

## 반모가 수종의 인체 암세포에 미치는 영향

정명채, 김진성, 윤상협, 류봉하, 류기원  
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

---

### Study of *Mylabris Phalerata* on Anti-cancer Effects in Some Kinds of Cancer Cells

Myung-Chai Jung, Jin-Sung Kim, Sang-Hyub Yoon, Bong-Ha Ryu, Ki-Won Ryu

Department of the 3rd Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

**Object :** Objective: This study was conducted to investigate the anti-cancer effects of *Mylabris phalerata* (斑蝥) in some kinds of cancer cells.

**Materials and Methods:** Some kinds of cancer cells lines were treated. We used nine kinds of cancer cell lines, such as stomach cancer cells (Kato), lung cancer cells (Calu-1, NCI-H1395), urinary bladder cancer cells (HS789T), bone cancer cells (Saos-2), brain cancer cells (SK-N-MC), liver cancer cells (Hep-G2), skin cancer cells (Mo-1) and prostate cancer cells (PC-3) with the water decoction of *Mylabris phalerata*. The histological changes of all cell lines in the media (RPMI-1640) containing the decoction of *Mylabris phalerata* were observed and we examined cell death assay by trypan blue exclusion testing was examined. Finally, the change of mitochondrial membrane potential was measured and the inhibitory effect of *Mylabris phalerata* on cell increase was examined by analyzing the cell cycle.

**Results:** In histologic change all cancer cell lines showed withdrawn and floating appearance that is typical in cellular impairment. Most of the cell lines showed over 50% death rate after 24 hours in trypan blue exclusion tests. Especially the stomach, urinary bladder, brain and liver cell lines showed over 30% death rate after 12 hours. All cell lines treated with *Mylabris phalerata* were less stained than the control group and the mitochondrial membrane potential in the *Mylabris phalerata* treated cell lines was markedly lower than that in the control group. The measurement of DNA quantity in all cell lines showed the disappearance of the peak and the thickened left axis, which suggests that all cellular DNA degraded.

**Conclusion:** *Mylabris phalerata* had cytotoxicity on various kinds of cancer cell lines and the mechanism of that was the impairment of mitochondria by the breakdown of the mitochondrial cell membrane. We propose that this is in part attributable to the destruction of DNA in cancer cells.

**Key Words:** apoptosis, cell cycle, membrane potentials, antineoplastic agents, *Mylabris phalerata*

---

### 1. 緒 論

· 접수 : 2004년 4월 10일 · 채택 : 2004년 5월 6일  
· 교신저자 : 정명채, 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방  
병원 3내과 의사실  
(Tel. 02-958-9140 Fax. 02-958-9136, E-mail :  
mungz@daum.net)

암의 정복을 위하여 기존의 암 치료법뿐 아니라  
유전자 연구를 바탕으로 다양한 치료법이 개발되어

암의 특성에 따라 단독 또는 병용되고 있으나, 그 효능의 한계와 부작용으로 인하여 여러 가지 문제점이 야기되고 있다.

최근 세포증식과 세포사멸 사이의 균형 붕괴로 인해 암의 발생이 촉진된다는 기본 발병원리가 밝혀지고 이 과정에 다양한 유전자들에 의한 신호전달체계(signal transduction pathway)가 관여한다는 것이 알려지면서<sup>2</sup> 분자생물학적인 방법을 통해 암을 극복하기 위한 다양한 연구들이 국내외적으로 진행 중이다<sup>3</sup>.

한의학적 암치료는 암의 병인, 병위, 성질 및 환자의 상태에 따라 扶正固本法, 攻邪法 및 扶正祛邪法의 3가지로 나누어 볼 수 있는데<sup>4</sup>, 그 중 정상세포가 변형되어 급속도로 파급되는 암의 특성상, 行氣理氣, 活血化瘀, 清熱利濕, 軟堅散結하는 보다 강력한 祛邪藥劑의 개발이 시급한 실정이다.

斑蝥은 異名으로 斑猫라고 하며 芫青科에 속한 곤충인 南方大斑蝥의 건조체로, 破血散結, 攻毒蝕瘡하는 效能이 있다<sup>5</sup>. 실험적으로는 胃癌細胞株에 대한 增殖抑制와 殺傷效果<sup>6</sup>, 黑色腫에 대한 抗癌效果<sup>7</sup>, 四君子湯과 四君子湯加斑蝥의 比較研究<sup>8</sup>, 斑蝥 各部位의 胃癌細胞에 對한 效果<sup>9</sup> 등이 연구되어 斑蝥가 위암세포 뿐만 아니라 기타 암세포에도 유효할 것으로 사료되나, 이에 관한 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 斑蝥 檢液 투여 후 Stomach(Kato), Lung(Calu-1, NCI-H1395), Urinary bladder(HS789T), Bone(Saos-2), Brain(SK-N-MC), Liver(Hep-G2), Skin(Mo-1), Prostate(PC-3) 암세포의 형태학적 변화, trypan blue exclusion test를 통한 암세포 살상 효과, 암세포 mitochondria 막전위 변화 및 암세포주기에 대한 효과를 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### (1) 약재

실험에 사용한 약재는 芫青科(가뢰과; Meloidae)에 속한 昆蟲인 南方大斑蝥(*Mylabris phalerata*

**Table 1.** Characteristics of Cell Lines Used in Experiments

Cell Line Name	Tissue	Histopathology
Kato	Stomach	Adenocarcinoma
Calu-1	Lung	Squamous cell carcinoma
NCI-H1395	Lung	Adenocarcinoma
HS789T	Urinary bladder	Transitional cell carcinoma
Saos-2	Bone	Osteosarcoma
SK-N-MC	Brain	Neuroepithelioma
Hep-G2	Liver	Hepatocellular carcinoma
Mo-1	Skin	Squamous cell carcinoma
PC-3	Prostate	Adenocarcinoma

PALL.)의 건조체로, 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입, 정선한 후 사용하였다.

#### (2) 검액의 조제

斑猫 5g을 분쇄기를 이용하여 잘게 부순 후 증류수 100ml을 가해 30분간 전탕하였다. 그 전탕액을 여과기를 이용하여 고형성분을 제거한 후 여과액 100ml을 얻어 검액으로 하여 실험에 사용하였다.

#### (3) 대상 細胞株

이 실험에 사용한 인체 암세포는 한국 암세포주 은행에서 구입한 Stomach(Kato), Lung(Calu-1, NCI-H1395), Urinary bladder(HS789T), Bone(Saos-2), Brain(SK-N-MC), Liver(Hep-G2), Skin(Mo-1), Prostate(PC-3)의 암세포이며, 암세포주의 구체적인 특성은 Table 1과 같다.

