

인체 자궁암세포에서 cisplatin과 산삼배양근추출물에 의한 apoptosis 유도

이 명 선*

청주대학교 이공대학 자연과학부 유전공학전공

Cisplatin and Extract of Tissue Cultured Mountain Ginseng-Induced Apoptosis in Human Cervical Cancer Cells

Myeong Seon Lee*

Department of Genetic Engineering, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea
(Received August 28, 2010; Revised September 27, 2010; Accepted September 28, 2010)

ABSTRACT

Mountain ginseng is a perennial crop rarely found in the deep mountains of Korea. The medicinal effect of the mountain ginseng is well known as a panacea in traditional Chinese medicine for a long time. But scientific studies to elucidate the medicinal effect of the mountain ginseng have never been made on account of lack of sample. Recently an improved method of adventitious root culture system through the use of bioreactor has been developed in *Panax ginseng* that seems to be a reliable way of commercialization of root derived secondary metabolites. This experiment was conducted to evaluate chemotherapeutic effect against human cervical cancer cells by cisplatin (CDDP) and extract of tissue cultured mountain ginseng (ETCMG). CDDP and ETCMG-induced apoptotic cell death in human cervical cancer cell line, HeLa was confirmed by the analysis of cell growth, morphological changes, DNA fragmentation, flow cytometry showed that ETCMG is an inducer of apoptosis and synergizes with CDDP. These results suggest that ETCMG present evidence of anticancer effect and could have a possibly natural therapeutic potential in cervical cancer patients.

Keywords : Cervical cancer, Cisplatin, Extract of tissue cultured mountain ginseng

서 론

암은 전 세계적으로 사망률이 높은 질병으로 지속적인 의학발전에 불구하고 계속 증가하고 있다. 통계청이 발표한 “2008년 사망원인 통계”에 따르면 한국인의 3대 사망원인은 암, 뇌혈관질환, 심장질환 순으로 암은 전체 사망원인 중 1위이며, 지난 10년 동안 사망률이 가장 많이 증가한 사인

이다(Korea National Statistical Office, 2010). 한국인 여성의 자궁경부암 발생률은 남미의 몇 개국을 제외하고는, 세계적으로 태국, 필리핀 등과 함께 높은 발생률을 유지하여왔고(Park et al., 1996), 수년간 1위를 지키던 자궁경부암이 환경의 개선으로 인하여 감소하였다. 그러나 보건복지부의 암 발생률 자료에 의하면 자궁암 발생률은 한국여성 15~34세군의 젊은 연령대에서 4위를 차지하여 여전히 높은것으로 나타났다(Ministry of health and welfare, 2010).

* Correspondence should be addressed to Myeong-Seon Lee, Department of Genetic Engineering, College of Science and Engineering, Cheongju University, Cheongju, Chungbuk 360-764, Korea. Ph.: (043) 229-8564, Fax: (043) 229-8432, E-mail: mslee@cju.ac.kr

최근 항암화학요법들이 암환자의 삶의 질과 더불어 생존 기간을 향상시키며 증명되어 활동능력이 있는 양호한 환자에서 표준으로 권장되고 있다. Cisplatin은 임상에서 광범위하게 사용되는 중요한 항암제 중 하나이며, 방광암, 전립선암, 고환암, 비소세포성폐암, 유선암, 난소암, 자궁경부암, 두경부암, 악성임파암 등 여러 가지 악성종양에 대하여 효과적인 치료작용 (Hanigan & Devarajan, 2003)을 하는 반면에 이독성, 신장독성, 골수독성 및 말초신경독성 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용이 제한적이다 (Schrier, 2002). 이러한 부작용에도 불구하고 시스플라틴은 약이 가지고 있는 치료효과 때문에 널리 사용되고 있으므로 이러한 문제를 해결할 부작용 없는 천연항암제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

한국산 산삼은 국내의 심산유곡에서 자생하고 있는 *Panax ginseng* C. A. Meyer이며, 이러한 천연산삼은 오래전부터 약초로서 그 효능이 알려지면서 과다한 채굴로 인하여 고갈되었다. 최근 조직배양기술을 이용하여 산삼뿌리로부터 모근과 동일한 유전자형을 가진 배양근을 유도하여 대량생산하는 방법이 개발되었고 (Han et al., 2003; Yoo et al., 2003) 이에 대한 효능에 관심이 모아지고 있다. 산삼에 대한 효능 연구는 산삼의 성분연구 (Yamaguchi et al., 1988)를 시작으로 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통한 면역 활성 증강 효과가 입증된 바 있으나 (Mizuno et al., 1994), 국내에서 산삼은 재배인삼과는 달리 체계적이고 과학적인 연구가 거의 없었다.

