

와송의 수종 암세포에 대한 항암작용 연구*

김진성, 윤상협, 류봉하, 류기원
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Anti-cancer Effects of *Orostachyos Herba* on some Kinds of Cancer Cells

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

3rd Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

Background: Cancer research is done in earnest world-wide, because cancer is one of most threatening diseases to humans. *Orostachyos Herba* is a widely used herb that has long been in use in Korea as an anti-inflammatory and anti-cancer therapy. The purpose of this study is to verify any anti-cancer effects on stomach and liver cancer in vitro.

Materials & Methods: AGS and KATO III stomach cancer cells and Hep3B and HepG2 liver cancer cells, all obtained from Korean Cell Line Bank, were used. The boiled extract of *Orostachyos Herba*(20 and 40 microliters) were injected into cultures and observed at 0 hours, and at 24-hour intervals up to 96 hours. The destruction of stomach and liver cancer cells was measured through Trypan blue exclusion testing. The suppression on viability of stomach and liver cancer cells was observed, and anti-cancer mechanisms was examined by analyzing the cell cycle.

Results: In morphologic change, AGS, KATO III, HepG2 and Hep3B showed some of the withdrawn and floating appearance that is typical in cellular impairment. AGS, KATO III, HepG2 and Hep3B showed more destruction of stomach cancer cells in each test group than in the control group to a statistically significant degree. Analysis of the cell cycle after introduction of *Orostachyos Herba* showed very little inhibition of divisions of all cell lines.

Conclusions: This experiment suggests that *Orostachyos Herba* has some anti-tumor effects on stomach and liver cancer cells. Progressive research on *Orostachyos Herba* and its anti-tumor effects will be needed to determine its practicability as a cancer treatment.

Key Words: *Orostachyos Herba*, anticancer effect, trypan blue exclusion test, cell cycle

1. 緒 論

우리나라에서 소화기암, 특히 위암 및 간암의 발생은 유전적 요인, 음식물을 포함한 환경적 요인 및 바이러스 감염 등에 의해 다른 나라에 비해 높은 발생 빈도를 나타내고 있으며, 중앙으로 인한 사망률에 있어서도 수위를 차지하고 있다¹.

하지만 이제 까지 국내외적으로 많은 연구와 치료방법의 개발에 노력을 기울여 왔으나, 과거에 비해 만족스러운 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

현재까지 개발된 항암제의 가장 큰 단점은 항암제의 비특이적 작용이라 할 수 있다. 즉 항암제가 암세포뿐 아니라 정상세포에도 같은 작용을 초래함으로써 정상세포의 세포분열 및 성장을 방해하여 이로 인한 부작용이 초래되는 것이다. 이러한 부작용을 극복하기위한 노력의 일환으로 최근 합성물질이 아닌 천연물질로부터 항암물질을 추출하려는 연구가 진행되고 있다.

瓦松(*Orostachyos Herba*)은 들나물과에 속한 다년생

* 이 연구는 2003년도 경희대학교 개교 55주년기념 학술진흥 특별연구비지원 결과임.

· 접수 : 2005. 2. 21. · 채택 : 2005. 3. 22.
· 교신저자 : 김진성, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방3내과
(Tel. 02-958-8895
E-mail : oridoc@khu.ac.kr)

육질초본인 바위솔(*Orostachys japonica* Berger)의 전초로 涼血止血, 清熱解毒, 收濕斂瘡하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다^{2,3}.

현대 한국에서 외송에 대한 관심은 비교적 오래되어서 한의계에서는 1966년 초보적 실험이나 항암작용과 독성에 대한 고찰이 이루어 졌으며⁴, 이후 윤⁵과 이⁶는 외송이 실험동물의 체중변화와 사망률에 대한 평가에서 뚜렷한 항암활성을 보였다고 하였으나, 양⁷은 자연살해세포 활성이 미약하다고 하였고, 전⁸과 황⁹은 외송이 담암 생쥐의 생존을 연장하고 지연형 과민반응의 감소에는 효과가 있었으나 그 외의 대부분의 면역반응에서 유의한 작용이 없다고 보고하였다.

이러한 외송에 대한 선행연구는 항암작용에 대한 평가가 엇갈리는 경향을 나타내고 있는데, 주로 *in vivo*상으로는 담암 생쥐의 생존율과 체중증가를 통한 평가이었으며, *in vitro*상으로는 면역효과에 대한 연구가 대부분을 차지하였다.

