

# 八珍抗癌丹의 인간 前骨髓性 白血病 세포 사멸 효과

이건업\* · 문석재 · 문 구 · 원진희 · 김동웅 · 김형균 · 문영호 · 이종범 · 윤준철 · 김홍준

원광대학교 한의과대학 내과학교실

## The Effect of Paljinhangahm-dan on Human Promyelocytic Leukemia Cells(HL-60) Death

Gun Up Lee\*, Seok Jae Moon, Goo Moon, Jin Hee Won, Dong Woung Kim, Hyung Kuen Kim, Young Ho Moon, Jong Bum Lee, Jun Chul Yoon, Hong Joon Kim

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

Paljinhangahm-dan is an Oriental herbal formulation for its ability to modulate cancer cell growth and survival. This research was performed to study the anti-cancer effects of Paljinhangahm-dan water extract(PHWE) in human promyelocytic leukemia(HL-60) cells. After HL-60 cells were routinely cultured, tetrazolium-based colorimetric(MTT) assay was performed for cytotoxicity test. To explore the mechanism of cytotoxicity, I used several measures of apoptosis to determine whether this processes was involved in PHWE-induced cell death in HL-60 cells. In addition, the experiment was practised 1H-NMR spectroscopy to examine molecular structure of PHWE. This study suggested that PHWE control cancer cell growth through of apoptosis with less cytotoxicity in normal cells.

Key words : Paljinhangahm-dan(八珍抗癌丹), anti-cancer effects, apoptosis, HL-60

### 서 론

癌은 전형적으로 생화학적 활성분자의 생산과 국소 팽창 및 인접부위 혹은 원격 조직부위의 비정상적인 성장, 즉 종양으로 나타난다. 증상은 특이분자산물과 종양부위에 따라 다르며, 아직도 그 발생원인과 기전이 명확히 밝혀져 있지 않고 있다<sup>1,2)</sup>. 한의학에서 암은 병정의 발생과 진행과정에 따라 昔癰, 腸覃, 石瘕, 積聚, 癥瘕, 疝, 反胃 등의 다양한 병증으로 표현되어 왔으며, 癌의 발병요인에 대하여 《素問 評熱病論》에 “邪氣所湊 其氣必虛”<sup>3)</sup>, 《素問 刺法論》에 “正氣存內 邪不可干”<sup>3)</sup>이라하여 邪氣의 침입에 대한 正氣의 抗病能力에 따라 질병의 발생과 진행이 결정된다고 인식하였다. 암치료시에는 發病機轉을 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 臟腑失調, 氣血虧虛 등으로 인식하였으며 邪實과 正虛의 단계에 따라 養血, 助陽, 益氣 등의 不正法과 清熱, 解毒, 化痰 등의 祛邪法을 함께 배합하여 사용하였다<sup>4)</sup>. 한의학에서 암치료는 암에 대한 인체의 방어 능력을 강조하여 인체의 내적 환경과 조건을 변화시킴으로써 癌을 억제할 수 있으나 치료효과가 완만하고 病所部位를 제거하기 어려우며 암세포 살해능력이 강하지 않는 결

점이 있다. 반면에 西洋醫學의 수술, 방사선, 화학요법 등은 癌의 病所를 제거해 癌의 진행을 제어할 수 있으나, 암세포를 제거함과 동시에 수술후유증, 면역기능억제, 정상세포독성, 다른 암종 유발 등의 부작용을 야기할 수 있다. 따라서, 인체의 면역력을 강화시키는 동시에 암세포에 대한 직접적인 치료효과를 높이면서, 서양의학의 부작용인 정상세포나 조직에 대한 독성은 거의 보이지 않는 새로운 치료법을 한의학에서 모색하는 연구가 시도되고 있다<sup>5)</sup>. 八珍抗癌丹은 원광대학교 비계내과학교실에서 八珍湯合化積丸에 白花蛇舌草를 加하여 사용하는 처방으로 八珍湯合化積丸<sup>6)</sup>은 健脾益氣, 活血祛瘀, 軟堅消腫, 항암효과가 있어 扶正祛邪하는 처방이다. 최근 金<sup>7-8)</sup>등은 八珍湯合化積丸과 adriamycin의 병용치리시 나타나는 항암효과에 관하여 보고하였으며, 韓<sup>9-12)</sup>등은 白花蛇舌草에 의한 암세포의 세포고사과정에 대하여 보고하였다. 세포고사(apoptosis)는 항암제의 암세포 사멸효과에 주된 기전이라고 제시되고 있으며, 암치료 결과의 예후인자로 세포고사가 많이 연구되고 있다<sup>13,14)</sup>. 세포고사는 세포의 특수한 형태로 염색질의 농축, DNA의 분절, 핵막의 발아, apoptosis 소포체(apoptotic body) 형성을 특징으로 하며 정상발달, 기관형성, 조직의 성장 등에서 세포를 제거하는 기능을 가진 壞死(necrosis)와는 다른 유전자 활성에 의해 조절받는 생리과정이다<sup>15-19)</sup>.