본 연구는 인체 자궁암 세포 HeLa에 항암제 cisplatin과 산삼배양근 추출물을 투여하여 세포 성장률, 형태, 전기영동에 의한 DNA fragmentation, 세포주기 분석을 통하여 apoptosis 유도를 확인함으로써 자궁경부암에서 산삼배양근의 항암작용을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포 및 시약

HeLa (인체 자궁암세포)는 미국 NIH, NCI에서 기증받아 사용하였고, 주원료인 산삼배양근 추출액은 CBN Biotech에서 기증받은 것을 사용하였다. 항암제 cisplatin (50 mg/50 mL)은 보령제약주식회사 제품을 사용하였다.

2. 세포배양

HeLa는 DMEM (GIBCO)배지에 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin을 첨가하여 5% CO₂가 공급되고, 습도가 유지되는 37°C 항온기에서 배양하면서 산삼배양근 추출액 (이하 ETCMG로 약칭)은 2, 4, 6 mg의 농도로, cisplatin (이하 CDDP로 약칭)은 4 µg/mL의 농도로 24시간 투여하였다.

3. ETCMG and/or CDDP가 자궁암세포의 apoptosis에 미치는 영향

ETCMG and/or CDDP가 자궁암세포의 성장에 미치는 영향을 분석하기 위하여 2 × 10⁵의 HeLa를 계수하여 60 mm TC dish에 넣고 세포가 80% 자란 상태에서 ETCMG를 2, 4, 6 mg/mL 또는 ETCMG 2, 4, 6 mg/mL + CDDP 4 µg/mL의 농도로 투여하고 24시간 배양하였다. 세포를 trypsin으로 떨어뜨려 0.4%의 trypan blue를 넣어 염색한 후, 혈구계수계를 사용하여 다음과 같은 공식에 의하여 apoptosis 비율을 계산하였다.

$$\text{Percent of apoptotic cells} = \frac{\text{No. of nonviable cells}}{\text{Total cell No.}} \times 100$$

4. 투과전자현미경(TEM)에 의한 분석

100 mm dish에 암세포를 배양하여 대조군과 ETCMG 4 mg/mL, CDDP 4 µg/mL의 농도로 24시간 처리한 후 세포를 모아서 1,200 rpm에서 원심분리한 다음 상등액을 제거하고 glutaraldehyde를 넣고 2~3시간 전고정한 후 osmium tetroxide에 후고정하여 alcohol propylene oxide계열로 탈수하고 Epon 혼합물에 포매하여 블록을 제작하였다. 제작한 블록을 초박절기 (Reicher-jung, Ultracut E)를 이용하여 60~80 nm 두께로 초박 절편을 만들어 Reynolds (1963)의 방법을 변형하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 투과전자현미경 (JEOL, JEM-1200 EX)으로 가속전압 80 KV에서 관찰하고 사진촬영 하였다.

5. DNA 단편화분석

100 mm dish에서 배양한 암세포에 ETCMG 2, 4, 6 mg/mL 또는 ETCMG 2, 4, 6 mg/mL + CDDP 4 µg/mL을 24시간 동안 투여한 후 세포들을 수확하여 얻은 pellets에 0.1 M Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 5% Triton X-100으로 조성된 lysis buffer (STET), proteinase K, 10% SDS를 첨가하여 pipetting한 후 37°C에서 3시간 배양한 다음 17,000 rpm에서 30분 동안 원심분리시켜 상등액만을 새로운 시험관에 옮겼다. 여기에 0.13 M NaCl과 1 vol.의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C에서 overnight 시킨 후 15,000 rpm에서 원심분리시켜 얻은 pellets을 건조시켰다. RNase A (20 µg/mL)를 넣고 37°C에서 1시간 처리한 후 분광광도계 (spectrophotometer; Hitachi Model U-1100)로 260 nm의 UV파장에서 O.D.값을 측정할 다음 동일한 양의 DNA를 ethidium bromide가 첨가된 1.6% agarose gel에서 염색제가 gel 하단 1 cm까지 오도록 전개시키고 이것을 증류수에 넣어 overnight 시킨 후 UV transilluminator (Spectronics Corporation, SPETROLLINE)로 ladder를 확인하고, digital camera로 사진촬영하였다.

