

## 漆皮 추출물의 담도암 세포주 SNU-1079와 SNU-1196에 대한 항암효과

정보배, 김영철  
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

---

### Study on Anti-Cancer Effects of *Rhus Verniciflua* Stokes Extracted with Sterile Distilled Water on Two Cholangiocarcinoma Cell Lines, SNU-1079 and SNU-1196

Bo-bae Joung, Young-chul Kim  
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives:** This study was performed to investigate the anti-cancer effects of *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) extracted with sterile distilled water on cholangiocarcinoma cell lines.

**Materials and Methods:** Two cholangiocarcinoma cell lines, SNU-1079 and SNU-1196, were used in this study. Cells were treated with different concentrations of RVS for 24, 48, and 72 hours. Cell count, viability, apoptosis, and mRNA expression of Bax, Bcl-2, Mcl-1, survivin, caspase-3, and cyclin D1 and P21 were determined with an automatic cell counter (ADAM-MC), MTT assay, apoptosis assay (Annexin-V/PI staining), and RT-PCR.

**Results:** All cells treated with RVS showed decreased cell counts in a dose-dependent manner. RVS inhibited proliferation of SNU-1196 in a dose-dependent manner, but SNU-1079 proliferation was inhibited in the long-time culture group in a dose-dependent manner. The proportion of early and late-stage apoptotic cells was increased by RVS in a dose-dependent manner in SNU-1196. In contrast, it was increased significantly in SNU-1079 treated with high-dose RVS. After treatment with RVS, the mRNA expression of Bcl-2 was decreased while Bax was increased in SNU-1079. Cyclin D1 mRNA levels were decreased in SNU-1196 in a dose-dependent manner. P21 expression was increased in all cells after the treatment with RVS.

**Conclusions:** RVS appears to have potential as a therapeutic agent for cholangiocarcinoma.

**Key words:** *Rhus verniciflua* Stokes, Cholangiocarcinoma, Apoptosis

---

## 1. 서 론

담관의 상피세포에서 발생하는 담도암은 나이가 들수록 발생빈도가 급격하게 증가하고, 특히 간질 환과 비만 등에서 더욱 발생빈도가 증가한다. 담도

암 발생 부위의 해부학적 위치에 따라, 간내담도암, 간문부담도암, 간외담도암의 3종류로 구분하며, 그 중 간문부담도암의 발생률이 가장 높은 것으로 알려져 있다<sup>1</sup>.

우리나라 통계청에서 발표한 2010년 기준, 담도암의 5년(2006년-2010년)상대 생존율은 26.7%로, 기타 다른 암에 비해 기대되는 생존율이 낮게 보고되고 있다<sup>2</sup>. 담도암은 발병초기 임상적인 특이 증상이 없기 때문에 조기 발견과 진단이 어려워, 진단

---

· 투고일: 2015.01.12, 심사일: 2015.03.11, 게재확정일: 2015.03.17  
· 교신저자: 김영철 서울시 동대문구 회기동 1번지  
경희대학교 대학원 한의학과 간계내과학교실  
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120  
E-mail: yckim@khmc.or.kr

후 의학적으로 기대되는 생존기간이 2년 정도로 예후가 매우 불량한 편이다<sup>3</sup>.

현재 시행되고 있는 담도암의 주된 치료 방법은 선행 화학요법 이후의 절제술이나 간이식 등의 수술요법이다. 하지만 진단 당시, 이미 암세포가 주변 조직을 광범위하게 침범되어 있거나, 환자의 연령이나 건강상태 등의 요인으로 제한된 수술만이 가능한 경우가 대부분이다<sup>4</sup>. 따라서 담도암 환자의 생존율을 높이기 위한 치료방법에 대하여 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

漆皮는 옷나무의 껍질로, 이미 15세기경부터 동아시아 지역에서 암을 포함하여, 다양한 질환의 치료를 목적으로 사용되어온 약재이다<sup>5,6</sup>. 최근에는 약리학적으로 漆皮에 함유되어있는 flavonoid 성분이 암세포에 대한 항증식효과와 세포자멸 활성효과가 보고되면서<sup>7,8</sup> 임상에서 주목을 받고 있다. 그러나, 담도암과 관련된 漆皮의 항암 효과에 대한 실험이나 임상응용 등은 아직까지 보고된 바 없다.

이에 저자는 기원이 다른 2종류의 담도암 세포주 SNU-1079와 SNU-1196을 대상으로 漆皮의 물추출물을 투여하여 세포수, 세포증식, 세포자멸을 측정하고, 세포자멸의 경로를 관찰하기 위해 Bcl-2, Bax, Mcl-1, Survivin, Caspase-3, Cyclin D1 및 P21 mRNA 발현의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 漆皮(*Rhus verniciflua Stokes*, 이하 RVS)는, 대한약전 및 대한약전의 한약 규격주해<sup>9</sup>에 근거하였으며, 경희대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였다.

漆皮는 옷나무의 껍질로, 옷나무의 줄기에 상처를 입혀 흘러나온 樹液이 자연 건조된 덩어리인 乾漆(*Lacca Sinica Exsiccata*)과는 다르다.

#### 2) 검액의 조제

漆皮 10 kg을 멸균증류수를 이용하여 1시간 동안 180 °C에서 가열한 뒤 추출하는 것을 2회 반복하여 추출액을 취합하였다.

3시간마다 분광기 상의 400 nm 파장에서 흡광도를 측정하여, 둔화된 변화량이 5% 미만으로 감소 되었을때 추출이 완료된 것으로 판단하였으며, 총 3시간이 소요되었다. 漆皮 추출액은 Whatman 여과지로 여과한 뒤, 감압농축 하였다. 동결건조기를 이용하여 수득률 4.3%의 분말상태 칩피 0.43 kg을 얻었다. 얻어진 동결건조 분말은 -80 °C 냉동고에 보관하고, 사용 시 해동 후, 증류수에 녹여서 0.2 µm syringe filter로 여과하여 필요한 농도(0, 50, 100, 200, 400 µg/ml)로 희석하여 사용하였다.

