

Original Article / 원저

土茯苓이 피부암 세포의 성장에 미치는 영향

송시열¹ · 정민영² · 최정화² · 박수연²

동신대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과학교실(¹대학원생, ²교수)

Effects of *Smilax China L.* on the Growth of Skin Cancer Cells

Si-Yeol Song · Min-Yeong Jung · Jeong-Hwa Choi · Soo-Yeon Park

Department of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean medicine,
Dongshin University

Abstract

Objectives : We aimed to study the effect of *Smilax China L.*(SCL), which has anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer effects, on the growth of skin cancer cells.

Methods : HaCaT cells, a normal human cell line, and skin cancer cells including A431, SK-MEL-5 and SK-MEL-28 cells were treated with *Smilax China L.* ethanol extract(SCL-EtOH) at concentrations of 5, 10, 20 and 40 μ g/ml. Meanwhile, JB6 Cl41, a normal mouse epithelial cell line, was treated with epidermal growth factor(EGF) and phorbol 12-myristate 13-acetate(TPA), an inflammatory factor, to induce cell transformation and treated with SCL-EtOH. In addition, we treated SK-MEL-5 and SK-MEL-28 cells with SCL-EtOH at various concentrations and checked the effect on the cell cycle.

Results : As a result, it showed no toxicity to HaCaT cells up to the highest concentration of 40 μ g/ml, and significant cell growth inhibition to A431, SK-MEL-5 and SK-MEL-28 cells in a time- and concentration-dependent manner. In addition, as a result of checking the shape of skin cancer cells according to SCL-EtOH treatment, it was observed that as the concentration increased, the number of normally attached and growing cells decreased and the shape of the cells changed. Colony formation was significantly reduced in a concentration-dependent manner in JB6 Cl41 cells treated with EGF or TPA. Flow cytometry analysis with propidium iodide(PI) staining showed that SCL-EtOH induced the G2/M phase arrest. We further confirmed the decrease in Cyclin B1 expression and increase in p27 expression associated with the G2/M phase of the cell cycle through western blot analysis. Flow cytometry analysis confirmed that SCL-EtOH induced cell apoptosis. Furthermore, through Western blot analysis, it was observed that the expression of cleaved-caspase-7, which is related to apoptosis, increased. Finally, it was confirmed that the expression of COX-2, an inflammatory marker protein, decreased in a concentration-dependent manner with SCL-EtOH.

Conclusions : Through the above results, we have established a basis for applying SCL to the treatment of skin cancer.

Key words : Skin cancer; Melanoma; *Smilax China L.* extracts; Anticancer

I. 서 론

피부암은 전 세계적으로 발생률과 사망률이 지속해서 증가하고 있고 상피세포에서 유래한 비흑색종 피부암(non-melanoma)과 멜라닌 세포에서 유래한 흑색종 피부암(melanoma)으로 크게 나눌 수 있다¹⁻⁶. 비흑색종 피부암에는 기저층이나 모낭을 구성하는 세포에서 유래한 기저세포암(basal cell carcinoma)과 표피의 각질 형성세포가 악성화한 편평상피세포암(squamous cell carcinoma)이 있고 흑색종은 전체 피부암의 5% 정도이지만 5년 생존율이 20% 미만으로 치료가 어려운 악성 종양이다²⁻⁶.

피부암 치료법은 외과적 절제술이 주로 시행되고 그 외에도 방사선 치료, 약물치료 및 항암 화학요법 등이 사용되고 있다. 절제 수술은 초기에 치료할 경우 완치가 가능하지만 이미 전이되어 있거나 재발한 경우에는 한계가 있고 또한 기존의 항암 치료 약물은 부작용이 있으며 약물 내성을 유발할 수 있다⁷. 그러므로 기존 피부암의 치료 약물에 비해 상대적으로 안전한 생약에 대한 관심이 증가하고 있다.

土茯苓(*Smilaxis Rhizoma*)은 백합과에 속하며 국내에서 자생하는 청미래덩굴(*Smilax china* Linné, SCL) 또는 중국에서 자생하는 光葉菝葜(*Smilax glabra* Roxburgh)의 뿌리줄기로 본 연구에서는 SCL을 사용하였다. 性은 平하고 味는 甘淡하며 除濕, 解毒, 通利關節하는 효능이 있어 關節疼痛, 근육마비, 설사, 水腫, 痲病, 癰癤, 腫毒, 만성 피부질환 등에 사용되고 있다^{8,9}. 현재까지 土茯苓의 실험적 연구로는 항염증¹⁰⁻², 항산화¹³, 항비만^{14,15} 그리고 항암¹⁶⁻⁹ 효과에 대해서 보고된 바 있다.

그러나 土茯苓의 피부암에 관한 연구는 접하지 못했기

에, 본 연구에서는 土茯苓 에탄올 추출물(SCL-EtOH)이 피부암 세포주인 A431, SK-MEL-5, SK-MEL-28의 성장에 미치는 영향을 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 연구에서 사용된 SCL-EtOH는 한국한의학연구원의 한약자원연구센터 한약표준자원은행(Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 분양받은 SCL-EtOH는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 100mg/ml의 농도로 stock solution을 제조한 후 -20℃에 보관하였다. 표본 관능감정과 유전자분석은 한약표준자원은행에서 발급되어진 확인서와 같이 규명되었다(Fig. 1, 2).

한약표준자원은행 표본 관능감정 확인서

코드	2-20-0021	표시 약명	토복령(土茯苓)
관정 약명	토복령(土茯苓), 청미래덩굴 <i>Smilax china</i> L.		
참고사항			
위와 같이 판정합니다. (주의 : 이는 제공된 시료에 대한 관능감정 결과로서, 품질을 보증하는 것은 아닙니다.) 2019-12-09 최고야 한국한의학연구원 한약표준자원은행			

Fig. 1. Sensory Test Certificate for SCL from the Standard Herbal Medicine Resources Bank, Korea Institute of Oriental Medicine.

2) 시약 및 기구

본 연구의 세포 배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), minimum essential medium(MEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin(P/S), sodium pyruvate (SP), minimum e

Corresponding author : Soo-Yeon Park, Department of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, Naju Dongshin University Korean Medicine Hospital, 14, Goyouk-gil, Naju-si, Jeollanam-do, 58326, Republic of Korea.
(Tel : 061-338-7811, E-mail : swallow92@hanmail.net)

• Received 2024/1/5 • Revised 2024/1/19 • Accepted 2024/1/26

한약표준자원은행 유전자분석 확인서

ID 194

코드	2-20-0021	표시 약명	토복령(土茯苓)
판정 결과	정미레팅골 <i>Smilax china</i> L.		
	<p>AAGTGCTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATGACTT ATTATACCTCGACTATGAACCAAAGATACTGATATCTTGCCA GCATTTCCAGTAACCTCCAACCCGGAGTTCGCGCTGAAGAGGC AGGGCGGGCGGTAGCCGAGAATCTTCTACTGGTACATGGACAA CTGTGTGGACTGATGGACTTACCAATCTTGTGCGTTACAAAGGACGATYAC CACATAGAGAGCGTGTGGGGAGGAAAACAATATATGCTTATGTAGCTTA TCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGGCTCGGTTACTAACATGTTTACTTCCATTG TGGTAATGATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGCTAGAGGATTTG CGAATTCCTACTCTTATCCAAAACCTTCCAAGGCCACCCCATGGATCCA AGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTGTGCTCCCTATTGGGATGTACCA TTAACCAAAAATTTGGGATATCCGCAAAAGACTACGGTAGAGCGGTTATGAA TGTCTGCGCGGTGGACTTGAATTTTACAAAAGATGATGAAAACGTGAACCTACA ACCATTATGCGTGGAGAGACGGTTTCGATTTTGTGCCGAAGCACTTTTTA AAGCGAGGGCGAAACGGGTGAAATCAAAGGACATTAATGAACTACTGCG GGTACATGTGAAGAAATGATGAAAAGGGCCGCAATTTGCTAGAGAATGGGACT TCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACGGGGGATTCAGTCAAAATACTACTT TAGCTCATTATTGCGGAGATAAAGGGCTACTTCTCACATCCATCGGCAATG CATGCAGTATTGATAGACAGAAAACCATGGTATGCATTTCCGCTGACTAGC TAAAGCATTACCGATGTCGCGGGAGATCATATTCACGCTGGTACAGTAGTAG GTAACCTGGAAGGGGACGTGAGATGACTTTAGGTTTGTGATTACTACGC GATGATTTTATTGAAAAGACCGAAGTCGGGGTATTTTTTCACTCAAGATTG GGTCTCTATGCCAGGTGTTTGGCCGTAGCTCCGGGGTATTCACGTTTGGC ATATGCCCGCTCAACCGAAATCTTTGGGGATGATTCGCTACTACAGTTCGGC GGAGGAACCTTAGGACACCTTGGGGAAATGCGCTGGTGCAGTAGCTAATCG AGTGGCTTCAGAAGCTGTGTACAAAGCTCTARTGAGGGGGCGTACTTGCTC GTGAAGTAAATAAATATCGGTGAAGCTTGCAATGGAGTCCGAACTGGCC GCTGCTTTGTAAGTATGGAAGGAGATCAAATTCGAGTTGCAACCGGTAGATAA GCTAGATAAAGAGAAGAAATAAGCACGTGAATTCAGTAATCTCTTTGTTTC TCCTAATTGCAATTTAA</p> <p>ITS2 TGTAAAATCTCGCAACCATCGAGTCTTTGAATGCAAGATGACTTGAGGCCA TCCGACTGAGGGCAGCGCTGCCTGGGCCCCAGGGCACGGACGTGGAGATTG GCCCCCCGCACATGAGCACGGCGAGACTAAGCGGGGCGGTGATGGGATGG GCACGACGAGTGGTGGATGGAAGTGCAGACTTTGCGCACCGAGCCGACGTC GTGGCCCCGGCCCCCAGTGGCAAGGCCCTTCAGAACTCATAGGGCGTGC GAGCCCTCCCCGGGATGGGTGAGCGCCCTCGCACCGGACCCAGGTGAGGTG GGGCCACTGTTTGTGTTAA</p> <p>ITS2 TGTAAAATCTACGAACCATCGAGTCTTTGAATGCAAGATGACTTGAGGCCA</p>		

