

개똥썩이 난소암 세포의 사멸에 미치는 영향

동신대학교 한의과대학 부인과학교실
서국장, 조성희, 양승정, 박경미

ABSTRACT

Effects of *Artemisiae Annuae Herba* (AAH) on Cell Death of Ovarian Cancer *in Vivo* and *in Vitro* Study

Kook-Jang Seo, Seong-Hee Cho, Seung-Jung Yang, Kyung-Mi Park
Dept. of OB & GY, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

Objective: This study was designed to investigate the anti-cancer effects of AAH on ovarian cancer *in vitro* and by using allograft model *in vivo*.

Methods: In this experiment, the effects of AAH on proliferation rates, cell morphology, cell death type, cell cycle, caspase activities and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway were investigated in A2780, human ovarian cell line.

Results: AAH inhibited proliferation of A2780 cells in a dose dependent manner. In addition, AAH induced apoptosis but did not affect cell cycle of A2780 cells. AAH also effectively inhibited caspase 3 and caspase 9 activities respectively. In allograft tumor model, AAH reduced tumor volume and expanded life span in a dose dependent manner.

Conclusion: It can be inferred that AAH can induce apoptosis in ovarian cancer cells and has possibility as an anticancer agent for ovarian cancer.

Key Words: *Artemisiae Annuae Herba*, Ovarian Cancer, Apoptosis, p38 MAPK, Caspase 3, Caspase 6

I. 서 론

난소암은 노령인구의 증가 및 산업화로 인해 발생 빈도가 증가하고 있는 암으로, 미국에서는 2012년 한해 22,280건의 난소암이 새로 진단되었고 사망자도 15,500명으로 여성 암 사망자 중 5번째로 많았다¹⁾. 통계청²⁾ 자료에 따르면 한국에서 1996년에서 2000년까지보다 2009년에서 2013년까지의 난소암 환자 수가 약 1.72배로 늘었고 같은 기간 동안 5년 상대생존율은 58.9%에서 62.0%로 1.05배 증가하였다.

한의학에서 난소암은 진단 상 癥瘕의 범주에 속하는 것으로 보고 있으며³⁾, 《東醫寶鑑》에서는 腸覃, 石瘕, 血蠱는 모두 여성의 고유한 질병으로, 癥瘕의 범주에 속하지만 발생하는 위치와 정도에 따라 각기 다르다고 하였고⁴⁾, 《靈樞》〈水脹編〉에서는 腸覃을 난소질환에 대응되는 것으로 보았다⁵⁾.

난소암에 대한 국내 한의학적 연구로는 한약 복합제제를 통한 난소암 환자의 항암 화학요법 후유증 개선 효과 보고⁶⁾, 조⁷⁾와 서⁸⁾ 등의 반지련의 난소암세포의 성장 억제 효과 보고 등이 있으나 아직 난소암에 대한 다양한 증례 및 실험적 연구가 부족한 실정이다.

개똥쑥(*Artemisiae Annuae Herba*, 이하 AAH)은 한의학에서 蒿蒿로 명명되는데 性味는 寒, 苦辛하며 淸熱解暑, 除蒸, 截瘧하는 효능이 있어⁹⁾, 瘧疾 및 虛熱을 치료하는데 응용되었다¹⁰⁾. 최근 AAH 추출물의 항균, 항산화, 항염증작용¹¹⁻³⁾ 및 유방암^{14,15)}, 위암¹⁶⁾, 폐암¹⁷⁾, 간암¹⁸⁻²⁰⁾, 대장암²¹⁾, 전립선암²²⁾ 등 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

이에 본 저자는 AAH이 난소암세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 난소암 세포주에 AAH를 투여한 후 세포 증식률에 미치는 영향, 세포 사멸 양상과 관련된 기전, 암종의 크기 변화 및 생쥐의 생존율에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 세포주

인간 유래 난소암세포주인 ovarian cancer cell(A2780, carcinoma)는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 냉동상태로 구매하여 사용하였으며, 생쥐 유래 carcinoma 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구매하였고, 두 세포주 모두 일주일 이상 계대 배양하여 실험 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 동 물

7주령 된 암컷 Balb/c 생쥐를 샘타코(Incheon, Korea)에서 구입하였으며, 모든 실험동물은 일주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 온도와 습도가 조절되는 환경(24±3°C, 12-hr light-dark cycle)에서 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하며 실험에 사용하였다.

3) 약 재

AAH는 경남 산청 지역에서 수확된 지상부로 동신대학교 부속 목포 한방병원을 통하여 구입 정제하여 사용하였다.

4) 시약 및 기기

Apoptosis의 유무를 확인하기 위하여 사용된 ANNEXIN V-FITC apoptosis detection kit는 Enzo Life Sciences(Enzo

Life Sciences, Switzerland)의 제품을, Caspase 3와 Caspase 6 측정 kit은 AB cam사(AB cam, UK)의 제품을 사용하였다. 측정을 위해 사용한 기기는 유세포 분석기(BD Biosciences, USA), Micro-plate reader (Bio-rad, CA), 광학 현미경(Olympus, Japan) 등이며, 시료의 조제를 위하여 원심 분리기(Vision, Korea), 감압농축기(EYELA, Japan), 동결건조기(삼원, 한국)를 사용하였다.

