

白僵蠶 추출액의 피부암 세포주에서 세포사멸 유도 작용에 대한 연구

권일호 · 두인선 · 박민철 · 황충연 · 김남권*

원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effect of *Batryticatus Bombycis* Extract on Apoptosis in B16F10 cells

Il Ho Kwen, In Sun Du, Min Chul Park, Chung Yeon Hwang, Nam Kwen Kim*

Department of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, Wonkwang University

This study was performed to investigate the anti cancer effect of *Batryticatus Bombycis* extract(BBE) in B16F10 cells. The cell viability after BBE treatment was quantified by MTT assay. The results showed that BBE inhibited the proliferation of B16F10 cells and caused a 80% inhibition of B16F10 cells at concentration of 500 µg/ml. B16F10 cells exposed to BBE displayed the DNA fragmentation ladder and nucleus chromatin condensation characteristic for apoptosis. The enzyme activity of caspase-3 and actived caspase-3 protein was markedly increased in B16F10 cells treated with the BBE. The expression of Bcl-2, anti-apoptotic protein, was decreased by treatment of the BBE in a dose-dependent manner. And the expression of pro-apoptotic Bax protein was increased. In conclusion, we can suggest that BBE induce the apoptotic death of B16F10 cells via activation of caspase-3, cleavage of PARP protein and Bcl-2 degradation.

Key words : anti cancer effect, *Batryticatus Bombycis*, apoptosis

서 론

한의학에서 피부암은 風毒燥熱의 邪氣가 인체에 침입하여 陰血과 精液을 손상시켜 肝腎陰虛, 津虧血燥, 皮毛不榮, 肺氣失調, 衛氣不宣하게 되어 발생한다고 하였다. 隋朝의 《諸病源候論》에서 “*鬚花瘡者, 初生如飯粒, 其頭破則血出, 便生惡肉, 漸大有根, 膿汁出, 肉反散如花狀*”이라 하였고, 明의 薛立齋는 “*鬚花瘡者有瘡瘍潰後, 肝火血燥生風所致, 或瘡口贅肉突出如菌, 大小不同, 或出如蛇頭, 長短不一*”이라 하여 피부암의 형상을 서술하였다¹⁾.

피부암 중의 하나인 악성 흑색종은 멜라닌 세포로부터 생기는 피부암이다. 절반 이하의 흑색종이 점으로부터 생기며, 대부분의 경우 처음부터 멜라닌 세포에서 발생한다. 초기 병변의 70%에서 다양한 색소 양상과 색조에 변이가 나타난다. 이 암의 정확한 원인은 알려져 있지 않지만 유전, 호르몬 요소, 자외선 노출 또는 자가 면역 작용에 의해 생길 수 있다²⁾.

서양의학에서 암의 치료는 주로 암세포에 직접적으로 살상작용을 나타내는 치료방법으로서 수술요법 · 방사선요법 · 화학요법 등이 사용되어 왔으나, 정상세포에 대한 많은 부작용 때문에 최근 부작용이 적은 천연물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 특히 새로운 치료법으로서 면역요법이나, 세포분화유도법, 혈관형성저해법, apoptosis 등과 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다³⁾.

한의학에서 암의 치료는 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 인체의 항암 능력을 증진시키는 扶正培本法과 活血化痰, 清熱解毒, 化痰消癥, 理氣消腫 등 암세포를 직접 공격하는 祛邪法 및 이 두가지 방법을 배합한 扶正祛邪法⁴⁾등으로 구분할 수 있는데 “扶正祛邪”로 요약되는 암 치료법은 면역력을 증강시켜 암세포의 성장을 억제하는 면역학적 치료법과 유사성을 갖고 있다⁷⁻⁹⁾.

白僵蠶은 蠶蛾科 Bombycidae에 속한 곤충인 누에의 유충이 백강균에 감염되어 죽은 蠶體로 그 味는 鹹, 혹은辛하고 性은 平 無毒하다. 熄風解癢, 疏散風熱, 化痰散結 등의 효능이 있어 驚風抽搐, 口眼喎斜, 咽喉腫痛, 風熱頭痛, 皮膚瘙癢 등의 병증을 치료한다⁹⁾. 白僵蠶에 대한 실험 연구에 의하면 혈당 강하¹⁰⁾, 신장조직에서 항산화 효과에 의한 세포 손상 방지¹¹⁾, 鎮痙 효과¹²⁾ 등이

* 교신저자 : 김남권, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 산본한방병원 · E-mail : drkim@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2671 · 접수 : 2005/03/31 · 수정 : 2005/05/11 · 채택 : 2005/06/02

보고되었으며, 당뇨병¹³⁾, 갑상선기능항진증¹⁴⁻¹⁵⁾의 치료에도 활용되고 있으나 항암에 대한 실험연구는 찾아보기 어려웠다.

