

八珍抗癌丹의 항종양효과 및 기전연구

배남규* · 문석재 · 원진희 · 김동웅 · 문 구

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

Study of Paljinhangahm-dan on Anti-tumoral Effect and Mechanism

Nam Kyu Bae*, Seok Jae Moon, Jin Hee Won, Dong Woung Kim, Goo Moon

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Recent evidence suggests that many Oriental Medicinal prescriptions are effective in cancer patients as a supportive care. Oriental Medicinal herbs have been investigated extensively and are known to have multiple pharmacological effect. These herbs contain a variety of ingredients which may act synergistically to inhibit tumor cell division, to increase tumor cell death (apoptosis), and to increase the proportion of immune cells within tumor. Paljinhangahm-dan (Paljin) has been used to treat for cancer patients in Oriental Medicine for decades. The effects of aqueous extract of Paljin on the induction of apoptotic cell death were investigated in human leukemia cell lines (HL-60, Jurkat, Molt-4 and U937). The viability of leukemia cells was markedly decreased by Paljin in a dose-dependent manner. Paljin induced the apoptotic death of leukemia cells, which was characterized by the ladder-pattern DNA fragmentation, and chromatin condensation of the nuclei. Paljin digested Bid protein but did not affect Bcl-2 protein level and also, induced mitochondrial dysfunction disrupted as shown as the mitochondrial membrane potential. It activated caspase-9 and caspase-3, thereby resulted in cleavage of poly(ADP) ribose polymerase(PARP). These results indicate that Paljin induces apoptosis of human leukemia cells via activation of intrinsic caspase cascades with mitochondrial dysfunction.

Key words : Paljinhangahm-dan(八珍抗癌丹), leukemia cells, apoptotic cell death

서 론

腫瘍이란 개체를 구성하는 정상세포가 여러 자극에 의하여 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학 및 면역학적 기능이 변화된 변형 세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형 세포의 집단, 즉 새로이 생긴 종괴를 뜻한다. 종양은 이를 구성하는 세포의 형태와 증식 특성에 따라 양성종양과 악성종양으로 구분하며 암(cancer)은 바로 악성종양에 해당한다¹⁾. 한의학에서 癌의 범주에 속하는 질병은 積聚, 腫瘍, 腫痛, 癥瘕, 痰癖, 腸覃, 痞塊, 石瘕, 血蠱, 噎膈, 反胃, 石疽, 石癰 등이 있다²⁻⁴⁾. 癌의 치료법으로 서양의 학에서는 手術療法, 化學療法, 放射線療法 등이 다용되고 있으나, 이들 대부분이 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 나타내어, 골수 조혈기능 장애, 소화기 장애 및 면역기능 저하 등의 부작용을 초래하는 問題點이 대두되고 있으며,⁵⁾ 이에 대한 대체

요법으로 면역, 호르몬 요법 등이 응용되고 있으나 아직 보조적인 요법으로 연구 개발 중에 있다⁶⁾. 한의학적 치료는 암에 대한 인체의 방어 능력을 강조하여 인체의 내적 환경과 조건을 변화 시킴으로써 癌을 억제할 수 있으나 치료효과가 완만하고 病所部位를 제거하기 어려우며 암세포 살해능력이 강하지 않은 결점이 있다. 그래서, 인체의 면역력을 강화시키는 동시에 암세포에 대한 직접적인 치료효과를 강화하여, 항암치료제나 방사선 조사의 부작용인 정상 세포나 조직에 대한 독성을 예방하는 새로운 치료법을 모색하는 한의학적 연구가 시도되고 있다⁷⁾. 八珍抗癌丹은 원광대학교 비계내과학교실에서 八珍湯合化積丸에 白花蛇舌草를 가하여 사용하는 처방으로 八珍湯合化積丸⁸⁾은 健脾益氣, 活血祛瘀, 연건소증, 항암효과가 있어 扶正祛邪하는 처방이다. 최근 金^{9,10)} 등은 八珍湯合化積丸과 adriamycin의 병용치러시 나타나는 항암효과를, 韓¹¹⁾은 白花蛇舌草에 의한 암세포의 세포고사효과를, 李¹²⁾는 八珍抗癌丹이 암세포에 대한 세포독성과 세포고사 유도를 통한 白血病 세포 사멸 효과를 보고하였다.

이에 저자는 八珍抗癌丹의 항암효과 및 그 기전을 알아보고자 八珍抗癌丹의 항암효과를 확인하는 중 사람의 白血病 세포에

* 교신저자 : 배남규, 광주시 남구 주월동 543-3, 원광대학교 부속 한방병원

E-mail : flypink@orgio.net, Tel : 062-670-6527

· 접수 : 2002/08/06 · 수정 : 2002/09/17 · 채택 : 2002/11/25

세포독성을 나타내었고, 이러한 세포죽음이 세포고사로 확인되어 세포고사 신호전달계를 조사하였다. 또한 백혈병 세포주에서 나타나는 八珍抗癌丹의 효과가 백혈병 환자의 백혈병 세포에서도 같은 효과를 나타내어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 팔진항암단은 원광대학교 비계내과학교실 처방에 의거하였으며 1첩의 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Paljinhangahm-dan(八珍抗癌丹)

本草名	生藥名	學名	分量(g)
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	12
人蔘	Radix ginseng	<i>Panax ginseng</i> C. A. MEYER.	6
白茯苓	Poria	<i>Poria cocos</i> WOLF.	6
生地黃	Rhizoma rehmanniae	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH.	6
鱉甲(醋)	Carapax amydae	<i>Trionyx sinensis</i> WIENGMANN.	6
穿山甲	Squama manitis	<i>Manis pentadactyla</i> L.	6
白朮	Rhizoma atractylodidae macrocephalae	<i>Atractylodes maceocephala</i> KOIDZ.	4
當歸	Radix angelicae gigantis	<i>Angelica sinensis</i> DIELS.	4
赤芍藥	Radix paeoniae rubra	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	4
三稜	Rhizoma scirpi	<i>Scirpus flaviatilis</i> A. GRAY.	4
蓬朮	Rhizoma curcumae zedoariae	<i>Curcuma zedoaria</i> ROSC.	4
香附子	Rhizoma cyperi	<i>Cyperus rotundus</i> L.	4
乳香	Mastix	<i>Boswellia carterii</i> BIRDW.	4
川芎	Rhizoma cnidii	<i>Ligusticum chuanxiiong</i> HORT.	4
甘草	Radix glycyrrhizae	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	3
Total amount			77

