대한한방내과학회지 제35권 2호(2014년 6월)
J. Int. Korean Med. 2014:35(2)133-144

白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母에 의한 MDA-MB-231 인체 유방암 세포에서의 항암 효과

진명호[1], 박선영[1], 강유경[1], 심원석[1], 허희수[1], 홍상훈[1], 박 철[2], 최영현[3], 박상은[1]
[1]동의대학교 한의과대학 한방내과, [2]동의대학교 분자생물학과, [3]동의대학교 한의과대학 생화학교실

Anti-cancer Effects of *Oldenlandia diffusa*, *Cremastra appendiculata* and *Fritillaria thunbergii* on MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells

Myung-ho Jin[1], Sun-young Park[1], You-gyung Kang[1], Won-suk Shim[1], Hee-soo Hur[1]
Sang-hoon Hong[1], Cheol Park[2], Yung-hyun Choi[3], Sang-eun Park[1]
[1]Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University
[2]Dept. of Molecular Biology, Dong-Eui University
[3]Dept. of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

ABSTRACT

O. diffusa, *C. appendiculata* and *F. thunbergii* are reported to possess many pharmacological activities including anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-hypertension, anti-diabetic and anti-cancer effects. However, their anti-cancer activities in human breast cancer have not been clearly elucidated yet.

Objectives: In the present study, we compared the *in vitro* cytotoxic effects of single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii* in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

Methods: After we treated human breast cancer MDA-MB-231 cells with *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*, we evaluated viability, growth inhibition, morphological changes, apoptotic body formation, measurement of the cell cycle and formation of DNA fragmentation of these cells.

Results: We found that single treatment of *O. diffusa* and *F. thunbergii* could inhibit cell proliferation in human breast cancer MDA-MB-231 cells. However, complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii* had weak or no effect on the cell proliferation of MDA-MB-231 cells. The first, anti-proliferative effects of *O. diffusa* in MDA-MB-231 cells was associated with G2/M arrest of cell cycle and apoptotic cell death. The second, anti-proliferative effect of *F. thunbergii* in MDA-MB-231 cells was associated with apoptotic cell death.

Conclusions: Taken together, these findings suggest that *O. diffusa* and *F. thunbergii* may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human breast cancer cells, further studies will be needed to identify the molecular mechanisms.

Key words: *O. diffusa*, *C. appendiculata*, *F. thunbergii*, human breast cancer cells, apoptosis

Ⅰ. 서 론

유방암은 미국이나 유럽에 거주하는 여성들에게서 주로 발병하는 것으로 알려져 있으나 최근 급속한 산업화에 의한 식생활의 서구화 등으로 인

· 교신저자: 박상은 울산시 남구 신정동 479-7번지
동의대학교 울산한방병원 한방내과
TEL: 052-226-8106 FAX: 052-256-0665
E-mail: hanseul@hanmail.net

하여 한국을 비롯한 산업화된 아시아 국가에서도 급격히 발병비율이 높아지고 있는 추세이며, 특히 한국 여성들의 경우에는 모든 암 중에서 두 번째로 많이 발병하는 암으로 알려져 있다[1].

현재까지 유방암을 치료하기 위하여 가장 많이 사용되는 방법으로는 외과적 수술 요법을 사용하고 있으며, 수술 후 보조요법으로는 수용체 발현 여부, 수술의 종류 등과 같은 여러 가지 상황에 따라 항암 화학요법, 방사선 치료, 항호르몬 치료 등이 행해지고 있다[2,3].

이러한 치료법들은 전이가 유발되지 않은 유방암에 효과가 뛰어난 것으로 알려지고 있지만 근력 약화, 림프부종, 체중 증가, 조기 폐경, 면역이상 반응 등과 같은 부작용을 초래할 수 있으므로 최근에는 여러 가지 천연물을 이용함으로써 유방암을 예방하고 유방암 치료 시 나타날 수 있는 부작용을 최소화할 수 있는 연구가 활발하게 진행되고 있다[4-6].

유방암에 대한 최근 연구 동향을 살펴보면 三稜, 玄胡索, 益氣養榮湯 등 한약 성분이 유방암 치료에 의미 있는 결과를 보인 연구들이 있다[7-16]. 하지만 임상에서 유방암 치료에 자주 활용하고 있는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母는 항암효과에 대한 연구들이 다수 나와 있음에도 유방암에 초점을 맞춘 실험적 연구는 아직 부족한 실정이다[17-23]. 따라서 본 연구에서는 인체 유방암세포주인 MDA-MB-231 세포를 대상으로 하여 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 단독처리 및 복합처리에 따른 함암효과를 확인하기 위하여 각각의 시료들이 유발하는 세포독성 정도를 확인하였으며, 이들 중 세포독성 효과가 뛰어난 시료가 apoptosis 유발에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다.