이에 저자는 化痰散結하는 효능이 있는 白僵蠶이 종양에 효과가 있으리라 추론되어 피부암 중 악성 흑색종 세포주인 B16F10을 이용하여 MTT assay, DNA fragmentation 등을 관찰하여 백강잠의 B16F10세포에 대한 apoptosis의 특징적 소견을 발견하고, 이러한 백강잠의 apoptosis 유도효과에 대한 기전을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용한 白僵蠶(Batryticatus Bombycis)은 신우약업사(서울)에서 구입하여 양질의 것을 정선하여 사용하였다. 白僵蠶 100g에 메탄올 100mℓ를 가하여 6시간 동안 Sonication하였다. 이 추출액을 filter paper를 이용하고 여과하여 3000 rpm으로 원심분리한 후, 농축기(Rotary evaporate)로 감압 농축하였다. 이후 -70℃(Deep freezer)에서 12시간 이상 동결시킨 다음 ekda freezer dryer로 동결건조시켜 건조 분말 5.54g (수득율 약 5.54%)의 시료를 얻었다.

2. 세포 배양

B16F10 세포주(한국세포주은행)의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)배지에서 배양하였으며, 4일마다 3ml의 trypsin-EDTA(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.) 용액을 사용하여 계대배양을 실시하면서 白僵蠶추출물을 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

3. MTT assay

B16F10 세포를 24well에 각 well당 1×10⁴ cell씩 분주하고 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시킨 다음 농도별로 시료를 72시간 동안 처리하였다. 배양완료 전 Denizot와 Rita의 방법을 따라 1% MTT(3-(4,5-dimethylthiazolyl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액을 모든 well에 50μℓ/well 씩 가해 주고 다시 4시간 배양하였다. 배양 종료시 생성된 formazan 결정은 DMSO에 용해시키고 실온에서 10분간 shaking한 후 micro plate reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결과 분석은 실험군의 평균 OD540값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD540값에 대한 백분율로 환산하였다.

4. Hoechst stain

Apoptosis과정에서 일어나는 DNA 분절화와 염색질 농축을 관찰하기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 白僵蠶 추출물이 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342(Sigma Chemical Co., St. Louis, NY.,

U.S.A.) 염색시약을 PBS에 10μM이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하고 형광현미경으로 관찰하였다.

5. DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 확인 방법은 Miller 등의 방법에 준하여 실시하였다. 세포의 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit (promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하였으며, Isopropan alcohol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공 건조시켰다. TE완충 용액(50mM HEPES pH, 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-chocolate, 1mM EDTA, 1mM PMSF)에 용해된 DNA 5μg을 1.5% agarose gel에 50V, 3시간 동안 전기영동을 실시하여 Ethidium bromide에 염색하여 UV하에서 관찰하였다.

6. Western blot & image analysis

배양된 B16F10에 白僵蠶 추출물을 각 농도별로 72시간 동안 처리한 다음 B16F10 세포를 수거하여, cold Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 2회 세척하였다. 포집된 세포는 lysis buffer (phosphate buffer, pH7.4, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml apoptinin, 1μg/ml leupeptin)로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2X sample buffer와 섞어서 100℃에서 3분간 끓인 후, 10% Sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer한 후 blocking buffer(10% skim milk)로 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, primary antibody등에 대한 항체를 Tris-buffered saline에 1:1,000으로 희석하여 반응시켰다. secondary anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase(TBST로 1:1,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit: Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다. Image analysis의 경우 Vilber Lourmat Bio-1D로 측정하였다.

7. 통계분석

실험에서 얻은 결과는 One-way ANOVA test를 이용하여 통계 처리하였고, p<0.05, p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

1. 白僵蠶 추출물이 피부암세포 B16F10 세포 생존율에 미치는 영향(MTT assay)

白僵蠶 추출물이 피부암세포인 B16F10세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 먼저 白僵蠶 추출물의 농도를 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 450, 500 μg/ml로 처리한 후 72시간 세포를 배양하여 세포 생존율의 변화를 MTT assay을 통해 측정하였다 (실험방법 참조). 세포생존율을 관찰한 결과 대조군을 100%로 환산하였을 경우, 93.8% (50 μg/ml), 93.3% (100 μg/ml), 84.5% (150 μg/ml) 82.1% (200 μg/ml), 63.1% (250 μg/ml)

/ml) 58.5% (300 $\mu\text{g/ml}$) 31.6% (350 $\mu\text{g/ml}$) 24.5% (400 $\mu\text{g/ml}$) 21.2% (450 $\mu\text{g/ml}$) 16.7% (500 $\mu\text{g/ml}$) 의 수치를 보여 세포생존율이 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 1).

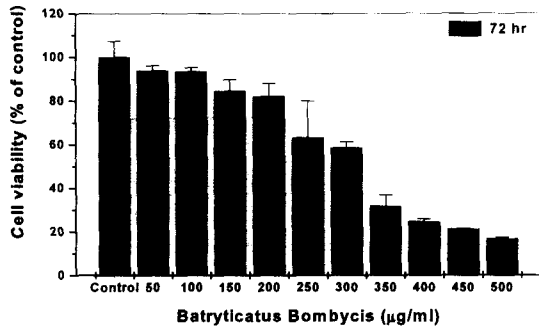


Fig. 1. The viability of B16F10 cells treated with various concentration of BBE by MTT assay.

Table 1. The viability of B16F10 cells treated with various concentration of BBE by MTT assay

Concentration of BB ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (% of control)
0	100 \pm 7.3
50	93.8 \pm 2.2
100	93.3 \pm 1.8
150	84.5 \pm 5.1
200	82.1 \pm 5.6
250	63.1 \pm 16
300	58.5 \pm 2.6
350	31.6 \pm 5.1
400	24.5 \pm 1.1
450	21.2 \pm 0.1
500	16.7 \pm 0.6

The data were compared with control(%).