저자는 八珍抗癌丹의 항암활성과 세포고사 유도효과를 알아

\* 교신저자 : 이건업, 광주광역시 남구 주월동, 원광대학교 광주한방병원

E-mail : gunup@hanmail.net Tel : 062-670-6527

· 접수: 2002/03/29 · 수정: 2002/04/30 · 채택 : 2002/05/27

보기 위하여 HL-60 암세포주에 대한 세포독성과 PBMC (peripheral blood mononuclear cells)에 대한 세포독성을 살펴 보았으며, HL-60세포에 대한 세포막의 형태학적 변화, DNA 분절화 및 유식세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 세포고사 유도를 확인하였다. 또한 본 연구에서는 임상에서 항암제로 사용되고 있는 doxorubicin 처리군과 비교하여 八珍抗癌丹의 상대적인 항암활성을 평가하였으며, 또한 八珍抗癌丹 처방의 객관성 정립 등을 위한 1H-NMR (proton nuclear magnetic resonance:양자 핵자기공명)스펙트럼 연구도 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 八珍抗癌丹은 원광대학교 비계내 과학교실 처방에 의거하였으며 1첩의 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription contents of Paljinhangahm-dan Per Pack

본초명	생약명	분량(g)
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	12
人蔘	Radix ginseng	6
白茯苓	Poria	6
生地黄	Rhizoma rehmanniae	6
鳖甲(醋)	Carapax amydae	6
穿山甲	Squama manitis	6
白朮	Rhizoma atractylodia macrocephalae	4
當歸	Radix angelicae gigantis	4
赤芍藥	Radix paeoniae rubra	4
三稜	Rhizoma scirpi	4
蓬朮	Rhizoma curcumaе zedoariae	4
香附子	Rhizoma cyperi	4
乳香	Mastrix	4
川芎	Rhizoma cnidii	4
甘草	Radix glycyrrhizae	3
Total amount		77

#### 2) 시약

3-[4,5-dimethylthiazol-2-y]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), histopaque-1077, Tris-HCl, isopropanol, triton, sodium bicarbonate, glutamine, RNase and propidium iodide (PI)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640, penicillin, streptomycin 은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) 八珍抗癌丹 수침액의 조제

약탕기에 八珍抗癌丹과 증류수 1 l 를 넣고 2시간 동안 달인 다음, 침출액을 여과지를 이용하여 여과하였다. 그 여과액을 freeze dryer로 동결건조하여 분말을 얻었다. 이때 동결건조의 수율은 약 9%(w/w)이었다. 건조한 추출약물은 실험 전에

phosphate-buffered saline (PBS)에 용해한 후 membrane filter (0.22 $\mu$ m)로 여과 멸균하여 검액으로 사용하였다.

#### 2) 세포배양

진골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. 세포는 0.2% sodium bicarbonate, 10% FBS, 2mM glutamine, 100units/ml penicillin, 10g/ml streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 배지에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

#### 3) PBMC의 분리

전혈 3ml를 3ml의 histopaque을 미리 넣은 15ml 시험관에 서서히 올린 후 상온에서 500 $\times$ g에서 40분간 원심분리 한 후 histopaque 층 위 층의 단핵구층을 모아 새로운 시험관에 넣어 10ml의 PBS와 섞어준 후 다시 400 $\times$ g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 이와 같은 세정 과정을 2번 더 반복한 후 0.2% sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100units/ml penicillin 그리고 10 $\mu$ g/ml streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 배지에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

#### 4) MTT 검색법

세포에 대한 약물의 세포독성 정도는 단시간에 대량 검색이 가능한 tetrazolium-based colorimetric(MTT) 검색법으로 Mosmann<sup>22)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 즉 세포 (6 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml)가 포함된 배지를 well당 500 $\mu$ l씩 접종하였다. 접종한 세포는 20분 이상 항온기에서 배양한 후 八珍抗癌丹을 농도별로 처리하였다. 실험이 끝난 후에 각 well당 50 $\mu$ l의 인산완충용액에 용해한 MTT stock solution (5mg/ml)을 첨가하였다. 4시간 후에 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다. 침전된 MTT formazan은 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액에 녹여 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 판독기를 이용하여 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 실험에 대해서 최소 3번 이상 반복하였으며 DMSO 용액을 blank solution으로 사용하였다.

