

## 선학초(짚신나물)에 의한 *in vitro*와 *in vivo*에서의 암세포사멸 기전 탐색

최순자, 백종우, 박종형, 전찬용, 최유경, 고성규\*  
경원대학교 내과학교실, \*경희대학교 예방의학교실

### Mechanism of Apoptosis & Tumor Growth Inhibition of *Agrimonia pilosa Ledebour*(APL) *in vitro* and *in vivo*

Soon-ja Choi, Jong-woo Baik, Jong-hyeong Park, Chan-yong Jun, You-kyung Choi, Seung-gyu Ko\*

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-won University  
\*Dept. of Preventive Medicine, College of Oriental medicine, Kyung-hee University

#### ABSTRACT

**Objectives :** The aim of this study was to experiment the antitumor activity of *Agrimonia pilosa Ledebour* (APL) in human stomach cancer (AGS) cell lines (*in vitro*) and male C57BL/6J mouse (*in vivo*).

**Methods :** The effects of the ethanol extract from the plant on several transplantable rodent tumors were investigated *in vitro* by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay, DNA content analysis and Western blot analysis. *Agrimonia pilosa Ledebour* (APL) was given to rats with Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells. The experimental rats were divided into 3 groups *in vivo*. Saline was injected into the abdominal cavity in the first group, 50 mg/kg APL was injected into the abdominal cavity in the second group and 100 mg/kg was injected into the abdominal cavity in the third group. After that, we checked their tumor volume periodically.

**Results :** At first, human gastric cancer (AGS) cell lines (*in vitro*) showed decreased cell viability, and increased sub-G<sub>1</sub> contents. When we experimented rat intestinal epithelial (RIE)1 as same condition, this result didn't show. With this, compared to normal cells, *Agrimonia pilosa Ledebour* (APL) led selectively to the extinction of cells only in human gastric cancer.

Moreover, we showed that the traditional herbal medicine APL induced caspase-dependent apoptosis in AGS cells.

Next, APL inhibited the growth of LLC-bearing mouse tumor. However, we could not verify APL induced caspase-dependent apoptosis in LLC-bearing mouse tumor.

**Conclusions :** The roots of *Agrimonia pilosa Ledebour* (APL) contain some antitumor constituents.

**Key words :** *Agrimonia pilosa Ledebour* (APL), Antitumor, Apoptosis, Caspase.

## 1. 서 론

암 정복을 위한 전 세계적인 노력에도 불구하고,

· 교신저자: 최유경 인천광역시 중구 용동 117번지  
경원대학교 인천한방병원 내과  
TEL: 032-770-1210 FAX: 032-772-9011  
E-mail: kosmos@kyungwon.ac.kr

· 본 연구는 경원대학교의 지원을 받아 수행하였습니다.

암은 여전히 국내외적으로 사망원인 1위를 차지하는 질환이다<sup>1-2</sup>. 암 치료와 관련하여 화학요법, 수술요법, 방사선요법 등 다양한 치료기술이 발달하였지만 기존 치료의 부작용에 대한 대안으로 한약물을 이용한 치료법에 대한 관심이 높아지고 있다.

선학초(*Agrimonia Pilosa Ledebour*: APL, 짚신나물)는 장미과의 다년생 초본식물로서 쏜루를 건

조하여 한약재로 사용한다. 한의학에서는 주로咯血, 吐血, 小便出血, 子宮出血 등의 각종 出血症에 널리 응용되었다<sup>3</sup>. 또한 강심작용, 생리활성작용, 항균작용, 항염작용, 항암작용 등이 보고되고 있다<sup>4-12</sup>. 최근 중국 임상에서는 전통적으로 解毒 및 收斂止血에 사용해 왔던 것에 착안하여 癌治療劑로써 빈용하고 있다<sup>13</sup>. 그러나 선학초의 실험적 연구는 매우 부족하며, 특히 抗癌 活性에 대한 기초적인 실험연구들은 거의 없는 상태이다. 이에 저자는 실험을 통해 선학초의 抗癌 效能을 확인하고, 그 메커니즘을 알아보려고 하였다.

먼저 시험관내(in vitro) 실험에서는 선학초 추출물의 인간위암세포주 AGS에서의 세포사멸 기전을 살펴보았다. 또한 시험관외(in vivo) 실험을 통해 시험관내(in vitro) 실험에서의 선학초 추출물의 抗癌 效果가 동물실험에서도 같은 결과를 보이는데도 살펴보았다. 한편, 쥐의 장세포주 RIE1에서의 선학초 추출물의 작용기전을 AGS 암세포주에서의 작용기전과 비교함으로써 선학초의 항암세포에 대한 선택적 치료효과를 밝혀보고자 하였다. 이상의 실험을 수행한 결과 선학초의 항암효과와 암세포에 대한 선택적 치료 기전에 관하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료와 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 약재인 선학초(*Agrimonia Pilosa Ledebour*: APL, 짚신나물)는 음니허브(Korea)에서 구입하여 100g을 정량 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185mm 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과하였다. 그 후 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 분말 5.7g(수율 5.7%)의 APL 분말

을 얻어 3차 증류수에 vortexing하여 녹였다. 그 후에 37°C shaking incubator에서 12 시간 녹여준 다음 syringe filter(0.20  $\mu$ m, Sartorius, Germany)을 이용하여 여과한 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약

본 실험에 사용한 시약은 특별히 명기한 것 외에는 모두 Sigma(Sigma-Aldrich, Michigan, USA)에서 구입하였다.

