

사매가 대장암 세포에 미치는 영향

이도형, 류봉하, 김진성, 윤상협, 류기원
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Effects of *Duchesnea Indica* of Colorectal Adenocarcinoma Cells

Do-Hyoung Lee, Bong-Ha Ryu, Jin-Sung Kim, Sang-Hyub Yoon, Ki-Won Ryu
3rd Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

Objectives: The aim is to identify any anti-tumor effects of *Duchesnea indica*(Andr.) Focke on colon cancer cells.

Materials & Methods: Colo201 human adenocarcinoma cells were obtained from American Type Culture Collection. The boiled extract of *Duchesnea indica*(Andr.) Focke was added (10 and 20 microliters) to cultures and observed at 0, 6, and 12 hours, and at 12-hour intervals thereafter. Morphological changes in colon cancer cells were observed through an inverted microscope. Destruction of colon cancer cells was measured through Trypan blue exclusion testing. Suppression of the viability of colon cancer cells were measured via MTT assay. Anti-cancer mechanisms in the cell cycle of colon cancer cells were analysed via flow cytometry.

Results: After introduction of *Duchesnea indica*(Andr.) Focke to cultures several changes were seen. Significant atrophy of the nucleus and cytoplasm of colon cancer cells was observed, indicating cell injury. Destruction of colon cancer cells was observed in direct proportion to dosage and duration. Suppression of viability of colon cancer cells for each test group was greater than that of the control group increasingly over time(36h, 48h, 60h, 72h), which was statistical significant ($p<0.05$). Cell numbers of the mitosis phase of the colon cancer cell cycle reduced.

Conclusions: Statistically significant anti-tumor effects of *Duchesnea indica*(Andr.) Focke were observed in this in vitro experiment. Results support a role for *Duchesnea indica*(Andr.) Focke in treatment of colon cancer. though it will required progressive research to develop a practical treatment.

Key Words: anti-cancer effects, colon cancer, *Duchesnea indica*(Andr.) Focke.

1. 緒 論

대장암은 2002년 통계청 자료에 의하면 암 사망률이 4위로 나타나 인구 10만명당 9.6명이 대장암으로 사망하는 것으로 보고되어 있으며¹, 최근 식생활 및 생활습성의 변화로 그 발생 빈도는 점차 증가하는 추세이다. 대장암에 대한 치료법으로는 외과적

수술요법, 항암약물요법, 방사선요법, 면역요법 및 유전자요법 등이 알려져 있고, 최근에는 중앙면역학, 바이러스종양학, 세포생물학, 분자생물학 등의 발달에 힘입어 암에 대한 이해 및 치료에 많은 발전을 이루고 있다. 그러나 면역요법과 유전자요법은 개발중이어서 치료방법이 아직 정립되지 못한 실정이며², 수술요법과 방사선요법은 국소적 암의 치료에는 어느 정도 유효하지만 전이된 암에는 치료에 한계가 있다³.

그러므로 현재의 상황하에서는 화학요법의 중요성이 강조되고 있는데⁴, 이러한 항암제는 그 작용의

· 접수 : 2005. 2. 21. · 채택 : 2005. 3. 22.
· 교신저자 : 류봉하, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 3내과 의사실
(Tel. 02-958-9140 Fax. 02-958-9136
E-mail : rbongh@khu.ac.kr)

비특이성으로 인해 많은 부작용을 수반하고 있는 것이 사실이다. 즉 항암제가 암세포 외에 정상적인 세포에도 역시 DNA의 손상을 초래하고 세포가 필요한 영양물질의 흡수를 차단하여 정상세포의 세포 분열 및 성장을 방해하는 부작용을 초래하는 경우가 대부분이며⁵, 이러한 부작용은 소화기계통을 비롯하여 간장장애, 혈액학적 이상, 면역기능 저하, 유전인자 손상 등으로 다양하게 나타나는데⁶, 이러한 점에서 항암치료제의 부작용을 감소시키면서 암세포에 대해 특이적 독성을 나타내는 항암제를 합성 물질이 아닌 천연물질에서 개발하려는 노력이 시도되고 있다⁷.

사매는 장미과 다년생 포복초본식물인 사매(*Duchesnea indica*(Andr.) Focke.)의 전초이며⁸, 異名은 蛇泡草, 鷄冠果, 地莓, 龍吐珠, 三瓜龍, 蛇果草이며 性味는 味甘, 酸하고 性은 寒하며 有小毒하다^{9,10}. 歸經은 肺經, 肝經, 心經이고, 효능은 淸熱, 養血, 消腫, 解毒 하며, 임상에서는 熱病, 驚癇, 咳嗽, 咽喉腫痛, 痢疾, 癰腫, 疔瘡, 疝氣, 鼻咽癌, 食管癌, 喉癌, 多발성골수종, 세균성이질, 위암, 폐암 및 자궁경부암 등의 치료제로 응용되고 있다¹⁰.

