

흰쥐의 종양에 대한 단삼 추출물의 항종양 활성

박현정¹ · 안상건² · 김정삼^{1*}

¹동신대학교 한의과대학 해부학교실

²조선대학교 치과대학 병리학교실

Antitumor Activity of *Salvia miltiorrhiza* Herbal Extract in Rat Tumor Model

Hyun Jeong Park¹, Sang Gun Ahn² and Jeong Sang Kim^{1*}

¹College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

²College of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract

The present study was carried out to investigate the antitumor activity of *Salvia miltiorrhiza* (SM) herbal extract in rat tumor model. We used a new tumor animal model for the invasion and metastasis of cancer using genetically k-ras-induced rat kidney cells (RK3E-ras). We observed tumor as early as 7 days after the injection of RK3E-ras cells in subcutaneous of Sprague-Dawley rats. All of the rats developed tumor mass at the inoculated site. After 7 days, the experimental groups were divided into two: saline control and injected with SM (200 mg/kg) groups. We investigated tumor's weight, size and hepatic metastasis of each group. Injection of SM herbal extract every other day for 14 days significantly inhibited tumor growth. Histologically, the tumors were undifferentiated carcinoma showing multifactorial necrosis and hemorrhage; also, the tumor invaded into hepatoportal region. Treatment with SM herbal extract caused significant inhibition of tumor cell proliferation. Our data showed that SM herbal extract is effective in controlling the tendency of tumor cell proliferation and metastasis by injection of RK3E-ras cells. These findings provided the potential value of SM as a novel antitumor agent candidate.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*, tumor, RK3E-ras cell, rat

서 론

암에 대한 치료법은 수술요법, 항암화학요법, 방사선요법, 면역요법 및 유전자요법 등이 알려져 있는데 그 중 사용빈도가 높은 화학요법과 방사선요법은 정상세포까지 독성을 나타내어 소화장애, 간장장애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역기능저하, 조혈장애, 유전자 손상 등의 부작용을 초래하고 있다(1,2).

한의학에서는 부작용을 감소시키면서 암세포에 대한 특이적 독성을 나타내는 항암제를 천연물질에서 개발하려는 연구동향으로 한방처방자체를 이용하여 항암효과 검증, 암전이 억제, 항암제 부작용 감소, 항암약물간의 상승작용 및 항암약침 개발 등의 실험연구가 시도되고 있다(3,4).

단삼은 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 허브종의 한가지로서, 그 뿌리털을 보통 단삼이라고 부르며, 심혈관 질환이나 월경주기 이상, 염증 억제를 위한 약제로서 인정받아왔다. 이 식물의 뿌리털에는 지용성 디터펜 퀴논 색소인 tan-shionones와 수용성페놀산인 로즈마리산의 두가지 화학물

질이 존재한다(5). 항암활성을 보이는 단삼의 효능을 입증한 연구로서 Sato 등(6)은 단삼 ether추출액에서 분리된 cryptotan shinone, tranhinone I, IIA 등의 작용을, Li 등(7)은 단삼에서 분리한 1,2,15,16-tetrahydrotanshiq-uinone과 RO-090680이 *in vivo*에서 P388백혈병 억제효과를, 성 등(8)이 단삼의 항암효과와 활성물질 분리, 남과 전(9)의 항암화학요법제로 유발된 세포독성에 미치는 단삼의 연구 및 최 등(10)의 단삼의 항암활성과 세포자멸사에 미치는 영향 등이 있다.

최근에는 항암치료방법의 개선을 위해 종양 동물 모델에 관한 관심이 증가하고 있다(11-14). Ras 유전자 돌연변이는 분자적으로 비정상적인 고형종 암을 일으킨다(15,16). Park 등(17)은 Ras 형질전환쥐의 피부암종이 강력한 발암물질 역할을 한다고 보고하였다. Kim 등(18)은 k-ras가 발현하는 RK3E-ras 세포주를 흰쥐에 주입하여 새로운 종양모델을 제시하였다.

