

원저

五加皮의 항암효과에 관한 연구

이장훈, 김영철, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Study on the Anti-Cancer Effect of Acanthopanax Sessiliflorus

Jang-Hoon Lee, Young-Chul Kim, and Hong-Jung Woo

Department of Liver Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Kyunghee University, Seoul, Korea

Objectives: Hepatoma is a very serious disease in Korea and worldwide. Hepatitis B virus (HBV) has proved the most significant cause of hepatoma. We carried out this study to investigate the effect of Acanthopanax sessiliflorus on inhibiting cell proliferation and DNA synthesis in HepG2.2.15 cell line and on inhibiting phosphorylation of oncogene (MAP kinase) in NIT/3T3-HBx cell.

Methods: To investigate the anti-cancer effect of Acanthopanax sessiliflorus, we did the CellTiter 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation assay (Promega); MTS/PMS assay, [³H]-thymidine incorporation assay, and we measured the gene expression through western blotting.

Results: Acanthopanax sessiliflorus showed

an inhibiting effect on the increase of HepG2.2.15 in the MTS/PMS assay. It also showed an inhibiting effect on DNA synthesis of HepG2.2.15 in the [³H]-thymidine incorporation assay. Acanthopanax sessiliflorus showed an inhibiting effect of phosphorylation of MAP kinase in HBV-X genes, too.

Conclusions: The results suggested that this herb had an anti-cancer effect. We may discover an effective anti-cancer herb medicine through further studies on this herb medicine.

Key words: hepatoma, Acanthopanax sessiliflorus, oncogene, phosphorylation, HBV-X gene

- 접수 : 1999년 10월 19일
- 채택 : 2000년 1월 25일
- 교신저자 : 이장훈, T. 02-958-9115

이 논문은 한국한의학연구원에서 시행한 한방치료기술연구개발사업에 의해 연구되었음.

I. 서 론

우리나라에서는 남성에 있어서 40대부터 50대에 만성간질환으로 인한 사망이 전체 사망원인 중에서 1위를 차지하고 있으며, 특히 간암으로 인한 사망은 인구 10만명당 남자 32.2명 여자 10.0명으로 세계보건통계연감에 발표된 나라 중 1위를 차지하고 있다¹⁾. 전세계적으로는 간암으로 인한 사망자가 매년 1250000명 정도인 것으로 추정되고 있어서, 성인남자의 주요 사망원인 중의 하나이다. 역학적으로 살펴볼 때, 간암은 간염바이러스의 이환율이 높은 아프리카와 동남아시아에서 흔한 것으로 알려져 있으며 서양권에서도 증가되는 추세에 있어서²⁾ 이의 치료에 대한 세계적인 관심이 날로 증가하고 있는 실정이다.

이러한 간암에 대한 韓醫學적인 기록은 丙經에서부터 있어왔다. 그 가운데서도 黃疸, 積聚, 脹滿 등의 證候에서 유사한 증후가 기록되어 있으며, 病因病理 및 治療에 대한 많은 기록들이 있어왔다³⁾. 현대적인 의미에 있어서 간암의 발생과 밀접한 관련이 있다고 인정되고 있는 바이러스성 간질환의 病理轉變에도 韓醫學的 治療는 효과적임이 보고되어 왔고, 한의학 임상에서도 만성간질환의 치료에 활발하게 응용되고 있다.

五加皮는 抗癌中草藥大辭典에서 化痰祛濕, 養腎益精, 壯筋骨, 活血祛瘀하는 효과를 가지고 있어서 위장계통의 암에 적용할 수 있는 것으로 기록하고 있다⁴⁾. 또한 水腫이나 乏尿에 쓰인다고 하였는데, 간장병의 치료에 利水滲濕하는 약제들이 주로 선택되고 있는 상황을 고려할 때, 이러한 개념은 현대적인 입장에서 복강내 암종의 치료에 적용해 볼 수 있는 것이다. 그러나 현재까지 五加皮에 대한 항암효과의 연구는 국내에서 거의 보고된 것이 없는 실정이다

본 실험에 사용한 HepG2.2.15 cell line은 HepG2 세포에 HBV가 integration 되어있는 세포로 HBV의 증식과정이 바이러스 자체의 증합효소로 일어나며 유전자의 발현 역시 실제 간암에서와 유사하게 일어나기 때문에

HBV-X gene의 암발생에 대한 연구에도 활용되고 있으며, NIH/3T3 fibroblast는 분화되기 이전의 정상 섬유모세포로서 분열과 증식에 관한 성질을 나타내기 때문에 발암유전자의 연구에 흔히 사용되는 세포주이다. 본 실험에서는 이 두 가지 세포주에 오가피를 처리하여 이 약제가 가지는 항암효과를 검증하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 오가피(Acanthopanax sessiliflorus)는 경희의료원 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였다.

2) cell line

HepG2.2.15은, HepG2 세포에 HBV가 integration되어 있는 세포로 HBV의 증식과정이 바이러스 자체의 증합효소로 일어나며 유전자의 발현 역시 실제 간암과 매우 유사하게 일어나기 때문에 HBV X gene의 암발생에 대한 본 과제에 매우 적합한 세포주라고 생각되어 선별검사에 활용하였다.

