

## 수종 한약 복합물의 역형성갑상선암세포 SNU-80에 대한 항암효과

여현수, 이민혜, 최유경, 전찬용, 박종형  
가천대학교 한의과대학 내과학교실

### Antineoplastic Effect of Several Herbal Medicine Mixtures on SNU-80 Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Line

Hyun-soo Yeo, Min-hye Lee, You-kyung Choi, Chan-young Jun, Jong-hyeong Park  
Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Ga-Chon University

#### ABSTRACT

**Objectives:** The purpose of this study was to investigate the antineoplastic effect of several herbal medicine mixtures (compositions of *Astragalus membranaceus*, *Angelica gigas*, *Trichosanthes kirilowii*, *Panax ginseng*, *Rhus verniciflua Stokes*) on the SNU-80 anaplastic thyroid carcinoma cell line.

**Methods:** MTT assay was used to examine whether our herbal medicine mixtures decreased cell growth rate of SNU-80. Wound healing assay and Transwell invasion assay was performed to investigate whether our herbal medicine mixtures affect the migration and invasion of anaplastic cancer cells, SNU-80. ELISA assay was performed to know if our herbal medicine mixtures suppressed the expression of pro-invasive molecules, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) secreted from SNU-80.

**Results:** MTT assay demonstrated that *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*=1:1:1 or 3:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*=1:1:1:1 or 3:1:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*:*R. verniciflua Stokes*=1:1:1:1:1 or 3:1:1:1:1 strongly suppressed the growth of SNU-80. Wound healing assay demonstrated that *A. membranaceus*:*A. gigas*=3:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*=1:1:1 or 3:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*=1:1:1:1 or 3:1:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*:*R. verniciflua Stokes*=1:1:1:1:1 or 3:1:1:1:1 inhibited the migration of SNU-80. Transwell invasion assay demonstrated that *A. membranaceus*:*A. gigas*=1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*=1:1:1 or 3:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*=1:1:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*:*R. verniciflua Stokes*=1:1:1:1:1 or 3:1:1:1:1 inhibited the invasion of SNU-80. ELISA assay demonstrated that *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*=1:1:1 or 3:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*:*R. verniciflua Stokes*=1:1:1:1:1 suppressed the expression of VEGF. Also, *A. membranaceus*:*A. gigas*=1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*=1:1:1 or 3:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*=1:1:1:1 or 3:1:1:1, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*:*P. ginseng*:*R. verniciflua Stokes*=1:1:1:1:1 or 3:1:1:1:1 suppressed the expression of MMP-2.

**Conclusions:** The results obtained in this study suggest that several herbal medicine mixtures suppress the growth and inhibit the migration and invasion of SNU-80, which is anaplastic thyroid cancer cells. Especially, *A. membranaceus*:*A. gigas*:*T. kirilowii*=1:1:1 mixture had a stronger anti-cancer effect.

**Key words:** several herbal medicine mixtures, antineoplastic effect, SNU-80, anaplastic thyroid cancer cells

## 1. 서론

· 교신저자: 박종형 인천시 남동구 구월1동 1200-1번지  
가천대학교부속 한방병원  
TEL: 032-468-0330 FAX: 032-468-4033  
E-mail: sdragon@gachon.ac.kr

한의학에서의 암치료는 크게 扶正法과 祛邪法의 방법을 활용하고 있다<sup>1,2</sup>. '扶正法'은 正氣를 돕는

약을 써서 邪氣로 하여금 저절로 소멸되게 하는 것이며, '祛邪法'은 邪氣를 제거하는 약을 쓰는 것이고, 양자를 적절히 운용하는 것이 '扶正祛邪法'이다<sup>3,4</sup>. 특히 전신 쇠약감, 식욕부진은 통증, 오심, 구토 등과 더불어 진행성 암환자에게서 흔히 동반되는 증상이지만, 현재의 암치료 방법으로는 전신 쇠약감 개선이 어려운 실정이므로<sup>5,6</sup> 正氣를 돕는 한의학의 '扶正法'의 역할은 향후 암치료에 있어 직접적인 주요 치료제의 제공뿐만 아니라 보조적인 치료법으로써도 기대할 수 있는 부분이라 할 수 있다.

현대적 연구에서는 각각의 치료법에 활용될 수 있는 한약에 대하여 다양한 항암 효과를 보고하고 있다. 扶正法의 관점에서 실행된 기존의 실험연구를 살펴보면, 김 등<sup>7</sup>이 '당귀보혈탕의 배합비율에 따른 대장암 세포주 HCT116 세포사멸 효과'에서 황기와 당귀 복합물을 이용하여 대장암에 대한 항암작용을 보고한 것이 있으며, 인삼의 경우 항암효과에 대한 보고가 다수 존재한다<sup>8,9</sup>. 또한 祛邪法에 활용할 수 있는 본초인 계혈등, 시호, 황금 등 다수의 한약재들이 암세포의 세포사멸, 염증조절, 분화과정조절(분화치료요법) 등에 효과가 있음이 보고되어 있다<sup>10</sup>. 그 중 천화분, 철피는 자궁경부암세포, 폐암세포 등에서의 항암효과가 보고되고 있어<sup>11-13</sup>, 항암작용으로 주목받고 있는 약재이다.

