

# MCF-7 인체 유방암 세포에서 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 항암 효과

진명호 · 홍상훈 · 박 철<sup>1</sup> · 최영현<sup>2</sup> · 박상은\*

동의대학교 한의과대학 한방내과, 1: 동의대학교 분자생물학과, 2: 동의대학교 한의과대학 생화학교실

## Anti-cancer Effects of *Oldenlandia diffusa*, *Cremastra appendiculata* and *Fritillaria thunbergii* on MCF-7 Cells

Myung Ho Jin, Sang Hoon Hong, Cheol Park<sup>1</sup>, Yung Hyun Choi<sup>2</sup>, Sang Eun Park\*

Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University,  
1: Department of Molecular Biology, Dong-Eui University,  
2: Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

*Oldenlandia diffusa*, *Cremastra appendiculata* and *Fritillaria thunbergii* are widely distributed in the Korea, China and Japan, and has been used in traditional medicine for various diseases, such as pharyngolaryngitis, tonsillitis, goiter and stomach ulcer. However, the anti-cancer activities in human breast cancer have not been clearly elucidated yet. In this study, it was compared the in vitro cytotoxic effects of single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*. We treat human breast cancer MCF-7 cells with *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*. And we evaluated viability, growth inhibition, morphological changes, apoptotic bodies formation, measurement of the cell cycle and formation of DNA fragmentation of these cells. It was found that single treatment of *O. diffusa* could inhibit the cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. However, complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii* is weakly or not affect the cell proliferation of MCF-7 cells. And anti-proliferative effects of *O. diffusa* in MCF-7 cells was associated with G1 arrest of cell cycle. These findings suggest that *O. diffusa* may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human breast cancer cells and further studies will be needed to identify the molecular mechanisms.

Key words : *O. diffusa*, *C. appendiculata*, *F. thunbergii*, human breast cancer cells, cell cycle arrest, anti-cancer

### 서 론

암은 신체의 모든 부위에서 발생할 수 있으며, 일단 발생하게 되면 빠르게 증식하고 전이되는 특징을 가진다. 최근 우리나라를 포함한 산업화가 된 많은 아시아 국가에서는 생활 수준 및 의료 수준의 발달로 인한 노령화와 산업화에 따른 암 유발 촉진 환경의 증가 및 식생활의 서구화 등에 의하여 암 발생이 증가하고 있을 뿐 만 아니라 발병하는 암의 종류도 위암, 간암, 폐암 등

과 같은 후진국형 암에서 유방암, 자궁암, 대장암, 전립선암 등과 같은 선진국형 암으로 변화하고 있는 추세이다<sup>1-5)</sup>.

여러 종류의 암 중에서 유방암은 전세계 여성들 사이에서 가장 빈번하게 발생하는 악성 종양으로서 매년 1,000,000 명 이상의 여성에게 발병하며, 400,000 명 이상이 사망하는 것으로 알려져 있다<sup>6-8)</sup>. 하지만 최근에는 유방촬영술(mammography) 등과 같은 유방암에 대한 진단법의 발달로 인하여 초기에 발견하는 경우가 많으며, 치료법이 발달함에 따라 초기 진단 후 5년 생존율이 약 89% 정도로 알려지고 있다<sup>9-12)</sup>.

외과적 수술, 항암요법, 방사선 치료 등의 치료법들은 전이가 유발되지 않은 유방암에 효과가 뛰어난 것으로 알려지고 있지만 근력약화, 림프부종, 체중 증가, 조기 폐경, 면역이상 반응 등과 같은 부작용을 초래할 수 있으므로 최근에는 여러 가지 천

\* To whom correspondence should be addressed at : Sang Eun Park,  
Department of Korean Internal medicine, College of Korean medicine,  
Dong-Eui University, 479-7, Sinjeong 3-dong, Nam-gu, Ulsan, Korea  
· E-mail : hanseul@hanmail.net, · Tel : 052-226-8106  
· Received : 2014/03/13 · Revised : 2014/04/30 · Accepted : 2014/05/27

연물을 이용함으로써 유방암을 예방하고 유방암 치료 시 나타날 수 있는 부작용을 최소화할 수 있는 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>13-17</sup>.