2. B16F10 세포의 apoptotic body 관찰조건

Apoptosis의 또 다른 형태학적 특징인 세포크기의 축소 (shrinkage of cell size) 현상을 관찰하기 위하여 광학현미경을 이용한 형태학적인 관찰을 시도하였다. Fig. 2는 白蠶蠶 추출물을 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 72시간 동안 처리한 후 사진으로 촬영하였다 (400배). 실험 결과에서와 같이 대조군의 세포크기에 비하여 白蠶蠶 추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 군에서는 많은 세포의 크기가 거의 1/2 이상 작아졌으며, 또한 세포가 잘게 부서지는 것 같은 모양이 관찰되었고, 다소 검게 보이는 듯한 죽은 세포도 관찰되었으며 세포수도 감소하였다(Fig. 2).

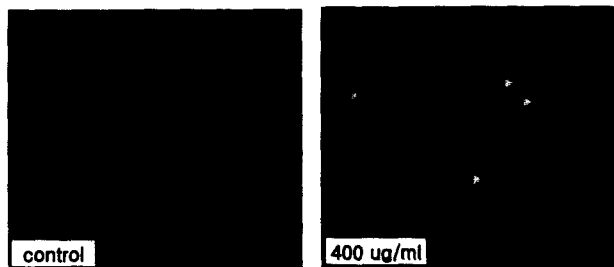


Fig. 2. BBE(400 $\mu\text{g/ml}$) induced apoptotic body in B16F10 cells Cells were treated for 48 hrs by BB in dose-dependent manner. Apoptotic bodies were observed in (✓) by BB treatment ($\times 400$).

3. B16F10 세포의 염색질 condensation과 fragmentation에 미치는 영향

상기의 실험에서 형태학적인 관찰을 통하여 세포크기의 감소를 확인한 후, DNA fragmentation의 유무를 관찰하기 위하여 Hoechst stain을 실시하였다. 白蠶蠶 추출물을 처리하지 않는 대조군에서는 그림과 같이 핵의 모양이 白蠶蠶 추출물처리군에 비해서 크고 또한 일정한 구형모양으로 관찰되었다. 그러나 Fig. 3에서 보는 바와 같이 白蠶蠶 추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 그 세포의 수가 많이 줄어 있었고 (data not shown), 세포핵이 여러 개의 군으로 쪼개어진 DNA fragmentation이 관찰되었다.

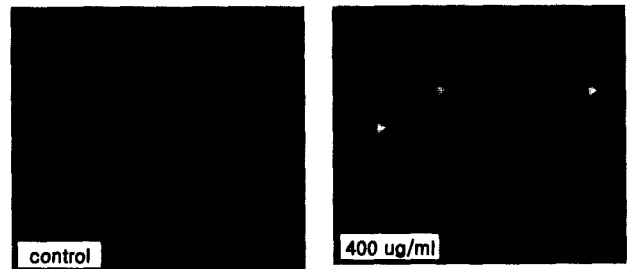


Fig. 3. BBE induced chromatin condensation and DNA fragmentation by hoechst stain in B16F10 cells. Cells were treated with BBE(400 $\mu\text{g/ml}$) for 48 hrs. Chromatin condensation and DNA fragmentation (✓) were observed in 400 $\mu\text{g/ml}$ of BBE ($\times 400$).

4. 白蠶蠶 추출물이 DNA fragmentation에 미치는 영향

Fig. 3에서의 실험결과인 DNA fragmentation 현상을 확인하기 위하여 agarose gel electrophoresis법을 이용한 ladder형 DNA분절 현상을 관찰하였다. Agarose electrophoresis에 의한 DNA분절 현상을 관찰하기 위해 白蠶蠶추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 B16F10 세포에 72시간 처리한 후, 배양된 세포를 수집하여 DNA를 추출하였다. 이 DNA를 1.5% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 ladder형의 DNA분절을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

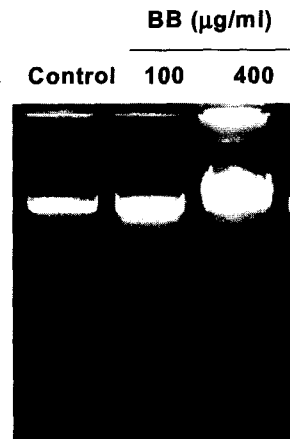


Fig. 4. The effect of BBE on DNA fragmentation by electrophoresis in B16F10. The Cells(1×10^6) were seed in Φ 10 cm dish and cultured for 24 hrs after BBE treatment(see Materials and Methods).

