

四君子湯加山慈菇가 위암세포에 미치는 항암효과에 대한 분자생물학적 연구

김진석, 류봉하, 류기원, 윤상협, 김진성
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Molecular Biological Study on Anti-Cancer Effects of *Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber* on Human Stomach Cancer Cells

Jin-Seok Kim, Bong-Ha Ryu, Ki-Won Ryu, Sang-Hyub Yoon, Jin-Seong Kim

Dept. of 3rd Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

1. Background

The previous studies on anticancer medicine derived from korean traditional medicine have focused on the life elongation of cancer cell bearing animals. However, it is thought that more molecular biological studies are needed to reveal their mechanism.

2. Objective

The aim of this study was to investigate the molecular biological function of *Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber* on cytostaticity, apoptosis and apoptosis related genes revelation against human stomach cancer cells(AGS).

3. Methods

After administrating *Sagunjatang* and *Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber* to human stomach cancer cell, MTT assay was performed to compare and examine the efficacy of each medicine on the cytostaticity of stomach cancer cells in proportion to time and doses, and apoptosis assay was performed to examine their effect on apoptosis by using DAPI dye and counting the number of cells which developed in an apoptotic body. In addition, the quantitative RT-PCR was used to examine their effect on the revelation of Bcl-2, Bax and P53, which are genes related to apoptosis.

4. Result and Conclusion

Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber demonstrated increased cytostaticity, decreased apoptosis and unremarkable revelation of apoptosis related genes. But in the cytostaticity and apoptosis, *Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber* showed a tendency to control stomach cancer cells. Therefore, we can expect the clinical application to the related diseases. Besides, it needs another experiment on various cancer cells, such as, lung cancer cell and hystero carcinoma cell.

Key Words: *Sagunjatang*, *Cremastrae Appenediculatae Tuber*, Human stomach cancer cells(AGS), MTT assay, Apoptosis, RT-PCR

I. 서론

우리나라에서 위암은 암 사망을 1위를 차지하며, 매년 약 14,000명이 위암으로 사망한다. 1998년 우리나라 사망원인 통계연보에 따르면 위암 사망률은 인구 10만 명당 25.6명이었는데, 이 중 남자는 32.4명, 여자는 18.8명이었다. 이러한 사망원인 통계를 근거

· 접수 : 2002년 4월 9일 · 채택 : 2002년 7월 31일
· 교신저자 : 김진석, 서울특별시 동대문구 회기동 1 경희의료원
한방병원 3내과
(Tel. 02-958-9140, Fax: 02-958-9136, E-mail:
yalli70@hanmail.net)

로 우리나라 사람이 일생동안 위암으로 사망할 확률을 계산하면 남자는 100명 중 7-8명, 여자는 3명이다.¹

위암의 치료법에는 크게 외과적 수술, 방사선조사, 내과적인 항암제 투여 등이 있다.² 전이되기 이전 초기 단계의 위암은 외과적 절제로 높은 치료효과를 보이지만 방사선조사와 내과적인 항암제 투여는 정상세포까지 독성을 나타내어 소화장애, 간장장애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역기능저하, 골수조혈장애, 생식기 장애, 유전인자장애, 피부변화 및 폐섬유증 등의 부작용을 초래하고 있다.³ 이러한 부작용을 극복하고자 최근 합성물질이 아닌 한약제를 위암 치료에 활용하려는 연구가 이루어지고 있다.

한방 항암제에 대한 기존의 약리 작용의 연구는 단편적으로 실험동물에 암세포를 투여한 후 항암제에 대해 실험동물의 수명이 연장됨을 확인하는 수준에 머물러 온 것이 사실이다. 이러한 단편적인 연구는 항암제의 작용 기전을 밝히기에는 부족하다고 생각되며 한약제의 약리 작용에 대한 분자생물학적 연구가 필요하다고 생각된다.⁴

四君子湯은 人蔘 白朮 白茯苓 甘草로 구성된 대표적인 補氣劑로서 최근의 연구에서 李⁵ 등이 면역증강 효과가 있음을 보고한 바 있으나 위암에 대한 연구는 보고된 바가 없고, 山慈菇는 임상에서 그 효능 및 치료 효과가 인정되는데도 불구하고 국내에서는 山慈菇에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 山慈菇의 항암효과에 대한 실험적 연구로는, 吳⁶의 山慈菇가 암세포 감수성에 미치는 영향, 梁⁷의 山慈菇가 흰 쥐의 自然殺害細胞活性에 미치는 영향에 관한 실험보고가 있었지만 山慈菇의 항암효과를 입증하지 못했다.