Ⅱ. 실험재료 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. 상기 약재를 세척, 불순물을 제거 후 건조, 분쇄하였고, 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母 100 g에 증류수 1 L를 첨가하여 180-200 ℃로 3시간 가열한 후 원심분리하여 찌꺼기를 제거한 다음 상층액만 분리하였다. 분리된 상층액은 Whatman 필터(No. 2)를 이용하여 걸러낸 다음 동결건조하여 고형성분을 얻었다. 白花蛇舌草의 경우 100 g당 10 g, 山慈姑는 100 g당 7.1 g, 浙貝母의 경우 100 g당 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 MDA-MB-231 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 DMEM(Gibco BRL) 배지를 성장배지로 사용하여, 5% CO_2, 37 ℃의 조건의 배양기를 사용하여 배양하였으며, 배양접시의 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

MDA-MB-231 세포를 1×10^5 개/ml씩 분주한 다음 72시간 동안 배양하였다. 72시간 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 2분 간 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 성장억제 측정

성장억제 정도 확인을 위하여 상기와 동일한 방법으로 세포를 6 well plate에 접종하고, 안정화시킨 후 각각의 시료를 처리하여 72시간 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 ℃에서 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

암세포의 성장 및 형태변화는 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 시각적으로 확인하였다. 먼저 세포 배양용 6 well plate에 MDA-MB-231 세포를 1×10^5 개/ml씩 분주하여 적정농도로 처리하였다. 72시간 동안 각각의 시료에 노출시킨 다음 시각적인 성장억제 정도와 형태변화 정도를 200배의 배율로 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하고 차이점을 비교 분석하였다.

6. DAPI 염색을 통한 세포핵 형태 관찰

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 30분 동안 고정하였다. 고정이 끝난 후 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 10분 동안 반응시킨 다음 2.5 μg/ml 농도의 DAPI 용액을 처리하여 세포의 핵을 20분 간 염색하였다. 염색이 끝난 후 증류수 및 PBS를 이용하여 염색이 되지 않은 DAPI 용액을 제거하고 충분히 말린 다음 mounting solution을 처리하고 형광 현미경(fluorescene microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다. 형광 현미경을 이용한 핵의 관찰은 400배 배율로 실시하였다.

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

白花蛇舌草, 浙貝母가 단독처리된 배지에서 자란 세포들을 원심분리하여 모은 다음 상층액을 제거하고 다시 0.5 ml의 PBS를 첨가하여 부유시킨다. 여기에 ethanol 0.5 ml을 첨가하여 4 ℃에서 한 시간 동안 고정시킨 다음 고정된 세포들을 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

정상배지에서 자란 세포와 白花蛇舌草, 浙貝母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 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 혼합 용액(25 : 24 : 1, Sigma)을 동량인 750 μl를 첨가하고 30분 간 회전교반 시켰다. 회전교반이 끝난 후 10분간 원심 분리한 다음 DNA와 RNA가 포함되어 있는 상층액 600 μl를 분리하여 300 μl의 100% isopropanol(Sigma)과 100 μl의 5 M NaCl를 첨가하고 4 ℃에서 24시간 동안 반응시켜 DNA와 RNA를 고형화 시켰다. 반응이 끝난 후 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 2시간 정도 전기영동 시킨 후 ethidium bromide(EtBr, Sigma)로 염색하여 ultra vilolet(UV) 하에서 사진촬영하여 DNA fragmentation 여부를 확인하였다.

9. 통계분석

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

Ⅲ. 결 과

1. MDA-MB-231 세포의 생존율에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

Trypan blue로 염색을 한 후 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포의 수를 계수하여 확인 한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 白花蛇舌草, 浙貝母의 단독처리군에서는 농도의존적으로 생존율이 현저하게 감소하는 것으로 나타났지만 山慈姑 단독처리군의 경우에는 白花蛇舌草, 浙貝母 처리군에 비해서 생존율 감소현상이 두 배 이상 약하게 나타나는 것으로 확인되었다. 또한 복합처리군의 경우 山慈姑가 포함된 시료에서는 생존율 감소현상이 약하게 나타나는 것으로 나타났다(Fig. 1).

2. MDA-MB-231 세포의 증식에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

MTT assay를 이용하여 조사한 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 白花蛇舌草, 浙貝母 단독처리군의 경우에는 비슷한 증식억제 효과가 있었지만, 山慈姑 단독처리군에서는 白花蛇舌草, 浙貝母 처리군과 비교하여 증식억제 효과가 낮은 것으로 확인되었다. 복합처리군에서도 상기 생존율 감소현상과 비슷하게 나타났다(Fig. 2).

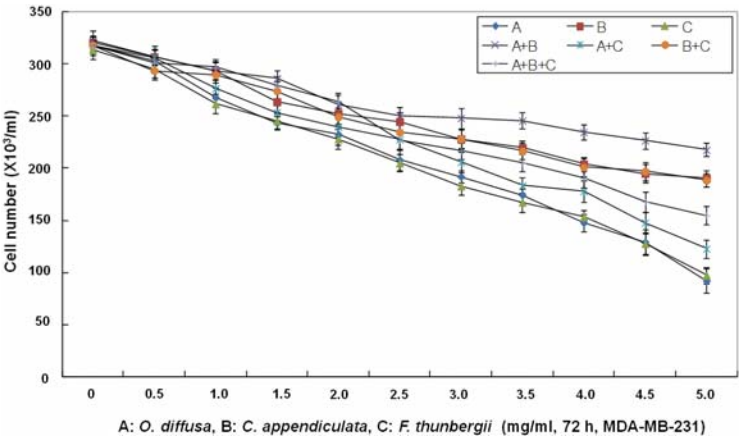


Fig. 1. Viability of human breast cancer MDA-MB-231 cells after single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*.