NIH/3T3 fibroblast는 분화(differentiation)되기 이전의 정상 섬유모세포로, 분화에 의한 여러 형질에 관련 없이 분열과 증식에 관한 성질을 나타내기 때문에 oncogene의 연구에 흔히 사용되는 세포주이다. 따라서 본 연구에서는 이 세포주에, 목암연구소의 윤영대 박사에게서 수여받은 pcDNA-X를 transfection 시킨 NIH/3T3-HBx 세포주를 사용하였다⁵⁾.

2. 방법

1) 약제준비

가. 약제의 추출 : 오가피 30g을 Round Flask에 넣고, 냉각기를 부착한 상태에서 증류수 300ml을 가하여 100℃에서 2시간씩 2회 환류추출한 후 먼으로 여과하여 여액을 80℃ 물중탕에서 감압농축하였다.

나. 동결건조 : 냉동 tray에 전탕액을 담고 -40℃에서 3시간동안 급속냉동시킨 후 가열판온도 40℃이하 진공도 0.4mmHg에서 72시

간동안 동결건조시킨다(동결건조기 : Christ LDC-A, Alpha 1/4, Germany).

다. 시료의 세포처리 : 얻어진 건조분말 시료(수득율 : 5.63%)를 50mg/ml의 농도로 80°C에서 2시간 동안 증류수에 넣은 후 ultrasonication을 시행하였다. 잡질을 제거하기 위하여 40,000rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 이것을 0.2 μ m syringe filter로 여과하여 10% FBS MEM 배지에 적정농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 약물의 항암효능 검사

가. CellTiter 96 AQueous Non-radioactive Cell Proliferation assay(Promega)

- MTS/PMS assay

(1) HepG2.2.15 세포들을 96 well plate에 well 당 10⁴개씩 분주한다.

(2) 세포가 바닥에 붙어 정상적으로 성장하기 시작할 때, 약재를 주어진 농도대로 48시간 처리한다.

(3) 2ml의 MTS 용액과 100 μ l의 PMS 용액을 섞어 well 당 20 μ l씩 넣어준다.

(4) 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 동안 incubator에서 반응시킨 후, 470nm 파장의 ELISA reader로 O.D.를 측정한다.

나. [³H]-thymidine incorporation assay

(1) 세포를 24well plate에 10⁵개 씩 분주한다.

(2) 약재를 48시간 동안 처리한 후, [³H]-thymidine을 10uCi되게 각 well에 가해준다.

(3) 16시간 반응시킨후 배지를 걸어내고 PBS로 2번 씻어준다.

(4) 0.5N NaOH 0.5ml에 세포를 녹인다.

(5) scintillation cocktail 5ml에 넣어 β -counter로 측정한다.

다. Western blotting을 통한 유전자 발현도 측정

(1) 세포에서 단백질 추출

찬 PBS로 세포를 두 번 씻어내고 RIPA buffer(50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1% deoxycholate, 1mM phenylmethylsulfonyl

fluoride, 1% Protease inhibitor cocktail (sigma))를 가하여 세포를 녹인다. 녹인 세포를 12000 xg에서 15분동안 원심분리하여 상등액을 취해 spectrophotometer로 정량한다.

(2) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

(가) 1.9ml 증류수, 1.7ml 30% Acrylamide solution, 1.3ml 1.5M Tris-HCl(pH 8.8), 50 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% Ammonium persulfate, 2 μ l TEMED를 섞어 10% separating gel을 만든다.

(나) 1.4ml 증류수, 0.33ml 30% Acrylamide solution, 0.25ml 1M Tris-HCl(pH 6.8), 20 μ l 10% SDS, 20 μ l 10% Ammonium persulfate, 2 μ l TEMED를 섞어 5% stacking gel을 만든다.

(다) 5X protein sample loading buffer(0.6ml 1M Tris-HCl(pH 6.8), 5ml 50% glycerol, 2ml 10% SDS, 0.5ml β -mercaptoethanol, 1ml 1% bromophenolblue, 0.9ml D.W)와 protein sample을 섞어 gel에 단백질 10 μ g loadong한다.

(라) 60V로 30분간 running한 후, 100V로 45분간 running한다.

(3) Transfer to nitrocellulose membrane

전기영동이 끝난 후 젤 상의 단백질을 transfer buffer (20mM Tris-HCl pH8.3, 150mM glycine, 20% methanol)에서 170mA, 1시간 동안 nitrocellulose membrane으로 이동시킨다.

(4) Immunoblotting

(가) Nitrocellulose membrane을 blocking solution(10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween-20) 하에서 1시간 동안 흔들면서 block한다.

(나) Membrane에 각각의 antibody를 포함한 TBST(10mM Tris-Hcl pH7.5, 0.9%NaCl, 0.05% Tween-20)중에 상온에서 1시간 동안 반응시킨다. c-myc의 antibody는 calbiochem사의 제품을, pERK, ERK의 antibody는 Santa Cruz사의 제품을 사용하였다.

(다) TBST로 5분씩 3회 세척하고 Horseradish peroxidase-conjugate secondary

antibody(Amersham)를 포함한 TBST에 1시간 동안 담가둔다.

(라) TBST로 5분씩 3회 세척한 후 detection solution을 가하고 X-ray film을 감광시킨다.

3) Statistical analysis

통계처리는 microsoft사의 EXCEL program을 사용하였으며, 각 군간의 비교는 처리군에 따른 차이를 확인하기 위하여 일원배치분산분석을 사용하고, DNA 합성도와 약재의 농도간의 선형관계가 추정되어 이후 회귀분석을 실시하였다.

