

원저

桔梗湯이 人體 肺細胞에 미치는 影響에 關한 分子生物學的 研究

李珩九*

ABSTRACT

Molecular Biological Study of The Effects of Gilgyung-Tang(GGT) on Cellular Proliferation and Viability of Normal Human Lung Fibroblast Cell

Hyung-Koo Rhee*

* Division of Respiratory system, Dept. of Internal Medicine,
College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

To characterize the effects of Gilgyung-Tang(GGT) on cellular proliferation and viability of normal lung fibroblast cells, we examined the cell cycle progression and cell cycle-related gene expression in T3891 using a flow cytometry and a quantitative RT-PCR analysis.

1. The significant suppression effect of cellular proliferations of GGT was observed in proportion to a certain concentration and time.
2. GGT was identified to induce apoptotic death of damaged cells by treatment with a DNA-damage agent and etoposide, while it stimulated the recovery of cellular viability of normal cells.
3. The significant reductions of mRNA expression of PCAN, c-Fos treated by GGT were observed.
4. The significant inductions of mRNA expression of p53, CDKN1, Gadd45 treated by GGT were observed.
5. The apoptosis caused by the reduction of Bcl-2 genes was significant and the Bax genes were increased, but the amount of Fas genes were not changed.

These results strongly suggest that GGT triggers arrest of the cell cycle at G1 phase, and thus causes an inhibition of cellular proliferation of human normal lung cells through the transcriptional up-regulation of cell cycle inhibitory genes and down-regulation of induction of cell cycle stimulating genes, respectively.

Key Words : Gilgyung-Tang(GGT), Cellular proliferation, Apoptosis, Genes, p53(gene)

* 慶熙大學校 韓醫科大學 肺系內科學 教室

접수: 99. 5. 31 채택: 99. 7. 2 연락처: 이형구 T. 02-958-8114

I. 緒 論

桔梗湯의 處方名은 《傷寒論》¹⁾에 처음 記錄되어 있으나, 桔梗과 甘草 두가지 藥物로만 이루어져 있고, 이후 體系的으로 構成된 桔梗湯 處方은 《濟生方》²⁾에 桔梗 貝母 當歸 瓜蒌仁 枳殼 薏苡仁 桑白皮 防己 各 1兩 甘草 杏仁 百合 各 5錢 黃芪 1兩半 生薑 5片으로 構成되어^{3,4)}, 여러 醫家들^{5,6,7,8,9)}에 의해서 肺癰에 臨床的으로 活用되어 왔다.

癌, 즉 腫瘍은 아직도 그 發生原因과 機轉이 밝혀져 있지 않고, 또 그 生物學的 性狀이 複雜하기 때문에 適切한 定義를 내리기는 어렵다. 그러나 一般的으로 定義하자면 腫瘍이란 組織의 自律的인 過剩性 成長이며, 이것은 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 대하여 破壞的인 것을 말한다¹⁰⁾. 韓醫學에서 癌을 治療하는 方法으로 生體의 氣血, 經絡, 臟腑의 生理機能을 增強시켜 抗病能力을 높이는 것을 目標로 하는 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾胃 등의 補益위주의 扶正固本法과 活血化痰, 清熱利濕, 軟緊散結하는 攻邪法이 있고 扶正固本法과 攻邪法을 겸한 扶正祛邪法 등의 3가지로 分類하여 活用하고 있다¹¹⁾. 腫瘍은 일반적으로 正常組織에 대하여 破壞的인 병리조직의 成長을 말하는데, 대표적인 腫瘍抑制 遺傳子로서 p53 腫瘍抑制 遺傳子が 있는데, 이는 細胞增殖(proliferation), 分化(differentiation), DNA 複製와 修復(repair)을 비롯하여 遺傳物質의 安定性을 維持하는 重要한 役割을 하고 있는 것으로 알려져 있다^{12,13)}.

이에 著者는 桔梗湯이 人體 肺細胞에 미치는 效果로 肺細胞에 미치는 影響을 조사하기 위하여 첫째, 桔梗湯이 肺細胞의 細胞分裂에 影響을 주는가의 與否를 處理濃度와 時間에 따라서 flow cytometry를 통하여 分析하였으며 둘째, 損傷된 肺細胞의 活性回復에 미치는 桔梗湯의 效果를 DNA 損傷物質인 etoposide를 處理한 후에 細胞週期の 正常回復時間을 觀察함으로써 分析하였다. 셋째, 이러한 效果가 이에 關聯한 遺傳子들의 發顯의 變化에 의해 일어나는가를 確認하기 위하여 quantitative

RT-PCR을 이용하여 重要 遺傳子들의 mRNA 發顯을 定量的으로 조사하여 研究 檢討한 結果 有意한 成績을 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 人體 肺細胞柱

本 研究를 위하여 使用한 細胞는 正常人的 肺組織에서 분리하여 培養한 正常 人體 肺細胞柱인 T3891이며, 細胞培養은 10%의 fetal bovine serum이 혼합된 Dulbecco's modified Eagle's medium(GIBCO, BRL)을 이용하였으며 5%의 humidified CO₂ 條件이 維持되는 incubator를 이용 37 °C에서 실시하였다.

2) 藥材

藥材는 市中 韓醫院에서 購入하여 精選한 後 使用하였으며, 處方은 慶熙醫院院 韓方病院에서 發行한 韓方基本處方集¹⁴⁾에 記載된 桔梗湯으로 1貼의 內容 및 分量은 다음과 같다.

