

항암단 및 그 주요 성분의 Calu6 와 MCF-7 사람 암세포주에 대한 항암효과

이동은¹, 이소영¹, 김정선², 조종관², 유화승², 최선주¹

¹한국원자력연구원 동위원소이용기술개발부, ²대전대학교 둔산한방병원 동서암센터

Antitumor Effect of Hang-Am-Dan (HAD) and its Ingredients on Calu6 and MCF-7 Human Cancer Cell Lines

Dong-Eun Lee¹, So-Young Lee¹, Jung-Sun Kim², Chong-Kwan Cho²,
Hwa-Seung Yoo², Sun-Ju Choi¹

¹Radioisotope Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute,
²East-West Cancer, Dunsan Oriental Hospital, Daejeon University

Objectives: To elucidate the antitumor activities of Hang-Am-Dan (HAD), we investigated the anti-proliferative effects and related mechanisms of HAD, the main ingredients such as Cordyceps Militaris and Santisigu Tuber, and its main effective components cordycepin and colchicin, respectively.

Methods: We cultivated Calu6 and MCF-7 cells and gave them phosphate-buffered saline extracts of HAD, each ingredient of HAD, and the main effective components of each ingredient. After these processes, we performed MTT assay, BrdU assay, TUNEL assay, SDS-PAGE and Western blot analysis and observed the results.

Results: The survival rate of these two cancer cells in HAD were 34-38%. The survival rate in extract of Cordyceps militaris (ECM) and extract of Santisigu tuber (EST) were both about 50%. Cordycepin showed decreased survival rate in both cancer cells, 32% and 89%. Colchicin also showed decreased survival rate, 30% and 16%. We observed that all of the cancer cells got apoptotic bodies after adding the extracts and they have more apoptotic bodies when they were exposed to more extracts. The expression of caspase-3 was increased in Calu6 cell lines treated with the ECM, cordycepin and colchicin. The expression of p53 and p21 were increased in the MCF-7 cell lines treated with the ECM and cordycepin.

Conclusions: HAD showed cytotoxic activities on the two kinds of human cancer cell lines, Calu6 and MCF-7. Additionally, HAD and its main ingredients caused a dose-dependent inhibition of cell proliferation and induced the apoptotic cell death.

Key Words : *Cordyceps militaris*, *Santisigu tuber*, cordycepin, colchicin, Calu6, MCF-7

• Received : 27 April 2009 • Revised : 30 June 2009 • Accepted : 6 July 2009

• Correspondence to : 최선주(Sun-Ju Choi)
대전시 유성구 대덕대로 1045 한국원자력연구원
Tel : +82-42-868-8449, Fax : +82-42-868-8448, E-mail : choisj@kaeri.re.kr

• Correspondence to : 유화승(Hwa-Seung Yoo)
대전시 서구 둔산동 1136 대전대학교 둔산한방병원 동서암센터
Tel : +82-42-470-9132, Fax : +82-42-470-9006, E-mail : altyhs@dju.ac.kr

These correspondence authors contributed equally to this work.

서 론

현재 인류의 사망원인으로 암이 차지하는 비중이 계속 증가하고 있으며, 우리나라에서도 사망 질병 원인 중 수위를 차지하고 있다. 이에 암의 예방과 치료법에 대한 연구가 전 세계적으로 중요한 연구 과제가 되고 있다. 수술 요법, 방사선 요법, 화학 요법에 의한 현재의 치료법은 제한적이거나 상당한 효과를 얻고 있지만 심각한 부작용을 야기하는 단점이 지적되고 있다. 이를 위해 기존의 부작용을 보완할 수 있는 천연 물질로부터 항암물질을 추출하려는 연구가 이루어지고 있다¹⁻²⁾. 국내에서는 민간 및 한방에서 여러 종류의 약용식물을 암 치료 및 면역증강의 목적으로 사용하여 왔고 한의학에서의 오랜 임상 경험을 바탕으로 생약 등 천연 물질의 투여에 대한 부작용 검증이 부분적으로 실시되어 왔다고 할 수 있다. 한방에서 사용되는 항암치료제는 임상적 경험을 통하여 그 효능 및 치료효과가 어느 정도 인정되고 있으나 체계적이고 과학적인 근거 자료가 부족한 실정이다.

대전대학교 둔산한방병원 동서암센터에서 면역증진과 암의 전이억제를 목적으로 개발된 항암단 (Hang-Am-Dan, HAD)은 의이인, 삼칠근, 해마, 동충하초, 산자고, 인삼, 우황, 진주분, 사향을 주요 구성 성분으로 하여 항종양 및 암 전이 억제 효과에 대한 임상적, 실험적 효능이 보고되어 왔다. 임상적

으로는 위암, 대장암 등의 재발전이 억제에 있어서는 유의성 있는 것으로 보고되고 있고³⁻⁶⁾, 신생혈관의 억제 및 암전이 유전자인 Matrix Metalloprotenase (MMP)-2 와 MMP-9의 유전자 발현을 현저하게 억제시킴을 실험적으로 입증하였다⁷⁾.