5. 白蠶蠶 추출물이 Caspase-3 활성화에 미치는 영향

白蠶蠶 추출물을 처리한 B16F10 세포의 죽음의 기전이

apoptosis 현상의 특징인 ladder형 DNA분절 현상과 Hoechst 염색에 의한 염색질의 농축과 분절화가 확인되어, 이러한 白蠟蠶 추출물 처리에 의한 B16F10 세포의 apoptosis 현상이 caspase-3의 활성화와 관련이 있는지 조사하였다. caspase-3(Yama, Apopain)는 cysteine protease로서 세포 내에서 32 kDa인 비활성형의 caspase-3 상태로 존재하는데 TNF- α , TNFR-1, Fas-Fas ligand, growth factor deprivation, virus, DNA damage, grazyme 등의 여러 가지 죽음의 신호(death signal)에 의해서 17 kDa과 12 kDa의 소단위로 쪼개져 활성을 갖게 된다. 따라서 western blotting을 이용하여 白蠟蠶 추출물을 B16F10 세포주에 처리한 다음 세포 내 활성형 caspase-3과 비활성형 caspase-3 단백질 발현량을 조사하였다. 白蠟蠶 추출물 처리 후 B16F10 세포로부터 단백질을 추출하여 조사한 결과, 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 caspase-3 (32 kDa) 단백질은 감소하였고, 활성화된 형태의 caspase-3 (17 kDa)의 단백질의 양은 상대적으로 증가하였다.(Fig 5, Table 2)

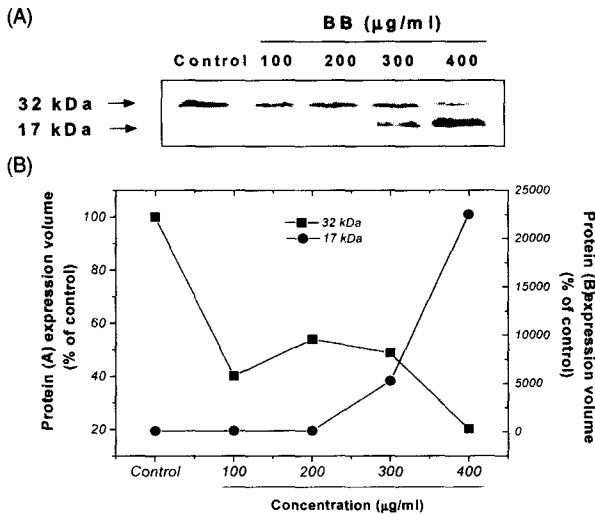


Fig. 5. The effect of BBE on caspase expression in B16F10 cells. The cells(1×10^6) were seeded in Φ 10 cm dish and cultured for 24hrs after BBE treatment. Various concentration of BBE were treated for 72 hrs. (A) Caspase protein dose observed by western blot. (B) The results of (A) analyzed by image analysis system. Rectangular curve (■) was the value of procaspase-3 32 kDa (inactive form) and circular curve (●) was the value of caspase-3 17 kDa (active form).

Table 2. The effect of BBE on caspase expression in B16F10 cells.

BB concentration (µg/ml)	Protein expression volume (% of control)	
	A	B
0	100	100
100	40.2	110.0
200	53.9	115.2
300	48.8	5251.4
400	20.2	22508.2

Data were fold induction of control. A was the volume of 32 kDa protein. B was the volume of 17 kDa protein.

6. Caspase 활성화에 따른 PARP 단백질 절단 조사

Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 DNA 수복과정에 관계되는 핵내에 존재하는 효소중의 하나로 최근 116 kDa의 PARP 단백질이 caspase-3에 의해 89 kDa와 24 kDa의 조각들로 쪼개지고, 이러한 과정은 apoptosis의 작용에 관여하는 것으로

밝혀졌다. 이에 caspase-3의 활성화에 따른 PARP 단백질 기질의 절단양상을 조사하기 위하여 白蠟蠶 추출물 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml를 B16F10 세포에 72시간 처리하고 western blotting을 실시하였다. 白蠟蠶 추출물을 처리한 결과 116 kDa의 PARP 단백질은 白蠟蠶 추출물의 용량이 증가함에 따라 감소하여 500 µg/ml 농도에서는 대조군과 비교하여 거의 완전히 감소하였고, 절단된 형태의 89 kDa PARP 단백질은 白蠟蠶 추출물의 용량 의존적으로 증가하여 白蠟蠶 추출물 500 µg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 대부분이 절단된 형태로 존재하였다. 이는 白蠟蠶 추출물 처리시 PARP 단백질 분절이 caspase-3 활성 증가와 같은 경향으로 나타났으며, 이는 caspase-3 활성화에 따라 PARP 단백질 분절이 증가했음을 알 수 있었다 (Fig. 6, Table 3).

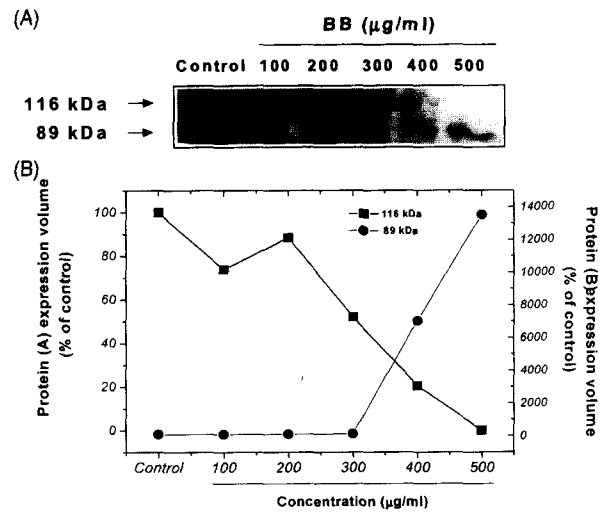


Fig. 6. The effect of BBE on PARP expression in B16F10 cells. Cells (1×10^6) were seeded in Φ 10 cm dish and cultured for stable condition for 24 hr in CO_2 incubator. Various concentration of BBE were treated for 72 hrs. (A) western blotting data (B) The data was extracted from image analysis system. Rectangular curve (■) was the value of PARP 116 kDa and circular curve (●) was the value of PARP 89 kDa.