#### 3) 세포 배양 및 시약

한국 세포주 은행에서 기원이 다른 사람 담도암 세포주 2종류, SNU-1079(biliary tract cancer, intrahepatic duct)와 SNU-1196(biliary tract cancer, hepatic duct bifurcation)를 분양받아 사용하였다.

RPMI 1640 배양액에 FBS 10%와 penicillin/streptomycin 1%를 첨가한 뒤, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 환경에서 배양하였다.

## 2. 방법

#### 1) 세포수 분석

ADAM-MC(한국, Nanoteck Inc.)를 사용하였고, 제작사의 지시에 따라 측정하였다.

#### 2) 세포증식 분석

세포 증식은 CellTiter 96 AQueous One solution kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석으로 측정하였다.

SNU-1079와 SNU-1196 세포주를 각 1×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96-well plate에 분주하고, 漆皮 추출물을 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도로 처리한 뒤, 24, 48, 72시간 동안 배양하였다.

담도암 세포의 생존율은 PMS/MTS solution을

이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 보았다.

### 3) 세포자멸 분석

Annexin-V/PI assay kit(BD Biosciences, USA)를 사용하여, 漆皮 추출물에 의한, 담도암 세포주의 세포자멸을 확인하였다.

漆皮 추출물을 각 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도로 처리한 SNU-1079와 SNU-1196 세포주를 ice-cold PBS buffer로 2차례 씻어내고, 500 µl binding buffer에서 재침전한 뒤, FITC 결합 Annexin-V(10 mg/ml)와 PI(50 mg/ml) 5 µl로 염색하여, 실온의 어두운 환경에서 5-15분가량 배양하고, FACSCalibur(Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

FITC에만 양성반응을 보이는 세포는 초기 세포자멸, FITC와 PI에 모두 양성반응을 보이는 세포는 후기 세포자멸 단계로, 이 두 가지 단계의 세포수 비율의 합으로 SNU-1079와 SNU-1196 세포주의 세포자멸을 평가하였다.

### 4) 역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석

SNU-1079와 SNU-1196 세포주를 6-well plate에 분주하고, 漆皮 추출물을 각 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도로 처리하였다. 각 24, 48, 72시간이 경과한 뒤, Qiagen사의 RNeasy Mini Plus Kit를 이용하여 제작사가 원하는 방법에 따라 RNA를 분리하였다.

Complementary DNA(이하 cDNA)는 Fermentas사의 RevertAids First-Strand cDNA Synthesis Kit를 사용하여 역시 제작사의 방법에 따라 합성하였다. random primer 1 µg과 RNA 1 µg을 포함하는 시료에 DEPC-처리된 증류수를 합하여 총 12 µl가 되도록 조절한 뒤, 65 °C에서 5분간 가열하고 5분간 얼음에 두었다. 다음으로, 5x reaction buffer(250 µM Tris-HCL, pH8.3) 4 µl와 RiboLock™ RNase Inhibitor(200 U/µl) 1 µl, 10 µM deoxynucleoside triphosphate(dNTP) MIX 2 µl, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) 1 µl을 넣고 전체 부피를 20 µl 되도록 조절한 뒤 부드럽게 흔들어서 잘 섞어주었다. 25 °C에 5분간, 42 °C에 60분간, 70 °C에 5분간의 조건으

로 반응시키고, 합성된 DNA는 -80 °C에서 보관하였다가 꺼내서 사용하였다.

Primer 합성은 Bioneer(대전, 한국)에 의뢰하여 제작하였으며, β-actin을 House keeping gene으로 사용하였다. Target gene으로는 Bcl-2, Bax, Mcl-1, Survivin, Cyclin D1, P21, Caspase-3를 사용하였다.

RT-PCR은 Applied Biosystem사(CA, USA)의 StepOnePlus RT PCR System을 이용하여 제작사가 원하는 방법에 따라 시행하였으며, House keeping gene인 β-actin을 기준으로 상대적인 유전자의 발현값을 정량적으로 표현하였다.

2x SYBR Green PCR Master Mix 10 µl, cDNA 1 µl, primer(sense) 1 µl, primer(anti-sense) 1 µl, Distilled water 7 µl를 혼합하여 전체 부피를 총 20 µl로 조절하였고, 초기변성(denaturation)은 첫 cycle만 95 °C에서 3분간, 나머지 40cycle까지는 95 °C에서 10초간, 풀림(annealing)은 60 °C에서 10초간, 연장(extension)은 72 °C에서 15초간으로 하여 증폭시켰다(Table 1).

Table 1. Primer Sequence for PCR

Genes	Primer sequence	Size (bp)
Bcl-2	5'-GATTGATGGGATCGTTGCCTTA-3'	200
	5'-CCTTGGCATGAGATGCAGGA-3'	
Bax	5'-GGATGCGTCCACCAAGAAG-3'	216
	5'-GCCTTGAGCACCAGTTTGC-3'	
Mcl-1	5'-CTCATTTCTTTTGGTGCCTTT-3'	117
	5'-CCAGTCCCGTTTTGTCCCTTAC-3'	
Survivin	5'-GGCCCAGTGTTCCTTCTGCTT-3'	91
	5'-GCAACCGGACGAATGCTTT-3'	
Cyclin D1	5'-CCGTCCATGCGGAAGATC-3'	86
	5'-ATG GCC AGC GGG AAG AC-3'	
P21	5'-CAGACCAGCATGACAGATTTTC-3'	66
	5'-TTAGGGCTTCCCTTTGGAGA-3'	
Caspase-3	5'-CAGTGGAGGCCACTTCTTG-3'	102
	5'-TGGCACAAAGCGACTGGAT-3'	
β-actin	5'-GCCAGAAGATGACCCAGATC-3'	77
	5'-GGATAGCACAGCCTGGATAG-3'	

### 3. 통계 분석

실험을 통해 얻어진 모든 데이터는 평균(Mean) ± 표준편차(SD) 혹은 평균(Mean) ± 표준오차(SEM)로 표기하였고, Excel program의 Student's t-test를 통해 대조군과 실험군의 데이터 차이를 비교하였다. P<0.05 기준으로 통계적 유의성을 평가하였다.