#### 3) 세포주

인간 위암세포주 AGS와 쥐의 장세포주 RIE1는 미국 세포주은행(American Type Culture Collection)을 통하여 구입하였으며, AGS는 RPMI 1640 배지, RIE1는 DMEM(Gibco)배지에 10%(v/v) 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL))과 1% 항생제[penicillin-streptomycin, (Gibco BRL)]를 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 든 37°C humidified incubator에서 키웠다. 각 실험에 사용된 세포는 80% 정도의 밀도로 준비하였다.

#### 4) 동물

실험에 사용된 동물(중앙실험동물[주], 한국)은 5주령의 C57BL/6J계 雌性 鼠(체중 18g-20g)를 공급 받아 경희대 한의과대학 동물실 환경(24 ± 2°C, 습도40~60%, 晝夜 12시간 교대로 150~300Lux 照射)에서 淨化 멸균된 증류수와 고형사료(조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.6% - 퓨리나[주], 한국)를 충분히 공급하고, 동물사육 cage(20 × 26 × 13cm)에 넣고 매주 3회 깔짚을 교체하여 청결을 유지하며, 건강 상태를 관찰하면서 1주간 적응시켰다.

### 2. 방법

#### 1) 세포 생존율 측정(MTS assay)

세포 생존율 측정 실험을 하기 위해서 AGS, RIE1 세포( $1 \times 10^4$  세포/100  $\mu$ l)를 96-well tissue culture plate에 칸 다음, 24시간 동안 안정화시켰다. APL추출물을 농도별로 72시간 동안 AGS와 RIE1에 처리한 후, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5

-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt(MTS)가 든 용액 20 $\mu$ l를 배지에 첨가하였다. 37°C에서 2시간 동안 반응을 시킨 다음, 생성된 formazan을 ELISA reader(Molecular devices Palo Alto, CA)를 이용하여 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2) DNA content analysis

AGS, RIE1 세포( $5 \times 10^5$  cells)를 60mm dishes에 칸 다음, 24시간 동안 안정화시켰다. 다양한 농도의 선택초를 처리한 다음, 24, 48, 72 시간 후에 detached와 adherent cells을 모두 모아 95% ethanol 3 ml(0.5% BSA 첨가)로 고정시켰다. 샘플이 모아질 때까지 샘플은 -20°C에 보관하였다. Cells pellet을 ice-cold PBS로 두 번 wash한 다음, 10 mg/ml RNase A를 처리하고 37°C incubator에서 15분간 반응시켰다. 마지막으로 10 mg/ml propidium iodide(PI)로 염색한 다음, 암상태로 보관하였다. DNA 양을 FACStar flow cytometer(Becton Dickinson, San Jose, CA)와 ModFit LT V2.0 software를 이용하여 분석하였다.

#### 3) SDS-PAGE와 Western Blot

AGS, RIE1 세포( $1.5 \times 10^6$  cells)를 100mm dishes에 칸 다음, 24시간 동안 안정화시켰다. 다양한 농도의 선택초를 처리한 다음, 24, 48, 72 시간 후에 detached와 adherent cells을 모두 모은 후, ice-cold PBS로 두 번 wash하였다. 각 시간별로 모아진 cell pellet을 lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay kit을 사용하였으며, SDS-PAGE시 동량의 단백질을 loading하여 separating한 후, nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 그 후, phosphate-buffered saline (PBS)-0.1% tween 20 containing 1% skim milk로 blocking 1시간 후, membrane을 다양한 1차 항체 - PARP, procaspase-3, cleaved-caspase-3, procaspase-9, procaspase-8, Bcl-Xs/1, Bax, Bcl-2, (santa-cruz)를 4°C O/N으로 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 들어간 1×PBS로 washing하고, 1차 항체를 HRP-conjugated secondary

antibodies와 1:1,000으로 1시간 정도 반응시켰다. Chemiluminescence detection system(Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 사용하여 X-ray film으로 결과를 확인하였다. 또한, 각 실험에 사용한 억제제(inhibitors)는 1시간 전에 z-VAD-fmk(50 $\mu$ M, Calbiochem)를 처리한 다음, APL을 처리하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다.