#### 5) Flow cytometer에 의한 세포고사 분석

세포를 원심 분리한 후, 0.5% tween-20이 첨가된 70% 에탄올로 30분간 고정시켰다. 세포를 다시 4°C에서 2,000 rpm으로 10분간 원심분리 후, PBS-B(phosphate-buffered saline with 1% BSA)로 세정하였다. 고정된 세포에 PI-RNase(50 $\mu$ g/ml of PI with 11 kunits/ml of RNase) 용액을 4°C에서 1시간 처리하여 DNA를 염색한 후 Facscan flow cytometer(Becton-Dickinson, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 6) DNA 분리 및 전기영동

세포에서의 DNA 분리는 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Co, Wisconsin Medicine, WI, USA)를 사용하여 분리하였다. 분리된 genomic DNA 5 $\mu$ g을 1.5% 아가로스젤에서 100 V로 1시간 전기영동 시킨 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV transilluminator로 관찰하였다.

#### 7) 현미경을 이용한 세포의 형태학적 변화 관찰

세포고사과정 중 세포막내에서 일어나는 세포의 형태학적 변화, 즉 cell shrinkage, membrane blebbing 및 apoptotic body의 형성을 광학현미경 (Olympus CK2, Japan)을 통해 관찰하고

카메라 (Olympus SC35, Japan)로 촬영하였다.

8) 1H-NMR 분석

1H-NMR 스펙트럼은 Varian Unity 500 (500 MHz, Japan) spectrometer로 분석하였다<sup>21)</sup>.

9) 통계학적 분석

모든 자료는 mean ± SEM으로 나타내었으며, 통계학적 분석은 student's t-test로 행하였다. 유의성은 대조군과 비교하여 결정하였다.

결 과

1. 八珍抗癌丹이 백혈병세포의 세포독성에 미치는 영향

八珍抗癌丹이 백혈병세포의 세포독성에 미치는 영향을 평가하기 위해 八珍抗癌丹을 각 농도별로 처리하고 MTT 검색법으로 측정하였다. 八珍抗癌丹 200mg/ℓ의 농도에서는 HL-60 세포의 생존율에 유의한 변화가 없었으나 400, 800mg/ℓ의 농도에서는 유의한 세포독성을 나타냈다. 또한 八珍抗癌丹에 의한 HL-60 세포의 생존율은 시간에 따라 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 1). 대조군인 doxorubicin 1.0mg/ℓ 처리군과 비교하였을 때 800mg/ℓ의 농도에서 대단히 유사한 세포독성을 보였다.

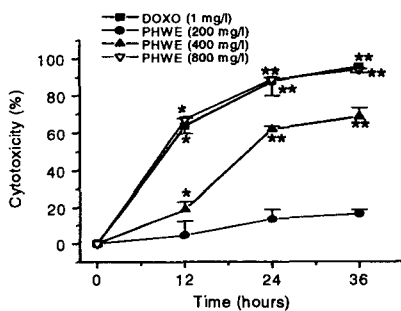


Fig. 1. Effect of PHWE on HL-60 human leukemia cells cytotoxicity. The cells ( $6 \times 10^4$  cells/ml) were treated with various concentrations of PHWE and the cells were tested for viability by MTT assay 12, 24, 36 hours after the treatment of PHWE. The value represented the mean±SEM from three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01; significantly different from the control value.

2. 정상 세포인 PBMC에 대한 八珍抗癌丹의 영향

Table 1. Viability of HL-60 human leukemia cells and PBMC by PHWE

Treatment	Concentration (mg/ℓ)	Viability (%)	
		HL-60	PBMC
None(PBS)	-	100.0±2.5	100.0±1.4
PHWE	200	86.4±5.4	110.5±3.7
	400	37.9±1.6**	102.0±0.9
	800	11.2±0.9**	72.5±4.6*
doxorubicin	1.0	12.2±7.9**	19.5±2.2**

PBMC( $6 \times 10^4$  cells/ml) were treated with various concentrations of PHWE or doxorubicin and then the cells were tested for viability by MTT assay 24 hours after the treatment of PHWE. The value represented the mean±SEM from three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01; significantly different from the control value.

八珍抗癌丹이 정상세포인 PBMC에 대한 세포독성 여부를 MTT 검색법으로 확인하였다. 암세포주인 HL-60 세포와 견강한

사람의 혈액에서 분리한 PBMC에 각각 비교군으로써 doxorubicin 1.0mg/ℓ, 실험군으로써 200, 400, 800mg/ℓ의 八珍抗癌丹을 24시간 처리한 후 MTT 시약을 첨가하였다. Doxorubicin (1.0 mg/ℓ)이 정상세포에서도 강력한 세포독성 (80.5%)을 보인 반면 八珍抗癌丹 800mg/ℓ 처리군은 현저하게 낮은 세포독성 (27.5%)을 보였다. 200, 400mg/ℓ 농도로 八珍抗癌丹을 처리한 세포에서는 세포독성이 관찰되지 않았다 (Table 1).