桔梗湯

韓藥名	生藥名	學 名	分量
桔 梗	Platycodi Radix	Platycodon grandiflorum	4.8g
貝 母	Fritillariae Cirrosae Bulbus	Fritillaria cirrhosa	4.8g
瓜蒌仁	Trichosanthis Fructus	Trichosanthes kirilowii	4.0g
薏苡仁	Coicis Semen	Coix lachryma-jobi var. mayueu	4.0g
當 歸	Angelicae Gigautis Radix	Angelica gigas	4.0g
桑白皮	Mori Cortex	Morus alba L.	2.0g
枳 殼	Aurantii fructus	Citrus aurantium L.	2.0g
黃 芪	Astragali Radix	Astragalus membranaceus	2.0g
防 風	Ledebouriellae Radix	Ledebouriella divaricata	2.0g
杏 仁	Armeniaca Amarum Semen	Prunus armeniaca var. ansu	2.0g
百 合	Lilii Bubus	Lilium lancifolium	2.0g
甘 草	Glycyrrhizae Radix	Glycyrrhiza uralensis	2.0g
生 薑	Zingiberis Rhzoma Recens	Zingibar officinale	10.0g
Total amount			38.6g

3) 檢液의 調製

上記 處方 1貼 分量 38.6g을 5,000ml round flask에 넣고 3,000ml의 精製水를 加하여 冷却器를 附着하고 3時間 加熱煎湯한 다음 濾過紙로 濾過한 濾液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 40°C 減壓乾燥器에서 完全乾燥시켜 桔梗湯엑기스 5g을 얻었고, 精製 및

濾過를 통하여 얻어진 固形成分 5 g을 50 ml 3차 증류수에 녹여 약 120 °C에서 2 時間 가량 끓인 후 冷蔵保管하였다. 細胞에의 處理는 處理前에 藥材 10 ml을 10 ml의 serum-free medium에 섞은 후 37 °C에서 약 3 時間동안 stirring을 통하여 混合하였다. 藥材 處理에 使用한 細胞는 culture flask에서 약 60-70% confluency의 成長을 보이는 약 1×10^6 개의 細胞를 대상으로 하였다.

2. 實驗方法

1) Flow Cytometric Analysis에 의한 Cell Cycle 變化의 測定

細胞는 두차례에 걸쳐 PBS로 洗滌하였으며 4°C의 70% cold ethanol로 약 1時間 동안 고정하였다. 遠心分離를 통하여 ethanol을 除去한 후 propidium iodide (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 RNase(1 mg/ml)가 포함된 1.5 ml의 PBS를 넣고 37°C에서 2時間동안 培養하였다. 遠心分離를 이용하여 PBS를 除去한 후 FACS Caliber Cellquest program(Beckton Dickinson)을 이용 cell cycle의 變化有無를 分析하였다.

2) RNA의 抽出

Total cellular RNA는 guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction method에 따라 抽出하였다¹⁵⁾. 遠心分離를 통하여 회수한 細胞들을 1.0 ml의 5 M GITC 溶液(5 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 5% beta-mercaptoethanol, pH 7.0)과 혼합한 후 50 °C에서 30분간 vortexing 하였다. 1.0 ml의 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 섞은 후 12000 RPM으로 약 20분간 遠心分離한 후, 上層液을 별도의 tube에 옮기고 1.0 ml의 isopropanol alcohol을 혼합한 뒤 -20°C에서 24 時間 보관함으로써 RNA pellet을 침전시켰다. 15000 RPM에서 1時間 遠心分離를 실시하여 pellet을 수거한 후 vacuum dryer를 이용하여 RNA를 건조시켰다. 건조된 RNA는 100 μl 의 증류수에 녹인후 spectrophotometer (Schimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA.)를 이용 그 濃度를 결정하였다.

3) cDNA의 合成

cDNA의 合成은 1 μg 의 RNA(14.5 μl)를 4.5 μl 의 反應溶液(2 μl 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 100 pmoles random hexamer primers, 100 pmoles dNTPs, 10 units MoMuLV 역전사효소)과 混合한 후 23°C에서 15분, 42°C에서 1時間, 95°C에서 5분간 培養함으로써 수행하였다. 合成된 cDNA는 3차 증류수를 이용 1:4로 희석한 후 PCR에 使用하였다¹⁶⁾.

4) Quantitative RT-PCR Analysis에 의한 遺傳子 發顯의 分析

RT-PCR을 이용하여 遺傳子發顯을 조사하기 위하여 使用한 oligonucleotide primer들은 Table I에 정리하였다. RT-PCR products의 specificity를 확인하기 위하여 biotinylated internal oligonucleotides를 probe로 이용하여 chemiluminescent Southern blot analysis를 시행하였다. 遺傳子發顯의 定量分析을 위하여 먼저 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 cycles의 PCR reaction을 실시하여 PCR products의 양이 logarithmic phase에 있는 cycles의 범위를 확인하였다. 이를 통하여 확인한 PCR 條件下에서 2 μl 의 cDNA를 이용 PCR을 수행하였다. 각 cycle은 95°C에서 1분, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분으로 구성하였으며 遺傳子에 따라 24-36 cycles을 수행하였다. 定量을 위한 internal control 遺傳子로서는 GAPDH를 이용하였다. RT-PCR products의 定量的 分析을 위하여 2% agarose를 이용한 전기영동을 통해 확인된 DNA bands에 대한 densitometric scanning을 수행하였으며 GAPDH에 대한 각 遺傳子發顯의 비율(target gene/GAPDH)을 구하여 각 實驗군을 상대적으로 比較하였다^{17,18)}. 위의 quantitative RT-PCR은 3번 反復하였으며 그 평균값을 구하였다.