III. 결 과

1. HepG2.2.15 cell의 Hepatitis B Virus producing ability 확인

HepG2.2.15 cell이 배양 중에 10% FBS RPMI1640 배지내에 정상적으로 HBV particle을 방출하는지 확인하기 위해 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 거두어 PCR을 위한 template로 사용하였다. PCR을 시행하고 1% Agarose gel에 loading하여 transilluminator로 확인한 결과, HBsAg(+), HBeAg(+), HBeAg(+), HBeAg(+)인 환자혈청을 양성 대조군으로 사용한 것과 같은 위치에서 PCR band가 나타나는 것이 확인되었고, 이것으로 HepG2.2.15 cell이 배양 중에 정상적으로 HBV particle을 방출하는 것이 인정되었다(Fig. 1.).

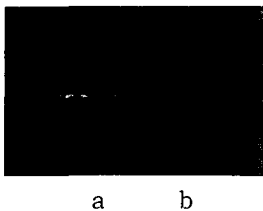


Fig. 1. Bands of PCR products

a: HBV positive serum, b: Media of HepG2.2.15 cell

2. 세포 증식도 측정

HBV X 유전자의 간암 발생에 한약재가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 시료를 500

$\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리한 다음, 방사성 동위원소를 측정하지 않고 세포 증식도를 측정할 수 있는 MTS-PMS assay를 시행하였다.

MTS/PMS assay에서 측정된 formazan product의 흡광도(OD) 값은 세포 증식도와 비례하므로 OD 값의 감소는 세포증식의 저하를 의미하는 결과로 볼 수 있으며, 이는 이후 과정의 예비실험적인 성격도 가지는 것이다. Table 1. 에서 보는 바와 같이 오가피를 투여한 HepG2.2.15 cell line의 세포증식정도는 농도에 비례하여 유의성있게 감소됨을 알 수 있었다($p < 0.001$). Fig. 2에서 나타나는 바와 같이 농도에 비례하여 지수함수적으로도 감소함을 알 수 있다.

Table 1. MTS/PMS Assay of Cell Proliferation Treated with Acanthopanax Sessiliflorus(YGP)

Herb	Concentration (ug/ml)	No. of group	Mean O.D.	Standard Deviation	Standard Error	P value
	CONTROL	3	1.9213	0.0798	0.0461	
YGP	500	3	0.691	0.1449	0.0836	<0.001
	1000	3	0.4767	0.0761	0.0439	
	1500	3	0.5053	0.0138	0.008	

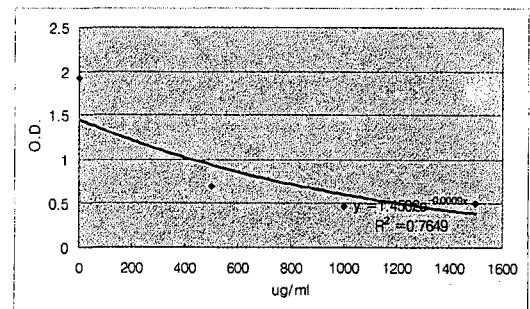


Fig. 2. MTS/PMS assay of cell proliferation treated with Acanthopanax sessiliflorus

3. HepG2.2.15 세포의 DNA 합성도

세포주기중의 S기에서 일어나는 DNA 복제량을 측정하기 위하여 [^3H]-thymidine 10uCi를 세포 분열 한 주기의 시간인 18시간 동안 처리하였다. β -counter로 측정된 CPM

값은 농도에 비례하여 지수함수적으로 감소되는 경향을 보였으며, Fig. 3에서와 같이 $y=11648e^{-0.0002x}$, $R^2=0.951$ 로 나타나서 유의성 있는 감소경향을 보여주었다. 이는 五加皮의 투여가 HepG2.2.15 cell의 DNA 복제를 억제하였음을 보여주는 결과이다.

Table 2. [³H]-Thymidine Incorporation Assay of HepG2.2.15 Cell DNA Synthesis Treated with Acanthopanax Sessiliflorus(YGP)

Herb	Concentration(ug/ml)	Mean C.P.M.	SD
YGP	0	8643	458.2052
	500	7397	113.1371
	1000	3341	364.8671
	1500	1393.5	416.4859

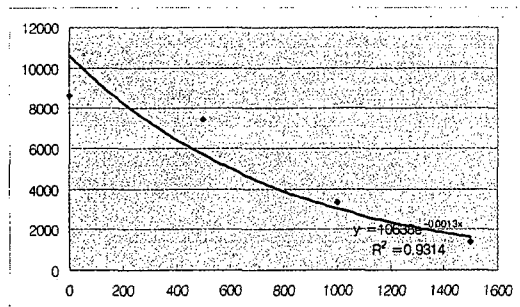


Fig. 3. [³H]-thymidine incorporation assay of HepG2.2.15 cell DNA synthesis treated with Acanthopanax sessiliflorus.

4. HBxAg의 작용에 미치는 영향

HBxAg의 간암발생에 있어서 발암유전자의 인산화에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 MAP kinase를 측정하였다.

