

보정방암탕 추출물의 혈관내피세포독성에 대한 방어효과

권강범 · 김은경¹ · 송미영¹ · 한미정 · 이수엽 · 이현재 · 이영래¹ · 주성민² · 류도곤 · 김성훈^{3*} · 전병훈^{2*}

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 전북대학교 의과대학 생화학교실,
2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 3: 경희대학교 한의과대학 병리학교실

Protective Effects of Bojungbangam-tang Extracts on ECV304 Cell Cytotoxicity

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim¹, Mi Young Song¹, Mi Jeong Han, Su Yeop Lee, Heon Jae Lee, Young Rae Lee¹, Sung Min Ju², Do Gon Ryu, Sung Hoon Kim^{3*}, Byung Hun Jeon^{2*}

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School,
2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, KyungHee University

This study was designed to investigate the protective effect of Bojungbangam-tang Ethanol Extracts (EBJT) on cisplatin and hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of human endothelial cell line ECV304 cells. After cells were treated with cisplatin and hydrogen peroxide, MTT assay was performed for cell viability test. To explore the mechanism of cytotoxicity, we used the several measures of apoptosis to determine whether this processes was involved in cisplatin and hydrogen peroxide-induced cell damage in ECV304 cells. Also, cells were treated with EBJT and then, followed by the addition of cisplatin or hydrogen peroxide. Cisplatin or hydrogen peroxide decreased the viability of ECV304 cells in a dose-dependent manner. ECV304 cells treated cisplatin or hydrogen peroxide were revealed as apoptosis characterized by nuclear staining. EBJT protected ECV304 cells from cisplatin or hydrogen peroxide-induced nuclear fragmentation and chromatin condensation. Also, EBJT inhibited the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in cisplatin or hydrogen peroxide-treated ECV304 cells. According to above results, EBJT may protect ECV304 cells from the apoptosis induced by cisplatin or hydrogen peroxide.

Key words : Bojungbangam-tang, cisplatin, hydrogen peroxide, endothelial cell

서 론

화학요법제란 암세포의 각종 대사경로에 개입하여 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나 핵산의 합성을 방해하고, 세포분열을 저해함으로써 항암활성, 즉 암세포에 대한 세포독성을 나타낸다. 그러나 이들 약제는 정상세포에 대한 세포독성이나 골수억제, 오심, 구토, 구내염, 탈모증,

신장독성 등의 부작용이 보고되고 있다^{1,2}. 화학요법제로 쓰이는 대표적인 약물로 알려진 Cisplatin은 현재 고환암, 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양, 위암, 폐암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 등의 항암 치료에 사용되는 가장 중요한 약제 중의 하나이지만, 이 독성, 신독성, 골수독성, 위장관 장애, 및 알러지 등의 부작용 때문에 임상적 사용이 제한 받고 있다³.

산소의 대사산물인 생체 내 활성산소 (reactive oxygen species: ROS)는 superoxide radical (O₂⁻), hydroxyl radical (OH[·]), peroxy radical (HO₂[·]), nitricoxide radical (NO[·])과 같은 유리라디칼과 라디칼 형태가 아닌 singlet oxygen (¹O₂), 오존 (O₃), hypochlorous acid (HOCl) 그리고 hydrogen peroxide (H₂O₂) 등이 있다⁴. 정상적인 상태의 세포는 활성산소를 제거하는 항산화 시스템에 의해 항암성을 유지하지만, 제거체계의 능력

* 교신저자 : 전병훈, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학
김성훈, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학
· E-mail : omdjbh@wonkwang.ac.kr, sungkim7@khu.ac.kr
· Tel : 063-850-6843, 031-201-2179
· 접수 : 2007/03/13 · 채택 : 2007/04/06

을 넘어 과생산 되거나 항산화 방어 기전의 활성이 감소하는 경우 여러 가지 기전을 통하여 이 활성산소에 의한 세포와 조직의 손상이 초래 된다^{4,5}).

최근 연구보고에 의하면 cisplatin과 hydrogen peroxide는 혈관내피세포에 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다^{3,6}). 이러한 혈관내피세포의 손상은 내피세포의 혈관벽의 기능을 변화시켜 죽상경화증 (atherosclerosis)과 같은 병변을 초래하게 된다⁷).