이에 본 연구에서는 단삼의 항암활성효과를 실험적으로 비교평가하기 위해 성공적으로 확립된 k-ras가 발현하는 RK3E-ras 세포를 흰쥐에 주입하는 종양모델을 만들어 *in*

*Corresponding author. E-mail: jskim@dsu.ac.kr
Phone: 82-61-330-3512, Fax: 82-61-330-2900

*vivo*에서 단삼 추출물액을 고형 종양에 직접 주입하고 종양 세포의 변화를 육안적 및 조직학적 관찰을 통하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 생후 3주령(60±10 g)의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하며, 일반 고형사료(다물 사이언스)와 물을 충분히 공급하면서 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

RK3E-ras cell을 이용한 암전이 모델

Sprague-Dawley계 흰쥐에 종양을 유발시키기 위한 세포주는 RK3E-ras cell로 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)을 기본 배지로 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가하여 5% CO₂와 95% air 조건의 배양기에서 37°C를 유지하며 배양하였다. 실험적 암 전이 모델은 Kim 등(18)의 방법에 준하였다. *in vitro* 상에서 배양한 암 세포주 RK3E-ras cell을 FBS 제거 후 계대 배양하여 5×10⁷ cell/mL가 되도록 세포 현탁액을 만들어 흰쥐 오른쪽 옆구리 부위에 주사하였다. 암세포 주사 다음날부터 매일 육종 형성상태를 육안으로 확인한다.

단삼 추출물 제조

본 연구에 사용한 단삼은 동신대학교 한방병원에서 제공받아 약제 200 g을 증류수와 배합한 후 100°C에서 3시간동안 전탕한 후 찌꺼기는 따로 분리하고 전탕액을 증류, 냉각, 여과하여 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 0.45 µm 여과한 후 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정 거친 후 시료를 준비하였다.

실험군 설정 및 추출물 투여

RK3E-ras 세포를 주사 1주일 후 육종을 확인하고 대조군(saline control), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*, SM) 투여군의 2 그룹으로 분류하였다. 대조군은 멸균된 saline을 투여하고, 단삼추출물은 성인 하루 투여량을 기준으로 200 mg/kg 농도로 육종 부위에 48시간 간격으로 14일간 직접 투여하였다.

종양 관찰

암세포 주사 다음날부터 약 일주일 동안 매일 암 전이 상태를 관찰, 유발확인 1주 후 약물을 2주 동안 종양 부위에 직접 주사하였다. 약물 주사 직전을 1주로, 약물 주사 2주 후 개복하여 종양의 크기와 무게를 측정하였다. 종양 크기는 Carlsson 등(19)에 준하여 $V = \frac{ab^2}{2}$ (a: longest diameter, b: shortest diameter)로 측정하였다.

조직학적 관찰

흰쥐의 간조직과 암종을 적출하여 10%의 포르말린을 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 30, 50, 70, 80, 90, 95,

100I, 100II와 같이 알코올 농도를 상승시켜 탈수를 한 다음 xylene으로 투명화 과정을 거친 후 파라핀으로 포매하였다. 포매된 조직은 microtome을 사용하여 5 µm 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene으로 파라핀을 제거한 다음, 100%, 90%, 80% 알코올과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 흡수과정을 거치게 하였다. Hematoxylin과 eosin으로 이중 염색을 한 다음 탈수를 하였다. Canada balsam으로 봉합한 후 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

통계분석

모든 값은 평균±표준오차로 나타낸 것이며, 통계처리는 SAS(statistical analysis system, version 6.12) program에 의하여 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하고 unpaired t-test를 시행하며, 유의수준은 0.05이하인 경우로 한다.

결 과

육종의 중량

RK3E-ras 세포를 주사한 다음날부터 약 일주일 동안 매일 육종 형성 정도를 관찰하여 약 3 g의 육종을 확인한 후부터 추출물을 처치하였다. 처치 2주 후 도살하여 육종을 분리한 후 중량을 측정된 결과 생리식염수를 투여한 대조군은 종양이 매우 빠른 속도로 증식하여 중량(36±0.71 g)이 아주 높게 나타났다. 그러나 SM 추출물을 투여한 군에서는 약물 처치 시작일과 비교하여 중량(0.6±0.06 g)이 감소하였다 (Fig. 1).

