

鬱금이 肺癌, 子宮癌, 神經膠腫 및 前立腺癌에 대한 細胞自殺誘導에 미치는 影響

박상현, 류봉하, 김진성, 윤상협
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Induction of Apoptosis by Curcuma aromatica on Lung Cancer Cells(A549), Cervical Cancer Cells(HeLa), Glioma Cancer Cells(A172) and Prostate Cancer Cells(PC3)

Sanghyun Park, Bongha Ryu, Jinsung Kim, Sanghyub Yoon
3rd Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

ABSTRACT

Objectives: We are aimed to identify anti-tumor effects of Curcuma aromatica on some kinds of cancer cells through molecular biologic methods.

Materials & Methods: We used 4 kinds of cancer cell lines such as lung cancer cells(A549), cervical cancer cells(HeLa), glioma cancer cells(A172) and prostate cancer cells(PC3). We treated the boiled extract of Curcuma aromatica 5 μ g, 10 μ g to cultural media(ml) for 24 hours. We measured the cytotoxicity on 4 kinds of cancer cells through trypan blue exclusion test and the suppressive effect on viability of 4 kinds of cancer cells via MTT assay. We measured change of mitochondria membrane potential via flow cytometry. The quantitative RT-PCR was used to examine the effect on the revelation of Bcl-2 and Bax which are genes related to apoptosis. We examined the effect on the revelation of Bcl-2 protein and Bax protein by western blot analysis.

Results : In the experiment of trypan blue exclusion test, the extract of Curcuma aromatica showed more significant killing effect on A549, HeLa than the control group with density dependent manner, which was statistically significant. In the experiment of MTT assay the extract of Curcuma aromatica showed more suppressive effect on viability of A549, HeLa than the control group with density dependent manner, which was statistically significant. Curcuma aromatica induced apoptosis by decreasing the membrane potential of mitochondria in A549, HeLa. In the experiment of the revelation of genes related to apoptosis, the revelation of Bcl-2 decreased and the revelation of Bax increased in A549, HeLa treated with Curcuma aromatica with dose dependent manner. In the experiment of the revelation of protein related to apoptosis, the protein levels of Bcl-2 decreased and the protein levels of Bax increased in A549, HeLa treated with Curcuma aromatica with dose dependent manner.

Conclusions: From this study, we can infer that Curcuma aromatica has anti-tumor effect on lung cancer cells and uterine carcinoma cells but not on glioma cells and prostate cancer cells.

Key words: Curcuma aromatica, lung cancer cell, cervical cancer cell, glioma cancer cell, prostate cancer cell, apoptosis, Bcl-2, Bax

I. 緒 論

癌은 현재 인류의 健康을 위협하는 주요한 疾病의 하나로, 傳染性 疾患이 근본적으로 해결된 국가에서는 心血管 疾患과 더불어 주요 死亡原因이 되고 있다¹.

癌의 治療法으로 西洋醫學에서는 手術療法, 化學療法, 放射線療法, 免疫療法 및 遺傳子療法 등을 사용하고 있으나, 化學療法과 放射線療법은 癌細胞 뿐만 아니라 正常細胞에도 毒性을 나타내어 骨髓造血機能 障礙, 消化器 障礙 및 免疫機能 低下 등의 不作用을 초래하는 문제점이 있다^{2,4}. 이러한 이유로 韓醫學을 이용한 抗癌治療 및 抗癌效果가 있는 韓藥物 개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

최근 鬱金の 抗癌性 研究에서 鬱금이 胃癌細胞(AGS)에 대하여 抗癌效果를 보였고⁵, angiogenesis 抑制效能⁶이 있음이 밝혀졌다. 하지만 鬱金の 다양한 臨床 適用을 위해서는 胃癌細胞株 이외의 數種의 癌細胞株에 대한 抗癌作用을 확인하는 것이 필요할 것으로 사료되었다.

이에 著者は 肺癌(A549), 子宮癌(HeLa), 神經膠腫(A172) 및 前立腺癌(PC3) 細胞株에 鬱金 檢液을 투여한 후 癌細胞의 形態 變化, 癌細胞의 殺傷效果, 癌細胞의 增殖抑制效果, 미토콘드리아 膜透過度 및 膜電位 變化에 대한效果, apoptosis 聯關 遺傳子 및 蛋白質 發顯에 미치는效果 등을 研究하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 藥 材

본 實驗에 사용한 鬱金은 慶熙醫療院 韓方病院 약제과에서 구입, 정선하여 사용하였다. 試藥은 특별히 명시가 없는 한 Sigma. MO에 제품을 신청하여 사용하였다.

藥名	學名	生藥名
鬱金	Curcuma aromatica Salisb.	Curcumae Rhizoma

2) 檢液의 調製

鬱金 5g을 蒸溜水 100ml에 넣고 100°C에서 2시간 동안 밀폐된 유리병에서 끓여 上層液을 0.2µm syringe filter로 여과하여 固形成分을 제거한 후 97 ml 용액을 얻어서 檢液으로 사용하였다.

3) 癌細胞株

본 實驗에 사용한 細胞株로는 肺癌(A549), 子宮癌(HeLa), 神經膠腫(A172), 前立腺癌(PC3) 4종류의 細胞株를 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다.

2. 方 法

1) 癌細胞의 培養

모든 癌細胞株를 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 RPMI 1640 培地(Gibco BRL, MD)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Precision Scientific Inc. NY)에서 배양하였다.

2) 藥物 處理

檢液의 농도는 培地 1ml당 5µg, 10µg을 처리하여 24시간 경과 후 抗癌作用을 측정하였다.

3) 癌細胞의 形態 觀察

癌細胞株에 檢液을 5µg/ml, 10µg/ml 농도로 투입하고 24시간 경과 후 細胞의 형태와 細胞核의 變化를 각각 inverted microscope(CK2, Olympus optical Co. LTD., Japan)와 fluorescence microscope(Eclipse E800, Nikon, Japan)하에서 관찰하였다. 대조군은 檢液을 사용하지 않은 細胞株를 사용하였다. 細胞核의 경우 形態學的 變化가 더욱 분명하게 일어나는 10µg/ml의 농도를 사용하여 측정하였다.

4) 癌細胞 殺傷能 測定

癌細胞의 殺傷效果를 측정하기 위하여 tryphan

blue exclusion test⁷를 시행하였다. 細胞를 회수하여 10⁶/ml의 농도로 細胞液을 만든 후 細胞液, PBS(Hanker' balanced salt solution), 0.4% tryphan blue를 각각 0.5ml, 0.3ml, 0.2ml의 비율로 섞고 5분간 방치한 후 10분 이내에 푸르게 염색된 細胞의 비율을 inverted microscope하에서 측정하였다. 檢液의 농도는 각각 5 μ g/ml, 10 μ g/ml씩 투입하고 24시간 후에 관찰하였다. 대조군은 檢液을 사용하지 않은 細胞株를 사용하였다.