6. Flow cytometry에 의한 세포주기 분석

부유하고 있는 세포들과 부착하고 있는 세포들을 15 mL 시험관에 모아 1,200 rpm에서 원심분리한 후 상등액을 제거하고 남은 pellets에 PBS를 첨가하여 남아있는 trypsin을 제거한 다음 1,200 rpm으로 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 PBS를 첨가하여 pipetting하고 이것을 새로운 eppendorf tube에 옮겨서 무수알코올을 첨가하여 전체가 70% 알콜이 되게한 후 4°C에서 overnight시켰다. 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고 여기에 1 mL의 PI용액을 첨가하여 FACSCalibur (BECTON DICKINSON; Type A Analyzer)로 세포주기를 측정하였다.

7. 통계처리

유의성 검정은 student t-test로 하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 산삼배양근이 자궁암세포의 apoptosis에 미치는 영향

본 연구는 산삼배양근이 인체 자궁암세포 HeLa에 항암작용을 나타내는지를 확인하고자 산삼배양근 추출액 ETCMG 2, 4, 6 mg/mL, CDDP 4 µg/mL의 농도로 24시간 투여한 후 세포의 성장에 미치는 영향을 분석하고, 항암제로서 효과가 입증되어있는 CDDP와 ETCMG를 복합투여하여 비교하였다. Apoptosis비율은 대조군 $2.83 \pm 0.25\%$ 에 비하여 ETCMG의 농도가 증가할수록 $13.53 \pm 0.67\%$, $29.20 \pm 5.56\%$, $55.23 \pm 1.29\%$ 로 농도에 비례하여 현저히 증가하였고 ($p < 0.05$), CDDP와 ETCMG가 세포의 apoptosis비율에 미치는 영향을 비교한 결과, CDDP의 apoptosis비율이 $19.77 \pm 1.76\%$ 로 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.05$), 또한 CDDP와 ETCMG를 복합투여한 경우에 $24.43 \pm 0.60\%$, $47.17 \pm 1.23\%$, $63.60 \pm 1.11\%$ 로 ETCMG를 단독으로 투여한 경우보다 암세포의 apoptosis비율이 매우 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1, $p < 0.05$).

2. 세포의 형태분석

암세포에 항암제 CDDP와 ETCMG를 투여한후 세포의 형태를 도립현미경 (Fig. 2A-C)과 투과전자현미경 (Fig. 2D-F)으로 관찰하였다. 대조군은 세포의 정상적인 형태를 유지하고 있는 반면에 CDDP와 ETCMG를 각각 처리한 암세포는 세포의 성장이 현저히 억제되었고 (Fig. 2B, C), 염색질의 응축과 apoptotic body가 관찰되어 (Fig. 2B, C) 항암제 CDDP와 마찬가지로 ETCMG 역시 암세포에 apoptosis를 유도하

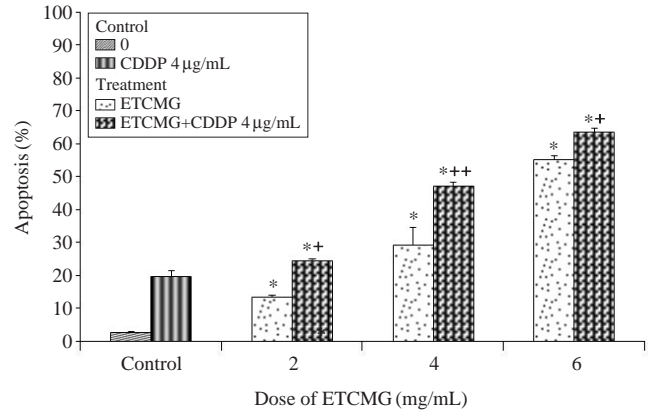


Fig. 1. Effect of ETCMG and/or CDDP on apoptosis. The percent of apoptotic cells in HeLa treated with 2, 4, 6 mg/mL of ETCMG alone or in combination with 4 µg/mL of CDDP for 24 hours. *: $p < 0.05$ compared with control, +: $p < 0.05$ compared with ETCMG to ETCMG+CDDP. Experiments were repeated 3 times.