2) 시약

세포 배양판은 Falcon (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 사로부터 구입하였고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 peroxidase (HRP), Bicinchoninic acid(BCA), 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one(scopoletin), Hoechst 33342, dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 picol 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. RPMI medium, Fetal bovine serum(FBS), horse serum 및 항생제 등은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)사로부터 구입하였다. Wizard genomic DNA purification kit는 Promega (Madison, USA) 사에서 구입하였고, spectrophotometer와 cytospin은 Beckman (Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)회사 제

품을 사용하였다. 7-amino-4-coumarin(Ac)-DEVD-AFC와 Ac-LEHD-AFC는 Calbiochem(San Diego, CA, USA)사에서 구입하였다. Anti-Bcl-2와 anti-PARP 항체는 Santa Cruz(Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였고, anti-bid 항체와 anti-phospho-H2AX는 Pharmingen(Hamburg, Germany)사에서 구입하였다. 유식 세포분석기는 Becton-Dickinson (Mountain View Co., CA, USA)회사의 기기를, 그리고 ELISA reader는 THERMO max (NY, USA)회사의 기기를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

八珍抗癌丹을 4첩 분량을 증류수 1,500ml와 함께 3,000ml 한저 플라스크에 넣은 다음, 2시간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과한 뒤 5,000rpm으로 30분 원심분리하고 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 시료를 조제하였으며, 튜브에 100mg/ml농도로 증류수에 녹여서 12,000rpm에서 20분 원심분리하였다. 원심분리한 시료의 상층액을 0.2µm filter에 통과시켜 멸균한 후 냉장보관하면서, 사용 시에는 세포 배양액인 RPMI에 희석해서 사용하였다.

2) 세포 배양

사람 백혈병 癌細胞주인 HL-60, Jurkat, Molt-4 그리고 U937는 미국의 American Type Culture Collection에서 구입하여, CO₂ 세포배양기에서 (37°C, 5% CO₂) 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 세포 배양액으로 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하여 주며, log phase에 있는 세포에 八珍抗癌丹을 처리한 뒤 세포의 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

3) 세포생존율 측정

세포의 생존율 측정은 24 wells 세포 배양판에 HL-60 세포를 1×10⁵ cells/ml씩 분주하고 八珍抗癌丹을 처리한 후 시간별로 세포생존율을 관찰하였다. 최종적으로 10%(v/v)가 되도록 5mg/ml 농도의 MTT를 넣어 3시간 반응시켰다. 살아있는 세포는 MTT로부터 보라색 불용성 formazan을 형성하고 이를 10% SDS와 0.01 N HCl이 들어있는 용액 1ml씩을 넣고 12시간 용해한 후 540nm 파장에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군을 기본값으로 정한 후 실험군의 흡광도와 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) Hoechst 染色

八珍抗癌丹을 처리한 백혈병 세포는 10µM Hoechst 33342 염색액을 처리하여 세포배양기에서 20분간 핵을 염색시킨다. 염색된 세포는 cytospin을 이용하여 슬라이드 그라스에 고정시킨 후 형광현미경으로 핵의 분절 현상을 관찰하였다.

5) DNA 분절 현상

DNA 분절 현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다. 먼저 대조군 및 실험군 세포 (1×10⁶세포)를 포집한 후 nuclei lysis buffer를 첨가하여 세포를 파쇄하고 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA만을 선택적으로 제거하였

다. 이후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 DNA를 응축시킨 후 다시 70% 에탄올로 세척한 후 자연상태에서 건조하였다. TE 완충용액(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)을 부가하여 DNA를 용해한 후 260nm와 280nm의 파장에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 μ g을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50 voltage, 30분)을 실시한 후, ethidium bromide로 염색하여 자외선등을 이용하여 DNA 분절을 관찰하였다.

6) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

사람의 백혈병 세포를(2 x 10⁶ cells) 4℃에서 15분 lysis buffer(1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)로 용해하고 14,000rpm으로 15분 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA법으로 단백질 양을 정량하여 assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT)에 모든 처리군에서 동일하게 되도록 적절하게 희석시킨 후, 형광표지된 기질과 37℃에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 측정하였다. Caspase-3 활성 측정은 기질로 fluorogenic substrate인 Ac-DEVD-AFC를 50 μ M을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength (460 nm)를 사용하였다. Caspase-9 효소활성은 형광기질로 Ac-LEHD-AFC를 50 μ M 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 400nm(excitation wavelength)와 505nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다.

7) 미토콘드리아의 막전위 측정

세포는 PBS에 두 번 세척한 후, JC-1을 DMEM 배지에 1 μ g/ml이 되도록 희석하여 부가하여, 37℃ 세포배양기에서 20분 반응시켰다. JC-1으로 염색된 세포는 PBS로 두 번 세척하고, 포집하여 1 ml의 PBS로 부유시킨 후 유식 세포분석기를 이용하여 분석하였다.

