

## 담관암세포주에서 地榆 에탄올 추출물의 항암 효과

박진규, 김영철  
경희대학교 대학원 한의학과 간계내과학교실

### Pro-apoptotic Effects of *Sanguisorbae Radix* Ethanol-Extracts on Two Cholangiocarcinoma Cell Lines, SNU-1079 and SNU-1196

Jin-kyu Park, Young-chul Kim  
Dept. of Internal Medicine, Oriental Medicine Graduate School, Kyung-Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study was performed to investigate the antineoplastic effect of ethanol extracts from *Sanguisorbae Radix* on cholangiocarcinoma cells that was established from biliary tract cancer tissue.

**Materials and Methods :** Two cholangiocarcinoma cell lines, SNU-1079 and SNU-1196, were studied. The mRNA expression of Caspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax, P53, and P21 was examined by RT-PCR. Cell viability was determined by MTT assay. The cell cycle was analyzed by flow cytometry and apoptosis by cell death detection ELISA kit.

**Results :** Proliferation of SNU-1079 and SNU-1196 was inhibited by *Sanguisorbae Radix* treatment in a dose-dependent manner. All cells treated with *Sanguisorbae Radix* showed increased dose- and time-dependent apoptosis. The expression of caspase 3, 8, 9, p53, and p21 was increased in all cells after the treatment of *Sanguisorbae Radix*. The expression of Bcl-2 was decreased in SNU-1196 and Bax expression was increased in all cells after the treatment of *Sanguisorbae Radix*.

**Conclusions :** These results suggest that *Sanguisorbae Radix* would be beneficial in the treatment of cholangiocarcinoma.

**Key words :** *Sanguisorbae Radix*, cholangiocarcinoma, apoptosis

## 1. 서 론

담관암은 담관을 싸고 있는 담관 상피세포에서 발생하는 암으로 간내 담관암과 간외 담관암으로 분류된다. 담관암의 발생 빈도는 원발성 간담도계 악성 종양 중에 두 번째이며, 최근 전 세계적으로 발생률과 사망률이 증가하고 있으며<sup>1,2</sup>, 예후는 매우 불량한 것으로 알려져 있다.

통계청의 최근 자료에 의하면 담낭 및 기타 담도계 암은 2009년 전체 암 가운데 2.5%이며, 연도별 발생 빈도는 인구 10만 명당 2003년 7.6명, 2006년 8.3명, 2009년 9.6명으로 꾸준히 증가하는 경향을 보이고 있다. 연령별로는 50대부터 발병률이 뚜렷이 증가하는 모습으로 2009년 통계에 의하면 50대 이상이 전체의 94%를 차지하였으며, 성별 분포는 남자에서 여자보다 1.38배 더 높은 발병률을 보였다<sup>3</sup>.

현재 담관암의 유일한 근치적 치료 방법은 수술이다. 그러나 진단 당시 수술적 완전 절제가 불가능한 경우가 대부분이며 환자의 연령 및 전신 상

· 교신저자: 김영철 서울시 동대문구 회기동 1번지  
경희대학교 대학원 한의학과 간계내과학교실  
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120  
E-mail: yckim@khmc.or.kr

대 불량 등으로 극히 제한된 환자에서만 수술이 가능하다. 완전절제를 위한 광범위 절제술의 경우 사망률과 합병증은 점차적으로 감소하고 있으나, 이와 같은 적극적인 수술에도 불구하고 5년 생존율은 20~40% 정도이다<sup>4</sup>. 또한, 절제 불가능한 담관암에 대한 수술 외 항암화학요법과 방사선치료, 표적치료, 광역학치료 등의 효과는 아직까지 확실하지 않다<sup>5,6</sup>. 최근에 분자 생물학적 표적치료제들이 병합요법으로서 시도되고 있으나<sup>7</sup>, 생존율 향상 등의 치료효과에 대해서는 향후 좀 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

地榆(*Sanguisorbae Radix*, JIU)는 장미과에 속하는 다년생 초본으로 동속근연식물의 뿌리를 건조한 것으로 涼血止血하고 清熱收斂하며 下焦에 入하여 濕熱을 제거하는 작용이 있어 出血症과 熱毒症에 사용되고 있는 약물이다<sup>8</sup>. 현재까지 발표된 단일 약물로서 地榆에 대한 연구 결과들을 살펴보면 피부암, 유선암, 폐암세포에 대한 항암효과 및 항균, 항산화, 항퀘양 및 항불안 효과에 대한 보고가 있다<sup>9-12</sup>. 그러나 담관암과 관련된 항암 효과는 아직까지 보고된 바 없다.

담낭은 간의 下面에 붙어 있으며, 藏象論에 의하면 肝膽은 表裏關係로 生理 病理的 기능으로 서로 밀접한 관계가 있다.