본 연구는 cisplatin과 활성산소종의 하나인 hydrogen peroxide의 혈관내피세포 독성과 이에 대한 보정방암탕 에탄올 추출물의 세포 보호 효과를 세포수준에서 확인하기 위하여, 배양된 혈관내피세포에 cisplatin과 hydrogen peroxide를 처리한 후 세포독성 효과를 조사하였으며 또한 이에 대한 보정방암탕의 방어효과를 세포생존율분석과 세포고사 분석에 의하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Cisplatin과 hydrogen peroxide는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 세포배양판은 Falcon 사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, PARP 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Hoechst 33258 등은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양액 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 혈관내피세포인 ECV304 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 95% 공기과 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되는 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. 보정방암탕 에탄올 추출물

본 연구에 사용된 보정방암탕 에탄올 추출물은 경희대학교 동서의학대학원 중앙학교실에서 얻어서 사용하였다.

4. MTT 분석

ECV304 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10⁴ cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 세포에 보정방암탕 에탄올 추출물을 처리하여 MTT (0.5mg/ml)와 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다.

측정한 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5. 핵 염색(Hoechst staining)

세포 핵 형태의 관찰은 4% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하였다. 핵 염색 시약 Hoechst 33258을 10μM로 희석하여 10분 염색하고 다시 PBS로 세척한 후 형광현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 핵 형태를 관찰하면서 10×10의 배율로 사진을 찍었다.

6. Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후, 동량의 단백질을 BCA용액으로 정량하였다. 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodesyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후, 100°C에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10% gel에서 sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차항체는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, ECL kit(Amersham Co., England)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

7. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법⁸)에 의거하여 정량하였다.

8. 통계 분석

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 Microcal Origin(Version 6.0)을 이용하여 ANOVA one-way test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Cisplatin과 hydrogen peroxide의 세포 독성에 대한 보정방암탕 추출물의 방어효과

혈관내피세포인 ECV304세포에 6종류의 보정방암탕 에탄올 추출물을 3시간 동안 전처리한 후 80 μM cisplatin과 400 μM hydrogen peroxide를 48시간 동안 처리한 후 세포 독성에 대한 효과를 MTT 분석법을 이용하여 조사 하였다. 그 결과 처리한 6종류의 보정방암탕 에탄올 추출물 중 4번째 보정방암탕 추출물 (EBJT-4)에서 유의한 방어효과를 나타냈다(Fig. 1).

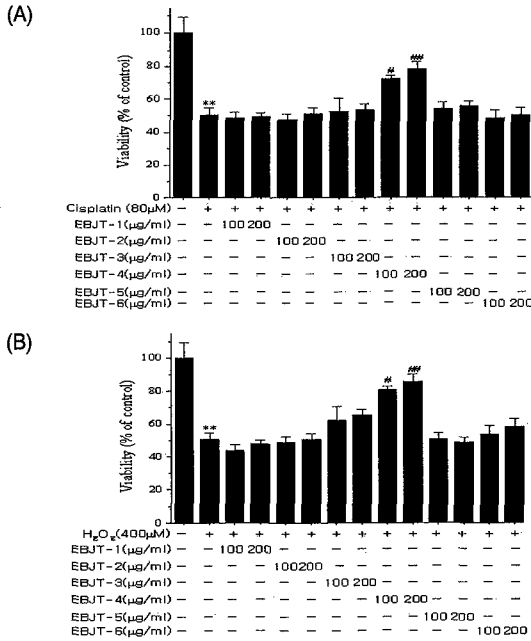


Fig. 1. The protective effects of EBJT-4 on cisplatin or hydrogen peroxide-induced decrease of viability in ECV304 cells. Cells were pretreated with six kinds of EBJT for 3 hr, and then treated with 80 μM cisplatin (A) or 400 μM hydrogen peroxide (B) for 48 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean±S.D. of three independent experiments. **p<0.01 vs non-treated group, #p<0.05, ##p<0.01 vs cisplatin or hydrogen peroxide-treated group.

2. Cisplatin과 hydrogen peroxide의 세포고사 유도에 대한 보정방암당 추출물의 방어효과.

EBJT-4의 cisplatin과 hydrogen peroxide 독성에 대한 방어 효과 기전을 조사하고자 EBJT-4를 3시간 동안 전처리 한 후 80 μM cisplatin과 400 μM hydrogen peroxide를 48시간 동안 처리한 후 세포고사의 특징적인 현상인 PARP의 절단을 Western blotting을 이용하여 조사하였으며, DNA 절단과 염색체 응축 현상을 Hoechst 33258 염색을 이용하여 조사하였다. Cisplatin과 hydrogen peroxide를 처리한 군은 PARP의 절단을 유도하였으며(Fig. 2A, 2B, lane 2), 또한 DNA 절단과 염색체 응축 현상을 나타내 세포고사 현상을 나타냈다(Fig. 3). 그러나 EBJT-4를 전처리한 군은 cisplatin과 hydrogen peroxide에 의한 PARP의 절단(Fig. 2A, 2B, lane 2 and 3)과 DNA 절단, 염색체 응축 현상을 유의하게 방어하였다(Fig. 3).

