

위암세포 사멸에 미치는 겨우살이 추출물과 항암제의 효과

서울의료원 의학연구소 임상의학연구실, ¹서울의료원 외과, ²가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

이용직 · 허수학 · 신동규¹ · 강성구¹ · 김일명¹ · 김태희²

목적: 여러 암 치료의 보조 및 대체요법으로서 겨우살이 추출물은 주로 유럽지역에서 이십세기 초부터 널리 사용되었고 현재 국내에서도 항암 대체 치료제로 점차 사용하는 추세이나 그 항암 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구는 겨우살이 추출물이 위암에 미치는 영향을 세포주 실험을 통해 규명하였다.

대상 및 방법: 위암 세포주는 SNU-719 세포주를 사용하였고 처리한 겨우살이 추출물은 (주)한국 아보노바사로부터 제공받은 ABNOBAviscum-Q와 ABNOBAviscum-F 두 가지를 사용하였다. 겨우살이 추출물과 함께 처리한 항암제는 5-FU와 Cisplatin을 사용하였다. CCK-8 assay kit를 사용하여 세포 생존율을 측정하였고 젓산탈수소효소(LDH) assay kit로써 세포 사멸률을 측정하였다. Caspase 3 assay kit를 이용하여 세포자멸사에 관여하는 caspase 3의 활성 변화를 알아보고 Western blot analysis를 통해 세포자멸사에 관여하는 Bcl2와 p53, 그리고 항암 작용을 하는 PTEN의 단백질 발현량을 측정하였다.

결과: 겨우살이 추출물 Q와 F를 각각 단독 처리한 실험군보다 항암제인 5-FU와 cisplatin을 병합처리 하였을 때 세포 생존율은 더 낮아졌다. Caspase 3의 활성은 겨우살이 추출물 및 항암제 5-FU 처리를 함으로써 대조군에 비해 4~6배까지 증가하였다. Bcl2의 단백질 발현량은 대조군보다 겨우살이 추출물과 항암제 처리를 통해 감소하였고 두 약물을 함께 처리하였을 경우 더 낮아졌다. p53의 발현은 겨우살이 추출물 처리에는 영향을 받지 않았고 항암제 처리를 통해서만 증가되었다. 또한 항암 작용을 하는 PTEN의 단백질 발현 정도는 겨우살이 추출물 처리를 통해서 의미 있는 변화가 없었다.

결론: 겨우살이 추출물과 항암제인 5-FU 및 cisplatin 등을 병합 처리 할 경우 위암 세포 사멸에 있어 상승효과를 보였다. 본 연구결과에서 겨우살이 추출물의 항암효과는 caspase 3의 활성화와 Bcl2 발현의 감소를 통해 세포자멸사를 유발하며 이 세포자멸사 유도 기전은 p53과는 상관없음(p53-independent)을 알 수 있었다.

중심 단어: 겨우살이 추출물, Bcl2, p53, 세포자멸사, 상승 효과

서 론

2006년 통계청 발표 우리나라 사망원인을 보면 암으로 인한 사망률이 인구 10만 명 당 134.8명으로서 가장 높으며 위암은 폐암, 간암과 함께 우리나라 3대 암 질환으로 보고되었다.(1) 위암의 경우 가장 중요하고 일차적인 치료법은 수술이나 진행이 많이 된 경우 근치적 절제 수술은 불가능한 실정이고 수술이 불가능할 정도로 진행된 4기 암환자의 경우 차선 치료 방법으로서 항암제 투여가 이루어지나 여러 부작용이 수반되는 문제점이 있다. 따라서 부작용이 없거나 적은 위암 치료제, 혹은 기존 항암제의 작용을 높이거나 보완해 줄 수 있는 대체 약물의 개발은 필수적이다.

겨우살이(mistletoe)는 숙주나무에 반 기생하는 다년생 식물로서 한방에서는 상기생이라는 약제로 불리고 있다. 학명으로는 *Viscum album* L.이며 현재 약 1,400여 종이 알려져 있다.(2) 겨우살이 항암 면역요법은 1921년 독일에서 중앙 치료에 도입된 이후 주로 유럽지역을 중심으로 발전되어 온 항암 면역요법이다. 현재 겨우살이 추출물은 유럽에서 가장 널리 사용되는 항암대체요법 약제이다.(3) 다양한 임상 연구에서 겨우살이 추출물 치료는 암환자의 생존기간 연장, 삶의 질 향상과 암 위축에 효과를 보이는 것으로 나타났다. 최근의 연구결과에서는 이러한 효과가 암 세포의 세포자멸사 유발과 면역계의 자극으로 인한 것으로 보고되고 있다. 즉, 지금까지 알려진 겨우살이 추출물의 항암작용을 크게 두 가지로 구분하여 설명하면 다음과 같다. 먼저 세포독성효과로서 겨우살이 추출물 중 Lectin은 세포의 사멸을 유도하고 Viscotoxin은 세포의 괴사를 일으킴으로써 결국 암세포의 성장을 억제하고 사멸에까지 이르게 한다.(4) 두 번째 작용은 면역조절 기능인데 lectin은 Interleukin (IL)-2-6-12, Interferon- γ (IFN- γ), 그리고 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)같은 사이토카인들의 분비를 촉진하며,(5,6) 올리고당류 및 다당류들은 자연세포독성세포의 활성을 높이는 작용을 하고 소포는 helper T lymphocytes의 증식을 유도함으로써 면역조절에 기여하게 된다.