육종의 크기

RK3E-ras 세포를 주사한 다음날부터 약 일주일 후 육종 형성을 확인하고 종양 크기를 측정된 결과 평균 5,461±

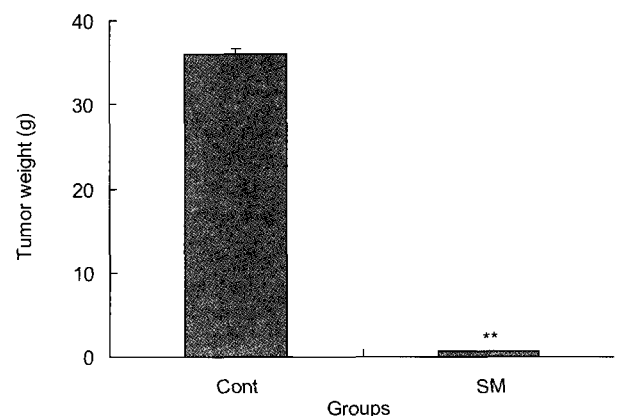


Fig. 1. Serial measurements of tumor weight in rat. Rats were sacrificed on day 14. Cont, control group injected with RK3E-ras cell. SM, injected with SM on the lumbar region (200 mg/kg/very other day). Mean±SEM (n=5); Prob> | T |, values in the 0.01.

1,378 mm³의 크기를 나타냈으며, 14일동안 saline만 투여한 대조군은 육종의 크기(39,563±1,770 mm³)가 계속 증가하였다. SM 추출물 투여군에서는 14일째에 현저하게 감소하여 크기(743±182 mm³)가 작았다(Fig. 2).

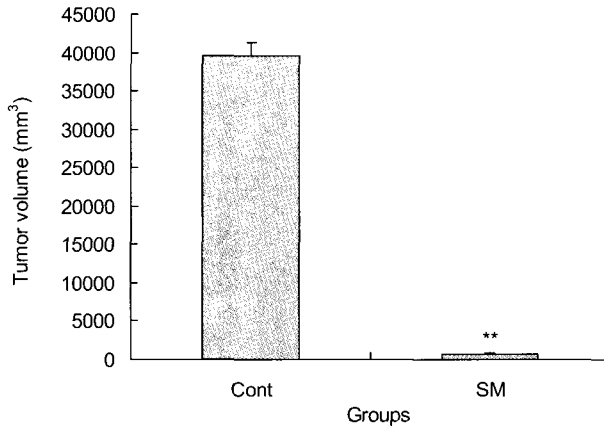


Fig. 2. Serial measurements of tumor formation in rat. Cont, control group injected with RK3E-ras cell. SM, injected with SM on the lumbar region (200 mg/kg/every other day). Mean±SEM (n=5); Prob> |T|, values in the 0.01.

종양의 육안적 관찰

RK3E-ras 세포를 흰쥐의 우측 요부에 접종한 1주 후부터 종양의 발달을 확인하고 단삼 추출물액을 종양 부위에 직접 주사하였으며, 2주 후 도살하여 피부를 제거하여 종양을 노출시킨 다음 관찰하였다. 그 결과 생리식염수를 투여한 대조군(Fig. 3A)과 매우 큰 종양이 관찰되었으며, 특히 생리식염수를 투여한 군에서는 육종의 일부가 괴사되어 있었다. SM 추출물(Fig. 3B)을 투여한 군에서는 추출물 투여 전에 비하여 종양의 크기가 감소하였다.

종양의 조직학적 관찰

RK3E-ras cell에 의하여 형성된 우측요부의 종양에 생리식염수를 주사한 대조군에서는 섬유막 층의 형성이 미약하였으며, 커다란 혈관을 비롯하여 직경이 작은 혈관들이 다수 관찰되었다. 종양에서는 매우 빠르게 분열하는 암세포들이 밀도가 높게 관찰되었으며, 종양부위에서는 괴사된 암세포들이 관찰되었다(Fig. 4A). SM을 투여한 군에서는 섬유막 층이 매우 뚜렷하게 관찰되었으며 혈관 구조는 거의 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 종양의 중앙부위 세포 밀도는 비교적 낮았다. 암세포의 분열 속도와 밀도 또한 대조군에 비하여 아주 낮게 관찰되었다(Fig. 4B).

