

황기, 당귀, 칠피, 천화분의 역형성갑상선암세포 SNU-80에 대한 항암효과

여현수¹⁾ · 이민혜¹⁾ · 고성규²⁾ · 최유경¹⁾ · 전찬용¹⁾ · 박종형¹⁾*

¹⁾ 가천대학교 한의과대학 내과학교실

²⁾ 경희대학교 한의과대학 예방의학교실

Antineoplastic Effect of Several Herbal Medicines on SNU-80 Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Line

Hyun Soo Yeo¹⁾, Min Hye Lee¹⁾, Seong Gyu Ko²⁾, You Kyung Choi¹⁾,
Chan Young Jun¹⁾ & Jong Hyeong Park¹⁾*

¹⁾ Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University

²⁾ Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Abstract

Objective : This study was performed to investigate the antineoplastic effect of *Astragalus membranaceus*, *Angelica gigas*, *Rhus verniciflua Stokes* and *Trichosanthes kirilowii* on SNU-80 anaplastic thyroid carcinoma cell line.

Method : We examined whether our herbal medicines decreases cell growth rate of SNU-80 using MTT assay. We performed western blot analysis to verify that our herbal medicines induces apoptosis via caspase-dependent mechanism. We also performed wound healing assay and transwell invasion assay to investigate whether our herbal medicines affects the migration and invasion of anaplastic cancer cells, SNU-80. We also carried out ELISA assay to know our herbal medicines suppresses the expression of proinvasive molecules, such as VEGF and MMP-2 secreted from SNU-80.

Results : MTT assay demonstrates that *Angelica gigas*, *Rhus verniciflua Stokes*, and *Trichosanthes kirilowii* suppressed strongly the growth of SNU-80. Western blot analysis demonstrates that *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis activating the cleavages of caspases (caspase-8, caspase-3) and PARP. Wound healing assay demonstrates that *Rhus verniciflua Stokes*, and *Trichosanthes kirilowii* inhibited the migration of SNU-80. Transwell invasion assay demonstrates that *Rhus verniciflua Stokes*, and *Trichosanthes kirilowii* inhibited the invasion of SNU-80. Elisa assay demonstrates that *Astragalus membranaceus*, *Angelica gigas*, *Rhus verniciflua Stokes*, and *Trichosanthes kirilowii* suppressed the expression of VEGF and MMP-2.

Conclusion : We could conclude that several herbal medicines suppresses the growth and inhibits the migration and invasion of SNU-80 which is anaplastic thyroid cancer cells. Especially, *Rhus verniciflua Stokes*, *Trichosanthes kirilowii* had stronger anti-cancer effect suggesting that we can apply them to treat anaplastic thyroid cancer.

• 접수 : 2014년 3월 31일 • 수정접수 : 2014년 4월 11일 • 채택 : 2014년 4월 12일

*교신저자 : 박종형, 인천광역시 남동구 구월1동 1200-1번지 가천대학교부속 한방병원
전화 : 032-468-0330, 팩스 : 032-468-4033, 전자우편 : sdragon@gachon.ac.kr

Key words: *Astragalus membranaceus*, *Angelica gigas*, *Rhus verniciflua* Stokes, *Trichosanthes kirilowii*, SNU-80, Antineoplastic Effect

I. 서론

갑상선암은 내분비계의 가장 흔한 악성종양으로 갑상선유두암종과 갑상선여포암종과 같은 분화종양들은 완치되는 경우가 흔하며 예후가 아주 좋은 편이지만¹⁾, 주위 조직으로 침윤해 들어간 경우나 다른 장기에 전이된 경우엔 생존율이 급격히 낮아진다. 역형성 암은 드물게 발생하며 악성도가 높은 미분화암으로, 원발성으로 생길 수도 있고 분화성이 좋은 유두암종이나 여포암종이 퇴화하여 생길 수도 있다²⁾. 역형성 갑상선암은 치명적이어서 환자의 대부분이 6개월 안에 사망할 수 있는 무서운 결과를 초래한다³⁻⁴⁾. 이러한 역형성 암은 방사성 요오드 치료, 항암화학요법 등에 일반적으로 반응하지 않으며¹⁾, 여타 치료법에 대한 연구도 미비한 실정이다⁵⁾.