## III. 결 과

### 1. 漆皮 추출물이 담도암 세포주 세포수에 미치는 영향

각 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도의 漆皮 추출물을 SNU-1079와 SNU-1196 세포주에 투여하여 24, 48, 72시간까지 배양한 결과, 두 세포주에서 모두 농도 의존적으로 세포수가 감소하였다(Fig. 1).

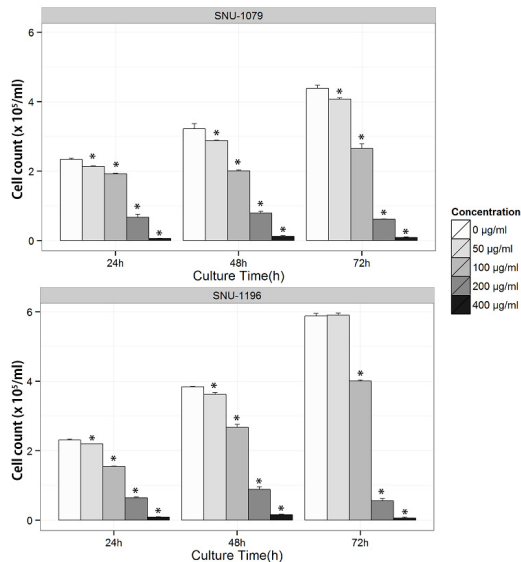


Fig. 1. Effects of RVS on cell counting of biliary tract cancer cells.

Biliary tract cancer cells were treated with various concentrations of RVS (0-400 µg/ml) for 24, 48, 72 hours. Cell counting was determined by the ADAM-MC. The data represent the mean ± SD of triplicate samples. \*p<0.05 compared to control.

### 2. 漆皮 추출물이 담도암 세포주 세포증식에 미치는 영향

SNU-1079와 SNU-1196 세포주에 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도의 漆皮 추출물을 투여하여 24, 48, 72시간동안 배양한 결과, 전 시간에 걸쳐 농도의존적으로 세포증식이 억제되는 SNU-1196과 달리, SNU-1079 세포주에서는 72시간에서 농도의존적으로 유의하게 세포 증식이 억제되었다(Fig. 2).

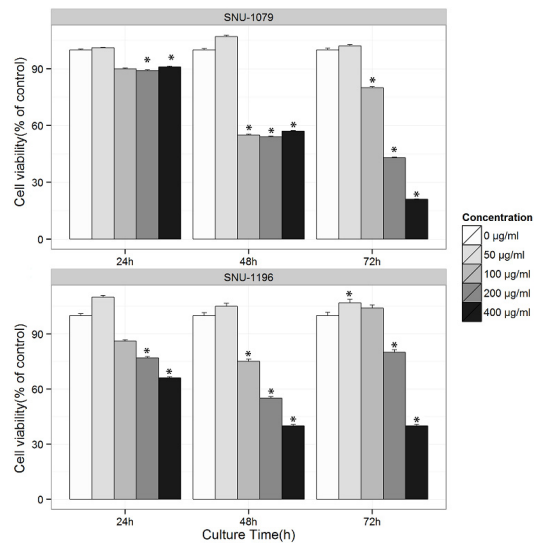


Fig. 2. Effects of RVS on cell viability of biliary tract cancer cells.

Biliary tract cancer cells were treated with various concentrations of RVS (0-400 µg/ml) for 24, 48, 72 hours. Cell viability was determined by the MTT assay. The data represent the mean ± SD of triplicate samples. \*p<0.05 compared to control.

### 3. 漆皮 추출물이 담도암 세포주 세포자멸에 미치는 영향

SNU-1079와 SNU-1196 세포주에 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도의 漆皮 추출물을 투여하고 24, 48, 72시간 배양하여 세포자멸 효과를 관찰한 결과, SNU-1196 세포주에서 48시간 배양시 농도 의존적으로 세포자멸이 증가하였고, SNU-1079 세포주에서는 400 µg/ml의 고농도 투여에서 세포자멸이 증가하였다(Fig. 3, Fig. 4).