이에 저자는 간세포 보호 효과 및 섬유화 억제 효과가 실험적으로 보고된 茵陳清肝湯의 약물들 중 담관암세포주에 대한 항암 효과를 나타내는 약물을 선별하여 실험을 진행하였으며 특히 본 연구에서 담관암세포주를 대상으로 地榆의 에탄올 추출물을 처리하여 항암효과에 대한 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 방 법

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

본 실험에 사용한 地榆(*Sanguisorbae Radix*, JIU)

는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해<sup>13</sup>에 근거하여 경희대부속 한방병원에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였다.

#### 2) 검액의 조제

地榆 100 g을 1000 ml의 80% 에탄올 수용액으로 4 °C에서 냉침 추출하였다. 3시간마다 분광기로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 변화량이 5% 미만으로 둔화되었을 때 추출이 완료된 것으로 간주하였고 48시간이 소요되었다. 추출액을 Whatman 여과지로 여과한 후 회전식 증발기로 감압농축 하였다. 동결건조기를 이용하여 분말상태의 地榆 28 g (수득율 28%)을 얻었다. 얻어진 동결건조 엑기스를 -80 °C 냉동고에 보관하고 필요할 때마다 녹여 사용하기 전 0.2 μm syringe filter로 여과하여 필요한 농도로 사용하였다.

#### 3) 세포 배양 및 시약

한국세포주은행에서 분양받은 SNU-1079(biliary tract cancer, intrahepatic duct), SNU-1196(biliary tract cancer, hepatic duct bifurcation)을 사용하였고, RPMI 1640 배양액(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS와 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 배양하였다. 검액은 dimethylsulfoxide(DMSO) (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA)에 용해시킨 후 RPMI 1640 배양액에 희석하여 사용하였다.

## 2. 방 법

#### 1) 세포증식 분석

세포증식은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석 kit인 CellTiter 96 AQueous One solution(Promega, Madison, WI, USA)으로 측정하였다. 각 세포주를 96-well 배양 접시에 1×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주하고 地榆 추출물을 0, 50, 100, 200, 300, 500 μg/ml의 농도로 투여한 후 각각 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 PMS/MTS solution을 이용하여 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2) 세포 주기 분석

地榆 추출물이 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 cell cycle analysis를 시행하였다. 세포들을  $1 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 6-well 배양접시에 분주 후 농도를 달리한 地榆 추출물과 함께 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS로 400  $\times$ g에 5분간 2회 원심 세척하였다. PBS 0.3 ml에 세포 침전물을 부유시키고 0.7 ml의 100% 에탄올에 1시간 이상 4  $^{\circ}$ C에서 고정시켰다. 세포 혼합물을 1시간 동안 10  $\mu$ l의 RNase A(10 mg/ml)로 37  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 20  $\mu$ l의 propidium iodide(1 mg/ml)로 염색하여 FACSCalibur(Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 세포 주기를 측정하였다.

## 3) 세포자멸사 분석

담관암세포주의 세포자멸사를 밝히기 위해 Cell death detection ELISA kit(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 세포자멸사를 측정하였다. 세포를 각각 6-well 배양 접시에  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하여 24시간 세포를 부착시킨 후 100, 200, 300  $\mu$ g/ml의 地榆 추출물을 투여한 후 24, 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 0.2 ml 용해완충액(lysis buffer)을 첨가하여 30분간 실온에서 세포를 용해시키고, 200  $\times$ g에서 10분간 원심 분리하였다. 20  $\mu$ l 세포용해물 안의 자멸세포들은 제조사의 지시에 따라 ELISA kit를 이용하여 DNA 분절화를 분석하였으며 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 4) 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

6-well plate에 SNU-1079, SNU-1196 세포주를 분주하고 각 plate에 0, 100, 200, 300  $\mu$ g/ml의 농도 별로 地榆 추출물을 처리하고 72시간 후 Qiagen사의 RNeasy Mini Plus Kit를 이용하여 제작사의 방