8) Western analysis

세포에 약제를 다양한 시간 처리 후, 포집하여 냉 Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 세포는 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)으로 4℃에서 용해하였다. 세포부유액에 2x sample buffer와 섞어 100℃에서 3분 끓인 후, 10% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로 4℃, 150V에서 4시간 동안 transfer 한 후 blocking buffer(10% skim milk)로 상온에서 2시간 반응시켰다. Phosph-H2AX, Bcl-2, Bid, 그리고 PARP 등에 대한 항체를 Tris-buffered saline에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase(TBS에 1:1,000으로 희석)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence kit(ECL kit: Amersham사)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

9) 통계처리

표시된 결과는 4번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 결과를 표시하였다. 통계처리는 paired student's t-test 검정을 통하여 수행하였으며, p 값이 0.05이하일 때 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 八珍抗癌丹이 사람의 백혈병 세포주의 생존율에 미치는 영향
본 실험에서는 八珍抗癌丹 추출물이 백혈병 환자로부터 유래된 HL-60, Jurkat, Molt-4 그리고 U937 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 각각의 세포주는 24 well plate의 각 well에 1 x 10⁵ 로 분주한 후, 다양한 농도의 八珍抗癌丹을 24시간 처리하여 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 八珍抗癌丹은 HL-60, Jurkat, Molt-4 및 U937의 세포주 모두에서 농도 의존적인 세포독성을 나타내었다(Fig. 1).

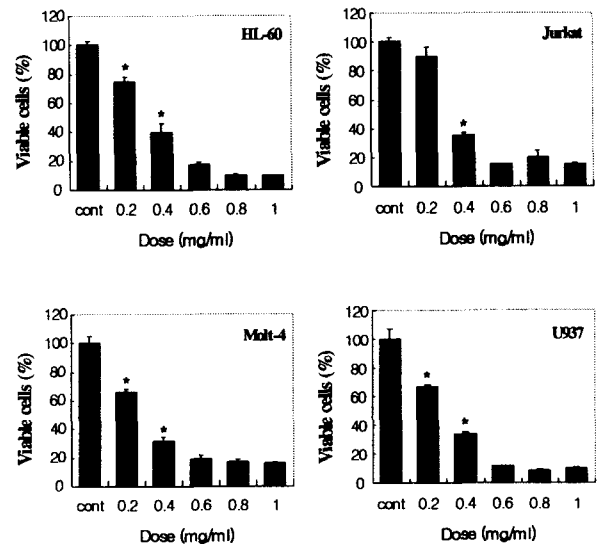


Fig. 1. Paljin decreased the viability of human leukemia cell lines. HL-60, Jurkat, Molt-4 and U937 cells were treated with various concentrations of Paljin for 24 hr. The viability of cells were determined by MTT assay. Results were presented as the mean±S.D. of four independent experiments. *, p<0.05 compared with control.

2. 八珍抗癌丹에 의한 세포죽음 성격규명

八珍抗癌丹 추출물에 의한 백혈병 세포주 HL-60 그리고 Jurkat, Molt-4, U937 세포의 세포독성이 세포고사(apoptosis) 혹은 괴사(necrosis) 기전에 의하여 이루어 졌는지를 확인하기 위해 세포고사 현상의 특징인 사다리형 DNA 분절을 확인하였다. DNA 분절 현상을 관찰하기 위해 八珍抗癌丹 0.4mg/ml을 처리하여 시간별로 세포를 수집한 후, genomic DNA를 추출하여 1.5% agarose gel에 전기영동 하였다. 전가된 DNA는 ethidium bromide로 염색하여 자외선등으로 조사한 결과, 八珍抗癌丹을 처리한 모든 세포주에서 DNA 분절 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 이로써 八珍抗癌丹에 의해 나타난 세포독성이 세포고사

기전에 의해서 매개되었음이 확인되었다.

또한 세포고사에 의한 핵의 분절 현상을 Hoechst 염색법을 이용하여 HL-60 그리고 Jurkat, Molt-4, U937 세포주에서 확인하였다. 여러 세포주에 0.4mg/ml 八珍抗癌丹을 12시간 및 24시간 처리하고, Hoechst 33342 염색액으로 세포의 핵을 염색하였다. 배양 세포는 cytospin을 사용하여 슬라이드 글라스에 고정 후 형광현미경으로 관찰하였다. 대조군 세포의 핵은 원형인 모형과 균질한 형광염색을 관찰할 수 있었으나, 0.4mg/ml 八珍抗癌丹을 처리한 군에서는 세포고사 현상의 전형적인 특징인 핵의 분절 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 이러한 DNA 분절 현상은 처리 시간에 따라서 더욱 뚜렷이 나타났다(Fig. 3).

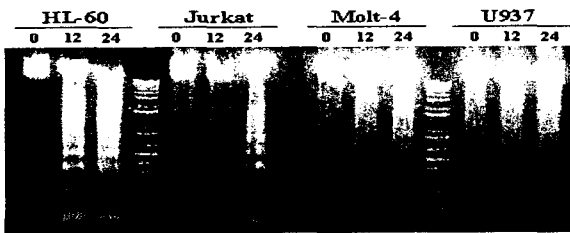


Fig. 2. Paljin induced the ladder pattern fragmentation of genomic DNA from leukemic cells. Cells were treated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods. Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gels. Then, the DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

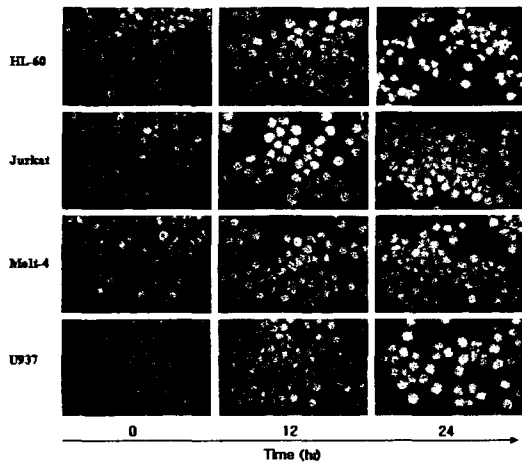


Fig. 3. Paljin induced chromatin condensation of the nuclei. Cells were treated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods and stained with Hoechst 33342. Cells were fixed on slide glass and then visualized under fluorescent microscope.