항암단의 주요 구성 성분 중, 개별 성분에 대한 실험적 효능이 보고 된 바 있으나 생약으로부터 추출된 순수 항암 유효 물질에 대한 분석이 미흡한 실정이다⁸⁻¹⁰⁾. 이에 저자는 항암단 및 구성 성분의 각종 고형 암에서의 항종양 효과를 알아보기 위해 몇몇 실험적 방법을 수행하였다. 항암단의 주요 구성 성분의 추출물의 경우 사전 실험을 통하여 의이인, 삼칠근, 동충하초, 인삼 및 산자고에서 유의성 있는 결과를 얻었다. 이 중에서 동충하초와 산자고, 그리고 이들의 항암 유효 성분인 코디세핀 (cordycepin) 과 콜히친 (colchicin)을 중심으로 사람폐암세포주인 Calu6와 사람 유방암세포주인 MCF-7을 이용해 항종양 효과를 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재 및 시약

본 실험에 사용한 항암단은 대전대학교 부속한방

Table 1. Prescription of Hang-Am-Dan(HAD)

Botanical name of herb	Relative amount (mg)	main chemical
<i>Coicis Semen</i>	129.5	coixenolide
<i>Pseudoginseng Radix</i>	43.0	Ginsenoside Rb1, Rg1, Rg2
<i>Hippocampus</i>	13.0	-
<i>Codyceps Militaris</i>	13.0	Cordycepin
<i>Santsigu Tuber</i>	13.0	Colchicin
<i>Ginseng Radix</i>	13.0	Ginsenoside
<i>Bovis Calculus</i>	8.5	Cholic acid
<i>Margarita</i>	8.5	Calcium
<i>Moschus</i>	8.5	Muscone
Total amount (per 1 capsule)	250.0	

병원 동서 암센터에서 캡슐 형태로 제조한 내용물을 사용하였고, 항암단 내 개별 생약 성분들 역시 분말 형태로 제조하여 사용하였다. 항암단의 조성 내용과 용량은 다음과 같다 (Table 1).

코디세핀 (Cordycepin, Cat. No. C-3394) 과 콜히친 (Colchicin, Cat. No. C-9754)은 Sigma에서 구매하였고 나머지 시약은 분자생물학 등급의 시약을 구매하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 EMEM, RPMI 1640 (Gibco), fetal bovine serum (FBS, Sigma), PBS (Sigma), Trypsin, tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma), BrdU cell proliferation assay kit (Chemicon Inc.), TUNEL assay kit (Roche) 이다.

2) 암세포 배양

실험에 사용한 사람 암세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받은 Calu6 (악성폐암 세포주), MCF-7 (유방암 세포주)를 사용하였다. 암세포 배양을 위해 10% FBS 와 1% penicillin 및 streptomycin 이 포함된 EMEM 및 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. MCF-7의 경우 RPMI 1640 배지를 사용하였고, Calu6는 EMEM 배지를 사용하여 배양하였다.

3) 항암단 및 주요 생약 성분 추출

항암단 및 주요 생약 성분들은 최종 농도의 10배 농도에 해당하는 적정량을 PBS에 녹인 후 상온에서 3시간 동안 추출한 후, 10,000rpm으로 10분간 원심 분리시켜 침전물을 제거 하였다. 이를 다시 0.45um 의 여과지를 이용하여 여과한 후 사용하였다. 동충하초와 산자고의 항암 유효 성분인 코디세핀 (cordycepin)과 콜히친 (colchicin)은 처리 농도의 10배에 해당하는 적정량을 PBS에 녹인 후 사용하였다.

4) MTT assay를 이용한 세포 증식률의 측정

세포 배양용 96 well plate에 Calu6, MCF-7의 세포를 well 당 5×10^4 의 수로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 PBS 추출물을 배지에 적정 농도로 처리 한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지에 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma)를 처리

한 후, 3시간 동안 CO₂ incubator에서 반응시킨 다음 MTT 반응 용액을 깨끗하게 제거하였다. 그 후 200ul 의 DMSO를 처리하여 well에 생성된 formazan 을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 3번의 측정값 (n=3)의 평균값과 표준오차를 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석하였다.

5) BrdU assay를 이용한 세포 증식률의 측정

세포 배양용 96 well plate에 Calu6, MCF-7의 세포를 well 당 5×10^4 의 수로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 PBS 추출물을 배지에 적정 농도로 처리 한 후 48시간 동안 배양하였다. 종료 4시간 전 배지에 500배 희석한 BrdU 20ul를 처리한 후, 4시간 동안 CO₂ incubator에서 반응 시켰다. 세포를 고정하고 DNA를 denaturation 시키기 위해 배지를 제거한 후, fixing solution을 200ul 처리한 후 상온에서 30분간 더 반응시켰다. Washing buffer로 3번 세척한 후, BrdU에 대한 1st antibody를 처리한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Washing buffer로 3번 세척한 후, peroxidase가 붙은 goat anti-Mouse IgG, 2nd antibody를 처리한 후 상온에서 30분간 반응 시켰다. Washing buffer로 3번 세척 및 증류수를 이용해 마지막 세척을 한 후, 건조시킨다. TMB peroxidase 기질을 첨가해 30분간 반응 시킨 후, acid stop solution을 이용해 반응을 중지시켰다. ELISA reader로 450/550nm에서 흡광도를 측정하였다. 3번의 측정값 (n=3)의 평균값과 표준오차를 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석하였다.

6) TUNEL assay

세포 배양용 96 well plate에 Calu6, MCF-7의 세포를 well 당 5×10^4 의 수로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 PBS 추출물을 배지에 적정 농도로 처리 한 후 48시간 동안 배양하였다. PBS buffer를 이용하여 세척한 후, fixation 용액을 well 당 100ul 씩 첨가해 상온에서 1시간 동안 반응 시켰다. PBS 세척 후 permeabilization 용액을 well 당 100ul씩 첨가해 저온(2-8°C)상에서 2분간 반응 시켰다. 다시

PBS세척 후, TUNEL reaction mixture를 50ul씩 처리해 어두운 상태로 37°C에서 60분간 반응시켰다. PBS로 세척 후, 형광현미경을 이용해 형광을 측정하였다.