는 것으로 나타났다.

3. DNA 단편화 분석

암세포에 ETCMG를 농도별로 처리한 것과 CDDP를 복합 처리한 것을 비교하여 세포의 성장억제가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하고자 DNA를 분리하여 전기영동 하였다. HeLa 세포에서 ETCMG의 농도가 증가할수록 ladder가 뚜렷이 관찰되었고 (Fig. 3, lane 2~4), CDDP를 복합처리한 것 역시 ETCMG의 농도에 비례하여 ladder가 선명하게 나타남으로서 (Fig. 3, lane 5~7) ETCMG와 CDDP가 apoptosis를 유도한 것을 확인할 수 있었다.

4. Flow cytometry (FC)에 의한 세포주기 분석

Apoptosis의 정도를 양적으로 분석하기 위하여 FC를 사용하여 핵을 고정한 후 Sub-G₁기의 DNA의 양을 측정하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 HeLa에 ETCMG를 농도별 (Fig. 4B-D)로 처리한 경우에 apoptosis를 나타내는 Sub-G₁기 (M1 중앙의 왼쪽)의 양이 농도에 비례하여 증가하여, ETCMG가 HeLa에서 apoptosis를 유도함이 입증되었다. 또한 항암제인 CDDP와 복합 투여한 경우에 Sub-G₁기 DNA양이 눈에 띄게 증가함으로써 항암제 CDDP의 단독 투여보다는 ETCMG와 함께 사용하는 경우에서 apoptosis유도에 상승효과가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 4E).