3. 八珍抗癌丹이 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향

최근 세포고사 신호전달 기전에 있어서 미토콘드리아의 중요성이 부각되고 있다. 미토콘드리아는 세포 자극에 의한 세포죽음의 신호를 감지하고 이를 증폭하여 하방의 세포고사 신호전달계를 활성화시킨다. 미토콘드리아의 세포고사 신호전달에 있어 미토콘드리아의 막전위의 변화가 중요하며, 막전위가 상실되었을 때 세포고사 기전의 활성화가 유도된다¹³⁻¹⁴). JC-1염색은 미토콘드리아의 막전위의 변화에 의해 미토콘드리아 내로 들어가서 다복합체를 형성하면 주황색을 띠고, 세포질에 남아 있을 때는

녹색을 띤다. 본 실험에서는 유식 세포분석기로 JC-1에 의한 미토콘드리아의 막전위차 변화를 측정하였다.

유식 세포분석기의 FL1-H와 FL-2 파장으로 JC-1의 녹색과 주황색을 측정하였을 때, HL-60 그리고 Molt-4, U937 세포주의 대조군에서 JC-1에 의해 염색된 미토콘드리아 막전위차는 그림의 오른쪽 위 부분에서 주황색 형광을 나타냈다. 그러나 0.4mg/ml의 八珍抗癌丹을 처리한 군에서는 세 세포주 모두에서 염색된 미토콘드리아 막전위차 변화가 유도되어 주황 형광이 감소하면서 녹색 형광이 증가하였다(Fig. 4, 5, 6).

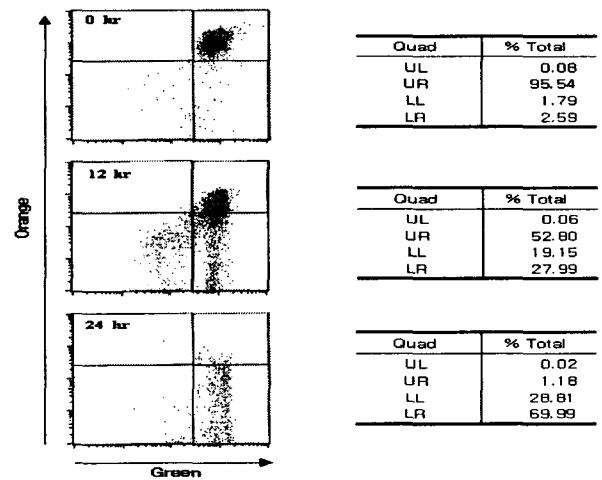


Fig. 4. Paljin induced the depolarization of mitochondrial membrane potential in HL-60 cells. HL-60 cells were incubated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods. After treatment, cells were stained with the mitochondria-selective JC-1 dye (1µg/ml) for 30 min in the dark. Cells with normal polarized mitochondrial membranes emit green-orange fluorescence (top right quadrant). The bottom right quadrant of each dot plot represented the percentage of cells that emit only green fluorescence attributable to depolarized mitochondrial membranes.

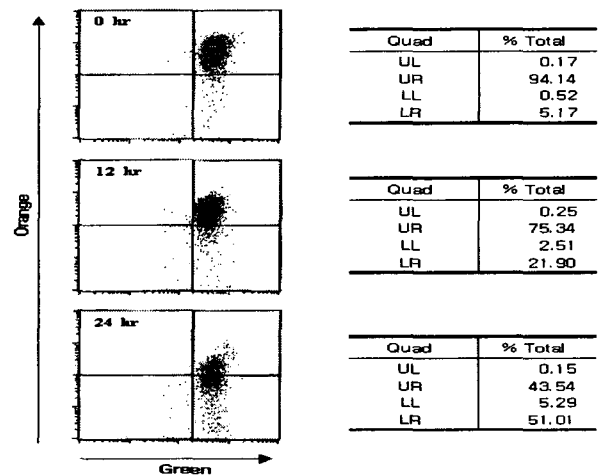


Fig. 5. Paljin induced the depolarization of mitochondrial membrane potential in Molt-4 cells. Molt-4 cells were incubated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods. After treatment, cells were stained with the mitochondria-selective JC-1 dye (1µg/ml) for 30 min in the dark. Cells with normal polarized mitochondrial membranes emit green-orange fluorescence (top right quadrant). The bottom right quadrant of each dot plot represented the percentage of cells that emit only green fluorescence attributable to depolarized mitochondrial membranes.

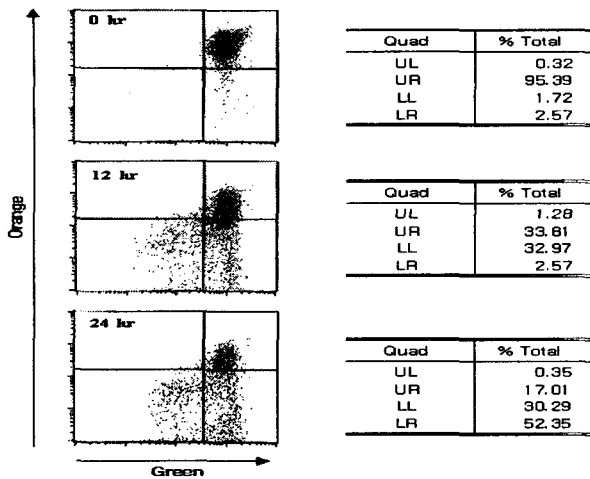


Fig. 6. Paljin induced the depolarization of mitochondrial membrane potential in U937 cells. U937 cells were incubated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods. After treatment, cells were stained with the mitochondria-selective JC-1 dye (1 μ g/ml) for 30 min in the dark. Cells with normal polarized mitochondrial membranes emit green-orange fluorescence (top right quadrant). The bottom right quadrant of each dot plot represented the percentage of cells that emit only green fluorescence attributable to depolarized mitochondrial membranes.