7) SDS-PAGE 및 Western blot analysis

세포 배양용 6 well의 각 well 당 5×10^5 cells/2ml 정도로 각 암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 각각의 PBS 추출물을 적정농도로 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어내고 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 50-100ul 의 RIPA buffer (protein extraction solution, pH 8.0)을 첨가한 후 4°C에서 30분간 반응시켰다. 4°C 13,000rpm으로 10min 간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-rad 단백질 정량 시약을 사용하여 측정하였고, 각 sample의 동량을 SDS-PAGE 하였다.

단백질 발현 분석을 위한 Western blot analysis를 위하여 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane에 electroblotting하고, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 넣고 상온에서 2시간 정도 incubation 하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking 을 실시하고 PBS-T로 15분(5분간 3번씩) 정도 세척하였다. 세척 후 1차 항체 (PBS-T에 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)을 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 overnight시킨 다음 PBS-T로 세척 (15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 적절한 2차 항체 (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척 (10분간 3번 및 5분간 3번)하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양상을 비교 분석하였다. 본 실험에 사용된 p53, p21, cyp32, Bcl2의 1차 항체와 2차 항체로 사용된 peroxidase-conjugated immunoglobulin은 Santa Cruz Biotechnology Inc. 및 Calbiochem에서 구입하였다.

결 과

1. MTT assay 및 BrdU assay를 이용한 항암단 및 주요 구성 성분의 추출물이 암세포 사멸 및 증식에 미치는 영향

고형암세포인 Calu6와 MCF-7 두 종류의 암세포의 증식에 각 추출물의 영향을 알아보기 위하여 5×10^4 의 세포를 분주하여 밤새 안정화를 시킨 후, 적정 농도의 추출물을 배지에 첨가하여 48시간 동안 배양한 후, MTT assay 및 BrdU assay를 실시하였다.

MTT assay 결과 항암단 자체의 추출물 (HAD)은 두 종류의 암세포 모두에서 1mg/ml 이상 처리 시 유의성 있게 암세포 증식 억제 현상을 관찰 할 수 있었다. Calu6와 MCF-7은 10mg/ml 농도의 HAD에서 각각 38%, 34%의 세포 사멸이 확인되었다. 동충하초 추출물(Extract of *Militaris Cordyceps*, ECM)의 경우 0.1mg/ml의 농도에서 Calu6와 MCF-7에서 각각 47%, 51%의 세포 사멸이 확인되었다. 산자고 추출물 (Extract of *Santsigu Tuber*, EST)은 Calu6의 경우 0.1mg/ml의 농도에서 42%의 세포 사멸이, MCF-7에서는 1mg/ml의 농도에서 45% 정도의 세포 사멸이 확인되어 Calu6에서 좀 더 강력한 사멸 효과를 나타내었다. 동충하초와 산자고의 경우 각각 유효 항암 성분으로 코디세핀 (cordycepin)과 콜히신 (colchicin)이 알려져 있다. 각 유효 항암 성분의 암세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 동일한 조건으로 실험을 수행한 결과 코디세핀은 125uM의 농도에서부터 유의성 있게 암세포 사멸 효과를 확인할 수 있었고 (Calu6: 12%, MCF-7: 38%), 500uM의 농도에서 Calu6와 MCF-7에 각각 32%, 89%의 세포 사멸 효과를 나타내었다. 콜히신은 500uM의 농도에서 Calu6와 MCF-7에서 각각 30%, 16%의 세포 사멸 효과를 나타내었다 (Fig. 1).

BrdU assay를 통해 항암단 및 주요 성분의 세포 증식(cell proliferation)에 대한 억제 효과는 더 민감하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 항암단의 추출물은 Calu6와 MCF-7의 경우 0.1mg/ml의 농도에서

각각 41%, 31%의 세포 증식 억제 현상을 확인 할 수 있었다. 그 외 Calu6와 MCF-7의 암세포에 동충하초 추출물은 0.1mg/ml에서 51%, 79%의 세포 증식을 억제하였고, 산자고 추출물은 2mg/ml 이상에서 76%, 45%의 증식 억제 효과를 보였다. 코디세핀

은 200uM의 농도부터 (Calu6: 41%, MCF-7: 66%) 높은 증식 억제를 보였고, 콜히친 역시 25uM 이상의 농도부터 (Calu6: 72%, MCF-7: 50%) 높은 증식 억제를 보였다. (Fig. 2)