최근 연구 동향을 보면 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 항암 효과에 대해 보고한 연구는 있으나 연구가 아직 부족하며 상기 약제가 임상적으로 유방암 치료에 응용됨에도 유방암과 관련된 연구는 거의 없는 실정이다<sup>18-27</sup>. 따라서 본 연구에서는 인체 유방암세포주인 MCF-7 세포를 대상으로 하여 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 단독처리 및 복합처리에 따른 항암효과를 확인하기 위하여 각각의 시료들이 유발하는 세포독성 정도를 확인하였으며, 이들 중 세포독성 효과가 뛰어난 시료가 apoptosis 유발에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 추출 및 처리방법

본 실험을 위하여 동의대학교 부속 한방병원에서 제공받은 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母를 아래와 같은 방법으로 추출한 후 사용하였다. 본 실험에 사용된 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母는 세척하여 불순물을 제거한 후 건조시키고 분쇄하였다. 분쇄된 각각의 시료들의 추출을 위하여 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母 100 g에 증류수 1 L를 첨가하여 180-200°C로 3시간 가열한 후 원심분리하여 찌꺼기를 제거한 다음 상층액만 분리하였다. 분리된 상층액은 Whatman 필터(No. 2)를 이용하여 걸러낸 다음 동결건조하여 고형성분을 얻었다. 추출된 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母 고형성분은 마쇄한 다음 밀봉시켜 -75°C 초저온냉동고에 보관하였다. 白花蛇舌草의 경우 100 g 당 10 g, 山慈姑는 100 g 당 7.1 g, 浙貝母의 경우 100 g 당 8.5 g의 고형성분을 얻었다. 상기와 같은 방법으로 얻어진 고형성분은 실험 시 3차 증류수에 녹여 100 mg/ml의 농도로 만들고 단독처리군의 경우에는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母를 적정 농도로 성장배지에 희석하여 세포에 처리하였고, 복합처리군의 경우에는 각각의 시료를 동량으로 섞은 다음 적정 농도로 성장배지에 희석하여 세포에 처리하였다.

### 2. 세포배양 방법

본 실험에 사용한 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포(American Type Culture Collection; ATCC, Rockville, MD, USA)는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 2 mM glutamine (Gibco BRL), 100 U/ml penicillin (Gibco BRL) 및 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL) 배지를 성장배지로 사용하여, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건의 배양기를 사용하여 배양하였으며, 배양 접시의 전체 면적 중 90% 정도의 밀도에 도달하였을 경우 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (trypsin-EDTA, Gibco-BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정수의 세포를 분주하여 재배양하였다.

### 3. Trypan blue 염색을 이용한 세포 생존율의 측정

유방암 세포주인 MCF-7 세포에서 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 단독처리 및 복합처리에 따른 세포의 생존율을 확인하기 위하여 trypan blue 염색법을 사용하여 측정하였다. 먼저 MCF-7 세포를 1 X 10<sup>5</sup> 개/ml 씩 분주한 다음 72 시간 동안 배양하였다. 72 시간 경과 후 상층액은 따로 분리하고 부착세포는 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시켜 원심분리를 이용하여 상층액을 제거한 세포만 모은 다음 1 ml의 phosphate-buffered saline (PBS)로 세포를 부유시켰다. 여기에 동량의 0.5% trypan blue solution (Gibco BRL)을 처리하여 2 분간 염색시킨 다음 hemocytometer를 이용하여 염색이 되지 않은 살아있는 세포의 수를 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 계수하였다.

### 4. MTT assay를 이용한 세포 viability 측정

白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 단독처리 및 복합처리에 따른 MCF-7 세포의 생존율 감소 현상을 재확인하기 위하여 MTT assay를 이용한 세포의 viability를 확인하였다. Viability 확인을 위하여 상기와 동일한 방법으로 세포를 6 well plate에 접종하고, 안정화시킨 후 각각의 시료를 처리하여 72 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 성장배지와 희석하여 0.5 mg/ml 농도로 만든 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 처리하고 빛을 차단하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 MTT 시약을 제거하고 생성된 보라색의 insoluble한 MTT formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco, Solon, OH, USA)에 녹인 다음 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. 세포의 성장억제 및 형태변화의 시각적인 관찰

白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 단독처리 및 복합처리에 따른 암세포의 성장 및 형태변화는 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 시각적으로 확인하였다. 먼저 세포 배양용 6 well plate에 MCF-7 세포를 1 X 10<sup>5</sup> 개/ml 씩 분주하여 적정농도로 처리하였다. 72 시간 동안 각각의 시료에 노출시킨 다음 시각적인 성장억제 정도와 형태변화 정도를 200 배의 배율로 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하고 차이점을 비교 분석하였다.

### 6. DAPI 염색을 통한 세포핵 형태 관찰

Apoptosis 유발 여부를 확인할 수 있는 방법 중 하나인 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색을 통한 핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母 처리된 세포를 모은 다음 상층액을 제거하고 PBS를 1 : 9의 비율로 희석된 37% formaldehyde 용액으로 만든 fixing solution을 처리하여 30 분 동안 고정하였다. 고정이 끝난 후 2,000 rpm을 5 분간 원심분리하여 fixing solution을 제거하고 세포만 모은 다음 다시 PBS 용액을 첨가하여 모아진 세포를 부유시켰다. 세포가 포함되어 있는 200 µl의 PBS 용액 중 60 µl를 slide glass 위에 떨어뜨리고

cytospin (SHANDON, UK)함으로서 원심력을 이용하여 고정된 세포를 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 세척하고 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 상온에서 10 분 동안 반응시킨 다음 2.5 µg/ml 농도의 DAPI 용액을 처리하여 세포의 핵을 20 분 간 염색하였다. 염색이 끝난 후 증류수 및 PBS를 이용하여 염색이 되지 않은 DAPI 용액을 제거하고 충분히 말린 다음 mounting solution을 처리하고 형광 현미경(fluorescence microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다. 형광 현미경을 이용한 핵의 관찰은 400 배 배율로 실시하였으며, Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