최근에 사매에 대해 실험된 연구로는 사매의 위암세포, 식도암 세포에 대한 항암효능은 보고된 바가 있지만¹¹, 대장암 세포에 대해서는 아직 연구된 바가 없었다.

이에 저자는 사매가 대장암세포에 미치는 효능을 분자생물학적으로 규명하기 위해, 대장암세포주(Colo 201)에 사매를 투여한 후 형태학적 변화, Tryphan blue exclusion test를 통해 대장암세포 살상효과, MTT assay를 시행하여 대장암세포의 증식억제효과 및 Flow Cytometry를 이용한 세포주기의 변화를 측정하여 다음과 같은 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 사매(생약명: *Duchesnea indica* Herba, 학명: *Duchesnea indica*(Andr.) Focke.)는 서울 경동시장 건재약국에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 시약은 특별히 명시가 없는 한 Sigma. MO (USA)에 제품을 신청하여 사용하였다.

2) 검액의 제제

사매 50g을 잘게 부순 후, 증류수 50ml에 넣어 15분간 121℃에서 끓인 다음, 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.2μm크기의 syringe filter를 이용하여 고형성분을 제거한 후 여과하였고, 배지 5ml 당 10μl 또는 20μl의 약물을 투여하였다. 실험에 사용될 때까지 검액은 4℃에 냉장 보관하였다.

3) 대장암세포

본 실험에 사용한 대장암세포는 미국 American type culture collection(ATCC, MD)에서 제공하는 대장암세포주 Colo 201(Adenocarcinoma)로, 한국세포주 은행에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 대장암세포의 배양

대장암세포주 Colo 201을 10% Fetal bovine serum (Life technology. CA), 1% broad spectrum antibiotics (Life technology. CA)가 함유된 RPMI-1640(Life technology. CA) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO2 incubator(NAPCO, precision scientific Inc.)에서 배양하였다.

세포의 회수는 0.1% Trypsin-EDTA(Sigma.MO)를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

2) 대장암 세포의 형태학적 변화 관찰¹²

약물을 투여한 후 48시간 경과하였을 때 세포를 inverted microscope(CK2, Olympus, optical Co.LTD., Japan)하에서 관찰하였다.

3) 대장암세포 살상효과 측정(Trypan blue exclusion test)^{13,14}.

Trypan blue exclusion test는 세포를 회수한 후 106/ml의 농도로 세포액을 만든 후 세포액, HBSS (Hanker's balanced salt solution), 0.4% Trypan blue를 각각 0.5ml, 0.3ml, 0.2ml의 비율로 섞은 후 5분간 방치한 후 10분 이내에 푸르게 염색된 세포의 비율을 Inverted microscope하에서 측정하였다.

4) 대장암세포 증식억제효과 측정(MTT assay)¹⁵

대장암세포 증식억제효과를 검증하기 위하여 MTT assay를 시행하였다.

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide)

5mg/ml을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 조절한 후 0.22 μ m filter로 여과하여 MTT stock solution을 만들었다. 그리고 10 μ l MTT를 100 μ l의 cell suspension에 추가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 방치하여 보라색 formazan crystals가 형성된 후 absolute isopropanol에 녹아있는 100 μ l 0.04M HCl을 넣어 보라색 formazan crystals가 완전히 용해된 후 ELISA(Enzyme linked-immunosorbent assay) reader(E-max, Molecular device, USA)를 이용하여 570nm의 파장에서 흡광도(O.D.,

optical density)를 측정하였다.

5) 대장암세포주기의 변화측정¹⁶

배지 1ml당 10 μ l의 약물을 투여하여, 48시간 경과 후 세포를 회수하여 PBS에 5분간 3회 세척한 후 Propidium iodide(100 μ g/ml)로 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 세포주기를 측정하였다.

3. 통계처리

각 실험군과 대조군 사이의 유의성 검사는 Mann-Whitney u test, p<0.05로 통계처리 하였으며, p<0.05를 유의성 있는 결과로 판단하였다.

III. 成 績

1. 대장암세포의 형태학적 변화에 대한 효과

Inverted microscope 하에서 암세포의 형태학적 변화를 관찰 한 결과 핵 및 세포질이 위축되어 크기가 작아지면서 세포배양 용기로부터 떨어져 나오는 전형적인 세포손상의 형태학적 변화가 관찰되었다. 대조군의 경우는 세포가 부착성 세포이기 때문에 dish의 plate에 온전한 모양대로 부착되어 있으나, 사매를 투여한 실험군에서는 세포가 손상을 입어 둥그란 모양으로 오그라들어 plate에서 떨어져 나와 부유되면서 죽어가는 소견이 관찰되었다(Fig. 1).