이에 저자는 四君子湯과 四君子湯에 山慈菇를 가

한 처방이 위암에 대하여 항암효능이 있을 것으로 사려되어 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 효과 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 약재

이 실험에 사용한 약재는 모 대학병원 약제과에서 구입, 정선한 후 사용하였고, 四君子湯의 내용과 분량은 陳師文의 太平惠民和劑局方에 준하였다.

이와 같은 기준에 의한 四君子湯加山慈菇의 구성 약재와 1첩의 분량은 Table 1과 같다.

2) 위암세포

이 실험에 사용한 암세포는 국내 암 환자의 위암 세포인 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), 1% broad-spectrum

Table 1. Prescription of Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber.

약명	학명	생약명	용량(g)
人蔘	<i>Panax Ginseng C. A. Meyer</i>	Ginseng Radix	5.00
白朮	<i>Atractylodes macrocephala Koidzumi</i>	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	5.00
白茯苓	<i>Poria cocos Wolff</i>	Hoelen	5.00
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischeret. De Candolle</i>	Glycyrrhizae Radix	5.00
山慈菇	<i>Cremastra appendiculata(D. DON) NAKINO (C. variabilis (BL.)NAKAI)</i>	Cremastrae AppenediculataeTuber	5.00-15.00
Total amount			25.00-35.00

antibiotics(Gibco BRL, MD)가 함유된 RPMI-1640(Gibco BRL, MD) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ incubator(Precision Scientific Inc., NY)에서 배양하였다. 세포의 회수는 0.1% Trypsin-EDTA(Sigma, MO)를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

2) 약물처리

증류수 100 ml에 조제된 四君子湯 1첩 분량 20g(sample A)과 四君子湯에 山慈菇를 각각 5g(sample B), 10g(sample C), 15g(sample D)을 첨가하여 125℃에서 20분간 끓인 후 이 액체를 검액으로 사용하였다. 이 검액을 0.2µm의 syringe filter를 이용하여 여과한 후, MTT assay를 시행하는 경우에는 배지 ml당 20µl의 검액을 각각 6, 12, 24시간 동안 투여하였으며, apoptosis assay를 시행하는 경우에는 배지 ml당 20µl의 검액을 각각 6, 12, 24시간 동안 투여하였으며, quantitative RT-PCR을 시행하는 경우에는 배지 ml당 20µl의 검액을 투여하여 반응을 관찰하였다.

3) 위암세포의 증식 억제 효과 측정

위암세포의 증식 억제 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 시행하였다.

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 5mg/ml을 PBS(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 면역형광측정

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) 위암 세포의 apoptosis에 미치는 효과 측정

위암 세포의 apoptosis에 미치는 효과를 측정하기 위하여 apoptosis assay를 시행하였다. 위암 세포주에 각각 검액을 20µl/ml씩 투여하여 각각 6, 12, 24시간 이 경과한 후에 위암 세포를 회수하여 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 시행한 후에 형광 현미경을 이용하여 apoptotic body가 형성된 위암 세포의 수를 측정하여 백분율로 표시하였다. 이 실험의 결과는 3회 반복하여 평균치로 나타냈다.

5) Apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 효과 측정

위암 세포의 증식 및 apoptosis와 연관된 유전자의 발현에 미치는 효과를 검증하기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다.

(1) RNA 추출

각각의 검액이 투여된 위암세포를 회수하여 원심 분리한 후 Solution D(250g guanidine isothiocyanate in 293 ml water, 0.75M sodium citrate 17.6 ml, 10% sarkosyl 26.4 ml, 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

다음의 조성(Table II)으로 시료를 혼합한 후 42℃에서 30분간 incubation하여 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA는 연쇄중합반응의 민감도를 높이기 위하여 1:4로 희석하였다.

(3) 유전자 연쇄중합반응(PCR)

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

Table 2. The Composition of cDNA

Reaction Mixture	Volume	Final Concentration
MgCl ₂ , 25mM 5x Reverse Transcriptase	4 μ l	5mM
Buffer(Gibco BRL, MD)	4 μ l	1x
10mM dNTP Mixture	2 μ l	1nm each
RNase Inhibitor(Promega, WI) AMV Reversetranscriptase	0.5 μ l	1U/ μ l
(8U/ μ l)(Gibco BRL, MD)	2 μ l	15U/ μ g of RNA
Oligo-dT(0.5 μ g/ μ l)	1 μ l	0.5 μ g/ μ g of RNA
RNA	1 μ l (1 μ g/ μ l)	50ng/ μ l
H ₂ O	5.5 μ l	

Table 3. The Condition of PCR Reaction

Primer	Denaturation	Annealing	Polymerization	Cycle
GAPDH	45sec at 94℃	30sec at 58℃	45sec at 72℃	36cycle

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

② 시료혼합물을 5분간 94℃에서 가열하여 DNA를 denaturation시킨다.