#### 7. DNA flow cytometry를 이용한 세포주기 및 apoptosis 유발의 정량적 분석

DNA flow cytometry를 이용한 세포주기의 변화 및 apoptosis 유발 정도를 확인하기 위하여 白花蛇舌草가 단독처리된 배지에서 자란 세포들을 원심분리하여 모은 다음 상층액을 제거하고 다시 0.5 ml의 PBS를 첨가하여 부유시킨다. 여기에 ethanol 0.5 ml를 첨가하여 4℃에서 한 시간 동안 고정시킨 다음 고정된 세포들을 원추형 vial에 넣어서 1,000 rpm으로 수 분간 원심 분리하여 상층액을 제거한다. 이렇게 모아진 세포에 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma)이 함유된 PBS를 이용하여 세척하고 원심분리하여 다시 세포만 모은 다음 1% BSA를 함유한 PBS 0.8 ml로 부유시키고 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma)와 0.1 mg/ml의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실, 4℃ 조건에서 1시간 동안 염색을 실시한다. PI로 염색된 세포를 PBS를 이용하여 세척하고 35 µm pore size의 nylon mesh를 이용하여 단일 세포로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software와 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

#### 8. DNA fragmentation을 통한 apoptosis 유발 분석

Apoptosis 유발 신호에 의하여 활성화되는 endonuclease에 의하여 형성되는 DNA fragmentation의 분석을 위하여 정상배지에서 자란 세포와 白花蛇舌草가 처리된 배지에서 자란 세포들을 모은 다음 원심분리를 이용하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 세포에 850 µl의 lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100]를 처리하여 4℃에서 30분 간 반응시킨 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액 750 µl를 분리하였다. 분리된 상층액에서 단백질을 제거하기 위하여 0.5 mg/ml의 proteinase K (Sigma)를 처리하여 50℃에서 3시간 동안 반응시킨 다음 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합용액(25 : 24 : 1, Sigma)을 동량인 750 µl를 첨가하고 30분 간 회전교반 시켰다. 회전교반이 끝난 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 DNA와 RNA가 포함되어 있는 상층액 600 µl를 분리하여 300 µl의 100% isopropanol (Sigma)과 100 µl의 5 M

NaCl를 첨가하고 4℃에서 24 시간 동안 반응시켜 DNA와 RNA를 고형화 시켰다. 반응이 끝난 후 14,000 rpm, 4℃에서 30분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거하고 남은 pellet에 RNase A가 포함되어 있는 20 µl의 diethyl pyrocarbonate (DEPC) water를 이용하여 pellet을 녹이고 6X DNA gel loading dye (Bioneer, Daejeon, Korea)를 첨가하여 DNA sample을 만들었다. 이렇게 만들어진 DNA sample을 1.6% agarose gel에 loading하고 50 V에서 2 시간 정도 전기영동 시킨 후 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색하여 ultra violet (UV) 하에서 사진 촬영하여 DNA fragmentation 여부를 확인하였다.

#### 9. 통계분석

상기의 모든 실험 결과는 SPSS ver. 18.0 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean) ± 표준편차(SD)로 나타났다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성 검증은 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 한 후, Student t-test와 Duncan's multiple range test를 이용하여 p<0.05 수준에서 검증하였다.

## 결 과

#### 1. MCF-7 세포의 생존율에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 결과를 살펴보면 山慈姑와 浙貝母는 MCF-7 세포의 생존율에 큰 영향을 주지 못하는 반면 白花蛇舌草는 MCF-7 세포의 생존율을 감소시켰고, 山慈姑와 浙貝母가 포함되어 있는 단독처리군 및 복합처리군에서 白花蛇舌草가 약간의 생존율 감소현상을 유발시켰다.

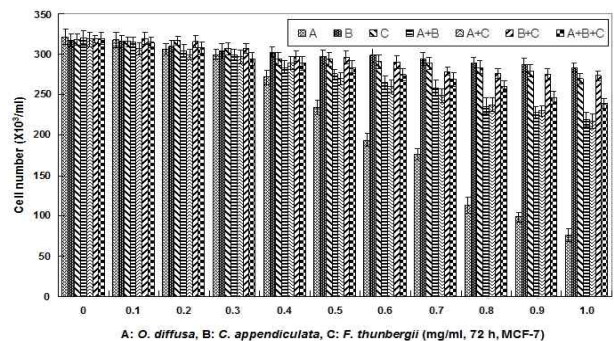


Fig. 1. Viability of human breast cancer MCF-7 cells after single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*. The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells.