5) PCR products의 agarose 전기영동 分析

10 μl 의 RT-PCR products는 2% Nusieve (FMC, Rockland, ME), 1% agarose gels을 이용하여 分析되었다. 전기영동은 110 volts에서 1.5 時間동안 수행하였으며 1X TBE

Table I. Sequences of primers used for quantitative RT-PCR

p53	5789	5'-TCTGTCCCTTCCCAGAAAACC-3'	(sense)
	6930	5'-TTGGGCAGTGCTCGCTTAGTGCTCC-3'	(antisense)
CDKN1	SC05	5'-AGCTGGGCGCGGATTCGCCGAG-3'	(sense)
	SC04	5'-AGGCTTCCTGTGAGCGGGCCTTTG-3'	(antisense)
Gadd45	GD1	5'-GTGAGTGAGTGCAGAAAAGCAGGCG-3'	(sense)
	GD3	5'-GAAGTGGATCTGCAGAGCCACATC-3'	(antisense)
Fas	M1	5'-GATGCTTTAAGCGCATGGCG-3'	(sense)
	M2	5'-GTTTAAACAGGGCTCCAATCGGT-3'	(antisense)
Bcl-2	PM12	5'-CTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTG-3'	(sense)
	PM14	5'-TGACTTCACTTGTGGCCAGATAG-3'	(antisense)
Bax	B3	5'-TGGCAGCTGACATGTTTTTC-3'	(sense)
	B4	5'-AGCTGGGGCCTCAGCCCATC-3'	(antisense)
Nm23-H1	PG-61	5'-CGCAGTTCAAAACCTAAGCAGCTGG-3'	(sense)
	PG-64	5'-AGATCCAGTCTGAGCACAGCTCG-3'	(antisense)
Nm3-H2	PG-77	5'-CTCGTGGCCATGAAGTTCCTCCGG-3'	(sense)
	PG-76	5'-AGGAGACTGCTGTTGTGTCCACC	(antisense)
Mdr1	DL20	5'-GTGGTGGGAACCTTTGGCT-3'	(sense)
	DL19	5'-CCAGCACCAATTCCTACTG-3'	(antisense)
PCNA	1	5'-CGCAACCTGGATGGGGCGTGAAC-3'	(sense)
	2	5'-CCATTTCCAAGTTCCTCACTTGCA-3'	(antisense)
c-Fos	1	5'-TTACTACCACTCACCCGAGACTC-3'	(sense)
	2	5'-TGGAGTGTATCAGTCAGTCCCTC-3'	(antisense)
GAPDH	2	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	(sense)
	3	5'-GACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3'	(antisense)

buffer를 使用하였다. Gel은 500 ml의 ethidium bromide 溶液 (0.5 µg/ml of 1 X Tris-borate EDTA, TBE)으로 약 30분 염색 하였고 PCR products는 자외선을 통하여 觀察한 후 Polaroid film을 이용하여 사진으로 제작 보관하였다.

III. 實驗成績

1. 細胞週期에 미치는 影響에 대한 分析

桔梗湯에 細胞週期の 活性 또는 抑制效果를 가지고 있는 지를 調査하기 위해 精製한 桔梗湯의 處理 濃度와 時間에 따른 細胞週期の 變化를 處理하지 않은 對照群과 比較하여 分析하였다. 細胞週期에 대한 分析은 flow cytometry를 利用하였으며 각각의 實驗은 2회 이상 反復하여 그 平均값을 구하였다. 藥材의 處理濃度は 1 µg/ml부터 1.0 mg/ml까지 (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1.0 mg/ml 濃度로 48時間) 다섯 段階로, 處理時間은 6時間부터 72時間까지(1.0 mg/ml 濃度로 6, 12, 24, 48, 72 時間) 다섯 段階로 나누

어 施行하였다. 桔梗湯에 의한 細胞分裂週期の 變化, 즉 細胞週期를 構成하는 G1, S, G2/M phases 構成의 變化는 100 µg/ml 이상의 濃度로 48 時間 이상 處理되었을 경우, G1 phase가 增加되는 것이 觀察되었다(Table II).

Table II. Effect on the cell cycle progression by different concentration of Gilgyung-Tang

	(48 hrs treatment, %)					
	Concentration(µg/ml)					
	control	1	5	10	100	1,000
G1	70.5	71.5	68.2	70.6	89.4	92.1
S	15.2	14.1	15.3	14.8	9.2	5.1
G2/M	14.3	14.4	16.5	14.6	1.4	2.8

G1, G2 : Gap1, Gap2. S : Synthesis. M : Mitosis

1.0 mg/ml 이상의 濃度(2.0, 5.0, 10.0 mg/ml)로 72 時間이상 處理했을 경우 細胞의 成長이 거의 中止되고 細胞死(apoptosis)가 觀察되었다. 100 µg/ml의 濃度에서는 細胞分裂의 抑制效果가 時間에 따라 持續되었으며

약 72 시간이후에는 分裂하는 細胞를 거의 觀察할 수 없었다(Table III).

