

四君子湯 및 四君子湯加斑猫가 위암세포에 미치는 영향

정우영, 류봉하, 김진성, 윤상협, 류기원

경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Effects of Sagunjatang and Sagunja-tang plus Mylabris phalerata on Human Stomach Cancer Cells

Woo-young Jung, Bong-Ha Ryu, Jin-Sung Kim, Sang-hyub Yoon, Ki-Won Ryu

Department of 3rd Internal Medicine, Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

The efficacy of Sagunja-tang and Sagunja-tang plus Mylabris phalerata against the human stomach cancer was examined and molecular biological fight of its actions was studied.

In the efficacy test of anti-stomach cancer cells growth using the MTT assay, administration of Sagunja-tang resulted in no significant change of stomach cancer cells growth, with the control group. Administration of Sagunja-tang plus Mylabris phalerata resulted in a decrease of stomach cancer cells growth in proportion to the concentration of mylabris phalerata and time, which was significantly different from the control group(significance recognized when $p < 0.05$).

In the test using the apoptosis assay, administration of Sagunja-tang showed an increase in apoptosis of human stomach cancer cells, with no significant difference from the control group. Administating Sagunja-tang plus Mylabris phalerata showed an increase in apoptosis of stomach cancer cells in proportion to the concentration of mylabris phalerata and time, which was significantly different from the control group(significance recognized when $p < 0.05$).

In the test using the quantitative RT-PCR to examine stomach cancer cells growth and revelation of apoptosis related genes, administrating Sagunja-tang plus Mylabris phalerata resulted in a decrease of Bcl-2, an anti-apoptosis gene, in proportion to concentration. No significant change was examined in the revelation of CDK1, Cdc2, Cyclin D1, PCNA, c-myc, which are genes related to the stomach cancer cells growth, and Bax, Bcl-XL, the genes related to apoptosis, and p53.

Referring to the results above, Sagunja-tang plus Mylabris phalerata may be considered to have an anti-growth efficacy against human stomach cancer cells, and an inducement efficacy. Therefore, it can be clinically implemented in the human stomach cancer.

Key Word: Sagunja-tang(Sijunzi-tang), Mylabris phalerata, MTT assay, apoptosis, RT-PCR

I. 緒 論

위암은 국내에서 발생률과 사망률에 있어서 전체 중앙 중에서 가장 높은 비율을 차지하고 있으며 유전적 요인 및 식생활을 포함한 환경적 요인으로 인하여 다른 나라보다 높은 발생빈도를 나타내고 있다¹.

한의학 문헌에는 위암이라는 명칭은

없으나 위암에 관련된 용어로는 積聚, 伏梁, 胃脘癰, 噎膈, 反胃가 가장 유사하다고 할 수 있으며, 그 발병원인을 주로 氣血阻滯, 血瘀, 痰飲, 濕熱 등에 의한 것으로 보았다².

한의학적 치료법으로 十全大補湯, 補中益氣湯³, 四六湯⁴ 등 健脾益氣를 비롯한 養血滋陰 養陰生津 溫陽補腎 滋補強壯 등을 위주로 하는 扶正法과 膈下逐

瘀湯⁵, 銀花瀉肝湯, 半夏厚朴湯⁷ 등 清熱解毒, 活血化瘀, 化痰散結, 行氣燥濕, 消脹 등을 위주로 하는 祛邪法, 그리고 扶正抗癌湯⁸, 整腸補脾湯, 消積白朮散¹⁰ 등 扶正과 祛邪를 병용하는 扶正祛邪法으로 분류할 수 있다¹¹. 이와같이 한의학적으로 항암효과를 밝힌 연구는 지금까지 많이 진행되어 왔으나 이들의 항암효과에 대한 연구는 생쥐에서 유래된 sarcoma-180 및 B16 세포주 등을 대상으로 한 연구가 주로 이루어져 왔으므로 인체 위암세포주에 대한 연구보고

접수: 2001년 10월 4일 채택: 2001년 10월 25일

교신저자: 신현수 (서울시 서대문구 연희동 194-37 동서한방병원 의사실, 전화: 017-312-1075, 팩스: 337-1117, E-mail: arhat75@netian.com)

는 부족한 실정이며, 위암치료에 대한 실험적 및 임상적 보고도 미미한 상태이므로 앞으로 치료약물 및 방제에 대한 연구개발이 시급하다고 생각된다.

이에 저자는 四君子湯과 四君子湯에 斑猫를 加한 처방이 항암치료의 부작용을 억제하고 위암의 예방이나 치료에 효과가 있을 것으로 생각되어 그 효능을 밝히기 위하여 인체 위암세포주 AGS를 대상으로 MTT assay를 시행하여 위암세포 증식억제효과를 검토하고, apoptosis assay를 통하여 apoptosis 형성 여부를 검토하였으며, 정량적 RT-PCR을 이용하여 세포의 증식 및 apoptosis와 연관이 있는 유전자의 발현에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

이 실험에 사용한 약재는 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입, 정선한 후 사용하였고, 四君子湯의 내용과 분량은 陳¹²의 太平惠民和劑局方에 준하였다. 이와 같은 기준에 의한 四君子湯加斑猫의 구성약재와 1貼의 분량은 다음과 같다(Table I).

2) 위암세포

이 실험에 사용한 암세포는 국내 암

환자의 위암세포인 SNU-1, SNU-5, SNU-16과 미국 American Type Culture Collection(ATCC)에서 제공하는 AGS, Kato 등의 위암세포 중 screen 과정을 통하여 적합한 세포를 선정하였다. 이 중 AGS가 가장 적합한 세포로 판명되었다.

