-bearing C57B/L mice. Data were represented as mean±S.D. P < 0.05 vs. non-treated control.

중량의 무게는 day 12에 비교한 결과 대조군 3.51g, APL100군 1.83g, APL150 3.20g으로 APL100, APL150, 대조군의 순서였다(Fig. 3.).

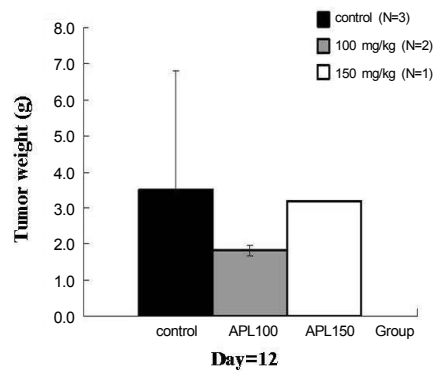
2. 각 군별 섭취량 조사

정상군에 비하여 대조군, APL100, APL150 군은 모두 음식섭취량과 물 섭취량이 증가하였다. 특히 APL100군의 음식섭취량은 2.83±1.01 g으로, 물 섭취량은 3.89±1.31 g으로 가장 많이 증가하였다(Table 3).

3. 몸무게 검사

대조군은 day 0에는 22.85g, day 6에는

A.



B.



Fig. 3. An ethanol extract of *Agrimonia Pilosa* Ledebour(APL) inhibits tumor weight in LLC-bearing C57B/L mice. A, data are represented as means±S.D. B, Separated tumor-inoculated skin in LLC-bearing C57B/L mice. The macroscopic observation of tumor is shown.

23.63g, day 12에는 22.85g을 나타냈다. APL100 군은 day 0에는 23.23g, day 6에는 23.98g, day 12에는 24.33 g이었으며, APL150군은 day 0에는 22.30 g, day 6에는 21.47 g, day 12에는

이시형 외 5인: 선학초(짚신나물) 경구투여시 항암효과 탐색 및 약물 대사효소의 변화

Table 3. The Food and Water Intake in Mice

	Food(g)	Water(ml)
Normal(N=11)	1.51±0.27	2.13±0.63
Control(N=4)	2.15±1.21	2.33±0.21
APL100(N=3)	2.83±1.01	3.89±1.31
APL150(N=2)	2.73±1.89	3.08±0.54

Table 4. The GOT, GPT and Creatinine Analysis in Mice.

Day	GOT(U/L)(0~37U/L)		GPT(U/L)(0~19U/L)		Creatinine(mg/dl)(0~1.4mg/dl)	
	0	12	0	12	0	12
Control(N=4)		283.67 ±115.96		15.33 ±12.00		0.17 ±0.06
APL100(N=3)	85.50 ±24.75	144 ±202.79	44.50 ±10.61	27.00 ±15.2	0.20±0	0.15 ±0.05
APL150(N=2)		110		12.00		0.20

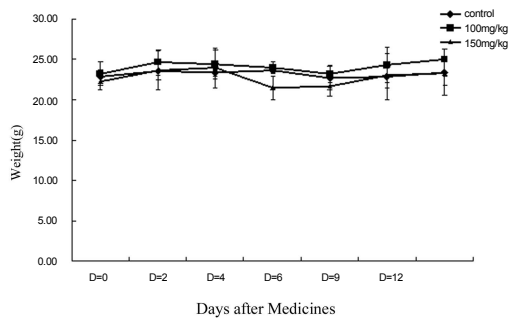


Fig. 4. The Body weight of control and *Agrimonia Pilosa* Ledebour(APL)-treated group

23.00 g으로 나타났다. 대조군은 체중증가가 없었으나, APL100군과 APL150군은 체중이 증가하는 양상을 나타냈으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4).

4. GOT, GPT, Creatinine 검사

GOT수치는 대조군, APL100, APL150군에서 모두 정상범위보다 높은 수치를 나타냈으나, APL150군이 110 U/L로 가장 낮은 수치를 나

타냈다.

GPT수치는 APL100군 27.00±15.20 U/L, 대조군 15.33±12.00 U/L로 정상범위 보다 높게 나타났으며, APL150군은 12.00 U/L로 정상범위로 나타났다.