3. 八珍抗癌丹이 백혈병세포 세포막의 형태학적 변화에 미치는 영향

HL-60세포에 八珍抗癌丹 처리시 세포고사로 진행되는 것을 형태학적인 변화로 알아보기 위해 약물을 처리하여 12시간 후에 광학현미경하에서 관찰한 결과 세포고사의 특징인 세포크기축소(cell shrinkage), 세포막 융기(cell membrane blebbing), apoptosis 소포체(apoptotic body) 등을 관찰할 수 있었다. 세포고사의 형태학적 특징은 고농도의 약물 처리군에서 더 많은 관찰을 할 수 있었다 (Fig. 2).

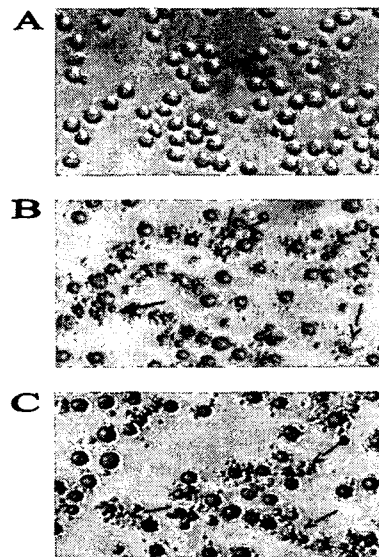


Fig. 2. Effect of PHWE on morphological change of HL-60 human leukemia cells. The cells were treated with either PHWE or doxorubicin for 12 hours. A) Untreated cell. B) Doxorubicin 1.0mg/ℓ. C) PHWE 800mg/ℓ. Arrows in B), C) indicate a typical apoptotic cell with apoptotic body. The cells were photographed under light microscopy (magnification, ×100).

4. 八珍抗癌丹이 白血病細胞의 DNA 분절화에 미치는 영향

八珍抗癌丹에 의한 세포 죽음의 기전이 세포고사에 의하여 매개될 가능성이 제시되었기 때문에 이를 확인하기 위하여 세포고사의 다른 현상적 특징의 하나인 DNA 분절화를 HL-60 암세포에서 확인 하였다. 八珍抗癌丹을 200, 400, 800 mg/ℓ로 처리하고 24시간 후에 세포에서 DNA를 추출하여 1.5% 아가로스젤에 전기영동하여 DNA 분절현상을 Et-Br 염색을 통하여 조사하였다. 400mg/ℓ 이상의 고농도에서 DNA 분절화현상이 관찰되었으며 800mg/ℓ의 八珍抗癌丹 처리군에서는 대조군인 doxorubicin (1.0mg/ℓ)과 같은 정도의 DNA 분절화현상을 분명하게 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

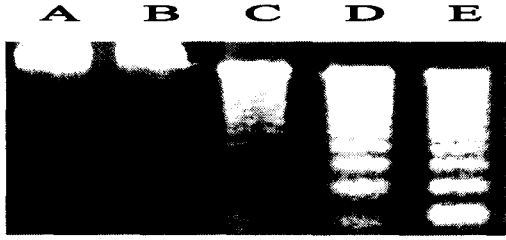


Fig. 3. PHWE induced the ladder pattern of DNA fragmentation in HL-60 human leukemia cells. After the treatment of the cells with various concentrations of PHWE for 24 hours, soluble cytoplasmic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gels. DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Similar patterns of gel electrophoresis were obtained in two separate experiments. A) Untreated cells. B) PHWE 200mg/l. C) PHWE 400mg/l. D) PHWE 800mg/l. E) doxorubicin 1.0mg/l.

5. 八珍抗癌丹이 白血病細胞의 DNA 함량에 미치는 영향

세포고사의 또 다른 측정 방법인 PI(propidium iodide)로 염색 후 flow cytometer 분석을 수행하였다. HL-60 암세포에 八珍抗癌丹을 24시간 동안 200, 400, 800mg/l 농도로 처리한 결과 2n 이하의 DNA함량을 지닌 hypodiploid의 세포고사의 특징을 지닌 세포의 비율이 각각 8.6, 28.7, 59.3%로 농도 의존적으로 뚜렷한 증가를 보였다. 비교군인 doxorubicin 1.0mg/l 처리군의 경우 67.9%의 비율을 보였다. 약물을 처리하지 않은 대조군은 4.3%로 나타났다 (Fig. 4).