이에 저자는 외송의 직접적인 항암작용을 *in vitro* 상으로 확인하기 위하여 먼저 암세포의 형태학적 변화, trypan blue exclusion test를 통한 암세포 살상 효과 및 암세포주기에 대한 효과를 관찰하여 일정한 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 약재는 돌나물과(景天科: *Crassulaceae*)에 속한 다년생 육질초본인 바위솔(*Orostachys japonica* Berger)의 전초로 여름에서 가을 사이에 채취하여 쇠건한 것으로, 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입 후 정선하여 사용하였다.

2) 검액의 조제

외송 50g을 분쇄기를 이용하여 잘게 부순 후 증류수 50ml에 넣고 121℃에서 15분간 끓인 후 상층액을 취하여 0.2μl syringe filter로 여과하여 검액으로 사용하였다.

3) 대상 세포주

이 실험에 사용한 인체 암세포는 한국 암세포주 은행에서 구입한 Stomach(AGS, KATOIII), Liver (HepG2, Hep3B)의 4종류이다.

2. 방법

1) 암세포의 배양

암세포주는 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, MD), 1% broad-spectrum antibiotics(Gibco BRL, MD)가 함유된 RPMI-1640(Gibco BRL, MD) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ incubator(Precision Scientific Inc. NY)에서 배양하였고, 세포는 0.1% Trypsin-EDTA (Sigma, MD)를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

2) 암세포의 형태학적 변화 측정

암세포주의 배지 1ml에 20μl의 검액을 투여하고 48시간 경과 후, inverted microscope(CK2, Olympus optical Co. LTD., Japan)하에서 형태학적 변화를 관찰하였다.

3) 암세포 살상효과 측정(Trypan blue exclusion test)

각 암세포주의 배지 1ml에 20μl 및 40μl의 검액을 투여하고 0, 24, 48, 72 및 96시간 경과 후, 각 세포를 회수하여 10⁶/ml의 농도로 세포액을 제작하였다. 제작된 세포액, PBS(8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄ pH 7.4), 0.4% trypan blue(Gibco BRL, cat. No. 15250-061, USA)를 각각 0.5ml, 0.3ml, 0.2 ml로 섞고 5분간 방치한 후, 10분 이내에 푸르게 염색된 세포의 비율을 inverted microscope하에서 측정하였다.

4) 암세포주기의 변화 측정

배양 중인 각 세포의 배지 1ml에 20μl의 검액을 투여하고 72시간 경과 후 세포를 회수하여 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 세척 후, 70% ethanol로 4℃에서 2시간 동안 고정시키고 PBS로 5분간 3회 세척한 후 100μg/ml의 RNase A와 50μg/ml의 propidium iodide(Sigma P 4170)를 첨가하여 4℃ 암실에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 완료 후 flow cytometer로

측정하면서 세포주기의 변화를 분석하였다.

5) 통계 처리

유의성 검증은 One way ANOVA test를 이용하였으며, p value 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 成 績

1. 암세포의 형태학적 소견

와송이 4종의 위암 세포주(AGS, KATOIII)와 간

암 세포주(HepG2, Hep3B)에 미치는 영향을 알아보기 위해 배지 1ml에 20 μ l의 검액을 투여하고 48시간 후 inverted microscope 하에서 관찰하였다. 대조군의 경우 세포 배양 plate에 암세포 특유의 모양대로 부착되어 있으며, 실험군의 암세포는 부분적으로 미약한 손상이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 암세포 살상효과 (Trypan blue exclusion test)