5) 癌細胞 增殖抑制能 測定

癌細胞 增殖 抑制 效果를 검증하기 위하여 MTT assay⁸를 시행하였다. 10 μ l MTT stock solution (MTT 5mg/ml in PBS, pH7.5)을 100ml의 cell suspension(10⁶/ml)에 넣고 37°C에서 3시간 동안 방치한 다음 100 μ g의 0.04M HCl in isopropanol을 넣고 잘 혼합한 후 곧 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) reader (Molecular device, CA)를 사용하여 540nm의 파장에서 吸光度를 측정하였다. 檢液의 농도는 5 μ g/ml, 10 μ g/ml의 농도로 細胞에 넣어주고 24시간 경과 후 측정하였다. 대조군은 檢液을 사용하지 않은 細胞株를 사용하였다.

6) Mitochondria 膜透過度 및 膜電位 測定⁹⁻¹¹

細胞培養 培地에 150nM의 mitotracker red를 넣은 후 20분간 37°C incubator에 보관하였다. 이후 PBS로 3회 세척한 후 fluorescence microscope와 flow cytometer(FACScaliver, Becton Dickinson, CA, USA)를 사용하여 관찰하였다.

7) Apoptosis 聯關 遺傳子 發顯 測定^{12,13}

癌細胞株의 增殖 및 apoptosis와 聯關된 遺傳子의 發顯에 미치는 影響을 검증하기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다. 檢液의 농도는 5 μ g/ml, 10 μ g/ml을 각 細胞株에 넣어주고, 대조군은 檢液을 사용하지 않은 細胞株를 사용하였다.

① RNA 抽出^{14,15}

檢液이 처리된 細胞를 회수하여 solution D (250g guanidine isothiocyanate in 293ml water, 0.75M sodium citrate 17.6ml, 10% sarcosyl 26.4ml,

0.1M 2 mercaptoethanol) 200 μ l, 2M sodium acetate (pH 4.2) 20 μ l, water saturated phenol 200 μ l, chloroform isoamyl alcohol (49:1) 40 μ l를 넣은 후 20분간 얼음에 보관하였다. 20분 후에 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 上層液을 회수하여 同量의 isopropanol을 넣고 20°C에서 1시간 보관하면서 RNA를 침전시켰다. 다음 13,000rpm에서 30분간 원심분리하여 上層液을 버리고 200 μ l의 ethanol을 넣어 RNA를 세척한 후 RNA를 spectrophotometer를 사용하여 定量하였다.

② cDNA 製作

5x reverse transcription buffer (Gibco BRL, MD) 4 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 10Mm dNTP mixture 2 μ l, RNase inhibitor (Promega, WI) 0.5 μ l, AMV Reversetranscriptase (8U/ μ l) (Gibco BRL, MD) 2 μ l, Oligo dT (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l, RNA 1 μ g (1ml/yk), H₂O 5.5 μ l의 試料를 혼합한 후 37°C에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 제작하였다.

③ RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)¹⁶

cDNA 1 μ l를 template로 하여 GAPDH primer (sense 5'-CTGCTTACCACCT TCTTGATGTC-3', antisense 5'-AACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3')를 각각 10 pmole, 10x PCR amplification buffer 10 μ l, 1.25Mm dNTP 16 μ l, H₂O 30 μ l를 넣어 94°C에서 45초간 변성, 58°C에서 30초간 가열 냉각시켜 primer가 template에 붙을 수 있도록 해주고, 72°C에서 45초간 重合反應을 36cycle 시행하였다. 試料를 2% agarose gel에서 20분간 電氣泳動한 후 ethidium bromide에 10분간 염색하여 gel doc system (Bio Rad, CA)으로 定量化 하였다. 이것을 바탕으로 band의 밝기에 따라 template cDNA의 양을 증감하여 상대적으로 cDNA의 양을 동일하게 조절하였다. 이후 Bcl-2 primer (sense 5'-ATGGCGCACGCTGGGAGAAC-3', antisense 5'-CTTGTGGCTCAGATAGGCAC-3'), Box

primer (sense 5'-ATGGACGGGTCCGGGAG-3', antisense 5'-GCCCATCTTCTTCCAGAT-3')를 사용하여 36cycle의 PCR 반응을 시행하여 Gel doc

system (Bio Rad, CA)으로 定量한 값을 GAPDH에 대한 값으로 나누어 각 遺傳子의 發顯 정도를 定量化하였다.

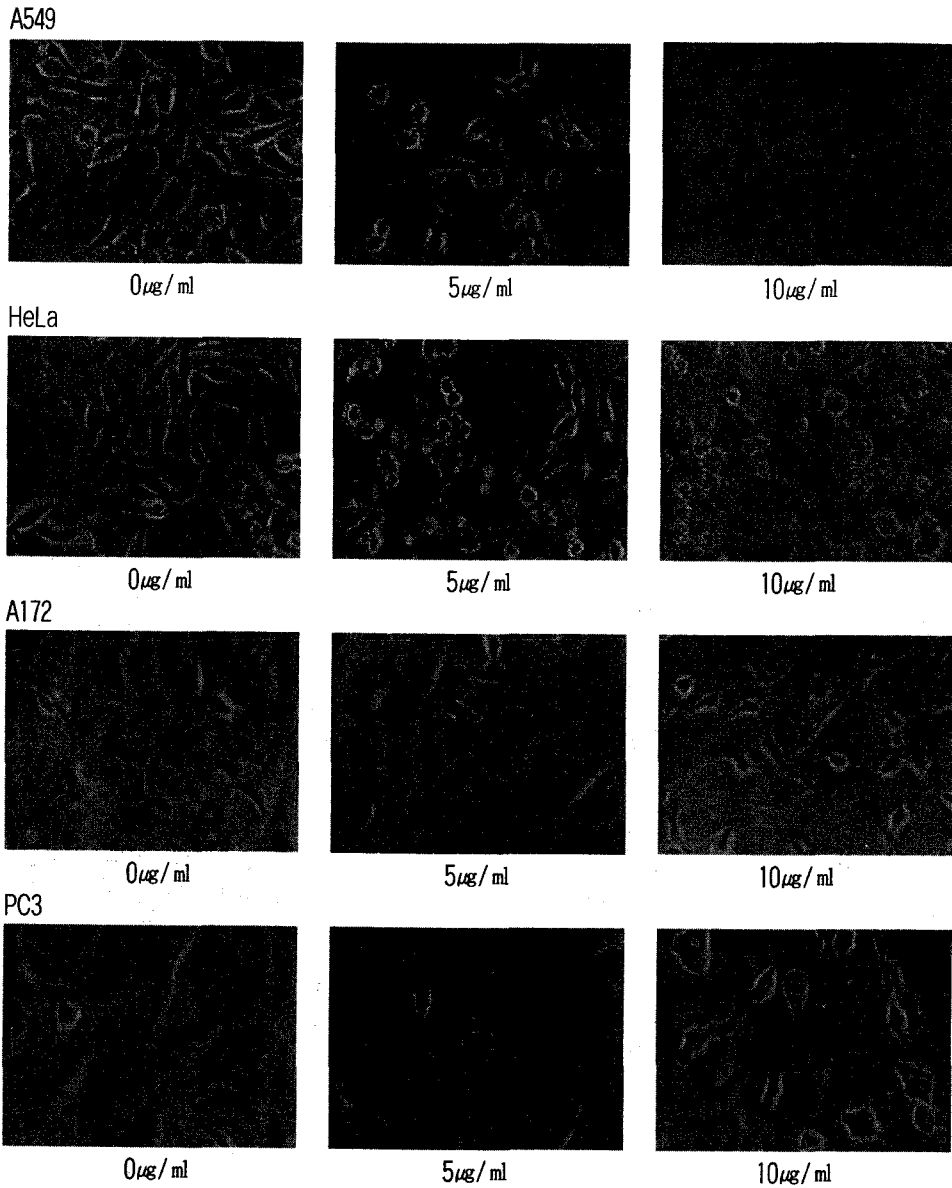
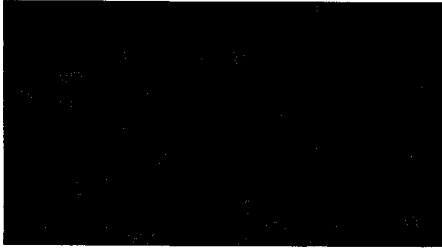


Fig. 1. Morphological changes of each cell lines A549, HeLa, A172, PC3 were treated with Curcuma aromatica 5µg/ml, 10µg/ml after 24 hr.

