

茵陳의 에탄올 추출물이 담도암 세포주 SNU-1196의 apoptosis에 미치는 효과에 관한 연구

이경욱, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Study on the Pro-apoptotic Effect of *Artemisiae Capillaris Herba* Extracted with Ethanol on Biliary Tract Cancer Cell Line, SNU-1196

Kyung-wook Lee, Hong-jung Woo
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to elucidate the pro-apoptotic effect of *Artemisiae capillaris herba* extracted with ethanol on biliary tract cancer cells.

Materials and Methods : The biliary tract cancer cell line SNU-1196 was used in this study. Cells were treated with different concentrations of *Artemisiae capillaris herba* for 24, 48 and 72 hours. After the treatment, cell viability, apoptosis, caspase activities and the mRNA expressions of the Bcl-2, Bax, P53, and P21 were measured by using MTT assay, cell cycle analysis, apoptosis assay, and RT-PCR. The cell cycle analysis was done by flow cytometry and apoptosis assay by cell death detection ELISA kit.

Results : *Artemisiae capillaris herba* inhibited proliferation of SNU-1196 in long-time culture group with dose-dependent manner. All cells treated with *Artemisiae capillaris herba* showed increased apoptosis with dose- and time-dependent manner. Exposure of SNU-1196 to *Artemisiae capillaris herba* induced caspase-3 activation. However, apoptosis was blocked when SNU-1196 was treated together with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK and the caspase-3 inhibitor Z-DEVE-FMK. After the treatment of *Artemisiae capillaris herba*, the mRNA expressions of caspase -3, -8, -9, p53, and p21 was increased in all cells. *Artemisiae capillaris herba* resulted in a significant decrease in Bcl-2 and an increase in Bax mRNA levels.

Conclusions : These results suggest that *Artemisiae capillaris herba* would be beneficial in the treatment of biliary tract cancer.

Key words : *Artemisiae capillaris herba*, biliary tract cancer, apoptosis

1. 緒 論

담도암은 담관의 상피를 닮은 세포로 구성된 종양으로 그 위치에 따라 간내 담관암과 간의 담관

암으로 나눈다. 초기에는 암을 의심할 만한 특이적 증상이 없기 때문에 조기 진단이 어렵고, 발견 당시에는 이미 진행이 된 경우가 많아서 예후가 불량한 편이다¹. 2012년에 발표한 국내 암발생 통계에 의하면, 2009년 우리나라 전체 암 중에서 담낭 및 기타 담도계암이 차지하는 비율은 남자 2.4%, 여자 2.6%이며, 발생빈도는 인구 10만명 당 9.6명으로 최근까지 꾸준히 증가하는 추세이다².

· 교신저자: 우홍정 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120
E-mail: hjwoo@khu.ac.kr

담도암의 유일한 완치방법은 수술을 통한 근치적 절제이다. 암세포가 대부분 주변부 간동맥, 간문맥 등으로 침범하여 진행되는 경우가 많기 때문에 근치적 절제가 쉽지 않고, 절제를 한 후에도 재발이 잦은 편이다¹. 또한 항암화학요법과 방사선치료, 광역학치료, 표적치료 및 기타 다각적 치료방법을 통한 많은 치료가 이루어지고 있지만 아직까지는 이들 효과에 대하여 충분한 검증이 필요하며^{3,4}, 담도암 치료 및 생존율 향상을 위한 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

茵陳은 淸熱利濕의 효과가 있어, 임상에서 바이러스성 간질환을 비롯한 간담질환의 치료에 광범위하게 사용되는 약재이다⁵.茵陳에 대한 연구는 항종양효과⁶, 항미생물활성효과⁷, 간섬유화 억제⁸, 소염진통효과⁹, 항진균효과¹⁰, 간세포활성증가¹¹ 등이 보고된바 있다. 그러나 담도암과 관련한茵陳의 항암효과는 아직까지 보고된 적은 없다.

저자는 본 연구를 통하여 한국인 담도암 환자로부터 확립한 암세포주를 대상으로茵陳의 에탄올 추출물을 처리하여 항암효과에 대한 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

II. 方法

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한茵陳(*Artemisiae capillaris herba*)은 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹²에 근거하여 엄선한 것을 경희대학교 한방병원에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2) 검액의 조제

茵陳 100 g을 80% 에탄올 수용액 1 L에 냉침하여 4 °C에서 추출하였으며, 매 3시간마다 분광기로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 변화량이 둔화되어 변화량이 5% 미만으로 되었을 때 완료된 것으로 간주하였으며 48시간 정도 소요되었다. 추출액은 Whatman 여과지로 여과한 후 감압농축 하였다.

농축할 때, 용매가 완전히 제거되기 전에 증류수를 첨가하여 얼린 다음 동결건조하여 12 g의 분말을 얻었다(수득율은 12 %). 얻어진 동결건조 분말은 -80 °C 냉동고에 보관하였고, 약재를 처리할 때에는 dimethylsulfoxide(DMSO)(Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA)에 용해시킨 후 0.2 μm syringe filter로 여과하고 RPMI 1640 배양액에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 세포 배양 및 시약

사람 담도암 세포주 SNU-1196를 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 세포배양액은 RPMI 1640에 10% FBS, 1% penicillin/sterptomycin를 첨가하여 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ 상태를 유지하는 배양기에서 배양하였다.