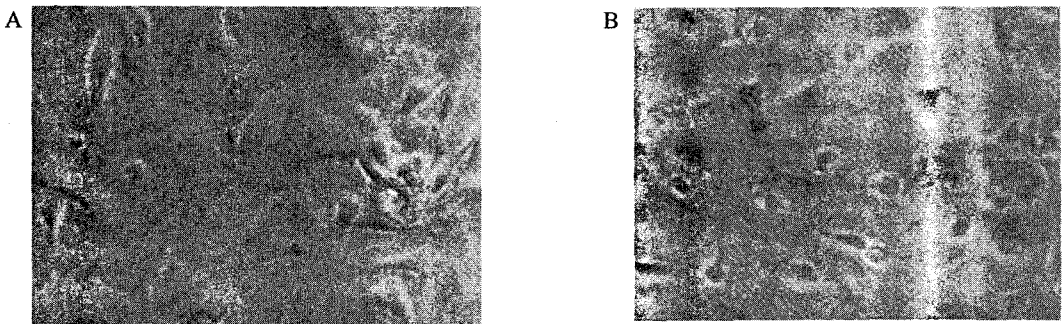


Fig. 1. Morphological change on colon cancer cells induced by Duchesnea indica(Andr.) Focke for 24 hrs.

A: Colon cancer cells not treated.

B: Colon cancer cells induced by Duchesnea indica(Andr.) Focke. 10 μ l/ml.

2. 대장암세포의 살상효과

Trypan blue exclusion test는 살아있는 세포의 경우 trypan blue에 염색되지 않고 투명하게 보이며, 죽은 세포의 경우 파란색으로 염색되므로, 염색된 세포의 수를 세어 통계처리 하였다. 대장암세포는 약 500개정도 사용되었으며 대조군과 실험군에서 dead cells의 개수를 %로 환산하여 나타내었다.

실험결과 10 μ l 투여군에서는 Mann-Whitney u test (p<0.05)로 통계처리 한 결과 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간에서 각각 유의성 있게 dead cells의 비율이 높아진 것으로 나타났다.

20 μ l 투여군에서도 Mann-Whitney u test (p<0.05)로 통계처리 한 결과 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간에서 각각 유의성 있게 dead cells의 비율이 높아진 것으로 나타났다.

결과적으로 10 μ l 투여군과 20 μ l 투여군을 비교해 볼 때 사매의 용량이 많아짐에 따라 그리고 시간이 경과함에 따라 암세포의 살상효과가 높아지는 것으로 나타났다(Fig. 2.).

3. 대장암세포의 증식억제효과

검액이 암세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인체 대장암세포주(Colo 201)를 이용하여 MTT assay를 시행한 결과를 흡광도(O.D., optical density)로 나타내었다.

실험결과 10 μ l 투여군에서는 Mann-Whitney u test (p<0.05)로 통계처리 한 결과 36시간, 48시간, 60시간, 72시간에서 각각 유의성 있게 O.D 수치가 감소한 것으로 나타났다. 20 μ l 투여군에서도 Mann-Whitney u test (p<0.05)로 통계처리 한 결과 36시간, 48시간, 60시간, 72시간에서 각각 유의성 있게 O.D 수치가 감소한 것으로 나타났다. 또한 사매 전탕액의 용량다소와 증식억제효과는 비례하지 않는 것으로 나타났다. 이 결과로 보아 사매의 위암세포에 대한 증식억제효과가 시간의 경과에 따라 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3.).

4. 대장암 세포주기의 변화에 대한 효과

10 μ l의 약물을 투여한 후 48시간 후에 세포주기를 측정한 결과 분열기의 세포가 감소하는 경향을 보였다. 즉, 대조군의 G0/G1이 78%(S/M; 22%)였으나,