Table III. Effect on the cell cycle progression by different time of Gilgyung-Tang (1,000 µg/ml treatment, %)

	Incubation Time(min)				
	6	12	24	48	72
G1	69.3	72.5	76.5	89.4	93.0
S	16.4	17.3	11.2	9.2	4.6
G2/M	14.3	10.2	12.3	1.4	2.4

G1, G2 : Gap1, Gap2. S : Synthesis. M : Mitosis

2. 損傷된 細胞의 活性回復에 대한 分析

損傷된 肺細胞의 회복에 桔梗湯이 影響을 미치는 가를 分析하기 위하여 대표적인 DNA damage 誘發物質인 etoposide를 處理하여 DNA 損傷을 誘導한 후 桔梗湯에 의한 損傷회복의 促進與否를 桔梗湯을 處理하지 않은 對照群과 比較 分析 하였다. 本 實驗에서는 50 µ moles/ml의 etoposide를 12時間 處理하여 DNA 損傷을 유발하였으며 G1 phase에서의 細胞分裂中斷 후 즉, DNA repair 후 다시 正常細胞分裂 週期로 회복되는데까지 소요되는 時間을 分析함으로써 桔梗湯이 損傷된 DNA의 repair를 促進하는 機能을 가지고 있는지의 與否를 조사하였다. 桔梗湯은 이미 위의 實驗을 통하여 細胞週期에 影響을 미치는 濃度로 밝혀진 100 µg/ml를 택하였으며(Table I), etoposide를 除去하고 PBS로 細胞를 洗滌한 즉시 投與하였다. 桔梗湯을 處理하지 않은 對照群의 細胞는 같은 PBS로 洗滌한 후 같은 條件하에서 계속 培養하였다. 桔梗湯의 處理 후 48 時間대에 일부의 細胞는 회수하여 tryphan blue 염색에 의한 apoptosis의 정도를 定量하였으며 일부는 flow cytometry를 이용하여 細胞週期の 회복 정도를 分析하였다(Table IV).

Table IV. Effect of Gilgyung-Tang on the apoptosis and recovery rate of biological viability of the DNA-damaged pulmonary cells

		Control I	Control II	GGT
		(-eto/-GGT)	(+eto/-GGT)	(+eto/+GGT)
Exam.1	Apoptosis	116/2000 (5.8%)	292/2000 (14.6%)	496/2000 (24.8%)
	G1	71.8%	94.2%	78.1%
Exam.2	Apoptosis	122/2000 (6.1%)	322/2000 (16.1%)	543/2000 (27.2%)
	G1	69.4%	93.9%	75.7%

eto : etoposide (50 µ moles/ml, 12 hrs)
Control I : Untreated group
Control II : Etoposide treated group
GGT : Etoposide/Gilgyung-Tang treated group
G1: Gap1

3. 遺傳子發顯에 미치는 影響에 관한 分析
위의 實驗 結果가 桔梗湯에 의한 遺傳子發顯의 調節에 의하여 일어나는지의 與否를 分析하기 위하여 細胞週期の 調節, apoptosis, 및 細胞活性의 調節과 關聯되는 機能을 가진 대표적인 遺傳子인 p53(腫瘍抑制 遺傳子), CDKN1(細胞週期調節 遺傳子), Gadd45 (DNA repair 遺傳子), NM23-H1, H2(腫瘍轉移抑制 遺傳子)를 비롯하여 Bcl-2, Bax 등의 apoptosis 調節遺傳子, c-Fos, PCNA 등의 細胞週期 調節遺傳子 등의 mRNA 發顯에 대한 定量적 分析을 시도하였다. 定量分析은 quantitative RT-PCR과 desitometric scan을 이용하여 동 일한 實驗을 3회 反復하여 그 평균값을 구하였다(Table V).

Table V. Quantitative RT-PCR analysis for the effect of Gilgyung-Tang(100 µg/ml) on gene expressions (target gene/GAPDH)

	c-Fos	PCNA	p53	CDKN1	Gadd45	Bcl-2	Bax	Fas
Control	0.73	0.69	0.34	0.32	0.43	0.78	0.33	0.35
12 h	0.56	0.55	0.59	0.69	0.78	0.75	0.31	0.39
GGT 24 h	0.51	0.50	0.73	0.68	0.75	0.69	0.37	0.26
48 h	0.31	0.22	0.71	0.74	0.67	0.14	0.71	0.30

Control : Untreated group,
GGT : Gilgyung-Tang treated group

1) 桔梗湯에 의한 細胞分裂 促進遺傳子 發顯의 減少

桔梗湯이 細胞分裂의 調節에 관여하는 遺傳子들의 發顯에 影響을 미치는 지의 與否를

조사하기 위하여 細胞週기를 誘導하는 機能을 가진 遺傳子인 c-Fos와 細胞週기의 促進과 함께 그 發顯이 增加하는 細胞分裂의 표식자인 PCNA 遺傳子の 發顯量을 조사하였다. 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 桔梗湯을 12, 24, 48 時間 投與한 후, RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 quantitative RT-PCR을 시행한 結果, Fig. 1에서 나타나는 바와 같이 投與 時間에 비례하는 顯著한 c-Fos 및 PCNA mRNA 發顯의 減少가 觀察되었다. 이러한 減少는 處理 12 時間후에 觀察되기 시작하여 48 時間 후에는 c-Fos의 경우 對照群의 약 42.5%, PCNA의 경우 對照群의 약 31.9%에 미치는 發顯의 減少를 나타냈다(Table V).