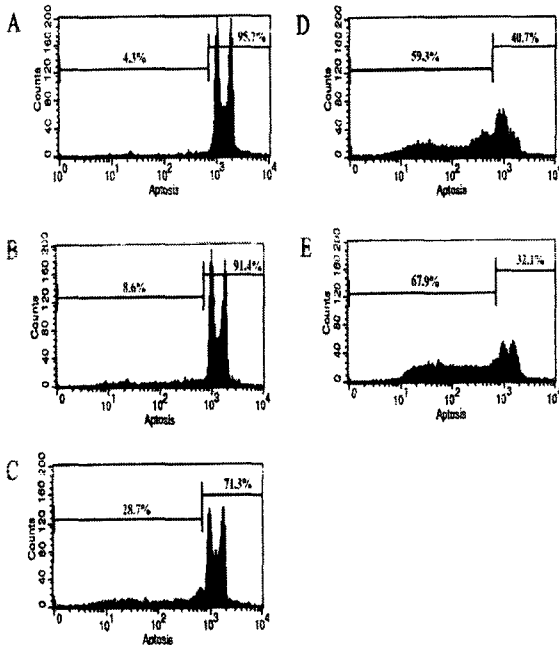


Fig. 4. Effect of PHWE on apoptosis of HL-60 human leukemia cells by flow cytometry analysis. The cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) treated with P-WFE for 24 hours were fixed in 1 ml of 70% ethanol with 0.5% tween-20 at 4°C for over 30min and suspended in PBS-B. The cells were stained with PI solution at 4°C for 1 hour and analyzed for DNA content by flow cytometry. Data represent the result from one of three similar experiments. A) Untreated cells. B) P-WFE 200mg/l. C) PHWE 400mg/l. D) PHWE 800mg/l. E) Doxorubicin 1.0mg/l.

6. 八珍抗癌丹의 1H-NMR 분석

八珍抗癌丹의 구성 성분의 특성을 알아보기 위하여 1H-NMR 분석을 수행한 결과 주된 생물학적 화합물을 분명하게

관찰할 수 있었다. 특히 3.10과 4.30ppm 사이와 5.60ppm에서 화학적 이동 (chemical shift)을 보였다 (Fig. 5).

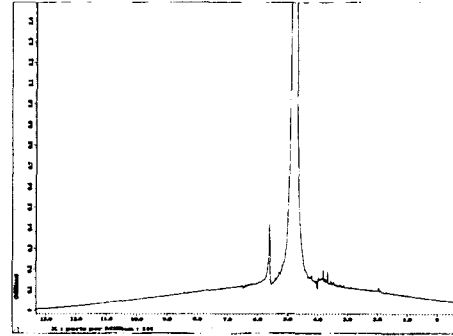


Fig. 5. 1H-NMR spectrum of PHWE.

고찰

癌이란 조직의 자율적인 과잉성장이며 개체에 대해 의의가 없거나 이롭지 않을뿐더러 정상조직에 대하여 파괴적인 것으로 임상 및 병리형태학적 소견에 의하여 악성종양으로 구분된다<sup>22,23</sup>. 일반적으로 암이라고 하는 모든 악성종양은 빠른 성장, 침윤, 체내 각 부위에의 확산 및 전이 등과 같은 특성이 있어 생명에 위협을 초래하는데 우리나라에서도 癌은 1991년 이래 순환기 계질환 다음으로 전체사망원인 2위를 차지하면서 국민보건을 위협하는 가장 큰 요인이 되었다<sup>24</sup>. 치료방법으로는 수술요법, 방사선요법, 화학요법과 면역요법 등이 주로 활용되고 있으며, 그 중 화학요법의 활용도가 가장 높다. 화학요법제로 활용되어지는 항암제의 주요 작용기전은 주로 암세포의 DNA에 손상을 초래하여 암세포의 세포 분열을 차단하거나, 세포가 성장하는데 반드시 필요한 영양물질의 흡수를 차단하여 세포의 성장을 차단하는 기능을 가지고 있다<sup>1</sup>. 현재 널리 사용되고 있는 화학요법제 중의 하나인 doxorubicin (adriamycin)은 유방암, 악성 육종, 폐암, 신경아세포종, 악성림프종, 급성백혈병에 사용하는 항암제로 DNA의 염기쌍에 부착하여 암세포의 증식에 필요한 새로운 RNA합성을 방해하며 산소자유기를 생성시켜 세포독성을 일으킨다. 그러나 doxorubicin의 정상세포나 조직에 대한 독성은 암환자 치료시 문제가 되고 있으며, 특히 심근세포에 대한 급성, 만성독성이 주요한 부작용으로 알려져있다<sup>25-27</sup>.

한의학에서의 암치료는 전신적인 상태와 국소적인 병증변화에 입각하여 변증시치를 하는데 인체 항병능력을 증진시키는 부정배분법과 직접적으로 암을 살상하는 祛邪法을 적절하게 배합하여 사용하고 있다<sup>28-29</sup>. 扶正은 正氣를 扶助하는 약물과 치료 방법을 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 瀉法을 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 癌細胞의 성장을 억제해서 正氣의 보존과 회복을 유리하게 한다<sup>4</sup>.