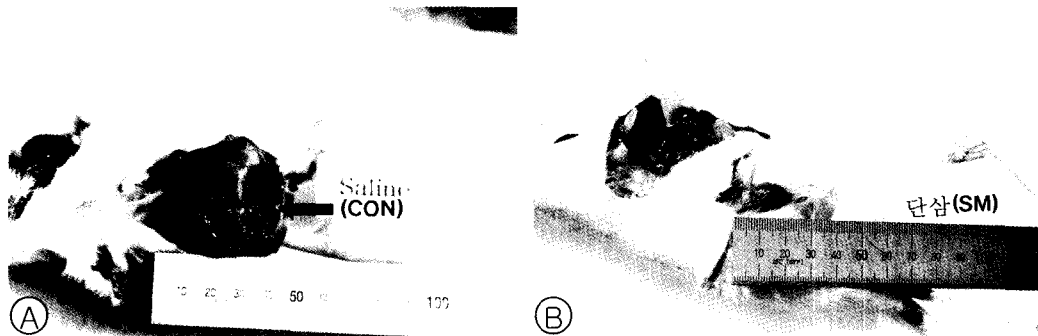


Fig. 3. Photographs of sarcoma from rats.

Solid tumor growth in RK3E-ras cell injected rats. Rats were sacrificed on day 14. (A) Gross appearance of tumors that developed on the flank of rat injected with saline control. (B) Appearance of tumor growth with SM. Con, control group injected with RK3E-ras cell. SM, injected with SM on the lumbar region (200 mg/kg/every other day).

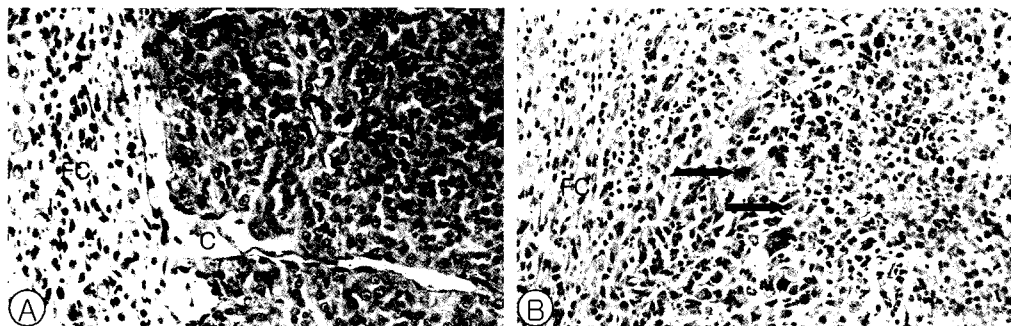


Fig. 4. Histological appearance of tumor from RK3E-ras cell injected rats.

RK3E-ras cells were inoculated on the subcutaneously on the right lumbar of rats and the rats were sacrificed on day 14. A, control group injected with RK3E-ras cell; B, injected with SM to the solid tumor (200 mg/kg/every other day). Arrows indicate cancer cells, C, capillary; FC, fibroblast cells. Hematoxylin-Eosin stain. Original magnification ×200.