2) 桔梗湯에 의한 腫瘍 抑制遺傳子 發顯의 增加

本 研究에서는 腫瘍細胞의 發生 또는 進行을 차단하는 機能을 하고 있는 p53 遺傳子 및 p53에 의하여 그 發顯이 增加하는 두 p53 pathway 關聯 遺傳子인 CDKN1과 Gadd45의 發顯을 조사하였다. Fig. 2에서 나타나는 바와 같이 이들 遺傳子들의 發顯이 桔梗湯의 處理에 의하여 顯著하게 促進됨이 發見되었다. 이들 遺傳子들의 發顯은 處理 12 時間 후 對照群에 비하여 거의 두배 가까운 增加(p53, 174%; CDKN1, 216%; Gadd45, 181%)를 보이고 있으며 處理 후 48 時間까지 지속적으로 높은 發顯量이 觀察되었다. 腫瘍轉移 抑制遺傳子인 Nm23-H1과 H2 遺傳子, 약제에 대한 細胞의 抵抗性を 높이는데 關여하여 특히 抗癌劑에 대한 抵抗性を 誘導하는데 直接的으로 作用하는 Mdr1 遺傳子の 變化는 觀察되지 않았다.

3) Apoptosis 促進遺傳子 發顯의 增加

위의 實驗結果들은 桔梗湯이 apoptosis의 誘發機能이 있음이 시사하고 있는데, 대표적인 apoptosis 抑制 遺傳子인 Bcl-2, apoptosis 促進 遺傳子인 Bax 및 Fas의 mRNA 發顯에 대한 分析을 시도하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 桔梗湯 處理 25時間까지는 變化가 觀察되지 않았으나 약 48 時間 후에 對照群에 비하여 顯著한 Bcl-2의 減少(對照群 대비

17.9%)와 Bax의 增加(對照群 대비 215%)가 發見되었다(Table V). Fas의 發顯은 變化가 觀察되지 않았다.

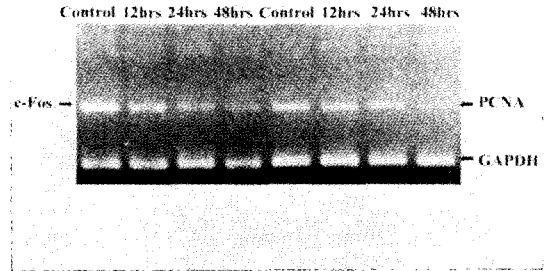


Fig. 1. Quantitative RT-PCR Analysis of PCNA and c-FOS mRNA Expression

100 $\mu\text{g/ml}$ of Gilgyung-Tang was treated to the human pulmonary cell T3891 for 12, 24 and 48 hours and the PCNA and c-FOS expression levels in untreated group were compared with these in Gilgyung-Tang treated group.

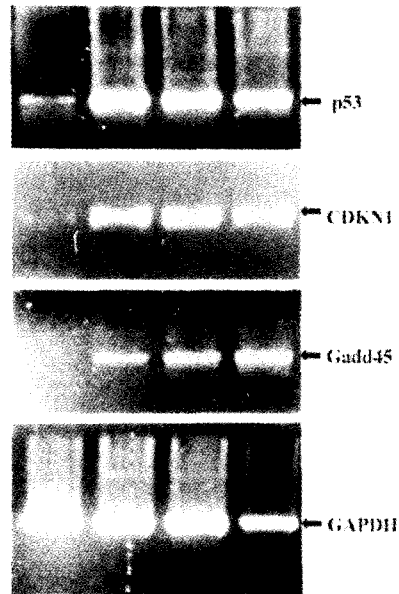


Fig. 2. Quantitative RT-PCR Analysis of p53, CDKN1 and Gadd45 mRNA Expression

100 $\mu\text{g/ml}$ of Gilgyung-Tang was treated to the human pulmonary cell T3891 for 12, 24 and 48 hours and the p53, CDKN1 and Gadd45 expression levels in untreated group

were compared with these in Gilgyung-Tang treated group.

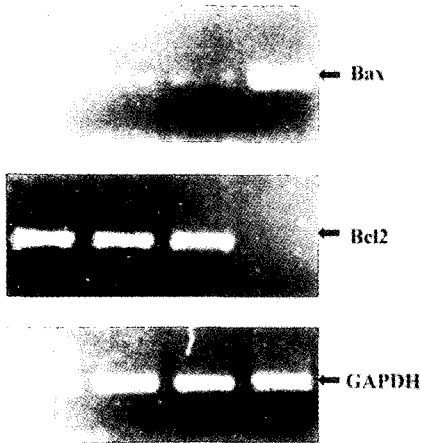


Fig. 3. Quantitative RT-PCR Analysis of Bax and Bcl2 mRNA Expression

100 µg/ml of Gilgyung-Tang was treated to the human pulmonary cell T3891 for 12, 24 and 48 hours and the Bax and Bcl2 expression levels in untreated group were compared with these in Gilgyung-Tang treated group.