#### 4) 검체의 투여와 실험군의 설정

Lewis Lung Carcinoma(LLC) cells( $5 \times 10^5$  cells)를 6주령 된 C57BL/6 mice(Daehan Biolink) 총 아홉 마리의 등에 피하주사로 접종하였다. 일주일 후에 세 마리씩 세 그룹으로 나누어 그룹-1(대조군, N=3)은 0.2 ml saline 복강 주사하고, 그룹-2(약물 투약, N=3)는 50 mg/kg APL 복강 주사하고, 그룹-3(약물 투약군, N=3)는 100 mg/kg APL 복강 주사하였다. 암을 접종한 1주일 후부터 11일 동안 매일 복강 주사하고, 몸무게는 이틀에 한번 측정하였다.

#### 5) tumor volume 측정

암 부피의 측정은 caliper(500-181-20, Mitutoyo, Japan)를 이용하였으며, 계산 방법은 아래와 같다.

$$\text{Tumor volume} = \text{단축} \times \text{단축} \times \text{장축}$$

#### 6) 통계분석

실험결과에 대한 모든 분석은 Win PC-SPSS (VER. 8.5) 프로그램으로 실시하였고, 기술통계학적 분석은 각 group의 측정값을 Mean(평균)  $\pm$  S.E(표준오차)로 요약하였으며, student t-test method로 분석하여 0.05 level에서 유의성을 인정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 암 세포증식 감소 및 세포사멸(apoptosis)에 대한 효과

APL 추출물을 농도별로 72시간 동안 AGS 세포주에 처리하였을 때, 팔목할 만큼 cell proliferation

이 감소함을 확인하였다. IC<sub>50</sub>농도는 약 30 µg/ml 인 것으로 나타났다(Fig. 1A). 그러나 정상 세포주인 RIE1에서는 cell growth inhibition이 거의 일어나지 않았다(Fig. 1B).

APL 추출물을 25, 50 µg/ml 농도로 AGS 위암 세포주에 0~48시간 동안 처리한 후, DNA contents를 분석한 결과, 시간과 농도에 의존적으로 apoptotic sub-G1 fraction이 증가하였다(Fig. 2).

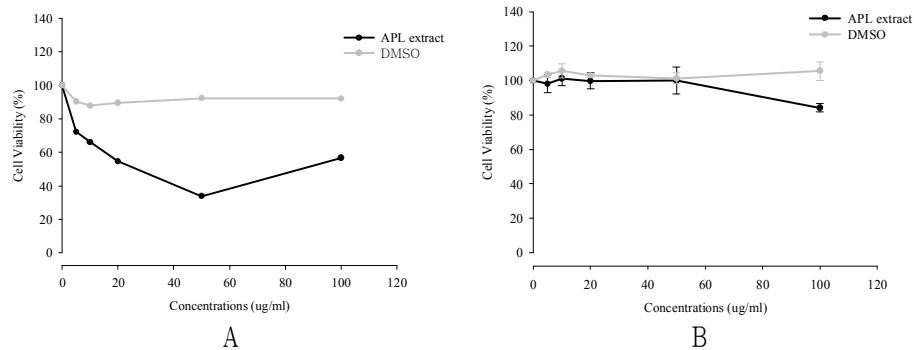


Fig. 1. Effects by treatment of *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) on AGS and RIE1 cells.

A, B. Cell growth inhibition of AGS(A) and RIE1(B) cells by the APL extract. AGS or RIE1 cells were treated with 5~100µg/ml the APL extract for 72 hours. And cell viability was measured by the MTS assay. Data are shown as the mean of three independent experiments(error bars were shown in mean ± standard deviation(SD)).

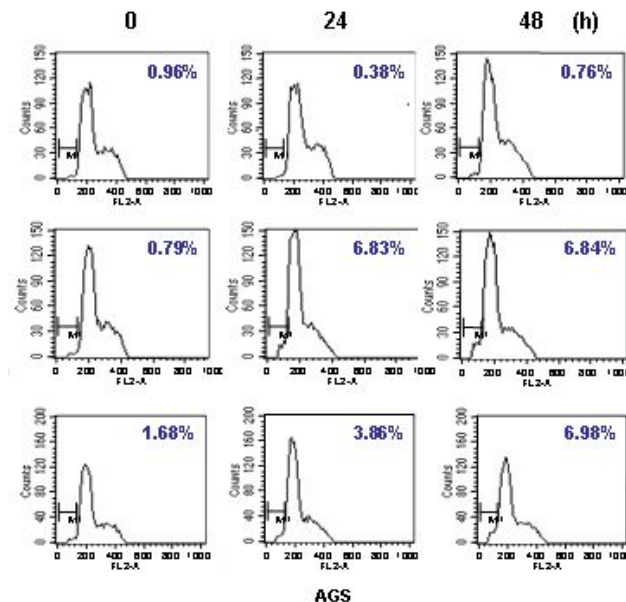


Fig 2. Effects by treatment of *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) on gastric cancer AGS cells.

APL extract induced sub-G1 population. Cell cycle distribution was analyzed using a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson), percentages of sub-G1 phase cells which were determined based on DNA content histogram.