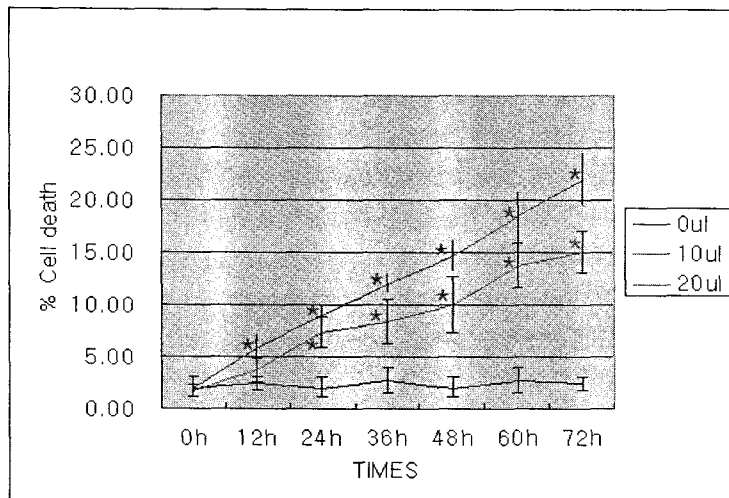


Fig. 2. Trypan blue exclusion analysis on dead cells of colon cancer cells induced by *Duchesnea indica*(Andr.) Focke (*: p < 0.05).

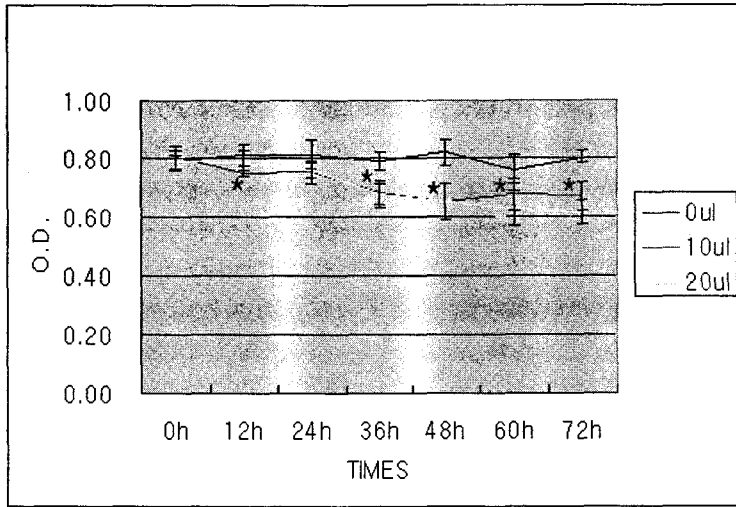


Fig. 3. Effects of *Duchesnea indica*(Andr.) Focke. on the cellular viability of colon cancer cells (*: $p < 0.05$).

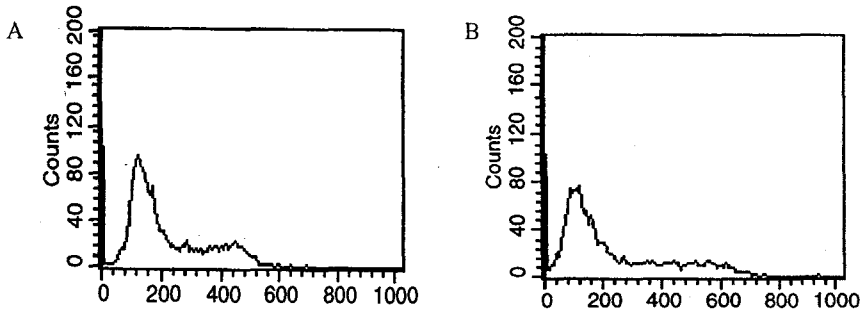


Fig. 4. Cell cycle analysis.

A: Colon cancer cells not treated. G0/G1: 78%, S/M: 22%.

B: Colon cancer cells treated with *Duchesnea indica*(Andr.) Focke. $10\mu\text{l/ml}$ for 48hrs. G0/G1: 84%, S/M: 16%.

$10\mu\text{l}$ 의 약물을 투여한 후 48시간 후에 측정된 실험군의 G0/G1은 84%(S/M; 16%)로 증가되었다(Fig. 4).

IV. 考 察

암은 조직의 자율적인 과잉 성장이며, 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것이라고 정의된다. 암은 일종의 전신성 질환으로 국부에서 침윤성장을 하거나 다른

부위로 확산과 전이를 일으켜 정상적인 조직기관을 파괴할 뿐만 아니라 압박, 감염, 출혈 등을 야기하며, 숙주에게 일련의 대사장애와 영양장애 등을 일으켜 항병력을 약화시키고, 결국에는 사망케 하는 질병이다¹⁷.

대장암의 발병은 유전적 요인보다 식이, 환경적 요인이 크게 작용할 것으로 추측되고 있는데 식이 습관의 차이에 따라 발병률이 다르며 육체적 활동량이 많은 직업에서 대장암 발병률이 낮아진다는

보고도 있다¹³. 또한 환경 요인이나 식이 요인이 중요한 것으로 인식되는 증거로는 일본에 거주하는 일본인보다 하와이나 캘리포니아에 이민하여 거주하는 일본인 1세와 2세에서 대장암의 발병률이 높거나 아시아나 아프리카에 사는 유대인보다는 유럽에 거주하는 유대인에게 발병률이 높다는 점을 들 수 있다¹⁸.