#### 2. MCF-7 세포의 증식에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

MTT assay를 이용하여 조사한 결과는 Fig. 2에서 나타나 있다. 상기 생존율 감소현상 결과와 비슷하게 山慈姑와 浙貝母의 경우에는 본 연구에 사용된 농도에서 MCF-7 세포의 증식을 억제하지 못하였지만 白花蛇舌草는 강력한 증식억제 효능을 가지고 있

다는 것을 알 수 있었으며, 山慈姑 및 浙貝母는 白花蛇舌草가 가지고 있는 증식억제 효과를 억제한다는 것을 예상할 수 있었다.

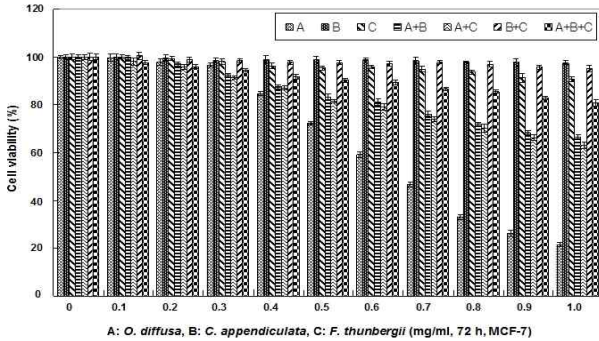


Fig. 2. Growth inhibition of human breast cancer MCF-7 cells after single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*. Inhibition of cell growth was measured by the metabolic-by-based MTT assay.

3. MCF-7 세포의 형태변화에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

도립현미경을 사용하여 세포의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 白花蛇舌草 단독처리군의 경우에는 처리농도의 증가에 따라 부착력을 잃고 부유하는 세포는 거의 관찰되지 않았지만 전체적인 세포의 밀도 감소와 함께 세포의 모양이 길어지는 형태변화가 나타났다. 山慈姑와 浙貝母의 단독처리군 및 복합처리군에서는 세포의 밀도에도 거의 변화가 없었으며, 세포의 형태변화도 나타나지 않았다.

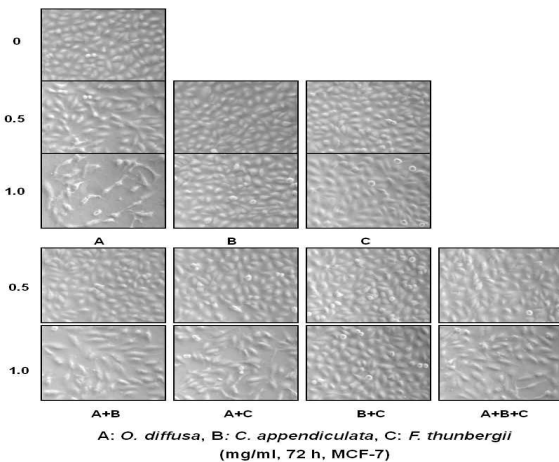


Fig. 3. Morphological changes of human breast cancer MCF-7 cells by single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*. Cell morphology was visualized by inverted microscope. Magnification, X 200.

4. MCF-7 세포핵의 형태변화에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

DAPI 염색을 한 후 핵의 형태변화를 조사한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 白花蛇舌草 단독처리군의 경우에는 전체적으로 핵의 밀도가 현저하게 감소하였다. 또한 apoptotic body 형성 및 DAPI의 투과성 증가에 따른 빛의 강도 증가 현상은 약하

게 나타났고, 白花蛇舌草가 포함된 복합처리군에서는 빛의 강도 증가 현상은 거의 나타나지 않았다. 한편 山慈姑와 浙貝母의 단독처리군 및 복합처리군에서는 핵의 밀도 및 형태에 아무런 변화가 나타나지 않았다. 이러한 결과를 살펴볼 때 白花蛇舌草가 MCF-7 세포에서 유발하는 생존을 감소, 성장억제 및 형태변화는 apoptosis 유발에 의한 현상이 아니라 또 다른 요인이 관여한다는 것을 예상할 수 있었다.