## 2. 방법

#### (1) 암세포의 배양

癌細胞株는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, MD), 1% broad-spectrum antibiotics (Gibco BRL, MD)가 함유된 RPMI-1640(Gibco BRL, MD) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Precision Scientific Inc. NY)에서 배양하였고, 세포는 0.1% Trypsin-EDTA (Sigma, MD)를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

#### (2) 암세포의 형태학적 변화 측정

癌細胞株의 배지 1ml에 10 $\mu$ l의 검액을 투여하고 24시간 경과 후, inverted microscope (CK2, Olympus optical Co. LTD., Japan)하에서 형태학적 변화를 관찰하였다.

(3) 암세포 살상효과 측정 (Trypan blue exclusion test)

각 癌細胞株의 배지 1ml에 10 $\mu$ l의 검액을 투여하고 0, 6, 12, 24 및 48시간 경과 후, 각 세포를 회수하여 106/ml의 농도로 세포액을 제작하였다. 제작된 세포액, PBS (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4), 0.4% trypan blue (Gibco BRL, cat. No. 15250-061, USA)를 각각 0.5ml, 0.3ml, 0.2 ml로 섞고 5분간 방치한 후, 10분 이내에 푸르게 염색된 세포의 비율을 inverted microscope하에서 측정하였다.

(4) 세포 mitochondria 막전위 변화 측정

배양 중인 각 세포의 배지 1ml에 10 $\mu$ l의 검액을 투여하고 24시간 경과 후 세포를 회수하여 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 세척 후 200nM의 mitotracker (Mitotracker Red CMXRos, M-7512, Molecular Probes)로 37 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분간 배양하여 염색한 후, PBS로 5분간 3회 재세척하고 형광현미경 (Eclipse E800, Nikon, Japan)과 flow cytometer (유세포 분석기, FACScaliver, Becton Dickinson, CA, USA)로 mitochondria의 막전위를 측정하였다.

(5) 암세포주기의 변화 측정

배양 중인 각 세포의 배지 1ml에 10 $\mu$ l의 검액을 투여하고 48시간 경과 후 세포를 회수하여 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 세척 후, 70% ethanol로 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 고정시키고 PBS로 5분간 3회 재세척한 후 100 $\mu$ g/ml의 RNase A와 50 $\mu$ g/ml의 propidium iodide (Sigma P 4170)를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C 암실에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 완료 후 flow cytometer로 측정하면서 세포주기의 변화를 분석하였다.

(6) 통계 처리

유의성 검증은 Student's t-test를 이용하였으며, p value 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

### III. 成 績

#### 1. 암세포의 형태학적 소견

斑蝥가 인체의 9종 癌細胞株에 미치는 영향을 알

아보기 위해 배지 1ml에 10 $\mu$ g의 검액을 투여하고 24시간 후 inverted microscope 하에서 관찰하였다. 그 결과, 대조군의 경우 세포 배양 plate에 암세포 특유의 모양대로 부착되어 있으나, 실험군의 암세포는 손상을 입어 원형 모양으로 축소되며 plate에서 떨어져나와 부유되면서 사멸되는 전형적인 세포손상의 소견이 관찰되었으며, 각 細胞株別 약물처리 24시간 후 형태학적 변화는 Fig. 1과 같다.

이러한 변화로 볼 때 斑蝥는 인체 여러 癌細胞株에 대한 살상효과가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

#### 2. 암세포 살상효과 (Trypan blue exclusion test)

斑蝥의 시간 경과에 따른 9종의 癌細胞株에 대한 살상효과를 알아보기 위해 癌細胞株들에 검액을 처리하고<sup>6, 12, 24</sup> 및 48 시간동안 배양 후 trypan blue exclusion test를 시행하였다. 그 결과 실험에 사용한 9종의 癌細胞株 중 stomach(Kato), urinary bladder(HS789T), brain(SK-N-MC) 및 liver(Hep-G2) 癌細胞株의 경우 검액 처리 12시간 경과 후에 30% 이상 사멸되었고, 24시간 경과 후에는 lung(NCI-H1395), skin(Mo-1) 癌細胞株를 제외한 나머지 7종의 癌細胞株에서 50% 이상 사멸되었으며, 48시간 경과 후에는 9종의 암세포 모두 70% 이상 사멸되는 살상효과를 보여 검액은 시간이 경과함에 따라 9종의 인체 癌細胞株들에 대하여 높은 살상효과를 보였다 (Fig. 2 - 10).

#### 3. 세포 mitochondria 막전위 변화에 대한 효과

斑蝥의 인체 癌細胞株들에 대한 살상효과와 작용기전을 확인하기 위해 mitochondria의 막전위 변화를 측정하였다. 그 결과 대조군에서 세포내 mitochondria가 붉게 염색이 되었으나, 斑蝥를 처리한 실험군 세포들은 mitochondria가 손상을 받아 염색되지 않고 대조군에 비해 훨씬 어둡게 보이며 세포 형태의 구별이 어려운 세포 손상의 소견을 관찰할 수 있었다.