2. Caspase cascade 활성화를 통한 세포사멸(apoptosis) 유도 효과

APL 추출물을 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 다양한 시간대별로(24, 48, 72 시간) sample을 획득하여 SDS-PAGE 후, Western blotting을 수행한 결과, procaspase-3의 cleavage와 caspase-3 activation이 일어나며, caspase-3의 기질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)가 degradation되었다. PARP cleavage는 24시간째부터 일어나지만, 72시간 째 가장 두드러지게 나타났다(Fig. 3A). 또한 APL 추출물에 의해 caspase-8 과 -9가 활성화되는 것을 확

인하였다(Fig. 3A). RIE1을 같은 조건으로 실험하였을 때, 이러한 결과가 나타나지 않았다(Fig. 3B). 그리고 AGS cells에 z-VAD-fmk(a pan caspases inhibitor)를 1시간 전처리한 후, APL 추출물을 처리하였을 때, caspase cascade activation이 완벽하게 억제되었다(Fig. 4).

Bcl-2와 Bcl-XL와 같은 anti-apoptotic members는 시간 의존적으로 서서히 감소하였고, pro-apoptotic members인 Bax의 발현은 시간 의존적으로 두드러지게 증가하였다(Fig. 5).

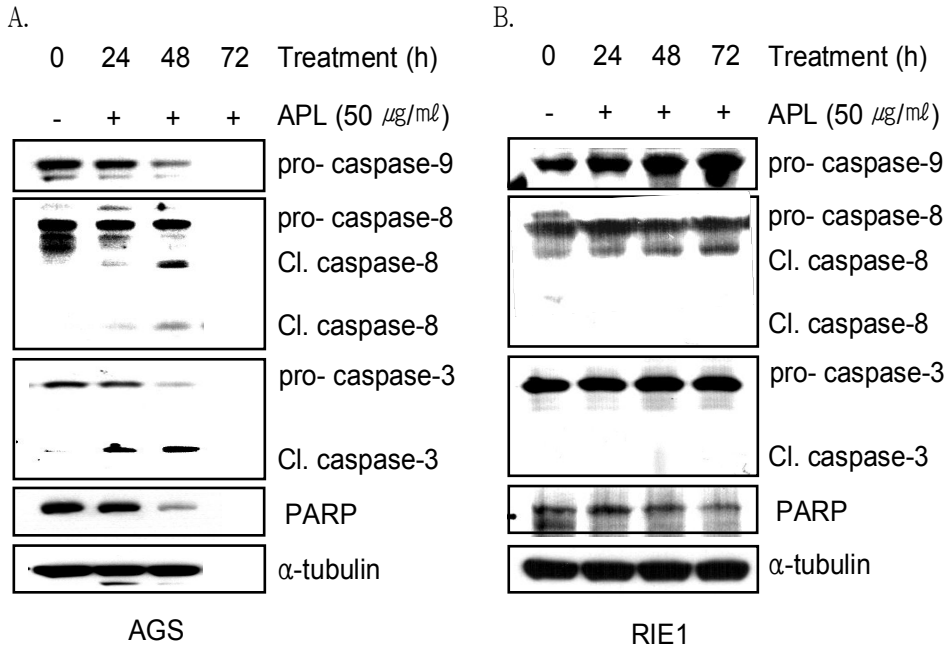


Fig. 3. Induction of apoptosis by *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) extract in gastric cancer AGS cells.

A, B, Involvement of caspase cascade in APL extract-induced apoptosis. AGS and RIE1 cells were treated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  APL extract for 72 hours. The cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-pro-caspase-9, -pro-caspase-8, -cleaved caspase-3, -pro-caspase-3, -cleaved caspase-3, -PARP, - $\alpha$ -tubulin.

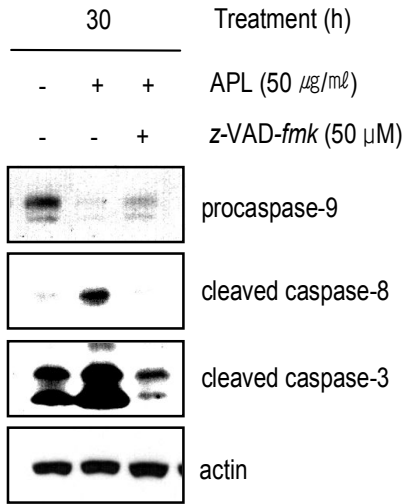


Fig. 4. Induction of apoptosis by *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) extract in gastric cancer AGS cells.

Involvement of caspase cascade activation in APL extract-induced apoptosis. AGS cells were pretreated with z-VAD-fmk(50  $\mu\text{M}$ ) for 1 hour and then exposed to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  APL extract for 30 hours. The cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-pro-caspase-9, -cleaved caspase-8, -cleaved caspase-3, -actin.

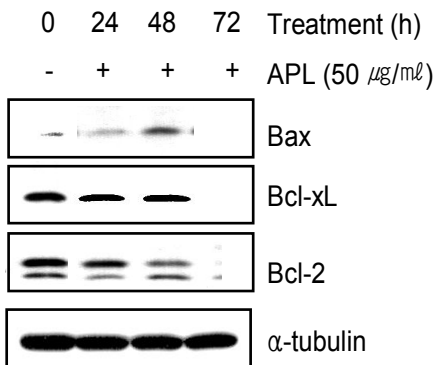


Fig. 5. Effect of an ethanol extract of *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) on expressions of Bcl-2 family in AGS gastric cancer cells.