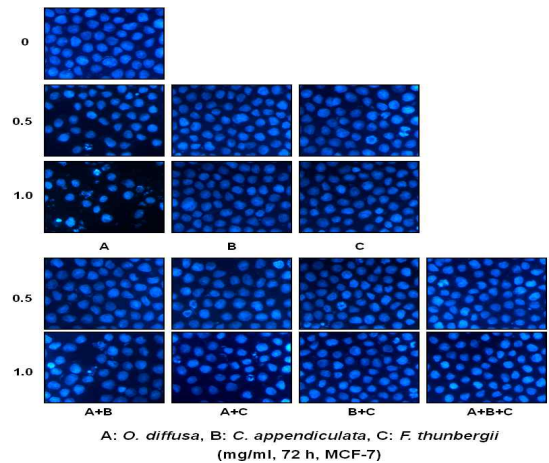


Fig. 4. Apoptotic bodies formation of human breast cancer MCF-7 cells by single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*. Cells were stained with DAPI solution. After 20 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

5. MCF-7 세포에서 白花蛇舌草에 의한 세포주기 변화

DNA flow cytometry를 이용하여 세포주기의 변화가 생존을 감소와 성장억제에 관여하는지 확인한 결과는 Fig. 5 및 6에서와 같다. 白花蛇舌草를 처리하였을 경우에 G1기에 해당하는 세포의 빈도가 현저하게 증가되었으며, 반면에 S기 및 G2/M기에 해당하는 세포의 빈도는 감소하였고, 따라서 MCF-7 세포에서 白花蛇舌草에 의하여 유발되는 생존을 감소, 성장억제 및 형태변화 등과 같은 여러 가지 현상들은 G1기에서의 세포주기 억제와 밀접한 관련이 있다는 것을 알 수 있었다.

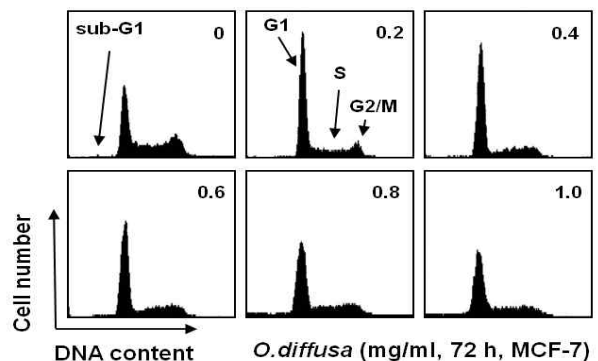


Fig. 5. Measurement of the cell cycle by single treatment of *O. diffusa* in human breast cancer MCF-7 cells. The cells were fixed and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by DNA flow cytometry.

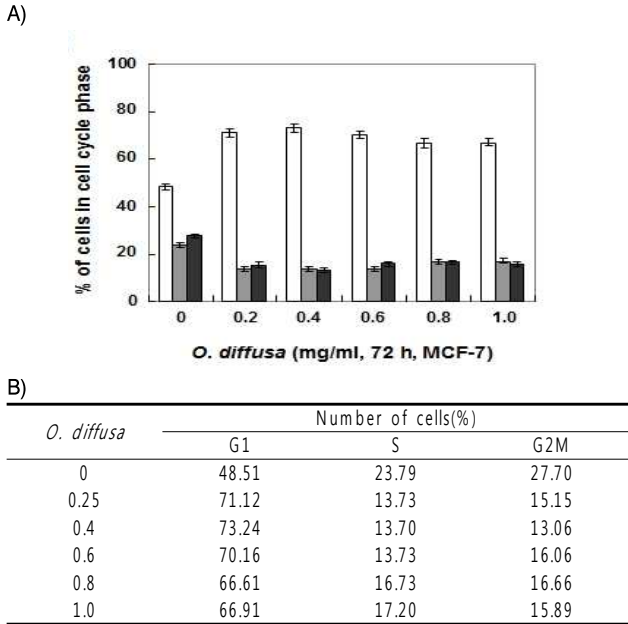


Fig. 6. Measurement of the cell cycle by single treatment of *O. diffusa* in human breast cancer MCF-7 cells. Cells grown under the same conditions as Fig. 14 were collected, fixed, and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by DNA flow cytometry.

#### 6. MCF-7 세포에서 白花蛇舌草가 sub-G1기 형성에 미치는 영향

DNA flow cytometry를 이용하여 sub-G1기에 해당하는 세포를 측정할 결과는 Fig. 7A에 나타난 바와 같이 白花蛇舌草를 처리하지 않았을 경우에는 sub-G1기의 빈도가 약 1.11%로 나타났으며, 0.6 mg/ml 처리군까지는 큰 변화가 나타나지 않았지만, 0.8 mg/ml, 1 mg/ml의 白花蛇舌草를 처리하였을 경우에는 sub-G1기의 빈도가 각각 4.5%, 12.25%로 나타나 고농도 처리군에서 약하게 sub-G1기의 빈도가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 Fig. 1의 白花蛇舌草 처리군의 세포 생존율에 비하여 미약한 수치이며, Fig. 5, 6의 DNA flow cytometry 결과처럼 생존율 감소 현상은 대부분 G1기에서의 세포주기 억제와 관련이 있었으므로 白花蛇舌草와 관련된 세포의 생존율이 뚜렷하게 감소한 1 mg/ml 농도에서도 apoptosis와의 관련성은 미약하다고 볼 수 있다. 따라서 MCF-7 세포에서 白花蛇舌草에 의하여 유발되는 생존율 감소, 성장억제 및 형태변화 등과 같은 여러 가지 변화들은 apoptosis 유발 보다는 G1기에서의 세포주기 억제가 중요하게 작용한다는 것을 예상 할 수 있었다.