고 찰

세포증식의 조절은 암발생뿐만 아니라 암예방에도 중요한 역할을 한다. 특정 성분의 항암작용을 알기 위해서는 암

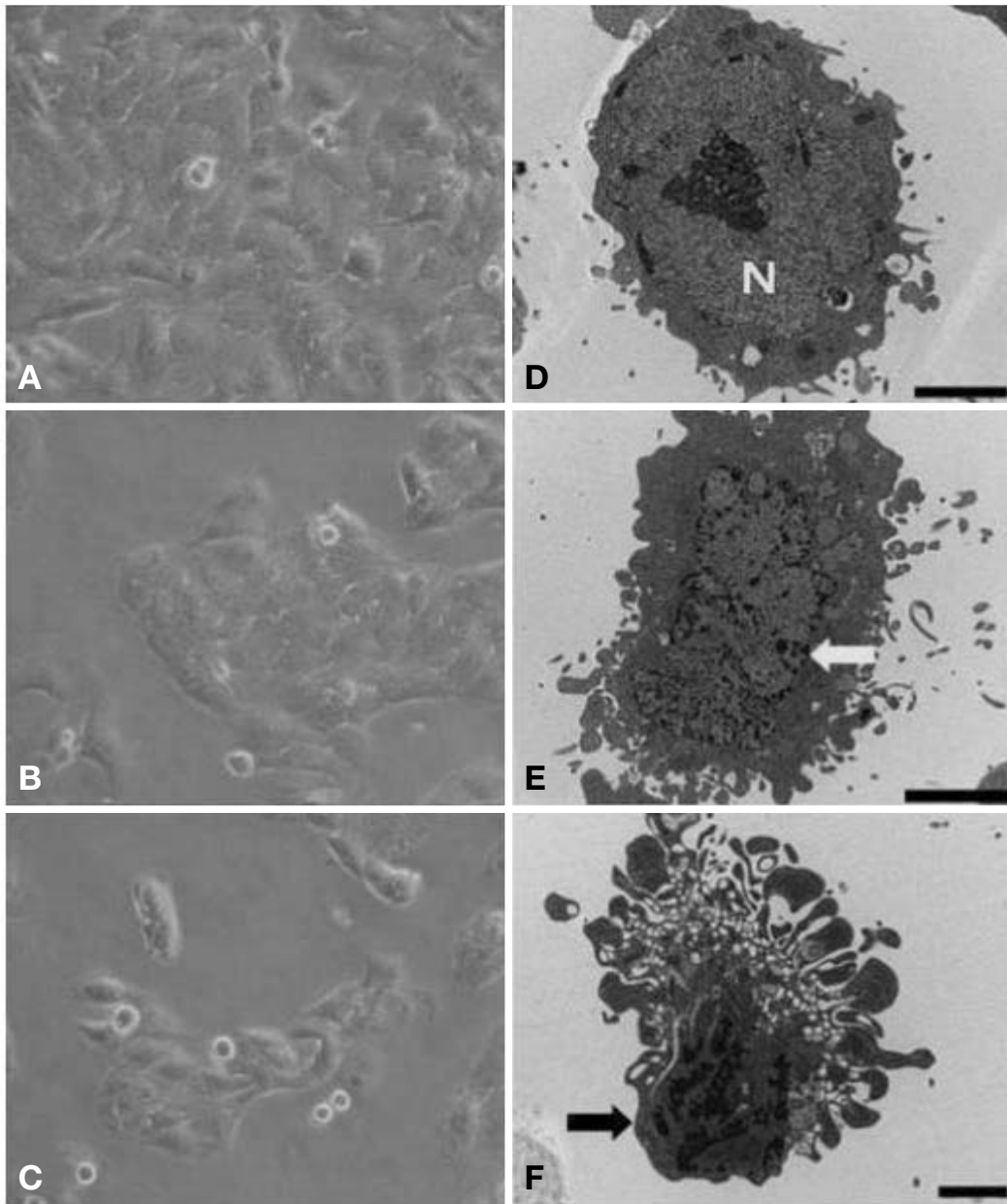


Fig. 2. Morphology of HeLa cells treated with ETCMG and/or CDDP for 24 hours. (A, D) Control cells, (B, E) Cells treated with 4 $\mu\text{g/mL}$ CDDP. (C, F) Cells treated with ETCMG 4 mg/mL. Photographs were taken with an inverted microscope at a magnification 100 \times (A~C), or a transmission electron microscope (D~F). Scale bars are 1 μm each (D~F). Untreated cells show unremarkable features (D). Whereas after 4 $\mu\text{g/mL}$ CDDP (E) or after 4 mg/mL ETCMG (F) for 24 hrs, cells exhibit condensation of nuclear chromatin and apoptotic bodies (E, F). Arrow: Apoptotic body, N: Nucleus.

세포 증식의 억제와 apoptosis의 생성, 대사 활성의 감소, 항산화적인 성질 등이 중요한 요인으로 간주되고 있다. 암치료에 효과적인 평가방법 중의 하나는 암세포에서 apoptosis가 유도되는 것이다. 세포에서 유도된 apoptosis의 형태학적인 특징은 염색질이 치밀해지고 핵막에 작은 덩어리들이 형성되면서 핵분열이 일어난다. 또한 세포질이 응축되고 세포표면이 돌돌 말리면서 돌기들이 생기고, 세포성분들이 조

각나 돌기들이 분리되며, 세포내에 transglutaminase의 가교결합이 증가하여 이로 인해 단백질막이 형성되어 apoptotic body가 만들어진다. Apoptosis를 확인하는 생화학적인 방법은 nucleosomal DNA 단편이 생성되었는지를 분석하는 것으로, DNA 단편화는 유전체 DNA가 약 180~200 base pair nucleosome단위의 배수로 잘라지는 것이 전기영동에 의해 ladder로 나타난다.