2. 방 법

1) 세포증식 분석

세포활성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석 kit인 CellTiter 96 AQueous One solution(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 세포를 1×10⁴ cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하고 검액을 각각 0, 50, 100, 200, 300, 500 μg/ml의 농도로 처리한 후 각각 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 세포 활성은 PMS/MTS solution을 이용하여 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2) 세포 주기 분석

茵陳 추출물이 담도암 세포주의 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 cell cycle analysis를 시행하여 세포주기를 측정하였다. 6-well plate에 SNU-1196 세포를 5×10⁵ cells/ml의 농도로 분주 후茵陳 추출물을 농도별로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 그리고 계속해서 PBS 0.3 ml에 세포 침전물을 부유시키고 100% 에탄올 0.7 ml를 가하여 4 °C에서 1시간 이상 고정시켰다. 그 후 세포 혼합물을 10 μl의 RNase A(10 mg/ml)를 첨가하여 37 °C에서 1시

간 동안 반응시키고, 계속해서 20 μ l의 propidium iodide(1 mg/ml)로 염색하여 FACSCalibur(Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 세포 주기를 측정하였다.

3) 세포자멸 분석

茵陳 추출물에 의한 담도암 세포주의 세포자멸을 관찰하기 위해 Cell death detection ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하였다. 96-well plate에 세포를 각각 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 세포를 부착시킨 후茵陳 추출물을 각각 0, 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리한 후 24, 48시간 동안 배양하였다. 그런 후 상층액을 제거하고 0.2 ml 용해완충액(lysis buffer)을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켜 세포를 용해시키고, 200 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 20 μ l 세포용해물 안에 존재하는 자멸세포들은 제조사의 지시에 따라 ELISA kit를 이용하여 DNA 분절화를 분석하였으며, 분광기의 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Caspase 활성화도 측정

茵陳에 의한 담도암 세포주의 세포사유도 연관성을 관찰하기 위해 Caspase colorimetric assay kit를 사용하여 intracellular caspase-3 활성화 증가 여부를 확인하였다. 세포를 100 mm 조직 배양 접시에 2×10^6 cells 농도로 분주하여 24시간 배양하여 세포를 부착시키고, 검액을 여러 농도로 처리한 후 trypsin-EDTA로 세포를 떼어 수거하여 세포 수를 계산하였다. 그런 다음 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포 침전물을 PBS로 재 부유하여 1.5 ml 시험관에 옮긴 다음 10,000 xg에 5분간 원심분리하고 상층액을 버렸다. 세포 침전물은 1×10^6 농도의 세포에 25 μ l의 세포 용해액을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 용해시켰다. 그런 다음 10,000 xg에서 1분간 원심 분리하여 상층액에 포함된 단백질을 새로운 1.5 ml 시험관에 보관하였다. 이렇게 얻은 단백질의 농도는 570 nm 흡광도에서 BCA 측정 방법으로 측정하였다. Caspase activity 분석은 colorimetric

assay(R & D System, Inc. Minneapolis, MN, USA)의 방법으로 시행하였다. 96 well plate에 200 μ g 단백질이 포함된 검액을 50 μ l의 용량이 되도록 조절하여 분주 하였다. 여기에 다시 1 mM DTT가 포함된 2 x incubation 용액을 50 μ l씩 넣고, caspase-3, -8, -9 colorimetric substrate를 각각 5 μ l씩 첨가하여 2시간 반응시켰다. 분광기(E-max)를 이용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

5) Caspase inhibitor를 투여한 후 세포 증식을 측정

96 well plate에 SNU-1196 세포를 1×10^4 cells의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 다음, 50 μ l의 caspase inhibitors를 포함하는 배지로 교환하였다. 100 μ l의 세포배양 중 pan-caspase inhibitor인 Z-VAD-FMK 혹은 caspase-3-specific inhibitor인 Z-DEVD-FMK의 농도는 각각 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M 이 되도록 첨가하였으며, 2시간동안 pre-incubation 하였다. 그런 다음茵陳 추출물 50 μ l(최종 농도 300 μ g/ml)를 혼합하여 72시간 동안 반응시켰다. 세포활성은 MTT assay와 동일한 방법으로 측정하였다.

6) 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

(1) RNA 추출

6-well plate에 SNU-1196 세포주를 분주하고 각 plate에茵陳 추출물을 0, 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 72시간 후 Qiagen사의 RNeasy Mini Plus Kit를 이용하여 제작사의 방법에 따라 RNA를 분리하였다.

(2) Complementary DNA(cDNA) 합성

실험에 필요한 cDNA는 Fermentas사의 RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit를 사용하여 제작사의 지시에 따라 시행하였다. 1 μ g의 RNA와 1 μ l의 random primer를 포함하는 시료에 DEPC-처리된 증류수를 가하여 12 μ l 되게 조정한 다음 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 5분간 얼음에 두었다. 그런 다음 4 μ l의 5 \times reaction buffer(250 μ M Tris-HCL, pH 8.3), 1 μ l의 RiboLockTM RNase Inhibitor(200 U/ μ l),

2µl의 10µM deoxynucleoside triphosphate(dNTP) MIX, 1 µl의 RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 U/µl)를 넣고 전체 볼륨을 20 µl 되게 조정하여 잘 섞어주었다. 반응조건은 25 °C에서 5분간, 42 °C에서 60분간, 70 °C에서 5분간으로 하여 반응시켰다. 합성된 cDNA는 -80 °C에서 보관하였으며 필요할 때마다 꺼내서 사용하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로 β-actin을 사용하였으며, target gene은 Bcl-2, Bax, p53, p21, caspase-3, caspase-8, caspase-9 등을 선택하였다. Primer 합성은 Bioneer(대전시 대덕구 문평동, 한국)에 의뢰하여 제작하였다.