한의학에서의 암치료는 正氣를 돕는 약을 써서 邪氣로 하여금 저절로 소멸되게 하는 ‘扶正法’과, 邪氣를 제거하는 약을 쓰는 것으로 이를 통해 正氣를 돕는 ‘祛邪法’을 활용하고 있으며, 각각의 치료법을 이용한 여러 한약물의 항암효과가 보고되고 있다⁶⁻⁹⁾. 黃芪(*Astragalus 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를 치료하며, 灸用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 치료한다¹⁰⁻¹¹⁾. 當歸(*Angelica 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 치료한다¹⁰⁻¹¹⁾. 天花粉(*Trichosanthes Radix*)은 性은 微寒하고 味는 甘微苦酸하며, 生津止渴, 消腫排膿의 효능이 있어 熱病煩渴, 肺熱燥咳, 內熱消渴, 瘡瘍腫毒을 치료한다¹⁰⁻¹¹⁾. 漆皮(*Rhus verniciflua* Stokes)는 性은 溫 有小毒하고 味는 辛하며, 骨折에 外用하였다¹²⁾. *Rhus verniciflua* Stokes의 樹脂를 乾燥한 乾漆(*Lacca Sinica Exsiccata*)은 性은 溫하고 味는 辛苦하며 有小毒하여 破血祛瘀, 消積, 殺蟲의 효능이 있어 婦人經閉, 癥瘕, 瘀血, 蟲積

腹痛을 치료한다¹⁰⁾. 천화분, 칠피는 항암효과로 주목받고 있는 약재로써, 이¹³⁾ 등은 ‘자궁경부암세포에 대한 天花粉의 성장억제 및 세포사멸효과’에서, 최¹⁴⁾ 등은 ‘천화분 약침액의 A549 폐암 세포주에서 apoptosis 유발효과’에서 각각 천화분의 항암 효과를 보고하였으며, 최¹⁵⁾ 등은 ‘법제 옷나무 추출물의 혈관형성저해 및 항암효과에 대한 연구’에서 칠피의 항암효과를 보고하였다.

본 연구에서는 황기, 당귀, 칠피, 천화분 각각이 역형성갑상선암세포에 미치는 영향과 기전을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 수종 한약은 (주) 한풍제약(Jeonjoo, Korea)에서 조제되어 본 연구실로 배송되었다. 배송된 수종 한약 분말은 30% 에탄올에 녹여 사용하였다.

2) 기기 및 시약

세포실험에 사용된 plastic 제품 96-well culture plate, 24-well culture plate, 100mm culture plate는 Daeillab service Co, Ltd, (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포 독성 측정 실험에 사용된 MTT 시약은 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약 중 NaCl, KCl, NaH₂PO₄, KH₂PO₄는 Sigma(USA)제품을 사용하였고, Tween 20은 BIO-RAD(USA) 제품을 사용하였다. Human VEGF, MMP-2 ELISA set은 R&D system(USA)에서 구입하였다.

3) 항체(Antibodies)

1차 항체들 중 FAS, cleaved caspase-8, cleaved caspase-3, PARP는 Cell Signaling Technology Inc

(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. STAT3, phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-JAK1 (Tyr1022/Tyr1023)은 Upstate-Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. Tubulin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (mouse and rabbit) (2차 항체)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

4) 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 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체 성분을 불활성화 시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation(56°C water bath에 30분간 가열)하여 사용하였다.

세포를 회수할 때에는 trypsin-EDTA 1ml를 가하여 37°C에서 1분간 반응시켜 세포를 분리하고 배지 4ml를 넣고 원심분리(1,200rpm, 2분)하여 세척한 후 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) MTT assay

SNU-80 cells을 한 well 당 3×10^3 개가 되도록 96-well culture plate에 심어준 후 overnight 배양하였다. 세포가 monolayer form을 형성한 후 각 한약을 농도별로(0~500 μ g/ml) 처리하였다. 72시간 후 MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) 0.5mg/ml를 well 당 10 μ l씩 분주하여 넣었다. 2시간 동안 37°C incubator에서 반응한 후 media를 제거하고 DMSO를 100 μ l 넣어서 blue fomazan crystal이 녹게 하였다. 570nm에서 ELISA Reader(Merck Co., Germany)를 이용하여 흡광도를 측정하여 각 한약의 세포독성 및 증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

2) Western blotting

SNU-80 세포에 황기, 당귀, 천화분을 500 μ g/ml 농도로 처리하여 control(EtOH 30%) 군과 함께 배양하였다.

24시간 배양 후 PBS로 세척하고 RIPA buffer(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50mM Tris (pH8.0), 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na3PO4, 1 μ g/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin)를 사용하여 용해한 후 13,000 \times g로 20분간 원심분리하였다.

동량의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리한 다음, Trans-blot unit를 사용하여 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (NC)에 전이(transfer)하였다. 이 NC를 5% non-fat dry milk(0.1% Tween-20을 함유한 Tris buffered saline: TBS-T)로 실온에서 1시간 blocking하고, 1차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, NC를 TBS-T로 10분간 3회 세척하였다.

이후, 2차 항체를 1:4,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 세척 후 ECL detection kit(Amersham)를 이용하여 반응성이 있는 특정 단백질 띠를 찾았다.