TCCGACTGAGGGCAGCCCTGCCGGGGTTACACATCGTGTCTCTACGCC CACGGCGCCGGACGTGGAGATTGGCCCCCGCACATGAGCACGGCGGACTAA GCGTGGGCGCTGATGGGATGGGCACGACGAGTGGTGGATGGAAGTGGGAA TTCGCGCACCCGAGCGGACGTATGGCCCTCGGCCCCCACTGGCACAGGGCC CTTAGAACTCCATAGGGCGTGCAGGCCCTCCCCGGGATGGGTGAGCCGCT TGCACCGGACCCAGGTGAGTGGGGCCACTCGCAAGTTTAA	
ITS2 TGTAAAATCCCGCAACCATCGAGTCTTTGAATGCAAGATGACTTGAGGCCA TCTGACTGAGGGCAGCGCTGCCTGGGCGTTACACATCGTGTCTCTACGCC CATGGGCGCCGACGTGGAGATTGGCCCCCGCACATGAGCACGGCGGACTA AGCGCGGGCCGTGATGGGATGGGCACGACGAGTGGTGGATGGAAGTGGGA CTTCCGCGACCCGAGCTGGACGTGTGGCCCCGACCCCAAGTGGCACAGGGC CCTTCAGAACTCATAGGGCGTGCAGGCCCTCCCCGGGATGGGTGAGCCGCT TGCACCGGACCCAGGTGAGTGGGGCCACTCGCAAGTTTAA	
ITS2 TGTAAAATCCCGCAACCATCGAGTCTTTGAATGCAAGATGACTTGAGGCCA TCTGACTGAGGGCAGCGCTGCCGGGGTTACACATCGTGTCTCTACGCC CATGGGCGCCGACGTGGAGATTGGCCCCCGCACATGAGCACGGCGGACTA AGCGCGGGCCGTGATGGGATGGGCACGACGAGTGGTGGATGGAAGTGGGA CTTCCGCGACCCGAGCTGGACGTGTGGCCCCGACCCCAAGTGGCACAGGGC CCTTCAGAACTCATAGGGCGTGCAGGCCCTCCCCGGGATGGGTGAGCCGCT TGCACCGGACCCAGGTGAGTGGGGCCACTCGCAAGTTTAA	
ITS2 TGTAAAATCTCGCAACCATCGAGTCTTTGAATGCAAGATGACTTGAGGTC TCCGACTGAGGGCAGCGCTGCCGGGGTTACACATGTTGTCTCTACGCC CACGGGCGCCGACGTGGAGATTGGCCCCCGCACATGAGCACGGCGGACTA AGCGTGGGCGCTGATGGGATGGGCACGACGAGTGGTGGATGGAAGTGGGA ATTCCGCGACCCGAGCCGATGTCGTGGCCCCGGCCCCCAAGTGGCACAGGGC CCTTCAGAACTCATAGGGCGTGCAGGCCCTCCCCGGGATGGGTGAGCCGCT TGCACCGGACCCAGGTGAGTGGGGCCACTCGCAAGTTTAA	
참고사항	<p>위와 같이 판정합니다. (주의 : 이는 제공된 시료에 대한 유전자분석 결과로서, 품질을 보증하는 것은 아닙니다.)</p> <p>2020-07-27</p> <p>김민지</p> <p>한국한약연구원 한약표준자원은행</p>

Fig. 2. Gene Analysis Certificate for SCL from the Standard Herbal Medicine Resources Bank, Korea Institute of Oriental Medicine.

essential medium non-essential amino acid(MEM NEAA), trypsin-EDTA 는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, DMSO, epidermal growth factor(EGF), phorbol 12- myristate 13-acetate(TPA), 5-fluorouracil(5-FU), basal medium eagle(BME)은 Sigma-Aldrich, Inc.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항체 p27, Cyclin B1, caspase-7은 Santa Cruz(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)에서 구입하였다. COX-2(human)는 Cayman(Ann Arbor, MI, USA)으로부터 구입하였으며, actin 은 Invitrogen (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포 배양

인간 유래 피부 각질 형성 세포주 HaCaT cells와 인간 피부암(비흑색종) 세포주 A431, 쥐의 상피 세포주인 JB6 Cl41은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 인간 피부암(흑색종) 세포주 SK-MEL-5와 SK-MEL-28은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. HaCaT cells와 A431 cells는 10% FBS, 100U/ml P/S를 첨가한 DMEM에서 배양하였으며, SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells는

10% FBS, 100U/ml P/S, 1X SP, 1X MEM NEAA 를 포함하는 MEM 배지를 이용하여 배양하였다. JB6 Cl41 은 5% FBS, 100U/ml P/S, X SP, 1X MEM NEAA 를 포함하는 MEM 에서 배양하였다. 모든 세포주는 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 각각 배양하였으며, 2일마다 새로운 배지로 교체해 주었다.

2) 정상 세포에 대한 독성 측정

SCL-EtOH 가 정상 세포에 독성을 나타내는지 알아보기 위하여 WST-8 분석을 수행하였다. HaCaT cells 를 96-well plate 에 7×10^3 cells/well 이 되도록 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. SCL-EtOH 를 다양한 농도(0, 5, 10, 20, 40 µg/ml)로 처리한 후, 각각 24시간 및 48시간 동안 반응시키고 Quanti-MAX WST-8 Cell viability Assay Kit reagent(Biomax, Seoul, Republic of Korea)를 각 well 에 10 µL 씩 첨가하였다. 37°C 에서 2시간 배양하고, Multiskan SkyHigh spectrophotometer(ThermoScientific, Vantaa, Finland)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 피부암 세포의 생존율 측정

SCL-EtOH 가 HaCaT cells 에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96-well plate 에 A431(2.5×10^3 cells/well), SK-MEL-5(1×10^3 cells/well) 및 SK-MEL-28 (1×10^3 cells/well) cells 를 18시간 동안 배양하고, SCL-EtOH 를 농도별로 처리한 후 각각 24시간, 48시간 및 72시간 동안 반응시켰다. 10 µL 의 WST-8를 각 well 에 첨가하고 37°C에서 1.5시간 동안 반응시킨 후 Spectrophotometer 를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 SCL-EtOH 의 효과를 비교하기 위하여 똑같은 조건에서 항암제인 5-FU 를 농도별(0, 1.25, 2.5, 5, 10 µM)로 처리하였다.

4) 세포 형태 변화 관찰

흑색종 피부암 세포주에 대한 SCL-EtOH 처리에 따른 세포 형태의 변화를 확인하기 위하여, SK-MEL-5 및

SK-MEL-28 cells 를 6-well plate 에 각 1.5×10^5 cells/well 로 seeding 한 후, 18시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 1X PBS 로 세척한 후, SCL-EtOH 를 농도별(0, 10, 20, 40 µg/ml)로 처리하였다. 각각 7 2시간 동안 반응시킨 후 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 통해 세포의 형태를 관찰하고 이미지를 저장하였다.