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

④ 100 μ l of light mineral oil를 넣는다.

⑤ 다음의 조건(Table III)으로 PCR 반응을 시행한다.

6) 통계처리

각 실험군과 대조군 사이의 유의성 검사는 SPSS 8.0 컴퓨터 프로그램을 이용하여 Repeated measures ANOVA로 통계처리하였으며, p<0.05를 유의성있는 결과로 판단하였다.

Ⅲ. 성 적

1. 위암 세포의 증식 억제 효과

검액이 암 세포의 증식에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 인체 위암 세포주 AGS를 이용하여 MTT assay를 시행하고 그 결과를 Table IV에 나타내었다.

이 결과로 보아 四君子湯은 위암세포에 대하여 증식을 억제하는 효과가 유의하게 나타나지 않았으며, 四君子湯加山慈姑는 山慈姑의 농도 및 시간경과에 비례하여 유의성 있는 위암 세포의 증식 억제 효과를 나타내지 않았으나 실측치에 있어서 위암 세포의 증식 억제 경향이 나타났다.

2. 위암 세포의 apoptosis에 대한 효과

검액이 암 세포의 apoptosis에 대한 효과를 관찰하기 위하여 인체의 위암 세포주 AGS를 이용하여

Table 4. Effects of Sagunjatang and Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber on Human Stomach Cancer Cells Growth Using MTT Assay

Group	O.D.(Optical Density)			
	0hrs	6hrs	12hrs	24hrs
Control	0.78±0.03 *	0.84±0.04	0.89±0.07	0.79±0.02
Sample A †	0.77±0.05	0.79±0.08	0.84±0.09	0.76±0.06
Sample B ‡	0.81±0.07	0.73±0.05	0.65±0.03	0.59±0.05
Sample C §	0.75±0.06	0.69±0.05	0.63±0.08	0.55±0.09
Sample D	0.76±0.07	0.75±0.10	0.68±0.13	0.56±0.07

apoptosis assay를 시행하고 그 결과를 Table V에 나타내었다.

이 결과로 보아 四君子湯은 위암 세포에 대하여 apoptosis를 촉진시키는 경향을 나타냈으나 그 효과가 미미하였고, 四君子湯加山慈菇는 山慈菇의 농도 및 시간경과에 비례하여 통계학적 유의성은 없으나 위암 세포의 apoptosis 촉진효과를 나타내어 항암효과를 기대할 수 있을 것으로 사려된다.

3. Apoptosis와 관련된 유전자의 발현에 미치는 효과
세포의 유전자 발현에 있어서 대조군과 검액을 투여한 실험군 세포의 유전자 발현양상을 알아보기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다. 세포의 유전자 발현에 있어서 중요한 역할을 하는 RNA를 추출하고 이것을 이용, cDNA를 합성하고 primer를 제작하여 PCR 반응을 시행하였고, 만들어진 PCR product를 전기영동을 거쳐 densitometry를 시행하여 Table VI에 나타내었다.

이 결과로 보아 apoptosis와 관련이 있는 bcl-2, bax, P53 등의 발현에는 유의할 만한 수치상의 변화가 없었다.

IV. 고 찰

신생물이란 개체를 구성하는 정상세포가 여러가지 자극에 의하여 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형세포의 집단, 즉 종양(tumor)을 뜻한다.⁸ 그러나 종양은 아직도 그 생물학적인 성상이 복잡하므로 그 정의를 적절하게 내린다는 것은 어렵다. 다만 종양이라는 것은 조직의 자율적인 과잉적 성장이며, 이것은 개체에 대해서 의의가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해서 파괴적인 것을 말한다는 설이 타당한 것 같다.⁹

이러한 종양(암)의 발생원인에 대하여 서양의학에

Table 5. Effects of Sagunjatang and Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber on Human Stomach Cancer Cells in Apoptosis Assay Using DAPI

Group	Apoptosis Rate(%)			
	0hrs	6hrs	12hrs	24hrs
Control	2.3±0.4 *	2.5±0.4	2.3±0.3	2.4±0.5
Sample A †	2.5±0.3	3.4±0.3	4.8±0.5	4.3±0.7
Sample B ‡	2.3±0.6	6.0±0.9	16±2.1	17±1.8
Sample C §	1.6±0.5	5.0±1.8	18±2.6	19±2.3
Sample D	3.5±0.3	5.0±1.7	17±0.9	22±2.4

Table 6. Gene Revelation of Cremastrae Appenediculatae Tuber on Human Stomach Cancer Cells by RT-PCR