지금까지 겨우살이 추출물의 항암 효과를 알아본 연구들은 대부분 대장암, 폐암, 피부암, 그리고 유방암 등을 다룬 것이고(7) 한국인에 특히 많이 발병하는 위암에 미치는 효

책임저자: 신동규, 서울시 강남구 삼성동 171-1
서울의료원 외과, 135-740
Tel: 02-3430-0665, Fax: 02-554-3736
E-mail: shinedk@seoulmc.or.kr
투고일(2008년 6월 23일), 수정일(1차: 2008년 6월 26일,
2차: 7월 31일, 3차: 8월 25일), 게재확정일(2008년 8월 25일)

과에 관해서는 국내에서조차도 연구가 많이 부족한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 위암 세포주에 겨우살이 추출물이 세포 생존율, 세포자멸사, 그리고 Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome10 (PTEN) 같은 항암 단백질에 어떻게 작용하는가를 임상에서 항암화학 치료제로 사용 중인 5-FU (5-Fluorouracil)와 Cisplatin과 비교 및 병합 처치를 통해서 알아보았다.

대상 및 방법

1) 연구 재료

실험에 사용된 위암세포주인 SNU-719 세포주(human stomach adenocarcinoma cell line)는 한국세포주은행에서 구입하였다(Seoul, Korea). 겨우살이 추출물 ABNOBaviscum-Q (AVQ)와 ABNOBaviscum-F (AVF)는 (주)한국 아브노바사에서 구매하였다(Seoul, Korea). 항암제 5-Fluorouracil (5-FU)과 Cisplatin은 각각 중외제약(Seoul, Korea)과 일동제약(Seoul, Korea)으로부터 공급받았다. CCK-8 assay kit는 Dojindo사의 제품을 사용하였고(Kumamoto, Japan), LDH assay kit은 TAKARA사 제품을 사용하였다(Otsu, Japan). Caspase 3 assay kit은 Promega사의 제품을 사용하였다(Madison, USA). 세포배양에 사용된 배양액과 FBS, 항생제는 (주)웰진에서 공급받았다(Seoul, Korea).

2) 위암세포주의 배양

위암세포 배양은 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic을 함유한 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 2일마다 한 번 새로운 배지로 교환하고 배양접시에 세포가 80% 이상 자랐을 때 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 배양접시에 부착된 세포를 떼어낸 후 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액은 제거하고 침전된 세포에 배지를 넣고 세포가 골고루 분산되도록 피펫으로 잘 혼합하여 96 well plate, 혹은 6 well plate에 분주 후 약물을 처리한 다음 여러 실험들을 수행하였다.

3) 위암세포 생존율 측정(CCK-8 assay)

100 μ l (5,000~10,000 cells/well)의 세포 부유액을 96 well plate에 분주 후 CO₂ 배양기 안에서 12시간 동안 전배양(pre-incubation)을 한 다음 여러 농도의 약물을 10 μ l 부피 범위 내에서 처리를 한다. CO₂ 배양기 안에서 24~48시간 동안 배양 후 plate의 각 well에 10 μ l의 CCK-8 용액을 첨가한다. 3시간 동안 반응을 시킨 뒤 ELISA microplate reader를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

4) 위암세포 사멸률 측정(LDH assay)

세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 12시간 이상 배

양하여 plate에 부착시킨 후, 각각 처리할 시약을 원하는 농도로 처리하여 48시간 동안 더 배양한다. 이 때 세포사멸의 양성대조군으로 1% triton X-100 처리군을 만들고 처리하지 않은 대조군을 음성대조군으로 만들어 이를 분석의 기준으로 삼는다. 이 후 배양액에 분출된 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase)의 활성도를 측정하기 위하여 배양액 100 μ l를 채취한다. 채취된 배양액을 LDH assay kit에서 제공되는 촉매제와 색소 용액의 혼합물과 실온에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 ELISA microplate reader를 사용하여 490 nm 파장대의 흡광도를 측정하였다.

5) Caspase 3 활성 측정

100 mm 배양 접시에 10^6 cell/ml이 되게 배양을 한 후 겨우살이 추출물, 5-FU, 그리고 50 μ M Z-VAD-FMK inhibitor를 처리한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 세포를 수확하여 용해(lysis)시킨 후 DEVD-pNA 기질을 이용하여 caspase 3 활성을 405 nm의 흡광도에서 측정하였다.

6) Western blot analysis

Mistletoe 추출물의 위암세포주에 대한 세포자멸사 유도의 분자생물학적 기전을 알기 위해 p53과 Bcl2 발현의 Western blot 검사를 시행하였다. 원하는 겨우살이 추출물을 계획대로 처리한 후 24시간, 48시간동안 배양 세포가 80% 정도 자란 100 mm 배양 접시에 단백질 추출액 200 μ l를 넣고 수확 후 50초 동안 격하게 흔들어서 세포를 분해한다.

20분 동안 영하 20°C 냉동고에 방치한 후 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리하여 모은 뒤 Bradford 방법(8)을 원용하여 단백질량을 측정한 뒤 동량을 사용하여 SDS-PAGE를 실시한다. 전기영동이 끝나면 바로 nitrocellulose membrane에 1시간 30분 동안 transfer한 뒤 5% (w/v) 탈지분유/TBS-T로써 밤새 blocking을 실시한다. Blocking 후 TBS-T로써 10분씩 3번 씻어내고 난 다음 2% (w/v) fat-free BSA/TBS-T에 희석시킨 일차 항체를 2시간 동안 처리한다. TBS-T로써 10분씩 3번 씻어낸 뒤 5% (w/v) 탈지분유/TBS-T에 희석시킨 HRP가 결합된 이차 항체를 1시간 동안 처리한 후 TBS-T로써 10분씩 3번, TBS로 10분 동안 1번 씻어낸 뒤 ECL western blotting detection reagent들을 처리하여 반응을 시킨 뒤 필름 현상을 통해 단백질 발현 정도를 확인한다.