와송의 시간경과에 따른 암세포 살상효과를 알아보기 위해 암세포주에 검액을 처리하고 24, 48, 72

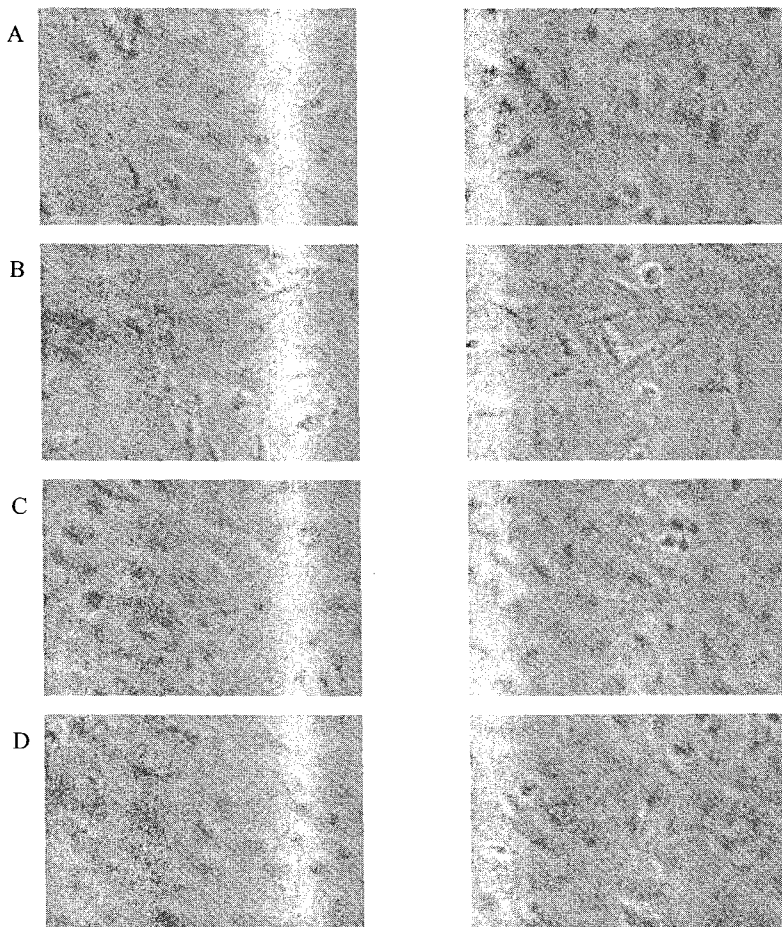


Fig. 1. Morphologic change of each cell lines.

A. AGS B. KATOIII C. HepG2 D. Hep3B

Left: Control Group

Right: Sample Group treated by *Orostachyos Herba*(20 μ l, 48h)

및 96 시간동안 배양 후 trypan blue exclusion test 를 시행하였다. 그 결과 위암 및 간암 세포주 AGS, KATOIII, HepG2 및 Hep3B에서 24시간 후부터 손상된 세포수가 증가하기 시작하여 96시간 후 현재

한 증가를 나타내었다(Fig. 2, 3, 4, 5).

3. 암세포주기에 대한 효과

DNA양 측정을 통해 각 세포의 특징적인 세포주

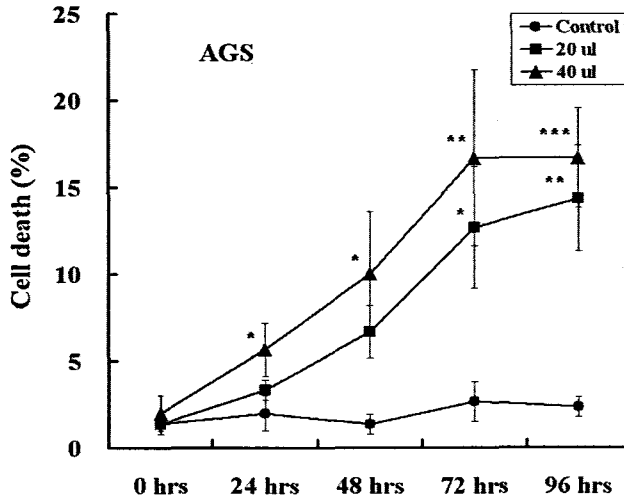


Fig. 2. Time and dose dependent cell death effect of *Orostachyos Herba* on AGS. There was statistically significant difference between control and sample groups.