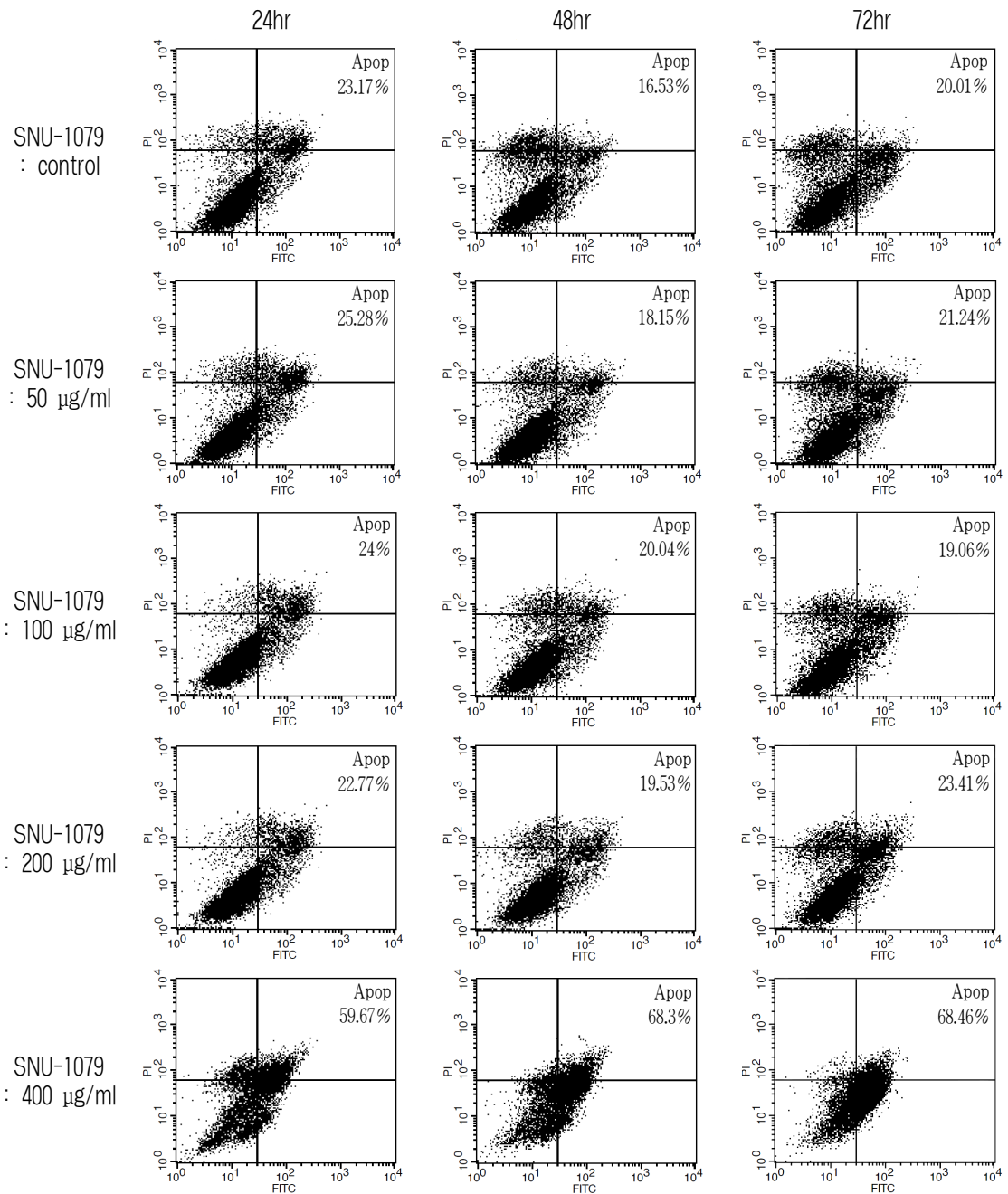


Fig. 3. FACS histograms of apoptosis assays by Annexin V-FITC/PI staining method in SNU-1079.

The proportion of early and late stage apoptotic cells which were treated with 400 µg/ml of RVS was increased significantly.

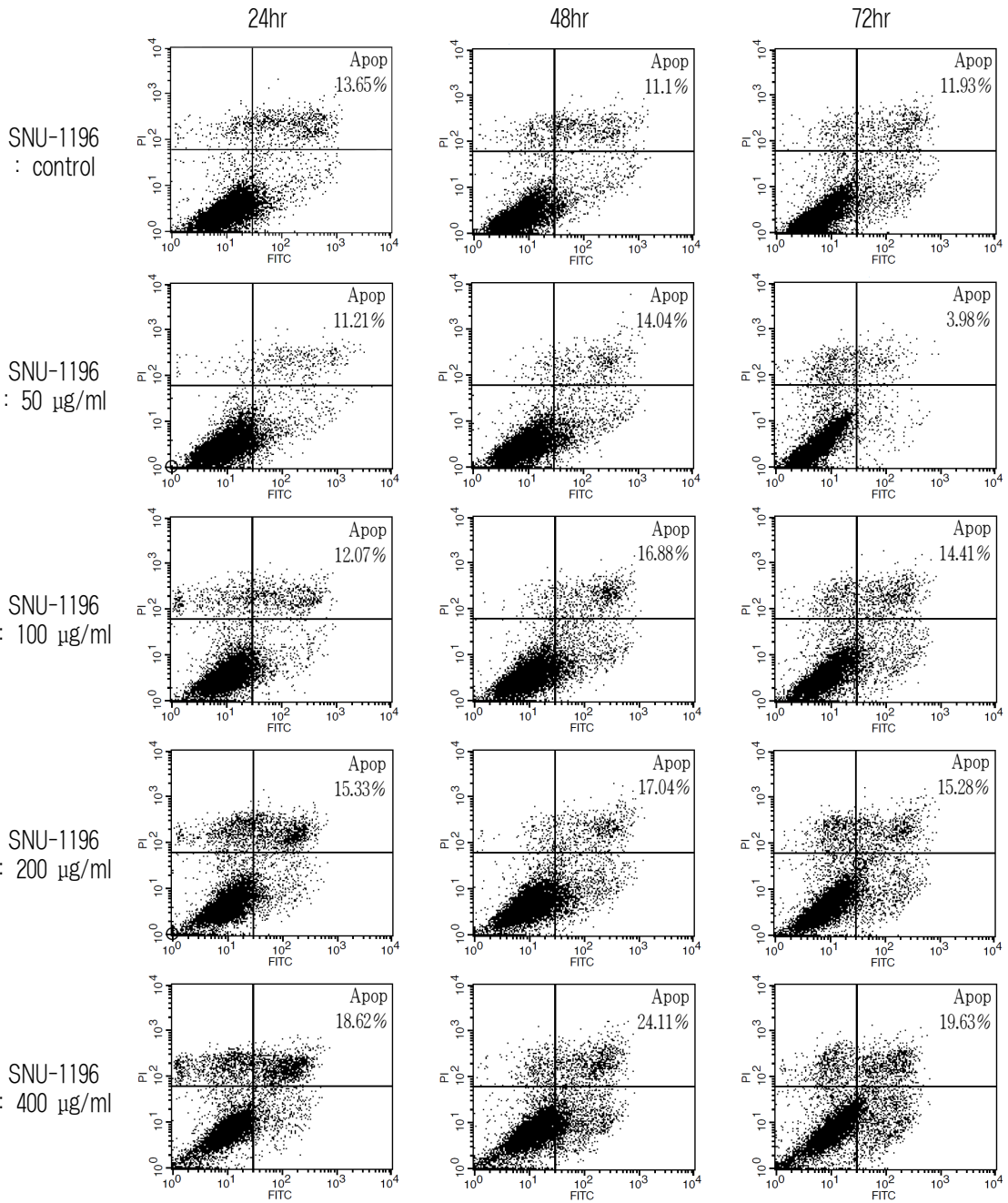


Fig. 4. FACS histograms of apoptosis assays by Annexin V-FITC/PI staining method in SNU-1196.