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 처방이다. 八珍湯合化積丸은 《中華腫瘤治療大成》<sup>9)</sup>에 수록된 처방으로 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. 구성약물을 살펴보면 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草는 補氣健脾하고 생지황(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, 三棱, 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<sup>30)</sup>.

이에 저자는 八珍抗癌丹이 암치료에 활용되기 위하여, HL-60 白血病細胞와 정상세포인 PBMC에 대한 八珍抗癌丹의 세포독성을 살펴보고, HL-60 白血病細胞의 세포막 형태 변화, DNA 분절화, flow cytometer 분석을 통해 암세포에 대한 세포고사효과를 확인하였다. 특히 본 실험에서는 doxorubicin과 비교하여 八珍抗癌丹의 객관적인 항암활성치를 평가하였다. 먼저 암세포의 세포독성을 측정하기 위해서 암세포 배양액에 八珍抗癌丹을 농도별로 처리하여 배양한 후 MTT 검색법을 이용하였다. MTT 검색법은 생존하는 세포의 효소작용에 의해 MTT가 환원되어 formazan crystal로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하여 항암제에 의해 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정하는 실험 방법으로 실험결과와 재현성과 객관성이 우수하여 대량검색이나 1차 검색에 적합하다<sup>31)</sup>. 실험결과 八珍抗癌丹은 농도와 시간 의존적으로 암세포에 대한 細胞毒性을 보였다. 특히 800mg/ℓ의 농도에서는 doxorubicin (1.0mg/ℓ)과 비슷한 정도의 세포독성을 보였다. 또한 정상세포에 대한 八珍抗癌丹의 세포독성을 알아보기 위하여 정상 세포인 PBMC를 분리하여 실험한 결과 항암치료에 사용되는 doxorubicin이 정상세포에서도 강력한 세포독성을 보인 반면 八珍抗癌丹은 상대적으로 약한 세포독성을 보였으며, 400mg/ℓ 이하의 농도에서는 전혀 세포독성을 나타내지 않았다. 세포고사(apoptosis)는 세포손상의 중요한 기전으로 1972년 처음 기술되었고, 종래의 괴사(necrosis)와는 명확하게 구분되는 새로운 개념으로 배의 발생, 정상조직에서의 항상성 조절, 암의 발생, 암의 치료 등 인체의 생리적 및 병적 현상 또는 진행에 관여하여 중요한 역할을 하며, 다양한 세포에서 자외선, 전리방사선, 이상고열과 같은 자극에 의해 유도되기도 한다<sup>32,33)</sup>. 세포고사는 종양의 자연치유와 종양세포들이 각종 항암제들에 의하여 사망될 때의 주된 기전이다. 세포고사는 초기단계에 세포막의 융기돌출현상(membrane blebbing), 점도(microviscosity)의 감소 혹은 막의 유동성의 증가를 초래하게 되며, 지질 이중막의 지질변화로 포스파티딜세린이 세포표면으로 노출되어 대식세포의 탐식작용 신호인자로 작용하여 세포고사가 유발된 세포들은 염증반응을 초래하지 않고 탐식작용에 의해 제거된다<sup>34,35)</sup>. 세포고사 과정 중에는 세포 크기가 축소(shrinkage)되는 특징적인 변화가 동반된다. 이외에도 세포막으로부터 융기가 돌출되는 현상(membrane blebbing) 및 여러 형태의 세포 내용물이 소포를 형

성하며 점차 여러개의 세포막으로 싸여져 세포로부터 떨어져 나온 apoptosis 소포체 (apoptotic body)라는 특수한 구조를 형성한다. 또한 미토콘드리아 등과 같은 세포내 소기관들은 자신의 원형구조를 대체적으로 유지하는데 비해, 핵에서는 염색질 응축, DNA 분절 등과 같은 변화가 동반된다<sup>10,36)</sup>. 염색질응축의 변화는 nucleosome사이의 연결부위에서 핵의 이중쇄 DNA가 절단되어 80나지 200 염기쌍 길이로 분할되어 나타나고 이것은 아가로스 젤 전기영동에서 특징적인 사다리 모양의 띠로 나타나게 된다. 전기영동상에서의 DNA 사다리 현상(DNA ladder)은 괴사와 세포고사를 구별하는 정통적인 방법으로 활용되고 있다<sup>10,37)</sup>.