#### 7. MCF-7 세포에서 白花蛇舌草가 DNA 단편화 유발에 미치는 영향

endonuclease에 의한 DNA 단편화 현상을 본 결과는 Fig. 7B에서 나타난 바와 같이 전체적으로 DNA 단편화 현상이 나타나지 않았으며, 생존율 감소가 뚜렷한 1 mg/ml 농도에서 DNA가 끌리는 현상이 나타났지만 그 정도가 약한 것을 볼 수 있다. 따라서 상기 실험 내용과 종합해보면 白花蛇舌草는 MCF-7 세포에서 apoptosis 유발의 영향보다는 G1기에서의 세포주기 억제를 유발함으로써 생존율 감소, 증식억제 및 형태변화에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

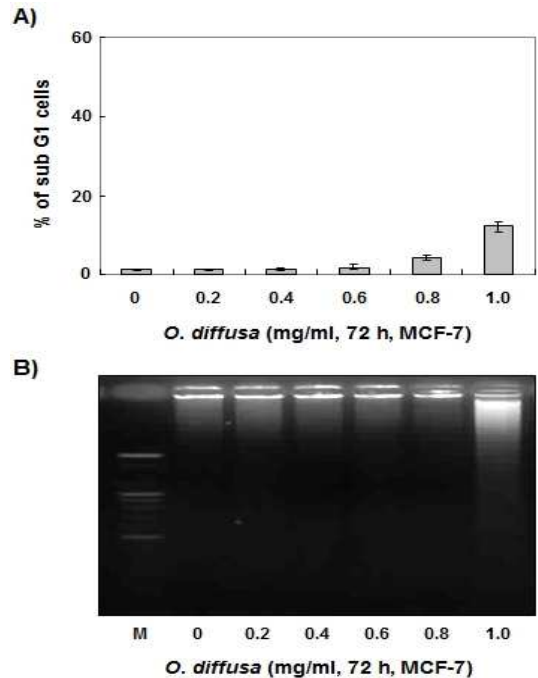


Fig. 7. Induction of sub-G1 phase rate and formation of DNA fragmentation by single treatment of *O. diffusa* in human breast cancer MDA-MB-231 cells. (A) Cells were collected, fixed, and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by DNA flow cytometry. (B) The cells were collected and DNA was extracted. The DNA fragmentations were separated on 1.6% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr.

## 고 찰

각종 악성종양 중 유방암은 한의학 질환으로 乳巖과 가장 부합되며 그 밖의 乳癰, 吹乳, 乳癆, 乳中結核, 乳癖, 乳痰 등의 유방종괴를 나타내는 명칭이 있다<sup>28)</sup>. 薛己<sup>29)</sup>는 《校注婦人大全良方》<乳癰乳巖方論>에서 “若初起內結小核, 或如繫棋子, 不赤不痛, 積之歲月漸大, 巖岩崩破, 如熟榴, 或內潰深洞, 血水滴瀝, 比屬肝脾鬱怒, 氣血虧損, 名曰乳巖, 爲難療.”라 하였다. 乳巖의 病因은 內因, 外因, 不內外因으로 나눌 수 있으나, 內因의 七情不調, 특히 鬱怒鬱結, 抑鬱이 주요인으로 정신적 스트레스를 받기 쉬운 사회적 요소가 강조되어 주로 疏氣行血之法이 기본이 되며, 氣血虧損한 상태에서 다발하게 되므로 補氣血法도 兼한다<sup>28)</sup>. 또한 나이, 월경유무에 따라 다르게 보았는데 《東醫寶鑑》<sup>30)</sup> 乳癰의 설명에서 “婦人乳癰, 四十以下, 血氣周流, 患此加療, 年事既高, 血氣耗澁, 患此難療.<直指>”, “婦人此病, 若早治之, 便可立消, 月經行時, 悉是輕病, 五六十後, 無月經時, 不可作輕易看也.<丹心>”라 하여 유방암 치료에 참고할 만하다.