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

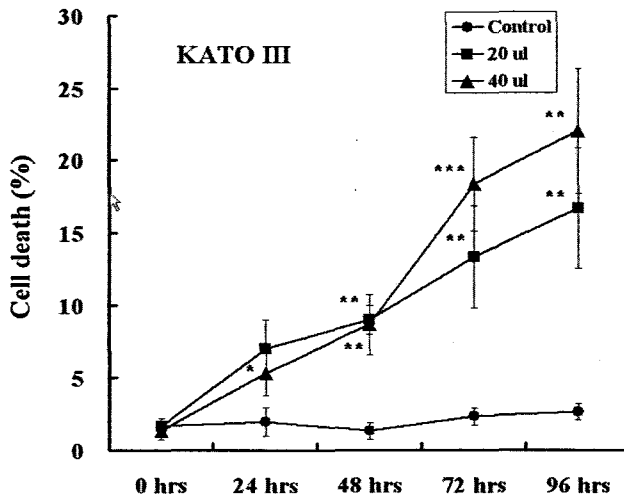


Fig. 3. Time and dose dependent cell death effect of *Orostachyos Herba* on KATOIII. There was statistically significant difference between control and sample groups.

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

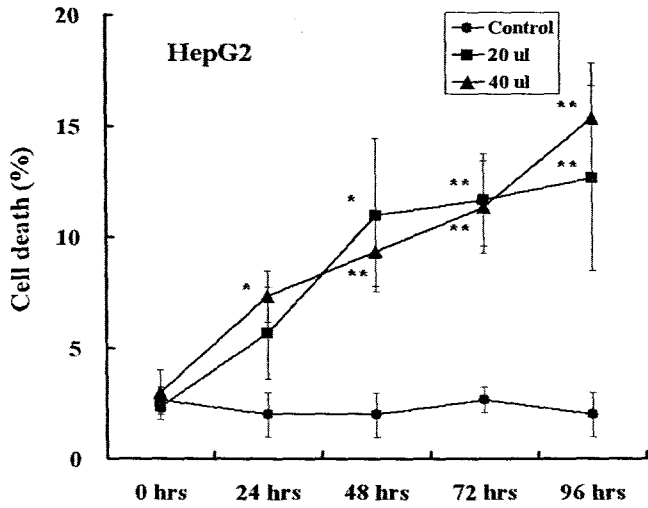


Fig. 4. Time and dose dependent cell death effect of *Orostachyos Herba* on HepG2. There was statistically significant difference between control and sample groups.

* p<0.05 ** p<0.01

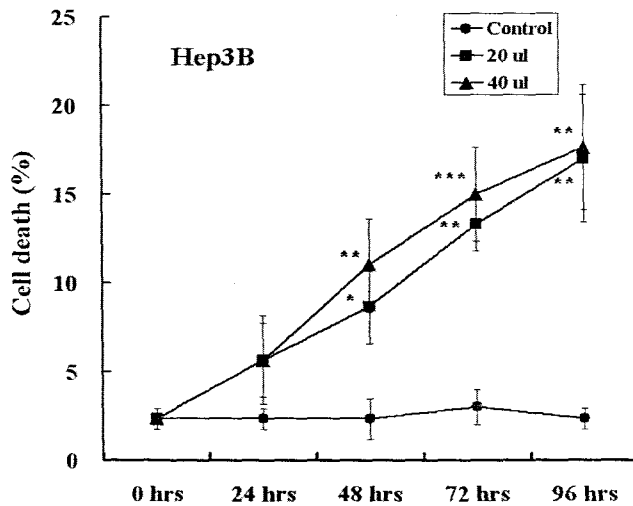


Fig. 5. Time and dose dependent cell death effect of *Orostachyos Herba* on HepG2. There was statistically significant difference between control and sample groups.

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

기를 분석할 수 있는 propidium iodide를 이용하여 4종의 암세포주에 대한 외송의 살상 효과를 관찰하였다. 그 결과, AGS, KATOIII, HepG2 및 Hep3B

에서 분열기의 세포가 감소하는 경향이 미미하였다 (Fig. 6.).