AGS cells were treated with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of an ethanol extract of APL for the indicated periods of time, and resulting cell lysates were then prepared and analyzed by Western blotting with anti-Bax, -Bcl-xL, -Bcl-2, and - $\alpha$ -tubulin.

### 3. LLC cell 접종한 마우스에서의 암 증식 억제효과

선향초가 마우스에게 독성을 유발하는지를 간접적으로 측정하기 위하여 APL 추출물을 복강주사하는 동안의 몸무게의 변화를 측정하였다. 미묘하지만 100 mg/kg APL 추출물을 투약한 마우스가 대조군에 비해서 몸무게 증가율이 낮은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

그룹-1(control)에 비하여 APL을 처리한 군에서 암을 접종한지 18일(약물투여 11일) 후에 통계적으로 유의한 수준으로 암의 부피가 감소한 것을 관찰 할 수 있었다( $p < 0.05$ )(Fig. 7). 뿐만 아니라, 그룹-1 (control)에 비하여 APL 추출물을 처리한 군에서 암을 접종한지 18일 후에 통계적으로 유의한 수준으로 암의 무게 역시 감소한 것을 관찰 할 수 있었다( $p < 0.05$ )(Fig. 8).

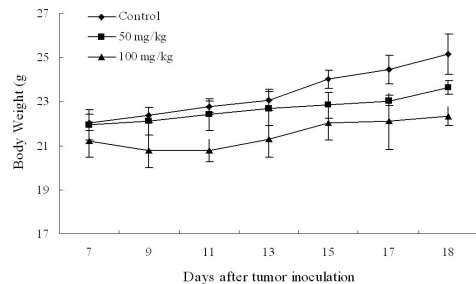


Fig. 6. The Body weight of control and *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL)-treated group

Data are represented as means  $\pm$  S.E. (n=3).

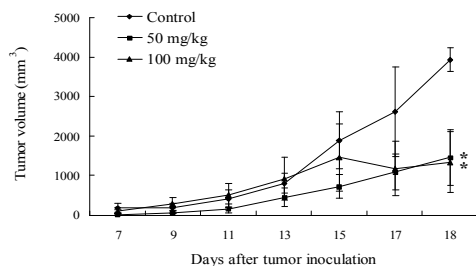


Fig. 7. Inhibition of tumor growth by ethanol extract of *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) in LLC-bearing C57BL/6J mice.

Data are represented as means  $\pm$  S.E.(n=3). Values with different superscripts were significantly different at the  $p < 0.05$  level versus saline-treated control by t-test.

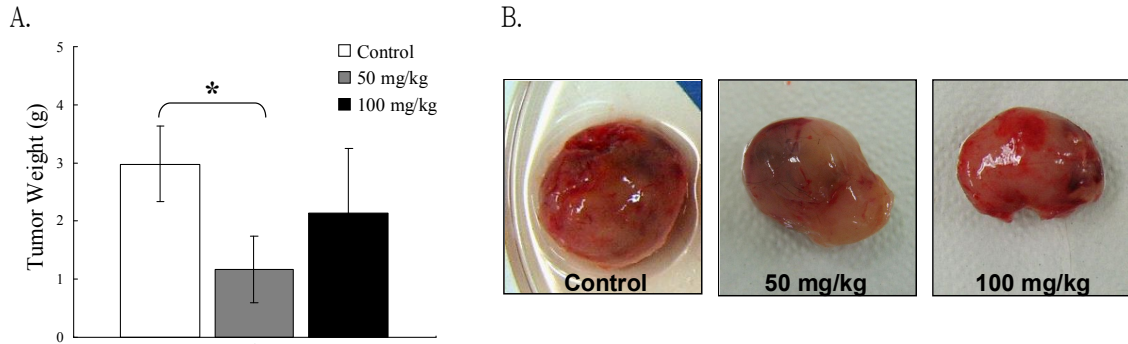


Fig. 8. Inhibition of tumor weight by ethanol extract of *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) in LLC-bearing C57BL/6J mice.

A, Data are represented as means  $\pm$  S.E.(n=3). Values with different superscripts were significantly different at the  $p < 0.05$  level versus saline-treated control by t- test. B, Separated tumor-inoculated skin in LLC-bearing C57BL/6J mice. The macroscopic observation of tumor is shown.

4. LLC cell 접종한 마우스에서의 암세포의 세포사멸(apoptosis) 활성화 효과

폐어낸 암조직의 일부를 Western blot을 수행하여 세포 사멸 과정에 관련하는 marker들을 확인하였다. APL을 처리한 군뿐만이 아니라 그룹-1 (control)에서도 역시 세포 사멸에 관련된 caspase cascade가 활성화됨을 확인하였다(Fig. 9).