3) Wound healing assay

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

4) Invasion assay

먼저 matrigel(BD matrigel Matrix)을 4°C overnight으로 녹인 후 24-well plate에 Falcon cell culture insert (8 μ m pore size)를 끼우고 matrigel을 50~60 μ l 수직으로 insert에 떨어뜨렸다. 24-well을 sealing

하여 4°C에서 overnight하였다. 다음날, 한 well에 10,000~20,000개 정도(100 μ l)세포를 1% FBS가 든 media에 넣어 matrigel 위에 깔고, 5분 동안 37°C에서 matrigel을 incubation 하였다. 아래의 well에 10% FBS가 든 media를 500 μ l 씩 넣었다. 위의 insert를 다시 끼운 후 1% FBS로 만든 각 한약 (50 μ g/ml)을 matrigel 위에 처리하였다. 24시간 후에 PBS나 물로 insert를 두 번 씻어냈다. 그 다음 4% paraformaldehyde를 500 μ l씩 well에 넣고 200 μ l씩 insert에 넣고 sealing하여 4°C에서 overnight하였다. 다음날, hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였다.

5) ELISA assay

세포를 한 100 \emptyset dish 당 1 \times 10⁶개를 깔고 그 다음 날 각 한약 (500 μ g/ml)을 처리하였다. 24시간 후 원심 분리기를 이용하여 1,000rpm에 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 protein과 적당히 희석시킨 세포 배양액을 각 well에 넣어주었다. 2시간 반응 후 plate를 씻어준 후에 human VEGF와 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 450nm에서의 흡광도를 측정하여 VEGF와 MMP-2의 농도를 확인하였다.

6) 통계 처리

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

III. 결 과

1. SNU-80의 세포생존율(MTT assay)

황기(*Astragalus membranaceus*), 당귀(*Angelica gigas*), 칠피(*Rhus verniciflua Stokes*), 천화분(*Trichosanthes kirilowii*)이 역형성갑상선암세포(human anaplastic thyroid cancer cells)인 SNU-80 세포주에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 관찰한 결과, 황기는 농도에 관계없이 세포생존율에 영향을 미치지 않았고(Figure 1), 당귀는 농도에 따라(dose-dependent) 점차 생존율을 감소시켰으며(Figure 1), 칠피와 천화분은 낮은 농도에서부터 높은 농도까지 급격히 세포생존율을 감소시켰다(Figure 2).

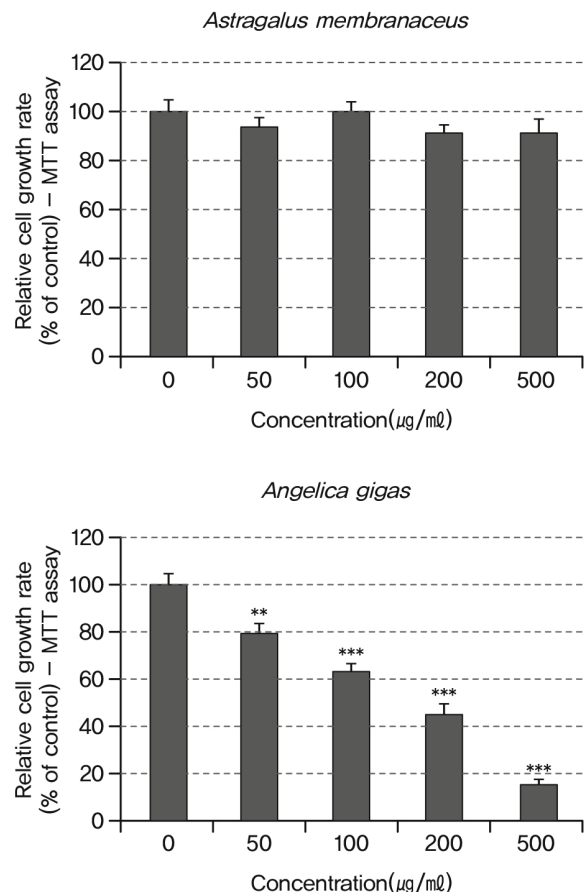


Fig. 1. Effect of *Astragalus membranaceus* and *Angelica gigas* on the growth of SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

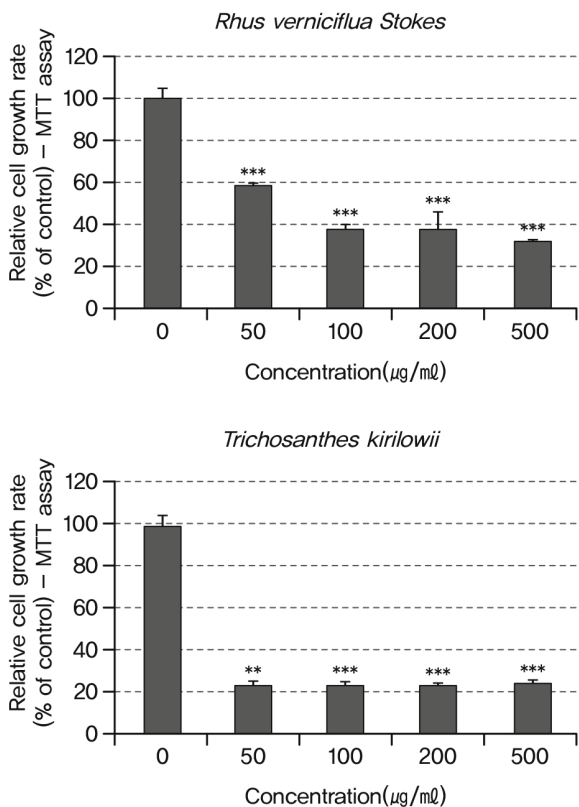


Fig. 2. Effect of *Rhus verniciflua Stokes* and *Trichosanthes kirilowii* on the growth of SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