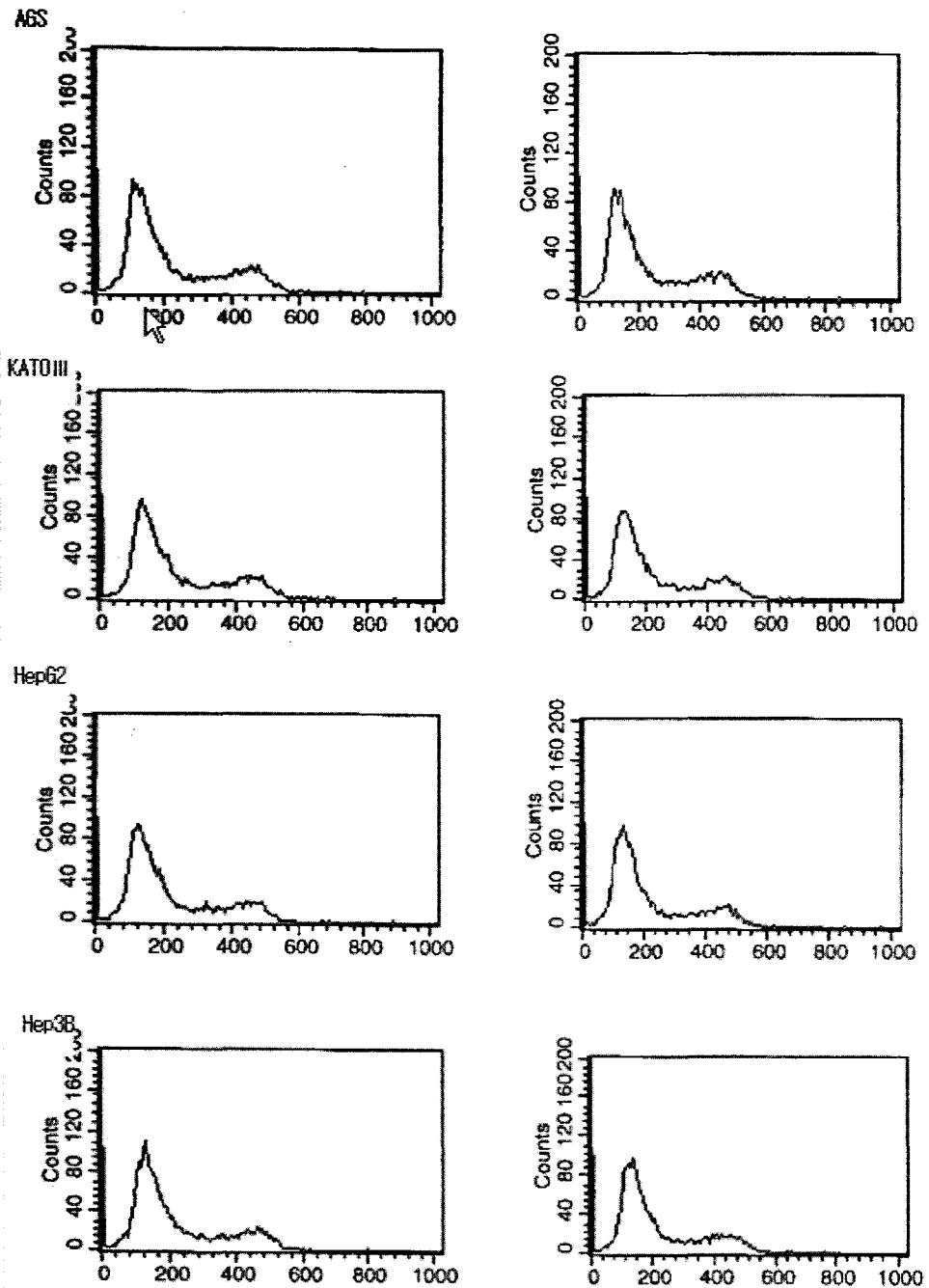


Fig. 6. Effects of *Orostachys Herba* on AGS, KATOIII, HepG2 and Hep3B cell lines using cell cycle analysis
Left: Control group.
Right: Sample group treated by *Orostachys Herba*(20µl, 72h)

IV. 考 察

한의학에서의 위암, 간암을 비롯한 여러 종류의 암에 대한 치료법은 전신적 상태와 병정에 따라 辨證論治에 의해 이루어지고 있지만, 특히 扶正과 祛邪法을 배합한 부정거사법이 우선 고려되고 있다¹⁰. 이중에서도 淸熱解毒藥을 君藥으로 병용한 부정거사의 방제가 가장 많이 활용되는 처방중의 하나이다. 淸熱解毒法은 熱毒이 암의 주병기로 인식되어, 특히 암의 초기에 가장 많이 활용된다. 또한 암을 발전시키고, 병정을 악화시키는 요소중이 하나인 염증과 감염을 치료하는데도 중요한 역할을 한다^{11,12}.