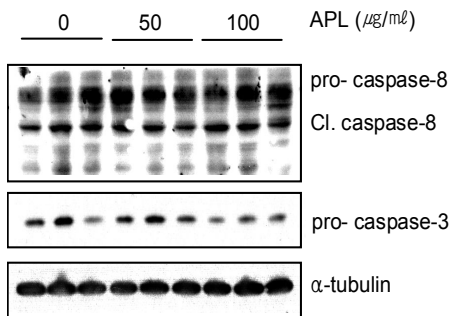


Fig. 9. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Agrimonia Pilosa Ledebour*(APL) extract in LLC-bearing C57BL/6J mice.

The tissues were homogenized and lysis. The cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-pro-caspase-8, -pro-caspase-3, - $\alpha$ -tubulin.

IV. 고찰

선학초(*Agrimonia Pilosa Ledebour*)는 다년생 초본식물로서 性味가 辛溫하고 無毒하며 歸經은 肺, 肝, 脾經이다. 전통적으로 各種 出血症狀에 收斂性 止血劑로 널리 응용되어 왔으며<sup>14</sup> 心血管 및 平滑筋에 대한 強心작용과 항염증작용, 항균 및 항기생충 작용이 있다는 실험적 보고가 있다<sup>4,6,8</sup>. 최근 中國에서는 임상에서 癌治療劑로서 선학초를 사용하고 있고 이에 대한 보고가 있는데<sup>13</sup> 癌治療와 관련한 선학초의 효능은 古書에도 이미 언급된 바가 있다. 百花鏡에는 선학초가 돌을 뚫는다고 하여 癌治療와 관련된 효능을 암시하였고, 藥鏡의 拾遺賦에서는 서양의학의 胃癌 症狀에 상응하는 噎膈, 反胃症에 대한 선학초의 치료효능에 대해 ‘滾咽膈之痰 平翻胃之噦 石打穿識得者誰’ 라는 기록이 있다<sup>14</sup>. 그러나 선학초의 항암효과에 대해서 아직까지 깊이 있는 실험적 연구가 이루어지지 않고 있다. 몇몇 보고에서 선학초의 항산화효과 또는 암 유발 마우스에게 선학초를 투여했을 때 life span을 연장시키는 것을 확인하거나, 백혈구 수치 상승, 단핵구에서의 Interleukin 유도 등을 관찰하여 면역

학적 의미를 찾는 정도의 항암연구를 찾아볼 수 있을 뿐이다<sup>10-12</sup>. 선학초의 항암 활성 및 항암기전에 대한 실험적 연구가 아직까지는 양적, 질적으로 매우 부족함을 알 수 있다. 이에 본 저자는 선학초의 항암효능을 확인하고, 특히 세포사멸 기작(apoptosis)에 근거하여 그 항암효과의 기전을 밝히고자 연구를 시행하였다.

Apoptosis 즉 programmed cell death는 조직의 항상성이나 발생 과정에서 세포에 원치 않는 자극이나 위협이 가해질 때 개체를 보호하기 위해 진화적으로 생겨난 과정이라고 알려져 왔다<sup>15-17</sup>. Apoptosis는 necrosis와는 구별되며 유기체로 하여금 세포의 숫자와 조직의 크기를 유지하며 세포내의 항상성을 위협하는 자극으로부터 자신을 보호하도록 한다. 세포사멸 메커니즘의 핵심 요소는 caspases라는 proteolytic system이다. Caspases는 세포가 programmed cell death를 일으켜야 할 때 다른 단백질을 잘라 분해하는 역할을 한다. 즉, 세포를 구성하는 핵심적 단백질이나 세포의 조직을 지탱하는 수많은 분자들을 caspases가 분해를 함으로써 세포가 적절하게 cell death에 이르게 한다<sup>18</sup>. 현재까지 알려진 caspases는 13종류가 있다. 그 가운데 caspase-8 와 caspase-9와 같은 upstream initiator caspases는 비활성형인 pro-form의 형태에서 분화되고(cleaving), 이것은 다시 다른 downstream effector caspases: caspase-3,-6,-7들을 활성화시킨다. 그 중, caspase-3의 활성화는 세포사멸 과정에서 핵심적인 역할을 하며 세포 내 많은 단백질-poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), gelsolin, retinoblastoma(Rb)와 b-catenin<sup>19</sup> 등을 분해시킨다. Caspases-8은 세포 표면에 존재하는 death receptors를 통해 활성화되는 외부자극에 의해 활성화 된다<sup>20</sup>. Caspase-9은 스트레스나 치료제 등에 의해 세포 내부에서 일어나는 세포사멸 과정에서 중요한 역할을 한다. Caspase-9이 활성화되기 위해서는 미토콘드리아내의 cytochrome C가 세포질로 방출되고, caspase-9과 Apaf-1이라는 사멸 유도