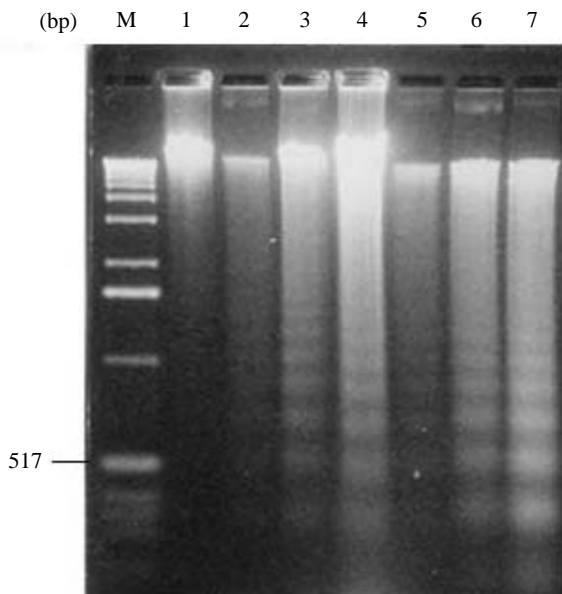


Fig. 3. Electrophoresis pattern of DNA isolated from HeLa cells after exposure to ETCMG and/or CDDP for 24 hours. lane 1: control, lane 2: ETCMG 2 mg/mL, lane 3: ETCMG 4 mg/mL, lane 4: ETCMG 6 mg/mL, lane 5: ETCMG 2 mg/mL+CDDP 4 μg/mL, lane 6: ETCMG 4 mg/mL+CDDP 4 μg/mL, lane 7: ETCMG 6 mg/mL+CDDP 4 μg/mL, 10 μg of DNA was loaded per well. Size and location of a molecular weight marker (M) are shown on the left. bp: base pair.

본 연구는 자궁암세포주인 HeLa에서 산삼배양근 추출액의 항암효과를 알아보기 위하여 항암제로 널리 사용하고 있는 시스플라틴과 단독 또는 복합적으로 사용하여 apoptosis 유도로 확인하고자 하였다. 시스플라틴의 분자는 한 개의 백금 원자, 두 개의 염소 원자와 두 개의 암모니아 분자로 구성된 무기 착화합물이며, 암세포중의 DNA와 결합하여 DNA 기능을 억제하고 DNA 복제를 간섭하여 암세포를 소멸하는 것으로 알려져 있다. 시스플라틴을 포함하여 현재 사용하고 있는 항암제들은 부작용으로 인한 보조적 치료의 필요가 절실한 상황이다. 1977년부터 한국의 과학자들은 인삼을 비롯한 천연식품재료로부터 독성이 없는 항암제를 발굴하기 위하여 많은 연구를 해 왔다 (Yun et al., 1980). 우리나라의 대표적인 자생 약용식물인 산삼은 예로부터 영약으로 취급해온 매우 희귀한 약용식물로 효능면에서 인삼보다 탁월하다고 인식되어 왔으나 다량으로 구입이 어려워 연구에 많은 어려움이 있었다. 최근에 조직배양 기술을 이용하여 산삼뿌리에 식물성 호르몬을 처리한 후 모근과 동일한 유전자를 가지고 있는 산삼배양근을 유도하여 이들로부터 특수한 사포닌을 다량 생산하는 산삼배양근을 선발한 다음에 기내 배양을 통한 대량생산 방법이 개발된 이래 산삼배양근이 뇌졸중, 치매 (In & Yang, 2004), 고지혈증 (Lee et al., 2003)에 효과적인 약리작용을 나타내며, 인체 대장암세포에서 항암 효과를 보인다 (Lee, 2008)는 연구결과를 발표한바 있으나,