Table 3. The effect of BBE on PARP expression in B16F10 cells.

BB concentration (µg/ml)	Protein expression volume (% of control)	
	A	B
0	100	100
100	73.8	100.0
200	88.4	105.5
300	52.1	120.1
400	20.4	7023.6
500	0	13520.3

Data were fold induction of control. A was the volume of 116 kDa protein. B was the volume of 89 kDa protein.

7. Bcl-2 단백질의 발현 양상에 미치는 영향

Bcl-2는 포유동물에서의 apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 가지의 유전자 중에서 제일 먼저 발견된 암유발유전자(proto-oncogene)로, apoptosis에 대하여 직접적인 억제작용이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 실험은 apoptosis의 억제작용을 가지고 있는 유전자로 알려진 Bcl-2에 미치는 白蠟蠶 추출물의 영향에 대해서 조사하였다. 白蠟蠶 추출물을 B16F10 세포에 각각 100, 400 µg/ml 농도로 72시간 동안 처리 한 후 세포 수집하

여 western blotting 방법으로 Bcl-2의 발현을 관찰하였다. 관찰된 Bcl-2는 다시 이미지 분석하여 아래와 같은 결과를 산출하였다(실험방법 참조). 그 결과 Bcl-2의 발현은 白蠟蠶 추출물의 처리 농도에 의존적으로 억제되었으며, 이미지 분석에서 대조군을 100으로 환산하면 白蠟蠶 추출물 100, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각, 99.7 %, 8.6 %로 나타났으며, 白蠟蠶 추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 Bcl-2의 발현은 약 90 % 이상 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 7, Table 4).

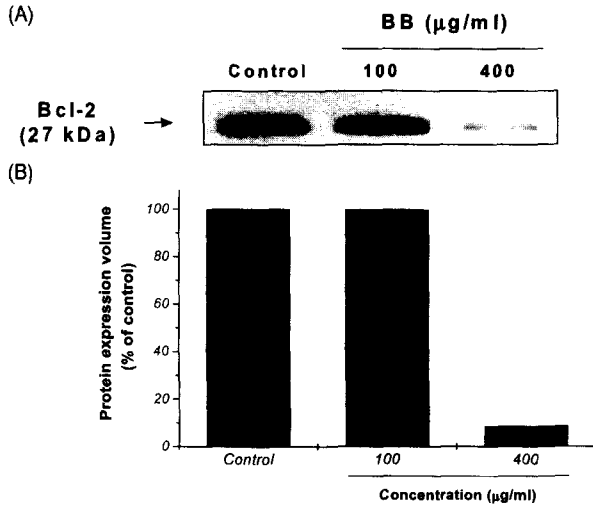


Fig. 7. The effect of BBE on Bcl-2 expression in B16F10 cells. Cells(1×10^6) were seed in Φ 10 cm dish and cultured for stable condition for 24 hrs in CO_2 incubator. Cells were treated for 72 hrs in various concentration of BBE (100, 400 $\mu\text{g/ml}$). (A) Bcl-2 protein dose observed by western blot. (B) The results of (A) analyzed by image analyser system.

Table 4. The effect of BBE on Bcl-2 expression in B16F10 cells.

BB concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Protein expression (% of control)
0	100.0
100	99.7
400	8.6

The data was % of control.

8. 白蠟蠶 추출물이 Bax 단백질 발현 양상에 미치는 영향

Bcl-2 family 중 하나로 포유동물에서는 apoptosis 촉진단백질로 알려진 Bax의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 白蠟蠶 추출물을 각각 100, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 B16F10 세포에 처리한 후 72시간 배양하였다. 배양 완료 후 B16F10 세포를 수집하여 western blotting 방법으로 Bax의 발현을 관찰하였고, 다시 이미지 분석하여 아래와 같은 결과를 산출하였다(실험방법 참조). 그 결과 Bax의 발현은 白蠟蠶 추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약간 증가되었다. 이미지 분석상 대조군을 100으로 환산하면 白蠟蠶 추출물 100, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 96.7 %, 114.5%로 나타났다 (Fig. 8, Table 5)

Table 5. The effect of BBE on Bax expression in B16F10.

BB concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Protein expression volume (% of control)
0	100.0
100	96.7
400	114.5

The data was % of control.

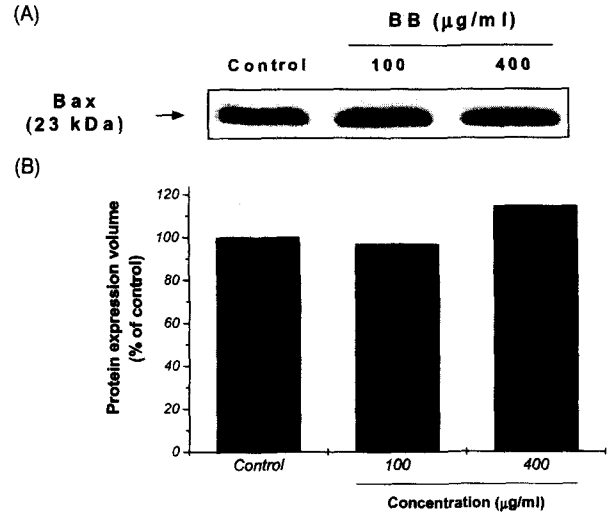


Fig. 8. The effect of BBE on Bax expression in B16F10 cells. Cells(1×10^6) were seed in Φ 10 cm dish and cultured for 24 hrs in CO_2 incubator. The cells were treated for 72 hrs in various concentration of BBE (100, 400 $\mu\text{g/ml}$). (A) Bax protein dose observed by western blot. (B) The results of (A) analyzed by image analyser system.