5) Anchorage-independent cell growth 분석 (Soft Agar assay)

성장인자인 EGF 에 의해 유도된 JB6 Cl41 cells 와 염증인자 TPA 에 의해 유도된 JB6 Cl41 cells 의 cell transformation 및 colony 형성 변화를 확인하기 위하여 anchorage-independent cell growth 분석을 실시하였다²⁰. Soft agar 는 두 층으로 이루어지며, 바닥 층을 만들기 위해 BME, 10% FBS, 10% PBS, 2mM L-glutamine, 5 µg/ml gentamicin 이 포함된 0.5% agar mix 에 -/+ 10ng/ml EGF 또는 -/+ 10ng/ml TPA 와 다양한 농도의 SCL-EtOH(10, 20, 40 µg/ml)를 첨가하여 6-well plate 에 well 당 3ml 씩 분주하고 상온에서 30분 정도 굳혔다. JB6 세포는 10% BME 배지로 resuspend 하여 준비하였다. 상기의 BME 혼합배지에 0.3% agar, -/+ 10ng/ml EGF 또는 -/+ 10ng/ml TPA 와 다양한 농도의 SCL-EtOH(10, 20, 40 µg/ml), 그리고 8×10^3 cells/well 이 되도록 JB6 세포를 혼합하여 바닥층 위로 1ml 씩 분주하여 상온에서 30분 동안 굳힌 다음 5% CO₂, 37°C 배양기에서 약 2주간 배양하였다. 형성된 colony 는 광학현미경을 통해 관찰하였으며, 저장된 이미지는 Image-Pro Plus software(v.6.0) program(Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)을 이용하여 colony 를 계수하였다.

6) Propidium Iodide(PI) 염색을 통한 세포주기 분석

SCL-EtOH 가 흑색종 세포주 SK-MEL-5와 SK-MEL-28의 세포주기에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 6-w

ell plate 에 1.5×10^5 cells/well 이 되도록 세포를 분주한 후, 18시간 동안 안정화하였다. SCL-EtOH 를 다양한 농도(10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하고 48시간 동안 배양한 다음, 배지와 1X cold-PBS 로 1회 세척한 세척수를 모두 모아주었다. Trypsin-EDTA 를 처리하여 세포들을 회수하고 1,000rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 1X cold-PBS 로 1회 세척한 다음, 70% 에탄올을 가하여 -20°C에서 24시간 이상 고정해주었다. 이후에 13,000rpm, 4°C에서 3분간 원심분리하여 70% 에탄올을 모두 제거하고, 1X cold-PBS 로 세척하였다. FxCycle™ PI/RNase Staining Solution(ThermoFisher Scientific, Rockford, Illinois)의 프로토콜을 따라 염색한 다음 유세포분석기 CytoFLEX(Beckman Coulter, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

7) Annexin V/PI 염색을 통한 세포 사멸 분석

SCL-EtOH 가 SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells 의 세포사멸에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 6-well plate 에 1.5×10^5 cells/well 의 세포를 seeding 하고, 18시간 동안 배양하였다. 기존 배지를 제거하고, 다양한 농도의 SCL-EtOH 를 처리하고 72시간 동안 배양한 배지와 1X cold-PBS 로 1회 세척한 세척수를 모두 회수하였다. Trypsin-EDTA 를 처리하여 세포들을 모으고, 4°C에서 1,000rpm 으로 5분간 원심분리하였다. 1X cold-PBS 로 1회 세척한 다음, 제조사의 프로토콜을 따라 Annexin V Alexa Fluor™ 488/Propidium Iodide Dead Cell Apoptosis Kits(ThermoFisher Scientific, Illinois, USA)를 사용해 세포를 염색시키고 CytoFLEX(Beckman Coulter)를 사용하여 분석하였다.

8) Western blot을 통한 단백질 발현 분석

SCL-EtOH 의 세포 성장 억제 효과를 나타내는 분자 기전을 알아보기 위하여, 100mm dish 에 0.8×10^6 cells/well 의 SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells 를 분주하고, 18시간 동안 배양하였다. 기존 배지를 제거하고, 0, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 다양한 SCL-EtOH 를 처리한 다음, 48

시간 또는 72시간 동안 배양하였다. 배지와 1X cold-PBS 세척수를 포함하여 trypsin-EDTA 를 처리하여 회수한 세포들을 4°C에서 1000rpm 으로 5분간 원심분리하였다. 1X cold-PBS 로 1회 세척한 후, PRO-PREP Protein Extraction Solution(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)과 Pierce BCA Protein Assay Kit(ThermoFisher Scientific, Illinois, USA)를 이용하여 단백질을 추출하고 정량하였다. Mini-PROTEAN Tetra Cell System(Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 SDS-PAGE 를 진행하고, iBlot 3 Transfer System(ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland)을 이용하여 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane 으로 이동시켰다. 실온에서 1시간 동안 5% skim milk 를 이용하여 blocking 후, 1X tris-buffered saline with Tween-20(TBS-T)를 이용하여 5분씩 3회 세척하고, 1차 항체와 충분히 반응시켜주기 위하여 4°C에서 12시간 이상 shaking 해주었다. 이후에는 실온에서 1X TBS-T 로 10분씩 3회 세척하고 2차 항체를 1시간 반응시켰다. 1X TBS-T 를 이용하여 10분씩 3회 세척하고 enhanced chemiluminescent(ECL) horseradish peroxidase(HRP) substrate(ThermoFisher Scientific, Illinois, USA)로 반응시켜 LAS-Amersham Imager 600(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다.

9) 통계처리

각각의 실험 결과값은 평균±표준편차로 나타내었고, Student's t-tests 와 GraphPad Prism(version 6.01 for Windows, GraphPad Software, California, USA, www.graphpad.com)을 사용하여 Dunnett 사후 테스트에 의한 일원 분산 분석(ANOVA)을 통해 통계적으로 처리하였다. 그룹 간 유의성은 $p < 0.05$ 에서 평가하였다.

III. 결 과

1. 정상세포에 대한 독성 여부

HaCaT에 대한 독성을 확인한 결과, SCL-EtOH는 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 처리한 경우에도 48시간 후 세포생존율이 86.3 \pm 0.3%로 독성을 나타내지 않았다(Fig. 3).

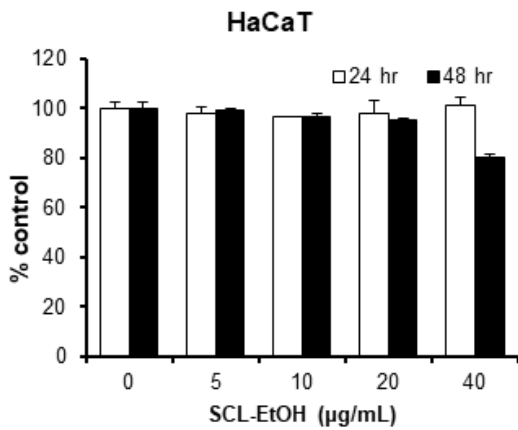


Fig. 3. Cytotoxic Effect of SCL-EtOH on Human Normal Skin Cell, HaCaT Cells.

Cells were treated with different concentration of SCL-EtOH for 24 and 48hr. The experimental data were expressed in mean \pm standard deviation of three replicates. No significant difference between the control and treated groups. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract.

2. 다양한 피부암 세포주의 성장에 미치는 영향

1) 비흑색종 세포주에서의 세포 성장 저해 효과

비흑색종 세포주 A431의 생존율을 관찰한 결과, SCL-EtOH는 농도 및 시간 의존적으로 유의성 있게 감소하여 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 72시간 후 49.8 \pm 4.3%의 세포 성장 억제를 보였다. 그러나 대조군인 5-FU는 같은 조건에서 72.4 \pm 0.9%의 세포 성장 억제를 보여서 SCL-EtOH보다 높게 나타났다(Fig. 4).

2) 흑색종 세포주에서의 세포 성장 저해 효과

흑색종 세포주 SK-MEL-5에 대한 SCL-EtOH 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항증식 효과는 24시간, 48시간 및 72시간 후에 각각 32.5 \pm 1.9%, 64.1 \pm 1.5%, 90.9 \pm 1.7%로 유의성 있는 세포 성장 억제를 보였다. 5-FU는 각각 11.1 \pm 2.8%, 43.6 \pm 3.4%, 58.8 \pm 0.8%로 SCL-EtOH가 억제 효과가 더 높게 나타났다(Fig. 5).