본 저자들은 선행연구에서 역형성감상선암세포를 대상으로 황기, 당귀, 철피, 천화분 각각의 항암효과를 보고한 바가 있다<sup>14</sup>. 祛邪法의 관점에서 선택한 철피, 천화분은 역형성감상선암세포 SNU-80

의 생존율을 감소시키고, 침윤이나 전이를 저해하는 높은 항암효과를 보였으며, 扶正法의 관점에서 선택한 황기, 당귀의 경우 암세포의 침윤 및 혈관생성에 관여하는 인자들(VEGF, MMP-2)의 발현에서는 유효한 효과를 나타내었으나 철피, 천화분에 비하여 암세포의 생존율 감소 효과나 침윤, 전이를 저해하는 효과가 미미하였다. 이렇게 황기와 당귀의 항암효과가 비교적 뚜렷하지 않았음에도 불구하고 임상에서 한방에 요구되는 扶正法의 필요성을 고려하고, 身體虛弱者, 脾胃虛寒者에게는 禁忌해야하는 철피와 천화분을 임상에서 활용할 경우 이를 보완하기 위한 근거마련의 일환으로써 각각의 항암효과 선행연구결과를 바탕으로 扶正法과 祛邪法 양자를 운용한 연구를 진행하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 황기와 당귀 복합물을 기반으로 하여 그 구성 비율을 달리 하고 천화분, 철피, 인삼 등을 추가한 다양한 조합의 한약 복합물이 역형성감상선암세포에 미치는 영향과 그 기전을 알아보았다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 한약은 (주) 한풍제약(Jeonjoo, Korea)에서 조제되어 본 연구실로 배송되었다. 배송된 한약 분말을 30% 에탄올에 녹여 사용하였다. 한약 복합물의 조성 내용은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Herbal Medicine Mixtures

Composition	
A	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> =1:1
B	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> =3:1
C	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> : <i>Trichosanthes kirilowii</i> =1:1:1
D	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> : <i>Trichosanthes kirilowii</i> =3:1:1
E	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> : <i>Trichosanthes kirilowii</i> : <i>Panax ginseng</i> =1:1:1:1
F	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> : <i>Trichosanthes kirilowii</i> : <i>Panax ginseng</i> =3:1:1:1
G	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> : <i>Trichosanthes kirilowii</i> : <i>Panax ginseng</i> : <i>Rhus verniciflua Stokes</i> =1:1:1:1:1
H	<i>Astragalus membranaceus</i> : <i>Angelica gigas</i> : <i>Trichosanthes kirilowii</i> : <i>Panax ginseng</i> : <i>Rhus verniciflua Stokes</i> =3:1:1:1:1

## 2) 기기 및 시약

세포실험에 사용된 plastic 제품 96-well culture plate, 24-well culture plate, 100mm culture plate는 Daellab service Co. Ltd(Seoul, Korea)에서 구입하였다. MTT 시약은 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. NaCl, KCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 는 Sigma(USA)제품을 사용하였고, Tween 20은 BIO-RAD(USA) 제품을 사용하였다. Human VEGF, MMP-2 ELISA set는 R&D system(USA)에서 구입하였다.

## 3) 세포주

SNU-80 human thyroid cancer cells은 한국 서울대학교 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다. 세포 배양에 사용된 배지는 10% FBS(Welgene, Daegu, Korea)와 Antibiotic-antimycotic(Welgene, Daegu, Korea)이 포함된 RPMI 배지(Welgene, Daegu, Korea)를 사용하였으며 3일 1회 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체 성분을 불활성화 시키기 위하여 실온에서 녹인 후 heat inactivation( $56^\circ\text{C}$  water bath에 30분간 가열)하여 사용하였다.

세포를 회수할 때에는 trypsin-EDTA 1 mL를 가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 1분 동안 반응시켜 세포를 분리하고 배지 4 mL를 넣고 원심분리(1,200 rpm, 2분)하여 세척 후 실험에 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) MTT assay

SNU-80 cells을 well 당 3,000개가 되도록 96-well culture plate에 심어주고 overnight 배양하였다. 세포가 monolayer form을 형성한 후 각 복합물을 농도 별로(0~500 ug/mL) 처리하였다. 72시간 후 MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) 0.5 mg/mL를 well 당 10 uL씩 분주하여 넣었다.  $37^\circ\text{C}$  incubator에서 2시간 동안 반응시켜 media를 제거하고 DMSO를 100 uL 넣어서 blue formazan crystal이 녹게 하였다. ELISA Reader(Merck Co., Germany)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2) Wound healing assay

SNU-80 cells을 한 well 당 350,000개가 되도록 6-well culture plate에 심어주고 overnight 배양하였다. 세포가 monolayer form을 형성하고 80~90%로 꽉 찼을 때, 노란색 pipette tip을 십자로 세포 위로 긁어서 세포간 간격이 생기게 하였다. PBS로 세포를 씻어낸 후 각 한약을 세포사멸(apoptosis)을 일으키지 않을 농도로(50 ug/mL) 처리하였다. 24시간 후 세포간 간격이 좁혀진 정도를 control에 비교하여 사진을 찍었다(40× magnification).

### 3) Invasion assay

Matrigel(BD matrigel Matrix)을  $4^\circ\text{C}$  overnight 으로 녹인 후 24-well plate에 Falcon cell culture insert(8  $\mu\text{m}$  pore size)를 끼우고 matrigel을 50~60 uL 수직으로 insert에 떨어뜨렸다. 24-well을 sealing하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight 하였다. 다음날, 한 well에 10,000~20,000개 정도(100 uL)세포를 1% FBS가 든 media에 넣어 matrigel 위에 깔고, 5분간  $37^\circ\text{C}$ 에서 matrigel을 incubation 하였다. 아래의 well에 10% FBS가 든 media를 500 uL 씩 넣었다. 위의 insert를 다시 끼운 후 1% FBS로 만든 각 한약을 세포사멸을 일으키지 않을 농도로(50 ug/mL) matrigel 위에 처리하였다. 24시간 후 PBS나 물로 insert를 두 번 씻어냈다. 그 다음 4% paraformaldehyde를 500 uL 씩 well에 넣고 200 uL씩 insert에 넣고 sealing하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight 하였다. 다음날 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였다.