7) 통계분석

실험 군들 간의 통계학적 의미 여부는 student's *t-test*와 one-way ANOVA를 사용하여 검정하였고 P<0.05일 경우 결과가 통계학적 의미가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) 위암 세포 생존율 및 사멸률에 미치는 영향

항암제 5-FU와 겨우살이 추출물들(AVQ와 AVF)은 모두 세포에 처리한 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소하였고 항암제의 세포 생존율 감소 효과가 겨우살이 추출물보다 더 컸다(Fig. 1). 세포 생존율 실험을 통해 겨우살이 추출물들이 SNU-719 위암세포에 대한 반수치사량(LD₅₀: 50% lethal dose)은 50 µg/ml 내외라는 것을 알 수 있었고 이 처리 농도 이상에서는 급격하게 세포 사멸률이 증가하는

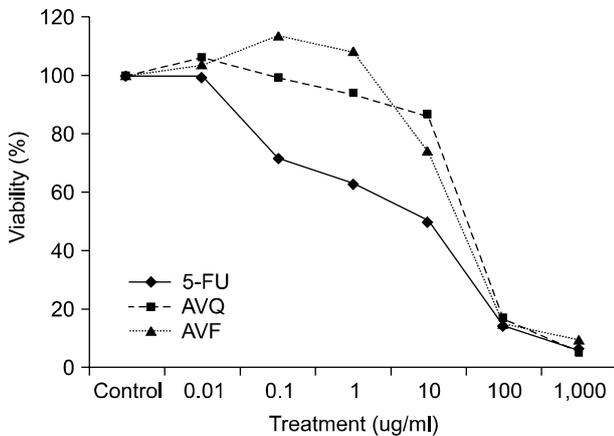


Fig. 1. The effects of 5-fluorouracil, mistletoe extracts ABNOBaviscum-Q and ABNOBaviscum-F (AVQ and AVF) on cell viability in serial concentrations. The cell viabilities were decreased in concentration dependent manner in both 5-FU and mistletoe extracts treatments. Cytotoxic effects were larger in 5-FU than mistletoe extracts.

즉, 세포독성 효과를 보이고 있다.

이들 약물이 세포의 사멸률에 미치는 영향을 알기위해 lactate dehydrogenase (LDH) 활성을 측정해 본 결과 세포 생존율 결과와 같은 맥락에서 약물 농도가 증가함에 따라 세포 사멸률은 증가하였고 이때도 항암제인 5-FU의 사멸률이 겨우살이 추출물들보다 더 컸다(Fig. 2). 또한 겨우살이 추출물과 5-FU를 병합처리 하였을 때 겨우살이 추출물들을 단독으로 처리하였을 경우보다 0.01~10 µg/ml의 농도 범위에서 50% 내외로 세포 사멸률이 더 증가하는 상승효과(synergistic effect)를 나타내었다(Fig. 3). 세포 사멸률 측정에 사용한 LDH assay 시약과 세포 생존율 측정에 쓰인 CCK-8

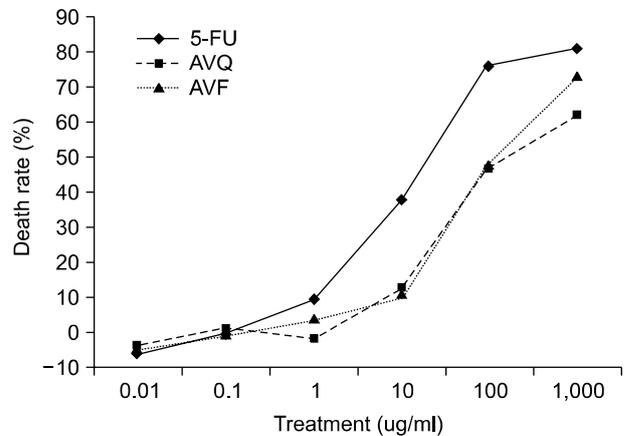


Fig. 2. The effects of 5-fluorouracil, mistletoe extracts ABNOBaviscum-Q and ABNOBaviscum-F (AVQ and AVF) on cell death rate (%) in serial concentrations. The cell death rates were increased in concentration dependent manner in both 5-FU and mistletoe extracts treatments. The death rates were larger in 5-FU than mistletoe extracts.

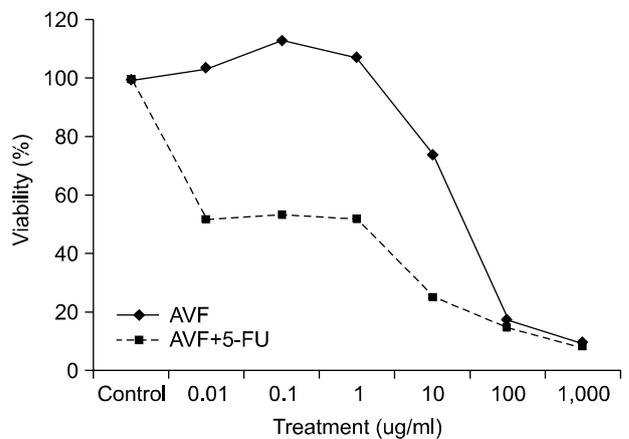
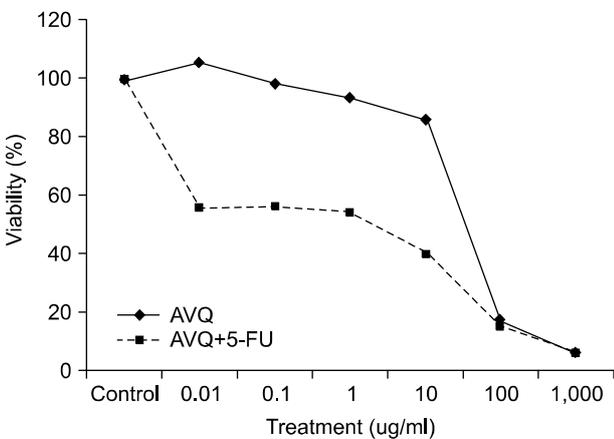


Fig. 3. The co-treated effect of ABNOBaviscum-Q, ABNOBaviscum-F (AVQ, AVF) and 5-FU on cell viability. The synergistic effects were observed in co-treated conditions of mistletoe extracts and 5-FU. The synergistic degree was more larger in combination of AVF and 5-FU than in AVQ.