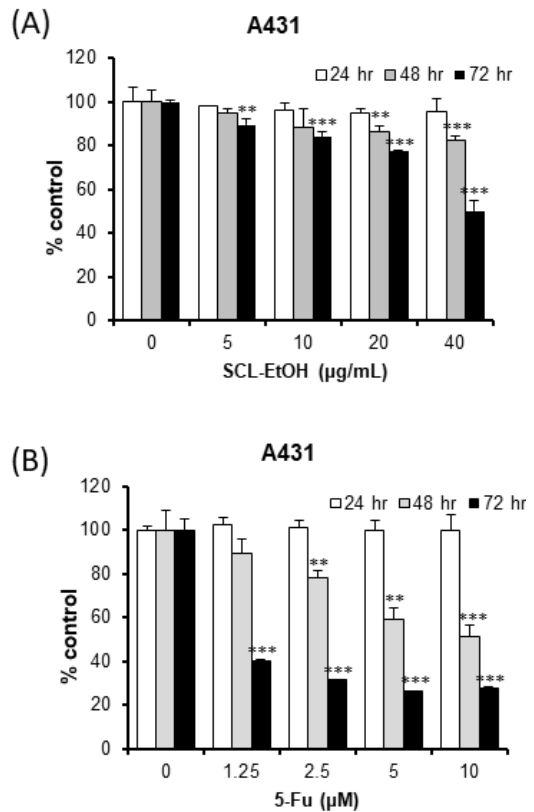


Fig. 4. The Effect of SCL-EtOH on the Cell Viability in A431 Cells.

A431 cells were treated with different concentration of (A) SCL-EtOH(5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or (B) 5-FU(1.25, 2.5, 5, and 10 μM) for 24, 48, 72hr. The experimental data were expressed in mean \pm standard deviation of three replicates. Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism: **p<0.01; ***p<0.001. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract, 5-FU: 5-fluorouracil.

SK-MEL-28에 대한 SCL-EtOH 40 μ g/ml의 항증식 효과는 24시간, 48시간 및 72시간 후에 각각 59.2 \pm 2.0%, 79.1 \pm 1.7%, 84.4 \pm 1.5%로 유의성 있는 세포의 성장 억제를 보였다. 5-FU는 각각 41.0 \pm 7.3%, 49.7 \pm 1.0%, 68.3 \pm 0.9%로 SCL-EtOH가 억제 효과가 더 높게 나타났다(Fig. 6).

3. 피부암 세포 형태에 미치는 영향

SK-MEL-5, SK-MEL-28 cells에서 SCL-EtOH의 농도가 증가할수록 세포의 형태가 변화하였으며, dish에 부착하지 않고 부유 상태인 세포가 증가하였다(Fig. 7).

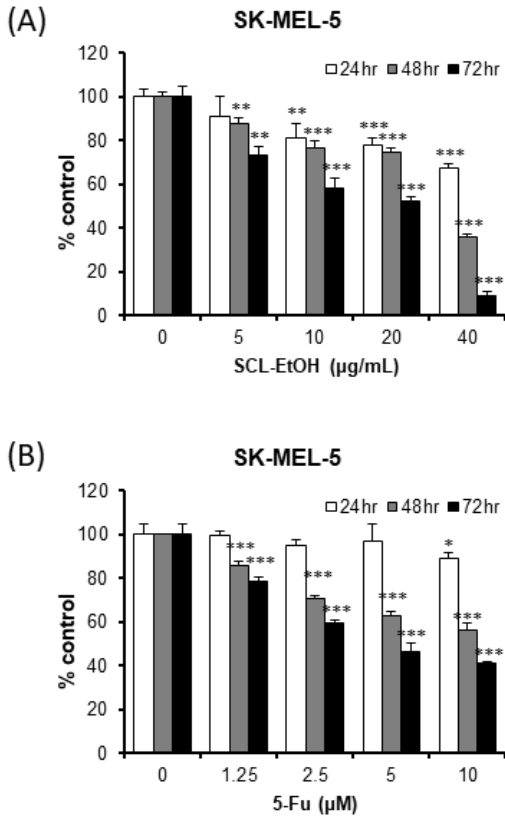


Fig. 5. The Effect of SCL-EtOH on the Cell Viability in SK-MEL-5 Cells.

SK-MEL-5 cells were treated with different concentration of (A) SCL-EtOH(5, 10, 20, and 40 μ g/ml) or (B) 5-FU (1.25, 2.5, 5, and 10 μ M) for 24, 48, 72hr. The experimental data were expressed in mean \pm standard deviation of three replicates. Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract, 5-FU: 5-fluorouracil.

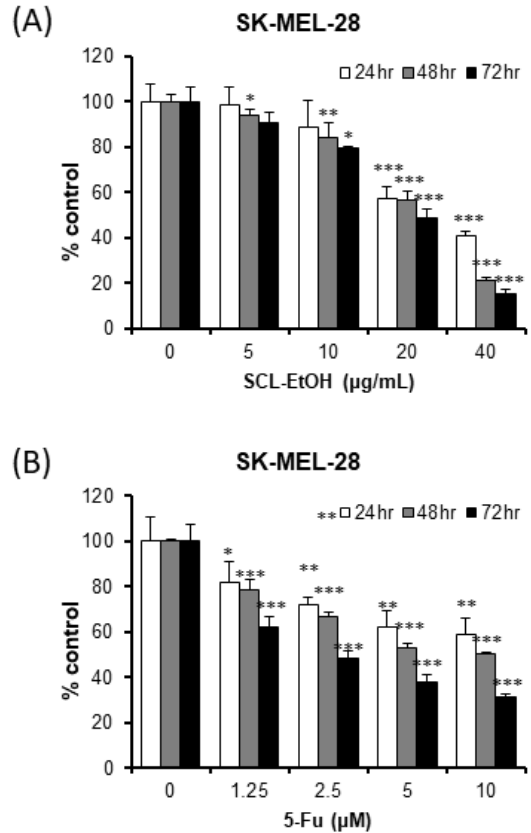


Fig. 6. The Effect of SCL-EtOH on the Cell Viability in SK-MEL-28 Cells.

SK-MEL-28 cells were treated with different concentration of (A) SCL-EtOH(5, 10, 20, and 40 μ g/ml) or (B) 5-FU (1.25, 2.5, 5, and 10 μ M) for 24, 48, 72hr. The experimental data were expressed in mean \pm standard deviation of three replicates. Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract, 5-FU: 5-fluorouracil.

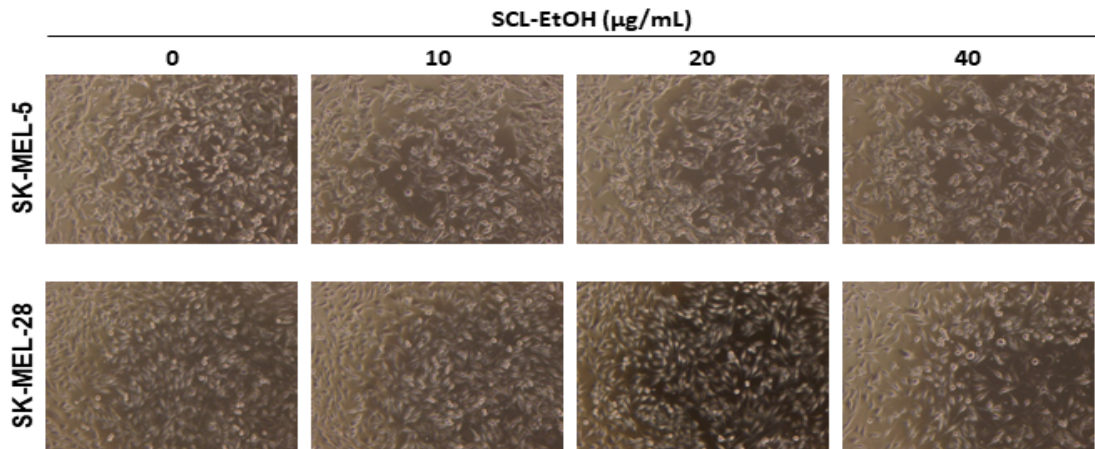


Fig. 7. The Representative Images of Effects of SCL-EtOH on Morphological Changes in SK-MEL-5 and SK-MEK-28 Cells.

Cells were treated with 10, 20, and 40 µg/ml SCL-EtOH and then incubated for 72hr. The morphological changes in the cells were observed using a microscope. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract.

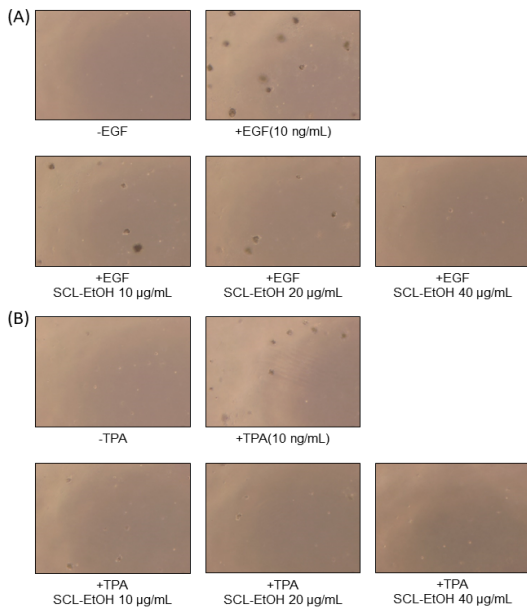


Fig. 8. The Representative Images of Effects of SCL-EtOH on Anchorage-independent Growth in EGF- or TPA-induced JB6 Cell Transformation.