IV. 考 察

桔梗湯은 《傷寒論》¹⁾에 咽痛을 治療하는 處方名으로 처음 등장하고^{3,4)}, 《備急千金要方》⁸⁾ 및 《金匱要略》¹⁾에는 肺癰을 치료하는 方劑로 설명되고 있는데, 이들 原典에는 桔梗과 甘草 두가지 藥物로만 이루어져 있다. 이후 體系的으로 構成된 桔梗湯 處方은 《濟生方》²⁾에 처음 등장하는데^{3,4)}, 桔梗 貝母 當歸 瓜蒌仁 枳殼 薏苡仁 桑白皮 防己 各 1兩 甘草 杏仁 百合 各 5錢 黃芪 1兩半 生薑 5片으로 加味되어 肺癰과 관련된 心胸氣壅, 咳嗽膿血, 心神煩悶, 咽乾多渴, 兩脚腫滿, 小便赤黃, 大便多澁등을 治療하고, 《丹溪心法》⁹⁾에는 桔梗 貝母 當歸 瓜蒌仁 枳殼 薏苡仁 桑白皮 防己 各 2兩 黃芪 1兩半 甘草 杏仁 百合 半兩으로 構成되었고, 《醫學正傳》⁶⁾에는 桔梗 貝母 各1錢 當歸 瓜蒌仁 薏苡仁 各 8分 枳殼 桑白皮 防己 黃芪 各 5分 杏仁 百合 甘草 各 3分 生薑 5片으로 변경되어, 咳嗽膿血하고 咽

喉多渴하며 大小便 赤澁하는 肺癰을 治療한다고 하였다. 《醫學入門》⁷⁾에서는 肺癰으로 인하여 脈數而虛하고 口燥咽乾, 胸中隱痛, 二便赤澁, 咳唾膿血腥臭, 바로 膿血을 물에 담가 놓으면 가라앉는다고 하고 桔梗湯으로 治療한다고 했다. 《東醫寶鑑》⁵⁾에서는 《醫學正傳》⁶⁾의 處方을 引用하여 說明하였다.

本 實驗에 使用된 桔梗湯은 慶熙大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院 肺系內科에서 肺癰, 氣痛, 肺膿瘍, 肺癰疽에 應用되고 있는 處方¹⁴⁾으로 構成藥物을 살펴보면, 桔梗 貝母 各 4.8g 瓜蒌仁 薏苡仁 當歸 各 4g 桑白皮 枳殼 黃芪 防風 杏仁 百合 甘草 各 2.0g 生薑 10.0g으로 既存處方과 構成藥物의 차이는 防己가 防風으로 變更되었고, 用量이 調節되었다.

韓醫學에서 《內經 素問·刺法論》¹⁹⁾에 “正氣內存 邪不可干”, 《內經 素問·評熱病論》^{19,20)}에 “邪之所湊 其氣必虛”라 한 바와 같이 대부분 疾患의 發生을 正氣의 不足으로 야기된다고 보았으며, 단지 邪氣는 人體를 治病케 하는 廣範圍한 外部刺戟의 病邪를 말한다²¹⁾.

疾病의 發生은 이러한 正氣不足과 邪氣侵入으로 因하여 痰結, 濕聚, 氣阻, 血瘀, 鬱熱 등의 病理的 產物을 만들어내며 이들은 癌과 類似한 病症을 原因으로 作用하는 것으로 보고있다^{22,23,24)}.

人間에 發生하는 대부분의 癌은 多段階로 發生(multistep genesis)하며 각 段階에서 體細胞 變化는 特定 遺傳子 또는 遺傳子들의 이상(aberration)에 의하여 일어나는 現狀으로 認識되고 있으며 이러한 發癌科程에서의 遺傳子の 變移는 癌遺傳子(oncogene)의 活性化와 腫瘍抑制 遺傳子(tumor suppressor gene)의 非活性化로 크게 구분된다. 그런데 腫瘍抑制 遺傳子の 非活性化는 遺傳子の 缺損(deletion)이나 變移(mutation)등의 原因으로 發生됨이 밝혀졌다^{25,26,27,28)}.

p53은 여러 遺傳子の 傳寫(transcription)에 대한 調節能力, 즉 transactivating 機能을 지니고 있는 대표적인 腫瘍抑制 遺傳子로서 이

에 의하여 細胞의 增殖, 分化, DNA 複製와 修復(repair) 등을 비롯하여 遺傳物質의 安定性を 維持하는 등의 重要な 役割을 가지고 있다^{12,13}. p53은 細胞週기를 抑制하는 CDKN1, DNA 修復을 促進하는 Gadd45 遺傳子의 promoter 부위에 binding하여 이들 遺傳子의 傳寫를 誘導하며 또한 transcription factor인 TATA-binding protein 또는 Spl 등과 結合하거나 p53-dependent negative response element로 알려진 特定 DNA 부위에 직접 結合하여 interleukin-6 (IL-6), Mdr1 및 Bcl-2 遺傳子의 發顯을 抑制하는 機能이 있음이 잘 알려져 있다^{31,32,33,34,35,36}. 正常的인 p53은 특히 DNA 損傷을 야기하는 物質에 반응하여 그 發顯이 增加하며, 이러한 p53의 增加는 細胞週기의 抑制(G1 cell cycle arrest)와 이에 따른 損傷 DNA의 修復, 또는 過度한 損傷을 받은 細胞에 대한 死滅(apoptosis)로 이어져, 損傷된 DNA가 다음의 細胞分裂을 통해 전달되어 非正常的인 腫瘍細胞가 出現하는 것을 막아주는 機能을 하고 있다^{37,38}. p53에 의한 이러한 細胞分裂의 抑制는 細胞分裂을 促進하는 遺傳子인 c-Fos, PCNA 및 c-Myc 등의 發顯抑制를 수반하며 이들 遺傳子의 發顯 역시 p53에 의하여 抑制됨이 報告된 바 있다^{39,40}.