2. 방법

1) 위암세포의 배양

위암세포주 AGS(ATCC, MD)를 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, MD)과 1% broad-spectrum antibiotics(Gibco BRL, MD)가 함유된 RPMI 1640(Gibco BRL, MD) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기 (incubator, Precision Scientific Inc., NY)에서 배양하였다. 세포의 회수는 0.1% Trypsin-EDTA(Sigma, MD)를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

2) 약물처리

증류수 100ml에 조제된 四君子湯 1첩 분량 20g(S I)과 四君子湯에 斑猫를 각각 0.5g(S II), 1.0g(S III), 2.0g(S IV)을 첨가하여 125℃에서 20분간 끓인 후 이 액체를 검액으로 사용하였다. 이 검액을 0.2μm의 syringe filter를 이용하여 여과(filtering)한 후, MTT assay를 시행하는 경우에는 배지 ml당 20μl의 검액을 각각 6, 12, 24시간 동안 투여하였으며, apoptosis assay를 시행하는 경

우에는 배지 ml당 20μl의 검액을 각각 12, 24, 48시간 동안 투여하였으며, quantitative RT-PCR을 시행하는 경우에는 배지 ml당 20μl의 검액을 투여하여 반응을 관찰하였다.

3) 위암세포의 증식억제효과 측정

위암세포의 증식억제효과를 검증하기 위하여 MTT assay를 시행하였다.

(1) MTT 용액제작 및 처리¹³

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 5mg/ml을 P BS(phosphate buffered saline)에 녹여 pH 7.5로 조절한 후 0.22μm filter로 여과하여 MTT 저장액(stock solution)을 만들었다. 그리고 MTT 저장액(stock solution) 10μl를 세포액(cell suspension) 100μl에 첨가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광측정¹³

MTT 저장액(stock solution)을 세포액(cell suspension)에 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 방치하여 보라색 formazan crystals가 형성된 후 absolute isopropanol에 녹아있는 0.04M HCl 100μl를 넣고 잘 혼합하여 보라색 formazan crystals가 완전히 용해된 후 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader(Molecular Device, CA)를 이용하여 570nm의 파장에서 흡광도(OD, optical density)를 측정하였다. 이 실험의 결과는 3회 반복하여 평균치로 나타냈다.

4) 위암세포의 apoptosis에 미치는 영향 측정

위암세포의 apoptosis에 미치는 영향을 검증하기 위하여 apoptosis assay를

Table 1. Prescription of Sagunjatang plus Mylabris Phalerata

Herbal drug	Scientific name	Galenicals name	dose(g)
人蔘	Panax Schinseng Ness	Giseng Radix	5.00
白朮	Atractylis japonica koidzumi	Atractylis Rhizoma	5.00
白茯苓	Poria cocos Wolff	Hoelen	5.00
甘草	Glycyrrhiza uralensis Fischer et. De Candolle	Glycyrrhizae Radix	5.00
斑猫	Mylabris speciosa Pall	Mylabris phalerata	0.50-2.00

시행하였다.

위암세포주에 각각 검액을 20µl/ml씩 투여하여 각각 12, 24, 48시간이 경과한 후에 위암세포를 회수하여 DAPI-(4,6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 시행한 후에 형광현미경을 이용하여 apoptotic body가 형성된 위암세포의 수를 측정하여 백분율로 표시하였다. 이 실험의 결과는 3회 반복하여 평균치로 나타냈다.

5) 위암세포와 연관된 유전자의 발현에 미치는 영향 측정

위암세포의 증식 및 apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 영향을 검증하기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다.

(1) RNA 추출¹⁴

각각의 검액이 투여된 위암세포를 회수하여 원심분리한 후 Solution D(250g guanidine isothiocyanate in 293ml water, 0.75M sodium citrate 17.6ml, 10% sarkosyl 26.4ml, 0.1M 2-mercaptoethanol) 200µl, 2M sodium acetate, pH 4.2, 20µl, water-saturated phenol 200µl, chloroform-isoamyl alcohol(49:1) 40µl를 넣은 후 20분간 얼음에 보관한다. 20분 후 12,000Xg에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 넣은 후 -20℃에서 12시간 동안 보관한다. 다음날 다시 12,000Xg, 20분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 ethanol 200µl를 넣어 RNA를 세척한다. 세척한 RNA를 spectrophotometer를 이용하여 정량한다.

(2) cDNA 합성

각 시료를 혼합한 후 42℃에서 30분

간 incubation하여 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA는 연쇄증합반응의 민감도를 높이기 위하여 1:4로 희석하였다.

(3) 유전자 연쇄증합반응(PCR)¹⁵

GAPDH primer(sense; 5'-atgtctcagag-caaccgggag-3', antisense; 5'-tttccgactga agagtgagc-3')에 대하여 다음의 과정을 시행한다.

① 멸균된 0.5ml microtube에 sterile H₂O 30µl, 10x PCR amplification buffer 10µl, mixture of dNTP each at a concentration of 1.25 mM 16µl, GAPDH primer(in 5µl of H₂O) 10pmoles, template cDNA(up to 1µl), H₂O to a final volume of 100µl를 혼합한다.

② 시료혼합물을 5분간 94℃에서 가열하여 DNA를 denaturation한다.

③ 0.5µl of Taq DNA polymerase (5 units/µl)를 첨가한다.

④ 100µl of light mineral oil를 넣는다.

⑤ PCR반응을 시행한다.