Table 1. Primer Sequences for PCR.

Genes	Primer sequence	Size (bp)	GeneBank
Bcl-2	5'-GAT TGA TGG GAT CGT TGC CTT A-3' 5'-CCT TGG CAT GAG ATG CAG GA-3'	200	NM000657
Bax	5'-GGA TGC GTC CAC CAA GAA G-3' 5'-GCC TTG AGC ACC AGT TTG C-3'	216	NM138764
P53	5'-AAC AAC ACC AGC TCC TCT CC-3' 5'-CTC ATT CAG CTC TCG GAA CA-3'	111	NM000546
p21WAF1/CIP1	5'-CAG ACC AGC ATG ACA GAT TTC-3' 5'-TTA GGG CTT CCT CTT GGA GA-3'	66	NM078467
Caspase-3	5'-CAG TGG AGG CCG ACT TCT TG-3' 5'-TGG CAC AAA GCG ACT GGA T-3'	102	NM004346
Caspase-8	5'-GGA TGG CCA CTG TGA ATA ACT G-3' 5'-TCG AGG ACA TCG CTC TCT CA-3'	101	NM001228
Caspase-9	5'-TGT CCT ACT CTA CTT TCC CAG GTT TT-3' 5'-GTG AGC CCA CTG CTC AAA GAT-3'	101	BC002452
β-actin	5'-GCG AGA AGA TGA CCC AGA TC-3' 5'-GGA TAG CAC AGC CTG GAT AG-3'	77	NM001101

(4) RT-PCR

PCR은 Applied Biosystem사(CA, USA)의 StepOnePlus RT PCR System을 사용하여 제작사의 지시에 따라 시행하였다. 즉, 10 µl의 2×SYBR Green PCR Master Mix, 1 µl의 cDNA, 1 µl의 primer(sense), 1 µl의 primer(anti-sense), 7 µl의 Distilled water를 넣어 전체 볼륨을 20 µl로 조정하였다. PCR 조건은 초기변성(denaturation)은 첫 cycle은 95 °C에서 3분간, 이후에는 95 °C에서 10초, 풀림(annealing)은 60 °C에서 10초간, 연장(extension)은 72 °C에서 15초간으로 하여 증폭시켰다. House keeping gene으로는 β-actin을 사용하였으며, 발현

된 유전자의 상대적인 값을 정량적으로 표현하였다.

7) 통계분석

모든 데이터는 평균±표준편차로써 표기하였고, 엑셀 프로그램의 Student's t-test를 이용하여 실험군과 대조군의 차이를 비교하였으며, P<0.05을 기준으로 통계적 유의성을 평가하였다.

III. 結果

1.茵陳 추출물이 담도암세포주 세포증식에 미치는 영향
茵陳 추출물을 50, 100, 200, 300, 500 µg/ml의 농도로 투여하여 24, 48, 72시간까지 배양한 결과 72

시간 배양하였을 때, 농도 의존적으로 세포증식이 억제되는 경향이 었다. 특히 300, 500 µg/ml의 농도로 투여하였을 때 통계적으로 유의성 있는 결과를 얻었다.

SNU-1196은 24시간 배양 결과 50, 100, 200, 300, 500 µg/ml의 농도에서 각각 89.96±15.62%, 91.08±13.34%,

102.70±21.81%, 108.39±26.95%, 138.10±26.86%였다.

48시간에서는 각각 102.64±12.10%, 128.64±17.54%, 103.28±18.89%, 99.23±17.57%, 110.13±26.44%였다.

72시간에서는 각각 93.52±14.63%, 100.75±21.39%, 74.81±23.00%, 48.74±17.19%, 25.17±10.60%였다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effects of INJIN Concentration on Cell Viability of SNU-1196.

	0	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml	500 µg/ml
24 h	100	89.96±15.62	91.08±13.34	102.70±21.81	108.39±26.95	138.10±26.86
48 h	100	102.64±12.10	128.64±17.54	103.28±18.89	99.23±17.57	110.13±26.44
72 h	100	93.52±14.63	100.75±21.39	74.81±23.00	48.74±17.19*	25.17±10.60*

Values represent Mean±SD.

* : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test(*P*<0.05).

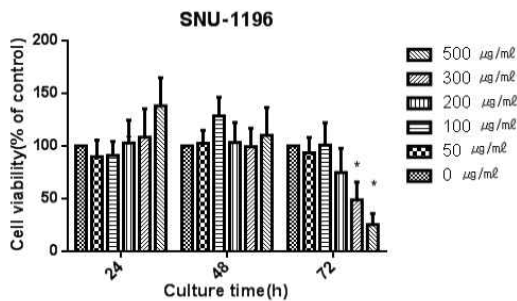


Fig. 1. Effects of INJIN concentration on cell viability of biliary tract cancer cells.

biliary tract cancer cells were treated with various concentrations of INJIN (0-500 µg/ml) for 24, 48, and 72 h. Cell viability was determined by the MTT assay. The data represent the Mean±SD of triplicate samples. **P*<0.05 compared to control.

2.茵蔯 추출물이 담도암세포주 세포주기에 미치는 영향

SNU-1196 세포주에茵蔯추출물을 100, 200, 300 µg/ml의 농도로 투여하여 세포주기 분석 결과 세포자멸 분석은 각각 5.29%, 6.02%, 6.86%로 나타나 대조군의 3.76%와 차이를 보였다. G0/G1 분석은 대조군에서 28.56%였던 것에 비해 100, 200, 300 µg/ml의 농도로茵蔯추출물을 투여한 후에는 27.32%,

22.54%, 38.31%로 세포 분열 과정을 억제하는 경향을 나타냈다(Fig. 2).