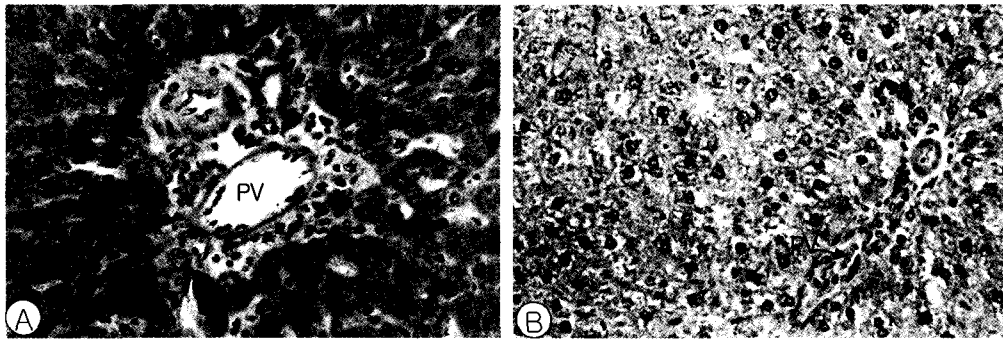


Fig. 5. Histological tumor invasion sections of liver of RK3E-ras cell injected rats.
 A, control group injected with RK3E-ras cell. B, injected with SM to the solid tumor (200 mg/kg/every other day). PV, portal vein. Hematoxylin-Eosin stain. Original magnification $\times 200$.

RK3E-ras 종양세포의 간 조직 전이

RK3E-ras cell에 의하여 형성된 종양 부위에 생리식염수 또는 추출물을 2주 동안 7회 투여한 다음 도살하여 간 조직을 절취하여 광학현미경 조직표본을 제작하였다. 대조군의 모든 조직들 특히 간문맥 가지 주변에 RK3E-ras 종양세포의 전이가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 5A). SM을 투여한 실험군에서는 간 조직의 극히 일부분에서 전이된 암세포를 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

고 찰

한의학에서의 암치료는 전신적인 상태와 국소적인 병소 변화에 입각하여 인체 면역력을 증가시켜 암세포의 성장을 억제하고 파괴하는 방법과 직접적으로 암을 살해하는 방법을 적절하게 배합하여 사용하고 있다(20). 하지만 양방의 항암요법치료보다 약하다고 할 수 있는데 양방의 항암요법이 가지고 있는 현저한 부작용을 고려할 때 부작용이 적은 한약재를 통하여 직접적으로 암세포를 공격하여 살상하는 항암 활성이 뛰어난 약재를 검색하여 항암치료에 활용하는 것이 필요하다(21).

단삼(*Salvia miltiorrhiza*)은 꿀풀과에 속한 다년생 본초인 단삼의 뿌리로서 한의학적으로 성미는 쓴·微寒하고 心, 心包, 肝에 귀경한다(22). 活血調經, 養血疎癰, 養血安神 등의 효능이 있어 月經不調, 血滯經閉, 產後腹痛, 癥瘕積聚, 腸癰腫痛, 心悸失眠 등의 병증을 치료한다(23,24).

Lee 등(25)은 단삼 ethyl ether층으로부터 column 크로마토그래피를 통해 분리된 항암활성물질을 분석한 결과, 이 물질은 C₁₉H₁₈O₃의 구조식을 가진 화합물로 분자량이 249 g인 transhione IIA로 보고하였으며, 세포독성효과측정에서는 모두 NCI protocol의 세포독성 평가기준인 4 μ g/mL 이하로 나타나 유효한 항암작용을 확인하였다.

암 치료연구에 관한 관심은 새로운 동물모델 연구로 발전하고 있다. 종양유도 Ras 단백질은 G 단백질의 GTP에 결합되어 다음 신호전달을 활성화하여 비정상적인 세포의 발달

에 관여한다. RK3E-ras cell은 흰쥐의 신장 세포에서 증식하는 종양 세포로 시험관 내에서 아테노바이러스와 함께 형질 변환을 통해 무한 증식하는 세포이다(26). RK3E-ras cell은 주로 상피세포에 존재하고 징크 핑거 단백질의 하나인 GLI 단백질과 G-단백질 군의 하나인 Ras 단백질에 의한 형질 변환을 통해 종양세포로 변화하는 특이성을 가지고 있다(27-29).

이에 저자는 단삼이 임상에서 광범위하게 암치료에 활용되기 위한 기초자료를 보강하기 위하여, 최근 Kim 등(18,30)이 보고한 대로 종특이성을 갖는 암전이 세포주인 RK3E-ras cell을 흰쥐의 우측 요부에 접종한 1주 후 종양 형성을 확인하고 단삼 약침액을 2주 동안 종양 부위에 직접 주사하고 도살하여 종양을 육안적으로 측정된 결과 대조군은 종양의 크기가 증가하였고, SM군에서는 약침 치료 전에 비하여 종양의 크기가 감소하였다.