The proportion of early and late stage apoptotic cells was increased by RVS with dose-dependent manner for 48 hours.

4. 漆皮 추출물에 의한 Bcl-2, Bax, Mcl-1 mRNA 발현의 변화

각 세포주에 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도의 漆皮 추출물을 투여하여 24, 48, 72시간동안 Bcl-2, Bax, Mcl-1 mRNA 발현을 관찰하였다.

SNU-1079 세포주의 경우 200 µg/ml 투여시 Bax

mRNA 발현이 유의하게 증가하였으며, 같은 농도에서 Bcl-2 mRNA 발현은 유의하게 감소하였으나, Mcl-1은 mRNA 발현의 차이가 없었다. 한편 SNU-1196 세포주에서는 Bcl-2, Bax, Mcl-1 모두 漆皮 추출물의 농도와 시간에 따른 유의한 mRNA 발현의 차이가 없었다(Fig. 5).

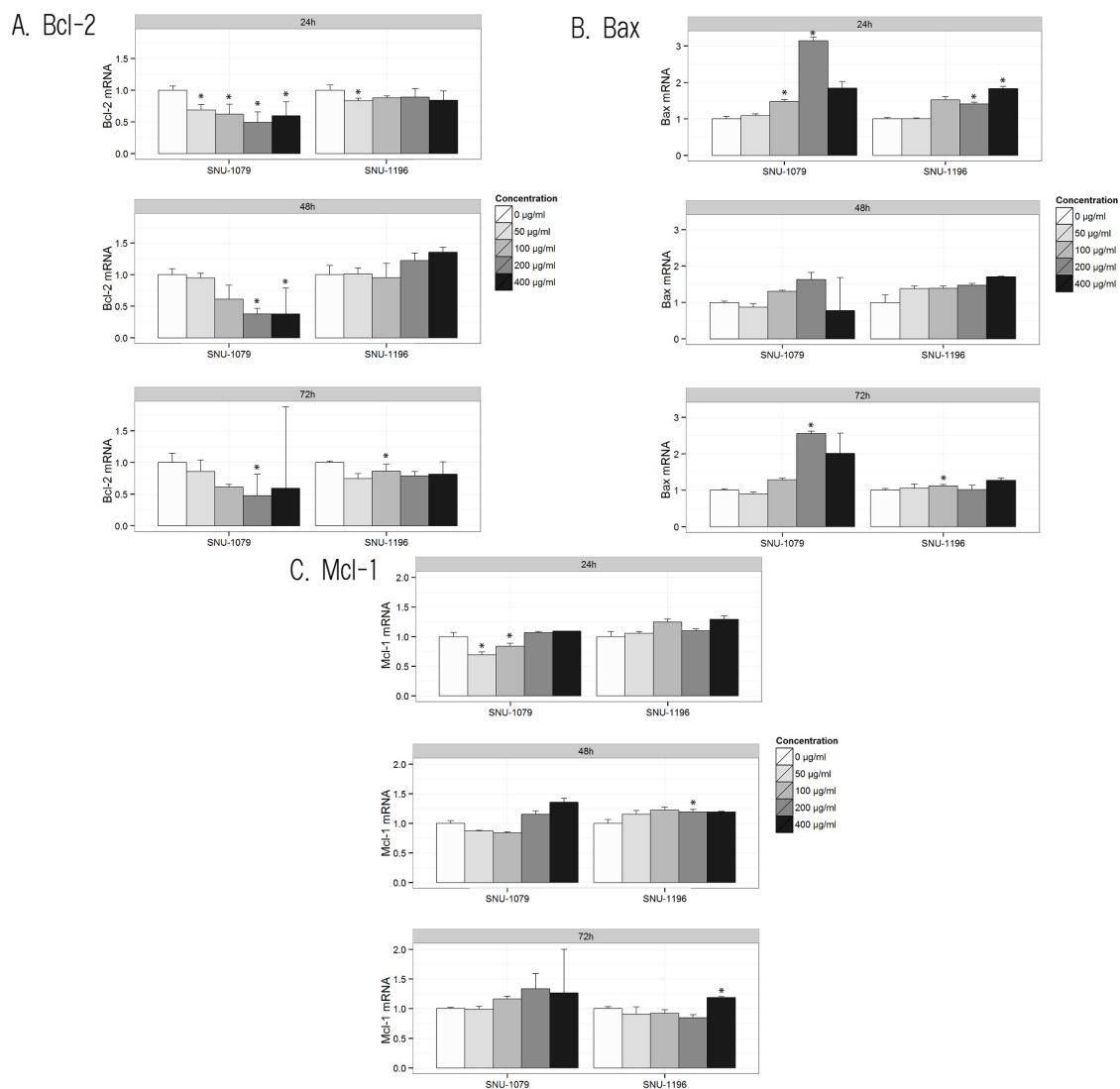


Fig. 5. Effects of RVS on the expression of Pro- and Anti-apoptotic mRNAs in SNU-1079 and SNU-1196.

Cells were cultured with 0, 50, 100, 200, 400µg/ml of RVS for 24, 48, 72 hours and RNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of Bcl-2 (A), Bax (B), Mcl-1 (C) with β-actin was applied to the formula, 2<sup>-</sup>(targetgene-β-actin), and relative amounts were quantified. The data represent the mean ± SEM of triplicate samples. \*p<0.05 compared to control.

5. 漆皮 추출물에 의한 Survivin, Caspase-3 mRNA 발현의 변화

SNU-1079와 SNU-1196 세포주에 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도의 漆皮 추출물을 투여하여 24, 48,

72시간동안 Survivin, Caspase-3 mRNA 발현을 관찰한 결과, 두 세포주 모두에서, 농도와 시간에 따른 유의한 Survivin mRNA 발현의 감소나 Caspase-3 mRNA 발현의 증가는 볼 수 없었다(Fig. 6).