필요한 단백질과 결합하여 apoptosome을 형성해야 한다<sup>21</sup>. 미토콘드리아를 경유하는 세포사멸 과정은 미토콘드리아 막의 침투성의 변화, 막 전위의 파괴, 막에 존재하는 침투막의 생성 및 세포독성에 관련된 단백질의 세포질로의 방출을 통해 caspase 활성을 총괄한다<sup>21,22</sup>. 이때, 미토콘드리아 막 침투성은 Bcl-2 family를 통하여 주로 조절 된다<sup>23,24</sup>. 따라서 Bcl-2 family protein 역시 세포사멸 과정에서 중요한 역할을 한다. Bcl-2 family protein은 Bcl-2와 Bcl-XL와 같은 anti-apoptotic members와 Bax와 Bak 같은 pro-apoptotic members가 있다. 이 단백질들은 생사의 세포운명을 결정하는데 checkpoints와 같은 역할을 한다<sup>23-25</sup>. 일반적으로 DNA 복제, 핵분열 등과 같은 세포 분열 과정이 무리 없이 진행되기 위해서는 세포 주기 조절이 잘 이루어져야 한다. 부적절한 자극이나, 손상 등에 의해 세포는 세포 주기를 진행하기 전에 DNA repairs 과정을 거치며, 이러한 DNA 손상이 수복 불가능할 정도라고 판단하게 되면 세포사멸 과정이라는 세포 자살 프로그램을 작동시킨다<sup>20</sup>.

본 연구에서는 APL이 암세포에만 선택적으로 세포독성을 나타내는 항암 활성을 가지는지 in vitro에서 확인하고(Fig. 1, Fig 2), 세포사멸의 기전에는 어떻게 관여하는지를 살펴보기 위하여 caspase-3, caspase-8, caspase-9 활성화 및 Bcl-2 family protein의 발현을 살펴보았다.

그 결과 APL 추출물은 caspase-3 의존적으로 세포사멸과정을 유발한다는 것을 밝혔으며, caspase-8과 caspase-9 또한 활성화되는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 caspase 활성화 억제제인 z-VAD-fmk를 처리하였을 때, 세포사멸과정이 완벽하게 저해되었는데(Fig. 4) 이로써 APL 추출물에 의해 유도되는 세포사멸과정에서 caspase activation이 결정적으로 필요하다는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과들은 APL 추출물에 의한 세포사멸현상이 세포 외-내부사멸 경로 혹은 미토콘드리아를 경유하여 일어날 수 있음을 알 수 있었다<sup>21</sup>. 이에 APL



추출물을 AGS 세포에 처리하여 미토콘드리아를 경유하는 세포사멸과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bcl-2 family protein의 level 변화를 확인하였다. 그 결과, pro-apoptotic members인 Bax 단백질은 눈에 띄게 시간 의존적으로 증가하였고, 반면에 Bcl-2와 Bcl-xL와 같은 anti-apoptotic members의 발현은 감소하였다(Fig. 5). 따라서 APL 추출물에 의한 세포사멸과정은 미토콘드리아를 경유한다는 것이 확실해졌다. 그러나 APL 추출물에 의한 세포사멸과정이 TNF나 FasL와 같은 extrinsic receptors에 의해서 유도되는지, 아니면 두 가지 경로를 모두 통하여 일어나는지에 대해서는 실험을 더 진행해야 한다<sup>16</sup>.

시험관내 실험에서 APL 추출물은 항암효능을 가지고 있었다. 이러한 결과가 실제 동물실험에서 같은 결과를 보이는지 확인하기 위하여 시험관의 실험을 진행하였다. LLC mouse tumor cell을 6주령된 C57BL/6J 마우스의 등쪽에 접종하여 일정한 크기의 암이 형성되도록 한 후 세 그룹으로 나누어 식염수만을 복강주사한 군(그룹-1, control)과 APL을 농도별로 처리한 두 군(그룹-2: 50 mg/kg, -3: 100 mg/kg)으로 나누어 실험을 진행하였다. 선학초가 마우스에게 독성을 유발하는지를 간접적으로 측정하기 위하여 APL을 복강주사하는 동안의 몸무게의 변화를 측정하였다. Fig. 6의 결과를 보면, 미묘하지만 100 mg/kg APL을 투약한 마우스가 control에 비해서 몸무게 증가가 적게 되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과로 보아 100mg/kg APL 추출물을 복강투여 하였을 때, 약간의 독성이 있는 것으로 판단된다.

다음으로는 실제로 APL 추출물이 암의 부피를 감소시키는지 확인하기 위하여 마우스에서 암을 제거하여 암의 부피와 무게 등을 비교하였다. 그룹-1(control)에 비하여 APL을 처리한 군에서 암을 접종한지 18일 후에 통계적으로 유의한 수준으로 암의 부피가 감소한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 7). 뿐만 아니라, 그룹-1(control)에 비하여 APL

처리군에서 암을 접종한지 18일 후에 통계적으로 유의한 수준으로 암의 무게 역시 감소한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 8).