이의 정량적 분석을 위해 flow cytometer로 mitochondria 막전위를 측정해 본 결과, 대조군은 막

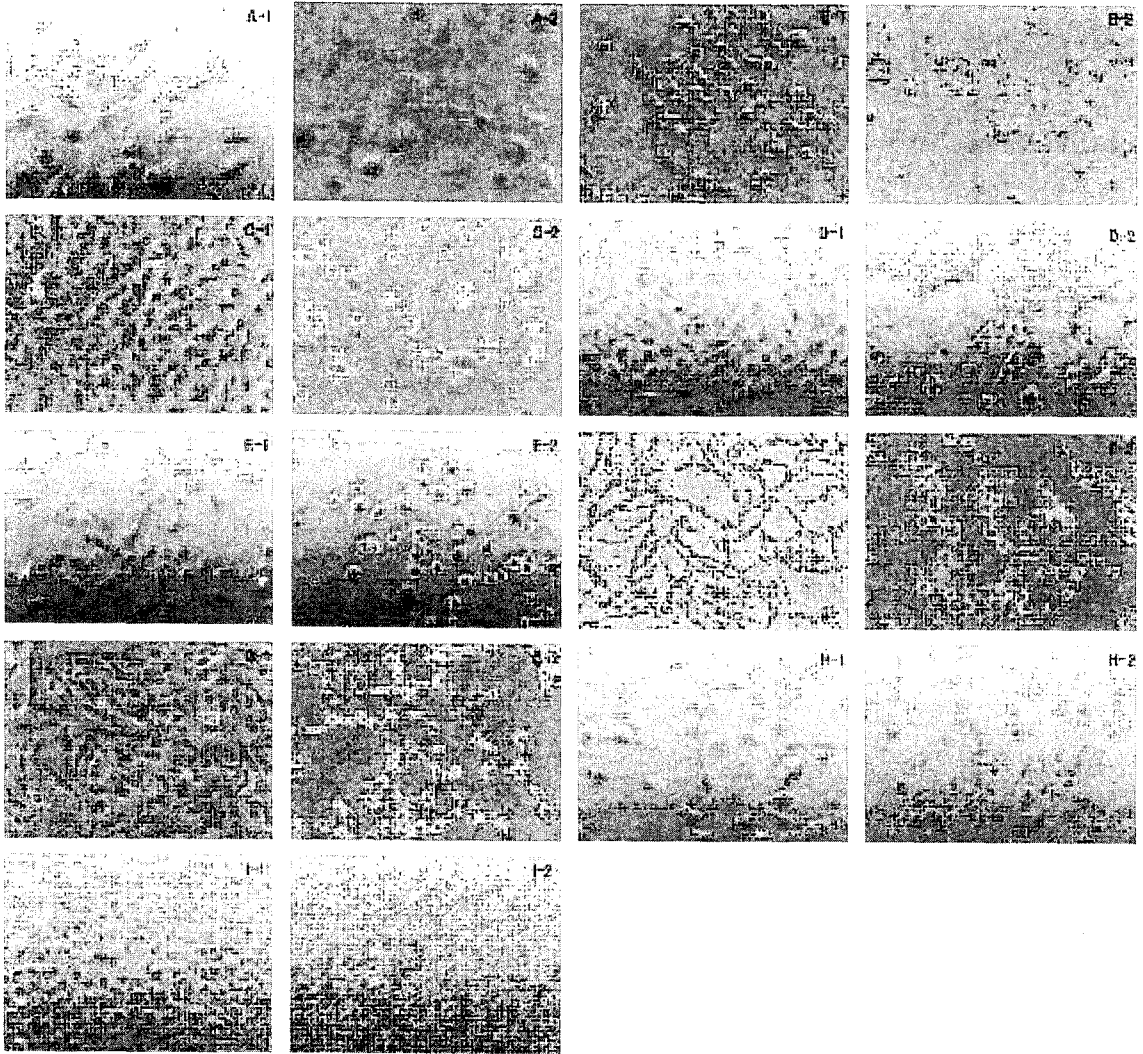


Fig. 1. Morphologic change of each cell lines.

- |                  |  |              |           |           |
|------------------|--|--------------|-----------|-----------|
| A. Kato          | B. Calu-1  | C. NCI-H1395 | D. HS789T | E. Saos-2 |
| F. SK-N-MC       | G. Hep-G2  | H. Mo-1      | I. PC-3   |           |
| 1. Control Group | 2. Sample Group treated by <i>Mylabris phalerata</i> |              |           |           |

전위도가 높게 나와 오른쪽으로 peak가 치우친 반면 실험군은 대조군에 비해 peak가 왼쪽으로 많이 이동되어 있어 현저히 막전위도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 11).

#### 4. 암세포주기에 대한 효과

DNA量 측정을 통해 각 세포의 특징적인 세포주

기를 分析할 수 있는 propidium iodide를 이용하여 9種의 癌細胞株에 대한 斑蝥의 殺傷효과 기전을 관찰하였다. 그 결과, 대조군은 보통의 癌細胞와 같이 2개의 peak를 보였으나, 검액을 처리한 실험군은 그러한 peak가 사라지고 그래프의 왼쪽이 두껍게 나타나 세포내 DNA들이 degradation 되었음을 알 수 있었다 (Fig. 12).

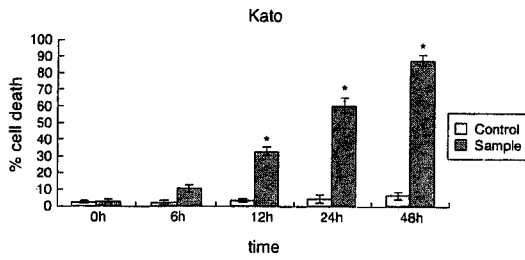


Fig. 2. Result of trypan blue exclusion test in Kato.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

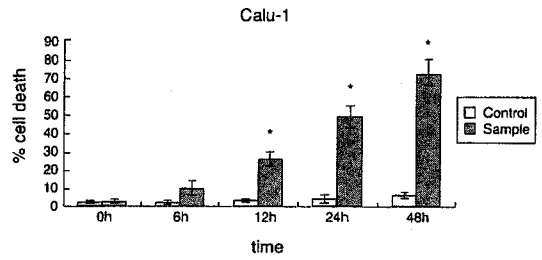


Fig. 3. Result of trypan blue exclusion test in Calu-1.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

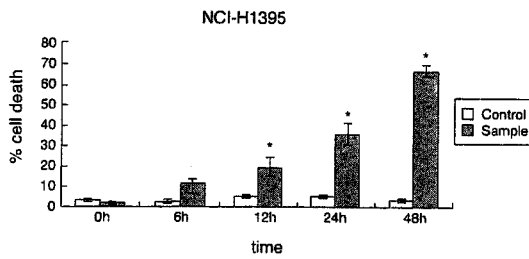


Fig. 4. Result of trypan blue exclusion test in NCI-H1395.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

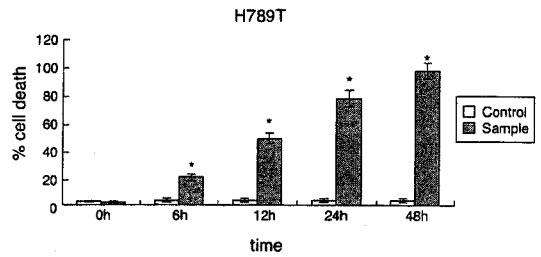


Fig. 5. Result of trypan blue exclusion test in HS789T.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 6h, 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

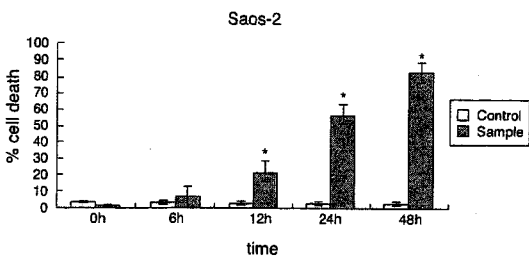


Fig. 6. Result of trypan blue exclusion test in Saos-2.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

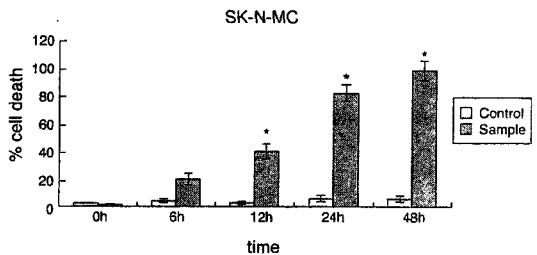


Fig. 7. Result of trypan blue exclusion test in SK-N-MC.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