2. 방 법

1) 약물의 준비

정제된 상태로 구입된 AAH 50 g을 66.6% 메탄올 1,000 ml에 침지 시키고 15분간 초음파로 진탕 한 후, 상온에서 24시간 추출하였으며, 모아진 추출액을 원심분리하여 상층액을 모은 다음, 와트만지(Watman paper)를 이용하여 2회 반복 여과하였다. 추출액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축시킨 다음 동결 건조하였다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말(AAH)은 4.0 g으로 수율은 8.0%였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관하였다.

2) 세포 배양

난소암세포주인 ovarian cancer cell (carcinoma)의 생육 배지로는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl, Sigma, USA)를 첨가하여 사용하였으며, 생쥐 유래 carcinoma 세포의 생육 배지로는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum와 penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂가 공여

되는 환경에서 유지시켰다.

3) 세포 증식율에 미치는 영향 관찰

AAH가 ovarian cancer cell(carcinoma)의 증식율에 미치는 영향 측정은 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 24-well plate에 5×10⁵ cell/well의 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 overnight incubation을 시행 후 다음날, AAH를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 인산완충액으로 가볍게 씻어낸 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)를 처리하고 다시 4시간을 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 dimethylsulfoxide에 녹인 다음 Microplate reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포 증식 양상에 미치는 영향 관찰

Ovarian cancer cell(carcinoma)에 AAH를 투여하고 24시간 뒤 역상 현미경과 카메라(Nikon ELWD, Japan)를 이용하여 세포 형태를 관찰하였다(40x).

5) 세포 사멸의 형태에 미치는 영향 관찰

AAH가 유발하는 cell death가 apoptosis에 해당하는지 확인하기 위해 Annexin V와 7-AAD를 이용하여 double staining을 시행하였다. 먼저 100 mm dish(SPL, Korea)에 5×10⁶ cell/well의 농도로 세포를 분주하고 overnight incubation을 시행하였다. 다음 날, AAH를 처리하고 24시간을 배양한 다음 배양액을 제거하고, 세포를 수거하였다. 수거된 세포는 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시킨 후 FACS tube 안으로 옮겨, 다음 냉장 환경(0~5°C)에서 annexin V와 2시간 동안 반응시켰다.

반응이 끝난 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리를 통하여 상층액을 제거하고 다시 500 μ l의 binding buffer(Enzo Life Sciences, Switzerland) FBS가 포함된 인산완충액을 넣어준 다음 7-AAD를 넣고 5분 후 유세포 분석을 시행하였다.

6) 세포 주기에 미치는 영향 관찰

세포 주기에 미치는 영향은 Krtolica 등²³⁾의 방법을 적절히 변형하여 사용하였다. 100 mm dish(SPL, Korea)에 5×10^6 cell/well의 농도로 세포를 분주하고 overnight incubation을 시행한 다음, AAH를 처리하고 24시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 제거하고, 세포를 수거하여, 75% 에탄올에 고정하였다. 고정이 끝난 후 40 μ g/ml의 RNase를 함유하고 있는 인산완충액에 부유시키고 10 μ g/ml의 PI(BD Biosciences, USA)와 함께 실온에서 30분간 반응시킨 후 유세포 분석을 시행하였다.

7) Caspase 활성화에 미치는 영향 측정

100 mm dish(SPL, Korea)에 5×10^6 cell/well의 농도로 세포를 분주하고 overnight incubation을 시행한 다음, AAH를 처리하고 24시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 제거하고, 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음, kit에 포함된 cell lysis buffer와 함께 ice 위에서 10분간 반응시켜 세포를 파괴한 후, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액 내에 있는 단백질 함량은 Bicinchoninic acid(BCA)법을 이용해 정량한 다음 200 mg의 단백질을 이용하여 caspase 3 및 caspase 6의 활성을 측정하였다. Caspase 3 및 caspase 6의 활성은 colorimetric method를 이용하여 측정되었으며, 먼저 50 μ l의 샘플과 10%의 DTT를 함유하고 있는 50 μ l의 reaction

buffer와 5 μ l의 4 mm DEVD-p-NA substrate를 첨가하고 37°C에서 2시간 반응시킨 후, Microplate reader(Bio-rad, USA)을 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Western blot analysis

먼저 100 mm dish(SPL, Korea)에 5×10^6 cell/well의 농도로 세포를 분주하고 overnight incubation을 시행하였다. 다음 날, AAH를 처리하고 24시간을 배양한 다음 배양액을 제거하고, 세포를 수거하였다. 수거된 세포는 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 cell lysis buffer(Intron, Korea)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid(BCA)법을 이용해 정량한 다음 40 μ g의 단백질을 SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 polyvinylidene fluoride membrane으로 옮긴 다음 anti-p38 antibody(1:2,000, Cell signalling, USA) 및 phospho-p38 antibody(1:1,000, Cell signalling, USA)와 함께 overnight incubation을 시행하였다. 다음 날, membrane을 간단히 수세하고, horseradish conjugated anti-Rabbit IgG(1:10,000, Santa Cruz, USA)와 함께 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 간단히 수세하고, SuperSignal West-Femto(Pierce, USA)를 이용하여 발색하였다.