A549

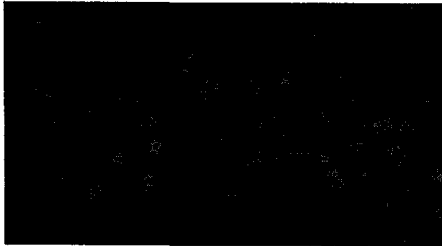


0 μg/ml



10 μg/ml

HeLa

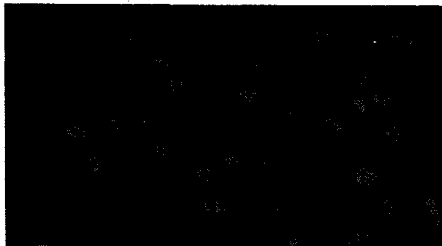


0 μg/ml



10 μg/ml

A172

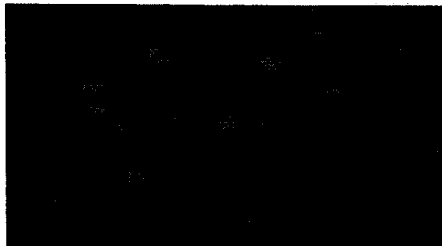


0 μg/ml

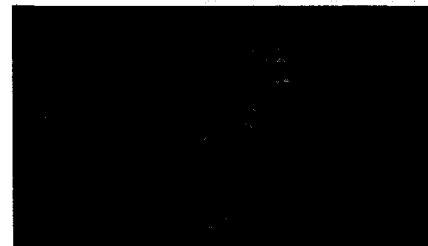


10 μg/ml

PC3



0 μg/ml



10 μg/ml

Fig. 2. Morphological changes of each nucleus A549, HeLa; A172, PC3 were treated with *Curcuma aromatica* 10 μg/ml after 24hr.

8) Apoptosis 聯關 蛋白質 發顯 測定^{12,13}

각 癌細胞株에 細胞 殺傷 效果가 보다 강했던 10 μ g/ml의 檢液을 처리하고 이 細胞들로부터 蛋白質을 추출하여 Bcl-2, Bax에 대한 western blot을 시행하였다

Western blot의 방법은 대조군과 檢液을 처리한 細胞株로부터 얻은 蛋白質을 뷰렛 방법으로 定量한 후 각각 30 μ g의 蛋白質을 12% SDS polyacrylamide gel에서 電氣泳動하여 蛋白質을 크기별로 분리하여 nitrocellulose membrane에 옮긴다. 蛋白質이 옮겨진 membrane을 일차 抗體인 Tubulin, Bax, Bcl-2 抗體로 3시간 동안 반응시킨 후, 2차 抗體를 1시간 동안 반응시키고 ECL(electrochemoluminescent)을 사용하여 band를 검출하였다.

3. 統計 處理

각 藥物의 藥效 지속 시간의 有意性 검증은 paired Student t-test로 통계처리하였으며, p<0.01를 有意性있는 결과로 판단하였다.

III. 成績

1. 形態學的 所見

肺癌(A549), 子宮癌(HeLa), 神經膠腫(A172) 및 前立腺癌(PC3) 細胞株에 檢液을 5 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도로 투여하고 24시간 경과 후 細胞들의 形態學的 變化를 inverted microscope 하에서 관찰하여 Fig. 1에 나타내었다. 또한 檢液을 10 μ g/ml 농도로 투여한 후 細胞核의 變化를 fluorescence microscope 하에서 관찰하여 Fig. 2에 나타내었다. A549, HeLa에서 鬱金에 대한 細胞 損傷에 의한 形態學的 變化가 크게 나타났으나, A172, PC3에서는 細胞損傷의 效果가 거의 일어나지 않았다.

2. 癌細胞 殺傷 效果

鬱金の 癌細胞에 대해 농도 변화에 따른 癌細胞 殺傷 效果를 측정하기 위해서 trypan blue exclusion test를 시행하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 檢液에 의해 細胞와 細胞核에 形態學的 變化를 보였던 A549, HeLa에서 檢液의 농도에 비례하여 통계적으로 有意性 있는 細胞殺傷 效果를 나타내었다. 반면 細胞와 細胞核의 形態學的 變化를 거의 보이지 않았던 A172, PC3에서는 有意성이 없었다.(Table 1)

Table 1. Trypan Blue Exclusion Analysis on Dead Cells of Cancer Cells induced by Curcuma aromatica

Group	Dead cell count (%)			
	A549	HeLa	A172	PC3
0ug/ml	1.3±0.6 ^a	2.3±0.6	3.0±1.0	2.0±1.0
5ug/ml	49.7±9.0 [*]	51.3±8.6 [*]	22.7±6.5	19.7±4.7
10ug/ml	81.3±9.7 [*]	81.7±8.7 [*]	33.3±7.2	32.0±7.5

a : MEAN ± S.D.

* : Statistical significance compared with control data (* : p<0.01) Cancer cells treated with Curcuma aromatica 0 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml

3. 癌細胞 增殖抑制 效果

鬱金の 癌細胞에 대한 增殖抑制 效果를 측정하기 위해서 MTT assay를 시행하여 Table. 2에 나타내었다. A549, HeLa의 경우 optical density(O.D.)가 檢液의 농도에 비례하여 감소하였고, 통계적으로 有意性 있는 細胞 增殖 抑制 效果를 보였다. HeLa의 경우 낮은 농도와 높은 濃度인 5 μ g/ml, 10 μ g/ml에서도 통계적인 有意성이 관찰되나, A549의 경우 5 μ g/ml에서는 비록 통계적 有意성은 없으나 細胞 增殖抑制 效果를 보였다. A172, PC3의 경우 O.D.값이 미미한 감소를 보여 통계적으로 有意성이 없었다.(Table 2)