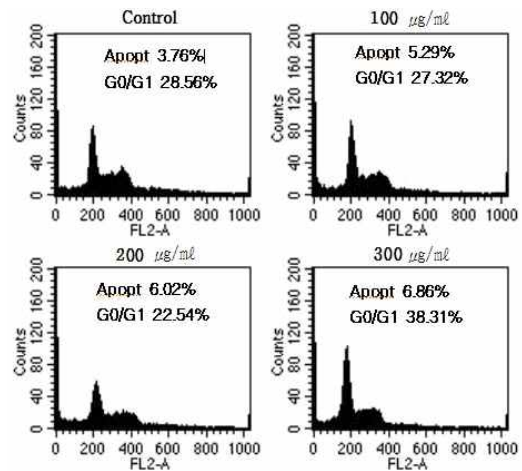


Fig. 2. Effects of INJIN concentration on cell cycle progression in biliary tract cancer cells.

Biliary tract cancer cells were cultured with various concentrations of INJIN (0-300 µg/ml) for 48 hours. Cells were harvested, treated with RNAsin and stained with propidium iodide. The DNA content was analyzed by flow cytometry. The indicated percentages are of the cells in apoptosis and G0/G1 phases.

3.茵陳 추출물이 담도암세포주 세포자멸에 미치는 영향

100, 200, 300 µg/ml茵陳 추출물을 투여한 후 24, 48, 72시간 동안 배양한 결과 SNU-1196 각 세포주에서 세포자멸 효과를 측정된 결과 시간 및 농도가 증가함에 따라 세포자멸 효과가 유의하게

증가하였다.

24시간 배양 결과 100, 200, 300 µg/ml의 농도에서 각각 2.125±0.437, 3.412±0.351, 4.119±0.413였으며, 48시간에서는 각각 2.982±0.176, 4.279±0.632, 5.924±0.328 이었다. 또한 72시간에서는 각각 5.091±0.646, 6.391±0.331, 9.933±0.351 이었다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effects of INJIN Concentration on the Apoptosis in SNU-1196.

time (hour) \ concentration	0 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml
24	1.000±0.107	2.125±0.437*	3.412±0.351**	4.119±0.413**
48	1.401±0.161	2.982±0.176**	4.279±0.632*	5.924±0.328**
72	4.398±0.132	5.091±0.646	6.391±0.331**	9.933±0.351**

Values represent Mean±SD.

* : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test ($P<0.05$) ** : ($P<0.01$)

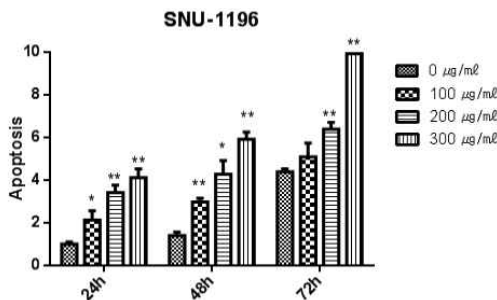


Fig. 3. Effects of INJIN concentration on the apoptosis in biliary tract cancer cells.

Biliary tract cancer cells were cultured with various concentrations of INJIN (0-300 µg/ml) for 24, 48 and 72 hours. Apoptotic cells were measured using a cell death detection ELISA. The data represent the Mean±SD of triplicate samples. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ compared to control.

4.茵陳 추출물에 의한 Caspase mRNA 발현의 변화

100, 200, 300 µg/ml茵陳 추출물을 투여한 후 SNU-1196 세포주에서 Caspase 3, 8, 9의 mRNA의 발현을 측정된 결과, Caspase 3, 8, 9의 유전자 발현이 모두 농도에 따라 유의하게 증가하는 경향을

보였다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Effects of INJIN Concentration on the Expression of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 in SNU-1196.

	0	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml
caspase-3	1.000 ±0.000	1.019 ±0.263	1.368 ±0.033**	1.523 ±0.030**
caspase-8	1.000 ±0.000	1.050 ±0.001**	1.130 ±0.009**	1.220 ±0.011**
caspase-9	1.000 ±0.000	1.028 ±0.049	1.425 ±0.038**	1.559 ±0.062**

Values represent Mean±SD.

* : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test ($P<0.05$) ** : ($P<0.01$)

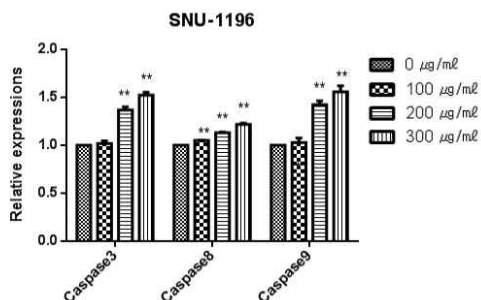


Fig. 4. Effects of INJIN Concentration on the Expression of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 mRNA in biliary tract cancer cells.

Cells were cultured with 0, 100, 200, 300 µg/ml INJIN concentration for 72hours and mRNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 with β-actin was applied to the formula, 2⁻(targetgene-β actin),

and relative amounts were quantified. The data represent the mean ±SD of triplicate samples and are reported as the ratio of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 to β-actin signals. **P*0.05 and ***P*0.01 compared to control.