Creatinine 수치는 대조군, APL100, APL150군 모두 정상범위를 나타냈다.(Table 4)

5. 호중구의 변화

호중구의 비율은 day 0에는 정상군과 비교 시 대조군, APL100, APL150군에 비하여 통계적 유의성은 없었다. Day 12에는 대조군과 APL100군은 각각 42.10±10.90%, 54.54±4.02로 통계적으로 유의하게 호중구 비율이 증가하였으며, APL150군에서는 50.97%였다(Table 5).

6. Western Blot analysis를 통한 Apoptosis

Caspase-3와 PARP에 대하여 Western blot을 실시한 결과 APL100군에서만 약간의 caspase-3

Table 5. The Relative Ratio of Neutrophil (%)

Day	0	p-value	12	p-value
Normal	3.67±1.21		6.19±1.23	
Control			42.10±10.90	0.00
APL100	8.99±6.80	0.25	54.54±4.02	0.00
APL150			50.97	

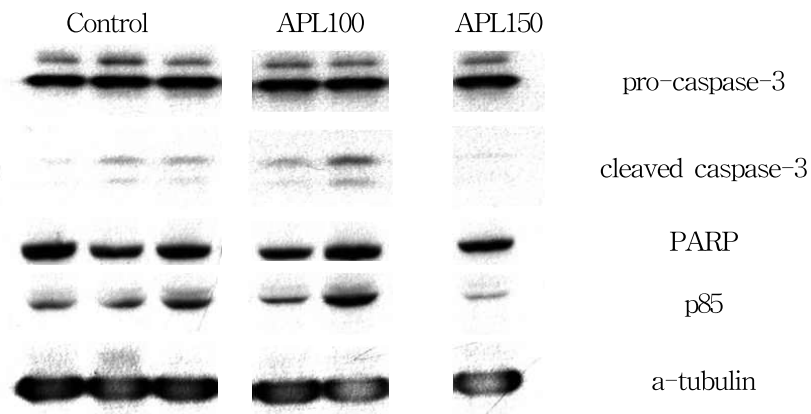


Fig. 5. An ethanol extract of Agrimonia Pilosa Ledebour(APL) extract induces apoptosis in LLC-bearing C57B/L mice. The tissues were homogenized and lysis. The cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-pro-caspase-3, -cleaved-caspase-3, -PARP, -PCNA and -α-tubulin.

가 2개의 띠로 분리되었으며, PARP의 p85에서 분절화가 나타났다(Fig. 5).

세포사멸기전에 관여하는 Bcl-2와 Bax 항목을 western blot 하였을 때, Bcl-2에서는 특이한 소견은 없었으나, APL100군에서는 Bax 항목이 대조군에 비하여 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

7. CYP 약물대사효소 변화량

CYP3A11은 정상군 대조군에서는 변화가 적었으나, APL100군에서는 72%, APL150군에서는 62%정도 발현량이 감소하였다(Table 6).

8. MRP1a 변화량

MRP1a는 경구 투여 하였을 때는 정상군, 대조군에 비하여 APL150군에서는 75% 정도 감소되어 발현되었으며, APL100군에서는 66% 정도 증가하였다(Table 7).

IV. 고찰

암에 대한 예방, 진단, 치료 측면에서 다양한 연구가 계속되고 있음에도 불구하고 암 자체의 다양성 및 발병기전의 다양화로 인해 부작용이 적고 내성을 극복할 수 있는 암 치료

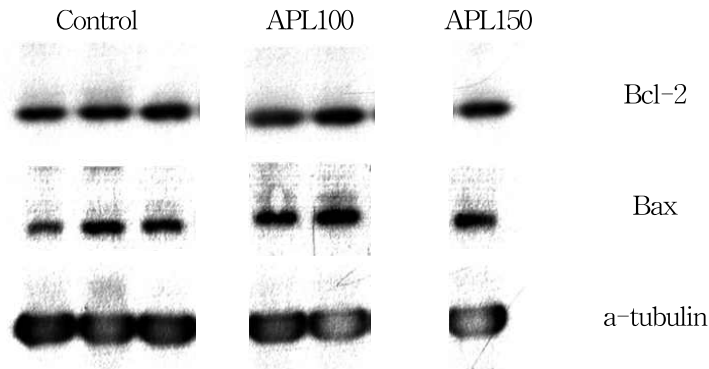


Fig. 6. An ethanol extract of Agrimonia Pilosa Ledebour(APL) extract induces apoptosis in LLC-bearing C57B/L mice. The tissues were homogenized and lysis. The cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-Bcl-2, -Bax and - α -tubulin.