(4) 전기영동

PCR product 10µl를 2% agarose gel에 loading하여 80V에서 20분간 전기영동을 시행한다. 다시 ethidium bromide solution에서 10분 동안 염색

한 후 UV transillum inator로 관찰한다.

(5) 정량화(Quantitation)

Gel-doc system(Bio-Rad, CA)과 densitometry를 이용하여 정량화(Quantitation)한다.

(6) 위의 결과를 바탕으로 band의 밝기에 따라 template cDNA의 양을 증감하여 상대적으로 cDNA의 양을 동일하게 조절하였다. 이후 CDK1 primer, Cdc2 primer, Cyclin D1 primer, c-myc primer, PCNA primer, Bcl-2 primer, Bax primer, Bcl-XL primer, p53 primer를 사용하여 각각 PCR 반응과 전기영동을 시행하여 gel-doc system(Bio-Rad, CA)과 densitometry를 이용하여 정량화(quantitation)한 후, 정량한 값을 GAPDH에 대한 값으로 나누어 각 유전자의 발현 정도를 비교하였다. 이 실험의 결과는 3회 반복하여 평균치로 나타냈다.

3. 통계처리

각 실험군과 대조군 사이의 유의성 검사는 paired T-test, χ^2 -test를 시행하였으며, p<0.05를 유의성있는 결과로 판단하였다.

Table 2. Effects of *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Mylabris Phalerata* on Human Stomach Cancer Cells Growth Using MTT Assay

Group	O.D.(Optical Density)			
	0hrs	6hrs	12hrs	24hrs
C ¹	0.78±0.03 ¹⁾	0.84±0.04	0.89±0.07	0.79±0.02
S I ²⁾	0.77±0.05	0.79±0.08	0.84±0.09	0.76±0.06
S II ³⁾	0.68±0.04	0.65±0.06	0.37±0.02 *	0.14±0.04 *
S III ⁴⁾	0.72±0.09	0.68±0.07	0.28±0.05 *	0.10±0.06 *
S IV ⁵⁾	0.82±0.04	0.72±0.05	0.26±0.09 *	0.08±0.04 *

¹⁾: Mean±Standard Error

²⁾: Statistically significant compared with control data(*: p<0.05)

Table 3. Effects of *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Mylabris Phalerata* on Human Stomach Cancer Cells Apoptosis Using Apoptosis Assay

Group	Apoptosis Rate(%)			
	0hrs	12hrs	24hrs	48hrs
C'	2.3±0.4 ^{a)}	2.5±0.4	2.3±0.3	2.4±0.5
S I'	2.5±0.3	3.4±0.3	4.8±0.5	4.3±0.7
S II ^s	2.1±0.4	22±1.5 *	38±4.7 *	53±4.9 *
S III ^a	1.9±0.2	35±1.5 *	47±7.4 *	68±4.7 *
S IV ^a	2.4±0.5	38±3.7 *	53±5.3 *	79±6.8 *

^{a)}: Mean±Standard Error

*: Statistically significant compared with control data(*: p<0.05)

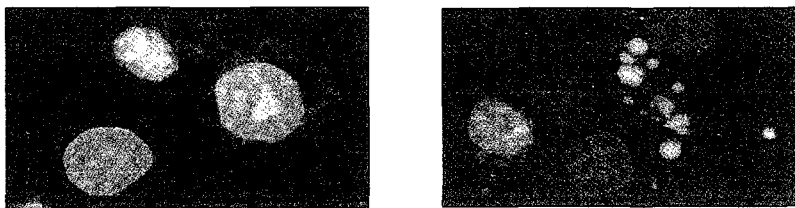


Fig. 1. Apoptotic stomach cancer cells induced by *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Mylabris phalerata*.

A: Normal control stomach cancer cells
B: Apoptotic stomach cancer cells

Table 4. Effects of *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Mylabris Phalerata* on Gene Regulation in Human Stomach Cancer Cells Using RT-PCR.

Group	GAPDH (GAPDH /GAPDH)	CDK1 (CDK1 /GAPDH)	Cdc2 (Cdc2 /GAPDH)	Cyclin D1 (Cyclin D1 /GAPDH)	PCNA (PCNA /GAPDH)	c-myc (c-myc /GAPDH)
C'	165(1)	69(0.42)	139(0.84)	124(0.75)	122(0.74)	94(0.57)
S I'	158(1)	73(0.46)	139(0.88)	122(0.77)	107(0.68)	100(0.63)
S II ^s	182(1)	71(0.39)	149(0.82)	129(0.71)	120(0.66)	111(0.61)
S III ^a	176(1)	72(0.41)	137(0.78)	120(0.68)	127(0.72)	102(0.58)
S IV ^a	162(1)	75(0.46)	122(0.75)	117(0.72)	126(0.78)	96(0.59)