(1) pErk western blot

NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2%로 3시간 동안 serum 으로 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 그리고 약제는 500µg/ml의 농도로 3시간 동안의 serum 처리와 동시에 시행하였다. 또한 양성 대조군으로 Erk의 inhibitor로 알려진 PD98059를 처리하였다. NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안

serum starvation 시킨 후, 2%로 3시간 동안 serum으로 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 약물의 처리는 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였다.

먼저 pcDNA-X를 transfection시킨 대조군과 pcDNA1만을 transfection시킨 음성대조군 사이의 차이를 Fig. 4에서 볼 수 있다. 즉, 같은 조건에서 같은 처리를 했음에도 불구하고 NIH/3T3-HBx의 Erk가 훨씬 더 많이 인산화되어 있음을 알 수 있으며 따라서 transfection이 잘 되었음을 보여주고 있다. 그리고 五加皮를 투여한 뒤에는 인산화가 감소되어 있음을 보여주고 있다. 그러나 PD98059 처리군에서 pErk의 양이 그다지 변하지 않은 것으로 나타났다.

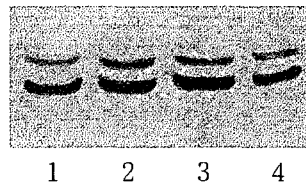
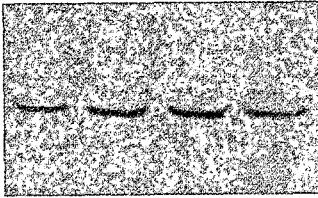


Fig. 4. pErk western blot of NIH/3T3-HBx

1: Acanthopanax sessiliflorus, 2: control(NIH/3T3-HBx), 3: PD98059 5uM, 4: negative control(pcDNA1)

(2) Erk western blot

pErk의 western blot이 정확하게 인산화도를 반영하고 있는가를 살펴보기 위해 같은 sample들을 가지고 인산화에 관계없이 전체적인 Erk 양을 측정할 수 있는 Erk western blot을 시행하였다. NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2%로 3시간 동안 serum으로 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2 양을 측정하였다. 약제는 500µg/ml의 농도로 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이, 어느 군에서나 Erk의 양이 거의 변화없이 일정함을 알 수 있다.



1 2 3 4

Fig. 5. Erk western blot of NIH/3T3-HBx

1: Acanthopanax sessiliflorus, 2: control(NIH/3T3-HBx),

3: PD98059 5uM, 4: negative control

(3) NIT/3T3의 pErk wetstern blot

위에서 나타난 한약의 pErk의 감소효과, 즉 Erk의 인산화를 감소시킴으로써 세포주기 진행을 억제하는 효과가 HBxAg 특이적으로 작용하는 것인지를 확인하기 위하여 pcDNA-X를 transfection 시키지 않은 NIH/3T3 세포에 위와 마찬가지로 시료를 처리하여 pErk의 양을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 6과 같다. NIH/3T3 세포들을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2%로 3시간 동안 serum으로 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 약제는 500µg/ml의 농도로 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였다.

Fig. 4와 Fig. 6를 비교해 보면, Fig. 4에 비하여 Fig. 6의 sample들간의 차이가 더 작음을 알 수 있다. 또 Fig. 6의 PD98059 처리군 pErk의 양이 큰 변화를 보이고 있다. 따라서, NIH/3T3-HBx에서 PD98059가 pErk의 억제작용을 하지 못한 것은 HBxAg의 길항작용에 의한 것일 가능성도 있다.



1 2 3 4

Fig. 6. pErk western blot of NIH/3T3

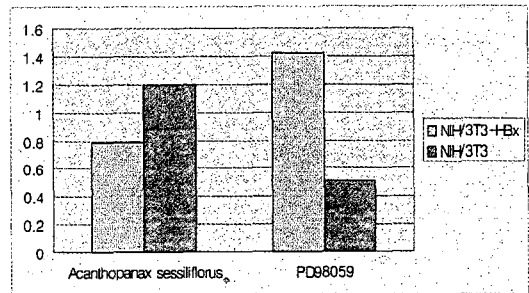
1: Acanthopanax sessiliflorus, 2: PD98059 5uM,

3: PD98059 50uM, 4: negative control

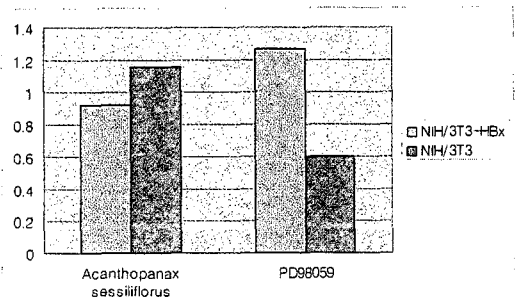
우리는 이를 정량분석하기 위하여 먼저 Densitometer로 band의 밀도를 측정하고 이

두 자료를 분석하여 아래의 그래프(Fig. 7.)로 나타냈다. 먼저 대조군을 1로 잡고 시료처리군의 양을 1에 대한 비율로 나타내어 이들을 비교하여 HBxAg 특이적인 Erk 인산화 억제작용을 지니는가를 확인하여 보았다.

아래와 같이, 五加皮는 HBxAg에 의한 Erk의 인산화를 특이적 억제하는 것으로 사료되었다. 따라서 五加皮는 HBV로 인한 간암 발생에 효과적인 약제로 선택될 수 있는 가능성을 높게 가지고 있다고 할 수 있다.