최근 연구 동향을 보면 白花蛇舌草의 ursolic acid, asperuloside의 성분, 메탄올 등의 추출물이 항암 및 항전이 효과가 있으며, 여러 가지 세포에서 세포독성, 항전이, 혈관형성억제, 세포고사, 세포 활성 감소 등의 기전을 보인다는 연구가 있다<sup>18-22)</sup>. 山慈姑에 대한 연구에서 왕<sup>23)</sup> 등은 加味慈桃丸에 들어가는 山慈姑가 혈관 신생을 억제하는 효능을 보였다고 하였고, 이<sup>24)</sup> 등은 山慈姑 추출물과 콜히신이 Calu6와 MCF-7의 세포 사멸 및

세포 증식 억제 효과를 보이거나 유효 항암 물질에 대한 연구가 더 필요함을 언급한다. 貝母와 관련된 연구 동향으로는 烏貝散이 위암세포주의 DNA에 유의미한 영향을 미쳤다는 점이 언급되었고<sup>25)</sup>, 그 외 貝母가 들어간 抗白湯이 HL-60 세포의 세포고사 효과가 있다는 연구와 貝母의 유효성분인 verticinone 단독투여 보다 복합처방인 茈貝散이 HL-60 세포분화 효과의 유의미한 증가가 있었다는 연구가 있다<sup>26,27)</sup>. 하지만 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母에 대한 기초 연구가 아직 부족하며 특히 상기 약물이 유방암에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 白花蛇舌草, 山慈姑 및 浙貝母가 유방암에서 유발하는 항암효능을 확인하기 위하여 유방암 세포주인 MCF-7 세포를 이용하여 白花蛇舌草, 山慈姑 및 浙貝母의 단독처리 및 복합처리에 따른 세포의 생존율 및 증식에 미치는 영향과 그에 따른 형태변화를 조사하였고 apoptosis 유발 및 세포주기의 변화 여부를 확인하기 위하여 핵의 형태변화, DNA flow cytometry를 이용한 세포주기 변화 및 sub-G1기의 비율 확인과 더불어 DNA 단편화 현상 등을 조사하였다.

trypan blue 염색법을 사용하여 세포의 생존율 변화를 확인한 결과 白花蛇舌草 단독처리군에서만 생존율 감소 현상이 강하게 유발되었고(Fig. 1), MTT assay를 이용하여 세포의 viability를 확인한 결과 마찬가지로 白花蛇舌草 단독처리군에서 성장억제가 유발되었다(Fig. 2). 이러한 생존율 감소 및 성장억제 현상이 세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인한 결과 저농도의 白花蛇舌草 단독처리군에서만 세포밀도 감소와 함께 형태변화가 나타났다(Fig. 3).

MCF-7 세포핵의 형태변화를 확인함으로써 apoptosis 유발 여부를 조사한 결과 白花蛇舌草 단독처리군에서 밀도 감소현상이 유발되었지만 apoptosis 유발의 증거가 거의 나타나지 않는 것으로 확인되었고(Fig. 4), DNA flow cytometry로 세포주기의 변화 및 apoptosis 유발 정도를 확인한 결과 G1기에서의 세포주기 억제가 나타났지만 apoptosis는 고농도 처리군에서 약하게 나타났다(Fig. 5, 6 및 7A). DNA flow cytometry에 의하여 확인된 apoptosis 유발을 재확인하기 위하여 DNA 단편화 현상 정도를 조사해보니 白花蛇舌草 처리군에서 DNA 단편화 현상이 거의 나타나지 않았다(Fig. 7B).

이상의 결과를 종합해보면 白花蛇舌草가 생존율 감소 및 성장억제 현상을 강하게 유발하였으며, 이러한 현상은 apoptosis 유발보다는 주로 G1기에서의 세포주기 억제에 의하여 일어났다. 따라서 白花蛇舌草는 인체 유방암 세포의 항암 효능에 대한 기초 자료로서 그 가치가 높을 것으로 생각되며, 향후 이와 연관된 분자생물학적 기전에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단되며, 白花蛇舌草와 다른 약물의 복합처리시 그 효능의 감소를 보인 것에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 결 론

山慈姑, 浙貝母는 MCF-7 세포의 생존율에 큰 영향을 주지 못하는 반면 白花蛇舌草는 MCF-7 세포의 생존율을 감소시켰으

며, 세포 증식 억제 실험에서도 동일한 결과를 볼 수 있었고, 두 실험 모두 복합처리시 山慈姑와 浙貝母는 白花蛇舌草의 효능을 감소시킨 것으로 나타났다. 세포 관찰시 白花蛇舌草 단독처리군에서 세포의 밀도감소, 형태변화를 유발하였다.

白花蛇舌草는 MCF-7 세포에서 apoptosis 유발에는 큰 영향을 미치지 못하였지만 G1기에서의 세포주기 억제를 유발함으로써 생존율 감소, 증식억제 및 형태변화에 관여하였다.