### 4) ELISA assay

세포를 한 100  $\text{mm}$  dish 당  $1 \times 10^6$ 개를 깔고 그 다음날 각 한약을 약물효과를 극대로 보기 위한 농도로(500 ug/mL) 처리하였다. 24시간 후 원심분리기를 이용하여 1,000 rpm에 5분간 원심 분리하여 배양액만을 걷어 분석 전까지 냉동 보관하였다. 이후 Sandwich ELISA 용 96-well plate에 human VEGF와 MMP-2의 capture antibody를 코팅시켰다. Overnight 후 0.05%의 Tween-20 PBS로 plate를 3회 씻어준 후 1% BSA의 PBS를 이용하여 1시간 동안 blocking

시켜주었다. 다시 3회 씻어준 다음 standard protein 과 적당히 희석시킨 세포 배양액을 각 well에 넣어 주었다. 2시간 반응 후 plate를 씻어준 후에 human VEGF 와 MMP-2의 detection antibody 용액을 넣고 2시간 동안 반응시켜 주었다. 다시 씻어준 후 TMB substrate solution(BD bioscience, USA)를 넣어준 다음 어두운 곳에서 반응시키면서 발색을 확인하고 적당히 발색되었을 때에 2N의 황산을 넣어 반응을 중지시켰다. 반응을 중지시킨 후 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 VEGF와 MMP-2의 농도를 확인하였다.

5) 통계 처리

실험결과에 대한 모든 분석은 Win PC-SPSS(VER. 8.5) 프로그램을 사용하였다. 기술 통계학적 분석은 각 group의 측정값을 Mean(평균)±S.E(표준오차)로 요약하였고, Student t-test method로 분석하여 p<0.05 level에서 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. SNU-80의 세포 생존율(MTT assay)

황기(*Astragalus membranaceus*), 당귀(*Angelica gigas*), 천화분(*Trichosanthes kirilowii*), 인삼(*Panax ginseng*), 칠피(*Rhus verniciflua Stokes*) 복합물의 구성 비율에 따른 역형성갑상선암세포(human anaplastic thyroid cancer cells) SNU-80 세포주에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 관찰한 결과, 복합물 A와 B에서는 세포 생존율의 감소가 거의 일어나지 않았다. 복합물 C와 D는 농도에 따라(dose-dependent) 점차 생존율을 감소시켰다. 복합물 E와 F는 특히 높은 농도에서 세포 생존율을 감소시켰다. 복합물 G는 낮은 농도에서부터 높은 농도까지 급격히 세포생존율을 감소시켰고, 복합물 H는 완만하게 세포생존율을 감소시켰다(Fig. 1).

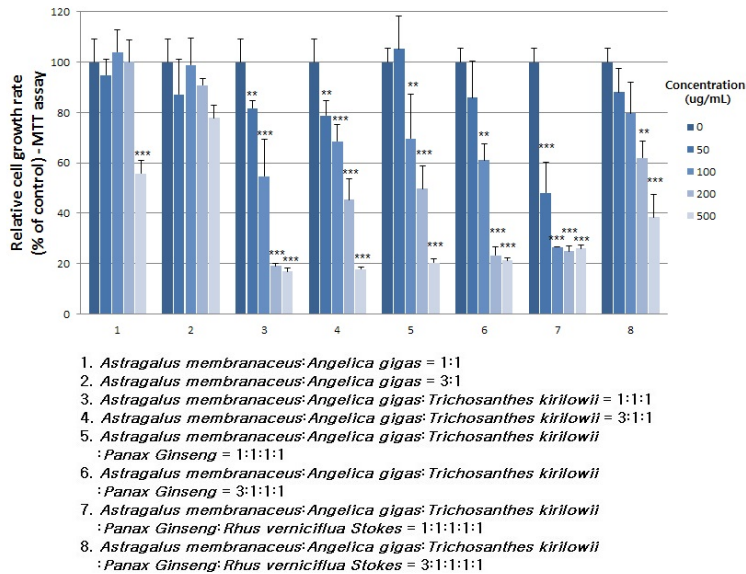


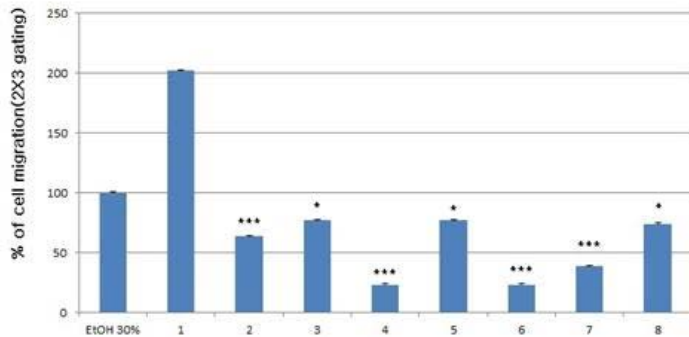
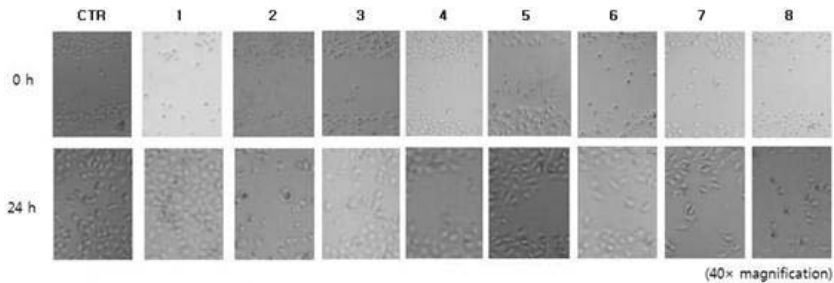
Fig. 1. Effect of several herbal medicine mixtures on the growth of SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2. 상처치유분석(Wound healing assay)

수종 한약이 역형성갑상선암세포 SNU-80 세포 주의 전이에 미치는 영향을 관찰한 결과, 복합물 A 는 전이율의 감소가 일어나지 않았으나 복합물 B, C, D, E, F, G, H는 세포 전이율의 감소가 일어났다(Fig. 2).