A



B

Fig. 7. Densitometric difference of pErk levels between NIH/3T3-HBx(former bar) and NIH/3T3(latter bar)

A : Erk1(44kD), B : Erk2(42kD)

values represent relative density of each bands regarding that of control as 1

IV. 고 찰

간암(Hepatic tumors)으로 인한 사망자는 전 세계적으로 매년 1,250,000명으로 추정되

어지고 있으며, 간암은 성인남자의 주요 사망 원인의 한가지이다. 역학적으로 살펴볼 때, 간암은 아프리카에서 가장 흔한 것으로 알려져 있으며 동남아시아에서도 흔할 뿐 아니라 서양권에서도 증가되는 추세에 있다²⁾. 특히 우리나라에서는 간질환이 남자 사망원인의 3위를 차지하고 있으며 40대부터 50대까지는 사망원인의 1위를 차지하고 있어 간질환에 대한 대책이 시급한 실정이다. 이러한 간질환의 심각성은 여성에게도 적용되어 40대부터 50대까지 여성사망원의 5위 이내에 간질환이 위치하고 있다¹⁾.

한의학적으로 간암은 脹滿, 癥積, 黃疸 등의 개념에 대응되며, 腹痛, 脹滿, 全身無力, 疲勞, 食慾不振, 惡心, 嘔吐, 黃疸, 發熱 등의 증상을 나타내고, 氣血瘀滯와 熱毒內盛 등의 證에 해당되어 淸熱利濕, 活血行氣, 扶正祛邪 등의 방법으로 간암을 치료해왔다³⁾. 본 연구는 이러한 한의학적인 치료의 현대과학적인 방법으로 이해하기 위한 것이며 이는 한의학적 치료의 신뢰성 획득과 나아가 새로운 치료법 개발을 위해서 반드시 필요한 것이다.

암의 원인을 밝히는 데 있어서 유전자의 역할이 부각되고 시작한 것은 Rous sarcoma virus(RSV)로 인한 암의 유발을 밝히는 데서 시작되었다⁶⁾. RSV의 src부분이 암을 유발하는 데 중요한 역할을 한다는 사실을 밝혀낸 이후로 그 원인이 바이러스에 의한 것이든 아니면 세포내에 잠재되어 있는 것이든 간에 세포성장에 관련된 여러 인자들의 변화가 암을 발생시킨다는 사실이 밝혀지면서 이후의 생화학, 분자생물학 연구의 주류는 성장인자(Growth factor)와 이의 신호를 전달하여 세포를 분열하게 하는 기전을 연구하는 경향으로 선회하게 되었다. 즉, 이후 분자생물학의 주된 과제는 신호전달경로(Signal transduction pathway)의 연구였고 이의 통제를 통한 암세포 성장의 억제 는 그 목표였다. 물론 여기에 기폭제가 된 것은 Varmus와 Bishop의 ras 유전자의 발견이었다⁷⁾.

세포가 성장하는데 관연하는 유전자들을 크게 네가지로 분류하여 보면 세포외부에서

성장을 조절하는 성장인자(growth factor), 세포막의 성장인자 수용체(receptor), 세포질안에서 세포막으로부터의 신호를 핵으로 전달하는 신호전달자(signal transducer), 핵 속의 성장 조절자 등이 있다⁸⁾. 이러한 유전자들은 전사 인자(transcription factor)에 의해 그 양이 조절되고 인산화(phosphorylation)나 단백질간의 상호작용(protein-protein interaction)에 의해 그 활성이 조정된다. 이러한 조절기전의 이상으로 성장 관련 유전자들의 양이 많아지거나 활성이 높아지면 암이 발생하게 되는 것이며 이러한 기전을 연구하는 것이 현대 생물학의 주된 주제였다.

이후 암의 연구는 또 한 번의 획기적인 전환을 맞이하는데 그것은 암억제 유전자(Tumor suppressor gene)의 발견이다. 대표적인 암 억제 유전자인 p53은 원래 발암 바이러스인 SV40의 T Ag으로 형질전환 세포에서 과잉발현되는 단백질로 발견되었는데 이후에 단백질이 핵 속에 위치한다는 점, p53 유전자의 결손이 암 발생의 유전적 소인(Li-Fraumeni syndrome)이 된다는 점 등에 의해 암과 밀접한 관련이 있는 것을 생각되어져 왔다. p53이 최근 암연구의 가장 중요한 주제로 자리잡게 된 것은, p53이 여러 세포에서 발현되고 point mutation에도 민감하게 반응하여 암발생에 결정적인 역할을 한다는 사실 등이 원인이 되었다⁹⁾. 이후 p53에 관한 집중적인 연구로 p53의 역할이 밝혀지기 시작하였는데 이를 요약하자면 세포분열의 억제와 apoptosis의 유도이다. 세포분열의 억제에는 p21이 관여하며 apoptosis의 유도에는 Gadd45가 관여하는데 이외에도 많은 유전자들이 p53의 조절을 받아 암 억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다^{10,11)}.