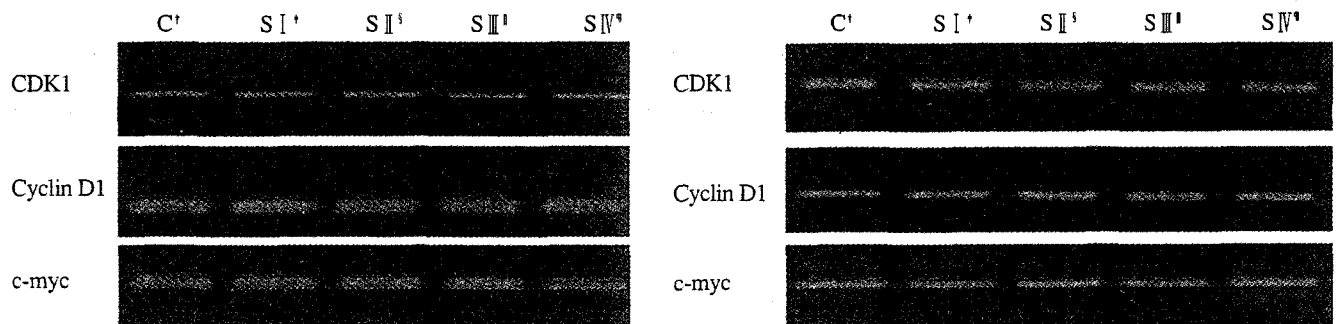


Fig. 2. Quantitative aAnalysis of CDK1, Cdc2, Cyclin D1, PCNA and c-myc expression induced by *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Mylabris phalerata*.

III. 成 績

1. 위암세포의 증식억제효과

검액이 암세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인체 위암세포주 AGS를 이용하여 MTT assay를 시행하고 그 결과를 나타내었다(Table II).

이 결과로 보아 四君子湯은 위암세포에 대하여 증식을 억제하는 효과가 나타나지 않았으며, 四君子湯加斑猫는 斑猫의 농도 및 시간경과에 비례하여 유의한 위암세포 증식억제효과가 나타났다.

2. 위암세포의 apoptosis에 미치는 영향

검액이 암세포의 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인체 위암세포주 AGS를 이용하여 apoptosis assay를 시행하고 그 결과를 나타내었다(Table III, Figure I).

이 결과로 보아 四君子湯은 위암세포에 대하여 apoptosis를 촉진시키는 경향이 나타났으나 유의성이 없었고, 四君子湯加斑猫는 斑猫의 농도 및 시간경과에 비례하여 유의한 apoptosis 촉진효과가 나타났다.

3. 위암세포와 연관된 유전자의 발현에 미치는 영향

1) 위암세포의 분열과 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

검액이 암세포의 CDK1, Cdc2, Cyclin D1, PCNA 및 c-myc 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인체 위암세포주 AGS를 이용하여 RT-PCR을 시행하고 그 결과를 나타내었다(Table IV, Figure II).

이 결과로 보아 세포분열을 촉진하는 CDK1, Cyclin D1 유전자와 세포분열을 나타내는 Cdc2, PCNA, c-myc 유전자는 四君子湯이나 四君子湯加斑猫에 의해 영향을 받지 않았다.

2) 위암세포의 apoptosis와 연관된 유전자 및 p53의 발현에 미치는 영향

검액이 암세포의 Bcl-2, Bax, Bcl-XL 및 p53 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인체 위암세포주 AGS를 이용하여 RT-PCR을 시행하고 그 결과를 나타내었다(Table V, Figure III).

이 결과로 보아 四君子湯加斑猫는 apoptosis를 억제하는 유전자인 Bcl-2의 발현을 斑猫의 농도에 비례하여 억제하는 효과가 나타났으나, 세포사멸을 유도하는 유전자인 Bax, 세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-XL 및 종양억제 유전자인 p53은 四君子湯 및 四君子湯加斑猫에 의해 영향을 받지 않았다.

IV. 考 察

악성 종양인 암은 발생기전이 불확실한 난치성 질환 중의 하나로서¹⁶ 비정상적인 세포분열로 인한 빠른 침윤성 성장과 각 부위로 확산되는 전이 등의 특이성을 지님으로써 전세계적으로 사망원인의 1·2위를 차지하고 있다¹⁷. 이러한 암의 발생원인에 대하여 서양의학에서는 유전적 요인, 인종과 지리학적 요인, 연령, 면역학적 인자 등의 내적 인자와 화학적 발암물질, 자외선 조사, 석면, 방사선 등과 같은 물질적 발암 인자 및 종양성 바이러스 등의 외적 인자로 인하여 유전자가 손상을 받아 돌연변이를 일으켜 발생하는 것으로 보고 있다¹⁸.

위암에 대한 치료법으로는 외과적 수술요법, 항암약물요법, 방사선요법, 면역요법, 유전자요법 등이 알려져 있고, 최근에는 종양면역학, 바이러스종양학, 세포생물학, 분자생물학 등의 발달에 힘입어 암에 대한 이해 및 치료에 많은 발전을 이루고 있다. 그러나 면역요법과 유전자요법은 개발중이어서 치료방법이 아직 정립되지 못한 실정이며 수술요법

Table 5. Effects of *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Mylabris Phalerata* on Gene Regulation in Human Stomach Cancer Cells Using RT-PCR

Group	GAPDH (GAPDH /GAPDH)	Bcl-2 (Bcl-2 /GAPDH)	Bax (Bax /GAPDH)	Bcl-XL (Bcl-XL/ GAPDH)	p53 (p53 /GAPDH)
C†	165(1)	106(0.64)	83(0.50)	109(0.66)	50(0.30)
S I †	158(1)	98(0.62)	92(0.58)	100(0.63)	57(0.36)
S II ‡	182(1)	62(0.34)	89(0.49)	113(0.62)	69(0.38)
S III §	176(1)	56(0.32)	84(0.48)	114(0.65)	62(0.35)
S IV ¶	162(1)	45(0.28)	83(0.51)	100(0.62)	53(0.33)