4. 八珍抗癌丹이 Bcl-2 및 Bid 단백질의 발현에 미치는 영향

세포고사를 조절하는데 관여하는 여러 유전자 산물 중에서 가장 널리 알려진 암 유발 유전자 산물은 Bcl-2 단백질 군이다¹⁵⁻¹⁶⁾. 본 실험에서는 八珍抗癌丹에 의해 유도된 백혈병 세포주의 세포고사에서 Bcl-2 및 Bid 단백질의 발현 양상을 조사하였다. 이를 위해 배양된 백혈병 세포주 HL-60, Molt-4 및 U937 세포주에 0.4mg/ml 八珍抗癌丹을 12시간 그리고 24시간 처리한 후, 세포를 포집하여 파쇄액을 얻었다. 이후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착 등을 거친 후 Bcl-2 및 Bid 단백질에 대한 항체를 사용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 八珍抗癌丹은 HL-60, Molt-4 및 U937 세포주에서 Bcl-2 단백질의 발현에 변화를 주지 않은 것으로 확인되었다. 그러나 모든 실험 세포주에서 Bid 단백질의 발현은 八珍抗癌丹 처리에 의하여 시간 의존적으로 감소하였다(Fig. 7).

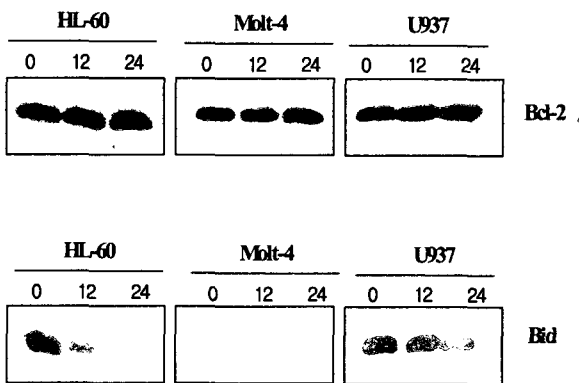


Fig. 7. Paljin induced the Bid cleavage of human leukemia cell lines. Cells were treated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods. The same amount of protein from lysates was subjected on 15% SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with Bcl-2 and Bid antibodies. The immunoreactive bands were visualized by ECL kit.

이상의 결과는 八珍抗癌丹이 anti-apoptotic 작용을 하는 Bcl-2 단백질의 발현에는 유의한 영향을 미치지 못하지만, pro-apoptotic한 기능을 갖는 Bcl-2 단백질군 중 Bid 단백질의 분절을 유도하여, 그 기능을 활성화시킴으로써 세포고사를 유도하였으리라 판단된다.

5. 八珍抗癌丹이 Caspase 활성화에 미치는 영향

세포고사의 특징적인 현상인 세포 shrinkage, DNA laddering, membrane blebbing, 핵의 응축 (nuclear condensation), membrane potential의 감소, translation의 저하 등은 caspase계 단백질분해효소의 활성화와 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 그래서 본 연구결과에서 관찰된 DNA 분절 현상이 caspase계의 활성화에 의한 신호전달에 의해서 이루어지는 것 인지를 확인하기 위해 다양한 caspase계 단백질 분해효소의 활성도를 측정하였다. HL-60, Molt-4 및 U937 세포주에 八珍抗癌丹을 0.4mg/ml을 시간별로 처리한 후 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 활성을 측정하였다. HL-60 세포주의 경우 12시간에서 시작된 caspase-3의 활성이 시간 의존적으로 증가하여 24시간에서는 대조군에 비해 약 70배 활성을 나타내었고, Molt-4 세포주에서는 12시간에 대조군에 비해 약 10배의 활성을 나타내다가 이후 활성 수준이 감소하였으며, 그리고 U937 세포주에서는 18시간에 최고의 활성 수준을 나타내었다(Fig. 8).

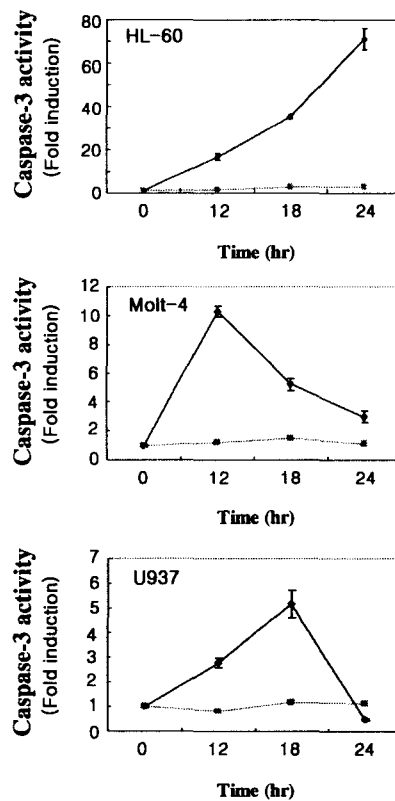


Fig. 8. Paljin increased the activity of caspase-3 of human leukemia cell lines in a time-dependent manner. Cells were treated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods. Lysates from the cells were used to measure the activity of caspase-3 by using fluorogenic peptide, Ac-DEVD-AFC, as a substrate. Results were represented as the mean \pm S.D. of four independent experiments.

caspase-8의 활성은 세 세포주 모두에서 측정할 수 없었다 (미발표 성적). caspase-9의 활성은 八珍抗癌丹을 처리한 HL-60 및 Molt-4 세포주에서만 유의성 있는 시간 의존적인 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

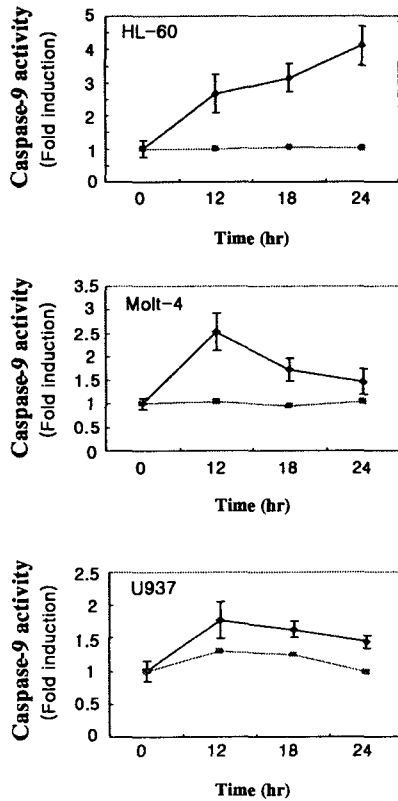


Fig. 9. Paljin increased the activity of caspase-9 of human leukemia cell lines in a time-dependent manner. Cells were treated with 0.4 mg/ml Paljin for the indicated periods. Lysates from the cells were used to measure the activity of caspase-9 by using fluorogenic peptide, Ac-LEHD-AFC, as a substrate. Results were represented as the mean±S.D. of four independent experiments.