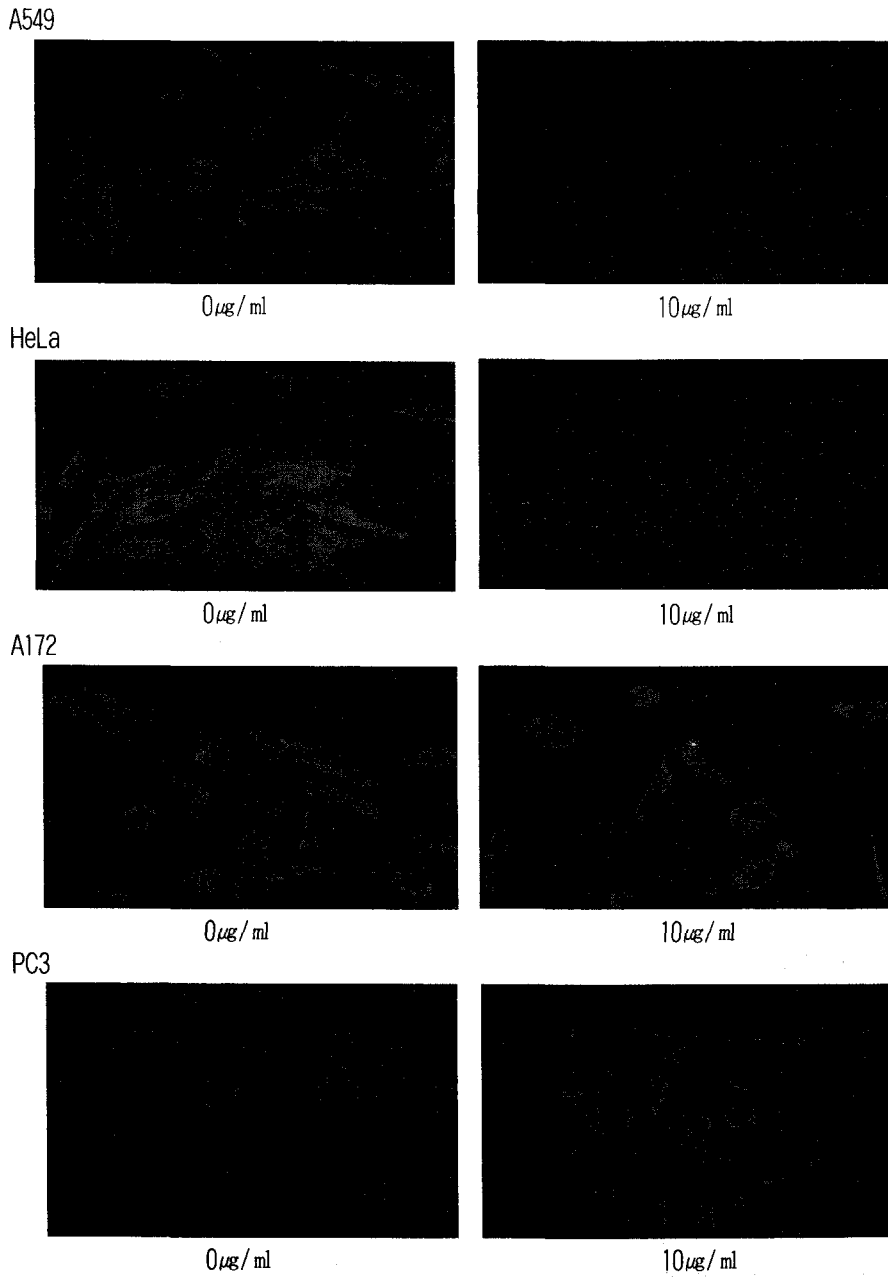


Fig. 3. Effect of Curcuma aromatica on photography of mitochondria membrane potential by fluorescent camera.

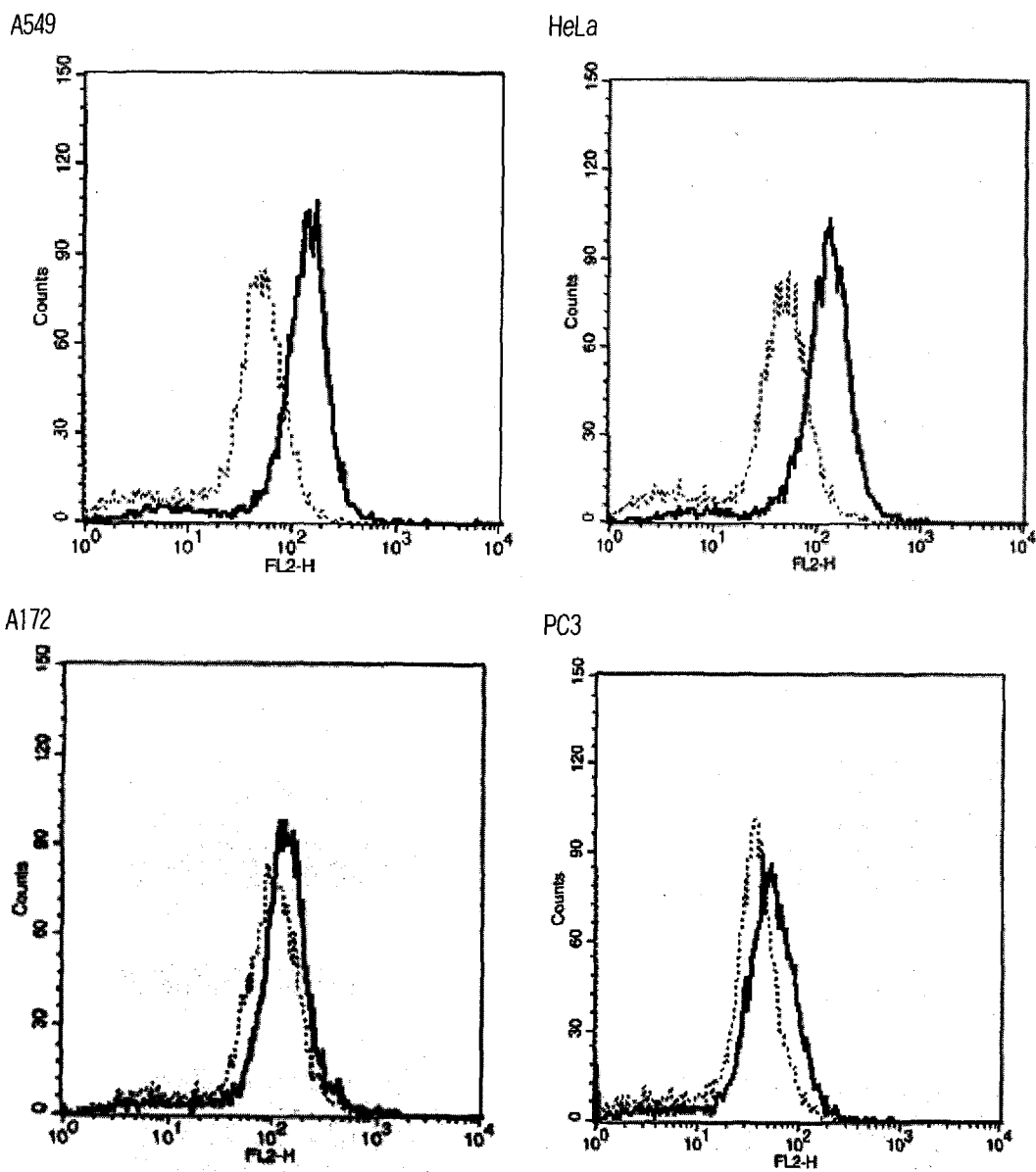


Fig. 4. Effect of Curcuma aromatica on mitochondria membrane potential by flowcytometry.