법에 따라 RNA를 분리하였으며, Fermentas사의 RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit를 사용하여 제작사의 방법에 따라 Complementary DNA (cDNA) 합성하였다. 1  $\mu$ g의 RNA와 1  $\mu$ l의 random primer를 DEPC-처리된 증류수에 12  $\mu$ l 되게 조정한 뒤 65  $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 얼음에 5분간 두었다. 다음 4  $\mu$ l의 5 $\times$  reaction buffer(250 mM Tris-HCL, pH 8.3), 1  $\mu$ l의 RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor(200 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l의 10mM deoxynucleoside triphosphate(dNTP) MIX, 1  $\mu$ l의 RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase(200 U/ $\mu$ l)를 넣어 전체 볼륨을 20  $\mu$ l되게 조정하고 부드럽게 흔들어 주었다. 반응조건은 25  $^{\circ}$ C에서 5분간, 42  $^{\circ}$ C에서 60분간, 70  $^{\circ}$ C에서 5분간으로 하여 반응시켰다. 합성된 cDNA는 -80  $^{\circ}$ C에서 보관하였으며 필요할 때마다 꺼내서 사용하였다. House keeping gene은  $\beta$ -actin을 사용하였으며, target gene으로는 Bcl-2, Bax, p53, p21, caspase-3, caspase-8, caspase-9를 사용하였으며, primer 합성은 Bioneer(대전시 대덕구 문평동, 한국)에서 제작하였다. PCR은 Applied Biosystem사(CA, USA)의 StepOnePlus RT PCR System을 사용하여 제작사의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 10  $\mu$ l의 2 $\times$  SYBR Green PCR Master Mix, 1  $\mu$ l의 cDNA, 1  $\mu$ l의 primer(sense), 1  $\mu$ l의 primer(anti-sense), 7  $\mu$ l의 Distilled water를 넣어 전체 볼륨을 20  $\mu$ l로 조정하였다. PCR 조건은 초기변성(denaturation)은 첫 cycle은 95  $^{\circ}$ C에서 3분간, 나머지 40 cycle까지는 95  $^{\circ}$ C에서 10초, 풀림(annealing)은 60  $^{\circ}$ C에서 10초간, 연장(extension)은 72  $^{\circ}$ C에서 15초간으로 하여 증폭시켰다. 유전자의 발현정도는  $\beta$ -actin을 기준으로 발현된 유전자의 상대적인 값을 정량적으로 표현하였다.

Table 1. Primer Sequences for PCR.

Genes	Primer sequence	Size (bp)	GeneBank
Bcl-2	5'-GAT TGA TGG GAT CGT TGC CTT A-3' 5'-CCT TGG CAT GAG ATG CAG GA-3'	200	NM000657
Bax	5'-GGA TGC GTC CAC CAA GAA G-3' 5'-GCC TTG AGC ACC AGT TTG C-3'	216	NM 138764
P53	5'-AAC AAC ACC AGC TCC TCT CC-3' 5'-CTC ATT CAG CTC TCG GAA CA-3'	111	NM_000546
p21WAF1/CIP1	5'-CAG ACC AGC ATG ACA GAT TTC-3' 5'-TTA GGG CTT CCT CTT GGA GA-3'	66	NM_078467
Caspase-3	5'-CAG TGG AGG CCG ACT TCT TG-3' 5'-TGG CAC AAA GCG ACT GGA T-3'	102	NM_004346
Caspase-8	5'-GGA TGG CCA CTG TGA ATA ACT G-3' 5'-TCG AGG ACA TCG CTC TCT CA-3'	101	NM_001228
Caspase-9	5'-TGT CCT ACT CTA CTT TCC CAG GTT TT-3' 5'-GTG AGC CCA CTG CTC AAA GAT-3'	101	BC002452
$\beta$ -actin	5'-GCG AGA AGA TGA CCC AGA TC-3' 5'-GGA TAG CAC AGC CTG GAT AG-3'	77	NM001101

### 3. 통계분석

모든 수치는 평균±표준편차로 표기하였고, 대조군과 실험군의 차이는 SPSS 통계 프로그램 및 Excel program을 이용하여 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 을 기준으로 평가하였다.

地榆 추출물을 50, 100, 200, 300, 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여하여 24, 48, 72시간까지 배양한 결과 모든 세포주에서 농도 의존적으로 세포증식이 억제되었다.

특히, 地榆 추출물 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 매우 강력한 세포증식 억제 효과를 나타내었는데 이는 地榆 추출물의 고용량으로 인한 세포독성으로 판단된다(Fig. 1).

## III. 결 과

### 1. 地榆 추출물이 담관암세포주 세포증식에 미치는 영향

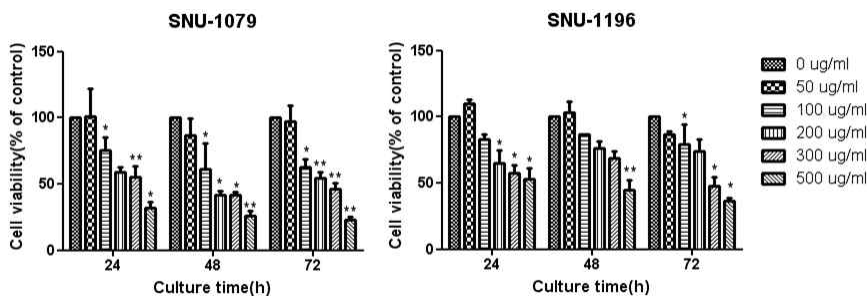


Fig. 1. Effects of JIU concentration on cell viability of cholangiocarcinoma cells.