본 실험에서는 八珍抗癌丹을 12시간 처리한 암세포에 있어서 세포고사의 형태학적인 특징인 apoptosis 소포체를 현미경으로 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 또한, 八珍抗癌丹을 각 농도로 24시간 처리한 암세포에서 DNA를 추출하여 전기영동을 한 결과 세포고사의 특징적 현상의 하나인 DNA 사다리 현상을 관찰할 수 있었다. DNA 분절화현상은 八珍抗癌丹의 농도에 따라 증가하는 양상을 보였으며 800mg/ℓ 농도의 처리군에서는 비교군인 doxorubicin (1.0mg/ℓ) 처리군과 비슷한 정도의 DNA 분절화 현상을 관찰할 수 있었다. Flow cytometer 분석법은 세포의 다양한 생화학적 지표를 정확하고 신속하게 분석할 수 있는데 세포주기에서 핵산의 분포와 DNA의 상대적 정량이 가능하다. 배양된 암세포주에 PI로 DNA를 염색하게 되면 모든 DNA가 염색이 되는데 이때 세포고사가 일어나지 않은 암세포 수와 세포고사가 일어나 조각난 DNA를 가진 세포의 수를 측정하여 비율을 알 수 있게 된다<sup>38)</sup>. 암세포에 八珍抗癌丹을 24시간 동안 처리한 결과 농도 의존적으로 2n 이하의 DNA함량을 지닌 hypodiploid의 세포고사의 특징을 지니는 세포의 비율이 각각 8.6, 28.7, 59.3%로 뚜렷하게 증가하였다. 1H-NMR (proton nuclear magnetic resonance:양자 핵자기공명)은 각각의 양성자들이 어떤 분자에 결합하는 가에 따라 주변의 화학적 자기적 영향을 받아 공명주파수가 변하게 되는 화학적 이동(chemical shift)현상을 그 원리로 하고 있으며, 자기공명주파수들의 미세한 차이로 말미암아 화학적으로 분자구조를 결정할 수 있는 방법이다<sup>39,40)</sup>. 본 실험에서는 八珍抗癌丹을 1H-NMR로 분석하여 주된 생물학적 화합물임을 분명하게 관찰할 수 있었다.

결론적으로 八珍抗癌丹은 암세포에 대한 세포독성과 세포고사를 통해 항암효과를 발현함을 알 수 있었다. 또한 八珍抗癌丹은 정상세포에서는 약한 세포독성을 보인 반면 암세포에 대해서는 강한 항암효과를 나타내기 때문에 임상적 활용면에서 대단히 큰 장점을 갖고 있다고 생각되며, 추후 더 많은 연구가 진행되어 유용한 항암치료제 및 치료방법의 개발로 이루어져야 하리라 사료된다.

## 결 론

八珍抗癌丹의 인간 전골수성 백혈병세포 사멸효과에 관한 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

八珍抗癌丹은 백혈병세포의 세포독성에 대한 실험에서 농도 의존적인 효과를 나타냈다. 정상세포인 PBMC에 대한 八珍抗癌丹의 세포독성은 800mg/ℓ의 농도에서 27.5%로 나타났을 뿐 그

이하의 농도에서는 세포독성이 관찰되지 않았다. 八珍抗癌丹은 백혈병세포에서 세포고사의 특징인 세포크기축소(cell shrinkage), 세포막 융기(cell membrane blebbing), apoptosis 소포체 (apoptotic body)를 형성하였으며 DNA 분절화를 유도하였다. 八珍抗癌丹은 백혈병세포에서 2n 이하의 DNA함량을 지닌 hypodiploid의 細胞枯死誘導의 세포비율을 뚜렷하게 증가시켰다. 八珍抗癌丹 구성성분의 특성을 알아보기 위하여 1H-NMR 분석을 수행하여 주된 생물학적 화합물임을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 八珍抗癌丹은 암세포에 대한 세포독성과 細胞枯死誘導를 통해 백혈병세포 사멸효과를 나타냄을 알 수 있다. 특히 정상세포에 대한 세포독성은 적게 보인 반면 백혈병세포 사멸효과는 강하여 부작용을 최소화할 수 있는 항암제로서의 개발가능성을 시사하였다.

### 감사의 글

본 논문은 2002년도 원광대학교 교비지원에 의해서 연구됨.