고찰

피부에 발생하는 악성종양은 노인층의 증가와 생활환경의 변화에 따라 유해물질이나 자외선에 노출될 기회가 많아지면서 발생 빈도가 증가하고 있으며, 내부 장기의 악성 종양과 마찬가지로 치료 시기를 놓치면 치료 후 국소적인 후유증과 내부 장기나 기타 부위에 전이를 일으켜 생명을 잃게 한다¹⁶⁾. 또한 악성 흑색종은 전이가 쉽게 되며, 화학요법 및 방사선 치료에 잘 반응하지 않으므로¹⁷⁾, 한의학적인 치료 방법의 모색이 필요하다고 생각된다.

역대 한의학의 고전에는 비록 腫瘍이라는 단어는 없지만, 腫瘍에 관한 내용을 찾아 볼 수 있다. 이는 각종 病名안에 포함되어 있으며, 현대의학의 癌과 그 描寫가 일치하고 있다¹⁸⁾. 이러한 증상과 증후분석을 통해보면, 악성종양은 한의학적으로 厥疔, 石瘕, 石瘕, 息真, 伏梁, 積聚, 腸賈, 癥瘕, 噎膈, 反胃, 痰癖, 石痛, 瘰癧, 癭瘤, 疝氣, 舌菌, 失榮, 乳巖, 石疽, 癰疽, 息肉, 惡瘡¹⁹⁾ 등의 범위에 포함되어 유사하게 인식되었다. 특히 癰疽는 서양의학의 종양성 질환과 염증성 질환을 포괄하는 개념으로 피부에 나타나는 종양은 癰疽 중 “翻花瘡, 黑疔, 石疔, 失榮, 疔, 贅瘤, 黑痣, 惡瘡” 등이 이에 해당한다²⁰⁾. 이 중 악성 흑색종은 黑疔에 가까운 것으로 보인다²¹⁾.

한의학에서 암의 발생원인은 外感邪氣, 七情內傷 등의 영향을 받아 臟腑陰陽氣血의 기능이 失調하여 痰凝, 濕聚, 氣滯, 血瘀, 熱毒蘊蓄 등의 병리기전을 일으킴으로서 발생한다고 볼 수 있다²²⁾. 그러므로 이에 대한 治法도 扶正培本, 益氣養血, 健脾補腎, 養陰生津, 健脾益氣, 滋陰補血, 溫腎助陽, 滋陰養胃, 補肝益腎 등의 扶正祛邪法과 活血化痰, 清熱解毒, 理氣, 疏肝理氣, 化痰消癥, 活血散結 등의 祛邪法이나, 健脾理氣, 健脾利濕, 滋陰利濕 등의 扶正祛邪法으로 치료하였으며, 주로 종양 초기에는 先攻後調法을, 중기에는 攻補兼重法을, 말기에는 先補後攻法을 활용하고 있다²³⁾.

암의 한의학적 병리기전 중 痰凝 역시 하나의 원인이 되는 데, 元代 朱丹溪는 “凡人身上中下有塊者多是痰, 痰之爲物, 隨氣

機升降, 無處不到"라고 하여 痰이 腫塊의 실질적인 병리중의 하나임을 설명하였다²⁴⁾.

白僵蠶에 대한 실험 연구에 의하면 혈당 강하¹⁰⁾, 신장조직에서 항산화 효과에 의한 세포 손상 방지¹¹⁾, 癲癩 효과¹²⁾ 등이 보고되었으며, 당뇨병¹³⁾, 갑상선기능항진증^{14,15)}의 치료에도 활용되고 있으나 항암 및 피부암에 대한 실험 연구는 찾아보기 어려웠다.