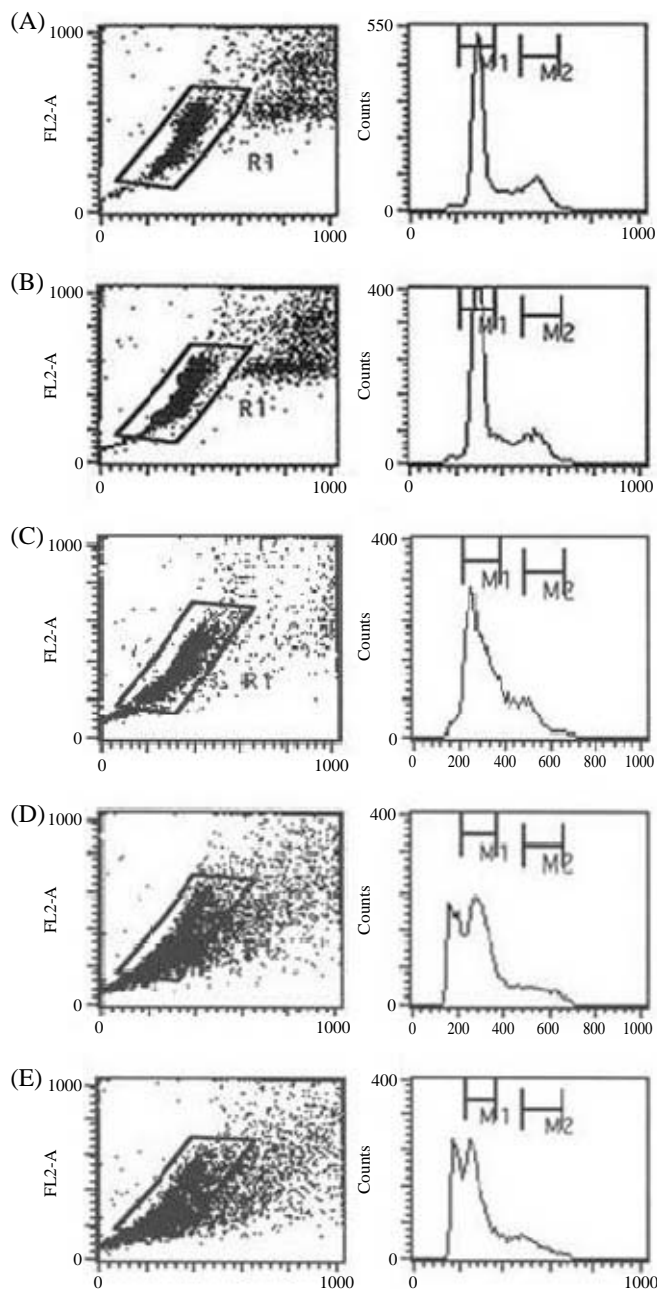


Fig. 4. Cell cycle analysis of HeLa cells following ETCMG and/or CDDP treatment. HeLa cells were treated with 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D) mg/mL ETCMG and 4 mg/mL ETCMG+4 μg/mL CDDP (E) for 24 hours. Stained with PI.

자궁암세포 배양에 의한 항암작용은 아직 밝혀지지 않았다. 한국 여성의 자궁암 발생률은 미국의 백인에 2.8배, 흑인의 1.6배, 중국에서 가장 발생 수준이 높은 천진지역 여성의 발생률보다 2.2배 높은 것으로 나타났으며, 일본 오사카 지역의 여성 인구 10만 명당 13.2명보다는 아주 약간 높았으나 필리핀이나 태국 등 동남아시아 국가들의 여성 자궁암 발병 발생수준보다는 낮게 나타났다 (Park et al., 1996). 수년간

여성암 1위를 차지하고 있는 자궁암이 위생상태의 개선 등으로 최근 감소하였지만, 여성암 발생순위 연령대비 4~5위로 계속 높은 수준을 유지하고 있다(Ministry of health, Labour and welfare, 2010).

본 연구를 통하여 인체 자궁암 세포주인 HeLa에서 산삼 배양근 추출액인 ETCMG가 탁월한 항암작용을 나타내었으며, 항암제 CDDP를 복합적으로 사용한 경우에 항암작용이 상승하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 ETCMG가 자궁암 치료제로서 가능성을 시사하는 것이며, 현재 사용하고 있는 항암제의 부작용을 줄이면서 더 좋은 항암효과를 기대할 수 있는 복합치료의 개발에 도움을 줄 것으로 사료된다. 희귀해서 구하기가 어렵고 고가인 천연 야생산삼에 대해 활만한 산삼배양근을 이용하여 산삼의 숨겨진 약리적 효능을 밝히는 것은 약품개발과 국민의 보건 향상에도 크게 기여할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Han EJ, Kim YS, Yu KW, Jeong CS, Paek KY: Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. B. Meyer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. *J Plant Biotech* 5 : 1-6, 2003.
- Hanigan MH, Devarajan P: Cisplatin nephrotoxicity; Molecular mechanisms. *Cancer Therapy* 1 : 47-61, 2003.
- In JK and DC Yang: Current Status and prospect of cultured root *in vitro* of the Korean Wild Ginseng. *Korean J Plant Resources* 17(1) : 1-18, 2004. (Korean)
- Lee EJ, Zhao HL, Li DW, Jeong CS, Kim YS: Effect of the MeOH extract of adventitious root culture of *Panax ginseng* on hyperlipidemic rat induced by high fat-rich diet. *Korean J Pharmacol* 34 : 179-184, 2003. (Korean)
- Lee MS: Induction of apoptosis by adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer in human colon HCT-116 carcinoma cells. *J Ind Sci, Cheongju Univ* 25(2) : 55-61, 2008. (Korean)
- Ministry of health and welfare: Cancer incidences 2006-2007 year, 2010. (Korean)
- Mizuno M, Yamada J, Terai H, Kozukue N, Lee YS, Tsuchida H: Differences in immunomodulating effects between wild and cultured *Panax ginseng*. *Biochem Biophysics Res Comm* 200 : 1672-1678, 1994.
- Park BJ, Lee MS, Ahn YO, Choi YM, Ju YS, Yoo KY, Kim H, Yew HS, Park TS: Nationwide incidence estimation of uterine cervix cancer among Korean women. *Korean J of Preventive Medicine* 29(4) : 843-851, 1996. (Korean)
- Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17 : 208-212, 1963.