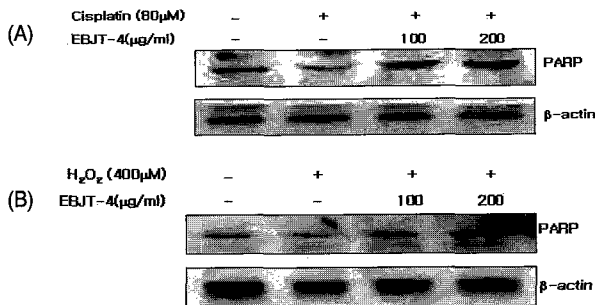


Fig. 2. The inhibition of EBJT-4 on cisplatin or hydrogen peroxide-induced PARP cleavage in ECV304 cells. Cells were pretreated with six kinds of EBJT for 3 hr, and then treated with 80 μM cisplatin (A) or 400 μM hydrogen peroxide (B) for 48 hr. PARP cleavage was measured by Western blotting.

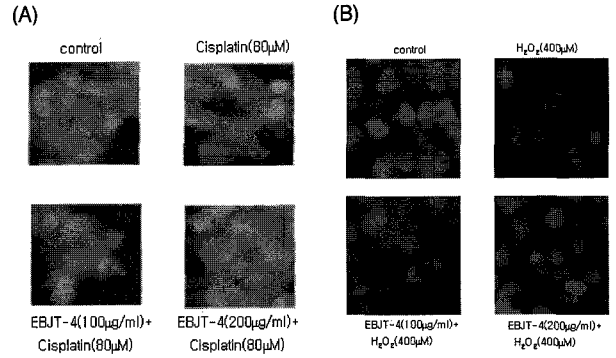


Fig. 3. The inhibition of EBJT-4 on cisplatin or hydrogen peroxide-induced DNA fragmentation and chromatin condensation in ECV304 cells. Cells were pretreated with six kinds of EBJT for 3 hr, and then treated with 80 μM cisplatin (A) or 400 μM hydrogen peroxide (B) for 48 hr. DNA fragmentation and chromatin condensation was measured by Hoechst 33258 staining.

고찰

cisplatin(cis-dichlorodiammineplatinum)은 platinum원자가 chloride와 ammonia원자에 의해 둘러싸여진 inorganic complex로서 epithelial tumor에 효과적인 항암제로 1972년부터 사용되어 왔다. 이는 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중 나선구조에 부착되어 DNA복제를 저해하여 암세포의 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하는 항암효과를 나타낸다. 특히 cisplatin은 전이 고환암과 난소암의 치료에 좋은 효과를 나타내며, 방광암, 두경부의 편평세포암, 기관지암, 자궁암, 임파종에도 많이 사용된다. 그러나 신독성, 골수조직 억제작용, 심한 구토, 신경 장애 등의 부작용이 문제시 되고 있다^{9,10}.

활성 산소종은 활성화된 호중구(neutrophils)에서 xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡, 그리고 아라키돈산 대사과정을 포함하는 세포의 정상적인 대사에 의해서 생성된다. ROS의 하나인 H₂O₂는 원형질막 NADPH oxidase, peroxisome에 존재하는 oxidase와 미토콘드리아 전자전달계에 의해 생성되며, 생물체에서 신호 전달물질, 물질대사의 중간산물, 방어체계의 세포 독성 물질, 그리고 병리학적 세포독성 물질로서 다양한 기능을 수행한다. 이러한 ROS의 과도한 생성은 산화적 스트레스를 유발하여 세포고사와 세포고사 같은 세포독성을 초래하나, 그 기전은 명확하지 않다. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 hem oxygenase 등이 세포 내에서 활성 산소종의 환원을 대사하여 여러 경로로 생성되는 활성 산소종의 독성으로부터 세포를 보호하는 기능을 하지만, 세포고사가 일어난 세포에서 과량의 ROS가 생성되고, 항산화제는 세포고사를 억제하고 있음이 밝혀졌다.