이러한 결과를 바탕으로 APL 추출물이 암의 성장을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 암 성장의 억제가 세포 사멸 기전에 의한 것인지를 Western Blot을 수행하여 확인하였으나, 대조군에서도 세포 사멸 기전이 활성화 되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 9). 이는 대조군의 암 크기가 너무 커서 자체 세포 사멸 기전이 활성화되었기 때문이 아닐까 사료된다. APL의 추출물이 *in vivo*에서의 암 성장 억제에 관한 기전은 본 연구에서 적은 샘플 수로 시행한 점, 정확한 기전을 밝히지 못한 점을 고려할 때 향후 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 항암효과가 있는 것으로 알려진 선학초의 시험관내 실험과 시험관의 실험을 바탕으로 선학초의 항암효과에 대한 구체적인 기전을 연구하기 위한 실험을 진행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 선학초 추출물에 의한 인간 위암 세포주인 AGS에서의 항암효과가 세포 사멸 기전에 의한 것임을 확인하였다.
2. 선학초 추출물이 정상 장세포주인 RIE1에서는 세포사멸을 일으키지 않았다.
3. 선학초 추출물은 암유발 C57BL/6J 마우스에서 대조군에 비하여 암 부피와 무게를 유의성 있게 감소시켰다( $p < 0.05$ ).
4. 선학초 추출물의 암유발 C57BL/6J 마우스에서의 암 부피와 무게 감소 기전은 밝히지 못하였다.

이상의 연구결과로 볼 때 선학초는 인간 위암

세포주의 세포사멸 기전에만 선택적으로 작용함으로써 정상세포에 대해서는 세포독성이 없는 안정적인 항암제로써의 유의성이 확인되었다. 시험관의 실험의 경우 향후 더 구체적이고 세밀한 실험을 계획하여 진행된다면 선학초의 항암 효과에 대한 기전을 좀 더 구체적으로 밝힐 수 있을 것이라 사료된다.

### 참고문헌

1. 전기택. 2005년 남녀사망자와 사망원인. 젠더리뷰. 2006;3:85-90.
2. 배종면. 상대생존율. 예방의학회지. 2004;37(3):217-9.
3. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영종, 김선희. 한약임상응용. 서울: 성보사; 1986, p. 248-9.
4. 전성봉, 양바름, 최춘환, 김익수, 박경석. 식물병원균에 대한 짚신나물(선학초) 추출물의 항균활성과 Agrimol B의 동정. 농약과학회지. 2006;10(3):230-6.
5. 박신, 권오진. Escherichia coli O157:H7의 제어를 위한 선학초 추출물과 NaCl의 병용효과. 한국생물공학회지. 1998;13(2):168-73.
6. 조려화, 이준경, 조국현, 강대길, 권태오, 권지웅 등. 선학초 부탄올 추출물의 혈관 이완 효과의 기전에 대한 연구. 생약학회지. 2006;37(2):67-73.
7. 이용호, 김만배, 정대수. 선학초 추출액이 흰쥐의 생리활성에 미치는 효과. 한국약용작물학회지. 2002;10(3):167-70.
8. 김현주, 임혜원, 김보현, 김학수, 최신욱, 윤창순. 선학초 추출물의 항여드름균 효능 연구. 대한화장품학회지. 2006;32(1):53-8.
9. 강세찬, 이창민, 구현정, 안동호, 최한, 이재현 등. 선학초 추출물의 간보호 효과. 생약학회지. 2006;37(1):28-32.
10. Murayama T, Kishi N, Koshiura R, Takagi K, Furukawa T, Miyamoto K. Agrimoniin, an antitumor tannin of Agrimonia pilosa Ledeb., induces interleukin-1. Anticancer Res. 1992 Sep-Oct;12(5):1471-4.
11. Gao K, Zhou L, Chen J, Li F, Zhang L. Experimental study on decoctum Agrimonia pilosa Ledeb-induced apoptosis in HL-60 cells in vitro. Zhong Yao Cai. 2000 Sep;23(9):561-2.
12. Miyamoto K, Kishi N, Koshiura R. Antitumor activity of methanol extract from roots of Agrimonia pilosa Ledeb. Jpn J Pharmacol. 1985 May;38(1):9-16.
13. Sugi M. Cancer therapy by chinese crude drugs. In: Kondo K. Cancer therapy in China today. Tokyo:Shizenom. 1977:95-6.
14. 이경순, 안덕균, 신민교, 김창민 외. 완역중약대사전. 서울: 도서출판정담; 1997, p. 2352-5.
15. Steller H. Mechanism and genes of cells suicide. Science. 1995;267:1145-9.
16. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. Cell. 2000;102:1-4.
17. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. Nature. 2000;407:796-801.
18. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. Oncogene. 1998;17:3237-45.
19. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. Science. 1997;278:294-8.
20. Jonstone RW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell. 2002;108:153-64.
21. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;1:63-7.
22. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes & Dev. 2001;15:2922-33.

23. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family. arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-6.
24. Cory S, Adams JM. The bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch *Nat. Rev. Cancer*. 2002;2:647-56.
25. Atan G, James MM, Stanley JK. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Dev*. 1999;13:1899-911.