시약은 그 성분 조성이 다르기 때문에 세포주의 시약 감수성에 차이가 나타나게 된다. 따라서 같은 시약을 동일 농도에서 처리를 해도 세포 사멸률 시험과 생존율 시험에서 절대치가 상호 일치되게 결과가 나오는 경우는 드물다. 그러나 본 연구에서 약제들을 농도가 증가하게 처리하였을 때 세포 생존율은 이에 비례하여 감소했고 세포 사멸률은 증가하였으므로 이 두 실험을 통해 겨우살이 추출물의 항암 효과를 분명하게 알 수 있다.

겨우살이 추출물들과 항암제인 cisplatin을 병합처리 하였을 경우에도 5-FU를 병합처리 하였을 때와 마찬가지로 상승효과를 보였다. 그러나 상승효과의 정도는 5-FU보다 작았다(Fig. 4). 겨우살이 추출물들과 cisplatin을 병합 처리 한 실험에서 앞서 시행한 5-FU와의 병합 효과에서 보다 겨우살이 추출물 단독 처리 시 세포 생존율 측정 결과에 있어 약제 감수성이 차이를 보이는 것은 실험에 사용한 세포주의 계대령(passage number)의 다름에 기인하는 것으로 판단된다.

2) Caspase 3 활성에 미치는 영향

Caspase 3는 effector caspase들 중 하나이고 직접 세포 사멸을 유도하는 단백질의 활성화를 일으키는 효소로서 세포 자멸사 과정에 작용하는 핵심적인 효소이다.

겨우살이 추출물 처리에 의한 세포 사멸의 기전을 확인하기 위해서 시행한 caspase 3 activity assay에서는 겨우살이 추출물의 경우 농도는 500 µg/ml과 1,000 µg/ml을 각각 처리하였고 5-FU의 경우 농도는 10 µg/ml, 100 µg/ml을 각각 처리하여 그 결과를 분석하였다. 분석 결과, 처리한 약물들의 농도의 고저에 상관없이 caspase 3의 활성은 증가하였고 caspase 3 작용 억제 물질인 Z-VAD-FMK를 처리함으로써 활성이 매우 낮게 감소한 것으로부터 겨우살이 추출물 및 5-FU 처리는 caspase 3의 활성을 증가시킴을 알 수 있다. 특

히 고용량으로 이들 약물을 처리하였을 때 저농도에서 보다 최고 3배 이상 caspase 3의 활성이 증가하였다(Fig. 5).

3) 겨우살이 추출물들과 항암제 처리 후 Bcl2와 p53 단백질 발현량 변화

겨우살이 추출물 AVQ와 AVF, 그리고 항암제인 5-FU와 cisplatin을 각각 그리고 병합 처리 후 Western blot analysis를 통해 apoptosis에 관여하는 Bcl2와 p53의 단백질 발현량을 24시간과 48시간에 걸쳐 측정한 결과 Bcl2는 처리 후 48시간이 지나야 대조군에 비해 발현량에 변화가 있었다. 즉, 항

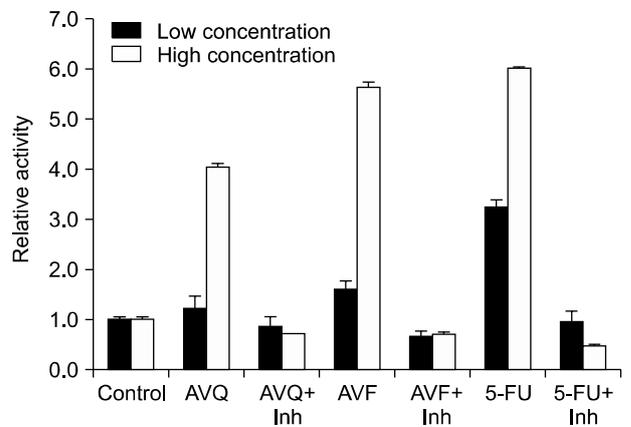


Fig. 5. The estimation of caspase 3 activity in the condition of 5-FU or mistletoe extracts ABNOBAviscum-Q and ABNOBAviscum-F (AVQ and AVF) treatment. Treating concentrations of mistletoe extracts and 5-FU were 500 ug/ml and 10 ug/ml in each at low concentration, and 1000 ug/ml and 100 ug/ml in each at high concentration condition. The caspase 3 activity was increased to 4~6 times in the condition of mistletoe extracts and 5-FU treatment than control group.