2. SNU-80의 세포성장을 저해하는 기전으로서의 apoptosis(Western blotanalysis)

SNU-80에 황기, 당귀, 천화분 단일물을 처리하여 세포사멸(apoptosis)에 관련된 molecules들을 western blot analysis를 통해 검사한 결과, cleaved caspase-8, cleaved caspase-3, cleaved PARP 모두 천화분에서 강하게 발현되었다(Figure 3).

3. 상처치유분석(Wound healing assay)

황기, 당귀, 칠피, 천화분이 역형성갑상선암세포 SNU-80 세포주의 전이에 미치는 영향을 관찰한 결과, 황기와 당귀는 control(EtOH 30%)에 비교했을 때 오히려 세포의 전이율을 증가시켰고, 칠피와 천화분은 control(EtOH 30%)에 비교했을 때 SNU-80의 전이율을 감소시켰다(Figure 4).

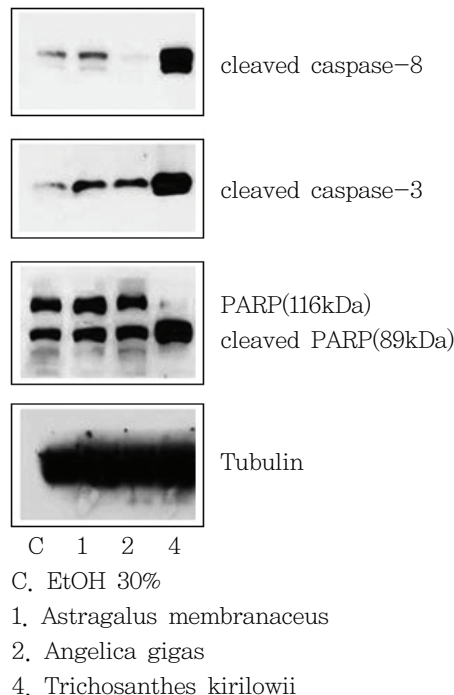


Fig. 3. Effect of several herbal medicines on the regulation of apoptotic molecules (caspases) in SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells.

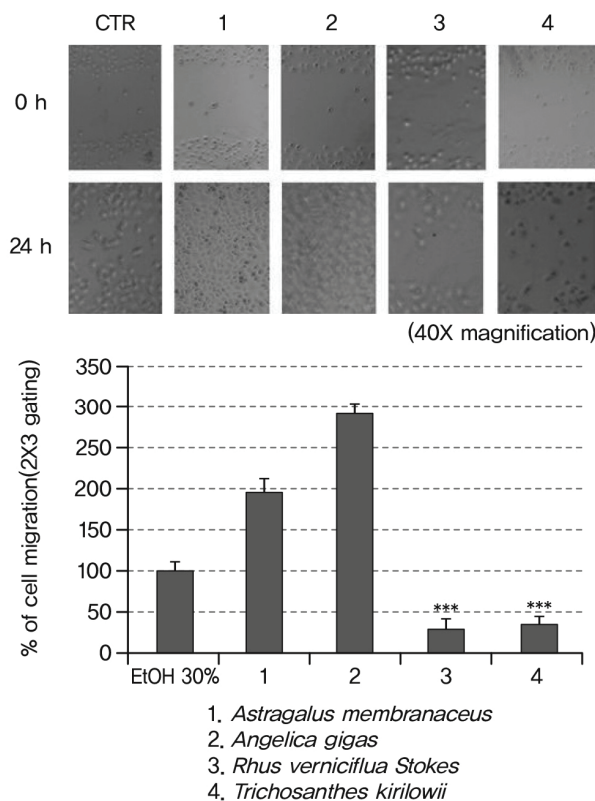


Fig. 4. Effect of several herbal medicines on the migration of SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

4. 암의 침윤정도(Transwell invasion assay)

황기, 당귀, 칠피, 천화분이 역형성갑상선암세포인 SNU-80 세포주의 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위하여 transwell invasion assay 방법으로 세포의 침윤율을 관찰한 결과, 황기와 당귀는 control(EtOH 30%)에 비교했을 때 오히려 세포의 침윤율을 증가시켰고, 칠피와 천화분은 control(EtOH 30%)에 비교했을 때 SNU-80의 침윤율을 감소시켰다(Figure 5).