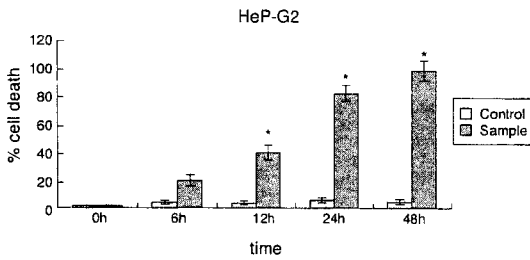


Fig. 8. Result of trypan blue exclusion test in Hep-G2.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

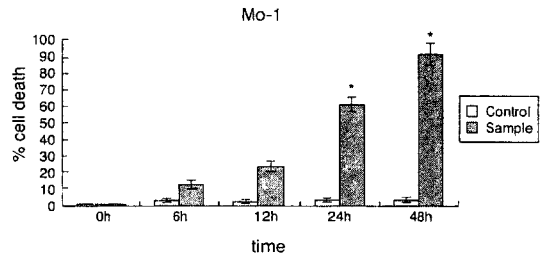


Fig. 9. Result of trypan blue exclusion test in Mo-1.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

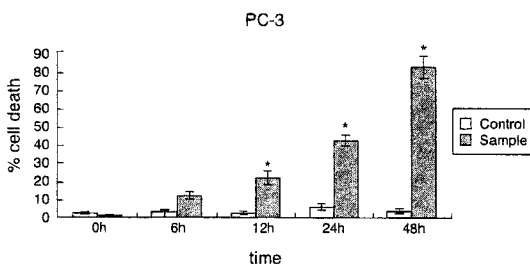


Fig. 10. Result of trypan blue exclusion test in PC-3.

There was statistically significant difference between control and sample groups in 12h, 24h and 48h. \*;  $p < 0.05$

骨文字 上에 '瘤' 字의 記載가 있었고 《靈樞 刺節眞邪篇》에서 筋溜, 腸溜, 昔瘤 等の 記載가 보이나, 實際로 宋代의 《衛濟寶書 卷上 癰疽五發一曰壘》 中에 "壘 疾初發 各無頭緒 只是肉熱痛 過一七或二七 忽然紫赤微腫 漸不疼痛 時顯軟熱紫赤色 只是不破 宜下大車皆散取之 然後服排膿敗毒托裏內補等散破 後用麝香膏貼之" 라 하여 그 腫塊가 岩石과 같이 단단하고 形상이 불규칙적이라는 의미로 '壘' 즉 '岩' 字에 疾病附를 붙여 제일 먼저 '瘤' 字가 使用되었다. 또한 《諸病源候論》에서는 "瘤者皮肉中忽腫起 初梅李大漸長大 不痛不痒 又不結強 言留結不散 謂之爲瘤" 라 하여 體內에 腫塊가 나타나 表面은 高低가 不平하고 質은 硬堅하고 바위를 硯어놓은 形態를 취한다고 하였다.

韓醫學에서는 癌에 對하여 一次的으로 乳岩, 腎岩, 苗贅, 舌菌, 失榮, 癭瘤 等과 같은 肉眼的으로 볼 수 있는 體表의 癌證과 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 崩漏, 帶下 等과 같이 內臟에 罹患된 癌證에 對한 記錄이 散在되어 있다. 이러한 癌證의 概念과 意味는 現代의 癌腫과는 完全히 一致하지는 않으나 體內에 나타나는 部位別 癌證에 符合되는 韓醫學의 病證 또는 病名이 있다.

例를 들면 噎膈은 食道癌, 噴門癌에 相當하고 反胃는 食道癌과, 癥積은 腹內 惡性腫瘍과, 脾積(痞氣)은 肝癌 및 肝脾腫大와, 肝積(肥氣, 癖黃)은 肝腫瘍

#### IV. 考 察

현대의학에서 '癌' 을 지칭하는 'Cancer' 는 게(蟹) 를 의미하는 라틴어 'Cancrum' 에서 유래된 용어이다. 즉 사망으로 침윤하여 어떤 곳이나 다리를 뻗쳐 橫行하는 放恣한 特徵을 형용한 것으로, 암이란 정상 세포와 비교할 때 악성세포 clone을 형성하고, 성장에 있어 정상적인 대사조절이 되지 않는 자발성을 지니고 있으며, 세포분화의 결핍이 있고 전이능력을 지니는 것을 特徵으로 하는 세포로 정의된다<sup>1)</sup>.

韓醫學 分野에서 腫瘍에 對한 文字記載는 殷墟甲

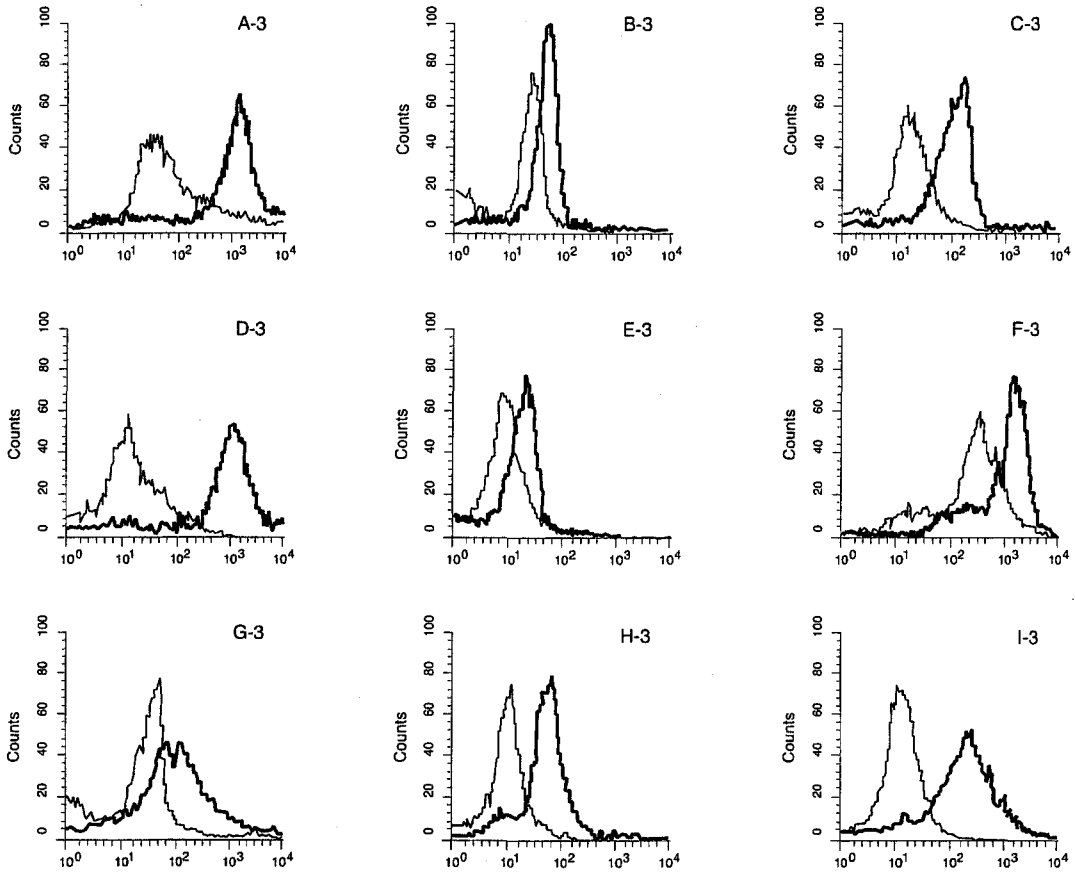


Fig. 11. Difference of membrane potential in each cell lines by Flow Cystometer.