암은 악성종양을 의미하며, 종양은 인체를 구성하는 정상세포가 자극에 의하여 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 형태학, 생물학, 화학, 번역학적 행동이 변한 변형세포가 무절제한 증식을 함으로써, 생체에서 정상성장조절을 받지 않고 무한정으로 증식하게 되는데 이때 암세포에서 DNA의 복제가 무한정 일어나게 된다(31).

종양 부위를 조직학적으로 분석한 결과 대조군의 종양 세포에서는 빠르게 분열하는 암세포들과 괴사된 조직들이 관찰되었다. SM 약침투여군은 육종의 크기에 비례하여 암세포의 분열 속도와 밀도 또한 대조군에 비해 아주 낮게 관찰되었다.

RK3E-ras 세포가 다른 조직 즉 간에 전이되는지 관찰한 결과 14일 후 대조군의 간 조직은 매우 큰 범위의 뚜렷한 암세포와 적혈구 침윤현상을 관찰할 수 있었고, 반면 SM군에서는 간 조직의 극히 일부분에서 전이된 암세포를 관찰할 수 있었다.

결과적으로 본 실험은 RK3E-ras 세포 주입으로 유도된 새로운 종양 동물모델에서 단삼 약침이 단기간내에 종양 형성 및 암전이 억제의 강력한 항종양 효과를 보여주었다. 추

후 다양한 동물실험을 통해 단삼의 항암물질로서 효능을 극대화하는 연구가 필요하며 단삼의 항종양 효과가 ras 단백질에 의한 형질변화를 통해서인지 근거를 제시하는 구체적인 기전연구가 필요하다고 사료된다.

요 약

흰쥐 우측요부에 RK3E-ras cell 주입으로 7일 이내에 종양이 발달하는 것을 관찰하고, 단삼 추출물을 제조하여 항종양 효과를 관찰하고자 1주 후부터 2주 동안 육종 부위에 투여 후 종양의 크기와 무게를 측정하고 조직학적인 관찰을 통하여 암세포의 발달과 암전이 유무를 살펴보았다. 암종의 크기는 대조군에 비하여 단삼 추출물을 투여한 실험군에서 현저히 감소($p < 0.01$)하였으며, 암종의 중량 또한 실험군에서 현저히 감소($p < 0.01$)하였다. 조직학적 관찰 결과 종양을 둘러싸고 있는 섬유막은 대조군에 비하여 실험군에서 발달해 있었으며, 암세포의 밀도는 실험군에 비하여 대조군에서 높았다. 간조직을 관찰한 결과 대조군의 간문맥 주변에서 전이된 것으로 보이는 암세포들이 다수 관찰되었다. 이와 같은 결과를 토대로 단삼 추출물이 항종양효과가 있다고 사료된다.