Group	Gene Revelation		
	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	p53/GAPDH
Control	0.64	0.50	0.30
Sample A †	0.62	0.58	0.36
Sample B ‡	0.58	0.52	0.35
Sample C §	0.70	0.57	0.41
Sample D	0.65	0.53	0.34

*: Mean ± Standard Error

Control: Untreated human stomach cancer cells

Sample A †: Human stomach cancer cells treated with *Sagunjatang*

Sample B ‡: Human stomach cancer cells treated with *Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber 5g*

Sample C §: Human stomach cancer cells treated with *Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber 10g*

Sample D ||: Human stomach cancer cells treated with *Sagunjatang plus Cremastrae Appenediculatae Tuber 15g*

서는 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 있다.¹⁰⁾

한의학에서는 위암이라는 명칭은 없지만, <素問風論>에 “胃風之狀 頸多汗惡風 飲食不下 膈塞不通 腹善滿 失衣則腹脹 食寒則泄 診形瘦而腹大”라 하였고,¹¹⁾ <靈樞 邪氣藏府病形篇>에 “爲病者腹脹 胃脘當心而痛 上支兩脇 膈咽不通 飲食不下”라는 기록이 있어서¹²⁾ 위암에 나타날 수 있는 증상과 유사한 것을 발견할 수 있으며, <金匱要略>에서는 “朝食暮吐 暮食朝吐, 宿食不化, 名曰胃反, 脈緊而澹 其病難治”라 하여서¹³⁾ 위암의 말기증상과 유사한 표현을 하고 있고, <醫學入門>에서는 “其枯在上焦賁門者 食不能下 下則胃脘當心而痛 須臾吐出痛乃止, 賁門即胃脘上口, 其枯在中焦幽門者 食物可下良久復出 幽門與中脘相近, 其枯在下焦蘭門者 朝食暮吐 暮食朝吐 蘭門膈下”라 하여서¹⁴⁾ 종양의 발생 부위별로 특징적인 증상을 나타내고 있는데 이는 위암의 발생부위 및 다른 장기로의 전이로 인한 증상의 차이를 나타내는 것과 유사함을 알 수 있다.⁴⁾

한의학적 치료법으로는 十全大補湯¹⁵⁾, 補中益氣湯¹⁶⁾ 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¹⁶⁾, 銀花瀉肝湯¹⁷⁾ 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¹⁸⁾, 整腸補脾湯¹⁹⁾ 등 扶正과 祛邪를 병용하는 扶正祛邪法으로 분류할 수 있다.²⁰⁾

서양의학에서는 위암을 치료함에 있어서 외과적 처치, 방사선 요법, 화학요법, 면역요법의 네가지 방법이 활용되고 있는데 진행암, 전이암 혹은 수술이나 방사선 치료와 같은 국소 치료법을 적용할 수 없는 경우 화학요법이 중요한 핵심을 이루게 된다.²¹⁾

위암의 치료에 사용되는 항암제의 작용 기전은 주로 암 세포의 DNA에 손상을 초래하여 암 세포의 세포분열을 차단하거나, 세포가 성장하는데 반드시 필

요한 영양물질과 경쟁관계를 형성함으로써 영양물질의 흡수를 차단하여 세포의 성장을 차단하는 기능을 가지고 있다. 그러나 현재까지 개발된 항암제의 가장 큰 단점은 항암제의 비특이적 작용이라 할 수 있다. 즉 항암제가 암 세포 뿐만 아니라 정상적인 세포에도 같은 작용을 함으로서 정상세포의 세포분열 및 성장을 방해하여 이로 인한 부작용이 초래되는 것이다. 화학요법에 사용되는 항암제는 암 세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 분열이나 증식이 빠른 세포에는 모두 작용하므로 정상적으로 세포분열이 왕성한 골수세포, 위장관 상피세포, 모낭 등에도 손상을 받게 된다.²²⁾ 이와 같이 항암제의 작용은 비특이적이기 때문에 정상세포에 대한 손상으로 치료에 수반되는 부작용은 불가피하다. 현재까지 개발된 항암제는 공통적으로 이와 같은 문제점을 가지고 있다. 이러한 부작용을 극복하고자 최근 합성물질이 아닌 천연물질에서 抗癌 물질을 추출하려는 연구가 이루어지고 있다.⁴⁾

한방에서 사용되는 항암제, 특히 위암의 치료에 이용되는 약물은 이제까지 임상적 경험을 통하여 여러 단계의 위암 환자에서 그 효능 및 치료효과가 인정되고 있으나 약물의 작용기전에 관한 체계적이며 과학적인 근거자료가 부족한 실정이며 또한 그 약리작용도 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 따라서 실험을 통한 과학적인 근거를 통하여 새로운 한약물이 改善 내지 개발될 수 있다는 점에서 이에 대한 과학적인 분석이 필요하다. 그러나 기존의 약리작용에 대한 연구는 단편적으로 실험동물에 암 세포를 투여한 후 항암제에 의해 실험동물의 수명이 연장됨을 확인하는 수준에서 머물러온 것이 사실이다.⁴⁾ 이러한 단편적인 연구는 항암제의 작용기전을 밝히기에는 부족하다고 생각되며 한약제의 약리 작용에 대한 분자생물학적 연구가 필요하다고 생각된다.