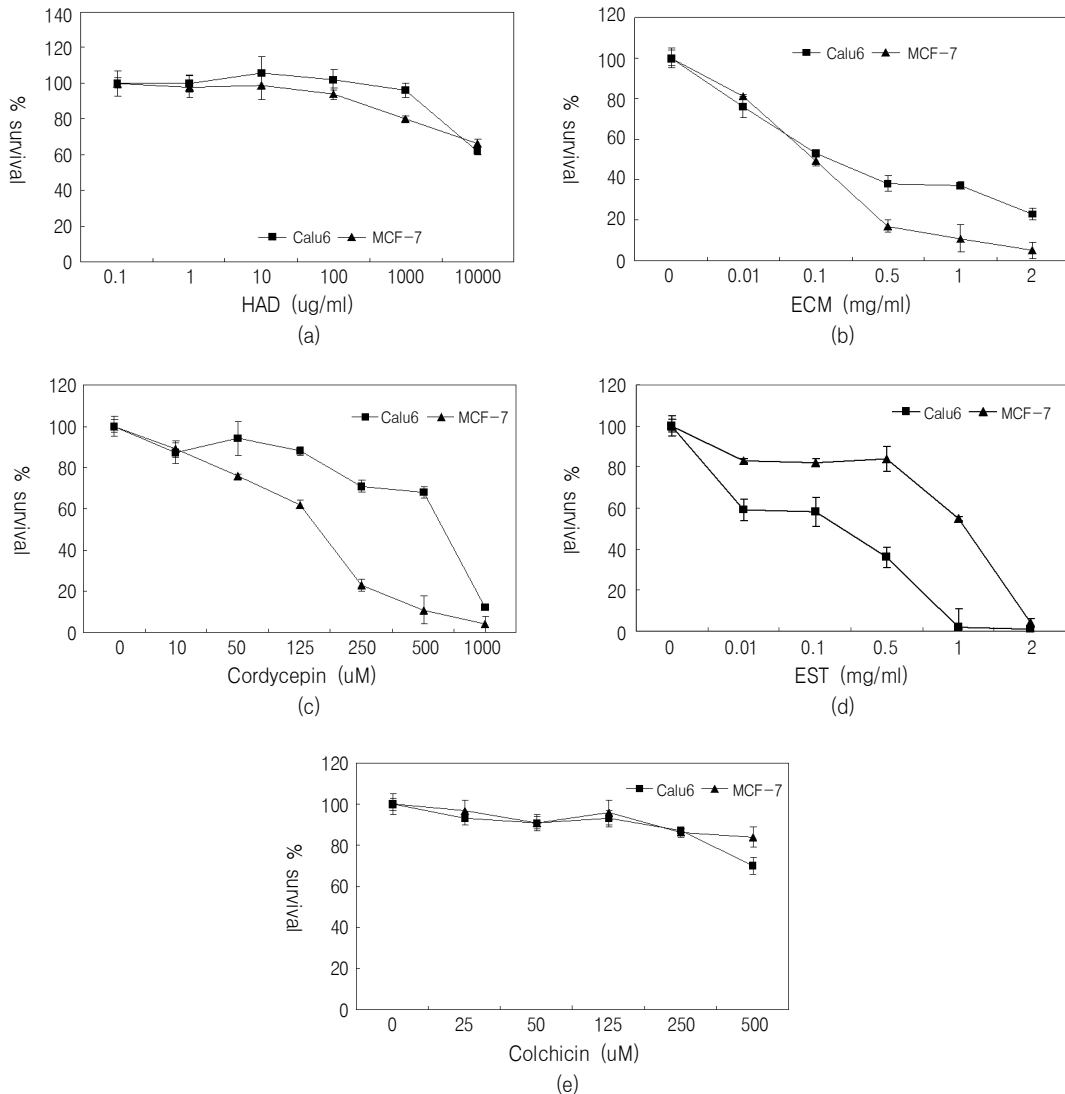


Fig. 1. Cytotoxic effect of PBS extract of HAD and other composition on the growth of Calu6 and MCF-7 cells. Cells were seeded as described in material and methods, and treated with various concentrations of PBS extract. After 48hrs incubation, MTT assay was performed. Data represent the mean of three independent experiments. (n=3) (a) Hang-Am-Dan (HAD), (b) Extracts of *Codyceps Militaris* (ECM), (c) cordycepin, (d) Extracts of *Santsigu Tuber* (EST), (e) colchicin, respectively.

2. TUNEL assay를 통한 apoptotic body 형성 분석

TUNEL assay는 세포 내에서 apoptotic 신호에 의해서 생기는 DNA fragmentation을 검사하는 방법으

로 HAD 및 주요 추출물의 처리로 인한 세포 사멸이 세포자멸(apoptosis)에 의한 것임을 알아보고자 수행하였다. 측정 결과 각 실험 군에서 추출물의 농도가 증가됨에 따라 높은 DNA fragmentation이 나