Cholangiocarcinoma cells were treated with various concentrations of JIU (0-500  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24, 48, and 72 h. Cell viability was determined by the MTT assay. The data represent the Mean  $\pm$  SD of triplicate samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control.

2. 地榆 추출물이 담관암세포주 세포주기에 미치는 영향

SNU-1079 세포주에 地榆 추출물을 100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여하여 세포주기 분석 결과 세포 자멸사 분획은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. G0/G1 분획은 대조군에서 44.59%였던 것에 비해 地榆 추출물을 100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여 후에는 32.25%, 27.31%, 34.58%로 세포 분열

과정을 억제하는 변화를 보였다(Fig. 2).

SNU-1196 세포주에 地榆 추출물을 100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여하여 세포주기 분석 결과 세포자멸사 분획은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. G0/G1 분획은 대조군에서 26.68%였던 것에 비해 地榆 추출물을 100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여 후에는 26.51%, 16.44%, 21.68%로 세포 분열 과정을 억제하는 경향을 나타냈다(Fig. 2).

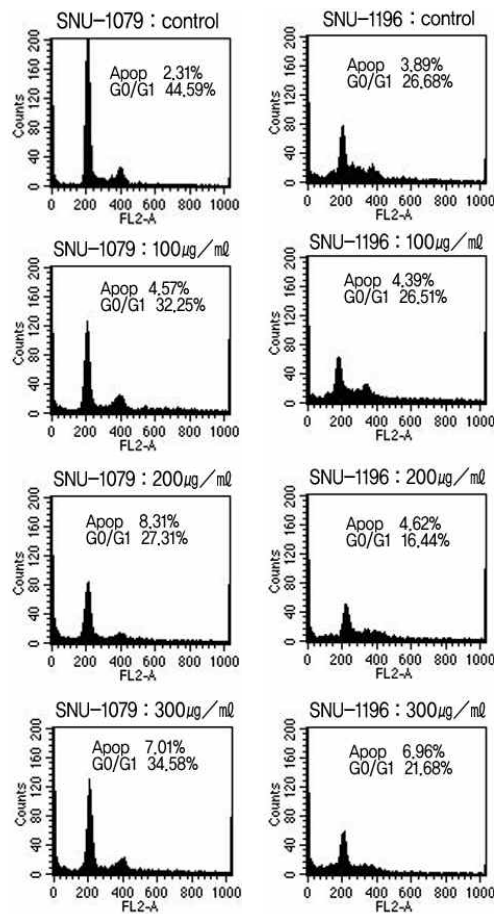


Fig. 2. Effects of JIU concentration on cell cycle progression in cholangiocarcinoma cells.

Cholangiocarcinoma cells were cultured with various concentrations of JIU (0-300  $\mu\text{g/ml}$ ) for 48h. Cells were harvested, treated with RNAsin and stained with propidium iodide. The DNA content was analyzed by flow cytometry. The indicated percentages are of the cells in apoptosis and G0/G1 phases.

3. 地榆 추출물이 담관암세포주 세포자멸에 미치는 영향

100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$  地榆 추출물을 투여한 후 24, 48시간 동안 배양한 결과 각 세포주에서 세포자멸 효과를 측정된 결과 시간 및 농도가 증가함에 따라 세포자멸사 효과도 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

4. 地榆 추출물에 의한 Caspase mRNA 발현의 변화

100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$  地榆 추출물을 투여한 후 각 세포주에서 Caspase 3, 8, 9의 mRNA의 발현을

측정하였다. SNU-1079 세포주에서 Caspase 3의 유전자 발현은 증가하였으며, Caspase 8의 경우 농도 의존적으로 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. Caspase 9의 경우 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 또한, SNU-1196 세포주에서 Caspase 3, 8, 9의 유전자 발현이 모두 농도에 따라 증가하는 경향으로 특히, 300  $\mu\text{g/ml}$  地榆 추출물 투여 시 각각  $2.172 \pm 0.253$ ,  $2.951 \pm 0.775$ ,  $1.246 \pm 0.056$ 로 유의하게 증가한 것으로 측정되었다(Fig. 4).