Table 6. The CYP3A11 Real-time PCR Analysis

Day	target Ct	GAPDH Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-(\Delta\Delta)}$	p-value
Normal	16.198 ± 1.807	15.915 ± 0.410	0.282 ± 2.094	0.000	1.000	
Control	16.283 ± 0.387	15.423 ± 0.361	0.860 ± 0.087	0.577	1.037	0.983
APL100	16.990 ± 0.269	15.840 ± 0.820	0.850 ± 0.552	0.567	0.283	0.739
APL150	16.850	14.700	2.150	1.390	0.382	

Table 7. The MRP1a Real-time PCR Analysis

Day	target Ct	GAPDH Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-(\Delta\Delta)}$	p-value
Normal	27.648 ± 1.268	17.890 ± 0.553	9.758 ± 1.572	0.000	1.000	
Control	25.290 ± 0.320	15.697 ± 0.427	9.593 ± 0.570	-0.164	1.121	0.098
APL100	25.045 ± 0.007	16.020 ± 0.976	9.025 ± 0.969	-0.732	1.662	0.112
APL150	26.060	14.630	11.430	2.010	0.248	

제의 개발은 여전히 어려운 문제로 남아있다. 선학초는 性味가 맵고, 따뜻하고, 독이 없다고 하며, 肺, 肝, 脾經에 작용하며, 예전부터 출혈성 질환에 많이 사용하였다. 최근 국내 연구를

살펴보면 위암, 대장암, 자궁경부암 치료보조제로 효과가 밝혀졌다. 이에 본 연구는 민간요법에서 종양치료에 사용되고 있지만, 기초연구가 미비한 선학초의 효과 및 안전성을 살펴보고자

하였다.

본 연구는 C57B/L6 마우스에 mouse tumor LLC를 주입하여 암을 유발한 모델에서 선학초를 경구투여하여, 종양 증식억제 효과, 혈액분석을 통한 간독성, 신독성 연구, Western blot analysis 등을 이용한 기전연구와, 약물대사효소를 분석하였다.

정상군, 대조군, APL100, APL150군의 4개 군으로 나누어 실험을 실시하였으며, 실험기간은 약물투여 전 14일, 약물투여 후 12일로 총 26일이었다.

종양증식억제 효과를 보기 위하여, 종양 부피의 증가비율, 종양의 부피, 무게를 측정하였다.

대조군은 day 6에는 9.1배, day 12에는 약 23배로 빠르게 증가하는 모습을 보였으나, APL100군과 APL150군은 day 6에는 약 7배, day 12에는 약 16배 정도로 대조군에 비하여 서서히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

Day 12에는 증가비율과 부피는 APL150, APL100, 대조군의 순서이며, 무게는 APL100, APL150, 대조군의 순서로 나타났다(Fig. 2, Fig. 3).

종양의 증가비율, 부피, 무게를 검토하였을 때 APL100군과 APL150군 모두 종양 증가 억제 효과가 있는 것으로 보아 선학초 경구투여는 종양 증식 억제 효과가 있는 것으로 생각된다.

선학초의 안전성을 보기 위하여 음식섭취량과 물 섭취량을 조사하였고, GOT, GPT, Creatinine, 호중구 비율을 측정하였다. 음식섭취량과 물 섭취량은 정상군에 비하여 대조군, APL100군, APL150군 모두 증가하였으며, 특히 물 섭취량의 증가는 음식섭취량의 증가에 비해 비교적 크게 증가하였다.

몸무게는 대조군에서는 기준일과 12일의 무게가 같았으나, APL100과 APL150에서는 몸무게가 조금 증가하였다. 대조군에서 종양이 커지고, 정상군에 비하여 음식섭취량과 물 섭취량이 증가하였음에도 몸무게가 기준일과 비교

시 변화가 없다는 것은 종양에 의한 것으로 생각된다.

GOT 수치는 대조군, APL100, APL150군 모두 정상범위 보다 높은 수치를 나타냈으나, APL100군은 $144. \pm 202.79$ U/L로, APL150군은 110 U/L으로 대조군에 비하여 낮게 나타났다. GPT 수치는 APL100군은 27.00 ± 15.2 OU/L로 대조군 15.33 ± 12.00 U/L보다 높게 나타났으며 두 군 모두 정상 범위보다 높게 나타났으며, APL150군은 12.00으로 정상 범위의 값을 나타냈다(Table 4).