The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells.

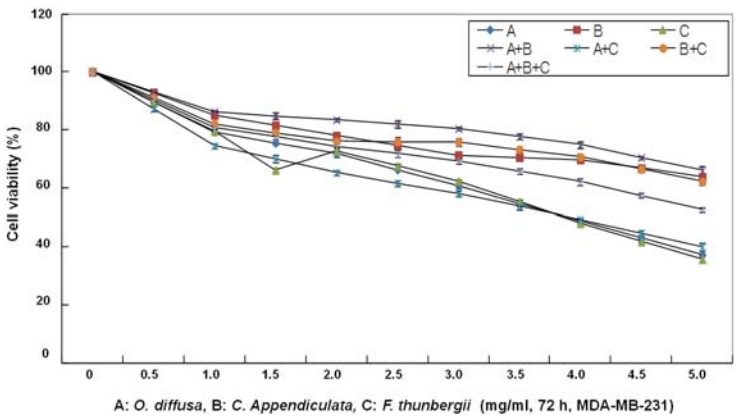


Fig. 2. Growth inhibition of human breast cancer MDA-MB-231 cells after single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*.

Inhibition of cell growth was measured by the metabolic-bye-based MTT assay.

3. MDA-MB-231 세포의 형태변화에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

도립현미경을 사용하여 MDA-MB-231 세포의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 山慈姑 단독처리군의 경우에는 약간의 세포밀도 감소현상이 나타났고 세포의 형태변화는 거의 관찰되지 않았지만, 白花蛇舌草, 浙貝母를 단독처리하였을 경우에는 처리농도 의존적으로 세포의 밀도가 현저하게 감소하였으며, 고농도 처리군에서는 전체적으로 세포의 모양이 길어지는 형태변화가 유발되었으며, 부착력을 잃고 부유하는 세포의 수가 증가되었다. 白花蛇舌草와 浙貝母 복합처리군의 경우에는 白花蛇舌草, 浙貝母의 단독처리군과 비교하여 조금 약한 세포의 밀도감소 현상과 형태변화가 유발되는 것으로 확인되었고, 山慈姑가 포함된 복합처리군에서는 밀도감소 현상이 현

저하게 감소하는 것으로 나타났으며, 이에 따른 형태변화도 거의 유발되지 않았다(Fig. 3).

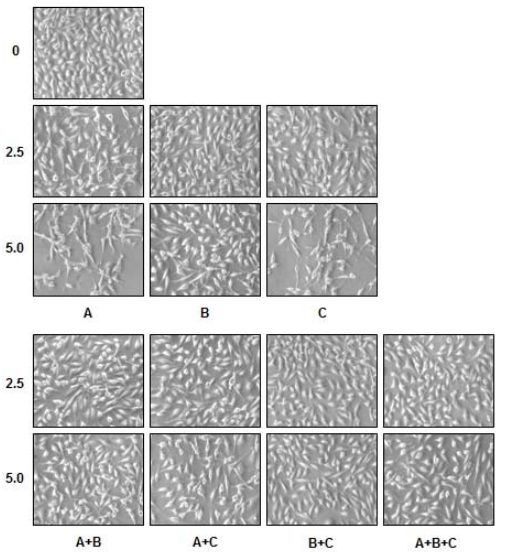


Fig. 3. Morphological changes of human breast cancer MDA-MB-231 cells by single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*.

Cell morphology was visualized by inverted microscope. Magnification, ×200

4. MDA-MB-231 세포핵의 형태변화에 미치는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 영향

DAPI를 세포에 처리하여 핵의 형태변화를 조사한 결과는 Fig. 4에서 나타난 바와 같다. 白花蛇舌草, 浙貝母 처리군에서는 전체적인 핵의 밀도가 감소하였으며, 특히 단독처리군에서 현저한 감소현상이 유발된다는 것을 알 수 있었다. Apoptotic body 형성 및 DAPI의 투과성 증가에 따른 빛의 강도 증가 현상을 확인한 결과 山慈姑 단독처리군과 山慈姑가 포함된 복합처리군에서는 apoptosis 유발의 특징들이 거의 나타나지 않았지만 白花蛇舌草, 浙貝母 단독처리군과 복합처리군에서는 apoptosis 유발의 특징들이 나타났다. 특히 浙貝母 단독처리군에서 apoptotic body 형성 및 빛의 강도 증가 현상이 강하게 나타났으며, 白花蛇舌草 단독처리군의 경우에는 浙貝母 단독처리군과 비교하여 이러한 현상들이 약하게 나타났다(Fig. 4).