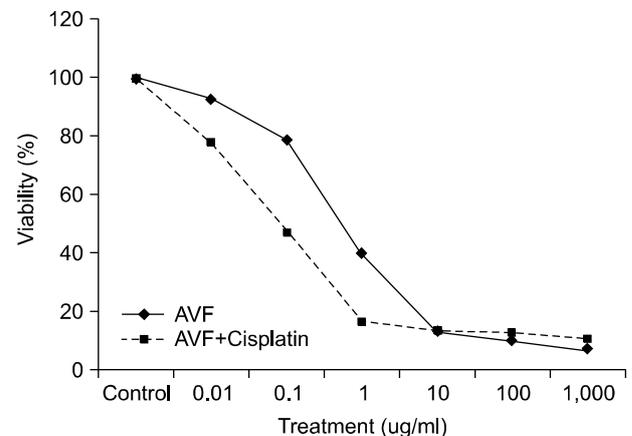
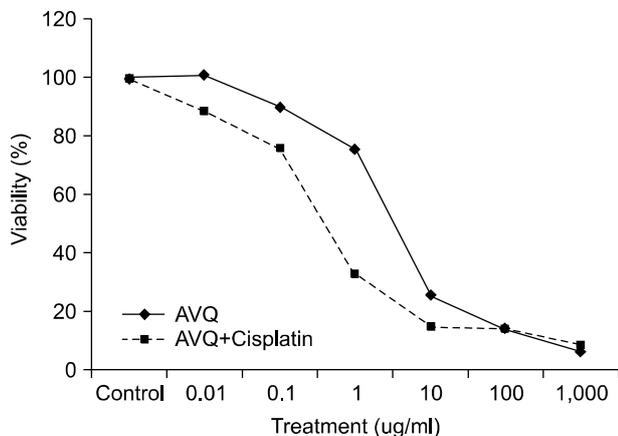


Fig. 4. The co-treated effect of ABNOBAviscum-Q-F (AVQ, AVF) and cisplatin on cell viability. The co-treatments of mistletoe extracts and cisplatin were showed a synergistic effects, however, the synergistic grade was smaller than 5-FU.

암제인 5-FU와 cisplatin, 그리고 겨우살이 추출물들 모두 Bcl2의 발현량을 감소시켰고 항암제들의 감소 효과가 더 컸다. 특히 항암제와 겨우살이 추출물을 병합 처리하였을 경우 각각 단독으로 처리하였을 때보다 Bcl2의 발현량이 더 감소하는 상승효과를 나타내었다.

p53은 겨우살이 추출물 처리를 통해서 시간대별로 전혀 차이가 없었고 오직 항암제들을 처리했을 경우에만 대조군에 비해 발현량이 매우 높게 증가하였다. 항암제를 처리하였을 때 24시간 후부터 대조군에 비해 매우 높게 발현이 증가하였고 48시간이 지난 후에는 5-FU 경우는 오히려 약간 발현량이 줄어들었고 cisplatin의 경우에는 차이가 없었다(Fig. 6, 7).

4) 겨우살이 추출물들과 항암제 처리 후 PTEN 단백질 발현량 변화

종양 억제 인자(tumor suppressor)로서 작용하는 PTEN의 단백질 발현량 변화를 겨우살이 추출물과 항암제들을 처리한 후 Western blot analysis를 사용하여 측정한 결과 5-FU와 겨우살이 추출물들을 각각 그리고 병합 처리하였을 때 PTEN의 발현량에는 의미 있는 차이가 없었고 이는 cisplatin을 처리하였을 경우에도 같은 결과를 보여주었다(Fig. 8).

고 찰

위암은 우리나라에서 가장 흔한 암으로 매년 약 2만여 명의 환자가 발생하는 것으로 보고되고 있다. 처음 위암을 진단받은 환자의 70% 정도에서 수술이 가능한 시기에 진단이 되며, 근치적 절제술을 시행 받은 환자의 30~40%가 결국 재발하고, 재발한 환자의 경우 예후는 아주 불량한 것으로 알려져 있다.(9) 진행성 위암에서 근치적 수술후에 항암화학요법을 시행하여 재발을 줄임으로써 생존율을 증가시키고자 하는 노력은 이전부터 이루어져 왔으나 현재에도 수술 후 표준 치료로 생각되는 항암화학요법은 없는 실정이다. 최근 기존의 항암요법치료의 한계와 부작용을 경감하는 치료방법으로 면역요법 치료가 여러 임상연구결과와 함께 주목받고 있다. 겨우살이(*Viscum album* L.) 추출물은 유럽에서 가장 널리 사용되는 항암대체요법 약제이다.

항암작용을 하는 겨우살이 추출물의 세포독성은 숙주나 무의 종류와 제조공정상에서 결정되는 겨우살이 성분의 활성 성분 함량에 의존하며, 유효 성분으로는 mistletoe lectin, viscotoxin, vesicle, 다당류 및 기타 많은 양의 단백질들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 겨우살이 추출물은 중앙세포의 성장억제와 괴사, 면역반응 조절 이외에도 β -endor-

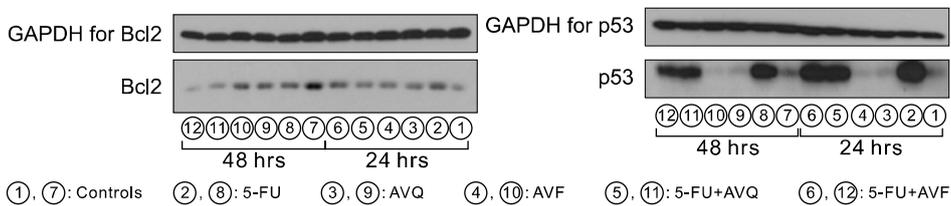


Fig. 6. Western blot analyses of Bcl2 and p53 from SNU-719 human gastric cancer cells treated by 5-FU and mistletoe extracts ABNOBAviscum-Q and ABNOBAviscum-F (AVQ and AVF). Treatment effects of drugs on Bcl2 expression were appeared 48 hours later significantly. In other words Bcl2 protein expression was decreased compared to control group, and was extremely diminished in mixed condition of 5-FU and mistletoes. The effects of drugs on p53 expression were emerged from 24 hours. Only 5-FU increased p53 protein expression.