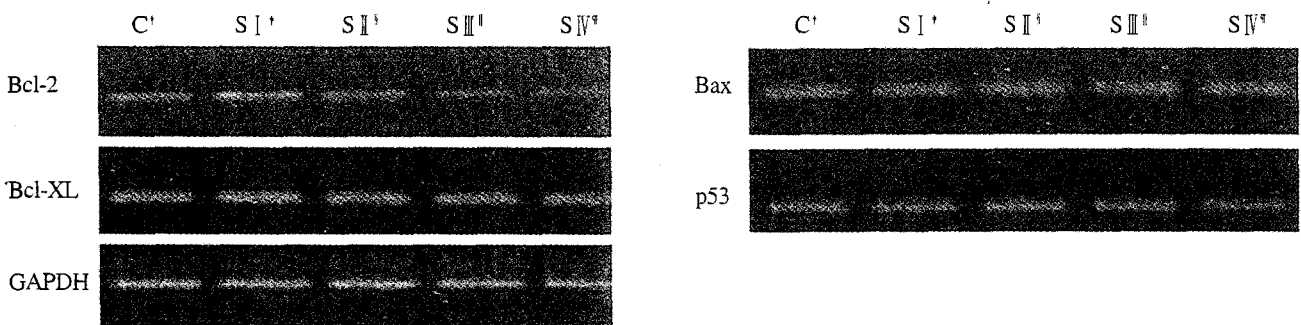


Fig. 3. Quantitative analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-XL and p53 expression induced by *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Mylabris phalerata*.

† : C: Stomach Cancer Cells Not treated

‡ : S I : Stomach Cancer Cells treated with *Sagunjatang*

§ : S II : Stomach Cancer Cells treated with *Sagunjatang plus Mylabris phalerata* 0.5g

|| : S III : Stomach Cancer Cells treated with *Sagunjatang plus Mylabris phalerata* 1.0g

¶ : S IV : Stomach Cancer Cells treated with *Sagunjatang plus Mylabris phalerata* 2.0g

과 방사선요법은 국소적 암의 치료에는 어느 정도 유효하지만 전이된 암에는 치료에 한계가 있다¹⁹. 이들 중 내과적인 항암약물요법이 현재까지의 다양한 중양치료에 있어서 가장 폭넓게 사용되고 있는 치료방법이라고 할 수 있다²⁰. 그러나 이러한 항암제는 그 불확실한 효과와 더불어 작용의 비특이성으로 인해 많은 부작용을 수반하고 있는 것이 사실이다. 즉 항암제가 암세포 외에 정상적인 세포에도 역시 DNA의 손상을 초래하고 세포가 필요한 영양물질의 흡수를 차단하여 정상세포의 세포분열 및 성장을 방해하는 부작용을 초래하는 경우가 대부분이며²¹ 이러한 부작용은 소화기계통을 비롯하여 간장장애, 혈액학적 이상, 면역기능 저하, 유전인자 손상 등으로 다양하게 나타난다²⁰.

따라서 최근에 와서는 이러한 부작용을 극복하고자 한의학적으로 암을 치료하는 여러 가지 방법들이 개발되고 있으며, 수술 후의 재발 방지약으로서 또 한 말기 암의 통증완화 및 수명 연장 효과를 목적으로 사용되어 상당한 효과를 나타내고 있다²¹.

최근의 연구경향은 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 즉 직접적인 중양치료에 관한 연구, 그리고 항암요법의 부작용을 경감시키고 환자의 면역기능을 강화시키는 방면의 연구가 그것이다. 한약의 항암효과에 대한 연구로서는 황³의十全大補湯加瓦松, 姜⁷의半夏厚朴湯, 金¹⁶의銀花瀉干湯加鹿茸, 李²²의啓膈散, 白²³의半夏白朮天麻湯 등과 같은 기존 처방을 비롯하여 林⁸의扶正抗癌湯, 卞⁹의整腸補脾湯, 高¹의膈下逐瘀湯과 같이 새로 창안된 처방들이 유효한 처방으로 보고되고 있으며 임상적 연구로 李⁰ 등은消積白朮散이 유효한 것으로 보고하고 있다. 항암요법의 부작용을 경감

시키고 환자의 면역기능을 강화시키는 방면의 연구로 崔⁴의補中益氣湯, 四六湯, 徐²⁴의沙蔘, 麥門冬, 天門冬, 羅²⁵의白蓮解毒湯 등의 보고가 있었다.

四君子湯은 송대의 陳¹²에 의해 편찬된 太平惠民和劑局方에 처음으로 수록된 처방으로 “治榮衛氣虛 臟腑怯弱 心腹脹滿 全不思飲食 腸鳴泄瀉 嘔噦吐逆”이라 하여 氣虛證을 치료하는 대표적인 補氣劑로서 위장관 질환에 많이 응용되어 왔으며, 실험적 연구로는 李²⁶ 등이 인체의 면역력 증강의 효능이 있음을, 李²⁷ 등은 筋小胞體의 ATPase 활성에 미치는 영향에 관하여 보고하였으나 항암효과에 대하여 미치는 영향을 연구한 보고는 없었다.

斑猫는 破血散結하는 효능이 있어 癥瘕·積聚·癰癤 등을 치료하는 약물로서²⁸ 최근 柳²⁹가 위암세포 증식억제효과 및 살상효과가 있음을 보고하였다.