Bold lind : control.

Dot line : Curcuma aromatica 10µg/ml, 24hr effect of Curcuma aromatica on the membrane potential of mitochondria of cancer cells.

Table 2. Effect of Curcuma aromatica on the Cellular Viability of Cancer Cells

Group	O.D. (Optical Density)			
	A549	HeLa	A172	PC3
0ug/ml	96±2.6 ^a	98.7±0.6	95.7±3.1	96.7±1.5
5ug/ml	53.3±12.0	46.3±10.7*	74.3±13.1	79.7±10.1
10ug/ml	20.7±11.9*	21.7±11.2*	61.7±12.2	68.3±13.0

a : MEAN ± S.D.

* : Statistical significance compared with control data (* : p<0.01) Cancer cells were treated with Curcuma aromatica 0μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml

4. Mitochondria 膜透過度 및 膜電位 變化에 대한 效果

Mitochondria 膜透過度 및 膜電位 變化에 대한 效果를 fluorescent camera와 flow cytometer를 사용하여 각각 Fig. 3와 Fig. 4에 나타내었다. 10μg/ml의 농도를 사용하여 癌細胞株들의 Mitochondria 膜

電位の 變化를 관찰한 결과, graph상의 가로축 높은 곳으로 갈수록 膜電位도가 높은 것이며, 대조군에 비하여 藥物 處理가 된 細胞群에서 시간이 지날수록 膜電位도가 낮아짐을 볼 수 있었다. 膜電位도의 경우에서도 細胞 增殖抑制 效果와 마찬가지로 A549, HeLa의 경우 膜電位도가 감소하였으나 細胞 增殖抑制 效果가 미미하였던 A172, PC3의 경우 膜電位도의 감소가 거의 없었다. (Fig. 3), (Fig. 4)

5. Apoptosis 聯關 遺傳子 發顯에 미치는 效果

Apoptosis 聯關 遺傳子 發顯에 미치는 效果를 判定하기 위하여 RT-PCR을 시행한 후 만들어진 PCR product를 電氣泳動하여 밝기를 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. 檢液은 A549, HeLa에서 Bcl-2 遺傳子是 檢液의 농도에 비례하여 감소되었다. 반면에 細胞死를 일으키는 Bax 遺傳子是 농도에 비례하여 증가되는 것을 알 수 있었다.

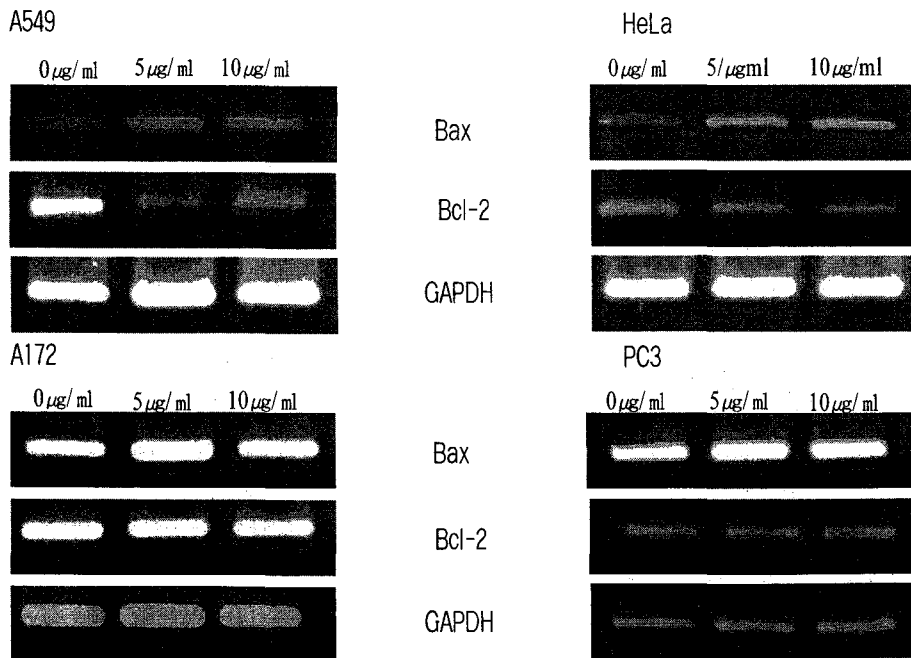


Fig. 5. Quantitative RT-PCR analysis of Bax, Bcl-2 mRNA expression induced by Curcuma aromatica.

그러나 細胞殺傷 效果가 미미했던 A172, PC3는 遺傳子 發顯의 변화는 없었다.(Fig. 5)

IV. 考 察

과학기술의 발전에 따른 생활 및 의료수준의 향상에도 불구하고 산업발전에 따른 환경오염, 스트레스 증가 등 그 逆機能 때문에 發癌物質 또는 자극에의 노출 등으로 인해서 전세계적으로 癌으로 인한 死亡率이 증가되고 있다¹.

현재 癌 治療를 위하여 다양한 治療 방법이 적용되고 있다. 이 가운데 手術療法과 放射線療法은 局所的인 治療法으로 治療에 한계성이 있고, 化學療法은 癌細胞에 대한 특이적 毒性效果가 아직 해결되지 못하였으며, 全身療法인 免疫療法도 현재로

6. Apoptosis 聯關 蛋白質 發顯에 미치는 效果

Apoptosis 聯關 蛋白質 發顯에 미치는 效果를 測定하기 위하여 western blot을 시행하여 Fig. 6에 나타내었다. 實驗 結果 A549, HeLa의 경우 遺傳子 수준에서는 發顯이 감소했던 Bcl-2는 蛋白質 수준에서도 發顯이 감소하였고, Bax는 發顯이 증가되었다. 그러나 細胞殺傷 效果가 미미했던 A172, PC3 細胞에서는 檢液에 대한 이들 蛋白質의 發顯에 변화가 없었다.(Fig. 6)