청열해독 약물에 대한 실험적 연구로 이미 수종이 단일 약제 및 처방에 대한 연구가 이루어졌고, 이들이 암세포의 DNA, RNA의 합성을 억제하여 암세포의 분열을 억제할 뿐만 아니라 직접 암세포를 살상시키기도 하고, 생체의 면역 방어기능을 증가시켜 항암효과가 실험적으로도 입증된 바 있다¹³⁻⁷.

瓦松(*Orostachys Herba*)은 들나물과(景天科; *Crasulaceae*)에 속한 다년생 육질초본인 바위솔(*Orostachys japonica* Berger)의 전초로 여름, 가을에 채취하여 왜건하여 사용한다. 性味는 涼酸苦하여 肝, 肺經에 歸入하며, 주로 涼血止血, 淸熱解毒, 收濕斂瘡하는 효능이 있어 吐血, 鼻衄, 便血, 血痢, 熱淋, 月經不調 및 疔瘡癰腫 등의 병증에 적용한다^{2,3}.

현대 한국에서 와송에 대한 관심은 비교적 오래되어서 한의계에서는 1966년 초보적 실험이나마 항암작용과 독성에 대한 고찰이 이루어 졌다⁴.

이후 윤⁵과 이⁶는 와송이 실험동물의 체중변화와 사망률에 대한 평가에서 뚜렷한 항암활성을 보였다고 하였으나, 양⁷은 흰쥐의 비장 임파구에 와송 검액을 시간별로 작용시킨 후 NKCA를 측정하여 자연살해세포 활성이 미약하게 나타난다고 하였고, 전⁸과 황⁹은 와송이 담암 생쥐의 생존율 연장과 지연형 과민반응의 감소에는 효과가 있었으나 그 외의 대부분의 면역반응에서 유의한 작용이 없다고 보고하였다.

또한, 약리성분과 관련하여 와송은 대량의 초산올

함유하고 있다고 하였고¹⁸, 와송의 성분에 대한 연구¹⁹에서 지방산 에스테르 혼합물, seco-A-triterpene 혼합물, glutinone, friedelin, b-amyrin, gltinol, epifridelanol, 1-hexatriacontanol, sterol 혼합물, steryl glucoside 혼합물을 분리하였으며, 이²⁰는 와송의 Triterpene 및 Steroid 성분으로 taraxerone, stigmast-4-3-one and ergost-4-ene-3-one을 분리하였다.

이러한 와송에 대한 선행연구는 항암작용에 대한 평가가 엇갈리는 경향을 보이고 있는데, 주로 in vivo상으로는 담암 생쥐의 생존율과 체중증가를 통한 평가이었으며, in vitro상으로는 면역효과에 대한 연구가 대부분을 차지하였다.

이에 저자는 와송의 직접적인 항암작용을 in vitro상으로 확인해보기 위하여 먼저 암세포의 형태학적 변화, trypan blue exclusion test를 통한 암세포 살상 효과 및 암세포주기에 대한 효과를 관찰하여 일정한 지견을 얻었다.

와송이 위암 세포주(AGS, KATOⅢ)와 간암 세포주(HepG2, Hep3B)에 미치는 영향을 알아보기 위해 배지 1ml에 20 μ l의 검액을 투여하고 48시간 후 inverted microscope 하에서 관찰하였다. 대조군의 경우 세포 배양 plate에 암세포 특유의 모양대로 부착되어 있으며, 실험군의 암세포는 부분적으로 미약한 손상을 입은 모습만이 관찰되었다. 이것은 뚜렷한 항암작용이 있을 때 나타나는(원형 모양으로 축소되며 plate에서 떨어져 나와 부유되면서 사멸됨) 소견이 아니어서 와송의 항암작용에 대한 추가 검정을 위해서는 단일 compound가 아닌 한약의 특성상 50 μ l 이상의 고농도의 검액을 통한 확인이 필요할 것으로 사료된다.