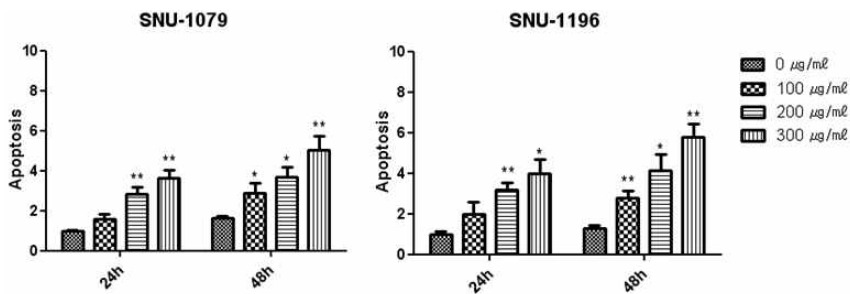


Fig. 3. Effects of JIU concentration on the apoptosis in cholangiocarcinoma cells.

Cholangiocarcinoma cells were cultured with various concentrations of JIU (0-300  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 and 48 h. Apoptotic cells were measured using a cell death detection ELISA. The data represent the Mean  $\pm$  SD of triplicate samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control.

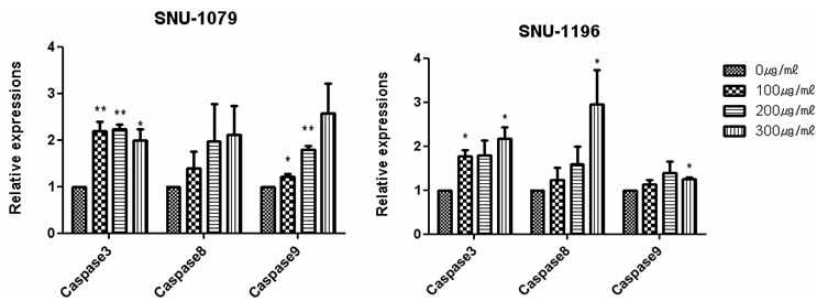


Fig. 4. Effects of JIU Concentration on the Expression of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 mRNA in cholangiocarcinoma cells.

Cells were cultured with 0, 100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$  JIU concentration for 72hours and mRNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 with  $\beta$ -actin was applied to the formula,  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (targetgene- $\beta$  actin), and relative amounts were quantified. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate samples and are reported as the ratio of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 to  $\beta$ -actin signals. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control.

5. 地榆 추출물에 의한 Bcl-2, Bax mRNA 발현의 변화

각 세포주에 100, 200, 300 µg/ml 地榆 추출물을 투여 한 후 Bcl-2, Bax gene mRNA의 발현을 관찰한 결과, Bax mRNA는 SNU-1079, SNU-1196 모두에서 농도 의존적으로 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. Bcl-2는 SNU-1079에서는 농도에 따라 유전자 발현의 차이가 없었으나 SNU-1196에서는 농도에

따라 유의하게 유전자 발현이 감소하였다(Fig. 5).

6. 地榆 추출물에 의한 p53, p21 mRNA 발현의 변화

각 세포주에 100, 200, 300 µg/ml 地榆 추출물을 투여 한 후 p53, p21의 발현을 관찰한 결과 p53, p21 모두 각각의 세포주에서 유의하게 발현이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

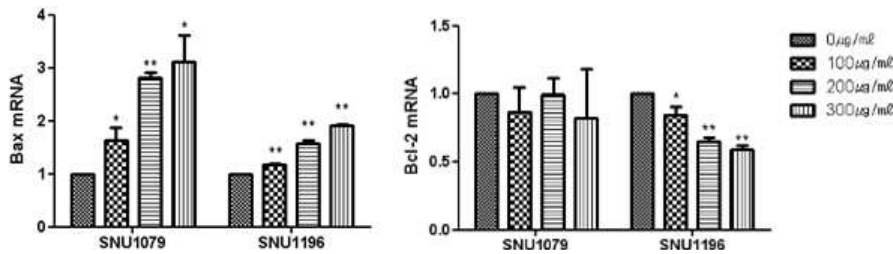


Fig. 5. Effects of JIU concentration on the expression of pro- and anti-apoptotic mRNAs in cholangiocarcinoma cells.

Cells were cultured with 0, 100, 200, 300 µg/ml JIU concentration for 72hours and mRNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of Bcl-2, Bax with β-actin was applied to the formula, 2<sup>-</sup>(targetgene-β actin), and relative amounts were quantified. The data represent the mean ± SD of triplicate samples. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared to control.

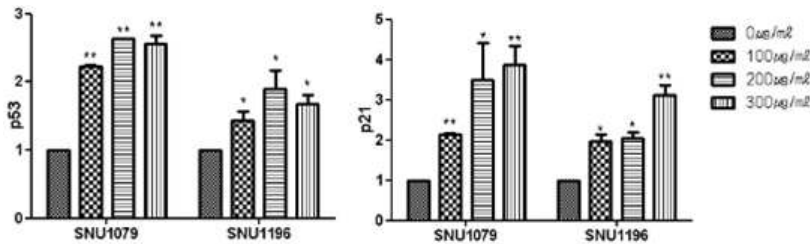


Fig. 6. Effects of JIU concentration on the expression of p53 and p21 in cholangiocarcinoma cells.