Anchorage-independent cell growth in soft agar containing various concentrations of SCL-EtOH(10, 20, 40 µg/ml) in EGF-induced (A) TPA-induced (B) JB6 cell transformation was conducted for 2 weeks. Representative images of the soft agar colony formation were obtained by microscope. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract, EGF: epidermal growth factor, TPA: phorbol 12-myristate 13-acetate.

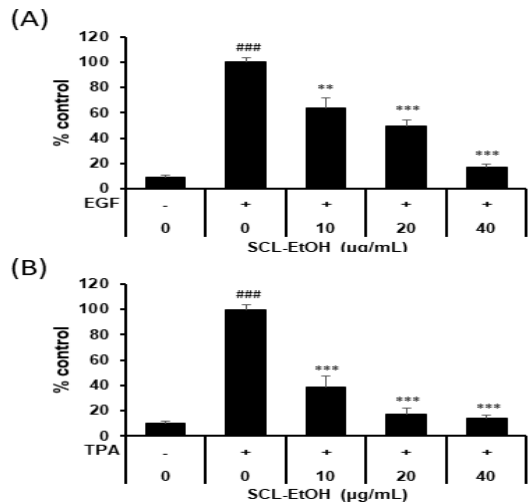


Fig. 9. The Effects of SCL-EtOH on Anchorage-independent Growth in EGF- or TPA-induced JB6 Cell Transformation.

Anchorage-independent cell growth in soft agar containing various concentrations of SCL-EtOH in EGF-induced (A) or TPA-induced (B) JB6 cell transformation was evaluated. The bar represents the relative ratio of colonies in soft agar with EGF or TPA and SCL-EtOH represented as the mean ± standard deviation(n=4). Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism: ### p<0.001 compared to control; ** p<0.01, *** p<0.001 compared to EGF- or TPA-treated group. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract, EGF: epidermal growth factor, TPA: phorbol 12-myristate 13-acetate.

4. Anchorage-independent cell growth 분석을 이용한 colony 형성 억제에 미치는 영향

1) EGF에 의해 유도된 세포변형에서의 억제 효과

40 μ g/ml의 SCL-EtOH는 EGF 유도 발암 모델에서 EGF 단독 처리군에 비해 82.6 \pm 2.5%의 유의성 있는 억제율을 보였고, colony의 크기도 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(Fig. 8, 9).

2) TPA에 의해 유도된 세포변형에서의 억제 효과

40 μ g/ml의 SCL-EtOH는 TPA 유도 발암 모델에서

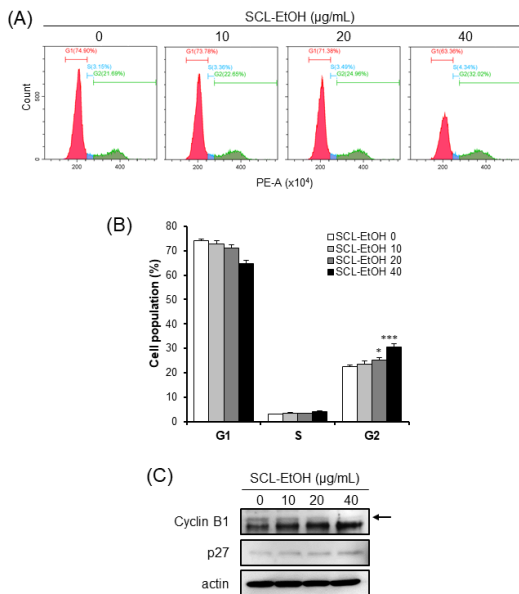


Fig. 10. SCL-EtOH Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest in SK-MEL-5 Cells.

(A) SK-MEL-5 cells were treated with 0, 10, 20 and 40 μ g/ml of SCL-EtOH and then incubated for 48hr. Representative plots of flow cytometry for cell cycle analysis in SK-MEL-5. (B) Effects of SCL-EtOH on cell cycle were in SK-MEL-5 cells. Data are presented as the mean \pm standard deviation(n=3). Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism; *p<0.05; ***p<0.001. (C) The effect of SCL-EtOH on the expression of proteins associated with cell cycle in SK-MEL-5 cells. The cell lysates were performed to western blotting using Cyclin B1 and p27 antibodies. β -actin was used as a loading control. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract.

TPA 단독 처리군에 비해 85.6 \pm 1.8%의 유의성 있는 억제율을 보였다(Fig. 8, 9).

5. 세포주기 조절에 미치는 영향

1) Flow cytometry를 통한 세포주기 조절에 미치는 영향

Flow cytometry 분석을 통하여 세포주기별 세포의 분포를 확인한 결과, SCL-EtOH의 농도(0, 10, 20, 40 μ g/ml)가 증가함에 따라 G2/M기에 있는 세포의 비율은 SK-MEL-5 cells에서 22.4 \pm 0.6%, 23.7 \pm 1.1%,

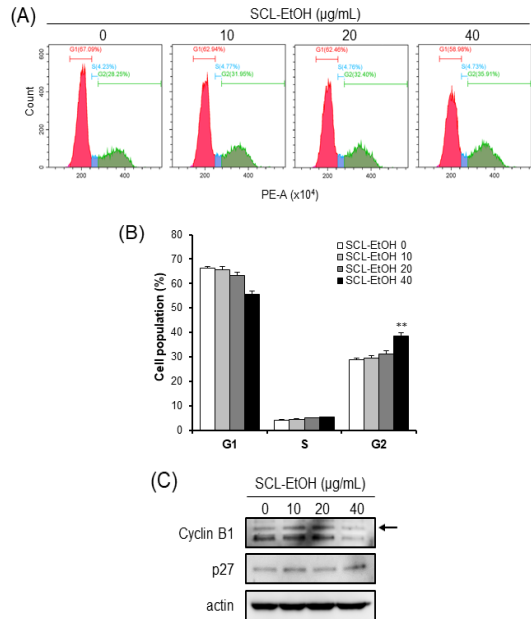


Fig. 11. SCL-EtOH Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest in SK-MEL-28 Cells.

(A) The cells were treated with 0, 10, 20 and 40 μ g/ml of SCL-EtOH and then incubated for 48hr. Representative plots of flow cytometry for cell cycle analysis in SK-MEL-28 cells. (B) Effects of SCL-EtOH on cell cycle were in SK-MEL-28 cells. Data are presented as the mean \pm standard deviation(n=3). Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism; *p<0.05; **p<0.01. (C) The effect of SCL-EtOH on the expression of proteins associated with cell cycle in SK-MEL-28 cells. The cell lysates were performed to western blotting using Cyclin B1 and p27 antibodies. β -actin was used as a loading control. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract.

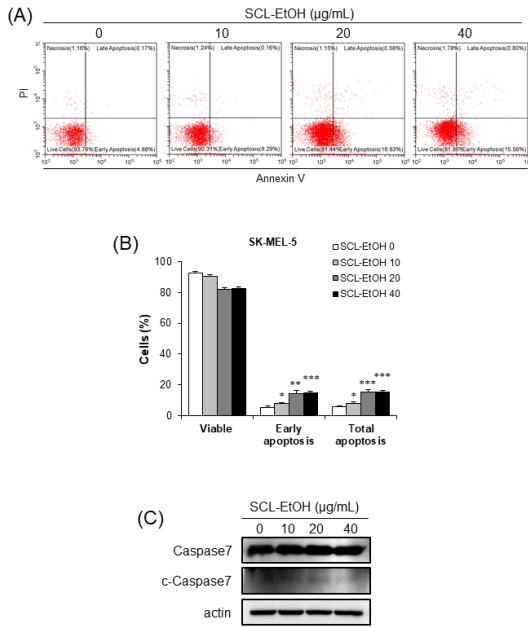


Fig. 12. SCL-EtOH Induces Apoptosis in SK-MEL-5 Cells.

(A) The cells were treated with 0, 10, 20 and 40 µg/ml of SCL-EtOH and then incubated for 72hr. Representative plots of flow cytometry for apoptosis analysis in SK-MEL-5 cells. (B) Effects of SCL-EtOH on apoptosis were in SK-MEL-5 cells. Data are presented as the mean ± standard deviation (n=3). Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. (C) The effect of SCL-EtOH on the expression of proteins associated with apoptosis in SK-MEL-5 cells. The cell lysates were performed to western blotting using caspase-7 antibody. β-actin was used as a loading control. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract.

25.2±1.1%, 30.5±1.3%로(Fig. 10), SK-MEL-28 cells에서는 29.0±0.8%, 29.5±2.1%, 31.2±1.9%, 38.6±2.3%로 각각 유의성 있게 증가하였다(Fig. 11).