항암제의 작용기전을 밝히기 위해서는 먼저 대상 항암제가 암세포의 증식에 미치는 효과를 먼저 분석하는 것이 필요하다. 위암세포 증식억제효과를 분석하기 위해서 위암세포를 배양기에서 배양하면서 다양한 농도의 항암제를 투여하여 세포의 증식정도를 알 수 있는 MTT assay를 이용하여 억제효과를 객관적으로 분석하였다. 이 실험에서 사용한 MTT assay는 cell의 viability를 측정하는 방법으로서 1983년 Mosmann³⁰ 등에 의해 처음 시도되었으며, Cole¹³ 등에 의해 널리 보급되었다.

MTT는 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue이며, 100mg, 250mg 등 다양한 용량의 yellow water soluble tetrazolium 염색으로 세포의 viability에 따라 MTT-formazan의 양이 달라지며, 이를 적절한 용매에 작용시킨 후

spectrophotometer로 읽어내어 세포의 생존능력을 측정한다.

본 실험에서 위암세포 증식억제효과를 측정한 결과 四君子湯은 뚜렷한 위암세포 증식억제효과가 없었으나 斑猫와 四君子湯加斑猫는 현저한 효과를 나타내었고 그 중에서 四君子湯加斑猫의 효과가 더 우수함을 관찰할 수 있었다.

최근 항암제가 종양세포를 죽이는 방법 중에서 자기계획 세포사(programmed cell death, apoptosis)를 유도한다는 연구가 활발히 진행되고 있다. 자기계획 세포사란 계획된 세포의 죽음이라 할 수 있으며 이는 최근 들어 세포의 생리학적, 병리학적 과정에서 매우 중요한 현상으로 받아들여지고 있다. Apoptosis는 1972년 Kerr 등에 의해 정립된 개념으로서, 세포사의 한 형태로 어떤 자극에 대해 반응하는 예정된 세포사(PCD: programmed cell death)이며, 암·바이러스성 질환·AIDS 등의 질병에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Apoptosis는 여러 가지 유전자 산물에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 열, stress, virus 등의 다양한 원인과 조건에서의 apoptosis 현상에 대한 분자생물학적 분석과 임상양상과의 상호 연관성에 대한 연구가 지속되고 있다³¹.

본 실험에서 검액이 위암세포의 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인체위암세포주 AGS를 이용하여 apoptosis assay를 시행한 결과 四君子湯加斑猫 투여군에서는 斑猫의 농도와 시간의 경과에 비례하여 위암세포의 apoptosis를 현저하게 촉진시키는 효능이 인정되었다.

암세포의 빠른 세포분열은 세포의 분열, 증식을 촉진시키는 유전자의 발현과 밀접한 관계를 가지고 있다. 즉 정상세

포에서 암세포로 변환(transformation) 되면서 정상세포에서는 약하게 또는 일시적으로 표현되는 세포증식 유전자가 항상 과도하게 표현되기 때문에 암세포가 빠른 세포분열을 하게 되는 것이다. 암세포에서 세포분열을 촉진시키거나 증식과 연관된 대표적인 유전자에는 CDK1(cell cycle을 촉진하는 유전자), CDKN1(cell cycle을 억제하는 유전자), CDKN2a(cell cycle을 억제하는 유전자), CDKN2b(cell cycle을 억제하는 유전자), PCNA(세포의 분열을 나타내는 유전자), Histone H3(cell cycle의 진행을 판별하는 유전자), Cdc2(세포의 분열을 나타내는 유전자), Cyclin D1(cell cycle을 촉진하는 유전자), c-myc(cell cycle에 관여하는 유전자), c-fos(cell cycle에 관여하는 유전자) 등이 있다³².

세포주기 및 분열은 여러 종류의 CDK(cyclin-dependent kinase)와 cyclin complex에 의해 조절된다. CDK1은 Cyclin A, B와 complex를 형성하여 G2 phase에서 mitosis로 진입시켜 주는 역할을 한다. 즉 세포 분열을 촉진시키는 기능이 있다.

Cdc2(cell-division cycle 2)는 mitotic phase로 진행하는데 있어서 매우 중요한 조절자의 역할을 수행하는 protein kinase로서 Cyclin B와 결합한다. Cyclin D는 cyclin-dependent kinase와 결합하여 kinase의 활성도를 조절해주는 단백질로서 Cyclin D는 G1 phase에 발현되는 cyclin으로서 D^{1,2,3}의 3 종류가 있으며 CDK^{4,6}와 결합하여 S phase로의 진행에 관여한다³³.

PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)은 DNA polymerase δ 와 결합하여 polymerization과정을 촉진시켜 주는 단백질로서 세포분열기에 많이

표현되어 세포의 proliferation index로 이용되고 있다³⁴.

c-myc는 protooncogene의 하나이며 immediate early growth response gene이다. 세포의 증식에 관여하며 암세포에서 흔히 활성화되어 있음을 볼 수 있다. 따라서 c-myc는 암세포의 세포증식과 밀접한 연관이 있다³⁵.

한편 세포의 자기계획 세포사에는 여러 종류의 단백질 및 유전자가 관여하는데 대표적인 유전자로는 Bcl-2, Bax, Bcl-XL, fas, FAD, CPP32, bak 등이 있다.