간암의 발생에는 B형 간염바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)와 C형 간염바이러스(Hepatitis C Virus, HCV)의 감염과 그 밖의 원인으로 인한 간경화와 만성간염이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다. B형 간염 바이러스와 간암과의 관계에 대해서는 그 간에 간염 바이러스의 X 단백질에 의한 암발생

이 계속되어 발표되어 왔으며, 최근에는 이 X단백질이 발암유전자(oncogene)의 전사(transcription)를 증가시키는 transactivating factor라는 것이 발표되어 그 가능성을 더욱 높여주고 있다¹²⁾. HBV-X 단백질이 transactivating factor로서의 작용이외의 암발생 효과를 가지고 있음이 보고되었는데, protein kinase C나 Diacylglycerol 등의 second messenger를 이용하여 암 발생 신호를 더욱 복잡하고 광범위하게 세포내로 전달한다는 것이다¹³⁾. HBV-X 단백질은 ras-raf-mitogen-MAP kinase 신호전달체계와 cdk2 등에 작용하여 cell cycle check point control의 균형을 깨뜨린다는 발표가 있었으며, 최근에는 HBV의 X gene이 p53과 같은 암억제유전자의 발현을 억제하는 것으로 알려져 HBV의 간암과의 관계가 더욱 밀접한 것으로 밝혀지고 있다^{14,15)}.

또한 HBV의 pre-S 항원의 축적 또한 간염과 재생과정을 촉진하고 이 과정에서 간암이 유발된다는 보고도 있다¹⁶⁾. HBV는 그 증식과정 중에 세포핵의 염색체 안에 integration되는 바이러스이므로 이 과정에서 암 관련 유전자의 발현을 조절하여 암을 발생시킬 수도 있다.

HBV의 간암 발생은 위에서 언급한 유전자에 의한 것 뿐만 아니라 만성간염이나 간경화와 같은 합병증과도 관련되는데, 이것은 HCV나 다른 간염 발생 요인의 간암 발생 경로이기도 하다. 결절형 세포증식은 간암으로 진행되며 세포 확장, 핵 다형태성, 다핵성 세포 등으로 특징지워지는 간세포의 형성이상으로 간암으로 가는 중간 단계이기도 하다¹⁷⁾. 뿐만 아니라 60%의 간경화 환자에서 원발성 간세포암이 발견되고 있으며, 간경화와 높은 세포 증식률을 가진 환자는 간암으로 발전할 가능성을 가지고 있다고 보고되어 왔다¹⁸⁾. 간암과 간경화의 관련성은 역학적으로도 증명되어 왔는데, 간세포암 환자 1073례 중 658(61.8%)례가 간경화를 보였다는 보고는 간경화와 간암의 연관을 잘 보여주고 있다²⁾.

간암의 한의학적 치료에 대한 연구는 아

직 활발하게 이루어지지 못하고 있는 실정이지만 간암을 유발하는 간염바이러스와 이로 인해 유발된 만성간질환의 치료에 대한 연구는 꾸준히 진행되어왔다. 우¹⁹⁾는 바이러스성 만성 B형 간염 환자를 대상으로 한약을 투여하여 임상증상의 개선, AST, ALT치를 안정화 및 29%에서 HBeAg이 소실되었다고 보고하였다. 김 등²⁰⁾은 천연물 치료제 Interferon과 유사한 치료효과를 나타낸다고 보고하였다. 이²¹⁾는 한약물이 실험적으로 유발된 간장해에 대하여 유의한 간보호작용을 나타내었고 담즙분비효능에 대하여도 유의한 효과가 있음을 보고하였다. 중국의 車²²⁾는 B형 간염환자를 대상으로 한약을 투여하여 HBeAg 음전률을 보고하였다. 일본에서의 和漢藥을 이용한 간염 치료의 경우를 살펴보면, 주로 C형에 관한 연구가 활발한데 기따사또 연구소의 정²³⁾은 anti-HCV 양성인 환자를 대상으로 한약을 투여하여 HCV-RNA가 음전되었다고 보고하였다. 우²⁴⁾는 茵陳清肝湯 복용 환자군에서 PCR을 이용하여 측정한 환자들의 바이러스의 역가가 낮아짐을 보고하였다.

본 실험에서 사용된 五加皮는 祛風濕, 強筋骨, 補肝腎하는 약리작용을 가지고 있으며 水腫이나 乏尿에 사용하는 것으로 기록되어 있는데²⁵⁾, 간장질환의 치료에 利水滲濕 효과를 가지는 약물이 효과적이라는 사실이 간장질환에 응용할 수 있을 것이라는 이론적 배경이 될 수 있다. 또한 抗癌中草藥大辭典에서는 潛血祛瘀하는 효과를 가지고 있어서 위장계통의 암에 적용할 수 있는 것으로 기록하고 있다⁴⁾. 이러한 개념은 현대적인 입장에서 복강내 암종의 치료에 적용해 볼 수 있는 것이다. 그러나 현재까지 五加皮에 대한 항암효과의 연구는 국내에서 거의 보고된 것이 없는 실정이다.

HepG2.2.15 cell이 배양 중에 10% FBS RPMI1640 배지내에 정상적으로 HBV particle을 방출하는지 확인하기 위해 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 거두어 PCR을 위한 template로 사용하였다. PCR

을 시행하고 1% Agarose gel에 loading하여 transilluminator로 확인한 결과, HBsAg(+), HBeAg(+)^{인 환자혈청을 양성 대조군으로 사용한 것과 같은 위치에서 PCR band가 나타나는 것이 확인되었고, 이것으로 HepG2.2.15 cell이 배양 중에 정상적으로 HBV particle을 방출하는 것임이 인정되었다.}

HBV X 유전자의 간암 발생에 한약재가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 먼저 모든 시료를 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 1500 μ g/ml의 농도로 48시간 동안 처리한 다음, 방사성 동위원소를 측정하지 않고 세포 증식도를 측정할 수 있는 MTS-PMS assay를 시행하였다. 간암세포주를 사용한 기존의 실험들에서 대부분 시료의 적정농도가 500 μ g/ml로 밝혀졌고 이를 근거로 위의 농도범위를 잡았다.