대장암의 증상은 발생부위, 크기, 진행 정도 및 합병증에 따라 차이가 있는데 그중 해부학적 위치가 가장 큰 관건이 된다¹⁹. 일반적인 증상은 피로감, 무기력, 체중감소, 빈혈, 혈변, 하복부둔통, 배변습관의 변화 등이 나타난다. 대장암의 진단방법은 직장수지검사, S-결장검사, 대장 X-선 조영술, 대장내시경검사, 직장초음파 검사, 분변잠혈검사 및 CEA 수치검사 등이 있는데 전암성 병변인 선종 단계에서 발견, 제거하면 예방이 가능하고 조기에 진단하면 완치도 가능하다²⁰.

대장암에 대한 치료방법은 수술요법, 방사선요법, 약물요법 등이 사용된다²¹. 수술요법은 가장 효과적인 대장암 치료방법이며 수술요법이 불가능한 경우에 방사선요법과 약물요법이 중심이 된다.

그러나 현재까지 개발된 항암제의 가장 큰 단점은 항암제의 비특이적 작용이라 할 수 있는데 정상세포까지 영향을 미치기 때문에 원하지 않는 부작용을 나타내는 경우가 많다. 대부분 항암제는 암세포의 각종 대사경로에 개입, 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA의 복제·전사·번역과정을 차단하거나, 핵산 전구체의 합성을 방해하고 세포분열을 저해함으로써 항암활성, 즉 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 약제인데³, 그 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 대부분이며^{4,6,12}, 이러한 부작용은 소화기계통을 비롯하여 간장장애, 혈액학적 이상, 면역기능 저하, 유전인자 손상 등으로 다양하게 나타난다²².

현재까지 개발된 항암제는 공통적으로 이와 같은 문제점을 가지고 있다. 이러한 부작용을 극복하고자 최근 여러 새로운 방향의 연구들이 이루어지고 있는데, 합성물질이 아닌 천연물질에서 항암제를 개발하려는 노력이 시도되고 있으며⁷, 한의학적 암치료의 장점과 서양의학의 암치료의 장점을 결합한 동서의 결합치료도 연구되고 있다.

한의학 문헌에 ‘대장암’이라는 명칭은 없으나, 일찍이 <內經>에 나타나는 ‘腸癰(腸澼)’이라는 말이 이와 상응하는 병증으로 보여지며²³, 대장암의 대표적인 임상증후 및 특징인 변혈, 점액변, 동통, 便通異常 등에 근거하면, 下焦濕熱, 腸風, 鎖肛痔, 腸覃, 腸癰, 積聚, 臟毒, 便血, 下痢, 腸癰疝 등을 대장암의 범주로 볼 수 있다.

대장암의 변증분류 및 치료법으로는 濕熱蘊毒型, 脾虛蘊濕型, 脾腎兩虛型, 寒濕凝滯型, 肝腎陰虛型, 氣血虛損型으로 나눌 수 있으며, 濕熱蘊毒型에는 清熱解毒, 祛濕攻積하고, 脾虛濕熱型에는 健脾化濕, 清熱解毒하며, 脾腎兩虛, 寒濕凝滯型에는 溫補脾腎, 祛濕化濁하고, 肝腎陰虛型에는 滋補肝腎, 養陰清熱하며, 氣血虛損型에는 補氣養血, 扶脾益腎하는 것으로 요약된다²⁴. 즉, 내인 및 외인의 작용으로 濕熱蘊毒되어 종양이 된 것이 대장암의 標이고, 脾腎虧虛로 正氣不足한 것이 本으로 요약된다. 이는 암세포의 성장 억제 및 면역 기능 활성화를 통한 부작용 억제 등 전체적인 생체 조절효과를 기대하는 치료법이다.

사매는 장미과 다년생 포복초본식물인 사매(*Duchesnea indica*(Andr.) Focke.)의 전초이며⁸, 蛇泡草, 鷄冠果, 地莓, 龍吐珠, 三瓜龍, 蛇果草라고도 한다. 性味는味甘, 酸하고 性은寒하며 有小毒하다^{9,10}. 歸經은肺經, 肝經, 心經이고, 효능은 清熱, 養血, 消腫, 解毒 하며, 熱病, 驚癇, 咳嗽, 咽喉腫痛, 痢疾, 癰腫, 疔瘡등의 治療劑로 이용된다. 사매의 주요 약리학적 성분은 중자유 중의 지방산인 linolic acid(53.1%)이고, 불감화성 물질로는 탄화수소, alcohol, sterol이 있으며, sterol의 주성분은 β-sitosterol(sterol 총량의 89.5%)이다. 실제 임상에서는 직장암, 鼻咽癌, 食管癌, 喉癌, 다발성골수종, 세균성리질, 위암, 폐암 및

자궁경부암 등의 치료제로 이용된다¹⁰.