5. Caspase inhibitor가 茵陳 추출물 처리 후의 세포활성에 미치는 영향

SNU-1196 세포주에 300 µg/ml 茵陳 추출물을 투여한 후, pan caspase inhibitor와 caspase-3 inhibitor를 각각 10, 20, 50, 100 µM씩 처리하여 세포활성을 측정한 결과, pan caspase inhibitor 처리 농도에 따라 세포활성이 대체로 증가하는 경향을 보였다. 또한 caspase-3 inhibitor 처리 농도에 따라 세포활성이 유의하게 증가하는 경향을 보였다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effects of caspase inhibitors on INJIN-treated cell viability.

Control	0.494±0.142
INJIN 300 µg/ml	0.364±0.040*
Pan caspase inhibitor 10 µM+INJIN 300 µg/ml	0.429±0.008
Pan caspase inhibitor 25 µM+INJIN 300 µg/ml	0.458±0.014
Pan caspase inhibitor 50 µM+INJIN 300 µg/ml	0.454±0.011
Pan caspase inhibitor 100 µM+INJIN 300 µg/ml	0.456±0.038
Caspase-3 inhibitor 10 µM+INJIN 300 µg/ml	0.378±0.011
Caspase-3 inhibitor 25 µM+INJIN 300 µg/ml	0.396±0.014*
Caspase-3 inhibitor 50 µM+INJIN 300 µg/ml	0.451±0.043*
Caspase-3 inhibitor 100 µM+INJIN 300 µg/ml	0.441±0.035

Values represent Mean±SD.

* : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test

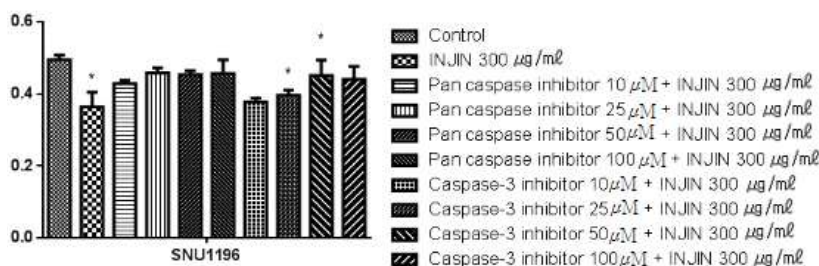


Fig. 5. Effects of caspase inhibitors on INJIN-treated cell viability.

Cell were treated with INJIN (500 µg/ml) in the presence or absence of Z-VAD-FMK (10-100 µM) or Z-DEVD-FMK (10-100 µM) for 72 hours. Cell viability was measured using the MTT assay. The data represent the mean±SD of triplicate samples. * *P*0.05 compared to control.

6.茵陳 추출물에 의한 Bcl-2, Bax mRNA 발현의 변화

SNU-1196 세포주에 100, 200, 300 µg/ml茵陳 추출물을 투여 한 후 Bcl-2, Bax gene mRNA의 발

현을 관찰한 결과, 200 µg/ml 투여 했을 때 Bax gene mRNA 발현이 유의하게 증가하였으며, 300 µg/ml 투여 했을 때 Bcl-2 유전자 발현이 유의하게 감소하였다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Effects of INJIN Concentration on the Expression of Pro- and Anti-apoptotic mRNAs in biliary tract cancer Cells.

SNU-1196	Bax mRNA-INJIN concentration (µg/ml)				Bcl-2 mRNA-INJIN concentration (µg/ml)			
	0	100	200	300	0	100	200	300
	1.000	1.078±0.292	1.249±0.089*	0.917±0.061	1.000	0.784±0.180	1.034±0.738	0.351±0.078**

Values represent Mean±SD. * : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test (P<0.05) ** : (P<0.01)

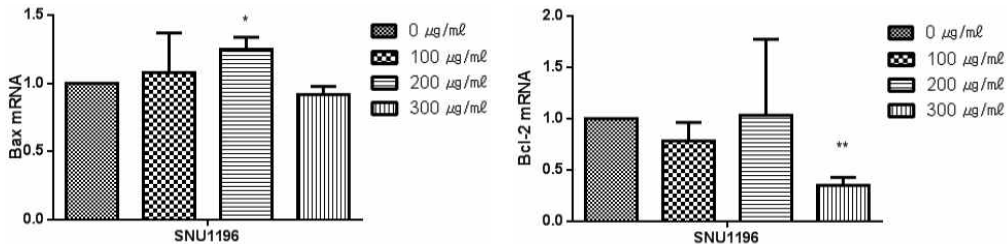


Fig. 6. Effects of INJIN concentration on the expression of pro- and anti-apoptotic mRNAs in biliary tract cancer cells.

Cells were cultured with 0, 100, 200, 300 µg/ml INJIN concentration for 72hours and mRNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of Bcl-2, Bax with β-actin was applied to the formula, 2⁻(targetgene-β actin), and relative amounts were quantified. The data represent the mean±SD of triplicate samples.

*P<0.05 and **P<0.01 compared to control.

7.茵陳 추출물에 의한 p53, p21 mRNA 발현의 변화
각 세포주에 100, 200, 300 µg/ml茵陳 추출물을 투여 한 후 p53, p21의 발현을 관찰한 결과, p53은

200 µg/ml을 투여 했을 때 발현이 유의하게 증가하였으며, p21은 200, 300 µg/ml을 투여 했을 때 발현이 유의하게 증가하였다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Effects of INJIN Concentration on the Expression of p53 and p21 in biliary tract cancer Cells.