2) 세포주기 조절 단백질에 미치는 영향

SCL-EtOH에 의해 SK-MEL-5과 SK-MEL-28 cells에서 세포주기 G2/M기 조절과 관련 있는 Cyclin B1 발현의 감소와 p27 발현의 증가를 Western blotting을 통하여 확인하였다(Fig. 10, 11).

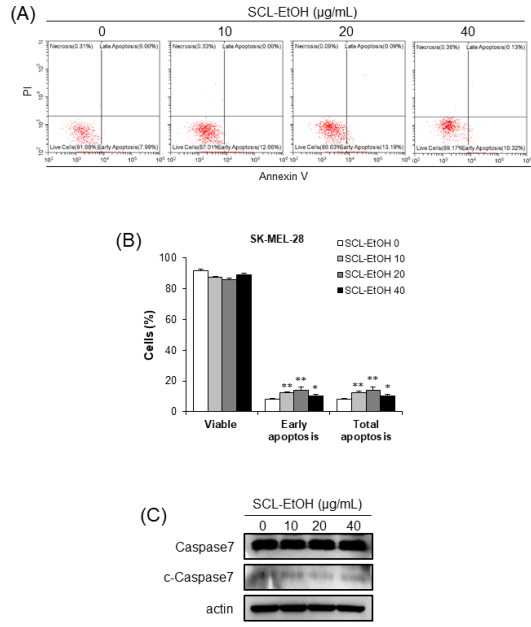


Fig. 13. SCL-EtOH Induces Apoptosis in SK-MEL-28 Cells.

(A) The cells were treated with 0, 10, 20 and 40 µg/ml of SCL-EtOH and then incubated for 72hr. Representative plots of flow cytometry for apoptosis analysis in SK-MEL-28 cells. (B) Effects of SCL-EtOH on apoptosis were in SK-MEL-28 cells. Data are presented as the mean ± standard deviation (n=3). Significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test performed using GraphPad Prism; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. (C) The effect of SCL-EtOH on the expression of proteins associated with apoptosis in SK-MEL-28 cells. The cell lysates were performed to western blotting using caspase-7 antibody. β-actin was used as a loading control. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract, c-caspase7: cleaved-caspase7.

6. 세포사멸 유도에 미치는 영향

1) Flow cytometry를 통한 세포사멸 유도에 미치는 영향

Annexin V/PI 염색 후 flow cytometry 분석을 통하여 SK-MEL-5 cells에서 SCL-EtOH의 농도가 증가할수록 early-apoptosis와 late-apoptosis를 포함한 total-apoptosis의 비율이 8.0±0.8%, 15.2±2.0%, 15.6±0.9%로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 12). 또한 SK-MEL-28 cells에서도 7.9±0.8%, 12.4±2.1%,

14.0±1.9%, 10.6±2.3%로 SCL-EtOH의 처리에 따라 total-apoptosis 비율이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 13).

2) 세포사멸 유도 단백질에 미치는 영향

세포사멸 관련 단백질인 Caspase7과 cleaved-Caspase7의 발현을 살펴본 결과, SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells 모두에서 cleaved-Caspase7의 발현이 증가하였다(Fig. 12, 13).

7. COX-2 단백질 발현 억제에 미치는 영향

Western blot을 수행하여 염증인자의 생성과 관련된 단백질인 Cyclo-oxygenase-2(COX-2)의 발현을 살펴본 결과, SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells 모두에서 SCL-EtOH의 농도가 증가할수록 COX-2의 발현이 감소하였다(Fig. 14).

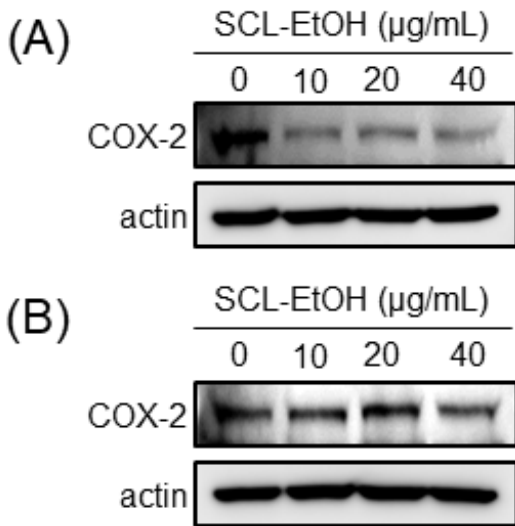


Fig. 14. The Effect of SCL-EtOH on COX-2 Expression in SK-MEL-5 and SK-MEL-28 Cells.

SK-MEL-5(A) and SK-MEL-28(B) cells were treated with 0, 10, 20 and 40µg/ml of SCL-EtOH and then incubated for 72hr. The cell lysates were performed to western blotting using COX-2 antibody. β-actin was used as a loading control. SCL-EtOH: *Smilax china* Linné 70% ethanol extract.

IV. 고찰

지구온난화로 인한 자외선 노출, 인구 고령화, 오염원에 대한 노출 등에 의해 피부암의 발생률 및 사망률이 증가하고 있다²¹⁾. 피부암은 인체의 가장 바깥층인 피부에서 발생하는 암으로 중·노년층에서 다발하고 크게 기저세포암, 편평상피세포암 그리고 악성 흑색종으로 나누어진다¹⁻⁵⁾. 기저세포암은 피부의 기저층이나 모낭 등을 구성하는 세포가 악성화한 종양으로, 각질형성세포나 모낭, 에크린한선 등의 피부부속기에서 발생하고, 편평상피세포암은 표피의 각질 형성 세포에서 유래한 악성종양으로 우리나라에서 가장 흔한 피부암 중 하나이다¹⁻⁵⁾. 악성 흑색종은 멜라닌 세포의 악성종양으로, 멜라닌 세포 또는 기존에 존재하는 모반세포의 악성 형질 변화로 악성도가 높은 종양 중 하나이다¹⁻⁵⁾. 흑색종은 전체 피부암의 5% 정도이나 발생률이 꾸준히 증가하고 있으며, 5년 생존율이 20% 미만으로 치료가 어려운 악성종양에 해당한다²⁻⁶⁾. 국내의 경우, 국가통계포털의 암 등록 통계자료²²⁾에 따르면 2020년에 총 247,952건의 암환자가 발생하였으며, 이 중 악성 흑색종을 포함하는 피부암 환자는 7,089명이었다. 이는 전체 암환자의 2.8%에 해당하며, 발생자수는 2010년 대비 1.9배 가량 증가하였다. 2020년에는 전 세계적으로 약 32만 5천 건의 새로운 흑색종 사례가 진단되었으며 사망자는 5만 7천 명 정도로 추정되어, 2040년에는 신규 사례 51만 명 및 사망 9만 6천 명으로 증가할 것으로 예상된다^{23,24)}.

현재 피부암 치료법으로는 외과적 절제술이 있으며 그 외에도 방사선 치료 및 항암 화학요법 등이 사용되고 있지만 수술요법은 한계가 있고 화학요법도 부작용이 많다¹⁻⁵⁾. 흑색종의 주요 치료는 수술적 제거이나 병리학적으로 구별이 매우 어렵고 최근 화학요법, 면역요법, 방사선요법 및 표적요법 또는 복합치료법인 다중항암화학요법, 다중면역요법 및 다중생화학요법과 같은 치료법이 발전하였지만, 흑색종의 치료는 여전히 매우 어렵다^{25,26)}. 그러므로 상대적으로 부작용이 적고 안전한 천연 생약에 대한 관심이 증가하고 있는데, 국내에서 단일 약제로는

鹿茸, 魚腥草, 吳茱萸, 旱蓮草, 天門冬, 紅花, 人參 蓬朮, 白僵蠶, 榆白皮, 차가버섯, 忍冬藤, 側柏葉, 防風, 甘菊 등이 피부암 증식 억제 효과가 있는 것으로 보고되었다²⁷⁾.

翻花瘡은 현대의학의 편평상피세포암, 기저세포암과 유사한데 피부에 나타난 腫瘍로 병변 부위가 파괴된 후 유합이 안 되고 贅肉이 밖으로 돌출하여 그 형상이 마치 꽃이 뒤집힌 것과 같아서 붙여진 이름이다. 한의학에서는 風毒之邪나 淫毒之氣 등 外因에 침습당한 경우, 瘡瘍이 潰한 후에 肝火로 인해 血燥하여 生風해서 發한 경우, 元氣가 허약한데 肝이 虛해져 血燥해지게 되고 이에 怒氣가 盛해서 發하는 경우, 怒火로 인한 경우 등으로 인해 변화상이 발생하는 것으로 보았고 扶正去邪의 관점에 의거하여 虛해진 肌膚와 脾胃土의 中氣를 자양하여 肌肉과 皮부를 潤하게 하고, 肝火로 인한 怒氣를 살피며 아울러 外治도 겸하는 치법을 사용했다²⁸⁾.