本 研究에서는 桔梗湯이 人體 肺細胞에 미치는 影響을 細胞週기變化, 損傷細胞의 回復 및 死滅, 이에 수반하는 關聯 遺傳子의 發顯의 觀點에서 조사하였다. 이를 위하여 이러한 細胞機能에 重要な 機能을 하고 있는 p53과 이와 關聯된 重要遺傳子를 중심으로 實驗을 進行하였다. 本 研究者는 먼저 細胞分裂週기에 미치는 桔梗湯의 效果를 分析하기 위하여 flow cytometry를 이용 細胞分裂週기의 變化를 추적하였다. 桔梗湯 處理濃度 또는 處理時間의 增加에 따른 細胞週기의 變化는 100 μ g/ml 이상의 濃度로 48 時間 이상 處理되었을 경우 觀察되기 시작하였으며 약 72 時間 이후에는 分裂하는 細胞를 거의 觀察할 수 없었다. 1.0 mg/ml 이상의 濃度로 72 時間 이상 處理했을 경우 細胞의 成長이 거의 中止되고 細胞死 (apoptosis)가 觀察되었다. 이리

한 觀察은 桔梗湯이 人體 正常 肺細胞의 分裂을 抑制하는 機能을 가지고 있으며 이러한 細胞分裂의 抑制는 apoptosis를 誘導와 關聯이 있음을 시사하고 있다. 이러한 細胞分裂의 抑制는 細胞週기를 誘導하는 機能을 가진 遺傳子인 c-Fos와 細胞週기의 促進과 함께 그 發顯이 增加하는 것으로 알려진 PCNA 發顯의 減少를 동반함이 觀察되었다. 桔梗湯 處理 12 時間 후부터 觀察된 細胞週기 促進遺傳子 發顯의 減少는 flow cytometry에 의해 處理 48 時間에 이르러 觀察되었던 細胞週기의 抑制가 桔梗湯의 處理 初期부터 細胞內部的 遺傳子 發顯의 調節을 거쳐 進行되어져 왔음을 시사하는 結果라 思料된다.

또한 本 研究에서는 細胞分裂의 抑制, 損傷된 DNA의 修復 및 損傷細胞의 死滅을 통하여 腫瘍細胞의 發生 또는 進行을 차단하는 機能을 하고 있는 p53 및 p53에 의하여 그 發顯이 增加하는 CDKN1과 Gadd45의 發顯을 조사하였다. 이들 遺傳子들의 發顯이 桔梗湯에 의하여 顯著하게 促進됨이 發見되었으며 이러한 事實은 桔梗湯이 抗癌效果를 지니고 있음을 강력하게 시사하는 것으로서 損傷된 細胞의 細胞分裂을 抑制함은 물론 過度한 遺傳物質의 損傷으로 야기될 수 있는 腫瘍細胞의 出現을 apoptosis를 통하여 除祛할 수 있는 分子的 環境을 조성하는 데 기여하고 있음을 推論케 하고 있다. 本 實驗을 통하여 觀察된 桔梗湯에 의한 人體 肺細胞의 apoptosis 誘導現狀은 桔梗湯이 Bcl-2와 Bax 遺傳子의 mRNA 發顯을 處理初期부터 直接的으로 調節하여 이에 의하여 apoptosis가 誘導된다기 보다는 이미 細胞內에서 다른 遺傳子의 變化에 촉발된 apoptosis의 과정에서 Bcl-2와 Bax 遺傳子의 變化가 야기된 것으로 判斷되며 이는 transcription factor로 作用하는 p53의 增加가 Bcl-2의 發顯을 抑制하고 Bax의 發顯을 增加시킨다는 기존의 研究 報告에 의하여 뒷받침되고 있다^{32,33,34,35,36}. 특히 本 實驗에서 觀察된 바와 같이 處理 12 時間 이후 p53의 增加가 우선적으로 觀察되고 약 36 時間 후에 Bcl-2와 Bax의 變化가 뒤따른다는

事實이 위의 推論을 뒷받침하고 있다.

結論의으로 본 研究를 통하여 桔梗湯이 人體 肺細胞의 細胞分裂週期를 抑制하는 機能을 가지고 있으며 이러한 機能은 특히 肺細胞가 損傷을 입어 正常的인 機能을 수행할 수 없는 상황이 야기될 경우 이들 損傷細胞의 빠른 회복을 促進하는데 기여하는 것으로 判斷된다. 이와 더불어 桔梗湯이 보이는 apoptosis 促進效果는 過度하게 損傷된 細胞의 死滅을 誘導함으로써 非正常的인 細胞의 殘留 및 增殖으로 인해 야기될 수 있는 疾病을 出現을 抑制하는데 重要的 役割을 하리라 추측되고 있다. 보다 廣範圍하고 體系的인 앞으로의 研究를 통해 위에서 觀察된 桔梗湯의 分子生物學的 機能이 桔梗湯의 실질적인 臨床的 效果와 어떠한 相關性을 지니고 있는지에 대하여 分析해 보아야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

桔梗湯이 人體 肺細胞에 미치는 影響을 分子遺傳子的으로 分析하기 위하여 細胞週期變化, 損傷細胞의 回復 및 細胞死, 이에 관련된 遺傳子의 發顯의 變化를 調査 研究한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 正常 肺細胞의 細胞分裂週期에서 桔梗湯의 細胞週期の 活性과 抑制效果가 認定되었다(100 µg/ml 이상, 48hrs).
2. 桔梗湯은 損傷된 肺細胞의 死滅에 의한 細胞死를 誘發하는 반면, 正常的인 細胞分裂週期 回復促進效果가 觀察되어 損傷細胞活性의 回復能力이 認定되었다.
3. 桔梗湯에 의한 細胞分裂 促進遺傳子인 c-Fos 및 PCNA 遺傳子의 發顯 減少가 認定되었다.
4. 桔梗湯에 의한 腫瘍 抑制遺傳子인 p53 遺傳子, CDKN1과 Gadd45 遺傳子의 發顯의 增加가 認定되었다.
5. 桔梗湯에 의한 自己細胞計劃死 抑制遺傳子인 Bcl-2 遺傳子 發顯의 減少 및 促進遺傳子인 Bax 遺傳子 發顯의 增加가 認定되었다.