3. 암의 침윤정도 (Transwell invasion assay)

수종 한약이 역형성갑상선암세포인 SNU-80 세포 주의 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위하여 transwell invasion assay 방법으로 세포의 침윤율을 관찰한 결과, 복합물 B, F는 침윤율의 감소가 일어나지 않았으나 복합물 A, C, D, E, G, H는 세포 침윤율의 감소가 일어났다(Fig. 3).



1. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas* = 1:1
2. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas* = 3:1
3. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas*:*Trichosanthes kirilowii* = 1:1:1
4. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas*:*Trichosanthes kirilowii* = 3:1:1
5. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas*:*Trichosanthes kirilowii*  
:*Panax Ginseng* = 1:1:1:1
6. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas*:*Trichosanthes kirilowii*  
:*Panax Ginseng* = 3:1:1:1
7. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas*:*Trichosanthes kirilowii*  
:*Panax Ginseng*:*Rhus verniciflua* Stokes = 1:1:1:1:1
8. *Astragalus membranaceus*:*Angelica gigas*:*Trichosanthes kirilowii*  
:*Panax Ginseng*:*Rhus verniciflua* Stokes = 3:1:1:1:1

Fig. 2. Effect of several herbal medicines on the migration of SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

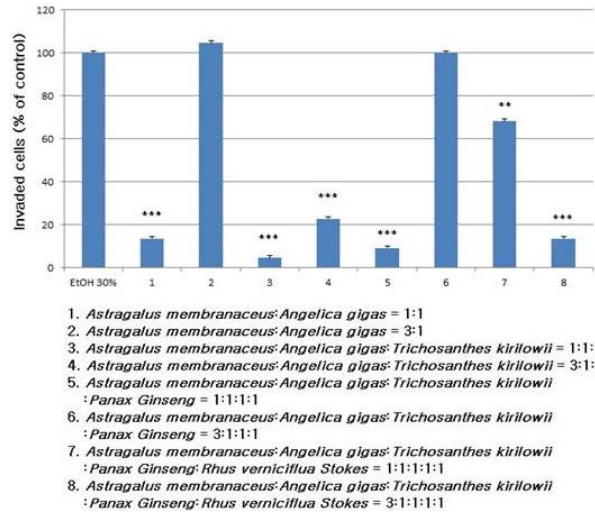


Fig. 3. Effect of several herbal medicines on the invasion of SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

4. 암의 침윤(invasion) 및 혈관생성(angiogenesis)에 관여하는 인자들(VEGF, MMP-2)의 발현정도 측정(ELISA assay)  
수중 한약이 SNU-80 세포에서 분비되는 VEGF (Vascular endothelial growth factor)나 MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)의 발현을 어떻게 조절하는지를 관찰한 결과, control(EtOH 30%)에 비교

했을 때 복합물 A와 B는 VEGF의 발현을 억제하지 못하였으나, 복합물 C는 VEGF의 발현을 강하게 억제하였다. 복합물 D와 G도 VEGF의 발현을 억제하였다(Fig. 4).

MMP-2의 경우, 복합물 B를 제외하고 복합물 A, C, D, E, F, G, H 모두에서 감소되었다(Fig. 5).

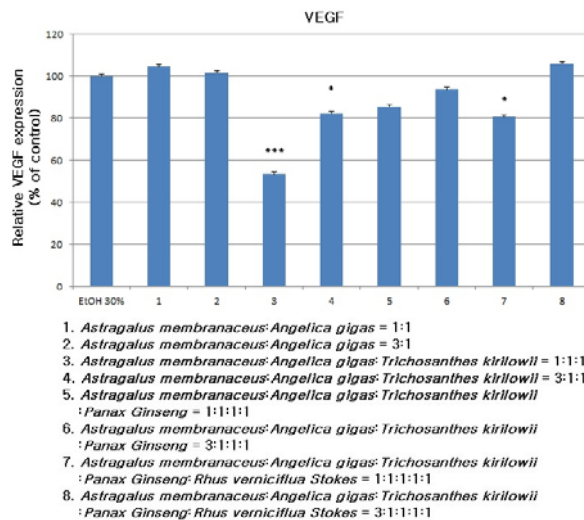


Fig. 4. Effect of several herbal medicines on the expression of VEGF in SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

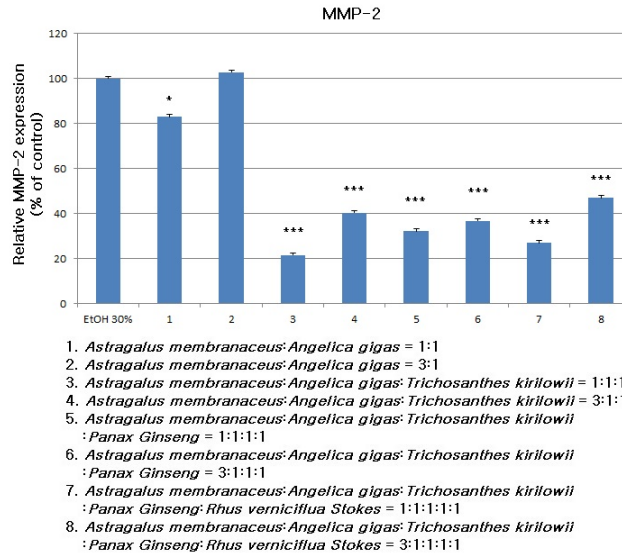


Fig. 5. Effect of several herbal medicines on the expression of MMP-2 in SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### IV. 고찰