또한 八珍抗癌丹에 의해 활성화된 caspase-3에 의하여 기질로 알려진 PARP 단백질의 분절 현상은 HL-60, Molt-4 및 U937 세포주에서 관찰하였다(Fig. 10).

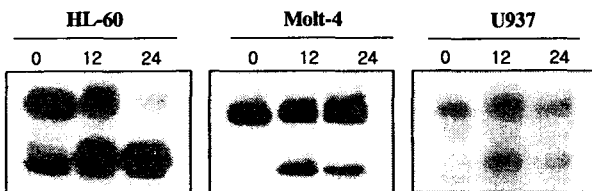


Fig. 10. Paljin increased the PARP cleavage of human leukemia cell lines. Cells were treated with Paljin(0.4mg/ml) for the indicated periods. The same amount of protein from lysates was subjected on 12.5% SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with PARP antibodies. The immunoreactive bands were visualized by ECL kit.

고찰

종양이란 비정상적인 과잉발육으로 체내의 각 부위에 확산

침윤하여 정상 조직을 파괴하는 질환으로, 이 중 악성종양을 흔히 암이라 일컫는다^{20,21}). 암의 치료는 서양의학에서는 주로 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법 등이 활용되고 있다. 이중 수술요법과 방사선요법은 암이 전신에 전이, 증식 되기 전에 실시함으로써 효과를 거둘 수는 있으나, 암이 원발병소 이외에까지 전이, 증식되었을 경우에는 이 두가지 방법의 국소요법만으로는 좋은 치료효과를 거두기 어렵다. 따라서 최근 항암제에 의한 화학요법이 다른 방법보다 유효하다고 인정이 되어 가장 많이 활용되고 있으나, 암종에 대한 감수성차이, 치료 후의 부작용, 재발 및 합병증 등의 문제점으로 부작용을 감소시키면서 항암효과를 높이는 치료법이 계속 연구되고 있다^{22,23}). 이에 1972년 미국 국립암연구소에서 실시한 항암제 개발연구에 있어서 항종양성 screening test에 이용된 물질 중 약 47%가 천연물질이었다²⁴)는 사실은 주목할 만 하다. 한의학에서의 암치료는 전신적인 상태와 국소적인 병증변화에 입각하여 변증시치를 하는데 인체 항병능력을 증진시키는 扶正培本法과 직접적으로 암을 살상하는 祛邪法을 적절하게 배합하여 사용하고 있다²⁵). 扶正은 正氣를 扶助하는 약물과 치료방법을 사용하는 것으로 補法을 말한다. 扶正治療는 正氣가 虛한 암환자에게 적용된다. 祛邪는 攻逐毒邪하는 약물과 치료방법을 사용하는 것으로 사법을 말한다. 祛邪治療는 正氣가 盛한 암환자에게 적용된다. 扶正과 祛邪는 相補相成의 관계에 있는데, 扶正은 正氣를 강화하여 인체의 면역력을 강화시키고, 抗毒, 抗癌을 도와 祛邪를 유리하게 하며 祛邪는 암세포를 죽이거나 암세포의 성장을 억제해서 正氣의 보존과 회복을 유리하게 한다^{26,28}).

본 연구에 사용한 八珍抗癌丹은 원광대학교 비계내과학교실에서 사용하는 처방으로 八珍湯合化積丸에 白花蛇舌草를 가한 處方이다. 八珍湯合化積丸은 《中華腫瘤治療大成》⁸)에 수록된 處方으로 補氣利氣, 活血祛瘀, 軟堅消腫, 抗癌 등의 효능이 있으며 腫塊日益增大堅硬, 按之痛甚, 痛有定處, 面色晦暗, 肌膚甲錯, 全身乾黃消瘦 등을 치료한다. 構成藥物을 살펴보면 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草은 補氣健脾하고 生地黃, 當歸, 赤芍藥, 川芎은 補肝腎, 補血和血하는 八珍湯之劑로 正氣를 강화시키고 免疫力를 증가시키는 扶正시키는 약물들이다. 香附子, 乳香, 三稜, 蓬朮, 穿山甲은 行氣破血, 消積止痛, 消腫하고, 鱉甲은 滋陰清熱, 軟堅散結하며, 白花蛇舌草는 清熱解毒작용으로 암세포를 억제하는 祛邪시키는 약물들이다. 그러므로 八珍抗癌丹은 扶正祛邪法에 입각한 처방임을 알 수 있다^{29,30}). 세포사멸의 한 형태로서 주목을 받고 있는 세포고사(apoptosis)는 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 생물학적 역할³¹)로 인식되어 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다^{32,33}). 抗癌 치료에 흔히 사용되는 항암제들은 작용기전에 관계없이 다양한 암조직이나 세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀져 있고 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide 경로, 초기발현 유전자(early immediate gene) 발현, 단백질 분해 효소 caspase family cysteine protease 및 DNA 분절을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 이유로 항암 치료의 효율성은 세포고사 기전의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 종양 치유의 관점에서 종양세포의 세포고사와 관

련된 세포고사 유도인자, 신호전달경로 그리고 관련 유전자들과 단백질들을 연구하여 항암기전을 연구하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다³⁴⁻³⁵⁾.