四君子湯은 宋代의 陳²²⁾에 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²³⁾로서 위장관 질환에 많이 응용되어 왔으며, 실험적 연구로

는 李²⁴ 등이 인체의 면역력 증강의 효능이 있음을, 李²⁴ 등은 筋小胞體의 ATPase 활성화에 미치는 영향에 관하여 보고하였으나 항암효과에 대하여 미치는 영향을 연구한 보고는 없었다.

山慈菇는 氣味가 辛·寒有小毒하고 肝·胃 二經絡에 작용하여 清熱解毒, 消腫散結, 抗癌 하는 清熱藥으로 유선암, 피부암, 백혈병, 호지킨씨병, 자궁경부암, 식도암, 폐암, 위암, 비인두암, 타액선암, 癰疽發背, 疔腫惡瘡, 淋巴結核, 急性痛風등이 적응증이다.²⁵

본 실험에서는 한국에서 주로 통용되고 있는 *Cremastrae Appendiculatae Tuber* 일명 藥蘭草를 대상으로 하였다. 중국에서는 山慈菇를 항암약제로 활용함에 있어서 清熱解毒, 消腫散結의 효능과 함께 '콜히친'이란 항암 성분의 작용을 증시한다. '콜히친'은 유사분열중기에 방추체 형성을 저지해 염색체가 양극으로 이동하는 것을 방해함으로써 세포 증식을 억제한다. 따라서 중국에서는 山慈菇의 기원식물 중 콜히친 함량이 가장 높은 *Iphegia indica*(麗江山慈菇)를 주로 활용한다. 또 콜히친 성분만을 따로 추출해서 임상에서 응용하기도 한다.²⁶ 콜히친을 주요성분으로 하는 山慈菇의 중독증은 주로 위장반응으로 나타나는데 구역, 식욕감퇴, 고창증 및 편비 등이 있다. 심하면 장마비, 사지산통의 증상도 나타난다. 백혈구와 혈소판의 감소증도 나타날 수 있으나 골수를 심하게 억제하는 일은 적고 복용을 멈추면 곧 회복된다. 정맥염도 나타날 수 있고 주사약물이 혈관 밖으로 유출되면 국부적 조직에 괴사가 올 수 있다. 따라서 노쇠하고 허약하며 간기능 장애가 있거나 심혈관병이 있는 자에게는 慎用하거나 禁해야 한다.²⁶

항암제의 작용기전을 밝히기 위해서는 대상 항암제가 암 세포의 증식에 미치는 효과를 먼저 분석하는 것이 필요하다. 암 억제 효과를 분석하기 위해서 암 세포를 배양기에 배양하면서 다양한 농도의 항암제를 투여하여 세포의 증식정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 억제 효과를 객관적으로 분석하였다. 본 실험에서 사용한 MTT 검사방법은 cell의 viability를 측정하는 방법으로 1983년 Mosmann에 해 처음 시도되었으며, 1986년 Cole에 의해 사용되기 시작하

여 최근 널리 보급되었다.²⁷

암은 DNA의 변화가 세포들의 기형적인 축적을 초래할 때 발생하게 된다. 세포 분열과 세포 죽음 사이의 상대적인 비율은 얼마나 암이 빨리 성장하는가를 결정한다. 어떤 암은 정상 세포보다 천천히 분열하지만 세포의 생존 기간이 연장됨으로써 암이 커지게 될 수도 있다. 많은 발암 인자가 DNA를 손상시키거나 정확한 DNA복제에 필요한 효소 작용을 방해하며 세포는 여러 방법으로 이런 종류의 손상에 반응하게 되는데 어떤 경우는 손상이 회복될 때까지 세포 분열을 연기할 수도 있고 또 다른 경우는 스스로 apoptosis(programmed cell death)를 일으키거나 또는 세포성장주기를 통해 중단없이 진행될 수도 있다. 그러므로 apoptosis는 유전학적인 병변이 있는 세포를 제거함으로써 악성화를 막을 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있다.²⁷