SNU-1196	p53 INJIN concentration (µg/ml)				p21 INJIN concentration (µg/ml)			
	0	100	200	300	0	100	200	300
	1.000	1.308±0.395	1.504±0.150*	0.802±0.063*	1.000	1.475±0.454	1.633±0.107**	1.505±0.195*

Values represent Mean±SD. * : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test (P<0.05) ** : (P<0.01)

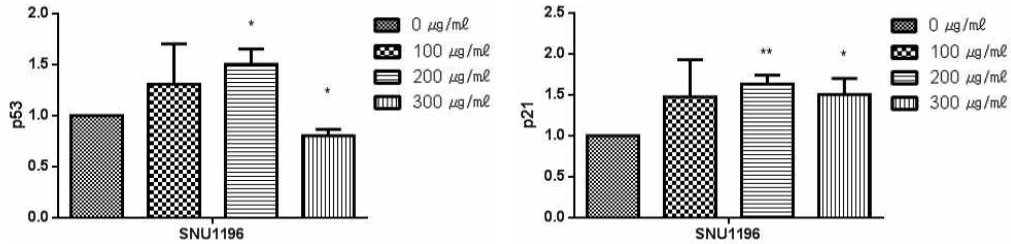


Fig. 7. Effects of INJIN concentration on the expression of p53 and p21 in biliary tract cancer cells.

Cells were cultured with 0, 100, 200, 300 µg/ml INJIN concentration for 72hours and mRNA levels were measured by RT-PCR. The crossing point of p53, p21 with β-actin was applied to the formula, 2^{-(targetgene-β actin)}, and relative amounts were quantified. The data represent the mean±SD of three independent samples. *P<0.05 and **P<0.01 compared to control.

IV. 考 察

담낭암 및 담도계암은 발생 초기에는 특이증상이 없기 때문에, 진단 당시에 이미 주변 장기로 침습된 경우가 많아서 근치적 절제가 쉽지 않다. 또한 수술 후에도 재발이 흔한 질환이다. 근치적 절제술을 시행한 후 여러 약물을 통한 보조항암화학요법이 시행되고 있지만, 아직까지 표준요법으로 권장되는 방법은 없으며, 이에 대하여 좀 더 연구가 필요한 실정이다^{13,14}.

담낭암 및 담도계암에 관련하여 한의학적 치료 방법을 통해 호전된 증례가 보고된 바 있으며¹⁵⁻¹⁷, 앞으로도 담도암에 대한 다양한 한의학적 접근과 치료효과에 대한 연구가 보다 더 필요한 상황이다.

茵陳은 국화와 다년생 초본인 사철쑥의 쏜대를 건조한 것으로, 清利濕熱, 退黃疸하는 효능이 있어 황달을 비롯한 간염, 담낭염 등의 다양한 간담계질환에 아주 널리 쓰이고 있으며⁵, 관절조직 및 동물에서의 소염진통작용이 있는 것으로 알려져 있고⁹, 고지방식으로 유도된 비만에 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁸. 국내의 논문에서茵陳의 항암효과에 대하여 연구된 바 있으며^{6,19}, 간암세포에도 유의한 항종양효과가 있음이 발표되었다²⁰. 기존의茵陳과 관련된 간암세포주에 대한 연구로는 인진오령산²¹, 인진청간탕²², 인진호탕²³ 등의 연구가 있으며,茵陳

의 간암세포에 대한 항암활성과 항암제와의 상승작용²⁴, 간암주에 대한 인진분획의 항암작용⁶에 대한 연구 등이 있다. 하지만 담도암에 대한 인진의 항암작용을 밝힌 연구는 아직 없다.

이에 저자는 간담계질환에 널리 쓰이는茵陳이 담도암 치료에도 효과가 있을 것으로 기대하고, 관찰하기 위하여 MTT assay, cell cycle analysis, apoptosis assay, 및 RT-PCR을 시행하여茵陳 추출물이 담도암세포주의 세포 활성화와 증식 및 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 연구에서는茵陳의 에탄올 추출물이 담도암 세포주의 세포 활성화도에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 실험에서茵陳 추출물의 농도는 50, 100, 200, 300, 500 µg/ml로, 배양 시간은 24시간, 48시간, 72시간으로 하였으며, 실험 결과 72시간 동안 배양하였을 때茵陳을 처리한 세포주에서 농도 의존적으로 세포증식이 억제되었다. 24시간, 48시간에서는 세포증식이 억제되지 않았음을 볼 때, 이는 세포독성이 나타나지 않는 결과임을 알 수 있다. 하지만 장기 72시간 투여군에서는 농도 의존적으로 세포활성이 줄어드는 것을 볼 때 단기간의 투여로 인한 세포독성은 없으면서 장기적으로는 세포증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 기대되는 소견이다.

Cell cycle analysis를 통해 G0/G1기에 세포의

비율이 늘어나는 것은 인진의 처리에 따라 세포자멸이 증가하고 있으며, 농도에 의존적으로 세포자멸이 나타남을 보여주는 결과이다. 따라서茵陳 추출물이 담도암세포주에 대하여 세포자멸 및 세포주기의 진행을 억제시키는 효과를 낸 것으로 볼 수 있다.

ELISA kit를 이용하여 담도암세포주의 세포자멸 효과를 측정된 결과, 농도와 시간에 의존적으로 세포자멸이 유의하게 증가하였다.

Caspase -8은 세포자멸의 외인성 경로에 관여하며, caspase -3, -9는 세포자멸의 내인성 경로에 관여하는 단백질이다²⁵. 이번 연구에서茵陳 추출물을 투여한 후 세포주에서 caspase -3, -8, -9의 mRNA의 발현이 유의하게 늘어나는 것은, 세포자멸과 관련된 유전자의 발현이 증가됨을 나타내는 결과라 할 수 있다. 따라서茵陳 추출물이 담도암세포주의 세포자멸을 증가시킨다는 해석을 할 수 있다.