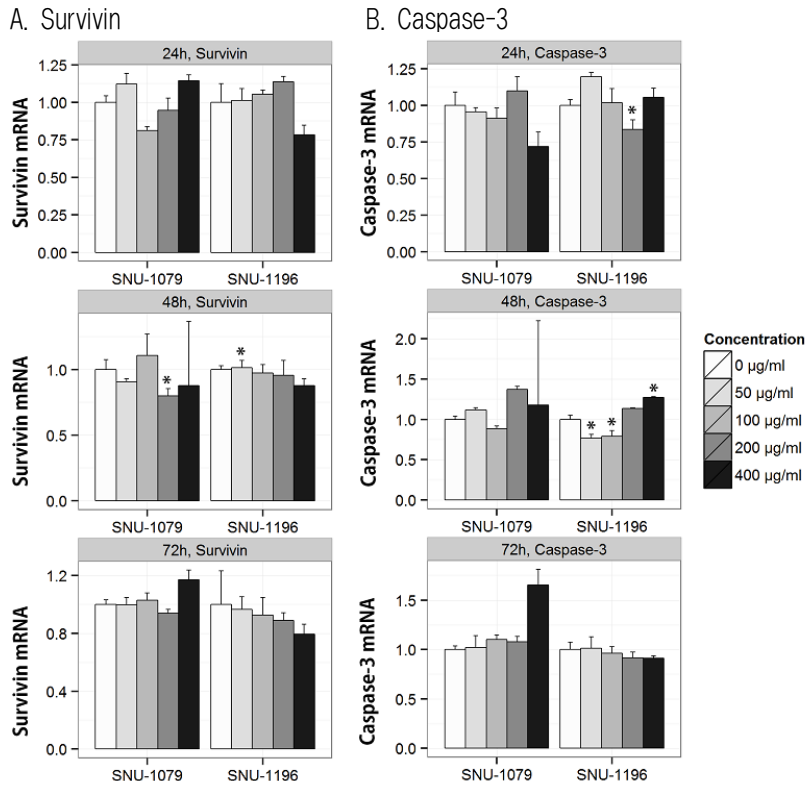


Fig. 6. Effects of RVS on the expression of Survivin, Caspase-3 mRNAs in SNU-1079 and SNU-1196.

Cells were cultured with 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml of RVS for 24, 48, 72 hours and RNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of Survivin (A), Caspase-3 (B) with β-actin was applied to the formula, 2<sup>-(targetgene-β-actin)</sup>, and relative amounts were quantified. The data represent the mean ± SEM of triplicate samples. \*p<0.05 compared to control.

6. 漆皮 추출물에 의한 Cyclin D1, P21 mRNA 발현의 변화

0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도의 漆皮 추출물을 투여한 뒤 각 세포주에서 24, 48, 72시간동안 Cyclin D1, P21 mRNA 발현을 살펴본 결과, SNU-1079 세포주에서 200 µg/ml 농도의 漆皮 추출물 투여시

P21 mRNA 발현이 유의하게 증가하였다.

SNU-1196 세포주에서는 농도 의존적으로 P21 mRNA 발현이 증가하는 경향으로, 특히 200, 400 µg/ml 농도에서 유의하게 증가하였다. Cyclin D1 mRNA 발현은 48시간 배양에서 유의하게 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 7).



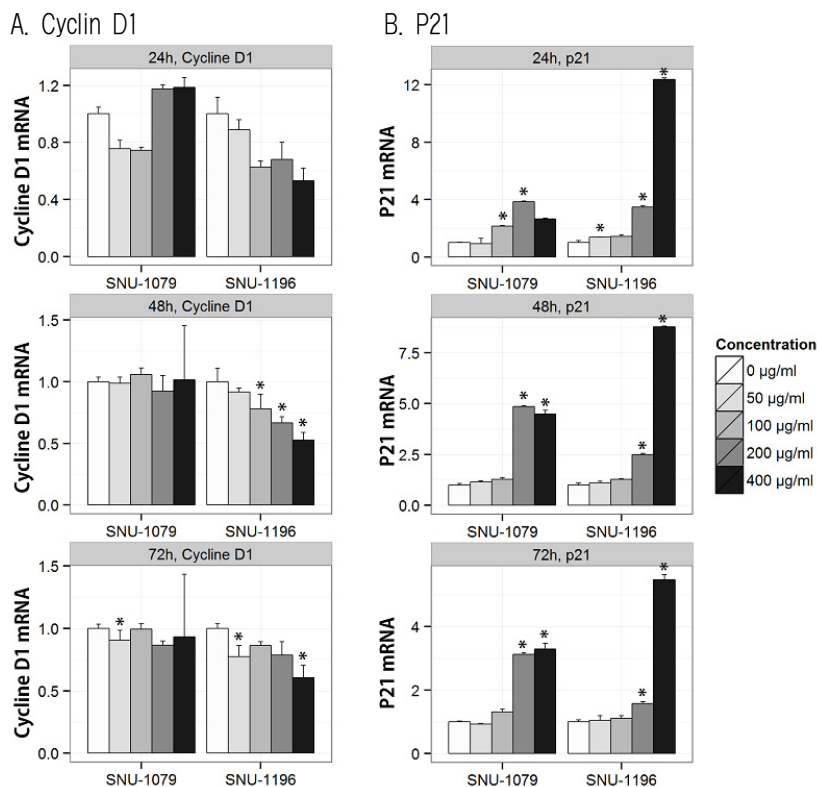


Fig. 7. Effects of RVS on the expression of Cyclin D1, P21 mRNAs in SNU-1079 and SNU-1196.

Cells were cultured with 0, 50, 100, 200, 400 μg/ml of RVS for 24, 48, 72 hours and RNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of Cyclin D1 (A), P21 (B) with β-actin was applied to the formula,  $2^{-(\text{targetgene}-\beta\text{-actin})}$ , and relative amounts were quantified. The data represent the mean ± SEM of triplicate samples. \*p<0.05 compared to control.

#### IV. 고찰

담도암은 악성 간종양 중 두 번째로 흔하게 보이는 종양으로, 발병 초기 임상적인 특이 증상이 없어 조기 발견과 진단이 어렵기 때문에, 진단 후 기대 생존기간이 2년 정도로 예후가 불량하다<sup>3</sup>. 현재 수술 요법이 담도암의 가장 일반적인 치료법이지만, 이미 진단 당시 수술이 가능한 환자가 많지 않고 또한 수술 후에도 재발이 흔한 질환이다<sup>4</sup>. 따라서, 담도암의 발생률은 점차 증가하고 있는 반면, 5년 상대생존율은 낮은 편으로 상대생존율이 증가 추세인 다른 암들에 비해 생존율 증가가 더딘 상

황이다<sup>2</sup>.