Apoptosis는 불필요한 세포를 제거하는 機作으로 다세포 생물의 발생과정과 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 생체구조의 형성, 불필요한 구조의 제거, 비정상적이거나 해가 되는 세포의 제거, 세포 수의 조절 등이 apoptosis를 통해 일어난다. 외부작용에 의해 일어나는 세포의 죽음인 necrosis에서는 죽는 세포는 부피가 커지면서 결국에는 세포가 터지고, 밖으로 분출된 세포질에 의해 염증반응을 일으키는 반면, apoptosis에서는 세포 부피의 축소, 세포막 돌출, membrane-bound apoptotic body 형성, 핵의 염색질 농축, DNA 단편화 등이 일어나고, 죽은 세포는 이웃세포의 대식작용에 의해 사라지게 된다. Apoptosis는 세포의 증식을 일으키는 mitosis와 상호전제하여 필요한 만큼의 세포 수를 유지하게 된다.²⁸

한편 세포의 자기계획 세포사에는 여러 종류의 단백질 및 유전자가 관여하는데 대표적인 유전자로는 Bcl-2, Bax, Bcl-XL, fas, FAD, CPP32, bak 등이 있다.²⁹ 이들 유전자는 세포의 죽음에 깊이 관여하고 있으며 한 예로서 Bcl-2 유전자의 경우에 이 유전자가 다량으로 표현될 경우 세포는 여러 종류의 유해한 자극으로부터 강력하게 저항할 수 있는 능력을 얻게 된다. 종양세포가 이런 유전자의 발현을 통해 항암제의

공격으로부터 저항하면서 지속적으로 분열·증식할 수 있는 것이다. 일부의 항암제의 경우 이러한 유전자의 발현을 억제하거나 또는 세포에서 죽음을 촉진하는 유전자를 유발함으로써 항암 효과를 발휘할 수 있다. 따라서 이 연구에서 사용되는 四君子湯加山慈菇가 이러한 세포의 죽음과 연관된 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는가를 연구하는 것은 四君子湯加山慈菇의 약리작용의 기전을 밝히는 데 반드시 필요한 과정이라 할 수 있다.

본 실험에서는 유전자의 발현을 분석하는데 있어 quantitative RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 방법을 사용하였다. RT-PCR은 전통적으로 특정 유전자의 RNA 분석에 사용된 Northern blot의 문제점을 극복하는 방법이다.³⁰ 기존 Northern blot 방법의 단점인 일개 유전자 분석에 5-10 µg의 RNA를 필요로 한다는 점과 동위원소의 사용이 필수적이라는 문제점을 해결한 방법으로 미량(1µg이하)의 RNA만으로도 특정 유전자의 분석이 가능하기 때문에 민감도가 뛰어나며, 동위원소의 사용이 필요하지 않다는 점 때문에 최근 대부분 분자생물학적 연구에 사용되어지고 있다. 그러나 세포 또는 조직속에 존재하는 핵산의 template가 100만배 이상으로 증폭된다는 사실로 인하여 정량분석은 PCR 시행 후에 그 product의 전기영동상의 DNA-band의 강도만으로 결과를 서로 비교할 수 없는 단점은 계속적으로 가지고 있다. 최근에는 표준 RNA를 이용하여 한 시험관에서 역전사가 일어나게 한 후 그 cDNA를 차례로 희석하고 각각을 PCR로 증폭하여 영상밀도계(densitometer)로서 정량화하는 방법 등을 이용하여 mRNA 정량방법을 확립하여 단점을 보완하였다.^{30,31}

Bcl-2는 follicular type의 악성 임파종에서 처음 발견된 유전자이다. 즉 t(14;18)(q32;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.³²

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 계열 단백질에는 bax, bid, bak, bad등이 있으며, 세포사멸을 억제하는 bcl-2 계열 단백질에는 bcl-2, bcl-XL등이 있다. Bcl-2 단백질의 작용기전은 아직 확실히 밝혀져 있지는 않지만 과도하게 발현이 증가될 경우 세포에서 세포사멸을 차단하여 세포가 오래 동안 죽지 않고 생존하게 함으로서 癌 세포로 이행할 수 있는 기회가 증가되어 결국 종양이 발생하리라고 생각된다.³³ 따라서 bcl-2 유전자의 발현은 종양의 진행과도 밀접한 관계가 있어 이들이 과도하게 발현될 경우 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 현재는 실험실적으로 진행되고 있지만 bcl-2의 발현을 억제함으로써 종양의 치료효과를 극대화시키려는 연구가 매우 활발히 진행되고 있는 바, 이들의 발현에 영향을 미치는 항암제의 개발 및 발굴은 매우 중요한 과정이라 할 수 있다. 반면에 bax 등 세포사멸을 유도하는 bcl-2 계열 단백질은 미토콘드리아의 막전위에 영향을 줌으로서 미토콘드리아에 존재하는 세포사멸을 유도하는 중요한 단백질인 cytochrome c, pro-caspase 9 등을 세포질내로 유리시켜 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다. 이러한 측면에서 볼 때 이들 유전자의 과도한 발현 및 발현 억제는 암 세포의 생존과 밀접한 연관이 있으며 항암제가 이들 유전자의 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다.³⁴