土茯苓(*Smilacis Rhizoma*)은 다년생 활엽덩굴성 관목인 국내에서 자생하는 청미래덩굴(*Smilax china* Linné, SCL) 또는 중국에서 자생하는 光葉菝葜(*Smilax glabra* Roxburgh)의 뿌리줄기로, 본 연구에서 사용한 청미래덩굴은 명감나무 또는 망개나무로도 불리며, 5-6월에 꽃이 개화하고, 9-10월에는 둥글고 붉은 열매를 맺는다^{8,9)}. 性은 平하고 味는 甘淡하며 肝과 胃經으로 귀경하여 除濕, 解毒, 通利關節하는 효능이 있다^{8,9)}. 關節疼痛, 근육마비, 설사, 水腫, 痲病, 癩癧, 腫毒 등을 치료하고 특히 매독, 연주창, 옹종, 수은 중독, 매독성 피부질환을 비롯한 만성 피부외과 질환의 치료 약물로 사용되고 있다^{8,29)}.

또 土茯苓에는 steroidal saponin 인 smilax saponin A, B, dioscin, sieboldigenin, smilaxchinoside A-D, isonarthogenin glycoside 등이 함유되어 있고, flavonoid 계열 화합물인 astilbin, engelitin, neoastilbin, taxifolin, apigenin 등도 함유되어 있으며 또한 stilbene 계열 화합물인 resveratrol, oxyresveratrol, verapenol, vis-scirpusin A 등이 함유되어 있다²⁹⁾.

현재까지 土茯苓은 항염증¹⁰⁻¹²⁾, 항산화¹³⁾, 항비만^{14,15)} 그리고 항암¹⁶⁻⁹⁾ 효과가 보고되었다. 장 등¹³⁾은 土茯苓의

항산화 및 산화적 DNA 손상억제 활성화에 대해서 연구하였고, Xu 등¹⁰⁾은 土茯苓의 폴리페놀 성분이 염증성 장질환의 장내 미생물 불균형 조절 효과가 있다고 보고하였으나 土茯苓의 피부암 세포주에 대한 실험연구는 아직까지 접하지 못했기에, 본 연구에서는 국내에서 자생하는 청미래덩굴을 사용하여 土茯苓 에탄올 추출물(SCL-EtOH)이 피부암 세포주인 A431, SK-MEL-5, SK-MEL-28의 성장에 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다.

먼저 SCL-EtOH가 사람의 정상 피부 세포주에 대한 독성을 나타내는지 관찰하기 위하여 HaCaT cells에 SCL-EtOH를 다양한 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ g/ml)로 처리하고 24시간 및 48시간 동안 반응시켜 WST-8 분석을 수행하였다. 실험결과, 48시간에서 최고 농도인 40 μ g/ml까지 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 3).

이어서 SCL-EtOH가 다양한 피부암 세포주의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 A431 및 SK-MEL-5, SK-MEL-28 cells에 SCL-EtOH와 대조군으로 5-FU를 처리하고 24시간, 48시간, 72시간 후에 WST-8 분석을 수행하였다. 실험 결과, SCL-EtOH가 SK-MEL-5, SK-MEL-28에서 5-FU보다 농도 및 시간 의존적으로 유의성 있게 세포 성장 저해효과가 있음을 보여주었다(Fig. 4-6). A431을 제외한 SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells에서 항암제인 5-FU보다 더 뛰어난 성장 저해 효과를 나타내어, 이후 실험에서는 SK-MEL-5 및 SK-MEL-28 cells를 사용하여 실험을 진행하기로 하였다. SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells에서 항암제인 5-FU보다 더 뛰어난 피부암 세포 성장 저해 효과를 나타냈다는 것은 부작용이 없으면서도 기존 항암제보다 뛰어난 항암 효과로, 향후 흑색종 치료제로서의 가능성이 충분하다고 사료된다.

피부암 세포 형태에 미치는 영향을 확인한 결과 SCL-EtOH의 농도가 증가함에 따라 정상적으로 부착하여 성장하는 세포가 줄어들고 부유 상태인 세포가 증가하며, 세포의 형태가 변화하는 것을 관찰하였다(Fig. 7).

쥐의 정상 상피세포인 JB6 Cl41 cells에 성장인자

EGF와 염증인자 TPA를 처리해 세포변형을 유도하고 SCL-EtOH의 세포변형 억제 및 성장 억제 효과를 확인하기 위해 Anchorage independent cell growth assay를 수행하였다. 그 결과 세포의 형질전환을 유도한 발암 모델 모두에 대하여 SCL-EtOH의 농도가 증가할수록 세포의 형질전환을 억제하여 colony 형성 및 성장을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 8, 9).

EGF는 종양 촉진자로, EGF 수용체(EGFR)에 결합하면 세포 증식, 세포 변형, 혈관 신생 및 전이에 관여하는 Ras-Raf-MEK-MAPK 및 PI3K-PTEN-AKT 신호전달 경로와 같은 EGFR 신호전달경로를 활성화하여 발암을 촉진한다³⁰. TPA는 대극과(Euphorbiaceae) 식물 및 바두油에 많이 함유된 phorbol ester의 일종으로, 세포의 성장과 사멸과 관련된 다양한 기전에서 조절자로 작용하는 protein kinase C(PKC) 및 activator protein-1을 활성화하여 세포변형을 유도하는 강력한 발암 촉진제이다^{31,32}. Anchorage-independent cell growth 분석법은 soft agar를 이용해 세포를 부유 상태로 배양시키는 방법으로, 사방으로 증식하며 자라는 암세포의 특성을 살려 colony 형성과 전이 능력을 확인할 수 있는 실험법으로 정상 세포에 EGF나 TPA를 처리하여 transformation을 유도함으로써 정상 세포의 암화 및 성장을 유사하게 구현할 수 있는 이점이 있다.

SCL-EtOH가 피부암 세포의 세포주기 및 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 SK-MEL-5, SK-MEL-28 cells에 다양한 농도(0, 10, 20, 40 μ g/ml)의 SCL-EtOH를 처리한 후 관찰하였다. Flow cytometry를 사용하여 분석한 결과 SCL-EtOH의 농도가 증가함에 따라 두 피부암 세포주에서 G2/M기에 머물러 있는 세포의 비율이 유의성 있게 증가하였고 total-apoptosis 비율이 유의성 있게 증가하였다.

또한 Western blot을 통해 G2/M기 조절 관련 단백질인 Cyclin B1의 발현 감소와 p27의 발현 증가를 확인하였고, 세포사멸 기전에서 세포사멸의 실행자로(excutioner)로 불리는 중요한 단백질인 활성화된(cleaved)-caspase7의 발현 증가를 확인하였다(Fig.

10-13). 세포주기는 G1, S, G2, M 주기로 구성되며 이런 세포주기 조절에 cyclin 단백질의 합성과 소멸이 중요한 역할을 한다³³. Cyclin은 세포분열의 각 주기에서 그 발현이 특이적으로 증가했다가 감소하며 cyclin dependant kinase(CDK)들과 결합하여 작용을 나타낸다. Cyclin B1의 발현은 암의 악성도 지표로서 중요한 역할을 한다. CDK 억제제(inhibitor) 중의 하나인 p27은 cyclin A/B-CDC2 복합체의 활성을 억제하여 세포 주기의 진행을 막는다³⁴.

발암은 만성 염증과 연관성이 있으며, 세포증식 증가, 세포사멸 회피, 신생혈관 형성 및 전이 등의 다양한 과정에서 염증 매개체인 cytokine, chemokine, cyclooxygenase-2(COX-2), prostaglandin(PG), 유도성 산화질소 합성효소(iNOS) 등의 비정상적인 활성화가 일어나게 된다^{35,36}. 본 연구에서는 SCL-EtOH가 SK-MEL-5, SK-MEL-28 cells에서 염증인자의 생성과 관련된 대표적인 단백질 중 하나인 COX-2의 발현을 저해하는지 확인하기 위하여 western blot을 실시하였는데 SCL-EtOH의 농도에 의존적으로 COX-2의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 14).

이상의 결과로부터 土茯苓 에탄올 추출물이 피부암 치료에 있어서 긍정적인 영향을 주는 것으로 생각된다. 특히 흑색종 세포주인 SK-MEL-5와 SK-MEL-28 cells에서 기존 항암제인 5-FU보다 더 뛰어난 세포 성장 저해 효과를 나타냈다는 것에 주목하여, 앞으로 다양한 흑색종 세포주를 대상으로 기존 항암제와 비교하는 연구로 확대하고, 동물모델에서의 연구도 필요할 것으로 사료된다. 더 나아가 흑색종 환자를 대상으로 土茯苓의 효능을 확인하는 임상적인 연구도 이루어지기를 기대해 본다.