한의학에서도 한의학적 접근을 통한 담낭암 및 담도암 치료효과에 대한 증례보고<sup>10-12</sup>가 진행 중에 있으며, 앞으로도 보다 다양한 접근과 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한약재 중 漆皮의 flavonoid 성분이 암세포에 대한 항증식효과, 세포자멸 활성효과가 있음이 밝혀지면서 항암 치료제로 주목 받기 시작했고, 이미 임상에서 漆皮 추출물이 유방암<sup>13</sup>, 림프암<sup>14</sup> 등의 치료에 효과적임이 보고된 바 있다. 담도암은 암세포 주위에 밀도가 높은 기질을 가지고 있다는 것이 특징인데, 이러한 기질에는 암 발생과 관련된 섬유

아세포들이 다량 함유되어 있다<sup>15-17</sup>. 그 중, 기질금속단백분해효소(Matrix metalloproteinases, MMPs : MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9)가 세포외기질을 재구성하여 암세포의 주변조직 침윤과 이동을 용이하게 하는 역할을 하는데<sup>18</sup>, 사람의 섬유육종 HT1080 세포에서 漆皮 추출물이 MMP-2와 MMP-9의 농도를 감소시키는 역할을 함이 밝혀진 바 있다<sup>19,20</sup>.

이에 저자는, 漆皮 추출물이 담도암의 치료에 효과가 있을 것이라 예측하고, 그 항암효과를 관찰하고자 세포수 관찰, MTT assay, apoptosis assay, RT-PCR을 시행하였다.

먼저 漆皮 추출물이 담도암 세포주의 세포활성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포수 관찰과 MTT assay를 시행하였다. 실험 시 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 漆皮 추출물을 처리하고, 24시간, 48시간, 72시간동안 배양하였다. 실험결과 SNU-1079과 SNU-1196 세포주 모두에서 농도 의존적으로 세포수가 감소하였다. 세포활성도는 SNU-1196에서 전 시간에 걸쳐 농도 의존적으로 활성도가 감소하였고, SNU-1079에서는 72시간에서 농도 의존적으로 감소하였다. 이는, SNU-1079의 doubling time이 72시간이기 때문에 나타나는 결과로 생각되며, 상대적으로 doubling time이 짧은 SNU-1196에서는 단기간 漆皮 추출물을 투여하여도 증식 억제가 나타나는 것으로 예측된다. 또한, 50 µg/ml 농도에서는 두 세포주 모두에서 증식 억제가 유의성 있게 나타나지 않는 것으로 보아, 치료시 일정 농도 이상의 漆皮 추출물 투여가 필요할 것으로 사료된다.

담도암 세포주의 세포자멸을 관찰하기 위해, Annexin-V/PI staining을 이용하였다. SNU-1196에서는 48시간 배양에서 농도 의존적으로 세포자멸이 증가하는 모습이나, SNU-1079에서는 400 µg/ml 고농도에서 세포자멸이 증가하는 결과를 보였다. 이는 두 세포의 기원차이를 고려해 볼 때, SNU-1079와 같은 intrahepatic duct 기원 즉, 간내담도암의 경우에는 漆皮 추출물을 고농도로 투여하는 것이 보다

효과적일 것으로 판단된다.

또한, 漆皮 추출물에 의한 세포자멸이 어떤 경로를 거쳐 발휘되는지 더 자세히 알아보기 위해, 몇 가지 target gene을 대상으로 RT-PCR을 시행하였다. 세포자멸은 세포 표면에서 외부 인자가 death receptor에 결합하면서 시작되는 외인성 경로와, 세포 내부 미토콘드리아의 막 투과성이 높아지면 세포자멸을 위한 단백질이 분비되면서 시작되는 내인성 경로의 2가지로 분류된다<sup>21</sup>.

먼저 Bcl-2 family로 pro-apoptotic(Bax) 작용과 anti-apoptotic(Bcl-2, Mcl-1) 작용으로 세포자멸을 조절<sup>22</sup>하는 3가지 mRNA 발현을 관찰한 결과, SNU-1079 세포주에서 세포자멸을 유도하는 Bax의 발현 증가와 세포자멸을 방해하는 Bcl-2의 발현 감소가 유의하게 나타났으나, SNU-1196 세포주에서는 유의한 결과를 보이지 않았다.

Survivin은 IAP family로, 내인성 세포자멸을 실행하는 Caspase-3에 물리적으로 결합하여 활성화를 방해하는 역할을 하는 단백질이다<sup>23</sup>. 본 실험에서는 두 가지 세포주 모두에서, 유의미한 Survivin mRNA 발현의 감소나 Caspase-3 mRNA 발현의 증가는 없었다. 이러한 결과는, 기존의 보고였던茵陳, 地榆 추출물이 Caspase 발현을 유의미하게 증가시켜 담도암 세포에 항암 효과<sup>11,12</sup>를 갖는 것과는 달리, 漆皮의 암세포주에 대한 세포자멸은 주로 외인성 경로와 관련되는 것이다.

마지막으로 G1기에서 S기로의 이행을 주도하는 Cyclin D와 이러한 Cyclin D에 결합하는 Cyclin 의존인산화효소의(Cdk4 등) inhibitor 역할을 하는 P21의<sup>24,25</sup> mRNA 발현을 관찰한 결과, SNU-1196 세포주에서 농도 의존적으로 Cyclin D1 발현이 감소하는 경향을 보였으며, P21의 경우 200 µg/ml 농도에서 두 세포주 모두에서 mRNA 발현이 증가하였다.

본 연구에서는 漆皮 추출물이 세포자멸 실행 단계 뿐 아니라, 조절 단계에서도 유효하게 작용하는 것을 알 수 있었다. 특히 SNU-1079 세포주에서는 외인성 경로, SNU-1196 세포주에서는 세포주기 조

절을 통한 세포자멸 효과와 밀접한 관련이 있음을 나타낸다.