P₃₃은 가장 잘 알려진 종양 억제 유전자로서 염색체 17p13.1에 위치하고 있다. 종양의 50% 이상에서 P₃₃의 돌연변이가 보고되고 있으며 특히 폐암, 위암, 대장암, 전립선암 등에서 그 발생 빈도가 높은 것으로 알려져 있다. P₃₃의 돌연변이로 인한 기능소실이 종양의 발생과 밀접한 연관이 있다는 사실은 P₃₃이 기능상 gatekeeper로서의 역할을 한다는 점과 연관이 있다고 볼 수 있다.³⁵ P₃₃은 세포의 핵에 위치하며 다른 유전자의 발현을 조절한다. 생리적으로 P₃₃은 20분 정도의 매우 짧은 반감기를 가지고 있으며 따라

서 정상 세포의 세포 주기를 조절하지는 않는다고 볼 수 있다. 그러나 P₃₃은 방사선, ultraviolet light 등의 DNA에 손상을 주는 자극을 받았을 경우 매우 증가되어 여러 가지 유전자의 발현을 통하여 고유한 기능인 세포 주기 및 세포 사멸을 조절한다. 세포 주기의 조절은 cyclin dependent kinase(CDK) 억제 유전자인 P21을 통하여 G1 phase의 후반부에서 조절하며 그밖에도 mdm2, GADD45의 발현을 통하여 이루어진다. P₃₃의 세포 사멸 조절은 치료적 측면과 매우 밀접한 관련이 있다. 일반적으로 항암 치료에 많이 사용되는 방사선 조사나 항암제는 DNA의 손상을 초래하여 이로 인한 세포 사멸을 유도하는 방법이다.³⁶ 이때 종양세포가 정상적인 P₃₃을 가지고 있는 경우 효과적인 세포 사멸이 일어나나, 돌연변이로 인한 비활성화된 P₃₃을 가지고 있는 경우 효율적인 세포 사멸이 일어나지 않는다. 따라서 P₃₃의 발현은 종양 치료적 측면에서 매우 중요한 의미를 가지고 있다고 볼 수 있다.³⁷

본 실험에서 四君子湯加山慈菇의 위암세포에 대한 항암효과를 분자생물학적 방법으로 살펴보았으나 통계상 유의성이 나타나지 않았으므로, 앞으로 다른 암 세포에 대한 연구나 새로운 약물의 구성을 통한 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

四君子湯加山慈菇의 항암 효과 여부와 그 분자생물학적 기전을 알아보고자, 위암 세포에 四君子湯과 四君子湯加山慈菇를 약물처리한 후, MTT 반응실험을 시행하여 위암 세포의 증식 억제 효과를 검토하였고, DAPI 염색을 하여 위암 세포의 apoptosis에 미치는 효과를 관찰하였으며, 그리고 apoptosis 관련 유전자의 mRNA 발현양상을 정량적 RT-PCR을 이용하여 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay 결과 四君子湯 투여군에서는 별다른 변화가 없었고 四君子湯加山慈菇 투여군에서는 대조군에 비하여 시간이 경과함에 따라 실측치에 있어

서 위암 세포의 증식 억제 경향이 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다.

2. Apoptosis assay 결과 四君子湯 투여군에서는 별다른 변화가 없었고 四君子湯加山慈菇 투여군에서는 대조군에 비하여 농도와 시간의 경과에 따라 apoptosis에 의한 cell death rate가 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다.

3. Apoptosis 관련 유전자의 정량적 mRNA 발현양상을 분석한 결과 apoptosis inhibitor인 Bcl-2와 apoptosis promotor인 Bax의 경우 의미있는 수치변화가 관찰되지 않았으며, apoptosis를 유도하면서 종양을 억제하는 P₃₃ 유전자의 경우도 유의한 변화가 없었다.