V. 결 론

1. SCL-EtOH는 HaCaT cells에 40 μ g/ml의 농도까지 세포독성이 없었다.
2. SCL-EtOH가 시간 및 농도 의존적으로 비흑색종 세포주 A431과 흑색종 세포주 SK-MEL-5, SK-MEL-

28의 성장을 유의성 있게 억제하였다.

3. SCL-EtOH의 처리에 따라서 농도가 증가할수록 피부암 세포의 형태가 변화하였다.
4. JB6 Cl41 cells에 EGF 또는 TPA로 세포변형을 유도한 다음, SCL-EtOH를 농도별로 처리한 결과, 농도 의존적으로 colony가 유의성 있게 감소하였다.
5. 피부암 세포의 성장저해가 세포주기 영향에 의한 것인지 확인한 결과, SCL-EtOH가 G2/M phase arrest를 유도하며, 관련 단백질인 Cyclin B1의 발현을 감소시켰고 p27의 발현을 증가시켰다.
6. 피부암 세포의 성장저해가 세포사멸에 의한 것인지 확인하기 위하여 flow cytometry 분석과 western blot을 수행한 결과, SCL-EtOH가 early apoptosis를 유도하며, 관련 단백질인 cleaved-caspase-7의 발현을 증가시켰다.
7. SCL-EtOH에 의해 염증 지표 단백질인 COX-2의 발현이 감소하였다.

ORCID

- Soo-Yeon Park
(<https://orcid.org/0000-0001-6812-0787>)
- Si-Yeol Song
(<https://orcid.org/0000-0001-9526-3652>)
- Min-Yeong Jeong
(<https://orcid.org/0000-0003-2344-1960>)
- Jeong-Wha Choi
(<https://orcid.org/0000-0002-5500-141X>)

References

1. Korean Dermatological Association Textbook Compilation Committee. Text book of Dermatology. Seoul:McGraw-Hill. 2020:613-45.
2. Department of Dermatology, College of Medicine, Seoul National University. Dermatology for Medical Students. Seoul:Korea Medicine. 2023:280-95.
3. Kim HN. Dermatology in an easy-to-understand way. Seoul:Medical Seowon. 2017: 276-90.
4. Paul K. Buxton. Dermatology understood at once. Seoul:Korean Medicine. 2012:179-88.
5. Apalla Z, Nashed D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol Ther(Heidelb)*. 2017;7(Suppl 1):5-19.
6. Lopez AT, Carvajal RD, Geskin L. Secondary Prevention Strategies for Nonmelanoma Skin Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2018;32(4):195-200.
7. Paulson KG, Lahman MC, Chapuis AG, Brownell I. Immunotherapy for skin cancer. *Int Immunol*. 2019;31(7):465-75.
8. Kim CM, Shin MK, Ahn DG, Lee GS. A dictionary of Chinese medicine. Seoul:Jeong Dam. 2006:1516-9.
9. Traditional Herbology Common Textbook Compilation Committee. Traditional Herbology. Seoul:Yeong Lim's Publisher. 2020:265-7.
10. Xu M, Xue H, Qiao G, Liao M, Kong L, Zhang Q, et al. Regulating the Imbalance of Gut Microbiota by *Smilax china* L. Polyphenols to Alleviate Dextran Sulfate Sodium-induced Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Chin Med*. 2022;50(2):553-68.
11. Feng H, He Y, La L, Hou C, Song L, Yang Q, et al. The flavonoid-enriched extract from the root of *Smilax china* L. inhibits inflammatory responses via the TLR-4-mediated signaling pathway. *J Ethnopharmacol*. 2020;256:1127

- 85.
12. Zhang Y, Pan X, Ran S, Wang K. Purification, structural elucidation and anti-inflammatory activity in vitro of polysaccharides from *Smilax china* L. Int J Biol Macromol. 2019;139:233-43.
 13. Jang TW, Oh CG, Park JH. Antioxidant activity and protective effects on oxidative DNA damage of *Smilax china* root. Journal of Applied Biological Chemistry. 2018;61(2):109-17.
 14. Kang YH, Kim KK, Kim DJ, Choe M. Antiobesity effects of the water-soluble fraction of the ethanol extract of *Smilax china* L. leaf in 3T3-L1 adipocytes. Nutr Res Pract. 2015;9(6):606-12.
 15. Park JA, Jin KS, Kwon HJ, Kim BW. The Anti-Obesity Effect of *Smilax china* Extract. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 2014;42(4):354-60.
 16. Wang C, Zhou Q, Wu ST. Scopolin obtained from *Smilax china* L. against hepatocellular carcinoma by inhibiting glycolysis: A network pharmacology and experimental study. J Ethnopharmacol. 2022;296:115469.
 17. Hu LL, Chen DS, Wang YY, Qin Y, Huang P, Yu LX, et al. *Smilax china* L. rhizome extract inhibits nuclear factor- κ B and induces apoptosis in ovarian cancer cells. Chin J Integr Med. 2015;21(12):907-15.
 18. Nho KJ, Chun JM, Kim HK. Anti-metastatic effect of *Smilax china* L. extract on MDA-MB-231 cells. Mol Med Rep. 2015;11(1):499-502.
 19. Yu HJ, Shin JA, Lee SO, Kwon KH, Cho SD. Extracellular signal-regulated kinase inhibition is required for methanol extract of *Smilax china* L.-induced apoptosis through death receptor 5 in human oral mucoepidermoid carcinoma cells. Mol Med Rep. 2014;9(2):663-8.
 20. Fu X, Zhao R, Yoon G, Shim JH, Choi BY, Yin F, et al. 3-Deoxysappanchalcone Inhibits Skin Cancer Proliferation by Regulating T-Lymphokine-Activated Killer Cell-Originated Protein Kinase in vitro and in vivo. Front Cell Dev Biol. 2021;9:638174.
 21. Hwang SY, Chae JI, Kwak AW, Lee MH, Shim JH. Alternative Options for Skin Cancer Therapy via Regulation of AKT and Related Signaling Pathways. Int J Mol Sci. 2020;21(18):6869.
 22. Korean Statistical Information Service [Internet]. Ministry of Health and Welfare: Cancer statistics in Korea; Number of cancer patients, relative frequency, crude rate, age-adjusted incidence by cancer site and sex. 2020[cited 2023 Nov 30]. Available from: URL: https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=117&tblId=DT_117N_A00025&conn_path=I2
 23. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
 24. Arnold M, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Vaccarella S, Meheus F. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. JAMA Dermatol. 2022;158(5):495-503.
 25. Cunha C, Marinheiro D, Ferreira BJML, Oliveira H, Daniel-da-Silva AL. Morin Hydrate Encapsulation and Release from Mesoporous Silica Nanoparticles for Melanoma Therapy. Mol

- ecules. 2023;28(12):4776.
26. Malyarenko OS, Usoltseva RV, Silchenko AS, Zueva AO, Ermakova SP. The Combined Metabolically Oriented Effect of Fucoïdan from the Brown Alga *Saccharina cichorioides* and Its Carboxymethylated Derivative with 2-Deoxy-D-Glucose on Human Melanoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):12050.
27. Yu PY. Inhibitory Effects of *Chrysanthemum indicum* L. on Skin Inflammation and Skin Cancer. *Naju: The Graduate School of Dongshin University.* 2023;48-54.
28. Park HJ, Go YS. A literature studies on the cause, symptom and treatment of the Bun-Hwa-Chang(翻花瘡). *The journal of oriental medical surgery, Ophthalmology&Otolaryngology.* 1997;10(1):136-7.
29. Herbal Pharmacology Compilation Committee. *Herbal Pharmacology.* 5th ed. Seoul:Shinil Books. 2023;246-7.
30. Lee CJ, Lee MH, Cho YY. Fibroblast and Epidermal Growth Factors Utilize Different Signaling Pathways to Induce Anchorage-independent Cell Transformation in JB6 Cl41 Mouse Skin Epidermal Cells. *J Cancer Prev.* 2014;19(3):199-208.
31. Kinoshita M, Yamada A, Sasa K, Ikezaki K, Shiota T, Kamijo R. Phorbol-12-myristate 13-acetate inhibits Nephronectin gene expression via Protein kinase C alpha and c-Jun/c-Fos transcription factors. *Sci Rep.* 2021;11(1):20360.
32. Oi N, Yamamoto H, Langfald A, Bai R, Lee MH, Bode AM, et al. LTA4H regulates cell cycle and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2017;38(7):728-37.
33. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-49.
34. Ghafouri-Fard, S, Khoshbakht T, Hussien BM, Dong P, Gassler N, et al. A review on the role of cyclin dependent kinases in cancers. *Cancer Cell International.* 2022;22(1):325.
35. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2373-80.
36. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009;30(7):1073-81.