Fig. 7. Western blot analyses of Bcl2 and p53 from SNU-719 human gastric cancer cells treated by cisplatin and mistletoe extracts ABNOBAviscum-Q and ABNOBAviscum-F (AVQ and AVF). These results are similar to the results of Western blotting for Bcl2 and p53 from gastric cancer cells treated by 5-FU and mistletoes generally.

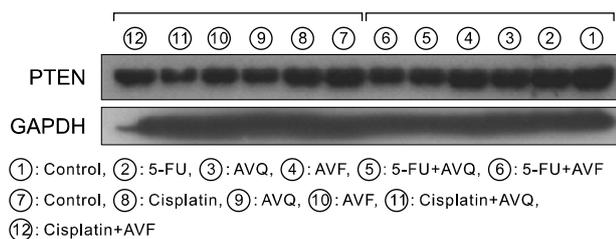


Fig. 8. Western blot analyses of PTEN from SNU-719 human gastric cancer cells treated by 5-FU, cisplatin and mistletoe extracts ABNOBAviscum-Q and ABNOBAviscum-F (AVQ and AVF). The protein expression level of PTEN was not changed by treatment of 5-FU, cisplatin and mistletoes.

phin의 분비를 증가시켜 암 환자의 통증을 감소시키고 삶의 질을 향상시키는 것으로 보고되고 있다.(10) 겨우살이 추출물 중에서 mistletoe lectin 성분이 주로 세포사멸사를 유발 하는데 현재 임상에서 사용되는 겨우살이 제제는 ABNOBAviscum[®] 과 Helixor[®] 그리고 Iscador[®] 세 제품이 있다. 본 연구에서는 위에서 언급한 세 가지 약제 중 mistletoe lectin을 가장 많이 함유한 독일 ABNOBA사의 ABNOBAviscum Quercus-2와 ABNOBAviscum Fraxini-2를 사용하여 위암 세포주에 대한 세포독성실험을 시행하였다. 하지만 mistletoe lectin의 함량은 세포소멸 능력과 밀접한 상관관계를 가지나 lectin만을 기준으로 세포독성효과를 예측하는 것은 불가능하다. Scheffler 등은 미슬토 약제의 직접적인 세포독성 연구에서 소세포성 폐암 세포주에 대해 Viscum album L Pini, Abietis, Quercus 이 세종류의 약제를 이용하여 확인해본 결과 억제 효과가 lectin 내용물에 달려 있다면 Quercus 약제가 가장 강력한 효과를 지니고 Pini 약제는 가장 적은 효과를 지니는 것으로 나타나야만 하지만 실험상에서는 상관관계가 없는 것으로 보고하였다.(11) 이것은 mistletoe lectin 외의 성분이 겨우살이 추출물의 세포독성 작용에 관여할 가능성을 암시하기 때문에 이점을 고려해 본 연구에서는 mistletoe lectin을 이용하지 않고 실제 임상에서 사용되는 용액형태 전체를 위암 세포주에 투여하여 직접적인 세포독성을 확인해 보았다.

Maier 등은 세종류(Iscador M, Qu, P)의 미슬토 추출물을 이용하여 16개의 사람 종양 세포주에 대해 항 증식 및 자극 효과를 시험했다. 이 실험에서 세 종류 모두 종양 성장 자극의 증거는 없으며, 높은 lectin 농도를 함유한 Iscador M과 Qu에서 유방암 세포주에서 15 µg/ml dose level에서 대조군에 비해 70% 이상 성장 억제 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 Iscador M에서 3개의 cancer cell lines에서 Iscador Qu에서 7개의 cell lines에서 약한 항종양 효과(성장 억제 30~70%)를 관찰할 수 있었다. 하지만 lectin을 함유하지 않은 Iscador P에서 항 증식 효과(antiproliferative effect)는 관찰되지 않았다.(12) 또한 네 가지 방광암 세포주에 겨우살이 추출물을 처리하였을 때 방광암 세포주들의 생장이 억제되었

다는 보고도 있다.(13)

Drees 등은 nude mice에서 5종류의 사람 종양 이종 이식 (human tumor xenograft)를 시행하여 다양한 약물들을 이용한 직접적인 세포 독성 효과를 측정해 보았는데 이 실험에서 겨우살이 추출물인 Iscador[®]와 Helixor[®], ABNOBAviscum mali[®] 그리고 장기 추출물인 Polyerga[®] 등이 비교되었다. 종양 콜로니 형성(tumor colony formation)을 대조군에 비해 30%까지 억제하는 농도를 (T/C<30%) 비교해본 결과 ABNOBAviscum mali가 5 µM/ml 농도로 가장 높은 세포독성을 보였으며 다른 약제들은 100 µg/ml 이상의 농도에서 이와 비슷한 세포독성을 보였다.(14) 여러 논문 검색에서 저자들과 유사한 실험논문이 검색되지 않아 비교할 수 없었지만 저자들이 사용한 위암 세포주(SNU-719)에서의 세포 사멸효과는 항암제인 5-FU에 의한 농도 의존적 세포사멸효과는 10 µg/ml 처리 시 약 50% 세포사멸이 나타났으며 이에 비해서 겨우살이 추출물 단독처리에 의한 세포사멸효과는 AVF인 경우 약 40 µg/ml에서 AVQ인 경우 약 50 µg/ml의 농도에서 나타남을 확인하였다(Fig. 1, 2). 본 연구에서 겨우살이 추출물 처리 농도가 50 µg/ml 이상에서는 급격히 높은 세포 사멸 효과, 즉 세포 독성 효과를 나타내나 세포주를 대상으로 시행한 in vitro 연구의 한계성을 볼 때 이를 곧바로 임상치료에 적용하는 것은 무리가 있다. 다만 본 연구를 통해 겨우살이 추출물의 항암작용의 기전을 정확히 파악하고 또 기존 항암제와 병합 처리 효과를 앞으로써 위암 환자 치료에 새로운 대안을 제시할 수 있을 것으로 사료된다. 항암제와의 병용효과에 대한 연구에서 Galm 등은 사람 백혈병 세포주(human leukemia cell lines)인 K562와 KG1a에 대한 유전자 재조합 겨우살이 lectin (rViscum)이 여러 항암제(vincristine, mafosf-amide, idarubicin and cisplatin)의 독성 효과를 증가시키는 것을 보고하였다.(15) 본 연구결과 에서도 겨우살이 추출물과 5-FU, 혹은 cisplatin을 위암 세포주에 병합 처리 시 겨우살이 추출물 단독 처리할 경우보다 분명히 상승효과가 있음을 확인 하였다(Fig. 3, 4).