최근 사매의 위암세포와 식도암세포에 대한 항암 효과가 보고된 바가 있으나¹¹, 대장암세포에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 이에 저자는 사매가 대장암세포에 미치는 영향을 관찰하게 되었다.

대장암 세포에 대한 형태학적 변화를 관찰하기 위하여, 사매 10 μ l를 투여한 후 24시간 후에 inverted microscope 하에서 암세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 핵 및 세포질이 위축되어 크기가 작아지면서 세포배양 용기로부터 떨어져 나오는 전형적인 세포손상의 형태학적 변화를 관찰 할 수 있었다. 대조군의 경우 세포는 부착성 세포이기 때문에 dish의 plate에 온전한 모양대로 부착되어 있으나 사매를 투여한 실험군에서는 세포가 손상을 입어 동그란 모양으로 오그라들어 plate에서 떨어져 나와 부유되면서 죽어 가는 전형적인 세포 소견을 관찰 할 수 있었다.

또한, 사매가 대장암세포에 미치는 살상효과를 측정하기 위하여 trypan blue exclusion test를 통하여 살펴보았다. Trypan blue exclusion test는 살아있는 세포의 경우 trypan blue에 의해 염색되지 않고 투명하게 보이며, 죽은 세포의 경우 파란색으로 염색되므로, 파란색으로 염색된 세포의 수를 세어 통계처리 하였다.

사매전탕액 10 μ l/ml에서는 Mann-Whitney u test ($p < 0.05$)로 통계처리 한 결과 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간에서 각각 유의성 있게 dead cells의 비율이 높아진 것으로 나타났다.

20 μ l/ml에서도 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간에서 각각 통계적으로 유의성 있게 dead cells의 비율이 높아진 것으로 나타났다. 따라서 결과적으로 사매의 대장암세포에 대한 살상효과는 사매의 투여용량과 투여한 후 시간의 경과에 비례하여 통계적으로 유의성 있게 높아지는 것으로 나타났다.

대장암세포 증식억제효과를 분석하기 위해서 암세포를 배양기에서 배양하면서 다양한 농도의 항암제를 투여하여 세포의 증식정도를 알 수 있는 MTT

assay를 통하여 억제효과를 객관적으로 분석하였다. 본 실험에서 사용한 MTT assay는 cell의 viability를 측정하는 방법으로 1983년 Mosmann에 의해 처음 시도 되었으며²⁵, 1986년 Cole과 1988년 Alley등에 의해 사용되기 시작하여 최근 널리 보급되었다²⁶.

MTT assay는 세포내 mitochondria의 tricarboxylic acid cycle에 관여하는 효소인 succinate dehydrogenase에 의해 황색의 MTT(3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 보라색의 formazan crystal로 변하는 정도를 분광학적인 방법(Spectroscopic method)으로 비색 정량함으로써 항암제의 감수성을 평가하는 방법이다²⁶. 따라서 세포의 viability에 따라 MTT-formazan의 양이 달라지므로, 이를 적절한 용매에 작용시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 흡광도(O.D., optical density)를 측정함으로써, 세포의 생존능력을 계속할 수 있다^{27,28}.

실험결과 10 μ l/ml에서는 36시간, 48시간, 60시간 및 72시간까지의 O.D. 수치가 0.68, 0.65, 0.68 및 0.67로 Mann-Whitney u test ($p < 0.05$)로 통계처리한 결과 시간이 경과함에 따라 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다.

20 μ l/ml에서도 36시간, 48시간, 60시간 및 72시간까지의 O.D. 수치가 0.68, 0.65, 0.63 및 0.62로 시간이 경과함에 따라 통계적으로 유의성 있게 O.D 수치가 감소한 것으로 나타났다.

살아있는 세포의 수가 많을수록 formazan crystal의 생성도 많아지므로, 시간이 경과함에 따라 O.D 수치가 감소했다는 것은 사매에 의한 대장암 세포의 증식을 억제하는 효과가 시간에 비례하여 유의성 있게 높아졌다는 것으로 해석할 수 있다. 그러나 사매 전탕액의 용량다소와 증식억제효과는 비례하지 않는 것으로 나타났다.