Cells were cultured with 0, 100, 200, 300 µg/ml JIU concentration for 72hours and mRNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of p53, p21 with β-actin was applied to the formula, 2<sup>-</sup>(targetgene-β actin), and relative amounts were quantified. The data represent the mean ± SD of three independent samples. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared to control.

IV. 고찰

간내 담관암은 간세포암에 이어 두 번째로 흔한 원발성 간내 악성 종양으로 최근 발생률이 증가하

고 있는 추세이다. 그러나 간의 담도암에 비해서 증상 발현이 늦고 고위험군이 확실하게 밝혀져 있지 않아 선별검사를 통한 조기 진단이 어렵기 때문에 5년 생존율이 20% 미만으로 예후가 매우 불

량하다<sup>14,15</sup>. 진단 당시 수술적 절제가 가능한 환자는 많지 않지만 절제 가능한 환자의 1년 생존율은 약 50~70%이고, 5년 생존율은 10~30%로 보고되며 절제가 불가능한 환자는 대개 2년 내에 사망하는 것으로 알려져 있다<sup>16</sup>. 절제술이 어려운 경우 항암화학요법과 방사선치료, 표적치료, 광역자치료 등의 적극적인 보존적 치료로 삶의 질 향상 및 생존기간 연장을 도모하나 그 결과는 만족스럽지 않다. 또, 수술 후 보조화학요법은 생존기간의 연장 효과가 없는 것으로 보고되고 있고<sup>5</sup>, 방사선치료는 절제연에 암세포가 남아있는 불완전 절제가 된 경우에 한하여 효과가 일부 인정되고 있다<sup>6</sup>. 담관암의 항암치료 효과에 대한 연구 발표는 드물며, 수술과 비교하여 비수술적 치료가 환자의 생존 향상에 얼마나 영향을 미치는지 분명하지 않다.

최근 담관암에 대한 연구도 분자생물학적 수준에서 발생 기전을 이해하려는 연구가 진행되고 있다. 유전자 손상과 지속적인 성장 자극이 축적되어 담관 상피세포의 악성세포로의 전환이 진행되며 이런 악성세포는 성장 억제 신호를 차단하고 세포자멸사 회피, 무제한 복제, 지속적인 혈관 신생 등의 특징을 지니면서 결국 전이의 능력을 가지게 된다<sup>17</sup>. 즉, 담관암의 분자생물학적 발병 기전은 대부분 만성적인 담즙 정체와 염증 상황에서 비롯된다는 것이 밝혀졌다. 또한, 이러한 연구 결과를 토대로 Cyclooxygenase-2 억제제인 celecoxib, EGFR(표피성장인자 수용체) 억제제인 cetuximab, Raf kinase 억제제인 sorafenib과 peroxisome proliferatoractivated receptor gamma 배위자 등 다양한 분자 표적 치료제들이 현재 연구 중이다<sup>18,19</sup>.

한의학에서는 각종 한약재와 처방을 대상으로 세포독성, 세포분화, 종양면역, 세포자멸, 혈관신생 및 신호전달체계 등의 연구를 통해 항암효과를 규명하고 있으며 항암약물간의 상승작용 및 항암제와 방사선 치료의 부작용 감소에 대한 효과에 대한 연구 등이 보고되고 있다<sup>20-22</sup>. 하지만, 보존적 치료의 저조한 치료율과 더불어 대상 환자의 희소

성과 진단 당시 환자의 전신 상태가 좋지 않아 종양 반응 평가가 쉽지 않아 담관암에 대한 한의학 적 치료연구 자료는 매우 부족한 실정이다<sup>23-26</sup>.

이에 저자는 피부암, 유선암, 폐암세포에 대해 항암 효과가 보고된<sup>10</sup> 地榆 추출물이 담관암세포주의 세포 활성화와 증식능 및 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay, cell cycle analysis, apoptosis assay, 및 RT-PCR을 시행하였다.

본 연구에서는 地榆의 에탄올 추출물이 담관암세포주의 세포 활성화도에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 실험 시 地榆 추출물의 처리 농도는 50, 100, 200, 300, 500 µg/ml로, 배양 시간은 24시간, 48시간, 72시간으로 하였다. 실험결과 모든 세포주에서 농도 의존적으로 세포 증식이 억제되었다. 그러나 500 µg/ml의 경우 地榆 추출물의 고용량으로 인해 세포 독성을 나타낸 것으로 판단되어 cell cycle analysis, apoptosis assay, 및 RT-PCR의 경우 제외하였다.