### 참고문헌

1. 서울대학교 의과대학편 : 종양학, 서울, 서울대학교출판부, pp. 1, 199-241, 1993.
2. 해리슨번역편찬위원회 : 해리슨내과학(한글제1판), 서울, 정담, p. 1963, 1997.
3. 楊維傑 : 黃帝內經素問譯釋, 서울, 成輔社, pp. 349, 469. 1980.
4. 문구 외 : 암 동서의 결합치료 1권, 익산, 원광대학교 출판국, pp. 256-257, 461-462, 1999.
5. 최승훈 : 東醫腫瘍學, 서울, 행림출판, pp. 142-143, 1995.
6. 潘敏求 外 : 中華腫瘤治療大成, 河北, 河北科學技術出版社, p. 60, 1996.
7. 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.
8. 李竝求 : 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용처리시 나타나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 關한 작용기전 研究, 圓光大博士學位論文, 2000.
9. 韓世熙 : 白花蛇舌草 메탄올 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.
10. 朴尙求 : 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 HL-60 細胞枯死 過程에 있어서의 transcriptional factors 活性變化 研究, 圓光大碩士學位論文, 1999.
11. 金日柱 : 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 HL-60 細胞枯死 過程의 caspases 活性變化 研究, 圓光大碩士學位論文, 1999.
12. 魯勳政 : 白花蛇舌草 메탄올 抽出物의 抗腫瘍效果 및 抗癌 機轉에 關한 研究, 圓光大博士學位論文, 1999.
13. Cohen JJ., Apoptosis. Immunol. Today 14, 126-130, 1993.
14. Dewey W.C., Ling C.C., Meyn R.E., Radiation-induced apoptosis :relevance to radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol ]Phys 33(4), 781-796, 1995.

15. 大韓病理學會 : 病理學, 서울, 高文社, pp. 35-38, 1994.
16. Williams GT. Apoptosis in the immune system, J. Patho, 173, 1-4, 1994.
17. Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, Milas L., Relationship of Mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. J NCI, 88, 1308-1314, 1996.
18. Provinciali M, Ciavattini A, Di Stefano G, Argentati K, Garzetti GG., In vivo amifostine (WR-2721) prevents chemotherapy-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes from cancer patients. Life Sci 64(17), 1525-32, 1999.
19. Shrivastava P, Sodhi A, Ranjan P, Anticancer drug-induced apoptosis in human monocytic leukemic cell line U937 requires activation of endonuclease. Anticancer Drugs 11(1), 39-48, 2000.
20. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65, 55-63, 1983.
21. Williams, D. H. and Fleming, I. : Spectroscopic methods in organic chemistry, New York, McGraw-Hill, pp.63-169, 1995.
22. 梁寶仁 : 癌症適中灸治療, 河北, 河北科學技術出版社, 1-24, 1992.
23. 李 岩 : 腫瘤病, 北京, 人民衛生出版社, pp. 2-8, 1982.
24. 성현제 외 : 암치료에 있어서 체질과 항암효과에 관한 한의학적 연구, 서울, 韓國韓醫學研究院論文集, 3(1):85-101, 1997.
25. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC., Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response, Science 8, 197(4299), 165-7, 1977.
26. Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J., Joenje H., Doxorubicin (adriamycin) : a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity, Pharmacol Ther 47(2), 219-31, 1990.
27. Lee V, Randhawa AK, Singal PK., Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals, Am J Physiol, 261(4 Pt 2), 989-95., 1991.
28. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 科學出版社, p. 311, 1997.
29. 鄭玉玲 外 : 中西醫腫瘤診療大全, 北京, 中國中醫藥出版社, pp. 241-256, 1998.
30. 劉春安 外 : 抗癌中草藥大事典, 湖北, 湖北科學技術出版社, p. 14, 33, 45, 100, 260, 305, 340, 440, 517, 638, 710, 752, 776, 817, 1153, 1994.
31. Carmichael J., Degraff W.G., Grazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B., Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, Assessment of chemosensitivity testing, Cancer Res 47, 936-942, 1987.
32. 高忠顯 外 : 現代腫瘤診斷治療學, 北京, 科學技術文獻出版社, pp.53-58, 1997.
33. Ling CC., Guo M., Chen CH., Deloherey T., Radiation-induced apoptosis : Effects of cell age and dose

- fractionation, *Cancer Res* 55, 5207-5212, 1995.
34. Darzynkiewicz Z., Apoptosis in antitumor strategies : Modulation of cell cycle or differentiation, *J Cell Biochemistry* 58, 151-159, 1995.
35. Vorhoven B, Schlegel RA, Williamson P., Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocytic recognition signal on apoptotic T lymphocytes, *J Exp Med* 182:1597-1601, 1995.
36. 오영준 : Methods used for Measuring Apoptosis, 서울, 醫學出版社, pp. 267-276, 2000.
37. Bold R. J., Termuhlen P. M., McConkey D. J., Apoptosis, cancer and cancer therapy, *Surg Oncol* 6, 133-142, 1997.
38. Hedly DW, Flow cytometry using paraffin-embedded tissue:five years on. *Cytometry* 10, 229, 1989.
39. Jensen KE, Magnetic resonance imaging and spectroscopy of the bone marrow in vivo. *Danish Med Bull* 39:369-390, 1992.
40. 조정혁 : NMR분광학, 서울, 자유아카데미, pp.15-16, 1989.