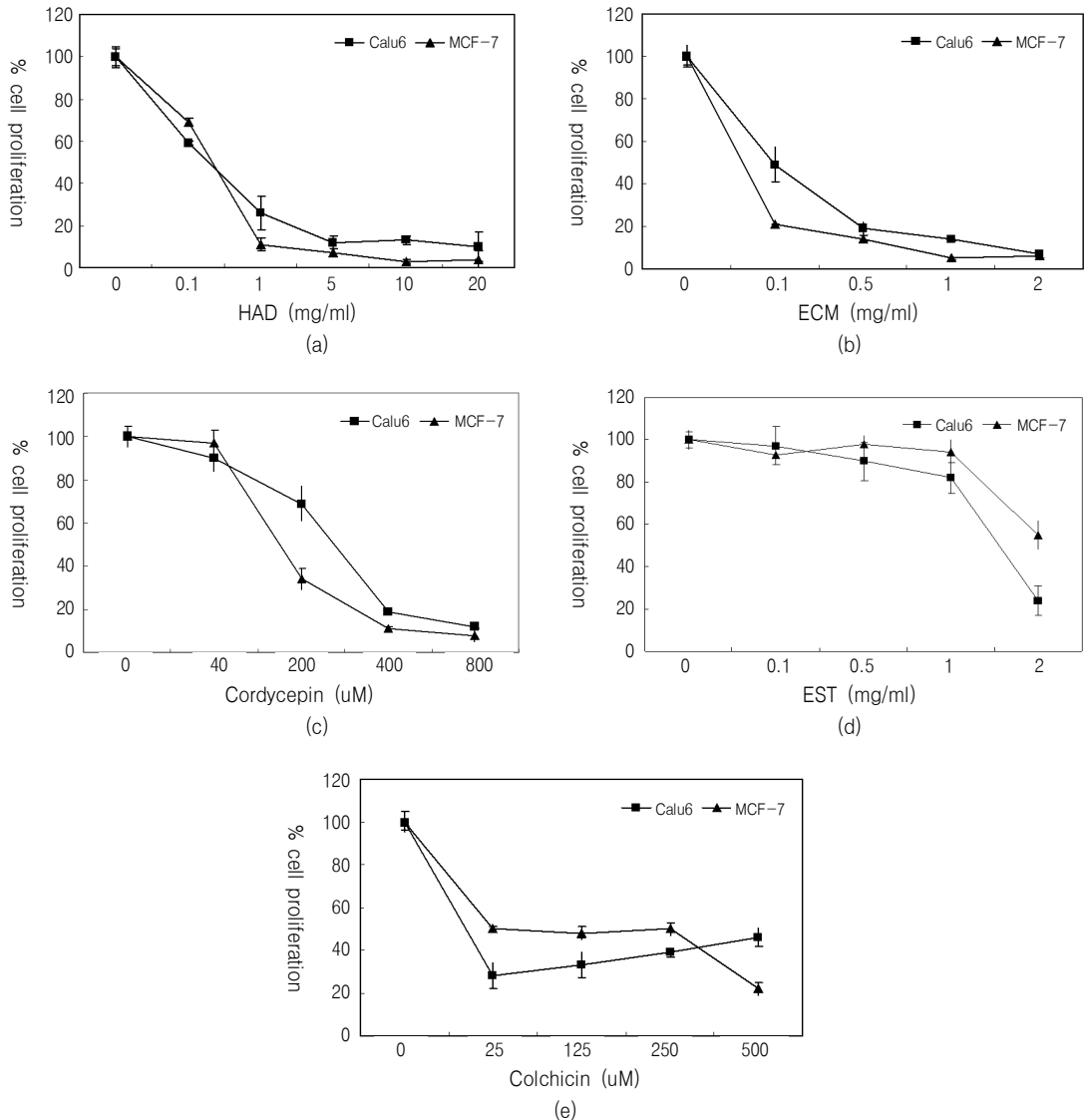
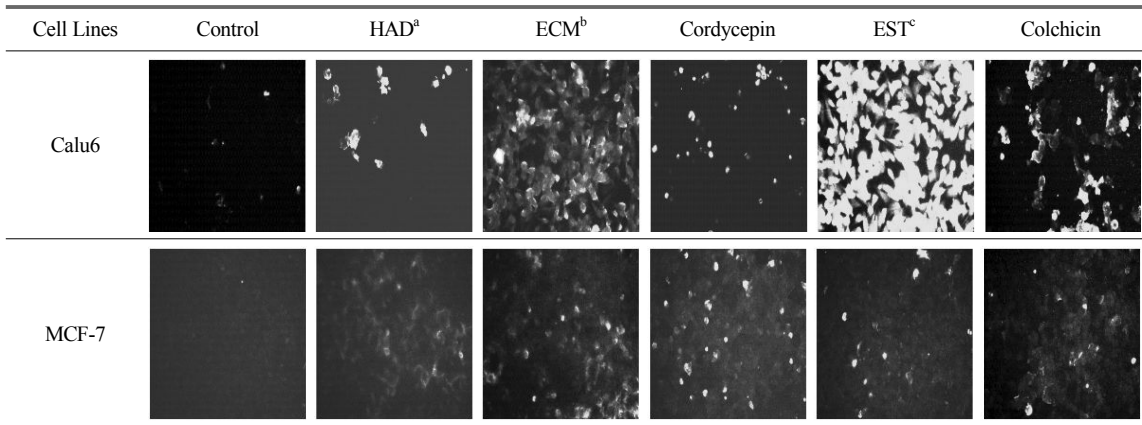


Fig. 2. Anti-proliferative effect of PBS extract of HAD and other composition on the growth of Calu6 and MCF-7 cells. Cells were seeded as described in material and methods, and treated with various concentrations of PBS extract. After 48hrs incubation, BrdU assay was performed. Data represent the mean of three independent experiments. (n=3) (a) Hang-Am-Dan (HAD), (b) Extracts of *Codyceps Militaris* (ECM), (c) cordycepin, (d) Extracts of *Santsigu Tuber* (EST), (e) colchicin, respectively.



^aHAD : Hang-Am-Dan

^bECM : Extracts of *Cordyceps Militaris*

^cEST : Extracts of *Santsigu Tuber*

Fig. 3. TUNEL assay. Calu6 and MCF-7 cells were treated with appropriate concentration of PBS extract for 48 hrs. Following treatment, cells were fixed, permeabilized and labeled with TUNEL reaction mixture to observe the extent of DNA damage as described in the materials and methods. The level of staining indicates the degree of DNA damage induced by treatment, where more positively stained cells are in the final stages of apoptosis. Magnification: 200×

타나 apoptotic body의 생성이 증가함을 보였다. MTT assay 결과를 통해 확인한 세포 사멸 및 증식 억제력을 하는 농도 구간을 처리하였고 항암단 및 주요 추출물의 처리 농도는 각각 HAD 추출물은 10 mg/ml, 동충하초 추출물은 0.1mg/ml, 산자고 추출물은 1mg/ml, 코디세핀은 500uM 그리고 콜히신은 500uM 이었다. TUNEL assay 결과 처리군이 대조군에 비교하여 면역염색이 됨을 확인 하였고 전반적으로 Calu6 종양세포에서 감수성이 높은 것으로 나타났다. 특히, 산자고의 경우 MCF-7보다 Calu6에서 apoptotic body의 밝기가 더 진한 것을 확인하였는데, 이는 종양 세포의 종류에 따라 감수성이 다름에 기인한 것으로 판단된다. (Fig. 3)

3. 세포 사멸과 관련이 있는 단백질의 발현에 미치는 영향

암세포 증식 억제 및 암세포 사멸 효과가 세포 사멸의 유도를 통한 것인지를 알아보기 위하여 항암 관련 단백질들인 p53, p21, caspase-3 및 Bcl-2의 단

백질 발현 수준을 western blotting을 이용하여 분석하였다. 세포 사멸을 유도하는 Bcl-2 계열의 단백질은 Bax, Bid, Bak, Bad 등이 있으며 세포 사멸을 억제하는 계열의 단백질들은 Bcl-2, Bcl-XL 등이 있다¹¹⁾.