Cell cycle analysis를 통해 地榆추출물은 담관암세포주 세포 순환의 자멸단계를 증가시켰고, 세포의 죽음을 증가시켰다는 것을 확인했으며, 이러한 결과들은 地榆 추출물이 G1 phase에서 담관암세포주에 대해 세포 증식을 억제하고 세포주기의 진행을 막는 것을 확인하였다.

담관암세포주의 세포자멸을 밝히기 위해 ELISA kit를 이용하여 세포자멸 효과를 측정 한 결과 시간 및 농도가 증가함에 따라 세포자멸사 효과도 유의하게 증가하였다.

세포자멸사 경로에는 크게 세포막의 death receptor와 caspase 8의 활성화가 관여하는 외인성 경로와 미토콘드리아와 caspase 3, caspase 9 활성화가 관여하는 내인성 경로가 있다<sup>27</sup>. 본 연구에서는 SNU-1079, SNU-1196 세포주 모두 caspase 3, 8, 9의 유전자 발현이 유의하게 증가한 것으로 보아 地榆 추출물이 담관암세포주의 apoptosis를 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

다양한 연구에서 여러 암세포주에서 pro-apoptotic



Bax 단백질의 발현증가와 anti-apoptotic Bcl-2의 발현감소를 보고 했다. Bcl-2 단백질은 담도계 중 bile ductule이나 interlobar bile duct에서만 발현된다고 알려져 있으며 Bax 단백질의 경우는 large intrahepatic bile duct까지 포함한 담관 전체에서 나타난다는 보고가 있다<sup>28</sup>. 특히, Bcl-2 단백질은 담관상피세포의 세포자멸사와 재생간의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>29</sup>, 대부분의 담관암에서 Bcl-2 유전자 mRNA가 과발현되는 것으로 알려져 있다<sup>30</sup>. 본 연구에서 RT-PCR을 통해 각 세포주에 100, 200, 300 µg/ml 地榆 추출물을 투여 한 후 Bcl-2, Bax gene mRNA의 발현을 관찰한 결과, Bcl-2는 SNU-1196 세포주에서 유의하게 발현이 감소하였으며, Bax mRNA는 SNU-1079, SNU-1196 모두에서 유의하게 발현이 증가하였다. 이 결과는 감소된 Bcl-2 발현과 증가된 Bax 발현이 地榆 추출물이 담관암세포주에 대한 세포자멸사 유도에 관여할 것이라는 가능성을 제시하며, 地榆 추출물에 대한 항암 효과는 세포마다 차이가 있을 수 있다는 것을 시사한다.

p53은 세포 주기의 조절, DNA 수복 그리고 세포자멸 등에 중요한 역할을 하며, p21은 세포 주기를 조절하는 cyclin- 의존성 키나아제를 억제하는 단백질로 DNA 손상 시 세포주기의 G1에서 S 시기로 가는 것을 차단함으로써 증식 억제 작용을 하여 종양의 발달을 차단하는 역할을 주로 한다. 본 연구에서 p53, p21의 발현이 두 세포주 모두 유의하게 발현이 증가하였다. 이 결과로 地榆 추출물이 p53, p21의 발현을 증가시켜 담관암세포주의 세포증식 억제에 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

이는 地榆 추출물의 피부암, 유선암, 폐암세포에 대한 항암효과를 보고한 연구<sup>10</sup>와 더불어 추가적으로 세포자멸유도를 통해 담관암세포주의 증식을 막고, apoptosis와 관련된 유전자 발현을 조절하여 농도 의존적으로 유의하게 세포자멸을 증가시켰다.

하지만, 담관암세포주에 대한 지유 추출물의 항암 효과 및 작용기전에 대해 설명하기 위하여 추

가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 2001;33:1353-7.
2. Davila JA, El-serag HB. Cholangiocarcinoma: the "other" liver cancer on the rise. *Am J Gastroenterol* 2002;97:3199-200.
3. 보건복지부 홈페이지:2012.[2012.06.27.검색]. Available at: [http://kosis.kr/gen\\_etl/start.jsp?orgId=117&tblId=DT\\_117N\\_A0024&conn\\_path=I2&path=중앙행정기관-보건복지부-암등록통계-61개암종/성/연령\(5세\)별암발생자수](http://kosis.kr/gen_etl/start.jsp?orgId=117&tblId=DT_117N_A0024&conn_path=I2&path=중앙행정기관-보건복지부-암등록통계-61개암종/성/연령(5세)별암발생자수).
4. Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M. Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World J Gastroenterol* 2009;15:4240-62.
5. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2005;16 Suppl 2:ii93-6.
6. Itoh H, Nishijima K, Kurosaka Y, Takegawa S, Kiriya M, Dohba S, et al. Magnitude of combination therapy of radical resection and external beam radiotherapy for patients with carcinomas of the extrahepatic bile duct and gallbladder. *Dig Dis Sci* 2005 Dec;50(12):2231-42.
7. Gruenberger B, Schueller J, Tamandl D, Kaczirek K, Scherthaner G, Gruenberger T. K-ras status and response in patients with advanced or metastatic cholangiocarcinoma treated with cetuximab plus gemcitabine-oxaliplatin (GEMOX): a single center phase II study. *J Clin Oncol* 2009;27(Suppl 15):4586. [Abstract].
8. 전국한 의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울: 영림사; 2004. p. 437-8.
9. 안봉전, 이진태, 이순애, 곽재훈, 박정미, 이진영.