## References

- DeSantis, C., Naishadham, D., Jemal, A. Cancer statistics for African Americans. *CA Cancer J Clin* 63: 151-166, 2013.
- Jung, K.W., Won, Y.J., Kong, H.J., Oh, C.M., Seo, H.G., Lee, J.S. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival and prevalence in 2010. *Cancer Res Treat* 45: 1-14, 2013.
- Scherer, L.D., Ubel, P.A., McClure, J., Greene, S.M., Alford, S.H., Holtzman, L., et al.. Belief in numbers: When and why women disbelieve tailored breast cancer risk statistics. *Patient Educ Couns* 92: 253-259, 2013.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 63: 11-30, 2013.
- Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., et al. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J Clin* 62: 220-241, 2012.
- Ibrahim, T., Mercatali, L., Amadori, D. A new emergency in oncology: Bone metastases in breast cancer patients. *Oncol Lett* 6: 306-310, 2013.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917, 2010.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 59: 225-249, 2009.
- Jalalian, A., Mashohor, S.B., Mahmud, H.R., Saripan, M.I., Ramli, A.R., Karasfi, B. Computer-aided detection/diagnosis of breast cancer in mammography and ultrasound: a review. *Clin Imaging* 37: 420-426, 2013.
- Kalles, V., Zografos, G.C., Provatopoulou, X., Koulocheri, D., Gounaris, A. The current status of positron emission mammography in breast cancer diagnosis. *Breast Cancer* 20: 123-130, 2013.
- Gøtzsche, P.C., Nielsen, M. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* 1: 1877, 2011.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* v 127: 2893-2917, 2010.
- Meiyanto, E., Hermawan, A., Anindyajati. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent

- chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 427-436, 2012.
14. Li, Y., Wicha, M.S., Schwartz, S.J., Sun, D. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *J Nutr Biochem* 22: 799-806, 2011.
  15. Yang, H., Dou, Q.P. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. *Curr Drug Targets* 11: 733-744, 2010.
  16. Kousidou, O.Ch, Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K. Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells. *Mini Rev Med Chem* 6: 331-337, 2006.
  17. Molnár, J., Gyémánt, N., Tanaka, M., Hohmann, J., Bergmann-Leitner, E., Molnár, P., et al. Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. *Curr Pharm Des* 12: 287-311, 2006.
  18. 김성훈.白花蛇舌草로부터 分離한 ursolic acid의 自然殺害效果와 抗轉移作用. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集 5(2):523-533, 1997.
  19. 김성훈, 송규용, 유시용.白花蛇舌草 핵산분획과 多糖體가 抗癌 및 抗轉移 活性에 미치는 影響(Ursolic acid와 Asperuloside 병용투여시 항암 및 항전이 효과에 관한 연구). *대한동의병리학회지* 13(1):65-75, 1999.
  20. 노훈정, 문구, 문석재, 원진희, 문영호, 박래길.白花蛇舌草 메탄을 抽出物의 抗腫瘍 效果 및 抗癌 機轉에 關한 研究. *대한한방중양학회지* 6(1):81-97, 2000.
  21. 이효정, 이은옥, 이연희, 김관현, 이재호, 백남인, 등. 국내산 白花蛇舌草 煎초와 뿌리의 항암효과. *생약학회지* 35(2):110-115, 2004.
  22. 김경순, 예성철, 유병철, 조종관, 이연일, 유화승. 鬼箭羽, 白花蛇舌草, 瓦松 추출물을 처치한 난소암과 자궁경부암 세포에서의 단백질 발현 변화. *대한한방내과학회지* 32(1):33-42, 2011.
  23. 왕덕중, 강희, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 加味慈桃丸 構成藥物의 血管新生 抑制效果에 關한 研究. *대한암한의학회지* 11(1):75-93, 2006.
  24. 이동은, 이소영, 김정선, 조종관, 유화승, 최선주. 抗癌丹 및 그 주요 성분의 Calu6와 MCF-7 사람 암세포주에 대한 항암효과. *대한암한의학회지* 30(5):50-60, 2009.
  25. 한상순, 오중환, 광민아, 변준석, 서정철, 한상원. 烏貝散의 항산화효과, 세포활성 및 cDNA microarray chip 유전자 발현에 미치는 영향. *대한본초학회지* 18(2):59-70, 2003.
  26. Jun Ho Park, Sung Min Ju, Kun Jung Kim, Byung Hoon Jeon, Jung Mi Oh, Chae Ho Lee, et al. In vitro Growth Inhibition and Apoptotic Effects of Hang-baek-Tang on HL-60 Cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 19(6):1636-1639, 2005.
  27. 황기명. 人間白血病 細胞株에서 苳貝散의 作用에 關한 研究. *대한한의학 방제학회지* 10(1):143-155, 2002.
  28. 金廷珍, 李京燮, 宋炳基. 乳房腫塊에 關한 文獻的 考察. *대한한방부인과학회지* 11(2):29-43, 1998.
  29. 薛己. 校注婦人良方大全. 文光圖書有限公司, pp 71-75.
  30. 許浚. 東醫寶鑑. 경남, 동의보감출판사, 683, 2006.