갑상선암은 갑상선유두암종과 갑상선여포암종과 같은 분화종양들은 완치되는 경우가 흔하며 예후가 아주 좋은 편이지만<sup>15</sup>, 역형성암은 드물게 발생하며 악성도가 높은 미분화암으로 침습적이고 예후가 극히 좋지 않다<sup>16</sup>. 역형성갑상선암은 방사성 요오드 치료, 항암화학요법 등에 일반적으로 반응하지 않으며<sup>15</sup>, 여타 치료법에 대한 연구도 미비한 실정이다<sup>17</sup>.

한의학적으로 갑상선암은 瘰癧의 개념으로 설명할 수 있는데, 石瘰·肉瘰·筋瘰·血瘰·氣瘰의 五瘰 중 石瘰과 가장 유사하다. 《備急千金要方》에서 石瘰은 대부분 氣鬱·濕痰 및 瘀血이 凝滯되어 야기되며, 頸部の 腫塊가 울퉁불퉁하고 단단하며 고정되어 있고, 쉽게 화를 내며 땀을 많이 흘리고 胸悶·心悸 증상이 수반된다 하였다<sup>18,19</sup>.

한의학에서의 암치료는 인체 抗病 능력을 증진시키는 扶正培本法과 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 적절히 배합시켜 활용하는 扶正祛邪法을 응용하고 있다<sup>20-23</sup>. 본 연구에서

는 扶正法으로 접근한 황기, 당귀 및 祛邪法으로 접근한 蟅蟲, 天胡粉을 이용한 선행연구<sup>14</sup>를 바탕으로, 扶正祛邪法에 주목하여 황기, 당귀, 蟅蟲, 天胡粉, 인삼의 다양한 조합으로 역형성갑상선암세포에 대한 효과의 강약을 알아보려고 하였다.

黃芪(*Astragali Radix*)는 性은 溫하고 味는 甘하며, 生用하면 益衛固表, 利水消腫, 托毒, 生肌의 효능이 있어 自汗, 盜汗, 血痺, 浮腫, 癰疽不潰, 潰久不斂을 치료하며, 炙用하면 補中益氣의 효능이 있어 內傷勞倦, 脾虛泄瀉, 脫肛, 氣虛血脫, 崩帶, 一切氣衰血虛之證을 치료한다<sup>24,25</sup>. 當歸(*Angelicae Gigantis Radix*)는 性은 溫하고 味는 甘辛하며, 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능이 있어 月經不調, 經閉腹痛, 癥瘕結聚, 崩漏, 血虛頭痛, 眩暈, 痿痺, 腸燥便難, 癰疽瘡瘍, 跌打損傷을 치료한다<sup>24,25</sup>. 人蔘(*Ginseng Radix*)는 性은 微溫하고 味는 甘微苦하며, 大補元氣, 固脫生津, 安神之 효능이 있어 勞傷虛損, 食少, 倦怠, 反胃吐食, 大便滑泄, 虛咳喘促, 自汗暴脫, 驚悸, 健忘, 眩暈頭痛, 陽痿, 頻尿, 消渴, 婦女崩漏, 小兒慢驚, 久虛不復, 一切氣血津液不足을 치료한다<sup>24</sup>. 天花粉(*Trichosanthes*

*Radix*)은性は微寒하고味는甘微苦酸하며,生津止渴,消腫排膿의효능이있어熱病煩渴,肺熱燥咳,內熱消渴,瘡瘍腫毒을치료하나脾胃虛寒者와大便滑泄者는복용을忌한다<sup>24,25</sup>.漆皮(*Rhus verniciflua Stokes*)는性は溫有小毒하고味는辛하며,骨折에外用하였다<sup>26</sup>.*Rhus verniciflua Stokes*의樹脂를乾燥한乾漆(*Lacca Sinica Exsiccata*)은性は溫하고味는辛苦하며有小毒하여破血祛瘀,消積,殺蟲의효능이있어婦人經閉,癥瘕,瘀血,蟲積腹痛을치료하며身體虛弱者 및 無瘀血者에게는忌해야한다<sup>24</sup>.

선행연구에서 확인한 항암관련 실험 항목에서 祛邪法의 관점에서 선택한 철피, 천화분은 모두 높은 항암효과를 보였으며,扶正法의 관점에서 선택한 황기, 당귀는 암세포의 침윤 및 혈관생성에 관여하는 인자들(VEGF, MMP-2)의 발현에서는 유효한 효과를 나타내었으나 그 외에 역형성감상선암세포의 침윤이나 전이를 저해하는 효과가 철피와 천화분에 비하여 미미하였고, 일부는 암세포의 전이율과 침윤율을 오히려 높이는 경우도 있었다<sup>14</sup>. 그러나扶正法은 이렇게 뚜렷한 결과를 내지 못했음에도 불구하고 임상에서 주치료법 뿐 아니라 암환자를 관리하는 데에 보조적인 치료법으로도 기대를 모으고 있는 방법이므로 본 연구에서는扶正法을祛邪法과 융합하여 그 효과를 연구하고자 하였다. 실제로 암환자의 대부분에서 전신쇠약감이나 식욕부진은 흔히 동반되는 증상이지만 현대의학의 암치료 및 관리방법으로는 해결하기가 어렵다<sup>5,6</sup>. 따라서 암치료에 있어正氣를 도울 수 있는 한의학적 치료법의 응용은 임상적으로, 학문적으로 절실히 요구되고 있는 실정이다. 또한 철피와 천화분의 경우脾胃虛寒者와大便滑泄者는 금기시하고 있으나<sup>24,25</sup> 임상적으로 대부분의 암환자에서 이를 의심할 수 있는 증상들을 동반하는 경우가 많으므로<sup>5,6</sup> 철피와 천화분의 높은 항암효과가 밝혀지더라도 임상에서는 신용해야하며, 이를 보완하기 위해서는扶正法과의 병용 또한 고려할 수 있다.