參考文獻

1. 張仲景, 仲景全書, 서울 : 大星文化社, 268, 376, 1989.
2. 嚴用和 編, 欽定四庫全書 子部 醫家類(11) 濟生方 卷八 : 大星文化社, 743-520, 1995.
3. 江克明, 包明惠, 簡明方劑辭典, : 上海科學技術出版社, 872, 1989.
4. 中醫研究院 廣州中醫學院, 簡明方劑辭典 : 三聯書店香港分店, 689, 1979.
5. 許浚, 東醫寶鑑, 서울 : 南山堂, 544, 1989.
6. 虞博, 醫學正傳, 서울 : 成輔社, 307, 1986.
7. 李挺, 醫學入門, 서울 : 高麗醫學, 465, 1989.
8. 孫思邈, 備急千金要方, 서울 : 大星文化社, 315, 1989.
9. 朱震亨, 丹溪心法附餘, 서울 : 大星文化社, 247, 1989.
10. 서울대학교 의과대학, 腫瘍學, 서울 : 서울대학교 출판부, 1-2, 1982.
11. 최승훈 : 韓醫學의 腫瘍에 대한 認識과 病理論, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1) : 11-28, 1995.
12. Levine, A. J. : The p53 tumor suppressor gene and product. Cancer Surveys, 12: 59-79, 1992.
13. Lane, D. P. : 53, guardian of the genome. Nature (Lond.), 358: 15-6, 1992.
14. 慶熙大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院, 慶熙韓方處方集, 서울 : 트윈기획, 46, 1997.
15. Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., 162: 156-9, 1987.
16. Saunders, K. A., Madwell, B. R., Oreffo, V. I. C., Kraegel, S. A., and Gumerlock, P. H. : Nucleotide sequence of canine c-N-ras: Codons 1 to 71. Am. J. Vet. Res., 53: 600-3, 1992.
17. Fishman, James R., P. H. Gumerlock, F. J. Meyers, amd R. W. deVere White. : Quantitation of NM23 expression in human prostate tissue. J. Urology., (submitted, revised), 1992.
18. Meyers, F.J., P.H. Gumerlock, E.S. Kawasaki, A.M. Wang, R.W. deVere White, and H.A. Erlich. : Bladder cancer,

- Human leukocyte antigen II, interleukin-6, and interleukin-6 receptor expression determined by the polymerase chain reaction. *Cancer*, 67: 2087-95, 1991.
19. 洪元植 編, 精校黃帝內經素問, 서울 : 東洋醫學研究院, 124, 285, 1985.
 20. 이경우 譯, 編注譯解黃帝內經素問(2), 서울 : 여강출판사, 296-305, 1995.
 21. 안덕균 譯, 免疫과 韓方, 서울 : 도서출판 열린책들, 1-13, 1994.
 22. 申天浩 譯, 癌瘤防治研究, 서울 : 成輔社, 25-9, 1984.
 23. 易雙勤, 何旺華. 癌症的早期信號與家庭防治, 北京 : 人民軍醫出版社, 1-29, 1992.
 24. 賀國輝, 惡性腫瘤的診斷與治療, 南昌 : 江西科學技術出版社, 5-11, 1992.
 25. Bishop. J. M. : The molecular genetics of cancer. *Science*, 235:305, 1987.
 26. Fearon E. R., Vogelstain B. : A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759, 1990.
 27. Knudson, A. G. Jr. : Hereditary cancer, oncogene, antioncogenes. *Cancer Res.*, 45:1437, 1985.
 28. Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A. : The p53 tumor suppressor gene, *Nature*, 351:453, 1991.
 31. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. : Mdm-2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO*, 12: 461-8, 1993.
 32. Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M., and Oren, M. : Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9979-83, 1991.
 33. Mack, D. H., Vartikar, J., Pipas, J. M., and Laimins, L. A. : Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature(Lond.)*, 363: 281-3, 1993.
 34. Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J., and Shenk, T. : Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 12028-32, 1992.
 35. Borellini, F. and Glazer, R. I. : Induction of Sp1-p53 binding heterocomplexes during granulocyte macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *J. Biol. Chem.*, 268: 7923-8, 1993.
 36. Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J. C. : Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.*, 54: pp.3131-3135, 1994.
 37. Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., kimchi, A., and Oren, M. : Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature (Lond.)*, 352 : 345-7, 1991.
 38. Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., and Fornace, A. J., Jr. : A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and Gadd45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71: 587-97, 1992.
 39. Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J. W., and Ullrich, S. J. : Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6166-70, 1990.
 40. Mercer, W. E., Shields, M. T., Lin, D., Appella, E., and Ullrich, S. J. : Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1958-62, 1991.