본 연구에서 cisplatin을 이용한 화학요법 치료 시 정상세포인 혈관내피세포에 미치는 세포독성과 hydrogen peroxide의 세포독성에 대한 보정방암당 에탄올 추출물의 방어능력을 실험적으로 규명하고자 하였다.

실험에서 cisplatin과 hydrogen peroxide는 혈관내피세포에 처리할 경우 세포생존율이 유의하게 감소하였으며 이는 세포고사에 의한 것임을 확인하였다. Cisplatin과 hydrogen peroxide는 다양한 암세포에서 세포고사 신호전달 기전을 통하여 암세포를 세포사멸로 유도한다고 알려져 있다. 최근 세포고사 유도 기전으

로 중요시되고 있는 caspase protease family는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화 되며, 현재까지 14종류가 알려져 있다¹¹⁻¹³⁾. 그 중 caspase-3 protease는 caspase cascade의 하방에 위치하여 상방에 위치한 caspase-8 protease와 -9 protease의 활성화신호가 합류하는 효소로서 손상된 DNA 복구와 스트레스 관련 발현유전자의 활성화 기능 유지에 중요한 단백질인 PARP를 절단하여 세포고사를 유도한다^{14,15)}. Cisplatin과 hydrogen peroxide를 처리한 ECV304세포는 caspase-3 protease 활성도를 증가시켰으며(data not shown) 이러한 활성도의 증가는 PARP의 절단을 유도하였다(Fig. 2, lane 2). 이러한 결과는 cisplatin과 hydrogen peroxide는 혈관내피세포에 독성을 증가시켰으며 이러한 세포 독성은 세포고사의 의한 것이고 그 이전에 caspase-3 활성 증가에 의한 PARP 절단이 관여하는 것을 시사한다.

이러한 cisplatin과 hydrogen peroxide에 의한 혈관내피세포 독성 대한 6 종류의 보정방압탕 에탄올 추출물의 방어효과를 조사하였다. 6종류의 보정방압탕 에탄올 추출물 중 4번째 추출물(EBJT-4)이 독성에 대하여 방어하였다(Fig. 1). EBJT-4의 cisplatin과 hydrogen peroxide에 의한 세포독성에 대한 방어효과는 세포고사를 억제하여 나타난 것을 PARP 절단(Fig. 2)과 DNA 절단, 염색체 응축(Fig. 3)을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

이상의 결과는 보정방압탕 에탄올 추출물(EBJT-4)도 화학요법 치료시 또는 활성산소에 의하여 나타나는 혈관내피세포 부작용을 완화시키는 제제로서 개발가능성을 시사한다 하겠다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(B050007)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 김용범 외. cisplatin을 포함한 항암화학요법 치료시 환자에게서 발생하는 오심 및 구토에서의 정맥주사용 및 경구용 tropisetron과 ondansetron의 비교연구. 대한산부회지 41(10): 2544-2550, 1998.
2. 이린화 외. 부인과 악성종양 환자에서 복합 항암화학요법에

다른 세포독성에 대한 amifostine의 임상효과에 관한 연구. 대한산부회지 44(11):1961-1967, 2001.

3. 정세영. 천연성분을 이용한 Cisplatin 신장독성 억제물질 개발: 전통약물로부터 신약개발. 경희대학교 경희동서약학연구소, 서울, pp 71-79, 1994.
4. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine, 3rd end, Oxford University Press, New York, 1998.
5. Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. Eur J Biochem 271(18):3646-3656, 2004.
6. Kaneko, M., Elmban, V., Dhalla, N.S. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals. Am J Physiol 261:4948-4955, 1989.
7. Libby, P., Deanfield, J.E. A CME monograph : Atherosclerosis and vascular disease Academy for Health Education. pp 1-28, 2002.
8. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254, 1976.
9. 白承學. 消積白朮散의 항암효과 및 cisplatin 부작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원, 1991.
10. 황영희 외. cisplatin의 신독성에 관한 연구. 영남의대학술지 9(2):327-333, 1992.
11. Goldberg, Y.P. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. Nature Genetics 13: 442-449, 1996.
12. Kim, T.W., Warren, H., Jung, Y.K., Kovacs, D., Tanzi, R. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. Science 277: 373-376, 1997.
13. Takahashi, A. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. Proc Natl Acad Sci. USA. 93: 8395-8400, 1996.