Calu6의 경우 ECM과 코디세핀의 처리에 따른 caspase-3의 발현이 두 경우 모두 처리 농도에 따라 다소 증가됨을 확인 할 수 있었다. EST와 콜히신의 경우 콜히신의 경우에만 caspase-3의 발현 정도가 증가됨이 관찰 되었다. 그 외 p53, p21 그리고 Bcl-2 발현의 변화는 관찰 되지 않았다. 반면, MCF-7의 경우 ECM과 코디세핀의 처리에 따른 p53 및 p21의 발현이 농도에 따라 증가됨을 확인 하였지만 caspase-3, Bcl-2 발현의 변화는 관찰되지 않았다. (Fig. 4)

고 찰

항암단은 암환자들에게 단독 투여하여 항암제 치료 후의 부작용 감소와 전이 및 혈관형성 억제를 통한 치료효과를 증진시킬 목적으로 임상에서 사용하

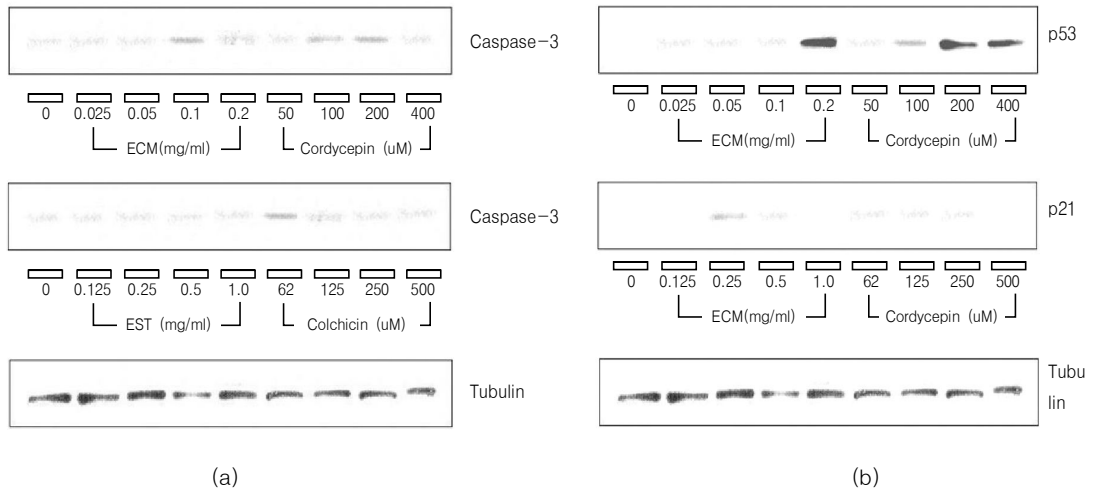


Fig. 4. Effects of PBS extract of composition on the expression of apoptosis related-proteins, p53, p21, Caspase-3. (a) Effects of ECM (Extracts of *Codyceps Militar*), cordycepin, EST (Extracts of *Santsiqu Tuber*) and colchicin treatment on the protein levels of caspase-3 in Calu6 (b) Effects of ECM and cordycepin treatment on the protein levels of p53 and p21 in MCF-7.

고 있다. 항암단의 개별 성분의 항암효과에 대한 실험적 보고가 있었으나 대부분 열수 추출물을 이용한 보고에 그치고 있고 이들의 항암 유효 물질과 함께 한 고찰은 이루어 지지 않았다. 본 연구에서는 면역 증진과 암의 전이억제를 목적으로 개발된 9가지 생약성분 복합물질인 항암단 (HAD) 과 사전 실험을 통해 주요 구성성분 중 동충하초와 산자고, 그리고 이들의 항암 유효물질인 코디세핀과 콜히신의 항암 효과와 기전을 규명하고자 하였다. 사전 실험을 통해 암의 종류에 따라 항암효과가 다르게 나타나는 것을 바탕으로 하여 본 실험에서는 처리 농도를 다양하게 사용하였고, 항암효과의 기전에 접근하기 위하여 세포 사멸 효과의 확인을 MTT 및 BrdU assay 를 이용하였고 세포 자멸을 확인하기 위하여 TUNEL assay 및 western blot 분석을 실시하였다.

우선 본 실험에서 기원이 다른 두 종류의 암세포주 즉, Calu6와 MCF-7 세포들을 대상으로 하여 처리 농도에 따른 세포 사멸 효과를 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과 항암단의 추출물의 경우 1mg/ml 이상의 농도 처리부터 유의성 있게 암세

포 사멸 효과를 확인 할 수 있었다. Calu6와 MCF-7 는 10mg/ml 농도의 항암단 추출물에서 각각 38%, 34%의 세포 사멸 효과를 확인하였다. 동충하초 추출물의 경우 0.1mg/ml의 농도 처리시 두 암세포주에 대해 47%, 51%의 높은 세포 사멸 효과를 확인하였다. 생약 복합물질인 항암단의 조성 중 동충하초의 함량 및 추출 조건 등을 고려했을 때 항암단 추출물 처리 시 결과와 동충하초 추출물의 단독 처리 시 나타난 결과로 세포 사멸 효과의 연관성을 확인할 수 있었다. 동충하초 및 주요 성분인 코디세핀은 혈관신생 및 종양 생성 억제 효과 및 고형암 성장 억제 및 면역 활성화 작용, 세포 자멸 유발에 의한 암세포 증식 억제 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 최근 동충하초 추출물을 분획하여 유효 항암 활성 성분이 코디세핀임을 밝히고 여러 사람 암세포주에 대한 세포 사멸 효과가 있음이 보고되었고¹³⁾, 동충하초에 포함된 코디세핀이 15.2%의 함량이 있음이 보고되었다¹⁴⁾. 코디세핀 처리에 의한 세포 사멸 효과는 125uM의 농도 처리 시 Calu6 와 MCF-7에서 각각 12%와 38%의 세포 사멸 효과를 나타내었

다. 동충하초의 자실체(버섯)와 기주(누에번데기)에는 각각 6.8%와 8.4%의 코디세핀 함량뿐 아니라 여러 다당류의 형태로도 코디세핀의 유사체가 보고되어 있는데¹⁴⁾ 이를 근거로 보았을 때 본 실험에서 사용한 동충하초 추출물의 효과가 코디세핀에 기인함을 확인할 수 있었다.