A. Kato                      B. Calu-1                      C. NCI-H1395                      D. HS789T                      E. Saos-2  
 F. SK-N-MC                      G. Hep-G2                      H. Mo-1                      I. PC-3  
 (Thick Line; Control Group, Thin Line; Sample Group)

과, 肺積(息賁)은 肺癌과, 心積(伏梁)은 胃, 肝, 膽, 脾臟腫瘍의 範疇에 屬한다. 또한 失榮은 惡性淋巴腫瘍이나 頸部淋巴結節 轉移癌에, 上石疽는 頸部淋巴結節 轉移癌이나 惡性 淋巴腫瘍에 相當한다. 乳岩은 乳腺癌과, 嫉乳는 乳腺濕疹樣癌과, 石癭은 甲狀腺癌과, 腎岩은 陰莖癌과, 蟲脣은 脣癌과, 舌菌은 舌癌과, 喉百葉은 喉頭癌과, 五色帶下는 子宮頸部癌 末期 및 骨盤腔內 惡性腫瘍과, 骨疽는 骨 惡性腫瘍과 類似하며, 石丁, 黑丁, 鬚花瘡은 體表의 惡性腫瘍인 melanoma, 惡性潰瘍 等에 相當하고, 肉瘤, 肉色疽는 軟組織 惡性腫瘍에 相當한다<sup>4</sup>.

서양의학적으로 암의 발생인자는 크게 내적 인자와 외적 인자로 분류되는데, 내적 인자로는 유전적 요인, 인종과 지리학적 요인, 연령, 면역학적 인자 등이 있으며 외적 인자로는 다양한 화학적 발암물질, 방사선, 바이러스등이 있고<sup>4</sup>, 최근에는 유전적인 원인이 암 발생의 중요한 인자로 거론되고 있다<sup>5</sup>.

한의학적으로도 암의 병인은 外因과 內因으로 分類되며 外因은 外來의 風寒邪氣가 痰食之滯와 더불어 相互影響하여 형성하는 것이고, 內因은 七情 飲食 等으로 인해 形成된 機體의 陰陽失調와 正氣衰退가 癌證의 生成과 成長의 조건이 되어 痰結, 濕聚, 氣阻,

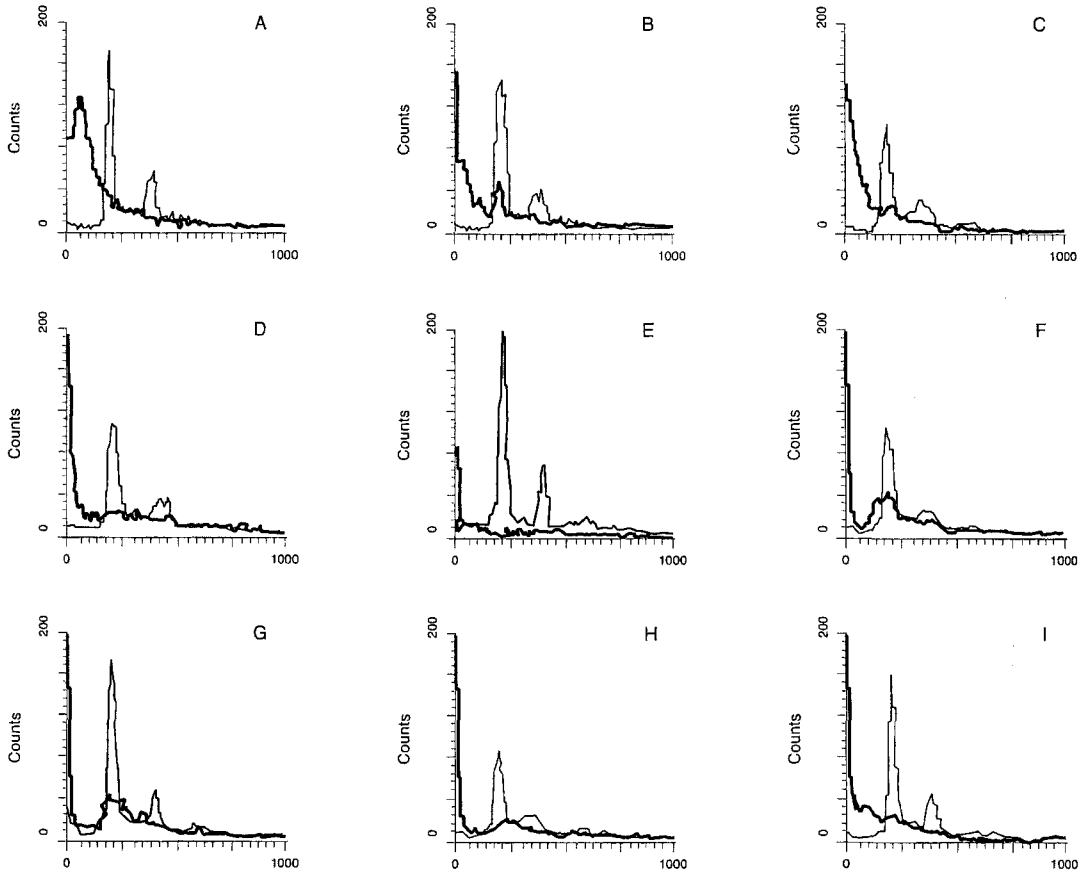


Fig. 12. Analysis of cell cycle in each cell lines.

A. Kato                      B. Calu-1                      C. NCI-H1395                      D. HS789T                      E. Saos-2  
 F. SK-N-MC                      G. Hep-G2                      H. Mo-1                      I. PC-3  
 (Thin Line; Control Group Thick Line; Sample Group)

血瘀, 鬱熱 등과 같은 一連의 病理 因子를 生成하여 正虛와 同時에 并存하여 相互因果關係를 이루어 惡性循環을 만들어내는 것으로 《內經》에서는 “營衛稽留 寒氣客於腸外與衛氣相搏”이라 하였다<sup>4</sup>.