茵陳 추출물을 투여한 담도암세포주에 caspase inhibitor 처리농도를 높일수록 caspase 발현량이 줄어들므로 세포자멸이 덜 일어나게 된다. 따라서 inhibitor의 농도가 높을수록 세포활성이 높아지는 것을 알 수 있다. 이것은茵陳 추출물을 투여했을 때 세포자멸이 증가되는 기전이 caspase의 작용이 관여함을 시사하는 결과이다. 그런데 여기서 inhibitor를 처리하였을 때 세포활성이 늘어나기는 하지만 현저한 증가를 보이지 못하는 것을 볼 때 인진을 투여하여 발생하는 담도암세포주의 세포자멸은 caspase 활성화 이외에도 다른 메카니즘에 의한 세포자멸이 있을 수 있음을 암시하는 결과라고 보이며, 따라서 인진치리에 의한 세포자멸의 전체적인 기전에 대해서는 추후에 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

세포자멸에 관여하는 단백질 중 pro-apoptotic protein인 Bax는 세포자멸을 활성화시키는 작용을 하며, anti-apoptotic protein인 Bcl-2는 세포자멸을 감소시키는 작용을 한다²⁶. 이러한 Bax와 Bcl-2의 발현 증감 여부는 조직에서 세포자멸유도를 측정

하는데 여러 연구에서 자주 사용되어 왔다^{27,28}. 이번 연구에서 RT-PCR을 통해 각 세포주에 100, 200, 300 µg/ml茵陳 추출물을 투여 한 후, Bcl-2, Bax gene mRNA의 발현을 관찰한 결과, 세포자멸을 억제하는 Bcl-2는 발현이 감소하였으며, 세포자멸을 유도하는 Bax는 발현이 증가하였다. 이 결과는 정확히 농도의존적이지는 않지만茵陳 추출물이 담도암세포주에 대한 세포자멸 유도에 의미있는 방향으로 작용을 하는 것으로 보인다. Caspase의 증가와 의미가 일치하는 결과라고 해석할 수 있다.

인체에서 p53 유전자의 변이는 암과 관련된 유전학적 변화중 가장 빈번히 관찰되며, 전체 악성종양의 50%가 p53의 돌연변이가 원인인 것으로 알려져 있다²⁹. p53은 CDK 인산화효소의 강력한 제해제인 p21을 전사 촉진시키고 세포자멸에 관련된 유전자들을 활성화시킨다. p21은 CDK-cyclin 복합체에 결합하여 기능을 억제하며 p53은 p21을 통해서 손상받은 DNA를 갖고 있는 세포가 G1단계에서 세포주기가 정지하게 한다³⁰. 본 연구에서는茵陳 추출물이 p53, p21의 발현을 증가시켜 담도암세포주의 세포자멸을 촉진하는 것으로 관찰되었다.

이상에서茵陳 추출물은 세포자멸유도를 통하여 담도암세포주의 증식을 억제하고, 세포자멸과 관련된 유전자의 발현을 조절하여 유의하게 세포자멸을 증가시켰다. 향후茵陳의 세포자멸과 관련된 작용기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

담도암세포주를 대상으로하여茵陳 추출물의 항암 효과 및 기전에 관하여 알아보고자 MTT assay, cell cycle analysis, apoptosis assay, 및 RT-PCR을 시행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

- 1.茵陳 추출물은 담도암세포주의 세포증식을 72시

- 간에서 유의성 있게 억제하였다.
- 2.茵陳 추출물은 담도암세포주의 세포주기 분석에서 세포주기의 진행을 억제하였다.
 - 3.茵陳 추출물은 담도암세포주의 세포자멸을 농도와 시간의 증가에 따라 유의성 있게 억제하였다.
 - 4.茵陳 추출물을 처리한 담도암세포주에서 농도의 증가에 따라 caspase-3, caspase-8, caspase-9의 유전자 발현이 유의성 있게 증가하였다.
 - 5.茵陳 추출물을 처리한 담도암세포주에 caspase inhibitor를 투여했을 때, 농도에 따라 세포활성이 증가하였다.
 6. RT-PCR 결과茵陳 추출물을 처리한 세포주에서 Bcl-2 mRNA는 발현이 감소하였으며, Bax mRNA는 발현이 증가하였다.
 - 7.茵陳 추출물을 처리한 담도암세포주에서 p53, p21의 유전자 발현이 농도에 따라 유의성 있게 증가하였다.

이상에서茵陳 추출물이 농도 의존적으로 담도암세포주의 활성을 억제하였으며, 세포자멸을 유도하였다. 이 세포자멸은 Caspase 3, 8, 9와 p53, p21, Bcl-2, Bax 유전자 발현과 관련된 것으로 판단된다. 향후茵陳의 담도암 세포에 대한 항암 효과 및 작용 기전과 관련하여 심층적인 연구가 필요할 것으로 사료되며, 이번 연구가 다른 한약재의 항암 효과를 입증하는 데에도 유용한 참고자료가 될 것으로 기대한다.

參考文獻

1. Alijiffry M, Walsh MJ, Molinari M. Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15:4240-62.
2. 보건복지부 홈페이지:2012.[2012.11.10.검색]. Available at: http://kosis.kr/gen_etl/start.jsp?orgId=117&tblId=DT_117N_A0024&conn_path=I2&pa

th = 중앙행정기관 - 보건복지부 - 암등록통계 - 61개 암종/성/연령(5세)별 암발생자수.

3. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2005;16:93-6.
4. Itoh H, Nishijima K, Kurosaka Y, Takegawa S, Kiriya M, Dohba S, et al. Magnitude of combination therapy of radical resection and external beam radiotherapy for patients with carcinomas of the extrahepatic bile duct and gallbladder. *Dig Dis Sci* 2005;50(12):2231-42.
5. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울:영림사; 2004, p. 328-9.
6. 송효정, 김진웅, 김성훈. 肝癌株와 S-180에 對한茵陳 分割의 抗腫瘍效果 Articles : Anitumor and Synergistic effects of Fractions of Herba Artemisiae Capillaris with anticancer drugs. *동의병리학회지* 1995;9(2):129-34.
7. 서경순, 윤경원.茵陳으로 쓰이는 사철쭉과 더위지기 추출물의 항미생물활성 및 total polyphenol 함량. *한국자원식물학회지* 2011;24(1):10-6.
8. 김성아, 우홍정, 김영철, 이장훈.茵陳이 간성상 세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2008;29(1):177-88.
9. 김시나, 김희석, 남경숙, 황성완, 황성연.茵陳 추출물의 소염진통작용. *생약학회지* 2005;36(4):338-43.
10. 최인호, 김연희, 이동녕, 김형준. Candida albicans에 대한 계지(桂枝), 백두옹(白頭翁), 백선피(白鮮皮), 백작약(白芍藥), 민낭,茵陳(茵陳)의 항진균효과. *동의생리병리학회지* 2005;19(3):690-5.
11. 강우성, 이장훈, 우홍정.茵陳과茵陳사령산가 감방이 肝細胞活性, 細胞週期 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 影響. *대한한학회지* 1999;37(3):91-105.
12. 지형준 외. *대한약전 및 대한약전의 한약규격주해*. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998.
13. 우상명, 유지원, 박주경, 양기영, 서정균, 이상

- 협, 등. 근치적 수술이 불가능한 담낭암 환자에서 Gemcitabine, Oxaliplatin 항암화학요법에 관한 제2상 임상시험: 중간보고. 대한소화기학회지 2007;50(5):36.
14. 이승원, 김형철, 주종우, 정준철, 정귀애. 담낭암 환자에서 Gemcitabine을 기본으로 한 보조항암 화학요법의 경험. 대한외과학회지 2008;75(4):255-61.
 15. 서영광, 김은희, 김달래, 고병희, 전성하, 어완규, 등. 폐 전이된 담낭암 환자를 사상의학적 관리를 통해 제반 증상과 삶의 질을 개선시킨 1례. 사상체질의학회지 2007;19(2):187-94.
 16. 김경순, 유화승, 정태영, 이연월, 조종관. 항암단 투여로 호전된 진행성 또는 전이성 담낭암 연속 환자증례. 대한한방내과학회지 2010;31(3):667-74.
 17. 송창훈, 이슬희, 김정철, 오성원, 정종진, 황진우 외. 원위부 담도암 환자 증례 보고. 대한한방내과학회지 2006;27(3):770-5.
 18. 유은주, 서병관, 황보, 김종인, 강성길. 인진약침이 고지방식이유도 비만 ICR Mice에서 항비만 및 대사이상 개선에 미치는 영향. 대한침구학회지 2011;28(1):1-14.
 19. Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. Apoptosis in Human Hepatoma Cell Line SMMC-7721 Induced by Water-soluble Macromolecular Components of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:113-7.
 20. 박경식, 김성훈, 김병탁. 생약의 간암세포에 대한 항종양효과와 항암제와의 상승작용. 대전대학교 한의학연구소 논문집 1995;4(1):211-23.
 21. 류미선, 김성필, 김재홍, 류혜선, 윤여충, 신정철. 인진오령산 약침이 DEN으로 유발된 흰쥐의 간암에 미치는 영향. 대한침구의학회 2011;28(5):39-55.
 22. 김철우, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳清肝湯이 인체 간암세포의 혈관생성인자 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2006;27(1):138-48.
 23. 윤중식, 김정상. 인진호탕 추출액의 투여가 흰쥐의 간암 발생에 미치는 효과. 한국전자현미경학회지 2009;39(4):283-9.
 24. 손갑호, 김성훈, 柴胡,茵陳의 肝癌細胞에 대한 抗癌活性 및 抗癌劑와의 相乘作用. 대한한의학회지 1995;16(2):414-32.
 25. 정성훈, 김병호, 김영일, 심재준, 황보영, 장재영, 등. 담관암세포주에서 내인성 peroxisome proliferator-activated receptor gamma 배위자인 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2의 항암 효과. 대한내과학회지 2010;78(1):75-86.
 26. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell press* 1993;74(4):609-19.
 27. Li WY, Chiu LC, Lam WS, Wong WY, Chan YT, Ho YP, et al. Ethyl acetate extract of Chinese medicinal herb *Sarcandra glabra* induces growth inhibition on human leukemic HL-60 cells, associated with cell cycle arrest and up-regulation of pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio. *Oncol Rep* 2007;17:425-31.
 28. Lian LH, Park EJ, Piao HS, Zhao YZ, Sohn DH. Aloe emodin-induced apoptosis in t-HSC/Cl-6 cells involves a mitochondria-mediated pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:495-502.
 29. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 2010;9:145-52.
 30. 김노경. 종양학. 제2전정판. 서울: 서울대학교출판부; 2003, p. 80.