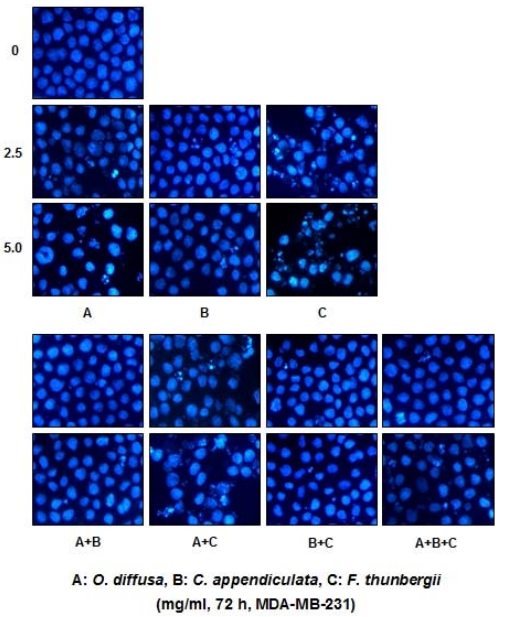


Fig. 4. Apoptotic bodies formation of human breast cancer MDA-MB-231 cells by single and complex treatment of *O. diffusa*, *C. appendiculata* and *F. thunbergii*.

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, ×400

5. MDA-MB-231 세포에서 白花蛇舌草, 浙貝母에 의한 세포주기 변화

白花蛇舌草 처리에 따른 세포주기 변화를 확인한 결과, Fig. 5 및 6에서 나타낸 바와 같이 처리농도 의존적으로 G1기에 해당하는 세포의 빈도는 감소하는 반면에 G2/M기에 해당하는 세포의 빈도가 증가되었다. 浙貝母 처리에 따른 세포주기

변화를 확인한 결과는 Fig. 5 및 7의 결과에서 알 수 있듯이 G1기, S기, G2/M기에 해당하는 세포의 빈도가 거의 변화가 없었다(Fig. 5, 6, 7).

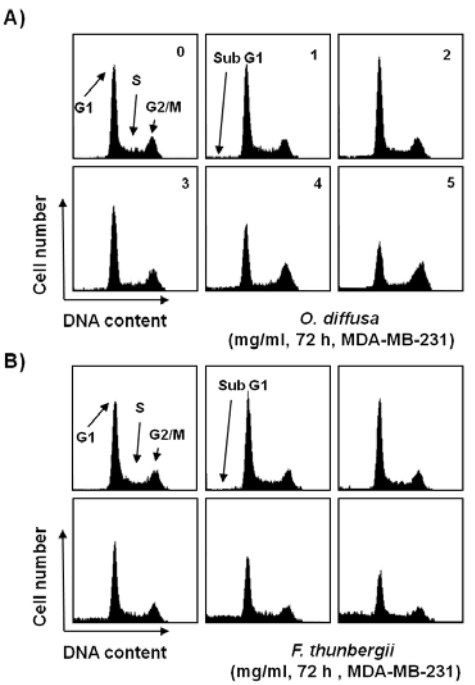
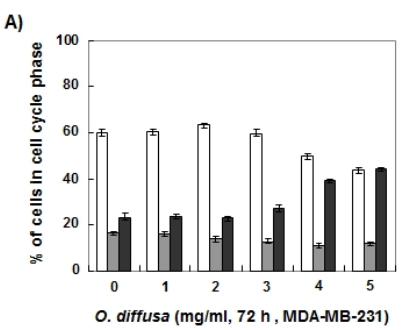


Fig. 5. Measurement of the cell cycle by single treatment of *O. diffusa* and *F. thunbergii* in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

The cells were fixed and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by DNA flow cytometery.

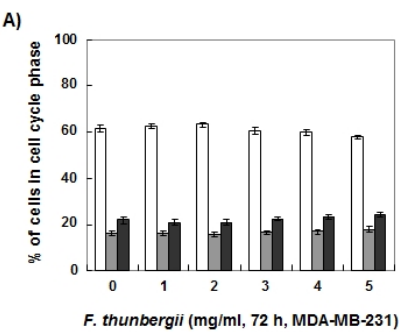


B)

O. diffusa (mg/ml, 72 h, MDA-MB-231)	Number of cells (%)		
	G1	S	G2/M
0	60.04	16.43	23.53
1	60.30	15.96	23.74
2	63.20	13.98	22.82
3	59.68	12.89	27.43
4	49.76	11.21	39.03
5	43.70	11.90	44.40

Fig. 6. Measurement of the cell cycle by single treatment of *O. diffusa* in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

Cells grown under the same conditions as Fig. 5 were collected, fixed, and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by DNA flow cytometery. The percentages of cells in each cell cycle phase are presented.