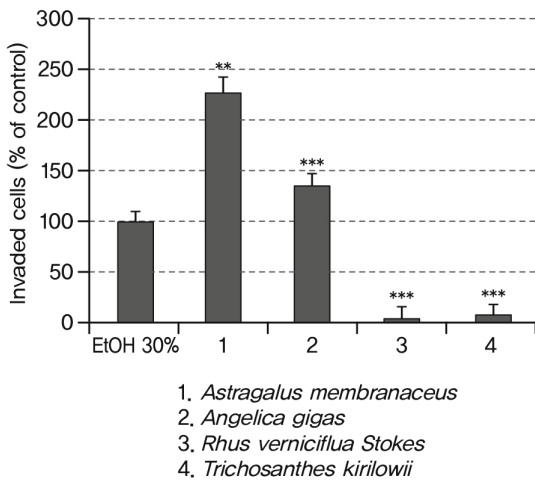


Fig. 5. Effect of several herbal medicines on the invasion of SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

5. 암의 침윤(invasion) 및 혈관생성(angiogenesis)에 관여하는 인자들(VEGF, MMP-2)의 발현정도 측정(ELISA assay)

황기, 당귀, 칠피, 천화분이 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 비교했을 때 황기, 당귀, 칠피, 천화분 모두 VEGF와 MMP-2의 발현을 억제하였다(Figure 6, Figure 7).

IV. 고 찰

갑상선은 인체에서 가장 큰 내분비선으로²⁾, 갑상선

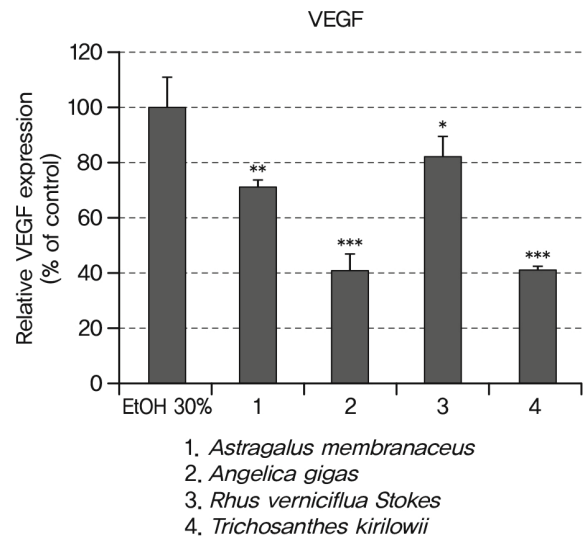


Fig. 6. Effect of several herbal medicines on the expression of VEGF in SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells. (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

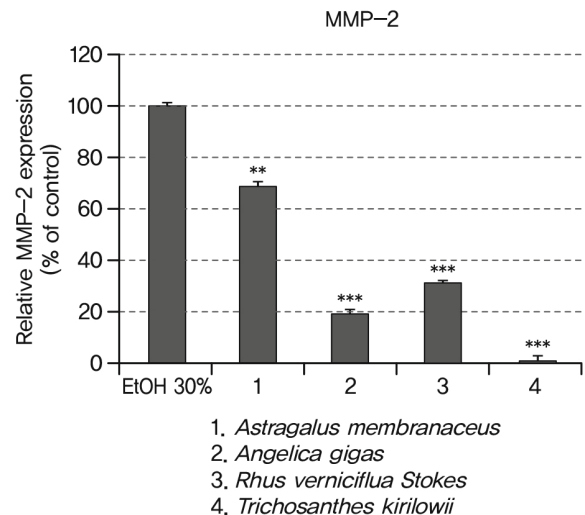


Fig. 7. Effect of several herbal medicines on the expression of MMP-2 in SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

에 발생하는 결절은 흔한 질환이며 최근에는 초음파진단 기기의 보급이 증가함에 따라 그 유병률이 점차 높아지고 있는 추세이다¹⁶⁾. 대부분의 갑상선결절은 양성 결절이며, 악성의 갑상선암 중에서 갑상선유두암(PTC)과 갑상선여포암(FTC)과 같은 분화된 갑상선암은 수술이 절대적인 치료방법이다. 이들 분화된 갑상선암의 경우에는 예후가 월등히 좋아, 완치되는 경우가 흔하다¹⁶⁾. 이에 비해, 미분화암인 갑상선역형성암종(ATC)은 침습

적이고 치료에 잘 반응하지 않으며 예후도 불량하다¹⁾. 갑상선암은 일반적으로 다른 갑상선종에 비해 갑상선 기능은 정상이고, 전이가 있어도 갑상선 이외의 증상은 적다. 그러나, 미분화 암은 발열, 심한 전신증상을 나타낸다¹⁷⁾.