종양 억제 유전자인 p53의 발현 정도는 항암제와 방사선 치료의 반응에 있어서 핵심적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. p53 유전자의 돌연변이는 인체종양에 있어서 획득적이거나 본태적인 저항성(acquired and intrinsic resistance)과 연관이 있으며 종양으로 하여금 많은 항종양 치료에 대한 불감수성을 나타 내도록하는 영향을 미친다.(16) 이와 반대로 Bcl2 단백질의 과 발현을 유도하였을 경우 거의 모든 항암제와 방사선 조사에 의해 유도되는 세포사멸사를 억제하는 결과로부터 Bcl2와 p53이 세포의 사멸사에 있어 서로 상반된 기능을 수행하는 중요한 유전자로 판단된다.(17,18)

Hostanska 등은 유전적으로 p53-wild-type (+/+)과 p53-deficient (-/-)인 설치류 배의 섬유아세포(murine embryo fibroblast)에서 유전자 재조합 겨우살이 lectin (rML)의 종양 세포 증식에 대한 영향을 조사한 연구에서 rML의 농도를

증가시킬수록 두 세포 모두 동일하게 증식 작용이 감소하는 것을 확인하였고 이것은 rML이 p53과는 독자적인 경로를 통해 세포자멸사를 유발함을 암시하고 있다.(19) 또한 Büssing 등은 두개의 리보솜 억제 단백질(ribosome-inhibiting proteins)인 겨우살이 lectin III와 Volkensin으로 사람 임파구를 가지고 이들에 의해 유도된 세포사멸의 효과를 연구하였다. 이 실험에서 세포의 사멸이 핵의 p53과 Bcl2 proteins의 감소와 telomeric associations 유도와 관련이 있다는 보고를 하였다.(20)

한국산 겨우살이 lectin을 p53-양성인 SK-Hep-1 세포주와 p53-음성인 Hep 3B 두 간암세포주에 처리함으로써 Bcl2는 그 발현이 저하되었고, Bax는 상승하였다, 그리고 caspase 3의 활성화는 증가되었고 이로 인해 p53과 p21과는 상관없이 독자적으로 세포자멸사가 유도되었으며, 또한 telomerase 활성이 감소되었다는 연구 보고가 있다.(21)

본 연구에서도 Bcl-2와 p53 단백질 발현을 알아본 Western blot 실험 결과 약물처리 48시간 후 대조군에 비해 5-FU, cisplatin, AVQ, AVF 처리군에서 Bcl2 단백질 발현량이 감소하는 것이 관찰되었고 겨우살이 추출물과 5-FU, cisplatin 병합 처리 시에는 Bcl2 단백질 발현량이 더욱 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 허나 p53의 경우에는 항암제인 5-FU와 cisplatin을 처리한 실험군들에서만 그 발현량이 대조군에 비해 매우 높게(37~50%) 증가하였지만 겨우살이 추출물만을 처리한 실험 군들에서는 대조군과 차이가 없었다. 이는 지금까지의 다른 연구결과와 마찬가지로 겨우살이 추출물은 p53에는 영향을 미치지 않고 즉 p53과는 독자적인 방식으로 Bcl2의 발현을 증가시킴으로써 항암작용을 함을 알 수 있었다.

PTEN 유전자는 종양 억제 유전자로서 이 유전자에 돌연변이가 유발되면 다중 진행성 암들(multiple advanced cancers)이 발생하는데 한 원인이 된다. PTEN enzyme은 정상 세포들보다 빠르게 증식하여 종양을 형성하는, 즉 통제를 벗어난 세포들의 생장을 막고 결국 세포자멸사를 유도하는 화학적 반응 경로에 참여한다.

PTEN은 자주 돌연변이 되고 소실되는 경향이 있고, 난소·전립선·경부암 같은 고형암의 악성 진행에 이 PTEN의 발현 감소가 관련이 있으며, PTEN이 결실되고 돌연변이된 생쥐는 종양 유도에 취약하다는 보고가 있다.(22)

본 연구결과에서는 항암제들과 겨우살이 추출물 모두 PTEN 단백질 발현에는 의미 있는 영향을 주지 못했다. 따라서 겨우살이 추출물은 PTEN 경로를 통한 항암 작용은 하지 않음을 알 수 있었다.

결 론

겨우살이 추출물들은 위암 세포에 농도 별로 처리 시 일정한 농도 이상부터 5-FU나 cisplatin같은 항암제보다 그 효과

는 작으나 세포 사멸을 일으켰고 항암제들과 병합 처리 시 단독 처리할 때보다 위암 세포 사멸에 있어 분명한 상승효과를 보였다.