다만, 이와 같은 담도암의 발생 부위에 따른 세포자멸기전 차이와 효과적인 치료 농도 및 시간에 대해서는 향후 추가적인 연구가 좀 더 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

기원이 다른 두 종류의 담도암 세포주 SNU-1079 와 SNU-1196을 대상으로, 漆皮 추출물의 항암효과를 알아보기 위해, 세포수 측정, MTT assay, apoptosis assay(Annexin-V/PI staining), RT-PCR을 시행하였고, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 漆皮 추출물을 처리한 두 가지 세포주 모두에서 농도 의존적으로 세포수가 감소하였다.
2. 漆皮 추출물은, SNU-1196 세포주에서 전 시간에 걸쳐 농도 의존적으로 세포 증식을 억제하였고, SNU-1079 세포주에서는 72시간에서 농도 의존적으로 세포증식을 억제하였다.
3. 漆皮 추출물을 처리한 SNU-1196 세포주에서는 농도 의존적으로 세포 자멸이 증가하였으나, SNU-1079 세포주에서는 400 µg/ml 고농도에서 급격하게 세포 자멸이 증가하였다.
4. 漆皮 추출물을 처리한 SNU-1079 세포주에서 Bax mRNA의 발현 증가와 Bcl-2 mRNA의 발현 감소가 유의하게 나타났으나, SNU-1196 세포주에서는 상대적으로 약하게 나타났다.
5. 漆皮 추출물을 처리한 두 가지 세포주 모두에서, 유의한 Survivin mRNA 발현의 감소나 Caspase-3 mRNA 발현의 증가는 없었다.
6. 漆皮 추출물을 처리한 SNU-1196 세포주에서 48 시간 배양시 농도 의존적으로 Cyclin D1 발현이 감소하는 경향을 보였으며, P21의 경우 200 µg/ml 농도의 두 가지 세포주 모두에서 유의하게 mRNA 발현이 증가하였다.

이상의 결과에서, 漆皮의 물추출물은 담도암세포주의 증식을 억제하는 효과가 있으며, 세포자멸을 유도할 뿐 아니라 세포주기 조절의 단계에서도 유효한 것으로 판단되어 담도암 치료에 유효할 것으로 사료된다. 다만 漆皮 투여에 대한 담도암 발생부위별 반응 및 기전의 차이에 대하여는 향후 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg* 2007;245:755-62.
2. 보건복지부 통계포털 : 2014.[2014.11.5.검색]. Available at: [http://stat.mw.go.kr/front/statData/publicationView.jsp?menuId=47&nttSeq=20640&bbbsSeq=13&nttClsCd=중앙행정기관-보건복지부-통계 발간물-주제별-질병/건강-국가암 등록사업 연례보고서\(2010년 암 등록통계\)](http://stat.mw.go.kr/front/statData/publicationView.jsp?menuId=47&nttSeq=20640&bbbsSeq=13&nttClsCd=중앙행정기관-보건복지부-통계 발간물-주제별-질병/건강-국가암 등록사업 연례보고서(2010년 암 등록통계))
3. Blechacz BG, Gores GJ. Tumors of the bile ducts, gallbladder and ampulla. In: Feldman ed. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease. Volume 1. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2010, p. 1171-6.
4. Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M. Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma 1990-2009. *World Journal of Gastroenterology* 2009;15:4240-62.
5. Son YO, Lee KY, Lee JC, et al. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicology Letters* 2005;155(1):115-25.
6. Jang HS, Kook SH, Son YO, et al. Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human

- osteosarcoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1726(3):309-16.
7. Samoszuk M, Tan J, Chorn G. The chalcone butein from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured with fibroblasts. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2005;5(5).
  8. Lee JC, Lee KY, Kim J, et al. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 2004;42(9):1383-8.
  9. 지형준, 외. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍사: 1998.
  10. 송창훈, 이슬희, 김정철, 오성원, 정종진, 황진우, 등. 원위부 담도암 환자 증례보고. *대한한방내과학회지* 2006;27(3):770-5.
  11. 이경옥, 우홍정. 茵陳의 에탄올 추출물이 담도암 세포주 SNU-1196의 apoptosis에 미치는 효과에 대한 연구. *대한한방내과학회지* 2012;33(4):587-98.
  12. 박진규, 김영철. 담관암 세포주에서 地榆 에탄올 추출물의 항암 효과. *대한한방내과학회지* 2012;33(4):465-75.
  13. Lee JO, Moon JW, Lee SK, Kim SM, Kim NM, Ko SG, et al. *Rhus verniciflua* Extract Modulates Survival of MCF-7 Breast Cancer Cells through the Modulation of AMPK-Pathway. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2014;37(5):794-801.
  14. Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, et al. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 2004;42:1383-8.
  15. Junttila MR, Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013;501:346-54.
  16. Sirica AE. The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2012;9:44-54.
  17. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:392-401.
  18. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2001;33(10):960-70.
  19. Moon G, Lee SH, Park JH. Effect of allergen removed *Rhus verniciflua* extract on inhibition of tumor metastasis. *Journal of Korean Traditional Oncology* 2010;15(1):47-61.
  20. Kim JS, Park BY, Park EK, et al. Screening of antiangiogenic activity from plant extracts. *Korean Journal of Pharmacognosy* 2006;37(4):253-7.
  21. 정성훈, 김병호, 김영일, 심재준, 황보영, 장재영, 등. 담관암 세포주에서 내인성 peroxisome proliferator-activated receptor gamma 배위자인 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2의 항암효과. *대한내과학회지* 2010;78(1):75-86.
  22. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell press* 1993;74(4):609-19.
  23. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research* 1998;58(23):5315-20.
  24. Hardwick JM. Cyclin' on the viral path to destruction. *Nature Cell Biology* 2000;2(11):E203-4.
  25. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Holland JF, Frei E, et al. *Cancer medicine* 6. Hamilton, Ont: BC Decker: 2003.