APL150군은 대조군, APL100군과 비교시 가장 좋은 수치를 나타냈었으나, APL100군은 대조군에 비하여 GOT는 낮게 나타났으나, GPT에서는 대조군보다 높은 값이 나타난 것을 고려할 때 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

신장의 기능을 살펴보는 Creatinine수치는 대조군 0.17 ± 0.06 , APL100군 0.15 ± 0.05 , APL150군 0.20으로 모두 정상범위를 나타내는 것으로 볼 때 선학초와 종양은 신장에 특별한 영향을 끼치지 않는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 살펴볼 때 혈액화학 분석검사를 살펴보면 선학초의 경구투여는 간독성 및 신독성에 특별한 영향을 끼치지 않는 것으로 판단되나, APL100군에서의 GOT수치의 상승에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

항암약물(anticancer drug)의 가장 흔한 부작용 중의 하나인 호중구 감소증은 골수기능 억제로 나타나며 사용 후 7~10일에 일어나며 10일 정도면 회복된다¹⁶⁻¹⁸.

호중구 비율이 day 12에는 대조군 42.10 ± 10.90 , APL100 54.54 ± 4.02 , APL150 50.97 로서 정상군과 비교시 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 보아 선학초 경구투여는 시험기간 동안 호중구 감소를 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이러한 점을 살펴볼 때, 선학초를 경구

투여한 APL100군과 APL150군은 큰 독성을 나타내지 않았지만, 체중과 간기능 검사 등에 대해 추가적인 연구가 필요할 것이다.

다음으로는 암의 증식억제가 세포사멸 기작에 의해 일어나는지를 확인하는 실험을 수행하기 위하여, 떼어낸 암조직의 일부를 Western Blot을 수행하여 세포사멸 과정에 관련하는 지표들을 확인하였다. 세포사멸이란 조직의 항상성이나 발생 과정에서 세포에 원치 않는 자극이나 위협이 가해질 때 개체를 보호하기 위해 진화적으로 생겨난 과정이라고 알려져 왔다¹⁹⁾⁻²¹⁾. 세포사멸 기전의 핵심 요소는 caspase라는 proteolytic system이며 caspase-8 와 caspase-9와 같은 upstream initiator caspases는 다른 downstream effector caspases인 caspase-3, -6와 -7을 활성화시킨다²²⁾. 그 중, caspase-3의 활성화는 세포사멸 과정에서 핵심적인 역할을 하며 세포 내 많은 단백질-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), gelsolin, retinoblastoma (Rb)와 b-catenin 등을 분해시킨다²³⁾⁻²⁴⁾. 그 중 PARP는 DNA 회복을 담당하는 것으로, caspase-3와 함께 apoptosis의 지표로 사용된다²⁵⁾.

Caspase-3와 PARP에 대해 western blot을 한 결과 대조군, APL100군에서 caspase-3가 두 개의 띠로 cleave 된 것을 보여주었으며, PARP도 APL100군에서 p85의 분절화가 나타났음을 볼 수 있었다. 이것으로 대조군, APL100에서 모두 세포 사멸 기작이 활성화 되었음을 나타내며, 대조군은 종양의 크기가 커서 자체 세포사멸기작이 활성화 되었을 것으로 추측된다.

세포사멸의 중요한 인자로 알려져 있는 세포사멸 억제인자인 Bcl-2와 촉진인자 Bax에 대해 검사하였을 때, APL100군에서 대조군에 비하여 Bax의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 선학초를 경구투여시 종양 성장 억제기전에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

다음으로는 정상군과 약물군간의 약물대사 효소의 발현차이 및 다중약물내성 단백질의 변화를 알아보려고 하였다. 신체조직은 외부 물질의 섭취에 대한 대사에 관련된 많은 효소들을 가지고 있다. 현재까지 가장 잘 알려진 약물대사와 관련된 효소로는 cytochrome P450(CYPs) family와 다중약물내성 단백질인 multidrug resistance protein(MRP)이 있다. MRP는 세포막 당단백질로서 ATP를 가수분해하고 얻은 에너지를 이용하여 물질을 세포 내부에서 외부로 배출하는데, 신장, 소화관, 간, 고환 등 여러 곳에 분포하며, 외부로부터 흡수된 이물질 등을 배출하는 생리적 기능을 담당한다²⁶⁾⁻²⁹⁾. 또 다른 약물대사 효소로 알려진 CYPs 효소는 외부로부터 흡수된 이물질을 다양한 화학적 반응으로 대사 전환물질로 바꾸어 배출하는 기능을 하는데, 간, 신장, 위장, 폐 등 신체의 다양한 조직에 다양한 isoform으로 존재한다^{30),31)}.