따라서 본 실험에서는 한방에서 암환자의 치료에 사용되는 八珍抗癌丹의 항암 효과를 사람의 백혈구 세포에서 유래된 HL-60, Jurkat, Molt-4 및 U937 세포주를 사용하여, 八珍抗癌丹 추출물들이 직접적으로 암 세포주에 다양한 신호전달 과정에 관여하여 세포고사를 일으켜 세포 죽음을 초래할 수 있는지를 밝히고자 실험하였다. 또한 백혈병 환자로부터 분리한 백혈병 세포에서 八珍抗癌丹의 효과를 규명하고자 하였다. 먼저 八珍抗癌丹 추출물이 HL-60, Jurkat, Molt-4 및 U937 세포주에 세포독성을 나타냈으며, 그 기전이 세포고사 기전에 의해서 매개됨이 DNA와 핵의 분절 현상으로 확인되었다. 八珍抗癌丹에 의한 백혈병 세포죽음이 세포고사 신호전달계를 활성화시키는지를 확인하기 위하여 여러 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 八珍抗癌丹에 의한 세포고사가 죽음 수용체(death receptor)를 거치지 않고 다른 세포고사 신호전달계의 활성화에 의하여 이루어지는 것을 확인하기 위하여 미토콘드리아의 막전위를 조사하였다. 八珍抗癌丹은 세포주 미토콘드리아 막전위의 상실을 유도하여, 八珍抗癌丹에 의한 항암효과가 미토콘드리아 경로를 활성화시키는 것을 확인하였다. Bcl-2 단백질 군은 세포고사에서 미토콘드리아의 기능을 조절함으로써 세포고사를 조절하는 것으로 알려져 있다. Bcl-2 단백질의 발현 양 또는 세포질에서 미토콘드리아로의 이동이 미토콘드리아의 막전위에 영향을 주며, 세포고사 신호전달에서 이러한 변화가 미토콘드리아의 내막과 외막 사이에 존재하는 cytochrome c의 세포질 방출을 유도함으로써 세포고사를 활성화시킨다¹³⁻¹⁶⁾. 본 실험에서는 八珍抗癌丹에 의하여 백혈병 세포주의 막전위 상실이 관찰되어 Bcl-2 단백질군의 발현 양을 관찰하였다. 八珍抗癌丹은 백혈병 세포주의 Bcl-2 단백질에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었으나, Bax 단백질의 경우 HL-60 세포주에서 증가되는 것을 확인하였다(미발표 성적). 세포고사를 촉진하는 Bid 단백질은 세포고사 과정에서 절단되어 미토콘드리아로 이동하는데³⁶⁻³⁸⁾, 八珍抗癌丹에 의하여 백혈병 세포주의 Bid 절단이 관찰되어 미토콘드리아를 경유하는 세포고사 유도를 재확인하였다. 세포고사 중요 작용기전의 하나인 caspase family¹⁸⁻¹⁹⁾는 정상적으로 세포내에 불활성화 형태로 존재하다가 세포고사 유도시 활성화되어 세포고사의 특징적인 현상을 초래한다. Caspase는 분해를 일으키는 표적 단백질이 아미노산 서열의 상동성(sequence homology)에 따라 3개의 family로 구분한다. 미토콘드리아의 하방에 존재하며, 미토콘드리아로부터 세포질로 방출된 cytochrome c와 복합체를 형성하여 활성화가 유도되는 caspase-9는 八珍抗癌丹에 의하여 활성화되었다. Caspase-3는 protease cascade의 하방에 위치하여 여러 세포고사 경로가 공통으로 통과하는 중요한 경로로 32kDa의 전구물질로부터 활성화되면 20kDa과 11kDa 아단위로 분해되어 DNA 복구와 스트레스 관련 유전자의 활성화 기능에 중요한 PARP를 분해하여 세포고사에 필수적이다³⁹⁾. 본 연구에서도 八珍抗癌丹은 caspase-3의 활성화를 증가시켜 결과적으로 PARP의 분절을 초래하였다.

위 실험결과를 바탕으로 八珍抗癌丹이 실제 백혈병환자의 항암치료의 이용 가능성을 조사하기 위하여, 백혈병 환자의 혈액에서 분리한 백혈병 세포에 八珍抗癌丹을 처리하여 세포독성 효과를 관찰하였다. 八珍抗癌丹은 백혈병 세포의 sub-G1 DNA 분획 증가와 사다리형의 DNA 분절을 유도하였으며, 합성기 말 G2/M기의 세포주기 진행이 억제되는 현상이 뚜렷이 관찰되어 八珍抗癌丹의 항암효과를 확인하였다. 八珍抗癌丹은 HL-60, Jurkat, Molt-4 및 U937 세포주에서 농도 의존적인 세포사멸을 유도하였다. 이때 八珍抗癌丹은 여러 백혈병 세포주에서 사다리형의 DNA 분절과 핵분절 현상을 유도하고, 미토콘드리아의 막전위를 상실, Bid의 분절 및 caspase계의 활성화와 기질인 PARP의 분절을 유도함으로써 세포고사 신호전달계를 활성화하였다.

결론

八珍抗癌丹의 항암효과를 연구하고, 세포고사 신호전달계의 활성화를 통하여 그 효능을 알아보도록 세포고사 신호전달계의 caspase인 단백질분해효소의 활성화, Bcl-2 단백질군의 발현과 절단, 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 八珍抗癌丹의 효과를 관찰하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