역형성 암은 드물게 발생하며 호발 연령은 60대에서 70대이고 인체의 암 중 악성도가 아주 높은 쪽에 속한다. 임상소견에서 종양을 인지하였을 때는 이미 갑상선 뿐 아니라 주변조직까지 침투하여 큰 덩어리를 형성한다. 조직소견에 따라 몇 가지 아형이 있어 예후가 다양하나, 발견 당시부터 광범위한 전이가 있어서 1년 생존율이 20% 정도이고 평균 생존율이 진단 후 6개월이다²⁾. 치료에 있어서는 미분화성 때문에 방사성 요오드 섭취는 일반적으로 미약하나 만일 잔류섭취가 있다면 치료에 사용될 수 있다. 항암화학요법은 anthracyclines와 paclitaxel 등을 포함하여 다약제로 시도되고 있으나 일반적으로 무익하고, 외부 방사선조사도 치료에 종양이 반응을 보이는 경우에 한해 계속 시도할 수 있다¹⁾.

한의학적으로 갑상선암은 氣血이 잘 돌지 못하고 물려 멍친 癥瘕의 개념으로 설명할 수 있는데, 石癥·肉癥·筋癥·血癥·氣癥의 五癥 중 石癥과 가장 유사하다. 《備急千金要方》에 기재된 石癥에 대한 설명을 보면, 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 하였다¹⁸⁻⁹⁾.

한의학에서의 암치료는 益氣補血, 滋陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 인체 抗病 능력을 증진시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化癥, 化痰消癥, 理氣消腫 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法을 응용하고 있다²⁰⁻³⁾. 본 연구에서는 扶正法에 활용할 수 있는 황기, 당귀 및 祛邪法에 활용할 수 있는 철피, 천화분을 이용하여 실험을 수행하였으며, 그들의 역형성갑상선암세포에 대한 효과의 강약을 알아보고자 하였다.

황기, 당귀, 철피, 천화분의 세포독성 및 증식효과를 조사하기 위해 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 관찰한 결과, 황기는 농도에 관계없이 세포생존율에 영향을 미치지 않았으며, 당귀는 농도에 따라 점차 생존율을 감소시켰다. 철피와 천화분은 낮은 농도에서부터 높은 농도까지 급격히 세포생존율을 감소시켰다. 이는 황기를 제외한 당귀, 철피, 천화분이 역형성갑상선암세포의 성장을 저해하는데 효과가 있음을 밝혀준다(Figure

1, Figure 2).

Programmed cell death의 하나인 apoptosis는 세포의 형태와 사멸에 관여하게 되며 두 가지의 pathway가 있다. 그 중 하나는 extrinsic pathway, 즉 death receptor pathway로 주로 여분의 세포를 제거하여 세포 형태를 결정하는 것에 이 기작이 사용된다. 나머지 하나는 intrinsic pathway 즉 mitochondria pathway로 DNA 손상과 같은 세포의 stress에 반응하여 유도된다. 두 가지 기작에서 caspase라는 proteolytic enzyme이 effector molecule로서 중요한 기능을 담당하게 된다. Apoptosis는 최종적으로 cell shrinkage, DNA fragmentation, membrane blebbing을 일으킨다²⁴⁻³²⁾. 본 실험에서는 황기, 당귀, 철피, 천화분이 역형성 갑상선 암세포 SNU-80의 세포성장을 저해하는 기전으로서의 apoptosis를 확인하기 위해 western blot analysis를 시행하였다. Apoptosis에 관련된 molecules들을 western blot analysis를 통해 detection한 결과, apoptosis가 일어날 때 발현되는 cleaved caspase-8은 천화분에서 발현이 가장 강하게 되었다. Caspase-8 다음단계로 cleave 되는 caspase-3도 황기, 당귀, 천화분에서 발현이 강하게 되었다. apoptosis의 최종단계라고 할 수 있는 cleaved PARP는 특히 천화분에서 발현이 강하게 되었다. 결과적으로 천화분이 apoptosis가 일어날 때 발현되는 molecules들을 강하게 발현시킴을 확인하여 apoptosis를 가장 잘 일으킴을 추정할 수 있다(Figure 3). 본 연구에서 철피의 결과는 얻지 못하였다. 향후 철피가 암세포 apoptosis에 미치는 영향에 대해서도 추가적인 실험 및 연구가 이루어져야 할 것이다.

또한 황기, 당귀, 철피, 천화분이 역형성갑상선암세포 SNU-80이 세포주의 전이에 미치는 영향을 알아보기 위해 wound healing assay를 시행하고, 아울러 transwell invasion assay를 시행하였다. 상처치유분석(wound healing assay)은 생체 내 상처 치유 기간 동안의 cell migration을 모방한 것이다. 기본 단계는 상처를 닫기 위해 cell migration 하는 동안 처음부터 정기적으로 이미지를 캡처하고, 세포의 migration 속도를 수량화하기 위해 이미지를 비교하고, 세포 monolayer에 상처를 만드는 것을 포함한다³³⁾. Invasion assay는 세포이동에 관련된 실험으로서, 세포가 matrigel을 통과하여 밀의 well(transwell)로 침윤하는 것을 관찰하는 방법이다³⁴⁾.