향후 이러한 임상적인 가능성들이 실용화되기

위한 근거마련의 일환으로 본 연구에서는扶正祛邪法에 기초하여 황기, 당귀 천화분, 철피, 인삼 등을 다양한 조합과 비율의 복합물로 만들어 이들이 각각 역형성감상선암세포에 미치는 영향과 그 기전을 알아보았다.

우선 이들 본초의 다양한 복합물들의 세포독성 및 증식효과를 조사하기 위해 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 관찰하였다. 그 결과 황기와 당귀를 1:1 또는 3:1로 섞은 복합물에서는 세포생존율의 감소가 거의 일어나지 않았으며(Fig. 1), 이는 당귀 단독으로 시행한 선행 실험에서 암세포의 생존율을 감소시킨 결과와 대조된다<sup>14</sup>. 황기, 당귀, 천화분을 1:1:1 또는 3:1:1로 섞은 복합물은 농도에 따라 점차 생존율을 감소시켰고, 황기, 당귀, 천화분, 인삼을 1:1:1:1 또는 3:1:1:1로 섞은 복합물은 특히 높은 농도에서 세포 생존율을 감소시켰다(Fig. 1). 황기, 당귀, 천화분, 인삼, 철피를 1:1:1:1:1로 섞은 복합물은 낮은 농도에서부터 높은 농도까지 급격히 세포생존율을 감소시켰고 3:1:1:1:1로 섞은 복합물은 완만하게 세포생존율을 감소시켰다(Fig. 1). 이는 황기와 당귀를 1:1 또는 3:1로 섞은 복합물을 제외한, 실험에 사용된 대부분의 복합물이 역형성감상선암세포의 성장을 저해하는데 큰 효과가 있음을 밝혀준다.

복합물들이 역형성감상선암세포 SNU-80 세포주의 전이에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 wound healing assay에서 세포의 전이율을 관찰한 결과, 황기와 당귀를 1:1로 섞은 복합물은 전이율의 감소가 일어나지 않았으나 3:1로 섞은 복합물은 전이율의 감소가 일어났다(Fig. 2). 선행연구에서 황기와 당귀를 단독으로 사용했을 때는 세포의 전이율이 오히려 증가되는 것을 확인하였는데<sup>14</sup>, 황기와 당귀를 3:1로 섞은 복합물에서는 전이율의 감소가 일어난 것이 흥미롭다. 황기, 당귀, 천화분을 1:1:1 또는 3:1:1로 섞은 복합물과 황기, 당귀, 천화분, 인삼을 1:1:1:1 또는 3:1:1:1로 섞은 복합물, 황기, 당귀, 천화분, 인삼, 철피를 1:1:1:1:1 또는 3:1:1:1:1로



섞은 복합물은 모두 전이율을 감소시켰다(Fig. 2). 이는 실험에 사용한 한약복합물 중 황기와 당귀를 1:1로 섞은 복합물을 제외하고 모든 복합물이 역형성갑상선암세포의 전이를 저해하는데 큰 효과가 있음을 밝혀준다.

또한 이들 복합물이 SNU-80 세포주의 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위하여 transwell invasion assay 방법으로 세포의 침윤율을 관찰한 결과, 황기와 당귀를 1:1로 섞은 복합물은 침윤율의 감소가 일어났으나 3:1로 섞은 복합물은 침윤율의 감소가 일어나지 않았다(Fig. 3). 황기, 당귀, 천화분을 1:1:1 또는 3:1:1로 섞은 복합물은 침윤율의 감소를 일으켰다(Fig. 3). 황기, 당귀, 천화분, 인삼을 1:1:1:1로 섞은 복합물은 침윤율의 감소를 일으켰으나 3:1:1:1로 섞은 복합물은 세포 침윤율의 감소가 일어나지 않았다(Fig. 3). 황기, 당귀, 천화분, 인삼, 철평피를 1:1:1:1:1 또는 3:1:1:1:1로 섞은 복합물은 세포 침윤율을 감소시켰다(Fig. 3). 선행연구에서는 황기, 당귀 단일물에서의 침윤율 증가, 천화분, 철평피 단일물에서의 침윤율 감소가 명확하였으나<sup>14</sup> 본 실험에서 황기와 당귀 복합물의 경우 비율에 따라 기존 결과와 상이한 결과를 나타내었다.

마지막으로 본 실험에서는 암의 침윤(invasion) 및 혈관생성(angiogenesis)에 관여하는 인자들(VEGF, MMP-2)의 발현정도를 측정하기 위해 ELISA assay를 시행하였다. VEGF(Vascular endothelial growth factor)는 혈관신생과 혈관형성의 중심조절자로, 암과 같은 몇몇 질병들은 비정상적인 혈관신생에 의해서 유발되는데, 많은 경우에 이런 질병들은 VEGF의 과다한 생성들을 수반한다. MMP(matrix metalloproteinase)는 아연 또는 칼슘 의존성의 효소군으로서 현재까지 23종류가 발견되었다(MMP-1~MMP-23). 이들 중 MMP-2는 종양세포의 악성도와 밀접한 연관성이 있다고 알려져 있으며 여러 암에서 MMP-2의 발현 증가를 보이는 경우 주위 조직으로의 침습과 림프관 전이의 빈도가 증가하였다는 보고도 있다<sup>27-33</sup>.