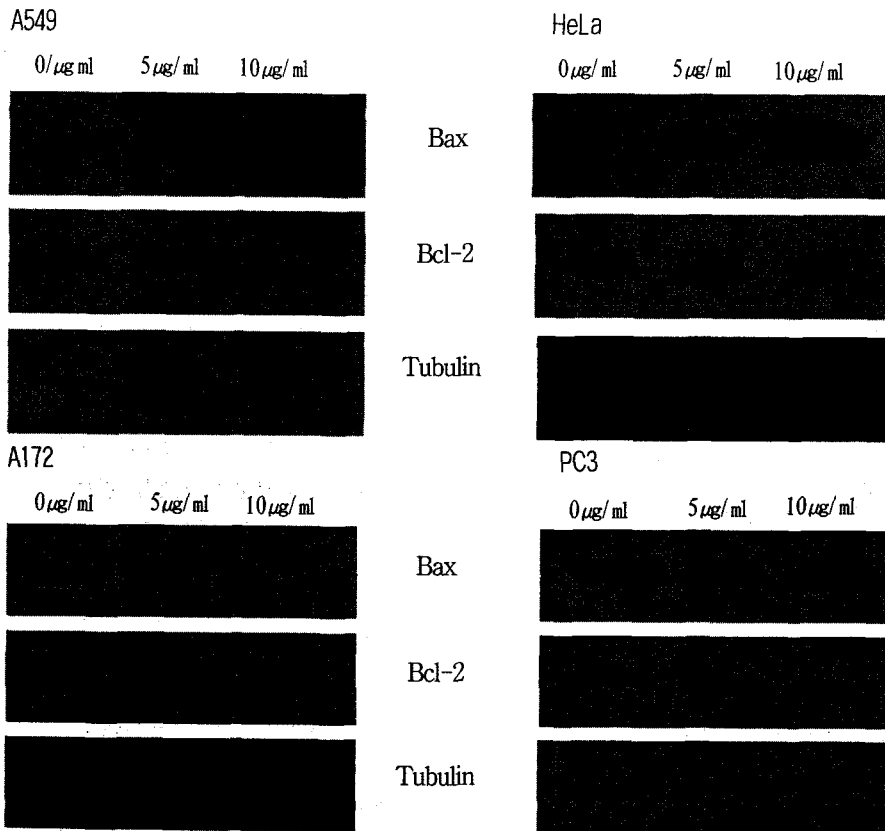


Fig. 6. Quantitative western blot analysis of Bax, Bcl-2 protein expression induced by Curcuma aromatica.

서는 治療方法이 정립되어 있지 않은 상태이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 抗癌 效能이 우수한 새로운 天然藥物, 즉 生藥成分인 韓藥에서 안전성이 높은 새로운 藥物개발이 절실한 실정이다.^{17,18}

韓醫學系의 癌 연구 동향은 抗癌效果가 인정되는 韓藥材와 韓藥 處方을 대상으로 細胞毒性, 細胞分化, 抗癌藥物間의 상승작용, 腫瘍 免疫 自己殺害能(apoptosis), 抗癌劑와 放射線療法 부작용 감소 등에 관한 연구가 수행되는 한편, 分子生物學, 遺傳子療法(gene therapy), 血管新生(angiogenesis) 및 信號傳達體系(signal transduction pathway) 등의 연구의 필요성이 대두되면서 이에 대한 연구들이 진행되고 있는 실정이다.¹⁹

최근 鬱金을 이용한 실험적 연구로는 鬱금이 胃癌細胞(AGS)에 미치는 影響⁵, 鬱금이 Angiogenesis 抑制機轉에 미치는 影響⁶, 울금 에탄올 추출물의 항산화 활성 비교²⁰, 葛花와 鬱金 및 苦蔘의 抗酸化作用에 關한 比較 研究²¹ 등이 있으며, 이들 연구결과 鬱금이 胃癌(AGS)에 대한 抗癌作用과 癌細胞의 apoptosis를 유도하는 작용, angiogenesis를 억제하는 효과, 뛰어난 抗酸化力이 있음을 밝혀내었다. 이런 鬱金の 效能이 胃癌뿐만 아니라 다른 癌細胞에도 效能이 있을 것으로 사료되어 肺癌(A549), 子宮癌(HeLa), 神經膠腫(A172), 前立腺癌(PC3) 4종류의 細胞株에 鬱金 檢液을 투여하여 抗癌效果를 실험적으로 연구하였다.

이에 著者は 이미 밝혀진 鬱金の 胃癌(AGS)에 대한 效果 외에 다른 數種의 人體 癌細胞에 대한 鬱金の 抗癌 效果를 실험적으로 연구할 목적으로 肺(A549), 子宮(HeLa), 神經膠腫(A157), 前立腺(PC3) 癌細胞株에 鬱金으로 檢液을 투여하여 癌細胞의 形態 變化 觀察, 癌細胞 殺傷能 測定(Tryphan blue exclusion test), 癌細胞 增殖抑制能 測定(MTT assay), mitochondria 膜透過度 및 膜電位 變化에 대한 效果 測定, apoptosis 聯關 遺傳子 發顯에 미치는 效果 測定 및 apoptosis 聯關 蛋白

質 發顯에 미치는 效果 測定의 方法을 통하여 다음과 같은 成績을 얻었다.

癌細胞와 細胞核의 形態學的 變化를 관찰한 결과, 肺癌細胞(A549)와 子宮癌細胞(HeLa)에서 鬱金에 의한 細胞 損傷으로 形態 變化가 크게 나타났으나, 神經膠腫細胞(A157)와 前立腺癌細胞(PC3)에서는 細胞 損傷이 거의 나타나지 않았다. 특히, 저농도 투여군(5 μ g/ml)보다 고농도 투여군(10 μ g/ml)에서 보다 현저한 細胞 損傷이 일어나서 이로부터 鬱金이 肺癌 및 子宮癌 細胞에 대하여 濃度 依存的으로 殺傷效果가 나타남을 알 수 있었다.

鬱金の 癌細胞에 대한 殺傷 效果를 濃度變化에 따라 측정하기 위해서 trypan blue exclusion test를 이용하였다. Trypan blue exclusion test는 살아있는 細胞의 경우 trypan blue에 염색되지 않고 투명하게 보이며 죽은 細胞의 경우 파란색으로 염색되는 원리를 이용하여 현미경하에서 염색된 수를 세어 분석하는 방법이다.⁷ Trypan blue로 細胞 損傷의 정도를 측정한 결과, 檢液에 의해 細胞와 細胞核에 形態學的 變化를 보였던 A549, HeLa에서 檢液의 농도에 비례하여 細胞 殺傷 效果가 나타났고 반면에 細胞와 細胞核의 形態學的 變化를 거의 보이지 않았던 A172, PC3에서는 殺傷 效果가 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 鬱金은 藥物 처리 후 농도에 비례하여 통계적으로 의미 있는 殺傷 效果를 보였으나 鬱金の 癌細胞 殺傷 效果는 모든 細胞株에서 동일하게 나타나는 것이 아니라 肺癌, 子宮癌 細胞에서는 강한 殺傷 效果를 보이나 神經膠腫癌, 前立腺癌 細胞에서는 殺傷 效果가 미약한 것으로 보아 細胞特異성이 있음을 알 수 있었다.

癌細胞 增殖抑制 效果를 분석하기 위해서 癌細胞를 배양기에서 배양하면서 다양한 농도의 抗癌劑를 投與하여 細胞의 增殖 정도를 알 수 있는 MTT assay를 통하여 抑制 效果를 객관적으로 분석하였다. 본 실험에서 사용한 MTT assay는 cell의 viability를 측정하는 방법으로 1983년 Mosmann에 의해 처음 시도되었으며, 1986년 Cole

과 1988년 Alley등에 의해 사용되기 시작하여 최근 널리 보급되었다⁸. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 機質인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 非水溶性의 MTT formazan (3 (4,5 dimethylthiazol 2 yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 吸光度는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 吸光度는 살아있고 代謝가 왕성한 細胞의 농도를 반영한다.