이에 저자는 암의 治法 중 化痰散結하는 효능이 있는 白僵蠶의 항암효과를 규명하고자 피부암 중 악성 흑색종 세포주 B16F10을 이용하여 실험을 하였다. 피부암에 대한 실험적 연구로는 金 등은 內托千金散加味方이 3-MCA로 유발된 피부암 및 면역조절작용에 미치는 영향을²¹⁾, 李 등은 3-MCA 유발 상피종에 대한 면역반응을^{25,26)}, 林 등은 3-MCA 피부암에 대한 자침부위별 항암 및 면역증강효과를²⁷⁾, 金 등은 피부암세포 A431에 대한 실험적 연구를^{28,30)} 보고하였으나 단일 한약제 추출물에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 실험은 천연물을 응용한 항암치료제의 개발을 목표로 다양한 한약재에 대한 연구를 시도하던 중 白僵蠶 추출물이 피부암 세포주에서 세포사멸을 유도하는 것으로 확인되어 구체적인 apoptosis의 기전에 대한 연구를 시도하였다. 白僵蠶 추출물이 피부암세포인 B16F10의 세포생존율에 미치는 영향에 대해서 알아보기 위하여 MTT assay를 통하여 관찰하였다. 관찰한 결과 MTT assay에서는 용량 의존적으로 세포 생존율이 감소하였다. 이 과정에서 白僵蠶 추출물이 피부암세포에서 세포생존율을 변화시키는 방법이 최소한 necrosis보다는 apoptosis에 근접하는 방법이라는 것을 알 수 있었다(Fig.1, Table 1). 白僵蠶 추출물이 피부암세포에서 세포생존율을 감소시키고 또한 이 작용이 apoptosis 과정과 유사하므로 Fig. 2에서 보는 바와 같이 형태학적 관찰을 시도하였다. Apoptosis의 형태학적인 특징은 세포크기의 축소(shrinkage of cell size)나 세포막으로부터 세포막기가 돌출하는 현상(membrane blebbing) 또는 여러 형태의 세포 내용물이 세포막으로 쌓여져 세포로부터 떨어져 나온 apoptotic body를 형성하고, chromatin condensation이나 nuclear fragmentation 또는 DNA fragmentation 등의 현상이 일어난다고 알려져 있다. 이를 관찰하기 위하여 현미경을 통한 형태학적인 관찰을 시도하였다. 세포의 크기와 apoptotic body, nuclear fragmentation을 관찰한 결과 白僵蠶 추출물 처리군에서는 세포가 잘게 부서지는 것 같은 모양이 관찰되었고, 세포의 크기가 거의 1/2 이상 작아졌으며, 다소 검게 보이는 듯한 죽은 세포도 관찰되었다. 또한 白僵蠶 추출물을 처리하지 않는 대조군에서는 그림과 같이 핵의 모양이 처리군에 비해서 크고 또한 단일세포에 동일한 구형모양으로 관찰되었다. 그러나 白僵蠶 추출물 처리군에서는 그 세포의 수가 많이 줄어있었고 (data not shown), Fig. 3와 같이 세포의 핵이 여러 개의 군으로 쪼개어진 DNA fragmentation 현상이 관찰되었다.

Apoptosis의 특징 중 하나인 DNA fragmentation 현상을 정확하게 확인하기 위하여 白僵蠶 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 B16F10 세포주에 처리한 후 전기영동에 의해서 관찰되었다. 배양된 세포를 수집한 후 DNA를 추출하였으며 1.5%

agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, ladder형의 DNA분절이 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 발생되었음을 확인하였다(Fig. 4). 일련의 실험과정에 의해서 얻어진 결과들을 통하여 白僵蠶 추출물이 피부암세포에서 유도하는 세포사멸과정은 apoptosis임을 확인할 수 있었으며 다음 진행되어진 실험은 그 기전을 알아보기 위한 과정이었다. 본 실험에서 밝혀진 白僵蠶 추출물의 caspase-3 activity에 미치는 영향은 inactive form인 32kDa가 농도 의존적으로 감소하였고, active form인 17kDa는 농도 의존적으로 증가하였다. Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 DNA 수복과정에 관계되는 핵내에 존재하는 효소중의 하나로 최근 116 kDa의 PARP 단백질이 caspase-3에 의해 89 kDa와 24 kDa의 조각들로 쪼개져 apoptosis의 작용에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 다음으로 진행된 PARP의 발현은 Fig. 8에서의 결과와 같이 116 kDa의 PARP가 caspase-3의 활성이 증가됨에 따라 절단되어 그 양은 감소되고 89 kDa의 PARP가 증가되었다고 생각된다. Bcl-2는 포유동물에서의 apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 가지의 유전자 중에서 제일 먼저 발견된 암유발유전자(proto-oncogene)이다. Bcl-2는 사람의 림프종의 발생과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26 KDa이며 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치해 있고, 다른 암유발유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 즉 Bcl-2는 apoptosis의 직접적인 억제작용이 있으며 심지어 유도된 necrosis 작용에서도 세포의 죽음을 억제하는 작용이 있음이 알려졌다. 이러한 Bcl-2에 대하여 白僵蠶 추출물은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 다음 72시간 경과 시 약 90% 이상 감소함을 알 수 있었다. 또한 Bcl-2 family 중 하나로 포유동물에서는 세포사멸 촉진 단백질로 알려진 Bax의 발현에 미치는 영향에 대해서 白僵蠶 추출물 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시 Bax의 발현은 24시간 경과 후 대조군에 비하여 약 15% 증가함을 알 수 있었다.

이상의 실험결과로 白僵蠶는 피부암세포인 B16F10세포에서 apoptosis의 작용에 의한 세포사멸을 유도하며, 이러한 apoptosis의 기전으로는 최소한 caspase-3, caspase-3 activity 증가에 따른 절단 PARP 단백질의 증가, Bcl-2, Bax 등의 apoptosis 관련인자가 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

따라서 白僵蠶 추출물을 이용한 피부암에 대한 항암제 개발 가능성이 기대되며 이를 기본 자료로 하여 앞으로 항암에 관한 연구가 수행되어야 할 것이다.