B)

F. thunbergii (mg/ml, 72 h, MDA-MB-231)	Number of cells (%)		
	G1	S	G2/M
0	61.59	16.36	22.05
1	62.63	16.37	21.00
2	63.26	15.73	21.01
3	60.71	16.64	22.65
4	59.92	16.84	23.24
5	57.69	17.89	24.42

Fig. 7. Measurement of the cell cycle by single treatment of *F. thunbergii* in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

Cells grown under the same conditions as Fig. 5 were collected, fixed, and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by DNA flow cytometery.

6. MDA-MB-231 세포에서 白花蛇舌草, 浙貝母가 sub-G1기 형성에 미치는 영향

DNA flow cytometry를 이용하여 sub-G1기에 해당하는 세포를 측정한 결과는 Fig. 5 및 8에 나타낸 바와 같다. 결과를 살펴보면 白花蛇舌草는 MDA-MB-231 세포에서 G2/M기에서의 세포주기 억제와 약한 apoptosis 유발에 의하여 생존율 감소 및 성장억제를 유발하였으며, 浙貝母는 강한 apoptosis 유발에 의하여 생존율 감소 및 성장억제를 유발하였다(Fig. 8).

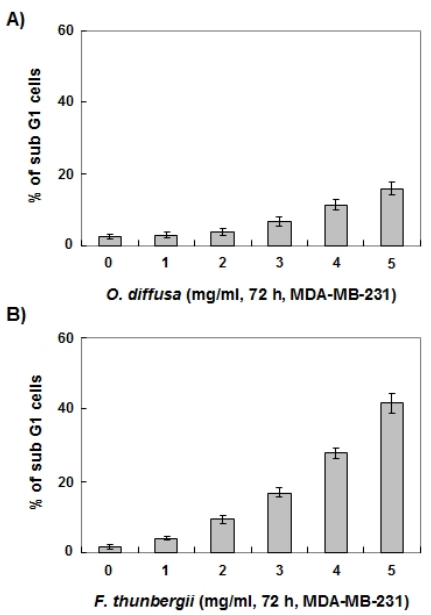


Fig. 8. Induction of sub-G1 phase rate by single treatment of *O. diffusa* and *F. thunbergii* in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation.

7. MDA-MB-231 세포에서 白花蛇舌草, 浙貝母가 DNA 단편화 유발에 미치는 영향

Endonuclease에 의한 DNA 단편화 현상이 유발되는 지를 조사한 결과는 Fig. 9에 나타난 바와 같이 白花蛇舌草는 약간의 apoptosis 유발과 함께 G2/M기에서의 세포주기 억제를 통하여 인체 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에서의 생존율 감소, 증식억제 및 형태변화를 유발한다는 것을 알 수 있었으며, 浙貝母는 세포주기 억제와는 상관없이 강력한 apoptosis 유발에 의하여 생존율 감소, 증식억제 및 형태변화를 유발한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 9).

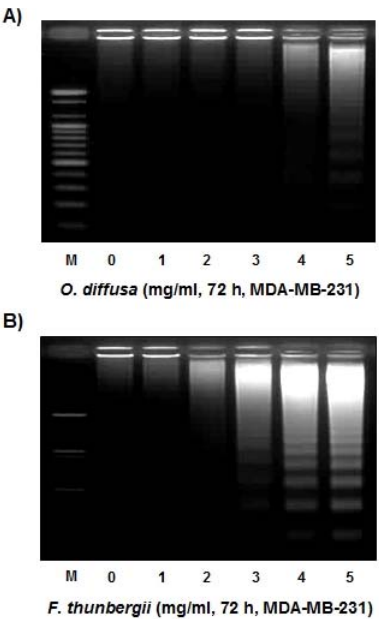


Fig. 9. Formation of DNA fragmentation by single treatment of *O. diffusa* and *F. thunbergii* in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

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.

Ⅳ. 고 찰

한의학 고전에 '癌'이라는 용어는 宋代의 ≪衛濟寶書≫에서 처음으로 찾아 볼 수 있으며, 腸覃, 反胃, 腫瘍, 癌, 癥瘕, 瘤, 瘿瘤, 巖, 噎膈, 積聚, 乳巖, 陰瘡, 舌菌, 失榮, 銷肛痔, 腎岩, 石疽 등으로 인식된 병증이고, 이는 현대 의학의 癌에 대한 묘사와 일치한다[24-30]. 이러한 악성 종양의 발생원인으로 한

의학에서는 外感邪氣, 七情內傷 등의 영향을 받아 臟腑陰陽氣血의 기능이 失調하여 痰凝, 濕聚, 氣滯, 瘀血, 熱毒蘊蓄 등의 병리기전을 통해 발생한다고 본다[31]. 따라서 치료는 健脾益腎, 滋陰補血 등의 扶正法과 活血化瘀, 淸熱解毒 등의 祛邪法, 健脾利濕 등의 扶正祛邪法으로 하였으며, 주로 종양 초기에는 先攻後調법을, 중기에는 攻補兼重法을, 말기에는 先補後攻法을 활용하고 있다[32].