최근 서양의학에서는 조기 진단에 의한 수술료법, 방사선료법, 항암제 등의 화학료법 및 유전자 치료 등이 시행되고 있으나, 이러한 치료법은 인체 정상조직과 기관에 강한 독성을 야기하여 소화장애, 골수기능감소, 면역기능저하, 염증반응 및 신체쇠약 등의 부작용을 발생시킨다. 그로 인해 그 실제적 효과는 그리 크지 못하다.

한의학에서는 단순히 補益藥을 위주로 하는 扶正固本法과 活血化瘀, 清熱利濕, 軟堅散結하는 攻邪法 및 扶正固本法과 癌細胞殺傷作用이 있는 藥物을 배합하거나 攻邪法을 加味하는 扶正祛邪法 등이 癌의 病因, 病位와 性質 및 病人의 狀態에 따라 使用되고 있다<sup>4</sup>. 지금까지 ‘養正則積自除’ 또는 ‘精氣虛則成癌’이라 하여 扶正祛邪法과 扶正固本法에 대한 研究<sup>16,17</sup>가 活潑히 이루어져 왔다. 그러나 祛邪法에 關해서는 하 등<sup>18</sup>의 香砂平胃散에 관한 研究, 이 등<sup>19</sup>의 血府逐瘀湯에 관한 研究 및 김 등<sup>20</sup>의 消積白朮散에 관한 研究 등 複合 處方에 관한 研究만 이루어져 癌細



胞에 직접 作用 할 수 있는 보다 強力한 祛邪劑의 開發이 時急한 實情이다.

斑蝥는 芫青科에 屬한 昆蟲의 乾死體로, 一般的으로 크기와 產地에 따라 大斑蝥와 小斑蝥로 분류된다. 本 실험에 사용한 斑蝥는 大斑蝥로 性味는 熱 有大毒하고 辛味를 가져, 肝胃腎으로 歸經한다. 斑蝥의 주 성분은 cantharidin ( $C_{10}H_{12}O_4$ )으로 약 1.2%가 함유되어 있으며, 이외에도 脂肪·樹脂質·蟻酸·色素 등을 함유하고 있으나 그 함량은 종류와 산지에 따라 다르다<sup>21</sup>. 斑蝥의 效能은 外用하면 攻毒死瘡를 治하고, 內服하면 破瘀散結한다고 알려져 있으며<sup>22</sup>, 攻毒蝕瘡, 破血散結, 逐瘀하는 효능이 있어 임상적으로 癰疽, 疔瘡, 疥癬, 頑癬, 狂犬咬傷, 斑蝥, 風濕痛, 神經痛을 치료하는데 사용하기도 한다<sup>23</sup>. 그러나 斑蝥는 有大毒하여 많은 문헌에서 體弱者, 孕婦, 소화성 궤양환자 및 신기능 부전환자에게 禁해야 한다고 하였다<sup>23,24</sup>.

이러한 독성에도 불구하고 斑蝥는 실험적으로 여러 가지 효능을 가지는 것으로 밝혀져, 柳<sup>6</sup>은 斑蝥가 胃癌細胞株에 대하여 增殖抑制效果 및 殺傷效果가 있음을 報告하였고, 張<sup>7</sup>은 山慈姑, 蟾酥, 斑蝥가 TXM<sup>18</sup> 黑色腫에 미치는 抗癌效果에 대한 연구를 통해 斑蝥의 抗癌效果를 보고하였으며, 鄭<sup>8</sup>은 四君子湯과 四君子湯加斑蝥를 비교 연구하여 斑蝥가 胃癌細胞株에 대하여 강한 細胞死滅誘導效果가 있음을 證明하였다. 또한 최근에는 朴<sup>9</sup>의 斑蝥 分割成分의 胃癌細胞에 대한 死滅效果 및 作用機轉에 關한 研究와 林<sup>10</sup>의 斑蝥 各部位에 따른 試驗管內 人體 胃癌細胞에 對한 效果 研究가 이루어져 斑蝥가 주로 胃癌細胞에는 研究되어 왔으나, 다른 種類의 癌細胞에 대한 研究는 부족한 실정이다.

이에 저자는 數種 人체 암세포에 대한 斑<sup>2</sup>의 항암 효과를 실험적으로 연구하고자 Stomach(Kato), Lung(Calu-1, NCI-H1395), Urinary bladder(HS789T), Bone(Saos-2), Brain(SK-N-MC), Liver(Hep-G2), Skin(Mo-1), Prostate(PC-3) 癌細胞株 배지 1ml에 10  $\mu$ l의 검액을 투여하고 24시간 경과 후 inverted

microscope下에서 형태학적 변화를 관찰하였다. 그 결과, 아무 처리하지 않은 대조군의 세포는 세포의 부착성을 유지하여 세포 배양 plate에 세포의 온전한 모양대로 부착되어 있으나, 검액을 투여한 실험군에서는 세포가 손상을 입어 동그란 모양으로 오그라들며 plate에서 떨어져 나와 浮游되며 死滅되는 전형적인 세포손상의 소견이 관찰되었다. 그러나 細胞株別 특이한 차이점은 없어 斑蝥가 실험에 사용된<sup>9</sup> 種의 細胞株들 모두에 同一한 기전으로 작용하였을 것으로 사료되며, 이러한 결과를 통해 數種의 人체 암세포에 대한 斑蝥의 殺傷효과를 확인할 수 있었다.

시간 경과에 따른 9종의 癌細胞株에 대한 殺傷효과를 관찰하기 위하여 癌細胞株의 배지 1ml에 10  $\mu$ l의 검액을 투여하고 0, 6, 12, 24 및 48시간 경과 후, 각 세포를 회수하여 trypan blue로 염색된 세포의 비율을 inverted microscope下에서 측정하였다.