9) 생체 내 항암 효과 확인을 위한 동물 실험

AAH의 항암 효과를 살펴보기 위하여 Kollmar 등²⁴⁾의 방법을 이용하였다. 생쥐에 암종을 유발하기 위하여 미리 준비된 생쥐 유래 carcinoma 세포를 마리당 1×10^6 개씩 우측 옆구리 부분에 주사하였다. 1주일 뒤, 고형암이 생기지 않은 개

체는 실험에서 배제하고 적절히 실험군을 분류한 다음 저농도군(LOW)과 고농도군(HIGH)으로 나누어 각각 0.5과 2.5 g/kg으로 총 3주간 투여하였다. 실험군은 다음과 같다.

(1) 대조군(CTL) : 1×10^6 cell/mouse의 암세포를 주사하고 증류수를 투여한 군(n=8)

(2) 저농도군(LOW) : 1×10^6 cell/mouse의 암세포를 주사하고 0.5 g/kg 용량으로 3주간 AAH를 구강투여한 군(n=8)

(3) 고농도군(HIGH) : 1×10^6 cell/mouse의 암세포를 주사하고 2.5 g/kg 용량으로 3주간 AAH를 구강투여한 군(n=8)

10) 체중에 미치는 영향 측정

체중의 측정은 실험 시작일(day 1) 이후부터 1주 간격으로 측정하였으며, 측정일 오전 약물을 투여하기 전에 전자저울(CAS, Korea)를 이용하여 측정하였다.

11) 암종의 크기에 미치는 영향 측정

표면적으로 암종의 크기를 잴 수 있는 기간인 실험 14일 차부터 주 1회 버니어 캘리퍼스(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 암종의 크기를 잴으며, 다음의 공식에 의하여 크기를 계산하였다.

$$\text{암종의 부피(mm}^3\text{)} = \text{가로(mm)} \times \text{세로(mm)} \times \frac{1}{2} \text{ 가로(mm)}$$

12) 개체의 생존율에 미치는 영향 측정

암종 크기에 미치는 영향의 측정이 끝난 후, AAH의 투여를 중단하고 계속 관찰하면서 개체의 생존율에 미치는 영향을 측정하였다.

3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS(The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, U.S.A.)

를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 각 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포 증식률에 미치는 영향

100 µg/ml, 200 µg/ml 및 400 µg/ml 투여군에서 유의한 세포 증식률 감소가 관찰되었으며, 증식 억제 효과는 농도의존적이었다(Fig. 1).

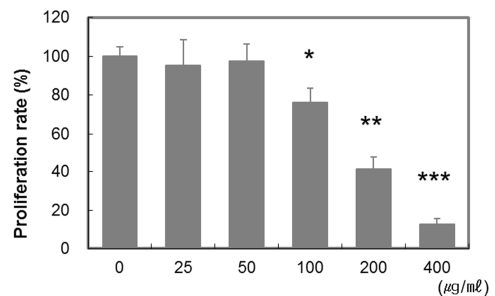


Fig. 1. Effects of AAH on proliferation rates in ovarian cancer cells.

The effects of AAH on proliferation rates of A2780 cells were measured using MTT method.

Cells were treated with indicated concentration of AAH for 24 hr.

P<0.01 and *P<0.001 compared with CTL group.

2. 세포 증식 양상에 미치는 영향

세포 증식률에 미치는 영향과 동일한 세포 수의 감소와 함께 동그랗게 응축된 형태의 사멸된 세포들이 관찰되었으며, 사멸된 세포의 수 역시 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 2).

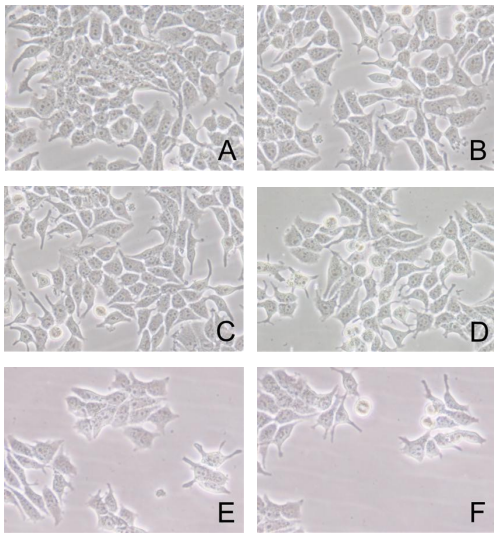


Fig. 2. Effects of AAH on cell morphology in ovarian cancer cells.

The effects of AAH on morphology of A2780 cells were observed using photo-microscope. Cells were treated with indicated concentration of AAH for 24 hr.

(A) 0 µg/ml, (B) 12.5 µg/ml, (C) 25 µg/ml, (D) 50 µg/ml, (E) 100 µg/ml, (F) 200 µg/ml (40X)

3. 세포 사멸의 형태에 미치는 영향

세포 사멸의 형태를 관찰한 결과 농도 의존적으로 apoptosis가 증가되는 경향을 보였다. Early apoptosis(Q2)의 경우 50 µg/ml에서 최대치를 보였다가 100 µg/ml 투여군에서는 감소되었으며, late apoptosis (Q3)의 경우 농도 의존적으로 증가 되는 경향을 보였다(Fig. 3, 4).