- 등. 한국산 地榆의 항산화 효과 및 천연소재로서의 활용방안. 한국응용생명화학회지 2004;47(2):244-50.
10. 안봉전, 이순애, 손준호, 곽재훈, 박정미, 이진영. 地榆의 항암 및 항균 효과. 한국응용생명화학회지 2004;47(1):141-5.
  11. 이소영, 정성현. 地榆의 항 불안 활성. 대한약학회지 1994;38(6):733-41.
  12. 이재준, 최현숙, 이정화, 정창주, 이명렬. 地榆가 흰쥐의 급성위염 및 소화성 궤양에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 2005;34(10):1545-52.
  13. 지형준 외. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998.
  14. Hammill CW, Wong LL. Intrahepatic cholangiocarcinoma: a malignancy of increasing importance. *J Am Coll Surg* 2008;207:594-603.
  15. Nathan H, Pawlik TM, Wolfgang CL, Choti MA, Cameron JL, Schulick RD. Trends in survival after surgery for cholangiocarcinoma: a 30-year population-based SEER database analysis. *J Gastrointest Surg* 2007;11:1488-96.
  16. Song GW, Lee SG, Lee YJ, Park KM, Hwang S, Kim KH, et al. Analysis of survival and factors affecting the survival after surgical resection of peripheral cholangiocarcinoma: 318 case in single institute. *Korean J Hepatol* 2007;13:208-21.
  17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
  18. Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 2005;41:5-15.
  19. Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* 2008;48:308-21.
  20. 김동우, 이종훈, 유화승, 조정효, 이연일, 손창규, 등. 천화분 추출물이 혈관신생 및 암세포 성장에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(2):490-9.
  21. 박병록, 박재우, 조종관, 유화승, 이연일. 한방치료를 통해 Adriamycin/Cytoxan 및 Taxol 항암제 부작용이 감소한 유방암 환자 증례보고. 대한한방내과학회지 2011;32(3):451-7.
  22. 문근아, 송낙근, 박성진, 윤유식. 가미홍화탕의 방사선 부작용 억제 효능 연구. 한국한의학연구원논문집 2003;9(2):107-19.
  23. 서영광, 김은희, 김달래, 고병희, 전성하, 어완규, 등. 폐 전이된 담낭암 환자를 사상의학적 관리를 통해 제반 증상과 삶의 질을 개선시킨 1례. 사상체질의학회지 2007;19(2):187-94.
  24. 김경순, 유화승, 정태영, 이연일, 조종관. 항암단투여로 호전된 진행성 또는 전이성 담낭암 연속환자증례. 대한한방내과학회지 2010;31(3):667-74.
  25. 송창훈, 이슬희, 김정철, 오성원, 정종진, 황진우, 등. 원위부 담도암 환자 증례 보고. 대한한방내과학회지 2006;27(3):770-5.
  26. 서상훈, 유화승, 이용연, 송기철, 최병렬, 조정효, 등. 췌장전이를 동반한 담도암 환자 1례에 대한 보고. 대한한방내과학회지 2002;23(4):735-40.
  27. 정성훈, 김병호, 김영일, 심재준, 황보영, 장재영, 등. 담관암세포주에서 내인성 peroxisome proliferator-activated receptor gamma 배위자인 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2의 항암 효과. 대한내과학회지 2010;78(1):75-86.
  28. Iwata M, Harada K, Kono N, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y. Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 2000;31:179-84.
  29. Harada K, Iwata M, Kono N, Koda W, Shimonishi T, Nakanuma Y. Distribution of apoptotic cells and expression of apoptosis-related proteins along the intrahepatic biliary tree in normal and non-biliary diseased liver.

*Histopathology* 2000;37:347-54.  
30. Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Monden  
M, Yamada T, et al. Bcl-2 expression in

cholangiocarcinoma is inversely correlated with  
biologically aggressive phenotypes. *Oncology*  
2000;59:63-7.