Trypan blue exclusion test는 살아있는 세포의 경우 trypan blue에 염색되지 않고 투명하게 보이며 죽은 세포의 경우 파란색으로 염색되는 원리를 이용하여 현미경하에서 염색된 수를 세어 분석하는 방법이다<sup>25</sup>. 본 실험에 사용한 癌細胞株 중 stomach(Kato), urinary bladder(HS789T), brain(SK-N-MC) 및 liver(Hep-G2) 癌細胞株의 경우 검액 처리 12시간 경과 후에 30% 이상 사멸되었고, 24시간 경과 후에는 lung(NCI-H1395), skin(Mo-1) 癌細胞株를 제외한 나머지 7종의 癌細胞株에서 50% 이상 사멸되었으며, 48시간 경과 후에는 9종의 암세포 모두 70% 이상 사멸되는 殺傷효과를 보여 검액은 시간이 경과함에 따라 9종의 人체 癌細胞株들에 대하여 높은 殺傷효과를 보였다. 이러한 결과는 검액이 시간이 경과함에 따라 여러 人체 癌細胞株들에 대해 높은 殺傷효과를 갖는다는 것을 증명하는 것이며, stomach(Kato), urinary bladder(HS789T), brain(SK-N-MC) 및 liver(Hep-G2) 細胞株에 더 민감한 殺傷효과를 갖고 있음을 확인할 수 있는 결과이다.

apoptosis는 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질내 칼슘 농도 증가, 염색질의 응축, DNA의 분절형성, transglutaminase의

활성화 및 apoptotic body의 형성 등을 동반한다<sup>26</sup>. apoptosis를 유발되는 원인은 방사선과 같은 물리적 자극 및 다양한 화학적 자극에 의해 매개될 가능성이 제시되고 있다<sup>26</sup>. 또한 이러한 세포 변형의 과정에서 reactive oxygen species 역할이 증명되고 있다<sup>27</sup>. 이상의 실험 결과는 斑蝥 역시 다양한 인체 암세포에 대해 apoptosis를 유발하였고 이와 같은 세포내 기전을 통해 殺傷효과가 나타난 것으로 생각된다.

斑蝥가 인체 수종의 암세포주들에 높은 殺傷효과를 갖는다는 점을 확인하였고, 癌細胞株들에 대한 斑蝥의 殺傷작용의 기전을 연구하기 위해 각 세포에 배지 1ml에 10 $\mu$ l의 검액을 투여하고 24시간 경과 후 mitotracker로 염색한 후, 형광현미경과 flow cytometer로 mitochondria의 막전위 변화를 관찰하였다.

Mitochondria는 세포사멸 과정을 조절하는 역할을 담당하므로 mitochondria가 손상을 입어 막전위에 변화가 생기게 되면 세포는 에너지를 생산할 수 없게 되고 세포는 결국 죽게 된다<sup>28</sup>. 이러한 mitochondria에 의한 세포사멸 조절은 permeability transition pore (이하 PTP)라는 구조와 밀접한 연관이 있다. PTP는 mitochondria 내막과 외막이 만나는 부위에 존재하는데, voltage dependent anion channel (VDAC), adenosine nucleotide translocator (ANT), cyclophilin D라는 단백질로 구성되어 있다. 다양한 항암 성분은 PTP를 열리게 하며 이로 인해 cytochrome c가 세포질내로 유리되어 caspase-3/9를 활성화시켜 세포사멸을 유도한다. 이러한 PTP를 조절하는 기전으로 mitochondria 막전위가 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며, mitochondria 막전위의 소실은 PTP를 열게 되고 이는 세포사멸을 유도하는 신호가 된다<sup>29</sup>. 따라서 mitochondria 막전위를 조절하는 물질을 이용한 연구가 항암제 개발에 중요한 부분을 차지하게 된다.

Mitochondria의 막전위 변화를 측정하기 위하여, 본 연구에서는 각 암세포를 mitotracker로 염색 후 형광현미경과 flow cytometer를 사용하여 측정하였다. 세포가 손상을 받지 않은 경우 mitotracker는 mitochondria에 염색되어 형광현미경하에서 붉은색

으로 보이게 되지만 세포가 손상을 입어 mitochondria가 손상되면 mitochondria의 막전위가 감소하여 mitotracker로 염색했을 때 염색되지 않고 어둡게 보이게 된다.

본 실험에서 대조군에서는 세포에 손상을 입지 않아 세포내 mitochondria가 붉게 염색이 되어 세포에 붉은 점을 찍어 놓은 듯이 보이는 것과 달리, 검액을 처리한 실험군의 경우, 세포 손상으로 인해 mitochondria가 손상을 받아 염색되지 않고 대조군에 비해 훨씬 어둡게 보이며 손상을 많이 받은 세포일수록 세포의 형태를 구별하기 어려움을 관찰할 수 있었다. 이 결과를 정량적으로 분석하기 위해 flow cytometer로 mitochondria 막전위도를 측정해 본 결과, 대조군은 오른쪽으로 peak 이동이 많아 막전위도가 높게 나오나 실험군의 경우 대조군에 비해 peak가 왼쪽으로 많이 이동되어 있어 현저히 막전위도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 斑蝥는 9종 癌細胞株들의 mitochondria에 손상을 주어 살상효과를 갖는다는 것을 알 수 있었다.

세포의 악성화는 세포분열조절, 세포사 및 genomic DNA integrity의 유지 조절기능의 변조를 유발하는 일련의 유전자 변환에 의하여 일어나며, 이러한 변화는 결국 세포주기 변조의 형태로 나타나므로 암은 세포주기와 관련된 질환이라고 할 수 있다. 정상적인 세포는 G1, S, G2, M期の 4개의 세포주기 중 때 주기를 지날 때마다 확인점 (check point)이 존재하여, 이들의 확인을 거친 후에야 세포분열의 다음 단계로 넘어가게 되는데, 암세포에서는 이러한 기능이 저하되어 있거나 소실되어 있다고 알려져 있다. 따라서 이러한 세포주기의 변조에 의한 혼돈은 암세포의 세포생물학적 특징의 하나로, 이러한 세포주기 조절기전에 대한 연구가 癌의 병인 이해 및 치료 방안 마련에 중요한 역할을 한다<sup>30</sup>.

斑蝥가 인체 다양한 癌細胞株들의 세포주기에 미치는 영향을 확인하고자 각 세포 배지 1ml에 10 $\mu$ l의 검액을 투여하고 48시간 경과 후 propidium iodide로 염색하여 flow cytometer로 측정하면서 세포주기의 변화를 분석하였다. Propidium iodide(이하 PI)는

DNA binding dye로서, PI로 염색한 세포를 flow cytometer로 측정하면 각 세포에 대한 DNA 量을 측정하여 그 세포가 가지고 있는 G1, S, G2, M phase의 특징적인 peak가 보이게 된다.

본 실험에서는 대조군의 경우 보통의 암세포와 같이 2개의 peak를 보였으나 검액을 투여한 실험군은 그러한 peak가 사라지고 그래프의 가로축 왼쪽이 두 겹게 나타났다. 이러한 현상은 세포내 DNA가 모두 파괴되어 나타나는 현상으로 반모의 殺傷효과로 인해 인체 암세포들의 DNA들이 degradation 되었음을 확인할 수 있었다.