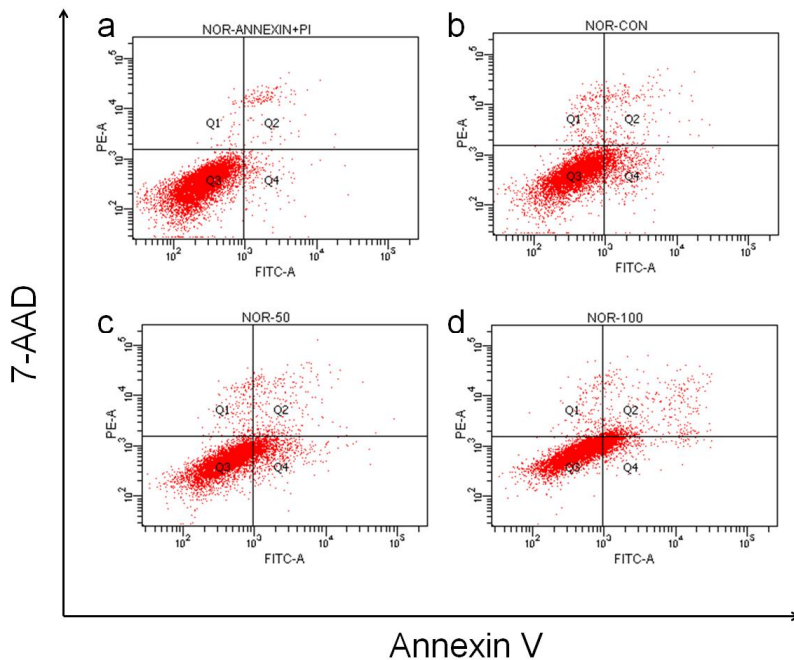


Fig. 3. Effects of AAH on types of cell death in ovarian cancer cells.

The effects of AAH on cell death types of A2780 cells were measured using Annexin V and 7-AAD double staining.

Cells were treated with indicated concentration of AAH for 24 hr.

(a) 0 µg/ml, (b) 25 µg/ml, (c) 50 µg/ml, (d) 100 µg/ml

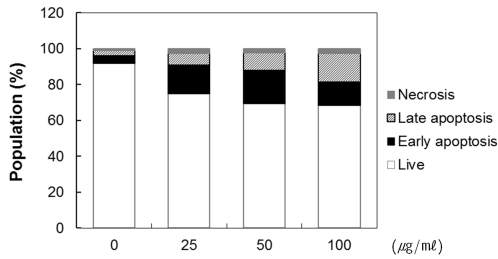


Fig. 4. Effects of AAH on population of

cell death in ovarian cancer cells. The populations of each cell death type were represented as cell numbers of each divisions (Q1 : necrosis, Q2 : late apoptosis, Q3 : live, Q4 : early apoptosis).

4. 세포 주기에 미치는 영향

난소암 세포의 생활주기에는 유의한 수준의 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 5).

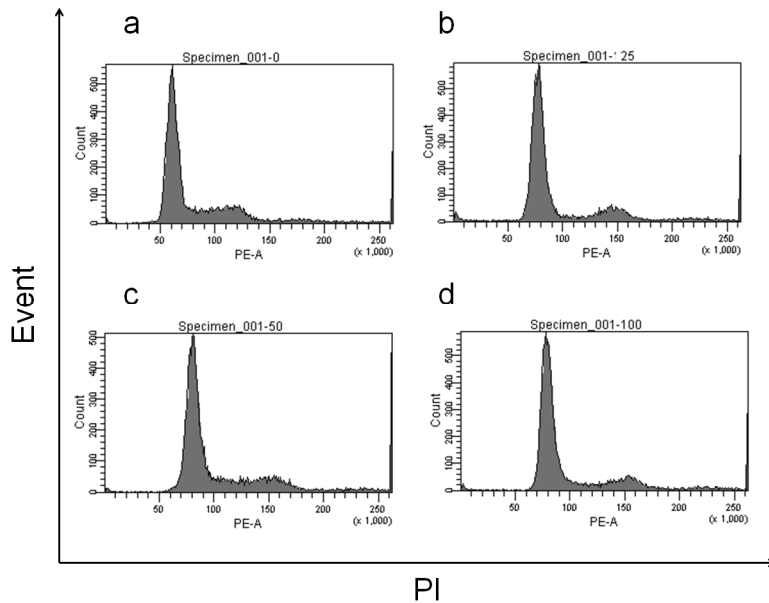


Fig. 5. Effects of AAH on cell cycle in ovarian cancer cells. The effects of AAH on cell cycle of A2780 cells were measured using PI staining. Cells were treated with indicated concentration of AAH for 24 hr. (a) 0 µg/ml, (b) 25 µg/ml, (C) 50 µg/ml, (D) 100 µg/ml.

5. Caspase 3 활성도에 미치는 영향

50 µg/ml 및 100 µg/ml 투여군에서 유의한 수준의 caspase 3 활성도 증가가 관찰되었다(Fig. 6).

6. Caspase 6 활성도에 미치는 영향

100 µg/ml 투여군에서 유의한 수준의 caspase 6 활성도 증가가 관찰되었다(Fig. 7).