Schrier RW: Cancer therapy and renal injury. *J Clin Invest* 110 : 743-745, 2002.

Korea National Statistical Office: 2008 year causes of death, 2010. (Korean)

Yamaguchi H, Matsuura H, Kasai R, Tanak O, Satake M, Kodha H, Izumi H, Nuno M, Katsuki S, Isoda S: Analysis of saponins of wild ginseng. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 36(10) : 4177-4181, 1988.

Yoo BS, Chang MS, Byun SY: Characterization of cell cultures and ginsenoside production by cultured ginseng and wild mountain ginseng. *Korean J Biotech Bioeng* 18(2) : 133-139, 2003. (Korean)

Yun TK, Yun YS, Han IW: An experimental study on the tumor inhibitory effect of red ginseng in mice and rats exposed to various chemical carcinogens. *Proc. 3rd Inter. Ginseng Sympo.* Korea Ginseng Research Institute Press, Seoul, pp. 87-112, 1980. (Korean)

< 국문초록 >

인체 자궁암 세포 HeLa에 항암제 cisplatin (CDDP)과 산삼배양근 추출물(ETCMG)을 투여하여 세포 성장률, 형태, 전기영동에 의한 DNA fragmentation, 세포주기 분석을 통하여 apoptosis 유도를 확인하였다.

ETCMG 2, 4, 6 mg/mL, CDDP 4 µg/mL의 농도로 24시간 투여한 후 세포의 성장에 미치는 영향을 분석하고, ETCMG를 항암제로서 효과가 입증되어있는 CDDP와 복합투여하여 비교한 결과 apoptosis비율은 대조군에 비하여 ETCMG의 농도가 증가할수록 농도에 비례하여 현저히 증가하였고 ($p < 0.05$), CDDP와 ETCMG를 복합투여한 경우에 ETCMG를 단독으로 투여한 경우보다 apoptosis비율이 매우 높은것으로 나타났다 ($p < 0.05$).

세포의 형태를 도립현미경과 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 대조군은 세포의 정상적인 형태를 유지하고 있는 반면에 CDDP와 ETCMG를 각각 처리한 암세포는 세포의 성장이 현저히 억제되었고, 염색질의 응축과 apoptotic body가 관찰되었다.

세포의 성장억제가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하고자 DNA를 분리하여 전기영동한 결과, HeLa 세포에서 ETCMG의 농도가 증가할수록 ladder가 뚜렷이 관찰되었고, CDDP를 복합 처리한 것 역시 ETCMG의 농도에 비례하여 ladder가 선명하게 나타났다.

Flow cytometry (FC)에 의한 세포주기 분석 결과, ETCMG를 농도별로 처리한 경우에 apoptosis를 나타내는 Sub-G₁기의 양이 농도에 비례하여 증가하였고, 항암제인 CDDP와 복합 투여한 경우에 Sub-G₁기 DNA양이 눈에 띄게 증가한 것으로 나타났다.

이상의 실험 결과를 종합하면, ETCMG는 인체 자궁암에서 항암효과를 가지고 있으며, 항암제 CDDP의 단독 투여보다는 ETCMG와 함께 사용하는 경우에 암 치료제로서의 상승효과가 있는 것으로 사료된다.