이 결과로 보아 사매의 대장암세포에 대한 증식억제효과가 시간의 경과에 따라 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다.

사매가 대장암세포의 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 실험에서는 flow cytometry를 이용한 세포주기를 측정하였다. 세포주기는 한 세포가

성장하여 두 세포로 분열되는 과정으로 간기인 G0 phase, G1 phase, S phase, G2 phase 및 분열기인 M phase의 4단계로 편의상 나누고 있다. G0 phase는 대사활동이 멈춘 상태이고, G1 phase는 DNA 합성을 준비하는 시기이고, S phase는 DNA를 합성하는 시기이며, G2 phase는 세포분열을 준비하는 시기이고, M phase는 유사분열기이다²⁹.

Propidium iodide(PI)는 DNA binding dye로서, PI로 염색한 세포를 flow cytometry로 처리하면, 각각의 세포에 대한 DNA의 양에 따라 세포주기의 단계인 G0, G1, S, G2, M phase의 세포의 비율을 측정할 수 있고, 이에 따른 특징적인 Peak를 histogram 상에서 볼 수 있다³⁰.

본 실험에서 10 μ l의 사매약물을 투여한 실험군과 그렇지 않은 대조군의 세포주기를 분석한 결과 대조군은 G0/G1이 78%로 측정되었으나, 실험군의 G0/G1은 84%로 측정되었다. 정상적으로 세포주기의 과정이 잘 이루어진다면, G0/G1:S/M의 백분율이 50:50이 되겠지만, G0/G1에서 백분율이 증가한다는 것은 세포주기가 G0/G1기로 이동한다는 것이고, 이는 세포분열은 이루어지지 않고, 사매에 반응하여 세포분열은 정지하고 단백질을 생성하기 때문이다. 따라서 사매약물을 투여한 실험군이 대장암의 세포주기에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

이에 사매가 대장암의 세포주기에 있어서 분열과 증식을 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

이상의 실험결과를 요약하여 보면, 형태학적 변화에 있어서, trypan blue exclusion test를 이용한 대장암세포 살상효과 측정에서 사매의 대장암세포에 대한 살상효과가 유의성 있게 높아지는 것으로 나타났고, MTT assay를 이용한 대장암세포 증식억제효과 측정에서 사매의 대장암세포에 대한 증식억제효과가 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났으며, flow cytometry를 이용한 사매의 대장암세포주기에 미치는 영향을 측정한 실험에서, 대장암 세포의 분열과 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

따라서 사매는 유효한 항대장암효과가 있는 것으로 평가할 수 있으며, 임상적으로 대장암의 예방 및

치료에 활용하기 위하여 앞으로 지속적이고 다양한 형태의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

사매를 대장암 세포에 투여하여 항암효능을 연구하기 위하여 형태학적 변화를 관찰, trypan blue exclusion test를 통해 대장암세포 살상효과를 측정, MTT assay를 통해 대장암세포의 증식억제효과를 측정하였으며, 그리고 flow cytometry를 이용한 대장암 세포주기에 미치는 효과를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대장암세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 핵 및 세포질이 위축되어 크기가 작아지면서 세포 배양용기로부터 떨어져 나오는 전형적인 세포손상의 형태학적 변화가 관찰되었다.
2. 대장암세포의 살상효과를 측정한 결과, trypan blue를 배출하지 못하는 손상된 세포의 수가 24시간부터 증가되기 시작하였으며, 72시간 후에는 통계적으로 의미있는 세포손상이 관찰되었다. 검액 10 μ l, 20 μ l를 투여한 실험군 모두에서 대장암 세포 살상효과가 유의성 있게 나타났으며, 살상율은 투여시간의 경과와 용량 의존적인 것으로 나타났다.
3. 대장암세포의 증식억제효과는 검액 10 μ l, 20 μ l를 투여한 실험군 모두에서 통계적으로 유의성 있게 나타났으며, 실험군은 대조군에 비하여 용량과 관계없이 시간이 경과함에 따라 증식억제효과가 증가하는 것으로 나타났다.
4. 대장암 세포주기의 변화에 대한 효과는 대조군의 G0/G1이 78%(S/M; 22%)인데 비하여, 실험군의 G0/G1은 84%(S/M; 16%)로 나타나, 분열기의 세포가 감소하는 경향을 보였다.

參 考 文 獻

1. 통계청. 사망원인통계. 042-481-2259,61. Available at <http://www.nso.go.kr/cgi-bin/sws777pop>.