간조직에서 CYP3A11 발현량의 차이를 real-time PCR을 활용하여 상대정량법을 이용하여 측정하였다.

CYP3A11은 정상군 대조군에서는 변화가 적었으나, APL100군과 APL150군에서 발현량이 매우 감소하였다. 따라서, CYP3A11에 의해 대사되는 다른 약물과 선학초를 병용 투여시 사용용량에 주의를 기울여야 할 필요가 있다. 선학초를 경구투여 했을 경우 MRP1a는 정상군, 대조군에 비하여 APL150군에서는 감소하였으나, APL100군에서는 오히려 증가하는 양상을 보였다. 이것으로 MRP1a는 경구투여를 하였을 때는 MRP1a 발현량 변화는 선학초 처리 농도에 따라 다른 양상을 보였다.

그렇지만, 본 연구는 샘플수가 적기 때문에 선학초의 항암제로서의 가능성만을 보았다고 할 수 있다. 추가로 본 연구를 확대하여 실시할 필요가 있다.

V. 결론

C57B/L6 쥐에 mouse tumor LLC를 접종하여 암이 생성된 쥐에게 선학초를 경구투여하였을 때 종양 증식 억제 효능, 간독성, 신독성, 기전, 약물대사 변화를 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 선학초 100mg/kg 농도를 경구투여했을 때와, 선학초 150mg/kg 농도를 경구투여했을 때 종양증식 억제 효과가 있는 것으로 보였다.
2. 선학초 100mg/kg 농도를 경구투여했을 때와, 선학초 150mg/kg 농도를 경구투여했을 때 물질섭취량 증가 등 이상반응이 나타났으나, 대조군에 비해 식이섭취량, 체중, 간독성과 신독성, 호중구 감소증에서 특이한 이상반응은 나타나지 않았다.
3. 선학초 100mg/kg 농도를 경구투여했을 때와, 선학초 150mg/kg 농도를 경구투여했을 때 약물대사시험에서 Bcl-2와 Bax항목을 western blot하였을 때 Bax에서는 대조군에 비해 발현이 증가되었다.
4. 선학초 100mg/kg 농도를 경구투여했을 때 CYP3A11에서는 72%가, APL150군에서는 62%가 감소하였다.
5. 선학초 150mg/kg 농도를 경구투여했을 때 MRP1a의 효소발현은 75% 감소하였다.

이상의 성적으로 보아 선학초는 종양 증식 억제효과가 있으며, 안전하다고 판단되어, 종양 치료제로서 가능성을 제시하고 있으며, 향후 지속적 연구가 필요하리라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 경원대학교의 지원을 받아 수행된 연구임.

VI. 참고문헌

1. 전기택. 2005년 남녀사망자와 사망원인. 쟈너리뷰. 2006; 3: 85-90.
2. 배종면. 상대생존율. 예방의학회지. 2004; 37(3): 217-9.
3. 김성경, 박웅섭. 우리나라 암 환자의 개인 부담 의료비용. 대한내과학회지. 2006; 70(1): 61-8.
4. 정진규, 김종성, 김성수, 강동수, 김성민, 이동훈, 한경희. 말기 암 환자 가족 간병인의 삶의 질. 한국호스피스완화의료학회지. 2006; 9(1): 1-10.
5. 박신, 권오진. Escherichia coli O157:H7의 제어를 위한 선학초 추출물과 NaCl의 병용 효과. 한국생물공학회지. 1998; 13(2): 168-73.
6. 조려화 외 8인. 선학초 부탄올 추출물의 혈관 이완 효과의 기전에 대한 연구. 생약학회지. 2006; 37(2): 67-73.
7. 전성봉, 양바롬, 최춘환, 김익수, 박경석. 식물병원균에 대한 짚신나물(선학초) 추출물의 항균활성과 Agrimol B의 동정. 농약과학회지. 2006; 10(3): 230-6.
8. Miyamoto K, Kishi N, Koshiura R. Antitumor activity of methanol extract from roots of Agrimonia pilosa Ledeb. Jpn J Pharmacol. 1985; 38(1): 9-16.
9. Murayama T, Kishi N, Koshiura R, Takagi K, Furukawa T, Miyamoto K.