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[33]. 乳巖의 治方으로 ≪丹溪治法心要≫에서는 靑皮, 瓜蔞, 橘葉, 連翹, 桃仁, 皀角刺, 甘草 등의 약재를 응용한 예가 있고, ≪醫學綱目≫에서는 神效瓜蔞散을, ≪醫學入門≫에서는 十六味流氣飮, 淸肝解鬱湯, 十全大補湯을 제시하고 있다[34]. 또한 중국에서는 유방암에 항암작용을 지니는 약물로 山慈姑, 穿山甲, 皀角刺, 夏枯草, 蒲公英, 白花蛇舌草, 土貝母, 貓人參, 半枝蓮, 天冬, 王不留行 등을 사용하고, 扶正시켜 면역력을 높이는 人參, 黃芪, 茯笭, 白朮, 甘草, 當歸, 薏苡仁 등의 약물과 함께 처방한다[35]. 또한 현대 중의학에는 衝任失調型, 肝鬱氣滯型, 熱毒瘀結型, 氣血兩虛型으로 분류하여 知柏地黃湯加減, 逍遙散加減, 桃紅四物湯合五味消毒飮加減, 補中益氣湯加減 등의 처방을 쓰기도 하며, 외용으로 山慈菇, 皀角刺, 丹蔘, 赤芍藥 등을 기본방으로 雄黃, 老生薑 등으로 가공하여 가루 또는 膏藥으로 만들어 쓰기도 한다[36].

유방암에 대한 최근 연구 동향을 살펴보면 三稜 추출물이 MCF-7세포의 세포독성과 세포자멸사 유발 효과가 있고, 그 밖에 歸朮破癥湯, 益氣養榮湯, 玄胡索 메탄올 추출물, 皀角刺 추출물, 天花粉, 苦蔘 등이 유방암 치료에 의미 있는 반응을 보인다[7-13]. 또한 十六味流氣飮은 면역조절 효과를 통하여 MCF-7 세포 이종이식에 대한 항암 효과와 악액질 저하를 보인다는 연구가 있고, 유방암에 대한 한의학적 치료로 半枝蓮은 세포자살의 특질이 있으며, 전이성 유방암을 가진 환자의 1b상 연구에서 안전하면서도 일부 환자에게 종양반응이 있다[14,15]. 또한 人參이나 黃芪 등의 補氣劑를 주사제로 만든 제제들은 유방암 수술 후의 회복을 촉진시키고 부작용을 줄이며 항암치료의 종양반응률을 상승시킨다는 연구결과들이 있다[16].

임상에서 유방암 치료에 자주 활용 하고 있는 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母에 대한 연구 동향을 살펴보면 白花蛇舌草의 추출물이 HL-60, S180, HeLa, NIH:OVCAR-3 등의 세포에 대해 항암 및 항전이 효과를 가지고 있다는 연구가 있고, 山慈姑 추출물과 콜히신이 Calu6와 MCF-7의 세포 증식 억제 효과를 보이나 유효 항암 물질에 대한 연구가 더 필요함을 언급한 연구가 있으며, 山慈姑가 들어가는 처방인 抗癌丹 복용 후 유방암 환자 26명의 VEGF, b-FGF 수치가 감소하였다는 보고 등이 있다[17-21]. 浙貝母에 대한 연구로는 貝母가 들어간 抗白湯이 HL-60세포의 세포고사 효과가 있다는 연구와 貝母의 유효성분인 verticinone 단독투여 보다 복합처방인 芷貝散이 HL-60세포분화 효과의 유의미한 증가가 있었다는 연구가 있다[22,23].

연구결과들을 보면 임상에서 유방암 치료에 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母가 자주 쓰임에도 이와 관련된 실험적 연구들이 부족함을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 白花蛇舌草, 山慈姑 및 浙貝母가 유방암에서 유발하는 항암효능을 확인하기 위하여 유방암 세포주인 MDA-MB-231 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.

먼저 trypan blue 염색법으로 세포의 생존율 변화를 확인한 결과 白花蛇舌草, 浙貝母 단독처리군에서 생존율 감소 현상이 강하게 유발되었고(Fig. 1),

MTT assay로 세포독성 및 성장억제 정도를 확인한 결과 마찬가지로 白花蛇舌草, 浙貝母 단독처리군에서 성장억제가 유발되었다(Fig. 2). 이러한 생존율 감소 및 성장억제 현상이 세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는 지 확인하니 고농도의 白花蛇舌草, 浙貝母 단독처리군에서 세포밀도 감소와 함께 형태변화가 나타났으며, 이러한 현상들은 각각의 시료들에 의한 생존율 감소 및 성장억제 현상과도 잘 일치하였다(Fig. 3).

그 다음 DAPI 염색을 이용하여 세포의 apoptosis 유발 여부를 조사한 결과, 생존율 감소 및 증식억제가 가장 많이 유발된 白花蛇舌草, 浙貝母의 단독처리군의 경우 모두 밀도의 감소현상이 나타났지만 浙貝母 단독처리군에서는 apoptotic body 및 빛의 강도 증가 현상이 증가한 반면 白花蛇舌草 단독처리군에서는 이러한 현상이 약하게 나타났다. 또한 白花蛇舌草 단독처리군에서는 浙貝母 단독처리군과 비슷하게 밀도 감소현상이 유발되었지만 apoptosis 유발의 증거가 거의 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 MDA-MB-231 세포에서 浙貝母는 apoptosis를 유발한다는 것을 예상할 수 있었지만 白花蛇舌草에 의하여 유발되는 생존율 감소와 증식억제 현상에는 또 다른 요인이 관여한다는 것을 예상할 수 있었다(Fig. 4).