MTS/PMS assay에서 측정한 formazan product의 OD 값은 세포 증식도와 비례하므로 흡광도의 감소는 곧 세포의 증식이 억제됨을 의미하는 것으로 인정된다. 실험결과 五加皮를 투여한 실험군은 투여 농도에 비례하여 흡광도가 유의하게 감소되는 것으로 나타났으며(P<0.001) 이는 五加皮가 세포의 증식을 억제하는 효과가 있을 것이라는 가정을 가능하게 하였다.

세포주기는 한 세포가 성장하여 두 세포로 분열되는 과정에서 모든 세포가 거치는 과정으로 한 세포주기는 G₁기, S기, G₂기 및 M기로 나누고 있다. G₁기는 첫번째 휴지기로서 세포가 분열된 직후 다음의 성장과정을 시작하기 이전에 필요한 세포내 인자를 준비하고 적절한 크기의 세포가 되도록 준비하는 기간으로써 이때 다음 과정인 S기로 가기 위해 충분한 세포내 인자들이 만들어지지 않으면 다음 기로 가지 못하게 조절하는 첫번째 check point가 있다. 이 check point를 G₁ check point라고 하며 이곳에서는 다음 세포주기가 시작될 수 있는지 여부를 조사하며 만약 세포가 준비가 되어 있지 못하면 cell cycle의 진행을 차단하여 세포가 G₁기에서 멈추도록 조절한다. 또한 이 G₁ check point는 세포가 성장과정으로 진행될 것인지 아니면

세포분화과정으로 들어갈 것인지를 결정하는 중요한 시점이기도 하다. 이 G₁ check point에서의 결정에 따라 세포는 성장과정 또는 분화과정의 두 길을 달리 가게 된다. 일단 G₁ check point에서 세포가 성장과정으로 갈 수 있는 조건이 이루어졌다고 판단되면 세포는 S기로 넘어간다.

S기에서는 핵에 있는 유전정보를 가진 DNA의 복제(replication)가 이루어지는 시기로서 한 염색체에서 두 copy의 염색체가 되는 시기이다. 일단 S기에서 DNA가 복제되어 두 copy가 되면 다음에는 두 세포로 분열되기 위해 핵 이외에 세포질 내의 여러 인자들이 복제되어야 한다.

[³H]-thymidine incorporation assay는 S기에서 일어나는 DNA 복제량을 측정하는 방법으로 ³H으로 표지된 thymidine을 세포에 일정시간 처리한 다음, 세포를 녹여 세포 내에 함유된 [³H]-thymidine의 양을 β -counter로 측정하는 방법이다. 본 실험에서는 [³H]-thymidine 10uCi를 세포 분열 한 주기의 시간인 18시간 동안 처리하였으며 β -counter로 측정한 CPM 값은 농도에 비례하여 감소되는 경향을 보였으며 이는 $y=11648e^{-0.0002x}$ R²=0.951로 나타나서 유의성있는 감소경향을 보여주었다. 이는 五加皮의 투여가 농도에 비례하여 HepG2.2.15 cell의 DNA 복제를 억제하는 것으로 인정되는 것이다.

NIH/3T3 fibroblast는 분화(differentiation)되기 이전의 정상 섬유모세포로 분화에 의한 여러 형질에 관련 없이 분열과 증식에 관한 성질을 나타내기 때문에 oncogene의 연구에 흔히 사용되는 세포주이다. 따라서 우리는 이 세포주에 목암연구소의 운영대 박사에게서 수여받은 pcDNA-X를 transfection시킨 NIH/3T3-HBx 세포주를 사용하였다⁵⁾.

본 실험에서 Transfection 방법으로 사용한 Qiagen 사의 Effectene transfectoin reagent는 기존의 liposome을 이용한 방법에서 한 단계 진보된 것으로 DNA-condensing enhancer를 이용하여 DNA를 응축시킨 다음, 이를 Effectene reagent로 coating하여 micelle

structure를 만든다. 세포막에 부착되어 vector를 세포 안으로 운반하는 것으로 serum이 포함된 media에서도 efficiency가 높고 cytotoxicity가 적어 본 실험에 매우 적합한 방법이였다.

p44 MAP kinase(ERK1)와 p42 MAP kinase(ERK-2)는 현재까지 알려진 MAP kinase family 중 가장 많이 연구되어진 것으로 tyrosine kinase를 활성화시키는 growth factor, protein kinase C activator, phosphatase inhibitor 등 여러 인자들에 의해 활성화된다. 이러한 MAP kinase의 활성화는 threonine과 tyrosine 기의 인산화(phosphorylation)에 의하여 조절되는데 ras-raf 신호 전달 경로나 MEK(MAP kinase kinase)에 의하여 인산화가 조절되는 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

HBx 단백질은 ras를 활성화시키며 tyrosine의 인산화를 통하여 ras-raf-MAP kinase 신호 전달 체계를 활성화시킨다²⁷⁾. 세포질에서 일어나는 이러한 신호전달은 유전자의 발현을 조절해서 일어나는 것이 아니라 그 보다 훨씬 단기에 유전자의 활성도를 조절하는 인산화에 의한 것이기 때문에 약물을 오랜 시간 처리해서는 그 효과를 뚜렷하게 볼 수 없다. 따라서 우리는 이전의 연구에 기초하여 NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2%로 3시간 동안 serum으로 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 그리고 약물의 처리는 3시간 동안의 serum 처리와 동시에 시행하였다²⁸⁾. 또한 양성 대조군으로 Erk의 inhibitor로 알려진 PD98059를 처리하였다. NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2%로 3시간 동안 serum으로 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 약물의 처리는 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였다. 농도는 모두 500µg/ml을 사용하였다.