세포의 성장 여부 및 증식 억제를 탐색할 수 있는 방법은 여러 가지가 있지만 세포가 자라서 증식하는데 필수적인 DNA의 합성 여부를 확인하는 것도 도움이 된다. 세포 성장 중 새로 합성되는 DNA의 함량을 BrdU assay로 확인 한 결과 200uM의 코디세핀 처리 농도부터 (Calu6: 41%, MCF-7: 66%) 높은 증식 억제를 보였고 0.1mg/ml의 동충하초 추출물의 처리에서도 Calu6와 MCF-7에서 각각 51%, 79%의 증식 억제를 보였다. 동충하초의 주요 구성 성분인 코디세핀의 경우 DNA의 구성 성분인 핵산 아데노신의 리보오스 당의 3번 위치의 산소 원소가 없는 유사체로서 RNA 합성의 조기 종료에 관여하는 것으로 알려져 있다. BrdU assay 결과를 토대로 동충하초 추출물 및 코디세핀의 의한 DNA 합성 억제로 인한 세포 성장이 억제됨을 확인하였다.

산자고의 추출물의 처리에 따른 MTT assay 결과 Calu6의 경우 0.1mg/ml의 농도에서 42%의 세포 사멸이, MCF-7에서는 1mg/ml의 농도에서 45% 정도의 세포 사멸이 확인되었고 콜히신은 500uM의 농도에서 Calu6와 MCF-7에서 각각 30%, 16%의 세포 사멸 효과를 나타나 Calu6에서 좀 더 강력한 사멸 효과를 보였다. 산자고는 임상에서의 그 효능 및 치료 효과가 인정되고 암세포 감수성에 미치는 영향 및 흰쥐의 자연살해세포 활성화에 미치는 영향 등에 관한 실험보고가 있어왔지만 그 항암효과를 입증하지는 못했다¹⁵⁾. 다만, 산자고의 주요 성분인 콜히신이 투불린 단량체가 마이크로투불린 (microtubulin)으로 중합되는 것을 억제하는 것으로 알려져 있고 이를 통해 콜히신이 유사분열 중기에 방추체 형성을 저지해 염색체의 이동을 방해함으로써 빠른 세포 증식하는 암세포의 성장을 억제하는 것으로 그 기작을 이해하고 있다¹⁶⁾. 최근에는 콜히신의 유도체인 ZD6126

을 이용한 신생혈관 표적 치료제의 임상시험이 보고되고 있다¹⁷⁾. BrdU assay 결과 산자고 추출물은 2mg/ml 이상에서 세포 증식 억제 효과를 보였지만, 콜히신의 경우 25uM의 농도에서부터 높은 증식 억제를 보였다 (Calu6: 72%, MCF-7: 50%). 항암단에 포함된 산자고는 *Santsigu Tuber*의 식물로서 본 실험에서 사용한 산자고 추출물속에 포함된 콜히신의 함량을 확인 할 수 없어서 정확한 평가가 어려웠다. MTT assay와 BrdU assay 결과를 단순 비교 했을 때 콜히신 단독 처리시 세포 분열을 억제함에 있어서의 효과는 확인이 되었으나 세포 사멸의 결과는 더 높은 농도의 콜히신의 처리가 필요하였다. 이에 반해, 산자고 추출물의 경우 낮은 농도의 처리에도 Calu6가 더 민감하게 세포 사멸이 이루어짐을 확인 하였으나 세포 증식 억제에 있어서는 높은 농도의 처리가 필요해 산자고 추출물의 콜히신 함량 뿐 아니라 또 다른 요소가 영향을 끼침을 예상 할 수 있었다. 이에 따라 산자고를 항암제 개발 약물로 연구를 진행함에 있어서, 먼저 산자고의 기원 식물에 대한 분자학적 정리와 주요 성분인 콜히신의 함량 및 유효 항암 물질에 대한 연구가 선행되어야 한다고 사려 된다.

HAD 및 주요 추출물의 처리로 인한 세포 사멸이 세포사멸(apoptosis)에 의한 것임을 알아보고자 MTT assay 결과를 통해 확인한 세포 사멸 및 증식 억제를 하는 농도 구간을 처리하여 TUNEL assay 및 western blot 분석을 수행하였다. TUNEL assay 결과 대조군에 비하여 면역염색이 처리 농도에 따라 증가함을 확인하였고, 전반적으로 Calu6 종양세포에서의 감수성이 높은 것으로 나타났다. 특히, 산자고의 경우 Calu6에서 높은 DNA fragmentation이 나타나 apoptotic body의 생성이 증가함을 확인하여 MTT assay 분석결과와 비교 했을 때 산자고 추출물 내에 콜히신 외에 유효 성분의 존재 여부를 예상 할 수 있다. Western blot 분석의 결과 Calu6의 경우 동충하초 추출물, 코디세핀 그리고 콜히신의 처리에 따른 caspase-3의 발현이 다소 증가됨을 확인 할 수 있었고 그 외 p53, p21 그리고 Bcl-2 발현의 변화는

관찰 되지 않았다. 동충하초 및 코디세핀의 의한 caspase-3 발현의 증가를 비교 할 때 동충하초 추출물의 효과는 코디세핀에 기인한 것으로 판단 할 수 있다. MCF-7의 경우에는 Calu6의 결과와 달리 동충하초 추출물과 코디세핀의 처리 시 p53이나 p21의 발현 증가가 관찰되었다. 이는 동충하초 추출물이나 코디세핀이 암세포의 종류에 따라 다른 경로로 세포 자멸이 이루어짐을 시사 한다고 할 수 있다.