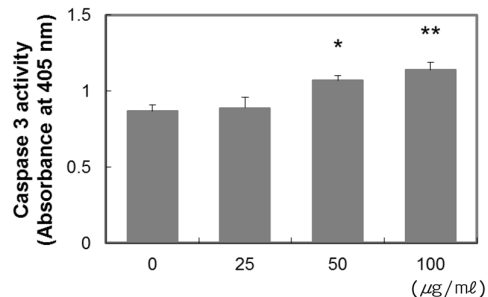


Fig. 6. Effects of AAH on caspase 3 activity in ovarian cancer cells. The effects of AAH on caspase 3 activity were measured using colorimetric method. Cells were treated with indicated concentration of AAH for 24 hr. *P<0.05 and **P<0.01 compared with CTL group.

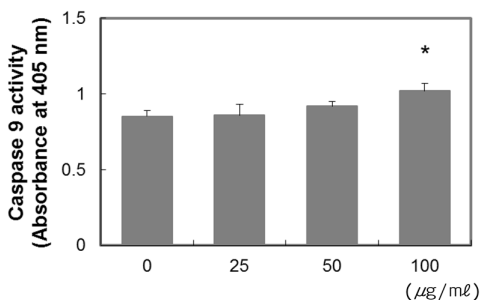


Fig. 7. Effects of AAH on caspase 6 activity in ovarian cancer cells. The effects of AAH on caspase 6 activity were measured using colorimetric method. Cells were treated with indicated concentration of AAH for 24 hr. *P<0.05 compared with CTL group.

7. p38 MAPK 경로에 미치는 영향

50 µg/ml 이상에서 p38의 phosphorylation을 억제하는 경향을 보였다(Fig. 8).

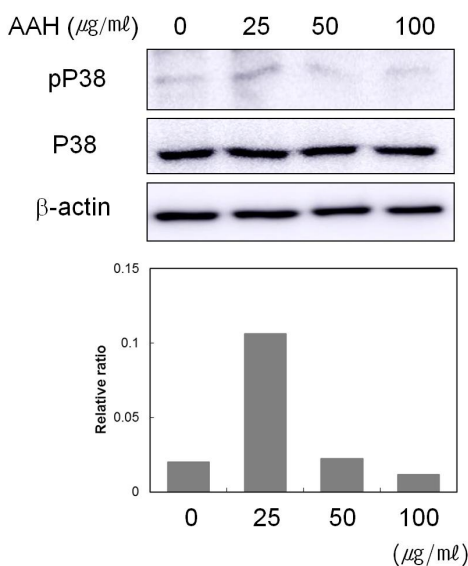


Fig. 8. Effects of AAH on p38 MAPK pathway in ovarian cancer cells. The effects of AAH on p38 MAPK pathway were measured using western blot analysis. The band of phosphorylated p38 was normalized using p38 band and the density was representative as relative ratio. Cells were treated with indicated concentration of AAH for 24 hr.

8. 체중에 미치는 영향

저농도 및 고농도 투여군 모두에서 대조군과 특별한 체중 증가 양상의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 9).

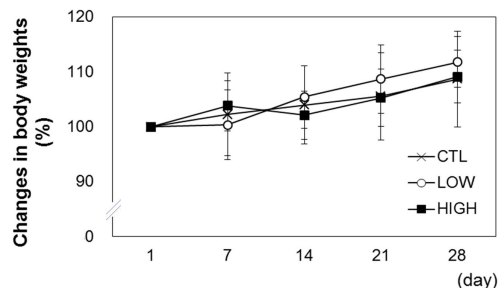


Fig. 9. Effects of AAH on changes in body weights in mice with tumor. The effects of AAH on changes in body weights were measured on the indicated days for 4 weeks (once in a week).

9. 암종의 크기에 미치는 영향

저농도 투여군에서는 대조군에 비해 암종의 크기가 감소하는 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다. 고농도 투여군의 경우 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 암종의 크기를 감소시켰다(Fig. 10).

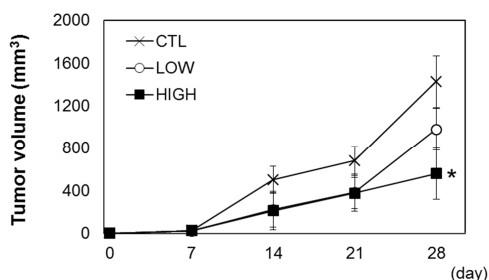


Fig. 10. Effects of AAH on tumor volume in mice. The effects of AAH on tumor volume were measured on the indicated days for 4 weeks. *P<0.05 compared with CTL group.

10. 개체의 생존율에 미치는 영향

저농도군과 고농도 투여군 모두에서

대조군에 비하여 유의한 수준의 생존율 증가가 관찰되었으며, 고농도군의 3마리는 60일 이상 생존하였다(Fig. 11).

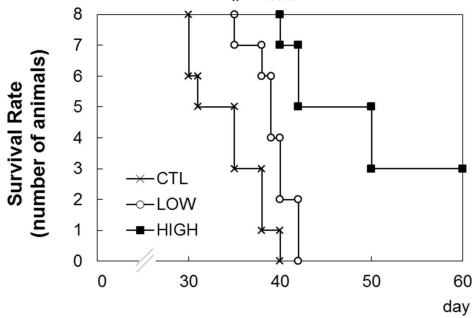


Fig. 11. Effects of AAH on survival rates in mice.