參考文獻

1. 김정룡 編著. 소화기계 질환. 서울:一潮閣;2000, 222-3.
2. 김원동 編著. '99 內科學의 最新知見. 서울:韓國醫學;1999, 213-4.
3. 김성훈 외. 數種瘀血藥物의 配合에 의한 抗癌 및 癌轉移 效果에 대한 研究. 97 國際瘀血심포지움 論文集 1997;105-34.
4. 김진성, 이지향, 류봉하, 박재훈, 지성길, 유진화. 數種 韓藥劑의 胃癌細胞에 대한 抗癌作用 效能檢索 및 藥理 作用에 관한 分子生物學의 研究. 大韓腫瘍學會誌 1999;5(1):47-60.
5. 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.
6. 吳千植. 靈芝, 山慈菇, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響. 慶熙大學校 碩士學位論文;1987.
7. 梁緒賢. 靈芝, 山慈菇, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 흰 쥐의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響. 慶熙大學校 碩士學位論文;1987.
8. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사;1991, 183-5.

9. 조완규. 종양학. 서울:서울대학교출판부;1989, 1-140.
10. 전병욱. 癌에 대한 韓醫學의 認識 및 實驗의 研究에 관한 考察. 대한한방종양학회지 1995;1(1):47-61.
11. 王琦 外 4人. 黃帝內經素問今釋. 서울:성보사;1983, 43, 146, 203, 353, 380, 433-6.
12. 張機. 金匱要略. 서울:동남출판사;1982, 164-5쪽.
13. 李旋. 醫學入門. 南昌市:江西科學技術出版社;1988, 846-8.
14. 황규동 류봉하 박동원 류기원. 十全大補湯, 瓦松, 十全大補湯加瓦松의 抗癌效果和 免疫反應에 關한 研究. 대한한방종양학회지 1996;2(1):1-24.
15. 최승훈. 방사선 조사 후의 N:GP(S) mouse 비장세포 증식에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 효과. 1995; 제1회 동양의학 국제심포지움논문집:110-239.
16. 고평석. 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節 作用에 關한 實驗의 研究. 경희대학교 대학원, 박사학위논문;1994.
17. 김진성. 銀花瀉肝湯과 銀花瀉肝湯加鹿茸의 抗癌效果和 免疫反應에 關한 研究. 대한한방종양학회지 1997;3(1):1-27.
18. 임미량. 扶正抗癌湯이 抗腫瘍免疫反應에 미치는 影響. 대한한방종양학회지 1997;3(1):67-84.
19. 전우현 류기원 류봉하 윤상협. 整腸補脾湯의 胃液分泌, 腸管輸送能 및 抗癌效果에 關한 研究. 경희대학교 대학원;1999.
20. 최승훈. 韓醫學의 腫瘍에 대한 認識과 病理論. 대한한방종양학회지 1995;1(1):11-28.
21. 의학교육연수원. 약물요법. 서울:서울대학교 출판부;1993, 327-31.
22. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 서울:경희대학교 한의과대학;1974, 115, 242.
23. 윤길영. 東醫臨床方劑學. 서울:명보 출판사;1985, 517, 626.
24. 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. 대한한학회지 1989;10(1):117-24.
25. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社;1991, 228-9.
26. 常敏毅. 抗癌本草. 杭州:湖南科學技術出版社;1986, 34-6.
27. 서정선. 20世紀末의 醫·生物學의 새로운 비전 apoptosis·몸의 效率의 生存을 위한 細胞의 能動的 死亡기전. 서울:醫學研究의 最新 動向;1998, 30-2.
28. Levine AJ. The P53 tumor suppressor gene and product. Cancer Surveys 1992;12:59-79.
29. Kane SE, Pastan I, Gottesman MM. Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. J. Bioenerg. Biomembr 1990;22:593-618.
30. Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. PCR Methods and Applications 1992;2:1-9.
31. 정현채 外. 人體 大腸 上皮細胞 및 大腸粘膜炎에 發顯된 여러 Cytokine 遺傳子의 定量分析을 통한 人體 宿主 防禦기전에 關한 研究-合成 RNA를 利用한 定量的 逆轉寫 PCR法의 應用. 大韓內科學會誌 1995;49(1):1-13.
32. Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R. Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. Endocr Relat Cancer 1999;6:61-8.
33. Tsujimoto Y, Shimizu S. FEBS Bcl-2 family:life-or-death. switch Lett 2000;466: 6-10.
34. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM, Andreeff M, Apoptosis. Molecules and mechanisms. Adv Exp Med Biol 1999;457: 217-36.
35. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to P53:the decision between life and death. Oncogene 1998;18:6145-57.
36. Roth JA, Swisher SG, Meyn RE. P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. Oncology 1999;10(Suppl 5):148-54.
37. Hainaut P, Hollstein M. P53 and human cancer:the first ten thousand mutations. Adv Cancer Res 1999;77:81-137.