- Agrimoniin, an antitumor tannin of *Agri-
monia pilosa* Ledeb., induces interleukin-1.
Anticancer Res. 1992 Sep-Oct; 12(5):
1471-4.
10. Gao K, Zhou L, Chen J, Li F, Zhang L. Experimental study on decoctum *Agri-
monia pilosa* Ledeb-induced apoptosis in HL-60
cells in vitro. *Zhong Yao Cai.* 2000 Sep;
23(9): 561-2.
 11. 최순자, 백중우, 박종형, 전찬용, 최유경, 고
성규. 선학초(짚신나물)에 의한 in vitro와
in vivo에서의 암세포사멸 기전탐색. 대한
한방내과학회지. 2009; 30(3): 399-409.
 12. 최정원, 장보형, 이주아, 고호연, 정희, 전찬
용 외 4인. 선학초(짚신나물) 복강주사의
항암효과 탐색 및 약물대사효소의 변화.
대한한의학회지. 2009; 30(4): 127-41.
 13. 강세찬 외 12인. 선학초 추출물의 간보호
효과. 생약학회지. 2006; 37(1): 28-32.
 14. 신민교 임상본초학. 서울: 영림사; 1997, p.384-6.
 15. 민경진, 송진욱, 차춘근. 선학초 추출물의
항산화 및 항암활성. 한국식품위생안전성
학회지. 2008; 23(2): 149-56.
 16. Kloft C, Wallin J, Henningsson A,
Chatelut E, Karlsson MO. Population
pharmacokinetic-pharmacodynamic model
for neutropenia with patient subgroup
identification: comparison across anticancer
drugs. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(18):
5481-90.
 17. Ishikawa M, Okada Y, Satake-Ishikawa
R, Kakitani M, Kawagishi M, Matsuki S,
Kusaka M, Asano K. Pharmacological
effects of recombinant human granulocyte
colony-stimulating factor modified by
polyethylene glycol on anticancer drug-
induced neutropenia in mice. *Gen Phar-
macol.* 1994 May; 25(3): 533-7.
 18. Sakurai M, Ito M, Hanawa Y, Tsukimoto
I, Imashuku S, Ueda K, Nishihira H,
Fujimoto T, Ohashi Y. Clinical study of
recombinant human granulocyte-colony
stimulating factor(KW-2228) in pediatric
field. 2. Effectiveness on neutropenia
associated with administration of anti-
cancer agent and safety. *Rinsho Ketsueki.*
1993; 34(2): 119-27.
 19. Steller H. Mechanism and genes of cells
suicide. *Science.* 1995; 267: 1145-9.
 20. Green, D. R. Apoptotic pathways: paper
wraps stone blunts scissors. *Cell.* 2000;
102: 1-4.
 21. Meier, P., Finch, A. and Evan, G.
Apoptosis in develop A. . *Nature.* 2000;
407: 796-801
 22. Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y.,
Inohara, N. Caspases: The proteases of
the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998;
17: 3237-45.
 23. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C.,
et al. Caspase-3-generated fragment of
gelsolin: Effector of morphological change
in apoptosis. *Science.* 1997; 278: 294-8.
 24. Jonstone, R. W. Apoptosis: a link between
cancer genetics and chemotherapy. *Cell.*
2002; 108: 153-64.
 25. 임순성, 이연실, 조환진, 신현경, 윤정환. 메
톡시화 플라본 유도체 합성과 유도체들이
HT-29 인간 대장암 세포 성장에 미치는
영향. *Cancer Prevention Research.* 2006;
11: 211-7.
 26. Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw
R. Multidrug resistance protein 4(MRP4/
ABCC4): a versatile efflux transporter
for drugs and signalling molecules. *Trends
Pharmacol Sci.* 2008; 29(4): 200-7.

27. Deeley RG, Cole SP. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1(ABCC1). *FEBS Lett.* 2006 ; 580(4) : 1103-11.
28. Van der Kolk DM, Vellenga E, Müller M, de Vries EG. Multidrug resistance protein MRP1, glutathione, and related enzymes. Their importance in acute myeloid leukemia. *Adv Exp Med Biol.* 1999 ; 457 : 187-98.
29. Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, König J. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact.* 1998 ; 111-112 : 153-61.
30. Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J. Cytochrome P450-activated prodrugs : targeted drug delivery. *Curr Med Chem.* 2008 ; 15(23) : 2346-65.
31. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human cytochrome P450-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006 ; 2(6) : 875-94.