시간 경과에 따른 AGS, KATO Ⅲ, HepG2 및 Hep3B에 대한 살상효과를 관찰하기 위하여 암세포주의 배지 1ml에 20 μ l의 와송 검액을 투여하고 24, 48, 72 및 96시간 경과 후, 각 세포를 회수하여 trypan blue로 염색된 세포의 비율을 inverted microscope 하에서 측정하였다. Trypan blue exclusion test는 살아있는 세포의 경우 trypan blue에 염색되지 않고 투명하게 보이며 죽은 세포의 경우 파란색으로 염색

되는 원리를 이용하여 현미경하에서 염색된 수를 세어 분석하는 방법이다. 4종의 암세포주 모두에서 24시간 후부터 손상된 세포수가 증가하기 시작하여 96시간 후 현저한 증가를 나타내어 뚜렷한 암세포 살상효과를 나타내었다.

DNA양 측정을 통해 각 세포의 특징적인 세포주기를 분석할 수 있는 propidium iodide를 이용하여 4종의 암세포주에 대한 와송의 살상 효과를 관찰하였다. 그 결과, AGS, KATO III, HepG2 및 Hep3B에서 모두 분열기의 세포가 감소하는 경향이 미미하였다. 이러한 결과도 추후 고농도군에서의 재검토가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 와송의 항암작용은 부분적으로 효과가 입증되었으며, 추후 임상적 활용의 근거를 마련하기 위하여 검액의 농도나 추출방법 등을 다양화하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 통계청. 2003년 사망원인별 사망자수 및 사망률 (Available from URL <http://www.nso.go.kr>).
2. 한의과대학 본초학편찬위원회. 본초학. 서울:영림사; 2004, p.734-5.
3. 조창섭, 조종관. 와송에 대한 문헌적 고찰. 대전 대한의학연구소 논문집. 1993;2(2):83-98.
4. 임좌진. 와송이 암에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1966;4(1):30-1.
5. 윤태여. 소적사군자탕, 와송 및 귀전우가 MNNG를 투여한 흰쥐의 항암작용에 관한 연구. 동국대학교한의대논문집. 1986;5:311-22.
6. 이정화. 와송약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구. 대한침구학회지. 1999;16(4):175-212.
7. 양서현, 김덕호, 우홍정, 김병운. 영지, 산자고, 선학초, 권백, 와송이 흰쥐의 자연살해세포에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1989;10(2):103-14.
8. 전병욱. 소음인보중익기탕과 와송이 항암 및 면역반응에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 1995.

9. 황규동, 류봉하, 박동원, 류기원. 십전대보탕, 와송 및 십전대보탕가와송의 항암효과와 면역반응에 관한 연구. 대한한방종양학회지. 1996;2(1):1-23.
10. 맹림승. 중의치암대성. 북경:북경과학기술출판사; 1995, p.96-144.
11. 김석근, 송호준. 포공영 수출물질이 진통 항염작용에 미치는 영향. 대한한의학회지 1992;13(1):152-61.
12. 서인교, 김상찬, 이진태, 변준석, 변성희. 백화사설초 추출물의 항균실험 및 SOD유사활성, 전자공여능에 관한 연구. 방제학회지 2000;8(1):299-318.
13. 김규, 김동희, 최봉균, 김성훈. 가미청열해독탕의 항암활성에 관한 연구(I). 대전대한의학연구소 논문집. 2000;8(2):93-106.
14. 김일주, 이견업, 소홍섭, 박래길, 원진희, 문구, 문석재. 백화사설초 메탄올추출물에 의한 HL-60세포 고사과정의 caspase활성변화 연구. 원광대논문집. 2000;10(1):255-69.
15. 김동희, 김성훈. 포공영 분획의 간암세포에 대한 항암활성과 항암제와의 병용투여 효과. 대한한의학회지. 1999;16(2):386-413.
16. Zhang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S, Yi J et al. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by Scutellaria baicalensis. Cnacer research. 2003;63:4037-43.
17. 진가현, 김수명, 강탁림, 김동희. 청열해독 복합방의 항종양작용에 대한 실험적 연구. 본초학회지. 2003;18(1):33-47.
18. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 역. 중약대사전 (7). 서울:정담; 1998, p.4042-4.
19. 이숙희, 최재수, 양한석, 박희준, 김정옥. 와송의 성분에 관한 연구. 한국생약학회지. 1991;22(2):78-84.
20. 이명선, 양한석, 박희준, 임상철. 와송의 Triterpene 및 Steroid 성분. 한국생약학회지. 1994;25(1):20-3.