Bcl-2는 follicular type의 악성 임파종에서 처음 발견된 유전자이다. 즉 t(14;18)(q 32;q21)사이의 translocation으로 인하여 Bcl-2가 존재하는 18q21부위가 면역단백질의 heavy chain을 발현시키는 14q32로 translocation되어 그 발현이 증가되어 발견되었다. 이후 이 계열의 단백질이 계속 발견되었으며 현재 Bcl-2 계열 단백질은 크게 세포사멸을 유도하는 단백질과 세포사멸을 억제하는 단백질로 구분할 수 있다. 이들은 공통적으로 Bcl-2 homology region이라 불리는 BH1, BH2, BH3, BH4를 가지고 있으며 이들은 Bcl-2 및 이 계열 단백질의 기능에 매우 밀접한 연관성을 가지고 있다. 세포사멸을 유도하는 Bcl-2 계열단백질에는 Bax, bid, bak, bad 등이 있으며 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 계열단백질에는 Bcl-2, Bcl-XL 등이 있다³¹.

p53은 가장 잘 알려진 종양억제 유전자로서 염색체 17p13.1에 위치하고 있다. 종양의 50%이상에서 p53의 돌연변이가 보고되고 있으며 특히 폐암, 위암, 대장암, 전립선암 등에서 그 발생빈도가 높은 것으로 알려져 있다. p53의 돌연변이로 인한 기능소실이 종양의 발생과

밀접한 연관이 있다는 사실은 p53이 기능상 gatekeeper로서의 역할을 한다는 점과 연관이 있다고 볼 수 있다³⁶. p53은 세포의 핵에 위치하며 다른 유전자의 발현을 조절한다. 생리적으로 p53은 20분 정도의 매우 짧은 반감기를 가지고 있으며 따라서 정상세포의 세포주기를 조절하지는 않는다고 볼 수 있다. 그러나 p53은 방사선, ultraviolet light 등의 DNA에 손상을 주는 자극을 받았을 경우 매우 증가되어 여러 가지 유전자의 발현을 통하여 고유한 기능인 세포주기 및 세포사멸을 조절한다. p53의 세포사멸 조절은 치료적 측면과 매우 밀접한 관련이 있다. 일반적으로 항암치료에 많이 사용되는 방사선 조사나 항암제는 DNA의 손상을 초래하여 이로 인한 세포사멸을 유도하는 방법이다³⁷. 이때 종양세포가 정상적인 p53을 가지고 있는 경우 효과적인 세포사멸이 일어나나, 돌연변이로 인한 비활성화된 p53을 가지고 있는 경우 효율적인 세포사멸이 일어나지 않는다. 따라서 p53의 발현은 종양치료적 측면에서 매우 중요한 의미를 가지고 있다고 볼 수 있다³⁸.

본 실험에서는 四君子湯과 四君子湯加斑猫에 의해 이러한 유전자들 중 어떤 유전자의 발현이 억제 또는 촉진되는지를 quantitative RT-PCR(reverse transcription -polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 측정함으로써 유전자 수준에서 본 약제의 작용기전을 살펴보았다.

RT-PCR은 전통적으로 특정 유전자의 RNA 분석에 사용된 Northern blot의 문제점을 극복하는 방법이다. 기존 Northern blot 방법의 단점인 일개 유전자 분석에 5~10 μ g의 RNA가 필요하다는 점과 동위원소의 사용이 필수적이라는 문제점을 해결한 방법으로 미량

(1 μ g 이하)의 RNA만으로도 특정 유전자의 분석이 가능하기에 민감도가 뛰어나며 동위원소의 사용이 필요하지 않다는 점 때문에 최근 대부분의 분자생물학적 연구에 사용되어지고 있다. 그러나 세포 또는 조직 속에 존재하는 핵산의 template가 100만배 이상으로 증폭된다는 사실로 인하여 정량분석은 PCR 시행 후에 그 product의 전기영동상 DNA-band의 강도만으로 결과를 서로 비교할 수 없다는 단점을 계속 가지고 있다. 최근에는 표준 RNA를 이용하여 한 시험관에서 역전사가 일어나게 한 후 그 cDNA를 차례로 희석하고 각각을 PCR로 증폭하여 영상밀도계(densitometer)로서 정량화하는 등으로 mRNA 정량방법을 확립하여 그 단점을 보완하였다¹⁴.

본 실험에서 이러한 RT-PCR을 이용해 앞에서 언급한 각종 유전자의 발현을 분석한 결과, 斑猫를 사용한 柳¹⁹의 보고에서 나타난 45.5%보다 증가된 억제효과를 나타내고 있어 四君子湯과 斑猫를 같이 사용할 경우 위암세포 억제 효과가 증가됨을 알 수 있었다.

V. 結 論

四君子湯 및 四君子湯加斑猫의 항암 효과와 그 분자생물학적인 기전을 밝히기 위하여 인체 위암세포주 AGS를 대상으로 MTT assay를 시행하여 위암세포 증식억제효과를, apoptosis assay를 시행하여 apoptosis에 미치는 영향을, 위암세포의 분열 관련 유전자 CDK1, Cdc2, Cyclin D1, PCNA, c-myc와 apoptosis 관련 유전자 Bcl-2, Bax, Bcl-XL 및 p53의 발현에 미치는 영향을 정량적 RT-PCR을 이용하여 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 위암세포의 증식억제효과 측정에서 四君子湯 투여군은 대조군에 비하여 위암세포 증식억제효과가 없었으나, 四君子湯加斑猫 투여군은 대조군에 비하여 위암세포의 증식이 시간경과에 비례하여 유의성(p<0.05)있게 억제되었다.

2. 위암세포의 apoptosis에 미치는 영향은 四君子湯 투여군이 대조군에 비하여 약간 증가하였으나 유의성은 인정되지 않았으며, 四君子湯加斑猫 투여군은 대조군에 비하여 농도와 시간경과에 비례하여 유의성(p<0.05)있게 증가하였다.