황기, 당귀, 칠피, 천화분이 SNU-80 세포주의 전이에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 wound healing assay에서 각 한약을 50 μ g/ml의 농도로 세포에 처리한 후 24시간 동안 배양하여 세포의 전이율을 관찰한 결과, 황기와 당귀는 control(EtOH 30%)에 비교했을 때 오히려 세포의 전이율을 증가시켰고, 칠피와 천화분은 control에 비해 SNU-80의 전이율을 감소시켰다(Figure 4). 이는 황기나 당귀는 암세포의 전이를 저해하지 못하나 칠피와 천화분은 역형성갑상선암세포의 전이를 저해하는데 큰 효과가 있음을 밝혀준다.

황기, 당귀, 칠피, 천화분이 SNU-80 세포주의 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위하여 transwell invasion assay 방법으로 세포의 침윤율을 관찰한 결과, 황기와 당귀는 control(EtOH 30%)에 비교했을 때 오히려 세포의 침윤율을 증가시켰고, 칠피와 천화분은 control에 비교했을 때 SNU-80의 침윤율을 감소시켰다(Figure 5). 이는 황기나 당귀는 암세포의 침윤을 저해하지 못하나 칠피와 천화분은 역형성 갑상선 암세포의 침윤을 저해하는데 큰 효과가 있음을 밝혀준다.

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 림프절 전이의 빈도가 증가하였다는 보고도 있다³⁵⁻⁴¹⁾.

ELISA assay는 Enzyme-linked immunosorbent assay로 항원-항체 반응을 이용하여 항원이나 항체를 정성, 정량할 수 있는 감도가 매우 높은 실험방법이다. 면역글로불린(immunoglobulin)은 특정효소와 결합할 수 있고, 효소의 작용으로 면역글로불린의 존재를 확인할 수 있는데 이러한 기술을 효소결합 면역흡수 분석법(ELISA)이라 한다. ELISA의 실험과정은 단백질처리, Incubation(흡착), Washing의 세단계를 각각 거치게 된다⁴²⁾.

암의 침윤 및 혈관생성에 관여하는 인자들인 VEGF와 MMP-2의 발현정도를 측정하기 위해 ELISA assay를 시행한 결과, 황기, 당귀, 칠피, 천화분 모두 control(EtOH 30%)에 비교했을 때 VEGF와 MMP-2의 발현을 억제하였다(Figure 6). 이는 실험에 사용한 황기, 당귀, 칠피, 천화분이 역형성갑상선암세포의 침윤이나 전이를 저해하는데 효과가 있음을 밝혀준다.

본 연구에서 正氣를 키우는 扶正法의 관점에서 선택한 황기, 당귀는 邪氣를 쫓는 祛邪法의 관점에서 선택한 칠피, 천화분에 비교하여 역형성 갑상선 암세포의 침윤이나 전이를 저해하는 효과가 미미하였다. 황기의 경우 암세포 성장저해에 효과가 없었으며, 암세포의 전이와 침윤은 황기, 당귀가 오히려 증가시켰다. 그러나 VEGF, MMP-2의 발현 등에서는 황기, 당귀 역시 유효한 결과를 확인할 수 있었다. 칠피와 천화분은 본 연구에서 확인한 항암관련 실험 항목에서 높은 항암효과를 보였다.

이에 황기와 당귀를 대상으로 향후 좀 더 다양한 항암기전에 대한 실험연구가 필요하며, 이를 바탕으로 扶正法을 임상에서 어떻게 적용할 것인지 깊이 있는 논의와 연구가 필요할 것이다. 아울러 扶正法과 祛邪法 양자를 적절히 운용하여 扶正祛邪法의 관점에서 다양한 한약물의 조합을 통해 한약물의 항암효과에 대한 보다 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

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

1. 당귀, 칠피, 천화분에서 SNU-80의 생존율을 감소시켰다.
2. cleaved caspase-8, cleaved caspase-3, cleaved PARP가 모두 천화분에서 강하게 발현되었다.
3. 칠피, 천화분에서 SNU-80의 전이율을 감소시켰다.
4. 칠피, 천화분에서 SNU-80의 침윤율을 감소시켰다.

5. 황기, 당귀, 칠피, 천화분에서 VEGF와 MMP-2의 발현을 억제하였다.

이상의 실험결과로부터 황기, 당귀, 칠피, 천화분이 각각 역형성감상선암세포인 SNU-80에 대해 항암효과를 가지고 있음을 확인하였으며, 특히 칠피와 천화분의 경우 매우 높은 항암효과를 보였다.