DNA flow cytometry를 이용하여 생존율 감소 및 성장억제 현상이 강하게 나타난 白花蛇舌草, 浙貝母 단독처리군이 유발하는 세포주기의 변화 및 apoptosis 유발 정도를 확인하였다. 白花蛇舌草 단독처리군에서는 G2/M기에서의 세포주기 억제와 apoptosis 유발이 동시에 나타났으며(Fig. 5, 6 및 8A), 浙貝母 단독처리군에서는 세포주기의 변화 없이 apoptosis만 유발되는 것으로 나타났다(Fig. 5, 7 및 8B). 또한 DNA flow cytometry에 의하여 확인된 apoptosis 유발을 재확인하기 위하여 DNA 단편화 현상 정도를 조사하였는데 白花蛇舌草를 처리하였을 경우에는 고농도 처리군에서만 약간의 DNA 단편화 현상이 나타난 반면 浙貝母를 처리하였을 경우에는 DNA 단편화 현상이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 9).

이상의 결과를 종합해보면 白花蛇舌草, 浙貝母가 MDA-MB-231 세포에서 생존율 감소 및 성장억제 현상을 강하게 유발하였고, 이러한 현상은 白花蛇舌草의 경우에는 G2/M기에서의 세포주기 억제와 apoptosis 유발이 관여하였으며, 浙貝母의 경우에는 세포주기의 변화 없이 apoptosis 유발이 관여하였다. 따라서 白花蛇舌草, 浙貝母가 인체 유방암 세포의 항암 효능에 대한 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각되며, 향후 이와 연관된 분자생물학적 기전에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단된다. 또한 약물의 단독처리, 복합처리에 따라 효능이 달라진다는 점에 대해서도 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Ⅳ. 결 론

1. MDA-MB-231세포에 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母를 단독처리 및 복합처리 하였을 때, 세포의 생존율, 증식억제 효과를 보면 白花蛇舌草, 浙貝母군은 농도 의존적으로 의미 있는 결과가 나왔으며, 山慈姑군은 단독처리 및 복합처리군 모두 효과가 낮게 측정되었다. 세포 관찰시 白花蛇舌草, 浙貝母군에서 세포 밀도 감소, 세포 형태 변화, 부유 세포 증가가 유발되었고, 山慈姑군에서는 세포의 형태변화는 거의 관찰되지 않았다. 白花蛇舌草, 浙貝母 복합처리 하였을 경우에는 각각 단독처리군에 비하여 약한 변화를 보였고, 山慈姑가 포함된 군에서는 밀도감소 현상이 현저하게 감소되었다.
2. MDA-MB-231세포에서 浙貝母는 강한 apoptosis 유발에 의하여 생존율 감소 및 성장억제를 보였고 세포주기 억제와는 관련이 없었다. 白花蛇舌草는 G2/M기에서의 세포주기 억제와 약한 apoptosis 유발에 의하여 생존율 감소 및 성장억제를 보였다.