문 헌

- 대한병리학회. 2003. 병리학. 고문사, 서울. p 143.
- 서울대학교의과대학편. 2001. 종양학. 제 2 진정판. 서울대학교출판부, 서울. p141-88.
- 김성훈. 1998. 한의학계의 암 연구 동향과 연구 전략에 대한 연구. 대한한의학회지 191: 470-99.
- Kronenberg F, Mindes J, Jacobson JS. 2005. The future of complementary and alternative medicine for cancer. *Cancer Invest* 23: 420-426.
- Okamura N, Sato M, Yagi A. 1992. An application of HPLC for identification of abietane-type pigments from *Salvia miltiorrhiza* and their effects on post-hypoxic cardiac contractile force in rats. *Planta Med* 58: 571-573.
- Sato M, Sato T, Ose Y, Nagase H, Kito H, Sakai Y. 1992. Modulating effect of tanshinones on mutagenic activity of Trp-P.1 and benzo[a]pyrene in *Salmonella Typhimurium*. *Mutat Res* 265: 149-154.
- Li ZT, Yang BJ, Ma GE. 1991. Chemical studies of *Salvia miltiorrhiza*. *Yao Hsueh Pao* 23: 209-213.
- 성락기, 김성훈, 이권익. 1996. 丹蔘의 抗癌效果和 活性物質分離에 關한 研究. 동의병리학회지 10: 76-91.
- 남우열, 전병훈. 1997. MMC 등의 抗癌化學療法劑로 誘發된 細胞毒성에 미치는 丹蔘의 影響. 동의병리학회지 11: 113-117.
- 최선미, 최승훈, 안규석. 2000. 丹蔘의 抗癌活性和 apoptosis에 미치는 影響. 동의병리학회지 14: 22-47.
- Akla B, Monteil J, Sturtz F, Rigaud M. 2003. A new orthotopic model of human breast cancer immunocompetent rats. *Anticancer Res* 23: 3761-3766.
- Choy G, O'Connor S, Diehn FE, Costouros N, Alewanger HR, Choyke P, Libutti SK. 2003. Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *Biotechniques* 35: 1028-1030.
- Gould MN. 1995. Rodent models for the study of etiology, prevention and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 6: 147-152.
- Hutchinson JN, Muller WJ. 2000. Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* 19: 6130-6137.
- Barbacid M. 1987. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.
- Caulin C, Nguyen T, Longley MA, Zhou Z, Wang XJ, Roop DR. 2004. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res* 64: 5054-5058.
- Park CB, Fukamachi K, Takasuka N, Han BS, Kim CK, Hamaguchi T. 2004. Rapid induction of skin and mammary tumors in human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats by treatment with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene followed by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Sci* 95: 205-210.
- Kim SA, Kim YC, Kim SW, Lee SH, Min JJ, Ahn SG, Yoon JH. 2007. Antitumor activity of novel indirubin derivatives in rat tumor model. *Clin Cancer Res* 13: 253-239.
- Carlsson G, Gullberg B, Hafstrom L. 1983. Estimation of liver tumor volume using different formulas-an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 105: 20-23.
- 한국한의학연구원. 1998. 암예방 및 치료에 의한 한의학적 연구. 한국한의학연구원 연구보고서, 서울. p 2-98.
- 공현식, 유기원. 1999. 한국한의학의 종양연구에 대한 현황. 제4회 한중학술대회 발표논문집. 서울. p 3-37.
- 凌一揆. 1999. 中藥本草學. 보진신문사, 서울. p 485-6, 492-6.
- 신민교. 1997. 임상본초학. 영림사, 서울. p 519-21, 691-2, 731-2.
- 전국한의학대학 본초학교수 공편. 1998. 본초학. 영림사, 서울. p 413-4, 419-21.
- Lee KI, Kim SH, Seong RK. 1996. Study on antitumor effect of *Salvia miltiorrhiza* radix and isolation of active compound. *Korean J Oriental Medical Pathology* 10: 76-91.
- Foster KW, Rens S, Louro ID, Lobo-Ruppert SM, Mckie-Bell P, Grizzle W, Hayes MR, Broker TR, Chow LT, Ruppert JM. 1999. Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GKLf. *Cell Growth Differ* 10: 423-434.
- Ruppert JM, Vogelstein B, Kinzler KW. 1991. The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A. *Mol Cell Biol* 11: 1724-1728.
- Torrance CJ, Agrawal V, Vogelstein B, Kinzler KW. 2001. Use of isogenic human cancer cells for high-throughput screening and drug discovery. *Nat Biotechnol* 19: 940-945.
- Chapman K, Hall DJ. 2005. Quantifying the activation of the small molecular weight G-protein ras. *Biochem Molec Biol Educ* 33: 22-27.
- Kim SA, Kim HW, Kim DG, Lee SG, Park JC, Kang DW, Kim SW, Ahn SG, Yoon JH. 2007. Rapid induction of malignant tumor in Sprague-Dawley rats by injection of RK3E-ras cells. *Cancer Lett* 235: 53-59.
- 서정선. 1998. 20세기말의 의·생물학의 새로운 비전, apoptosis·몸의 효율적 생존을 위한 세포의 능동적 사망기전. 의학연구의 최신동향. 서울. p 30-32.

(2007년 1월 12일 접수; 2007년 2월 20일 채택)