겨우살이 추출물들은 본 연구결과에서 caspase 3의 활성을 증가시키고 Bcl2의 단백질 발현량을 감소시킴으로써 세포자멸사를 유발하며 이는 p53과는 상관없는, 즉 p53-independent한 작용임을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Available at: http://www.kosis.kr/notice/new/no01_index.jsp Accessed April 03, 2008.
2. Yang SW, Shin DG, Kim IM, Yoon SM, Lee YJ, Heo SH, Kim TH. The immunological effect of mistletoe extract on gastric cancer patients. J Korean Gastric Cancer Assoc 2007;7:167-173.
3. Richardson MA, Sanders T, Palmer JL, Greisinger A, Singlerary SE. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. J Clin Oncol 2000;18:2505-2514.
4. Büssing A. Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: a review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L. Apoptosis 1996;1:25-32.
5. Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ. Increased secretion of tumor necrosis factor α , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to β -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. Cancer Research 1990;50:3322-3326.
6. Ribéreau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Pointron P, Anton R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. Cancer Letters 1996;109:33-38.
7. Horneber MA, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2008, Issue 2. Art. No.: CD003297. DOI: 10.1002/14651858. CD003297. pub2.
8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
9. Ahn JS, Ryu SW, Kim IH, Sohn SS. Factors influencing recurrence after curative resection for advanced gastric cancer. J Korean Surg Soc 2003;65:210-216.
10. Heiny BM, Beuth J. Mistletoe extract etandardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces β -endorphin release and immunopotential in breast cancer patients. Anticancer Research 1994;14:1339-1342.
11. Scheffler VA, Fiebig HH, Kabelitz D, Metelman HR. Zur direkten zytotoxizität von mistelpräparaten. Erfahrungsheilkunde 1993;6:338-346.
12. Maier G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in

- vitro. *Anticancer Drugs* 2002;13:373-379.
13. Urech K, Buessing A, Thalmann G, Schaefermeyer H, Heusser P. Antiproliferative effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extract in urinary bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2006;26:3049-3055.
 14. Drees M, Berger DP, Dengler WA, Fiebig GH. Direct cytotoxic effects of preparations used as unconventional methods in cancer therapy in human tumor xenografts in the clonogenic assay and in nude mice. *Immunodeficient Animals: Models for Cancer Research. Contrib Oncol Basel Karger* 1996;51:115-122.
 15. Galm O, Fabry U, Efferth T, Osieka R. Synergism between rViscumin and cisplatin is not dependent on ERCC-1 expression. *Cancer Letters* 2002;187:143-151.
 16. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994;266:807-810.
 17. Green DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol* 1995;7:694-703.
 18. Mountz JD, Zhou T, Wu J, Wang W, Su X, Cheng J. Regulation of apoptosis in immune cells. *J Clin Immunol* 1995;15:1-16.
 19. Hostanska K, Vuong V, Rocha S, Soengas MS, Glanzmann C, Saller R, Bodis S, Pruschy M. Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer* 2003;88:1785-1792.
 20. Büssing A, Multani AS, Pathak S, Pfüller U, Schietzel M. Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album* L. is associate with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. *Cancer Letters* 1998;130:57-68.
 21. Lyu SY, Choi SH, Park WB. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch Pharm Res* 2002;25:93-101.
 22. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008;1784:150-158.

= Abstract =

The Effects of Mistletoe Extract and Anti-cancer Drugs on the Apoptosis of Gastric Cancer Cells

Yong-Jik Lee, Ph.D., **Su Hak Heo**, M.S., **Dong Gue Shin**, M.D.¹, **Sung-Koo Kang**, M.D.¹, **Il Myung Kim**, M.D.¹ and **Tae Hee Kim**, M.D.²

Division of Clinical Research, Medical Institute, Seoul Medical Center, ¹Department of Surgery, Seoul Medical Center, ²Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: Mistletoe extract was widely used for cancer treatment as complementary or alternative therapy in European area from early twenty century. It is currently used as alternative anti-cancer remedy by piecemeal in domestic medical group, however, the anti-cancer mechanism of mistletoe extract was not known precisely until now. In this study the effect of mistletoe extract on gastric cancer was studied vis cell line experiments.

Materials and Methods: The SNU719 gastric cancer cell line was used, and ABNOBAviscum-Q and ABNOBAviscum-F were treated to cells as mistletoe extract, or 5-FU and cisplatin were used with mistletoe extract. The cell viability and cell death rate were estimated by CCK-8 assay kit and lactate dehydrogenase (LDH) assay kit in each. Caspase 3 assay kit was used to measure caspase 3 activity. The protein expression amounts of Bcl2, p53, and PTEN were estimated through Western blot analysis.

Results: The co-treatments of mistletoe extract Q/F and 5-FU/cisplatin decreased lesser cell viability than only mistletoe treat. Caspase 3 activity was increased 4~6 times in co-treatment of mistletoe extracts and 5-FU than control. Bcl2 protein expression was reduced by mistletoe extracts or anti-cancer drugs, further more, the co-treatment of mistletoe extracts and 5-FU/cisplatin diminished more the expression than only mistletoe treatment. Mistletoe extracts did not affect the protein expressions of p53 and PTEN.

Conclusion: It was concluded that the anti-cancer mechanism of mistletoe extracts was made by caspase 3 activation and lowered Bcl2 expression, and this apoptosis inducing mechanism was independent to p53. (**J Korean Gastric Cancer Assoc 2008;8:120-128**)

Key Words: Mistletoe extracts, Bcl2, p53, Apoptosis, Synergistic effect