세포가 증식이 억제되고 죽게될 때도 세포주기가 본 실험과 같이 DNA가 모두 degradation 될 수 있지만, 세포주기 (G1, S, G2, M) 중에 어느 한 주기가 정지되어 죽게 되는 경우도 있다. 그와 같은 경우 해당하는 주기의 peak가 대단히 높게 나오게 되나, 본 실험의 결과는 그러한 세포주기 정지가 일어나는 것이 아니라 세포내 DNA가 degradation되어 죽게 된다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, 斑蝥은 인체 수증의 癌細胞株에 殺傷효과를 가지며, 그 기전으로는 암세포 mitochondria의 막전위를 떨어지게 하여 세포내 에너지를 만들어내는 중요한 기관인 mitochondria를 손상시킴으로서 세포를 죽게함과 아울러 세포내 DNA를 파괴하여 결국 세포주기에 변화를 가져옴으로써 강한 殺傷효과를 보인다는 것을 알 수 있었다. 향후 斑蝥의 농도에 따른 항암반응 등을 평가하는 추가적인 연구가 이루어질 경우, 한의학적 항암치료에 있어 祛邪劑로서의 斑蝥 사용량을 정하는데 보다 도움이 될 것으로 사료된다.

### V. 結論

斑蝥가 인체 암세포에 미치는 항암효과를 규명하기 위하여 斑蝥 검액을 Stomach(Kato), Lung(Calu-1, NCI-H1395), Urinarybladder(HS789T), Bone (Saos-2), Brain(SK-N-MC), Liver(Hep-G2), Skin(Mo-1) 및 Prostate(PC-3) 癌細胞株에 투여한 후 세포의 형태학

적 변화, trypan blue exclusion test를 통한 암세포 살상 효과, 세포 mitochondria 막전위 변화 및 암세포주기에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험군 암세포 모두 축소된 원형과 浮游 양상의 형태가 관찰되어 전형적인 세포손상의 소견을 나타내었다.
2. Trypan blue exclusion test에서 lung(NCI-H1395), skin(Mo-1) 癌細胞株를 제외한 암세포들은 斑蝥 검액 투여 24시간 후 50% 이상의 殺傷효과를 나타내었고, 48시간 경과 후에는 모두가 70% 이상의 암세포 殺傷효과를 나타내었다.
3. 실험군 암세포의 경우 mitochondria 손상으로 대조군에 비하여 약한 염색상을 보였으며, mitochondria 막전위 역시 모든 암세포에서 현저히 감소하였다.
4. 암세포주기에 대한 효과를 관찰하기 위해 propidium iodide를 이용한 DNA量 측정에서 모든 실험군 암세포에서 peak가 사라지고 그래프의 가로축 왼쪽이 두겹게 나타나 세포내 DNA들이 degradation 되었음을 나타내었다.

### 參考文獻

1. Wu L, Sato MD. Integrated, Molecular Engineering Approaches to Develop Prostate Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 2003;3(5):452-67.
2. Arany I, Chen SH, Megyesi JK, Adler-Storthz K, Chen Z, Rajaraman S et al. Differentiation-dependent expression of signal transducers and activators of transcription (STATs) might modify responses to growth factors in the cancers of the head and neck. *Cancer Lett.* 2003;199(1):83-9.
3. Tinini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 2003;22(42):6549-56.
4. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林書院;1995, 37-8, 84-93, p.142.
5. 全國 韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울:永林社;1998, p.646-7.

6. 류봉하, 김진성, 이지향, 박재훈, 지성길, 유진화. 수중 한약제의 위암세포에 대한 항암작용 효능 검색 및 약리작용에 관한 분자생물학적 연구. 대한한방중앙학회지. 1999;5(1):47-60.
7. 張聖恩, 山慈姑, 蟾酥, 斑蝥 가 TMX 18 黑色腫에 미치는 抗癩效果에 對한 研究. 慶熙大學校 韓醫科大學 碩士學位論文. 2001.
8. 鄭祐榮, 柳逢夏, 金珍成, 尹相協, 柳基遠. 四君子湯과 四君子湯加斑蝥 가 胃癌細胞에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌. 2001;22(4):579-87.
9. 朴宰民. 斑猫 分割成分의 胃癌細胞에 대한 死滅效果 및 作用機轉에 關한 研究. 慶熙大學校 韓醫科大學 博士學位論文. 2002.
10. 林鍾源. 斑猫 各 部位에 따른 試驗管 內 人體 胃癌細胞에 對한 效果. 慶熙大學校 韓醫科大學 博士學位論文. 2003.
11. 해리슨 번역 편찬위원회. Harrison's 내과학(Ⅱ). 서울:정담출판사;1997, p.1963-73.
12. 李岩. 腫瘤臨證備要. 北京:人民衛生出版社;1998, p.1-5, 19-24.
13. 李岩. 腫瘤臨證備要. 北京:人民衛生出版社;1998, p.1-5, 19-24.
14. 서울대학교 의과대학. 종양학. 서울:서울대학교출판부;1993, p.1-3.
15. 金東熙, 金聖勳. 抗癩劑 및 放射線 副作用에 대한 韓方治療. 大韓東醫病理學會誌. 1994;1:33-51.
16. 신병철, 이형구, 김병우, 유기원, 유봉하, 윤상협. 消癩去痰益氣湯의 抗癩效果에 대한 研究. 慶熙大大學院 博士學位論文. 2002.
17. 金榮權, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 六味地黃湯이 生理活性指標와 淋巴球細胞數에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1998;4(1):89-110.
18. 하지용, 조영호, 이지숙. 香砂平胃散이 抗癩 및 免疫調節作用에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌. 2000;6(1):47-66.
19. 李眞華, 沈範相, 安圭錫, 崔昇勳. 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1999;5(1):61-75.
20. 金泰運, 孫彰奎, 趙鍾寬. 消積白朮散이 Bleomycin의 副作用減少와 抗癩效果에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1999;5(1):77-101.
21. 李尙仁. 本草學. 서울:醫藥社;1975, 323-4.
22. 박미형, 조종관. 斑猫에 관한 문헌적 고찰. 大韓韓方內科學會誌. 1995;15(2):912-6.
23. 黃宮繡. 本草求真. 臺北:宏業書局有限公司;1981, p.247.
24. 新文豐出版公司編. 新編中藥大辭典(下). 臺北:新文豐出版公司;1983, p.1973-4.
25. Mark CW. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. The journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1999;47(9):1101-9.
26. 안성자, 박래길, 이상록, 정웅기, 나병식, 남택근등. 방사선 조사에 의한 HL-60 세포주의 Apoptosis 신호전달기전. 大韓腫瘍學會誌. 2000;32(1):156-67.
27. John H. Reactive oxygen species and cell signaling. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001;25(6):661-3.
28. Paolo B, Luca S, Raffaele C, Valeria P, Fabio DL. Mitochondria and cell death: mechanistic aspects and methodological issues. Eur J Biochem. 1999;264:687-701.
29. Martin C. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J. 1999;342:233-49.
30. 장정순, 강정훈, 박병규, 황상구. Wild-type p53 유전자 가 결여된 암세포에서 cyclic AMP의 세포주기 조절 기작에 관한 연구. 大韓腫瘍學會誌. 2000;332(4):750-6.