본 실험의 결과 A549, HeLa의 경우 Optical density(O.D.)가 檢液의 농도에 비례하여 감소하여 통계적으로 有意性 있는 細胞 增殖抑制 效果를 보였다. HeLa의 경우 낮은 농도와 높은 농도인 5 μ g/ml, 10 μ g/ml에서도 통계적인 有意性이 관찰되나 A549의 경우 5 μ g/ml에서는 통계적 有意性은 없으나 10 μ g/ml에서는 細胞 增殖抑制 效果를 보였다. A172, PC3의 경우 O.D.값이 미미하게 감소되었으나, 細胞 增殖抑制 效果를 보이지 못했다. 이러한 결과는 tryphan blue exclusion의 결과와 일치하는 결과로서 肺癌, 子宮癌 細胞의 경우 鬱金에 반응하여 細胞 增殖抑制 效果를 보이면서 癌細胞에 殺傷 效果를 보임을 알 수 있었으며 鬱金에 의한 細胞 增殖抑制 效果 역시 細胞株 特異性을 보이는 것은 tryphan blue exclusion test의 결과와 일치하였다.

鬱金の 癌細胞에 대한 mitochondria 膜透過度 및 膜電位 變化에 대한 效果를 측정하기 위해서 檢液 10 μ g/ml를 사용하여 mitotracker의 염색여부를 관찰하였다. Mitochondria는 모양이나 크기가 매우 다양하지만 일반적으로 직경이 0.5-1.0 μ m, 길이가 7 μ m 정도인 顆粒狀이나 管狀을 이루고 있다. Mitochondria는 外膜과 內膜의 二重膜으로 되어 있으며, 外膜은 細胞質에 면해 있고, 內膜은 mitochondria 내부로 깊게 접혀져 주름진 형태의 크리스테(cristae)를 형성한다. 그 결과 內外膜에 의해 두 개의 구획으로 나누어지는데 하나는 內膜으로 둘러싸인 液體로 가득한 매트릭스(matrix)라

불리는 內部區劃으로 크리스테가 주름잡혀 돌출되어 있다. 다른 하나의 區劃은 두 膜 사이의 공간으로 膜間공간인 외부구획을 말한다. Mitochondria의 주된 기능은 酸素의 존재하에서 呼吸基質을 酸化시켜 에너지(ATP)를 生産하는 것으로 細胞의 종류에 따라 수천 개가 들어 있는 경우도 있다²². 또한 mitochondria의 膜系는 電子傳達係와 酸化的 磷酸化反應에 관계되는 여러 가지 酵素가 배열되어 있어서 ATP 생성이 효율적으로 이루어질 수 있게 되어 있다²³.

膜電位는 細胞外 電位를 기준으로 해서 細胞內 電位를 측정하는 것이다²⁴. Mitochondria의 膜電位 變化를 측정하는 방법은 여러 가지가 제시되고 있으나²⁵, 본 실험에서는 각 癌細胞株를 mitotracker로 염색 후 형광현미경과 flow cytometer를 사용하여 측정하였다. Mitochondria는 apoptosis나 細胞 壞死의 시작에 있어서 결정적인 役割者로서²⁶ 細胞質內로 cytochrome c를 방출함으로써 細胞를 不可逆的으로 죽음에 이르게 할 수 있다²⁷. 이 과정에 있어서의 주된 役割者는 MPTP(Mitochondria Permeability Transition Pore)인데, 이는 正常的인 代謝媒介에 관계된 蛋白質뿐만 아니라 apoptosis를 조절하는 蛋白質을 함유하고 있는 多蛋白 複合體²⁸로 1.5kDa이하의 分子에 대해서 透過性을 가지며, 基質內 Ca²⁺의 증가된 상황에서 mitochondria 內膜으로 열린다²⁶. 이 MPTP의 開放은 apoptosis를 유발하는 mitochondria 基質要素의 滲透壓의 膨脹을 야기하고 이어서 mitochondria 外膜이 파괴되어 cytochrome c의 非特異的 유출을 야기한다. 또한 mitochondria의 膜電位에도 영향을 줌으로써 cytochrome c의 非特異的 유출을 惹起하여 細胞死 滅을 유도한다고 알려져 있다²⁷. Mitochondria가 損傷을 입지 않고 온전한 상태에서는 mitotracker가 mitochondria 膜 사이로 들어가서 染色이 되지만 mitochondria가 損傷을 입어 膜電位가 변하게 되면 mitochondria 膜 사이로 들어갔던 mitotracker가 다시 흘러나와 損傷 여부에 따라 염색이 되지 않거

나 약하게 염색이 되어 현미경하에서 膜電位 損傷 여부를 확인할 수 있다.

이 실험의 결과 檢液의 투여 후 肺癌, 子宮癌의 경우 膜電位度가 감소함을 볼 수 있으나 細胞 增殖抑制 效果가 미미하였던 神經膠腫, 前立腺癌 細胞의 경우 膜電位度의 감소가 거의 없었다. 이러한 결과는 鬱金은 肺癌, 子宮癌에서 mitochondria의 損傷으로 膜電位度를 떨어뜨리고 細胞 增殖을 억제시키며 결국 細胞殺傷 效果를 나타내게 됨을 알 수 있었다.

鬱金の 癌細胞의 apoptosis 聯關 遺傳子 發顯에 미치는 效果를 측정하기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다. 細胞의 自己計劃 細胞死에는 여러 종류의 蛋白質 및 遺傳子가 관여하는데 대표적인 遺傳子로는 Bcl-2, Bax, Bcl-XL, fas, FAD, CPP32, Bak 등이 있다²⁹⁻³¹. 이들 遺傳子は 細胞의 죽음에 깊이 관여하고 있으며 한 예로서 Bcl-2 遺傳子의 경우에 이 遺傳子가 다량으로 표현될 경우 細胞는 여러 종류의 유해한 자극으로부터 강력하게 저항할 수 있는 능력을 얻게 된다. 腫瘍細胞가 이런 遺傳子의 發顯을 통해 抗癌劑의 공격으로부터 저항하면서 지속적으로 分裂·增殖할 수 있는 것이다. Bcl-2 遺傳子は B細胞 淋巴瘤 형성에서 발견되는 癌遺傳子로서 蛋白質 產物은 mitochondria 膜과 內形質世網 그리고 核膜에서 발현된다³². 현재 Bcl-2 계열 蛋白質은 크게 apoptosis를 유도하는 蛋白質과 apoptosis를 억제하는 蛋白質로 구분할 수 있다³³. 細胞 死滅을 유도하는 Bcl-2 系列蛋白質에는 Bax, Bid, Bcl-XL 등이 있으며 細胞 死滅을 억제하는 Bcl-2 系列蛋白質에는 Bcl-2, Bcl-XL 등이 있다. Bcl-2 蛋白質의 작용기전은 아직 확실히 밝혀져 있지 않지만 과도하게 發顯이 증가될 경우, 細胞에서 細胞 死滅을 차단하여 細胞가 오래 동안 죽지 않고 생존하게 함으로서 癌細胞로 이행할 수 있는 기회가 증가되어 결국 腫瘍이 發生하리라고 생각된다³⁴. 따라서 Bcl-2 遺傳子의 發顯은 腫瘍의 진행과도 밀접한 관계가 있어 이들이 과도

하게 發顯될 경우 患者의 豫候가 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 現在는 實驗室의으로 진행되고 있지만 Bcl-2의 發顯을 억제함으로써 腫瘍의 治療效果를 극대화시키려는 연구가 매우 활발히 진행되고 있는 바, 이들의 發顯에 영향을 미치는 抗癌劑의 개발 및 발굴은 매우 중요한 과정이라 할 수 있다. 이러한 측면에서 볼 때 이들 遺傳子의 과도한 發顯 및 發顯 억제는 癌細胞의 生存과 密接한 연관관이 있으며 抗癌劑가 이들 遺傳子의 發顯에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다³⁵⁻³⁷.