The effects of AAH on survival rates were measured on the indicated days for 60 days. *P<0.05 and ***P<0.001 compared with CTL group.

IV. 고찰

난소암은 다양한 병리조직학적 유형을 가진 악성종양으로, 난소의 표면상피세포, 생식세포, 성기삭과 기질을 구성하고 있는 세포에서 유래한 종양 그리고 전이성 종양으로 분류되며, 분류에 따라 치료방침이 결정 된다²⁵⁾. 이 중 표면상피세포종양이 80~60%로 2013년 우리나라에서 발생한 난소암 중 82%가 상피성 난소암이다²⁾.

한의학에서 난소암은 진단 상 癥瘕의 범주에 속하는 것으로 보고 있으며³⁾, 張介賓은 《景岳全書》〈癥瘕類〉에서 “蓋癥者徵也, 瘕者假也, 徵者成形而堅硬不移者是也, 假者無形而可聚可散者是也”라 하여 癥과 瘕를 腫塊의 형태와 성질에 따라 구분하였다²⁶⁾. 한편, 許浚은 《東醫寶鑑》에서 “腸覃, 石瘕, 血蠱는 모두 여성의 고유

한 질병으로 종류는 不同하나 痞塊의 異名이다”고 하였는데, 腸覃, 石瘕, 血蠱는 모두 癥瘕의 범주에 속하지만 발생하는 위치와 정도에 따라 각기 다르게 분류하였음을 알 수 있다⁴⁾.

癥瘕의 원인으로 蕭頊는 《女科經綸》〈癥瘕痲癖證〉에서 “此證多兼七情虧損, 五臟氣血乘違而成”이라 하여 氣滯를 癥瘕의 유발인자이며 병리변화의 주된 요인으로 보았고²⁷⁾, 薛己는 《校注婦人良方》〈婦人腹中瘀血方論第十〉에서 “婦人腹中瘀血者, 由月經閉積, 或產後餘血未盡, 或風寒滯瘀, 久而不消, 則爲積聚癥瘕矣”라 하여 瘀血을 주원인으로, 濕痰과 食積을 기타 원인으로 보았다²⁸⁾.

본 실험에 사용된 약물인 AAH는 한의학 명칭으로는 菁蒿로 명명된다. 性味는 寒, 苦辛 하며 肝·膽의 二經으로 歸經하고 清熱解暑, 除蒸, 截瘧하는 효능이 있어 暑邪發熱, 陰虛發熱, 夜熱早涼, 骨蒸勞熱, 瘧疾寒熱, 濕熱黃疸에 응용하여 치료하는 藥材로서⁹⁾ 菁蒿清膽湯 《重訂通俗傷寒論》, 菁蒿鳖甲湯 《溫病條辨》 등의 方劑에 배합되어 瘧疾 및 虛熱을 치료하는데 응용 되었다¹⁰⁾.

최근 개똥쑥(*Artemisiae Annuae Herba*, AAH) 추출물의 항균, 항산화, 항염증작용¹¹⁻³⁾ 및 E2F1 전사억제 및 EMT(Epithelial-mesenchymal transition) 세포 억제를 통한 유방암 세포의 항증식 효과^{14,15)}, 위암 세포의 apoptosis 유도 효과¹⁶⁾ 등이 보고되고 있다. 또한, 미토콘드리아 경로를 통한 폐암 세포의 apoptosis 유도 효과¹⁷⁾, 간암¹⁸⁻²⁰⁾과 대장암²¹⁾ 세포에서 세포주기 억제 효과, 전립선암 치료 호르몬제와 병용투여에서 PSA(Prostate Specific Antigen) 억제 효과²²⁾ 등 항암효과에 대한 연구가

활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 AAH의 항암작용을 알아보기 위하여 인간 유래 난소암 세포주인 ovarian cancer cell(carcinoma)을 사용하여, 세포주에 AAH를 투여한 후 세포 증식률에 미치는 영향, 세포 사멸의 양상과 관련 기전을 살펴보았으며, 동물실험에서는 생쥐 유래 carcinoma 세포를 사용하여 고형암을 유발시킨 후, 암종 크기 변화 및 생쥐의 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다.

본 연구의 결과에서 AAH는 100 µg/ml 이상의 농도에서 난소암 세포의 증식률을 유의한 수준으로 감소시켰다(Fig. 1). 이러한 결과로부터 AAH가 난소암 세포의 증식을 억제하거나 세포 사멸을 유도할 수 있다는 가설을 세울 수 있다.

난소암 세포에 AAH를 투여하고 cell morphology에 미치는 영향을 살펴본 결과 세포수의 감소뿐만 아니라 위축되고 동그랗게 변한 세포들이 다수 관찰되었으며, 이러한 경향은 농도와 비례하는 경향을 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 AAH가 직접적으로 난소암 세포의 사멸에 관여한다는 증거로 해석될 수 있다.