결론

白僵蠶의 항암효과를 실험적으로 규명하고자 피부암세포주인 B16F10세포를 이용하여 세포의 생존율과 형태학적인 관찰을 통한 apoptosis효과를 관찰하고, 그 기전을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

白僵蠶 추출물은 피부암세포주인 B16F10 세포에서 농도 의존적으로 세포생존율을 감소시켰다. 白僵蠶 추출물은 B16F10 세포의 크기 감소와 apoptotic body의 형성을 유도하였다. 白僵

蠶 추출물은 B16F10 세포의 caspase-3 활성도를 농도 의존적으로 증가시켰으며, PARP 단백질의 절단양상을 증가시켰다. 白僵蠶 추출물은 B16F10 세포의 Bcl-2 protein 발현을 감소시켰으며, Bax protein 발현은 증가시켰다.

이상의 결과, 白僵蠶 추출물은 B16F10 피부암 세포주에서 caspase-3 활성도의 증가, 이에 따른 PARP 단백질의 절단양상의 증가, 세포고사 억제 단백질인 Bcl-2의 발현억제, Bax 단백질의 발현 증가 등을 통하여 apoptosis를 유도시킴으로서 항암작용이 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 張宗岐. 臨床腫瘤綜合治療大全, 북경, 奧林匹克出版社, p 503-505, 1995.
- 대한피부과학회 간행위원회. 피부과학, 서울, 여문각, p 277-279, 1992.
- 문구 외. 암동서의결합치료1. 원광대학교출판국. pp 253-303, 383-460. 1999.
- 孟琳升 외. 中醫治癌大成, 북경, 북경과학기술회사, pp 111-112, 122-143, 232-233, 1995.
- 郭瑞林. 扶正祛邪與腫瘤免疫, 實用中西醫結合雜誌, 4(4):205-208, 1991.
- 邢雪梅. 抗癌中藥의 生物治療功能研究近況, 한글판 中醫雜誌, No.3, pp 85-90, 1994.
- 金鍾烈, 金又重. 東西醫學 比較研究, 서울, 계축문화사, pp 31-36, 41-44, 1994.
- 정태호. 면역학강의, 대구, 경북대학교출판부, pp 293-303, 309-311, 1993.
- 신민교. 임상본초학, 서울, 永林社, p 619, 1997.
- 權寧哲. 蠶이 Alloxan 투여 家兔의 혈당량에 미치는 영향, 서울, 경희대학교대학원, 1986.
- 李武炯, 尹哲浩, 鄭智天. 신장조직에서 백강잠 추출물의 항산화 작용에 관한 연구, 동국한의학회 논문집, 7(1):87-98, 1998.
- 張逸鎮 외. 天麻와 白僵蠶水鍼이 鎮痙 효과에 미치는 영향, 경희한의대 논문집, 11, 175-182, 1988.
- 王裕生. 中藥藥理與應用, 臺北, 인민위생출판사, pp 1238-1239, 1983.
- 余永諱. 中醫治療內分泌代謝病, 浙江, 浙江科學技術出版社, p 41, 1992.
- 楊思澍 외. 증의임상대전, 서울, 의성당, pp 236-237, 1993.
- 권기록. 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 대한침구학회지, 11(1):157-172, 1997
- Dreiling, L., Hoffman, S., Robinson, W.A. Melanoma, epidemiology, pathogenesis and new modes of treatment, Adv. Intern. Med, 41, 553-604, 1996.
- 金相贊. 종양의 치료에 관한 실험적 연구, 경산대학교 대학원 석사학위논문, pp 1-2, 1997.
- 張中植, 參茸湯이 S-180에 대한 항종양 효과와 Cyclophosphamide로 유발된 백서의 부작용 감소에 미치는 영향, 대전대학교대학원 석사학위논문, pp 1-2, 19-21, 1991.
- 余朋千, 隗文發, 實用中西醫腫瘤治療大全, 중경, 중경대학출판사, pp 2-15, 19, 86-87, 399-400, 1995.
- 金喜澤, 盧石善. 內托千金散加味方이 3-MCA로 유발된 피부암 및 면역조절작용에 미치는 영향, 대한외관과학회지, 12(2):20-52.
- 田炳旭, 柳逢夏 외. 少陰人補中益氣湯과 瓦松이 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 제 18회 전국한의학회학술대회발표논문집, p 48, 1996.
- 崔鐘鎬. 枸杞子 및 地骨皮 藥鍼이 腫瘍과 면역반응에 미치는 영향, 대전대학교 대학원 박사학위논문, pp 55-56, 1996.
- 李聰甫. 金元四大醫家學術思想之研究, 북경, 인민위생출판사, p 236, 1983.
- 李鍾律. 3-MCA 유발 상피종에 대한 海藻玉壺湯과 昆布의 항종양효과와 면역반응에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 1998.
- 金倫範. 3-MCA 유발 상피종에 대한 香貝養榮湯과 貝母單味劑가 면역반응에 미치는 영향, 대한한방종양학회지, 1(1):191-210, 1995.
- 임사비나 외. 3-methylcholantrene 피부암에 대한 자침부위별 항암 및 면역증강효과, 경희한의대논문집, 16, 149-179, 1993.
- 金喜澤. 清熱消毒散加味蟬酥가 피부암세포(A431)에 미치는 영향, 대전대학교 대학원 석사학위논문, 1995.
- 崔政和. 當歸飲子加蟬酥가 피부암세포(A431)의 세포독성에 미치는 영향, 대한외관과학회지, 9(1):1-15, 1996.
- 朴惠暎 외. 八物湯이 항암 및 면역기능에 미치는 실험적 효과, 대한한의학회지, 19(1):327-338, 1998.