향후 白花蛇舌草, 山慈姑, 浙貝母의 항암효능에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보이며, 단일제제 및 복합제제에 관한 후속 연구도 필요할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Jung KW, Park S, Kong HJ, Won YJ, Lee JY, Seo HG, et al. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2009. *Cancer Res Treat* 2012;44:11-24.
2. Cardoso F, Bischoff J, Brain E, Zotano ÁG, Lück HJ, Tjan-Heijnen VC, et al. A review of the treatment of endocrine responsive metastatic breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Treat Rev* 2013;39:457-65.
3. Hashemi-Meshkini A, Keshavarz K, Gharibnaseri Z, Kheirandish M, Kebriaeezadeh A, Nikfar S, et al. Cost-effectiveness analysis review of exemestane in the treatment of primary and advanced breast cancer. *Arch Med Sci* 2013;9:472-8.
4. Meiyanto E, Hermawan A, Anindyajati. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:427-36.
5. Yang H, Dou QP. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. *Curr Drug Targets* 2010;11:733-44.
6. 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* 2006;12:287-311.
7. 정경아, 박경미, 조성희. 三稜 추출물의 인간 유방암 세포 성장 억제 효과. 대한한방부인과학회지 2006;19(1):166-77.
8. 반혜란, 조성희, 박경미. 歸朮破癥湯 추출물의 인간 유방암세포에 대한 성장억제 효과. 대한한방부인과학회지 2006;19(1):155-65.
9. 이진아, 박경미, 조성희. 益氣養榮湯의 항산화 및 유방암 세포주 생장 억제 효과에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 2007;20(1):32-49.
10. 박영애, 김동철. 玄胡索 메탄올 추출물이 Bcl-2와 Bcl-$_{XL}$ 발현 억제를 통해 유방암 세포의 자멸사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 2008;21(4):90-103.
11. 반혜란, 조성희, 박경미, 양승정. 皂角刺 추출물이 인간 유래 유방암 세포 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 2009;22(2):94-118.
12. 정승민, 정미경, 고성규, 최유경, 박종형, 전찬용. 天花粉이 MCF-7 유방암 세포주의 G2/M세포 주기 억제에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2011;25(5):857-62.
13. 이희정, 김민철, 임보라, 배고은, 김형우, 권영규, 등. 苦蔘의 인체 유방암세포에 미치는 효과. 韓國韓醫學硏究院論文集 2012;18(1):75-84.
14. 정연철, 박영선, 김동철. 十六味流氣飮의 免疫活性에 의한 乳房癌 세포 成長抑制效果. 대한한방부인과학회지 2012;25(3):40-60.
15. Perez AT, Arun B, Tripathy D, Tagliaferri MA, Shaw HS, Kimmick GG, et al. A phase 1B dose escalation trial of Scutellaria barbata (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120(1):111-8.
16. 정의민, 정종수, 박재우, 정현식, 윤성우. 중의학 논문에 나타난 유방암의 연구 동향에 대한 고찰-중의학 논문을 중심으로-. 대한한방부인과학회지 2009;22(1):263-78.
17. 노훈정, 문구, 문석재, 원진희, 문영호, 박래길. 白花蛇舌草 메탄올 抽出物의 抗腫瘍 效果 및 抗癌 機轉에 關한 硏究. 대한한방종양학회지 2000;6(1):81-97.

18. 이효정, 이은옥, 이연희, 김관현, 이재호, 백남인, 나정찬, 김성훈. 국내산 白花蛇舌草 전초와 뿌리의 항암효과. 생약학회지 2004;35(2):110-5.
19. 김경순, 예성철, 유병철, 조종관, 이연월, 유화승. 鬼箭羽, 白花蛇舌草, 瓦松 추출물을 처치한 난소암과 자궁경부암 세포에서의 단백질 발현 변화. 대한한방내과학회지 2011;32(1):33-42.
20. 이동은, 이소영, 김정선, 조종관, 유화승, 최선주. 抗癌丹 및 그 주요 성분의 Calu6와 MCF-7 사람 암세포주에 대한 항암효과. 대한한의학회지 2009;30(5):50-60.
21. Yoo HS, Lee NH, Cho JH, Lee YW, Son CG, Kang WC, Cho CK. Changes of Serum VEGF and b-FGF in 26 Patients with Breast Cancer after Treatment with *Hang-Am-Dan* (HAD), an Antiangiogenic Botanical Prescription. *Korean Journal of Oriental Medicine* 2005;26(4):22-30.
22. Park JH, Ju SM, Kim KJ, Jeon BH, Oh JM, Lee CH, Han DM, Kim WS. *In vitro* Growth Inhibition and Apoptotic Effects of Hang-baek-Tang on HL-60 Cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2005;19(6):1636-9.
23. 황기명. 人間白血病 細胞株에서 芷貝散의 作用에 關한 硏究. 대한한의학방제학회지 2002;10(1):143-55.
24. 葉銘洪. 治癌中藥及處方. 臺北: 華聯出版社; 1986, p. 1-10.
25. 方藥中, 鄧鐵濤, 李克光, 陳可冀, 金實壽 等篇. 用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社; 1986, p. 12-6, 621-35.
26. 郎偉君. 抗癌中藥一千方. 北京: 中國醫藥科技術出版社; 1994, p. 5-17.
27. 賈堃. 癌瘤防治硏究. 서울: 成輔社; 1984, p. 25-7.
28. 上海中醫學院. 中醫外科學. 香港: 商務印書館; 1982, p. 302-7.
29. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海: 上海科學技術出版社; 1985, p. 148-9.
30. 金相贊. 腫瘍의 治法에 關한 實驗的 硏究. 慶山大學校大學院碩士學位論文 1997;1-2.
31. 田炳旭, 柳逢夏. 少陰人補中益氣湯과 瓦松이 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響. 第18回全國韓醫學學術大會發表論文集 1996;48.
32. 崔鐘鎬. 枸杞子 및 地骨皮 藥針이 腫瘍과 免疫反應에 미치는 影響. 大田大學校大學院博士學位論文 1996;55-6.
33. 金廷珍, 李京燮, 宋炳基. 乳房腫塊에 關한 文獻的 考察. 대한한방부인과학회지 1998;11(2):29-43.
34. 金義一, 柳同烈. 乳房疾患의 治方에 對한 文獻的 考察. 大田大學校韓醫學硏究所論文集 2004;13(1):129-46.
35. 孟琳升 等 編著. 中医治癌大成. 北京: 北京科學技術出版社; 1997, p. 646.
36. 周宜强 主編. 實用中醫腫瘤學. 北京: 中醫古籍出版社; 2006, p. 375-6.