Annexin V는 일종의 형광 probe로 세포 표면에 결합하며, apoptosis를 포함한 몇 가지 세포 사멸 과정에서 발견되는 물질이며²⁹⁾, 7-AAD 역시 PI라는 형광물질로 세포를 염색할 때 사용한다. 일반적으로 7-AAD는 정상세포와 necrosis 또는 apoptosis를 일으키고 있는 세포의 구분에 사용된다³⁰⁾. AAH가 일으키는 세포사 어떤 종류인지 살펴보기 위하여 annexin V와 7-AAD double stain을 시행한 결과 농도 의존적으로 apoptosis가 늘어나는 경향을 보였으며, 특히 late apoptosis에서

농도 의존적 양상이 두드러졌다(Fig. 3, 4).

세포의 생활 주기는 DNA의 복제 단계에 따라 G0, G1, S, G2, M의 5단계로 나뉘며, 정상적으로 성장하는 세포들은 이러한 주기가 순차적으로 진행된다. Programmed cell death를 일으키는 세포들은 세포 주기의 단계에서 arrest가 일어나는 경우를 볼 수 있다. 본 연구의 결과를 살펴보면, AAH는 난소암 세포의 세포주기에 유의한 수준의 변화를 일으키지는 못하였다(Fig. 5).

Type 1 programmed cell death인 apoptosis에는 크게 내인성 경로(intrinsic pathway)와 외인성 경로(extrinsic pathway)가 관여한다³¹⁾.

Caspase 3는 상기한 외인성과 내인성 두 가지 경로를 통하여 활성화 될 수 있고, 내인성 경로에 속하는 caspase 6과 cytochrome c에 의해서도 활성화 될 수 있다³²⁾. 본 연구의 결과를 살펴보면, AAH의 처리는 caspase 3 및 caspase 6의 활성도를 유의한 수준으로 상승시켰다(Fig. 6, 7). 이러한 결과는 AAH가 일으키는 apoptosis가 내인성 경로의 활성화와 관계있음을 시사한다.

P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 대표적인 MAPK 중의 하나로 세포의 성장, 활성화, 분열 등 세포 주기에 중요한 역할을 수행하고 있으며, 암 세포에서 p38의 활성화는 활발한 세포 성장을 의미 한다³³⁾. 본 연구의 결과에서 AAH의 투여는 난소암 세포의 p38 경로를 억제하는 경향을 보였다(Fig. 8). 이는 AAH의 항암작용이 p38 경로의 억제와 관련이 있을 가능성을 시사하며, 향후 후속 연구를 통하여 이를 확인할 필요가 있다고 사료 된다.

이렇듯 난소암 세포에 대하여 항암효과가 확인된 AAH가 생체 내에서도 항암작용에 관여하는지 살펴보기 위하여 allograft 모델을 이용한 *in vivo* 연구를 수행하였다. 본 연구에서 총 4주간의 관찰기간 동안 대조군과 비교하여 특이한 체중 변화는 관찰되지 않았으며(Fig. 6), 고농도 투여군에서 통계적으로 유의한 수준의 암종 크기 감소가 관찰되었다(Fig. 10). 이러한 결과는 AAH가 시험관 내 뿐만 아니라 생체 내에서도 항암작용이 있음을 시사한다. 마지막으로 암종이 주사된 개체의 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 저농도 및 고농도 투여군에서 유의한 수준의 생존율 연장효과를 보였다(Fig. 11). 이러한 결과는 앞서 제시한 암종 크기에 미치는 영향에 대한 결과와 함께 AAH가 생체 내에서 항암효과가 있음을 입증한다.

이상의 실험결과를 통하여, AAH은 난소암 세포의 증식을 감소, 세포 수 감소 등 난소암 세포의 사멸에 영향을 미치는 항암효과가 있는 것으로 보이며, 향후 AAH의 항암효과에 대한 다양하고 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

AAH이 난소암 세포주와 암종이 유발된 생쥐에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 난소암 세포 증식률의 유의한 감소, 세포 수 감소 및 세포 형태의 변화가 다수 관찰되어 AAH가 난소암 세포의 사멸에 관여함을 확인하였다.
2. AAH가 일으키는 세포사는 apoptosis이며, 난소암 세포의 cell cycle에는 특별한 영향을 미치지 않았다.
3. AAH는 caspase 3 및 caspase 6의 활성도를 유의한 수준으로 상승시켰으며 apoptosis가 내인성 경로의 활성화와 관계있음을 확인하였다.
4. AAH의 항암작용은 p38 경로 억제와 관련 있을 가능성을 시사한다.
5. AAH는 저농도 및 고농도 투여군에서 유의한 수준의 생존율 연장효과를 보였다.
6. AAH는 체중변화에는 영향을 미치지 않았으나, 통계적으로 유의한 수준의 암종 크기 감소를 일으켰다.

□ Received : Apr 26, 2018

□ Revised : Mar 02, 2018

□ Accepted : Mar 16, 2018

References

1. Tarver T. Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society (ACS). Journal of Consumer Health on the internet. 2012;16(3):366-8.
2. Statistics Korea. Cancer Registration Statistics[cited November 15, 2016]. Available from:URL:http://kosis.kr/statHtml/statHtml.doorgId=117&tblId=DT_117N_A00021&vw_cd.
3. Jang HG, et al. Clinical Handbook of Integration of Western and Traditional Chinese Medicine for Common Tumour. 1st. China:Henan Science Technology Publishers. 1684:264.