3. 유전자의 발현에 미치는 영향은 四君子湯加斑猫 투여군에서만 apoptosis를 억제하는 Bcl-2의 발현이 농도에 비례하여 감소하는 것으로 나타났으며, 위암세포 분열관련 유전자 CDK1, Cdc2, Cyclin D1, PCNA, c-myc와 apoptosis 관련 유전자 Bax, Bcl-XL 및 p53에 대해서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

參考文獻

1. 조완규. 消化器學. 서울:서울대학교의과대학;1990, 87-98쪽
2. 康命吉. 濟衆新編. 서울:행림서원;1971, 12, 87, 136-137, 150-151쪽
3. 황규동 류봉하 박동원 류기원. 十全大補湯, 瓦松, 十全大補湯加瓦松의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 關한 研究. 대한한방종양학회지 1996;2(1):1-24.
4. 최승훈. 방사선 조사 후의 N:GP(S) mouse 비장세포증식에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 효과. 제1회 동양의학 국제심포지움논문집 1995:110-239.
5. 고평석. 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗腫瘍 및 免疫調節作用에 關한 實驗的 研究. 경희대학교 대학원 박사학위논문 1994.
6. 김진성. 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 關한 研究. 대한한방종양학회지 1997;3(1):1-27.
7. 강재만. 半夏厚朴湯이 抗腫瘍 및 免疫調節作用에 미치는 影響. 대한한방종양학회지

- 1996;2(1):57-73.
8. 임미량. 扶正抗腫瘍湯이 抗腫瘍免疫反應에 미치는 影響. 대한한방종양학회지 1997;3(1):67-84.
9. 전우현 류기원 류봉하 윤상철. 整腸補脾湯의 胃液分泌, 腸管輸送能 및 抗腫瘍效果에 關한 研究. 경희대학교 대학원. 1999.
10. 박태선. 消積白朮散이 免疫細胞의 動態, 大食細胞의 走化性 및 附着性에 미치는 影響. 대한한방종양학회지 1997;3(1):49-66.
11. 최승훈. 韓醫學의 腫瘍에 대한 認識과 病理論. 대한한방종양학회지 1995;1(1):11-28.
12. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 서울:경희대학교 한의과대학;1974, 115, 242쪽
13. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. Cancer chemotherapy Pharmacology 1986;17(3):259-63.
14. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm-2 expression is induced by wild-type p53 activity. EMBO 1993;12:461-8.
15. Ferre F. Quantitative or semiquantitative PCR:reality versus myth. PCR Methods and Applications 1992;2:1-9.
16. 김정순. 우리나라 사망원인의 변천과 현황. 대한의학협회지 1993;36(3):271-84.
17. 대한병리학회. 病理學. 서울:고문사;1991, 225-6쪽
18. 전병욱. 癌에 대한 韓醫學의 認識 및 實驗的 研究에 關한 考察. 대한한방종양학회지 1995;1(1):47-61.
19. 서울대학교의과대학 편. 腫瘍學. 서울:서울대학교 출판부;1998, 138, 149-53, 168, 182-4, 225-7쪽
20. 의학교육연수원. 약물요법. 서울:서울대학교 출판부;1993, 327-31쪽
21. 김병주 문구. 大腸癌의 東西醫 結合 診治近況. 대한한방종양학회지 1999;5(1):1-17.
22. 이지향. 啓膈散의 抗腫瘍 및 免疫反應에 關한 實驗的 研究. 대한한방종양학회지 1997;3(1):99-128.
23. 백태현. 半夏白朮天麻湯과 半夏白朮天麻湯加味方의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 關한 實驗的 研究. 대한한방종양학회지 1995;1(1):141-66.
24. 徐龍生. 扶正培本法在 腫瘤臨床上的 應用. 浙江中醫雜誌 1989;1:5.
25. 羅景光. 鼻咽癌的 中西醫結合治療深討. 新中醫 1989;5:37-8.
26. 이남구 이현창 주영승. 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK細胞의 細胞毒性에

- 미치는 影響. 대한한의학회지 1989; 10(2):115-22.
27. 이기남. 四君子湯 抽出液이 筋小胞體의 ATPase 活性에 미치는 影響에 關한 研究. 대한한의학회지 1989;10(1):117-24.
28. 신민교. 臨床本草學. 서울:남산당;1986, 166-7, 172-3, 175-7, 250-2, 711-2쪽
29. 류봉하 김진성 이지향 박재훈 지성길 유진화. 수중 한약제의 위암세포에 대한 항암작용 효능 검색 및 약리작용에 관한 분자생물학적 연구. 대한한방중양학회지 1999;5(1):47-60.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunologic methods* 1983;65(1-2):55-63.
31. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Komblau SM, Andreeff M. Apoptosis. *Molecules and mechanisms. Adv. Exp. Med. Biol* 1999;457:217-36.
32. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extration. *Anal. Biochem* 1987;162:156-9. .
33. Harvey L, Arnold B, S. Lawrence Z, Paul M, David B, James D. *Molecular cell biology*. 4th edition. W. H. Freeman company;2000, 520-9쪽.
34. Cann IK, Ishino S, Hayashi I, Komori K, Toh H, Morikawa K, Ishino Y. Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J Bacteriol* 1999;181:6591-9.
35. Ramzi S. Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collins. *Pathologic basis of disease*. 6th edition. Philadelphia: W. B. Saunders company;1999, 282-3쪽.
36. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53:the decision between life and death. *Oncogene* 1999;18: 6145-57.
37. Roth JA, Swisher SG, Meyn RE. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Oncology* 10 Suppl 1999;5: 148-54.
38. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer:the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res* 1999; 77:81-137.