실험 결과 鬱金은 肺癌, 子宮癌 細胞에서 細胞를 보호해주는 Bcl-2 遺傳子를 檢液의 濃度에 비례하여 감소시키는 반면 細胞死를 일으키는 Bax 遺傳子는 농도에 비례하여 증가시키는 것을 알 수 있었다. 그러나 細胞 殺傷 效果가 미미했던 神經膠腫, 前立腺癌 細胞株의 경우 이들 遺傳子의 發顯은 鬱金에 대한 변화가 없었다.

鬱金の apoptosis 聯關 蛋白質 發顯에 미치는 效果를 측정하기 위하여 檢液 10 μ g/ml를 사용하여 이 細胞들로부터 蛋白質을 추출하여 Bcl-2, Bax에 대한 Western blot을 시행하였다. 이때 蛋白質들의 定量은 Tubulin을 이용하였는데 동일한 양의 tubulin band가 보인다는 것은 蛋白質 양이 동일하다는 뜻이며 동일한 양의 蛋白質에서 Western blot을 했을 때 Bcl-2, Bax蛋白質의 band 밝기가 서로 다르다면 이들 蛋白質에 증감이 있다는 것을 의미한다.

실험 결과, 肺癌과 子宮癌細胞에서는 遺傳子 수준에서 發顯이 감소했던 Bcl-2는 蛋白質 수준에서도 發顯이 감소하였고 Bax는 發顯이 증가하였다. 그러나 細胞 殺傷 效果가 미미했던 神經膠腫, 前立腺癌 細胞에서는 鬱金에 대한 이들 蛋白質의 發顯에 변화가 없었다. 이러한 결과로 鬱金이 蛋白質 수준에서도 癌細胞에 대해 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

이상의 成績을 종합해 볼 때 鬱金은 肺癌

(A549), 子宮癌(HeLa) 細胞株에 대해서 細胞損傷 자극으로부터 細胞 死滅을 유도하는 Bax 遺傳子를 증가시키고 細胞를 보호하는 Bcl-2 遺傳子를 감소시키며 mitochondria 膜電位를 떨어뜨리면서 細胞增殖抑制 效果를 가짐으로써 癌細胞를 殺傷하는 抗癌劑로서의 効능이 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나 神經膠腫(A172), 前立腺癌(PC3) 細胞株에서는 殺傷 效果가 미미한 것으로 보아 鬱금이 抗癌劑로서의 効능은 細胞特異性을 보인다는 것을 알게 되었으며 以後 더 많은 癌細胞株와 더 다양하고 심도있는 실험연구를 통하여 鬱金の 効능에 대한 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

鬱金は 肺癌 및 子宮癌에 대하여 선택적인 抗癌 效果를 나타내며, 抗癌劑로서의 効능은 細胞特異性을 보였다. 이것은 기초적인 실험적 연구로 향후 지속적인 연구를 통해 鬱金の 실제적인 抗癌效果가 밝혀지기를 기대한다.

參 考 文 獻

- Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004, p.17.
- 서울대학교의과대학편. 종양학. 제2전정판. 서울: 서울대학교출판부; 2001, p.141-88.
- 김동희, 김성훈. 항암제 부작용에 대한 한의용법. 대전대학교한의학연구소논문집. 1994;12(1):211-23.
- 최승훈. 한의학적 암치료에 대한 이해. 대한방사선종양학회지. 2002;20(부록):31-2.
- 曹裕旻, 柳逢夏, 金炳佑, 尹相協, 金珍成, 柳基遠. 鬱금이 胃癌細胞에 미치는 影響. 대한한방종양학회지. 2003;9(1):15-38.
- 成熙根, 崔昇勳, 安圭錫. 鬱금이 Angiogenesis 抑制機轉에 미치는 影響. 대한동의병리학회지. 1999;13(2):66-78.
- Jones JM, Anderson JW. Relative potencies of PAHs PCBs based on the response of human cells. Environmental Toxicology and Pharmacology. 1999;7:19-26.
- 정경석, 홍창걸, 문성하. MTT Assay를 이용한 위선암의 항암제 감수성 검사. 의과학회지 1995;49(4):479-83.
- Brail M. Ploster and Gary Fidkum. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. Journal of Neurochemistry. 2004; 90:1281-9.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J. 1999;341:233-49.
- Kim JY, Park JH. ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. FEBS Letters. 2003;549:94-8.
- Gupta S. HSP60, Bax, Apoptosis and the Heart. J. Cell. Mol Med. 2005;9(1):51-8.
- Douglas R. Green and John C. Reed. Mitochondria and Apoptosis. SCIENCE. 1998;281:28.
- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm-2 expression is induced by wild-type p53 activity. EMBO. 1993;12:461-8.
- Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci. USA. 1989;86(24):9717-21.
- Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth, PCR Methods and Applications. 1992;2:1-9.
- Fish B. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. Cancer. 1984;54:2609-17.
- Goodman GE, Yen YP, Cox TC, Crowley J.

- Effect of verapamil in vitro cytotoxicity and vinblastine in human tumor cell. *Cancer Res* 1987;47:2295.
19. 金聖勳. 韓醫學界의 癌研究動向과 研究, 戰略에 대한 研究. *대한한의학회지*, 1998;19(1):470-99.
 20. 강우석, 김정한, 박은주, 윤광로. 올금 에탄올 추출물의 항산화 활성 비교. *한국식품과학회지*. 1998;30(2):266-71.
 21. 朴涌基. 葛花와 鬱金 및 苦蔘의 抗酸化作用에 관한 比較研究. *大韓本草學會誌*. 2001;16(1):41-53.
 22. 권영명, 김훈수, 박순직, 이진범, 임옥빈, 현재선. 최신 일반생물학. 서울:교문사;2000, p.63.
 23. 생물교재편찬회 역. 존슨 생물학. 서울:탐구당;1990, p.29.
 24. 민병일. 최신생리학. 서울:신광출판사;2000, p.2-6.
 25. Anthony M, Ying H, Barbara KK, Alberto AB. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 2000;46:126-38.
 26. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*. 2002;84(2-3):153-66.
 27. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J*. 2002;16:607-9.
 28. Luigi R, Isabel M, Paola C, Santos AS, Naoufal Z, Patrice XP et al. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene*. 1999;18:2537-46.
 29. Kane SE, Pastan I, Gottesman MM. Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. *J. Bioenerg. Biomembr*. 1990;22:593-618.
 30. Kim JH, Takashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK et al. Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumor and cell lines. *J Natl Cancer Res*. 1991;83:938-43.
 31. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*. 1994;54:3391-5.
 32. 서정선. 20世紀末의 醫·生化學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, p.30-2.
 33. 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.
 34. Tsujimoto Y, Shimizu S. FEBS Bcl-2 family: life-or-death switch. *Lett* 2000;466:6-10.
 35. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF et al. Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 1999;457:217-36.
 36. Park CK, Manning JT, Battifora H, Medeiros LJ. Follicle center lymphoma and Warthin tumor involving the same anatomic site. Report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:113-9.
 37. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*. 1998;5:372-80.