4. Huh J. Donguibogam(東醫寶鑑). 1st. Seoul:Bubin Publishers. 2007:780-3.
5. Lee GW. Compile translation(編注譯解) Huang Di Nei Jing Lingshu(黃帝內經靈樞) 3. 1st. Seoul:Yeogang Publishers. 2003:56-6.
6. Lee JH, Kim GH, Choi CM. A Case Report : Complications of Chemotherapy after Curative Resection in Patient with Ovarian CarcinomaIV. J Korean Obstet Gynecol. 2014;27(3):124-34.
7. Cho SY, Kim DC. Korean Medical Treatment of Sequela Following Abdominal Surgery with Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Ovarian Cancer: a Case Report. J Korean Obstet Gynecol. 2016;29(4):57-68.
8. Seo JW, et al. A Study on Inhibitory Effects of the Scutellaria barbata Don Water-extracts on the Growth of Human ovarian carcinoma cells. J Korean Obstet Gynecol. 1999;12(1):151-60.
9. Nationwide College of Oriental Medicine. Herbalism edited by Professor. Herbalism. 1st. Seoul:Younglim Inc. 2006:276-7.
10. College of Oriental Medicine, Oriental Medical Prescription edited by Professor. Oriental Medical Prescription. 1st. Seoul:Younglim Inc. 1999:147-8, 208-12.
11. Byeun DN. Antimicrobial effect of *Artemisia annua* L.. Department of Development in Plant Resources, The Graduate School, Sunchon National University. 2015.
12. Kim WS, et al. Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L. Korean J Physiol Pharmacol. 2015;19(1):21-7.
13. Song Y, et al. Polyphenolic profile and antioxidant effects of various parts of *Artemisia annua* L. Biomed Chromatogr. 2016;30(4):588-95.
14. Tin AS, et al. Antiproliferative effects of artemisinin on human breast cancer cells requires the downregulated expression of the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. Anticancer Drugs. 2012;23(4):370-9.
15. Ko YS, et al. Polyphenols from *Artemisia annua* L. Inhibit Adhesion and EMT of Highly Metastatic Breast Cancer Cells MDA-MB-231. Phytother Res. 2016;30(7):1180-8.
16. Kim EJ, et al. Apoptosis-Induced Effects of Extract from *Artemisia annua* L. by Modulating Akt/mTOR/GSK-3 β Signal Pathway in AGS Human Gastric Carcinoma Cells. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 2016;45(9):1-9.
17. Kim BM, et al. The Extract from *Artemisia annua* L. Induces p53-independent Apoptosis through Mitochondrial Signaling Pathway in A549 Lung Cancer Cells. Journal of life science. 2016;26(8):887-94.
18. Kim EJ, et al. Apoptotic Effect of Extract from *Artemisia annua* L. by Akt/mTOR/GSK-3 β Signal Pathway in Hep3B Human Hepatoma Cells. Journal of life science. 2016;26(7):764-71.
19. Kim EJ, et al. Cell Cycle Arrest Effect

- of Extract from *Artemisia annua* L. in Hep3B Human Hepatoma Cells.. Korean society for biotechnology and bioengineering journal. 2015;30(4):175-81.
20. Chen J, et al. Anti-tumour effects of polysaccharides isolated from *Artemisia annua* L. by inducing cell apoptosis and immunomodulatory anti-hepatoma effects of polysaccharides. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013;11(1):15-22.
 21. Kim BM, et al. Cell Cycle Arrest of Extract from *Artemisia annua* L. Via Akt-mTOR Signaling Pathway in HCT116 Colon Cancer Cells. Korean society for biotechnology and bioengineering journal. 2015;30(5):223-9.
 22. Michaelsen F, et al. Activity of *Artemisia annua* and artemisinin derivatives, in prostate carcinoma. Phytomedicine. 2015;22(14):1223-31.
 23. Krtolica A, Krucher NA, Ludlow JW. Molecular analysis of selected cell cycle regulatory proteins during aerobic and hypoxic maintenance of human ovarian carcinoma cells. Br J Cancer. 1999;80(12):1875-83.
 24. Kollmar O, et al. CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. Int J Cancer. 2010;126(6):1302-15.
 25. Practice guideline of ovarian cancer. Korean Society of Gynecologic Oncology [cited 2016]. Available from:URL: http://www.sgo.or.kr/community/pdf/guide_01_2016_03.pdf.
 26. Jang GB. Gyong Ak Jeon Seo(景岳全書). 1st. Seoul:Hanmi Publishers. 2006:1865-6.
 27. Xiao-Xun. Yeo gwa gyung nyun(女科經綸). 1st. Seoul:Bomyoung Books. 2006:511.
 28. Xue-Ji. Gyojubuin-yangbang(校注婦人良方). 1st. Seoul:Jungdam Publishing. 2011:305-8.
 29. Meers P, Mealy T. Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan 187. Biochemistry. 1994;33(19):5829-37.
 30. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. Exp Cell Res. 2002;277(1):1-14.
 31. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(9):621-32.
 32. Salvesen GS. Caspases: Opening the boxes and interpreting the arrows. Cell Death Differ. 2002;9(1):3-5.
 33. Grossi V, et al. p38 α MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. World J Gastroenterol. 2014;20(29):9744-58.