八珍抗癌丹 추출물은 사람 백혈병 세포주인 HL-60, Jurkat, Molt-4 및 U937 세포주의 세포생존율을 감소시켰다. 八珍抗癌丹 추출물은 세포고사의 전형적인 형태인 사다리형의 DNA 분절과 핵의 분절 현상을 나타냄으로써 사람 백혈병 세포주인 HL-60, Jurkat, Molt-4 및 U937 세포주에서 세포고사를 유도함을 확인하였다. 八珍抗癌丹 추출물은 사람 백혈병 세포주인 HL-60, Molt-4 및 U937 세포주의 미토콘드리아의 막전위 상실을 유도하였다. 八珍抗癌丹 추출물은 사람 백혈병 세포주인 HL-60, Molt-4 및 U937 세포주의 Bcl-2 단백질의 발현양에는 영향을 주지 않았지만 Bid 단백질의 양의 감소를 유도하였다. 八珍抗癌丹 추출물은 사람 백혈병 세포주인 HL-60, Molt-4 및 U937 세포주의 세포고사에서 단백질 분해작용에 중요한 역할을 하는 caspase-3, 그리고 caspase-9의 활성화와 동시에 PARP의 분절을 유도하였다. 八珍抗癌丹은 사람의 백혈병 세포주 HL-60, Jurkat, Molt-4 및 U937 세포주에서 농도 의존적인 세포사멸을 유도하였다. 이때 八珍抗癌丹은 여러 백혈병 세포주에서 사다리형의 DNA 분절과 핵분절 현상을 유도하고, histone 단백질 중 H2AX의 인산화, 미토콘드리아의 막전위를 상실, Bcl-2 단백질 군 중 Bid의 분절, caspase계의 활성화와 기질인 PARP의 분절을 유도함으로써 세포고사 신호전달계를 활성화하였다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 원광대학교 송산연구비지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. 대한병리학회, 병리학 제3판, pp.201-202, 고문사, 서울, 1997.

2. 錢伯文, 腫瘤的辨證施治, pp. 1-10, 上海科學技術出版社, 上海, 1980.
3. 郁仁存, 中醫腫瘤學, pp. 1-11, 北京科學出版社, 北京, 1983.
4. 賈旁, 癌瘤中醫防治研究, pp. 1-3, 陝西科學技術出版社, 陝西, 1983.
5. 孫泰重, 病理學概論, p. 227, 고문사, 서울, 1979.
6. 전국의과대학교수, 오늘의 진단과 치료, pp. 78,85,90,105, 서울, 도서출판 한우리, 1999.
7. 최승훈, 東醫腫瘍學, pp. 142-3, 행림출판, 서울, 1995.
8. 潘敏求 外, 中華腫瘤治療大成, p. 60, 河北科學技術出版社, 河北, 1996.
9. 金成鎮, 八珍湯合化積丸의 抗腫瘍 效果에 關한 研究, 圓光大碩士學位論文, 1999.
10. 李竝求, 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용치리시 나타나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 關한 작용기전 研究, 圓光大博士學位論文, 2000.
11. 韓世熙, 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 HL-60 細胞 枯死 過程에서의 cell cycle 關聯因子的 活性變化 研究, 圓光大碩士學位論文, 1999.
12. 李建業, 八珍抗癌丹의 인간 前骨髓性 白血病 細胞 死滅 效果, 圓光大博士學位論文, 2001.
13. Guido K., John C.R., Mitochondrial control of cell death : Nature 6(5), 513-519, 2000.
14. Finbarr E.C., Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective : chemotherapy 111, 52-60, 2000.
15. Shigeomi S., Masashi N., Yoshihide T., Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC : Nature 399, 483-487, 1999.
16. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y., Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC : Nature 399, 411-2, 1999.
17. Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis : Nature 376, 37-43, 1995.
18. Alemri E.S., Mammalian cell death proteases : a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases : J. Cell. Biochem 64, 33-42, 1997.
19. Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S. and Dixit V.M., An induced proximity model for caspase-8 activation : J. Biol. Chem 273, 2926-2930, 1998.
20. 豫防醫學과 公衆保健 編輯委員會, 豫防醫學과 公衆保健, p. 425, 癸丑文化社, 서울, 1987.
21. 金春元, 病理學, p. 84, 신광출판사, 서울, 1989.
22. 李佩文, 如何正確選用抗癌中成藥 :中醫雜誌 9, 46-48, 1989.
23. 張代釗, 中西醫結合治療癌證, pp. 11-19, 山西人民出版社, 山西, 1984.
24. King, M.L., Screening study on Taiwan Plants for antitumor activity. Cancer Chemotherapy Reports part 2 : 4(3), 1974.
25. 鄭玉玲 外, 中西醫腫瘤診療大全, pp. 241-256, 中國中醫藥出版社, 北京, 1998.
26. 문구, 정병학, 김병주, 암 동서의 결합치료 1권, pp. 256-257, 461-462, 원광대학교 출판국, 익산, 1999.
27. Wong R, Sagar CM, Sagar SM, Integration of Chinese medicine into supportive cancer care: a modern role for an ancient tradition : Cancer Treat Rev 27(4), 235-46, 2001.
28. Wei H, Tian Z, Xu X, Feng J, Xiao W, Expression of transcription factor T-bet/GATA3 in lung cancer patients and its interference by the traditional Chinese herbal medicine : Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 24(1), 34-7, 2002.
29. 劉春安 外, 抗癌中草藥大事典, pp. 14, 33, 45, 100, 260, 305, 340, 440, 517, 638, 710, 752, 776, 817, 1153, 湖北科學技術出版社, 湖北, 1994.
30. 辛民教, 原色 臨床本草學, pp. 166, 172, 175, 221, 240, 249, 250, 297, 300, 385, 403, 404, 453, 472, 688, 永林社, 서울, 1991.
31. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zuh H, Yuan J, ICH-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death: Cell 78:739-750, 1994.
32. Williams GT, Apoptosis in the immune system : J. Pathol 173, 1-4, 1994.
33. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD, Programed cell death and the control of cell survival : Science 262, 695-700, 1993.
34. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH, Chemotherapy-induced apoptosis : Adv. Pharmacol 41, 461, 1997.
35. Thomson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease : Science 267, 1456-1462, 1995.
36. Michael O.H., The biochemistry of apoptosis : Nature 407, 770-776, 2000.
37. Guseva N.V., Taghiyev A.F., Rokhlin O.W., Cohen M.B., Contribution of death receptor and mitochondrial pathways to Fas-mediated apoptosis in the prostatic carcinoma cell line PC3 : Prostate 1;51(4), 231-40, 2002.
38. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB, Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl : Carcinogenesis 23(1), 143-50, 2002.
39. Scott HK and William CE, Induction of apoptosis by cancer chemotherapy : Experimental Cell Research 256:42-49, 2000.