이상의 다양한 실험적 결과들을 통해 항암단은 그동안의 임상적 결과들과 마찬가지로 유효한 항암 효과를 나타내었고 특히 주요 구성성분 중 동충하초와 산자고에서 그 효과가 우수한 것으로 나타났다. 이들의 항암 유효 물질인 코디세핀과 콜히신의 항암 효과를 확인하였으며, 본 연구 결과를 통해 향후 항암단의 암치료에 활용 할 수 있는 근거와 주요 성분을 이용한 새로운 항암약의 개발에도 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 본 연구 결과를 토대로 항암 유효 물질의 병용투여나 항암단의 조성 변화를 이용한 연구 및 임상적 고려로 보다 발전된 암치료 방법을 모색 할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 대전대학교 둔산한방병원 동서암센터에서 면역증진과 암의 전이억제를 목적으로 개발된 9가지 생약성분 복합물질인 항암단 (HAD)과 주요 구성 성분 중 동충하초와 산자고, 그리고 이들의 항암 유효 물질인 코디세핀과 콜히신의 항암 효과를 알아보았다. 추출물과 항암 유효 물질들의 처리에 의한 세포 사멸 및 증식 억제 효과는 처리 시간과 농도에 비례하여 증가하였으나 암의 종류에 따라 다소간의 차이가 있었다. 또한 세포 사멸과 관련 있는 단백질들의 발현 차이를 분석 한 결과 암의 종류에 따라 항암효과의 기전이 다르게 나타남을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Lee DK, Kim BS, Lee SG, Gwon HJ, Moon EY, Hwang HS, et al. Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation. *Anticancer Research*. 1998;18(1A):119-24.
2. Park JH, Shon HS, Sung HK, Liu Y, Kim JY, Sung EK, et al. Anti-tumor effect of green tea catechin on cancer cell lines. *The Korean J. Anat*. 2000;33(4):447-58.
3. Yoo HS, Son CG, Cho CK. Antitumor Effects of HagnAmDan (HAD) on 55 Patients with Advanced Gastric Cancer. *Korean Journal of Oriental Medicine*. 2001;2(1):77-88.
4. Lee YY, Seo SH, Yoo HS, Choi WJ, Cho JH, Lee YW, et al. The clinical study in 83 cases for large intestine cancer patients on the effects by Hangamdan The J. Korean Orient. *Oncol*. 2000;6(1):165-80.
5. Yoo HS, Choi WJ, Lee YY, Seo SH, Cho JH, Lee YW, et al. The clinical study in 105 cases for stomach cancer patients on the effects by Hangamdan. *J fo daejeon university oriental hospital*. 2000;9(2):7-25.
6. Yoo HS, Lee YY, Song KC, Choi BL, Seo SH, Cho JH, et al. The effects of hangamdan(HAD) on anti-metastasis and preventing relapses, administered to 69 cancer patients. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2002;23(2):165-73.
7. Kim SD. Study on the anti-metastasis and immune activity of HangAmDan. [dissertation]. Daejeon University Graduate school; 1999.
8. Ha JW, Yoo HS, Shin JW, Cho JH, Lee NH, Yoon DH, et al. Effects of Cordyceps Militaris Extract on Tumor Immunity. *Korean Journal of Oriental Medicine*. 2006;27(4):12-29.
9. Yoo HS, Shin JW, Cho JH, Son CG, Lee YW, Park SY, et al. Effects of Cordyceps militaris extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2004;25(5):657-65.

10. Hong SH, Park DI, Seo SH, Choi YH. Anti-proliferative effects by aqueous extract of *Cordyceps militaris* in human leukemic U937 cells. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2005;19(2):452-8.
11. Tsujimoto Y. Bcl-2 family: life-or-death switch. Biosci Rep. 2002;22(1):47-58.
12. Yoshikawa N, Yamada S, Takeuchi C, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M, et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits the growth of B16-BL6 mouse melanoma cells through the stimulation of adenosine A3 receptor followed by glycogen synthase kinase-3 β activation and cyclin D1 suppression. *Nauuyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2008;377(4-6):591-5.
13. Lim HW, Kwon YM, Cho SM, Kim JH, Yoon GH, Lee SJ et al. Antitumor activity of *Cordyceps militaris* on human cancer cell line. *Kor. J. Pharmacogn.* 2004; 35(4):364-7.
14. Yeon SH. The chemical composition and biological activities of *Cordyceps militaris* [dissertation]. Seoul national Univ.; 2000.
15. Kim SR, Ryu BH, Ryu KW, Park DW. Study of anti-cancer effects of *Cremastrae Appendiculatae* Tuber on stomach cancer cells. *J. Korean Oriental Med.* 2001;22(2):75-83.
16. Borish GG, Taylor EW. The mechanism of action of colchicine-binding of colchine-3H to cellular protein. *J. Cell. Biol.* 1967;34:533-48.
17. Goto H, Yano S, Zhang H, Matsumori Y, Ogawa H, Blakey DC et al. Activity of a New Vascular Targeting Agent, ZD6126, in Pulmonary Metastases by Human Lung Adenocarcinoma in Nude Mice. *Cancer. Research* 2002;62(13):3711-5.