암의 침윤 및 혈관생성에 관여하는 인자들인 VEGF

와 MMP-2의 발현정도를 측정하기 위해 ELISA assay를 시행한 결과, 황기와 당귀를 1:1 또는 3:1로 섞은 복합물은 VEGF의 발현을 억제하지 못하였다(Fig. 4). 황기, 당귀, 천화분을 1:1:1 또는 3:1:1로 섞은 복합물은 VEGF의 발현을 억제하였다(Fig. 4). 황기, 당귀, 천화분, 인삼을 1:1:1:1 또는 3:1:1:1로 섞은 복합물은 VEGF의 발현을 억제하지 못하였다(Fig. 4). 황기, 당귀, 천화분, 인삼, 철평피를 1:1:1:1:1로 섞은 복합물은 VEGF의 발현을 억제하였으나, 3:1:1:1:1로 섞은 복합물은 억제하지 못하였다(Fig. 4). MMP-2의 경우 황기와 당귀를 3:1로 섞은 복합물을 제외한 황기와 당귀를 1:1로 섞은 복합물, 황기, 당귀, 천화분을 1:1:1 또는 3:1:1로 섞은 복합물, 황기, 당귀, 천화분, 인삼을 1:1:1:1 또는 3:1:1:1로 섞은 복합물, 황기, 당귀, 천화분, 인삼, 철평피를 1:1:1:1:1 또는 3:1:1:1:1로 섞은 복합물에서 MMP-2의 발현을 억제하였다(Fig. 5). 단일물 실험에서는 황기, 당귀, 철평피, 천화분의 네가지 약물이 모두 VEGF와 MMP-2의 발현을 억제한 것<sup>14</sup>과는 대조적으로 복합물 실험에서는 그 비율과 구성에 따라 다양한 결과를 얻었다.

이상을 통해 보았을 때, 황기, 당귀, 천화분을 함께 조합하였을 때 역형성갑상선암세포의 전이와 침윤을 강하게 저해하는 효과를 확인하였으며, 황기, 당귀, 천화분 복합물에 인삼과 철평피를 함께 조합하였을 때에도 선별적으로 역형성갑상선암세포를 억제하는 효과를 나타내었다.

또한, 복합물의 경우 약물 상호관계 등의 요인으로 조성 및 비율에 따라 다양한 결과를 나타냄을 확인하였다. 따라서 단일물에서의 실험결과만을 근거로 두 가지 이상의 약물을 복합하였을 때의 결과를 추정할 수는 없으며, 우수한 암 치료제 개발을 위해서는 무수한 조합의 한약물들의 실험연구가 꾸준히 시행되어야 한다.

특히 실제 임상에서의 암 치료는 환자의 면역력을 증강시키고 항병능력을 키우기 위한 扶正法과 邪氣를 공격하는 祛邪法을 적절히 운용하여 면역

기능의 평형을 이루는 것을 목표로 삼아야하므로 扶正祛邪를 바탕으로 다양한 한약복합물들에 대한 심도 있는 항암효과연구를 통해 항암에 유효한 한약물을 개발할 수 있을 것으로 기대한다.

## V. 결 론

수종 한약 복합물의 역형성갑상선암세포 SNU-80에 대한 항암효과를 알아보기 위해 각 한약을 처리한 SNU-80 thyroid cancer cells에서 세포생존율, 상처치유분석(wound healing assay), 암의 침윤정도 확인(invasion assay), 암의 침윤 및 혈관생성에 관여하는 인자들(VEGF, MMP-2)의 발현정도(ELISA assay)를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황기:당귀:천화분=1:1:1 또는 3:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼=1:1:1:1 또는 3:1:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼:칠피=1:1:1:1:1 복합물에서 SNU-80의 생존율을 감소시켰다.
2. 황기:당귀=3:1 복합물, 황기:당귀:천화분=1:1:1 또는 3:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼=1:1:1:1 또는 3:1:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼:칠피=1:1:1:1:1 또는 3:1:1:1:1 복합물에서 SNU-80의 전이율을 감소시켰다.
3. 황기:당귀=1:1 복합물, 황기:당귀:천화분=1:1:1 또는 3:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼=1:1:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼:칠피=1:1:1:1:1 또는 3:1:1:1:1 복합물에서 SNU-80의 침윤율을 감소시켰다.
4. 황기:당귀:천화분=1:1:1 또는 3:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼:칠피=1:1:1:1:1 복합물에서 VEGF의 발현을 억제하였으며, 황기:당귀=1:1 복합물, 황기:당귀:천화분=1:1:1 또는 3:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼=1:1:1:1 또는 3:1:1:1 복합물, 황기:당귀:천화분:인삼:칠피=1:1:1:1:1 또는 3:1:1:1:1 복합물에서 MMP-2의 발현을 억제하였다.

이상의 결과로부터 실험을 실시한 수종 한약 중 다수가 역형성갑상선암세포 SNU-80에 대해 항암 효과를 가지고 있음을 확인하였으며, 특히 황기:당귀:천화분=1:1:1 복합물의 경우 매우 높은 항암효과를 보였다. 따라서 수종 한약 중 높은 항암효과를 나타낸 조합물을 대상으로 보다 심도 있는 연구를 수행함으로써 역형성갑상선암을 치료하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 2012년도 가천대학교 교내학술연구비 지원을 받아 수행되었음.