- cgi?A REPORT ID=MA&A CONTENT'S=1502 &A LANG=1.
2. Wu L, Sato MD. Integrated, Molecular Engineering Approaches to Develop Prostate Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 2003;3(5):452-67.
 3. 서울대학교의과대학 편. 腫瘍學. 서울:서울대학교 출판부; 1998. p.138,149-53,168,182-4,225-7.
 4. 박상구, 이지현, 문구, 문석재, 원진희, 박래길. 백화사설초 메탄올 추출물에 의한 HL-60 세포 고사과정에 있어서의 transcriptional factors 활성 변화 연구. *대한한방종양학회지.* 2000;6(1):67-80.
 5. 全宇鉉, 金珍成, 柳逢夏, 朴東源, 柳基源. 整腸補脾湯의 消化管機能 및 胃癌細胞 增殖抑制能에 關한 研究. *慶熙韓醫大論文集.* 2000;23(1):17-34.
 6. 의학교육연수원. 약물요법. 서울:서울대학교 출판부; 1993. p.327-31.
 7. 김동희, 김성훈. 항암제 부작용에 대한 한방요법. *대전대학교 한의학 연구소, 한의학편.* 1993;2(1); 33-51.
 8. 조종관. 한방임상종양학. 대전:주민출판사; 2001. p.400,1076.
 9. 임록재, 김현삼, 곽종송, 라오칠, 리용재, 리관필 등. *조선식물지.* 평양:과학기술출판사; 1997. p. 235-6.
 10. 金昌玟 3인. *원역 중약대사전.* 서울:도서출판정담; 1997. p.459-60.
 11. 홍상선, 류봉하, 김진성, 윤상협, 류기원. 사매가 위암세포에 미치는 영향. *대한 한방내과 학회지.* 2003;24(2):290-9.
 12. Le Brun DP, Warmke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol.* 1993;142:743-53.
 13. Jennifer M. Jones, Jack W. Anderson. Relative potencies of PAHs and PCBs based on the response of human cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 1999;7(7):19-26.
 14. 손윤희, 남경수. 포공영 에탄올 추출물이 발암 개시에 미치는 영향. *대한암예방학회지.* 2002;7(1):13-8.
 15. 정경석, 홍창걸, 문성하. MTT Assay를 이용한 위선암의 항암제 감수성 검사. *외과학회지.* 1995; 49(4):479-83.
 16. Sang-Han Lee, Do-Kwon Kim, Young-Rok Seo, Kee-Min Woo. Nickel(II)-induced apoptosis and G2/M enrichment. *Experimental and Molecular medicine.* 1998;30(3):171-6.
 17. 이진화, 심범상, 안규석, 최승훈. 혈부축어탕이 암 전이 억제에 미치는 영향. *대한한방종양학회지.* 1999;5(1):61-76.
 18. 김미숙, 전점이, 손경희. 대장암 환자의 생활양상에 관한 연구. *성인간호학회지.* 2002;14(3):390-400.
 19. 최영상, 안승익. 청장년에서 대장 및 직장암의 임상적 고찰. *대한암학회지.* 1991;23(2):357-65.
 20. 정승용. 대장암 조기검진을 위한 권고안. *대한 소화기내시경학회지.* 2002;24:317-20.
 21. 김정범, 안규석. 대장암의 동서의학적비교연구. *동의병리학회지.* 1995;10:89-126.
 22. 김병주, 문구. 大腸癌의 東西醫 結合診治 近況. *대한한방종양학회지.* 1999;5(1):1-17.
 23. 최승훈. 한의학의 腫瘍에 대한 認識과 病理論. *대한한방종양학회지.* 1995;1(1):11-28.
 24. 李太業. 加味香砂六君子湯이 생쥐 소장에서 방사선 조사 후 保護效果와 Apoptosis에 미치는 影響. *경희대학교 대학원.* 2000.
 25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of immunol. methods.* 1983;65(1-2):55-63.
 26. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer chemother Pharmacol.* 1986;17(3):259-63.
 27. 정경석, 홍창걸, 문성하, 이재정, 최창식, 이계숙. MTT Assay를 이용한 위선암의 항암제 감수성 검사. *외과학회지.* 1995;49(4):479-83.
 28. 강우성, 이장훈, 우홍정. 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 肝細胞活性, 細胞週期 및 DNA damage-

- induced apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 1999;20(1):91-105.
29. 김현일, 김진성, 윤상협, 류봉하, 류기원. 斑猫가 大腸癌細胞에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2004;25(2):214-23.
30. Anthony Mathur, Ying Hong, Barbara K. Kemp. Evaluation of fluorescent dye for the detection of mitochondrial membrane potential change in cultured cardiomyocyte. Cardiovascular Research. 2002;46:126-38.