참고문헌

1. 대한내과학회. 해리슨내과학 제17판. 서울:도서출판 MIP. 2010;2699, 2703.
2. 대한병리학회. 병리학 제6판. 서울:KMS. 2007;904, 916.
3. Pasiaka JL. Anaplastic Thyroid Cancer. *Curr Opin Oncol*. 2003;15:78-83.
4. Kim TY, Kim KW, Jung TS, Kim JM, Kim SW, Chung KW, Kim EY, Gong G, Oh YL, Cho SY, Yi KH, Kim WB, Park Do J, Chung JH, Cho BY, Shong TK. Prognostic Factors for Korean Patients with Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Head Neck*. 2007;29:765-72.
5. 최현정, 김태용, 김의용, 김원구, 김원배, 송영기. 심바스타틴이 미분화 갑상선암 세포주의 성장 및 침습에 미치는 영향. *대한내분비학회지*. 2008;23(4):238-44.
6. 류기원, 전병욱, 류봉하, 박동원. 암에 대한 한의학적 인식 및 실험적 연구에 관한 고찰. *대한한방중앙학회지*. 1995;1(1):29-54.
7. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林書院. 1995;13-42.
8. 전통의학연구소. *한의학사전*. 서울:成輔社. 2001;233.
9. 정재중, 구선영, 임새롬, 성정석, 김동일. 四物湯加味方의 항암효과에 대한 실험적 연구. *대한한방부인과학회지*. 2010;23(3):38-55.
10. 전국한의과대학 본초학공동교재 편집위원회. *本草學*. 서울:永林社. 2012; 205, 477, 573, 577, 630.
11. 주영중, 정종길. *약용자원식물학*. 서울:永林社. 2005; 207, 239, 247.
12. 中藥大辭典 編纂委員會. 中藥大辭典. 서울:정담. 1997; 4374.
13. 이현희, 임은미. 자궁경부암세포에 대한 天花粉의 성장억제 및 세포사멸효과. *대한한방부인과학회지*. 2005;18(3):77-91.
14. 최태연, 이성원, 류연희, 반효정, 서근영, 김재효, 안성훈, 손인철. 천화분 약침액의 A549 폐암 세포주에서 apoptosis 유발효과. *경락경혈학회지*. 2010;27(4):15-23.
15. 최원철, 이재호, 이은옥, 이효정, 윤성우, 안규석, 김성훈. 법제 옷나무 추출물의 혈관형성저해 및 항암효과에 대한 연구. *대한암한의학회지*. 2006;11(1):23-30.
16. 의학교육연수원. *가정의학*. 서울:서울대학교 출판부. 2003;470-1, 475.
17. Yawara Yoshitoshi. 內科診斷學 改訂6版. 서울:제일의학사. 1994;538.
18. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:여강출판사. 2001;2253.
19. 傳統文化研究所. 東洋醫學大辭典. 서울:成輔社. 2000; 467, 1080.
20. 김성동. 白花蛇舌草로부터 분리한 ursolic acid의 자연살해효과와 항전이작용. *대전대학교한의학회 연구소논문집*. 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. 파두를 가미한 사군자탕 및 사물탕의 항암효과에 대한 연구. *동의병리생리학회지*. 1994;9(1):79-100.
24. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol*. 2012;34(3):255-62.
25. Liwak U, Faye MD, Holcik M. Translation control in apoptosis. *Exp Oncol*. 2012;34(3):218-30.
26. Weerasinghe P, Buja LM. Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp Mol Pathol*. 2012.
27. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012;45(6):487-98.

28. Perrin AJ, Gunda M, Yu B, Yen K, Ito S, Forster S, Tissenbaum HA, Derry WB. Noncanonical control of *C. elegans* germline apoptosis by the insulin/IGF-1 and Ras/MAPK signaling pathways. *Cell Death Differ.* 2012.
29. Bhujade A, Gupta G, Talmale S, Das SK, Patil MB. Induction of apoptosis in A431 skin cancer cells by *Cissus quadrangularis* Linn stem extract by altering Bax-Bcl-2 ratio, release of cytochrome c from mitochondria and PARP cleavage. *Food Funct.* 2012.
30. Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JH, Murphy BM. Targeting the anti-apoptotic bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol.* 2012;34(3):192-9.
31. Monian P, Jiang X. Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: regulation post cytochrome C release. *Exp Oncol.* 2012;34(3):185-91.
32. Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol.* 2012;34(3):165-75.
33. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.* 2005;294:23-9.
34. Marshall J. Transwell(®) invasion assays. *Methods Mol Biol.* 2011;769:97-110.
35. 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.
36. Wang L, Wang X, Liang Y, Diao X, Chen Q. S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by up-regulating matrix metalloproteinase-13. *Acta Biochim Pol.* 2012.
37. Gao W, Sweeney C, Walsh C, Rooney P, McCormick J, Veale DJ, Fearon U. Notch signalling pathways mediate synovial angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2. *Ann Rheum Dis.* 2012.
38. Aricò A, Giantin M, Gelain M, Riondato F, Mortarino M, Comazzi S, Dacasto M, Castagnaro M, Aresu L. Matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor expression in canine leukaemias. *Vet J.* 2012.
39. 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.* 2012.
40. 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.
41. Li X, Ji Z, Ma Y, Qiu X, Fan Q, Ma B. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 in sacral chordomas. *Oncol Lett.* 2012;3(6):1268-74.
42. Peter Hornbeck, Scott E, Winston, Steven A, Fuller. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). *Current protocols.* 2001.