## 참고문헌

1. 류기원, 전병욱, 류봉하, 박동원. 암에 대한 한의학적 인식 및 실험적 연구에 관한 고찰. 대한한방종양학회지 1995;1(1):29-54.
2. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울: 杏林書院: 1995, p. 13-42.
3. 전통의학연구소. 한의학사전. 서울: 成輔社: 2001, p. 233.
4. 정재중, 구선영, 임새롬, 성정석, 김동일. 四物湯加味方의 항암효과에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지 2010;23(3):38-55.
5. 심윤수, 김도연, 남은미, 이순남. 말기 암환자의 임종 전 48시간동안의 임상양상. 한국 호스피스 완화의료학회지 2007;10(4):190-4.
6. Walsh D, Rybicki A, Nelson KA, Donnelly S. Symptoms and prognosis in advanced cancer. *Support care cancer* 2002;10:385-8.
7. 김병완, 윤현정, 전현숙, 윤형중, 김창현, 박선동. 당귀보혈탕의 배합비율에 따른 대장암 세포주 HCT116 세포사멸 효과. 대한본초학회지 2006; 21(2):37-46.

8. 장성일, 유화승. 인삼의 항암작용에 대한 한의학 관련 논문 분석. 대전대학교 한의학연구소 논문집 2011;19(2):145-51.
9. Park SC, Yoo HS, Park C, Cho CK, Kim GY, Kim WJ, et al. Introduction of apoptosis in human lung carcinoma cells by water extract of *Panax notoginseng* is associated with the activation of caspase-3 through downregulation of Akt. *International journal of oncology* 2009; 35(1):121-7.
10. 박영철, 박용기, 이선동. 한약의 다양한 항암기전. *대한본초학회지* 2012;27(3):39-55.
11. 이현희, 임은미. 자궁경부암세포에 대한 天花粉의 성장억제 및 세포사멸효과. *대한한방부인과학회지* 2005;18(3):77-91.
12. 최태연, 이성원, 류연희, 반효정, 서근영, 김재효, 등. 천화분 약침액의 A549 폐암 세포주에서 apoptosis 유발효과. *경락경혈학회지* 2010;27(4):15-23.
13. 최원철, 이재호, 이은옥, 이효정, 윤성우, 안규석, 등. 법제 옷나무 추출물의 혈관형성저해 및 항암효과에 대한 연구. *대한암한의학학회지* 2006;11(1):23-30.
14. 여현수, 이민혜, 고성규, 최유경, 전찬용, 박종형, 황기, 당귀, 칠피, 천화분의 역형성갑상선암세포 SNU-80에 대한 항암효과. *대한예방한의학회지* 2014;18(1):83-92.
15. 대한내과학회. *해리슨내과학 제17판*. 서울: 도서출판 MIP; 2010, p. 2699, 2703.
16. 대한병리학회. *병리학 제6판*. 서울: KMS; 2007, p. 904, 916.
17. 최현정, 김태용, 김의용, 김원구, 김원배, 송영기. 심바스타틴이 미분화 갑상선암 세포주의 성장 및 침습에 미치는 영향. *대한내분비학회지* 2008; 23(4):238-44.
18. 許浚. *東醫寶鑑*. 서울: 여강출판사; 2001, p. 2253.
19. 傳統文化研究所. *東洋醫學大辭典*. 서울: 成輔社; 2000, p. 467, 1080.
20. 김성동. 白花蛇舌草로부터 분리한 ursolic acid의 자연살해효과와 항전이작용. *대전대학교한의학연구소논문집* 1997;5(2):523-33.
21. 송호준, 김대현. 白花蛇舌草 전탕액 투여가 마우스의 항종양 면역반응에 미치는 영향. *본초분과학회지* 1994;9(1):3-97.
22. 邢雪梅. 抗癌中藥의 生物治療效能研究近況. *한글판 中醫雜誌* 1994;85-90.
23. 이영찬, 전병훈. 과두를 가미한 사군자탕 및 사물탕의 항암효과에 대한 연구. *동의병리생리학회지* 1994;9(1):79-100.
24. 전국한의과대학 본초학공동교재 편집위원회. *本草學*. 서울: 永林社; 2012, p. 205, 477, 573, 577, 630.
25. 주영증, 정종길. *약용자원식물학*. 서울: 永林社; 2005, p. 207, 239, 247.
26. *中藥大辭典 編纂委員會. 中藥大辭典*. 서울: 정담; 1997, p. 4374.
27. Sharma C, Nusri Qel-A, Begum S, Javed E, Rizvi TA, Hussain A. (-)-epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and inhibits invasion and migration of human cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(9):4815-22.
28. Wang L, Wang X, Liang Y, Diao X, Chen Q. S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by upregulating matrix metalloproteinase-13. *Acta Biochim Pol* 2012;59(4):593-8.
29. Gao W, Sweeney C, Walsh C, Rooney P, McCormick J, Veale DJ, et al. Notch signalling pathways mediate synovial angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2. *Ann Rheum Dis* 2013;72(6):1080-8.
30. Aricò A, Giantin M, Gelain M, Riondato F, Mortarino M, Comazzi S, et al. Matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor expression

- in canine leukaemias. *Vet J* 2013;196(2):260-2.
31. Yarani R, Mansouri K, Mohammadi-Motlagh HR, Mahnam A, Emami Aleagha MS. In vitro inhibition of angiogenesis by hydroalcoholic extract of oak (*Quercus infectoria*) acorn shell via suppressing VEGF, MMP-2, and MMP-9 secretion. *Pharm Biol* 2013;51(3):361-8.
32. Siejka A, Barabutis N, Schally AV. GHRH antagonist inhibits focal adhesion kinase(FAK) and decreases expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in human lung cancer cells in vitro. *Peptides* 2012;37(1):63-8.
33. Li X, Ji Z, Ma Y, Qiu X, Fan Q, Ma B. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 in sacral chordomas. *Oncol Lett* 2012;3(6):1268-74.