먼저 pcDNA-X를 transfection시킨 대조군과 pcDNA1만을 transfection시킨 음성대조군

사이의 차이를 Fig. 4에서 볼 수 있다. 즉, 같은 조건에서 같은 처리를 했음에도 불구하고 NIH/3T3-HBx의 Erk가 훨씬 더 많이 인산화되어 있음을 알 수 있으며, 이는 HBV-X gene이 인산화를 촉진시킨다는 기존의 보고와도 일치되는 결과이다^{14,15)}. 이것은 transfection이 잘 되었음을 보여주고 있다. 그리고 PD98059 처리군에서 pErk의 양이 그다지 변하지 않은 것을 확인할 수 있는데 이는 아래에서 고찰하도록 한다.

그리고 pErk의 wetern blot이 과연 정확하게 인산화도를 반영하고 있는가를 살펴보기 위해 같은 sample들을 가지고 인산화에 관계없이 Erk를 측정할 수 있는 Erk western blot을 시행하였다. NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 처리한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 약물의 처리는 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였으며 약물은 500µg/ml의 농도로 사용하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이, Erk의 양이 거의 변화없이 일정함을 알 수 있다. 이는 약제가 세포의 발암유전자 생성에는 아무런 영향을 주지 않고 Erk의 인산화만을 선택적으로 억제하였다는 것으로 해석될 수 있으며, 따라서 五加皮는 암발생을 억제하는 효과를 가지는 것으로 생각된다.

위에서 나타난 한약의 pErk의 감소효과, 즉 Erk의 인산화를 감소시킴으로써 세포주기 진행을 억제하는 효과가 HBxAg 특이적으로 작용하는 것인지를 확인하기 위하여 pcDNA-X를 transfection 시키지 않은 NIH/3T3 세포에 위와 마찬가지로 방법으로 시료를 처리하여 pErk의 양을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 6과 같았다. HBV-X gene을 포함하지 않은 NIH/3T3 세포들을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다.

Fig. 4와 Fig. 6을 비교해 보면, Fig. 4에 비하여 Fig. 6의 sample들간의 차이가 더 작음을 알 수 있다. 또 Fig. 6의 PD98059 처리

군 pErk의 양에는 큰 변화가 보이고 있다. 따라서, NIH/3T3-HBx에서 PD98059가 pErk의 억제작용을 하지 못한 것은 HBxAg의 길항작용에 의한 것일 수도 있다.

우리는 이를 정량분석하기 위하여 먼저 Densitometer로 band의 밀도를 측정하고 이 두 자료를 분석하여 아래의 그래프로 나타냈다. 먼저 대조군을 1로 잡고 시료처리군의 양을 1에 대한 비율로 나타내어 이 둘을 비교하여 HBxAg 특이적인 Erk 인산화 억제작용을 확인하였다.

이 결과 五加皮는 HBxAg에 의한 Erk의 인산화를 특이적으로 억제함을 알 수 있다. 이 결과는 앞에서 살펴보았던 DNA 합성 억제 현상에 대한 분자생물학적 기반을 제시해주는 것으로 五加皮는 HBxAg의 간암 발생을 억제하는데 유의한 약물인 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 五加皮는 MTS/PMS assay 상 간암세포주 HepG2.2.15의 증식을 억제하는 효과가 있었다.

2. 五加皮는 [³H]-thymidine incorporation assay상 간암세포주 HepG2.2.15의 DNA 합성을 억제하는 효과가 있었다.

3. 五加皮는 HBV-X gene의 MAP kinase의 인산화를 억제하는 효과가 있었다.

이상의 결과를 볼 때, 五加皮는 HBV로 인한 간암발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료되며, 이에 대한 계속적인 연구를 통하여 간암치료에 대한 임상적용 가능성을 넓힐 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement : 이 논문은 한국한의학연구원에서 시행한 한방치료기술연구개발사업의 연구비 수혜논문입니다.

pcDNA-X를 제공하여주신 목암연구소의 윤영대박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. 통계청, 97년 사망원인 통계연보, 1999.
2. Sheila Sherlock & James Dooley, Diseases of the liver and biliary system, Blackwell science, 1997.
3. 전국 간계내과학 교수 공저, 간계내과학, 서울, 동양의학연구원, p.274, 1989.
4. 劉春安, 彭明 主編, 抗癌中草藥大辭典, 湖北, 湖北科學技術出版社, pp.185-8, 1994.
5. Lee HS et al. X-gene product antagonizes the p53-mediated inhibition of hepatitis B virus replication through regulation of the progenomic/core promoter, Journal of biological chemistry, 270(52),31405-12, 1995.
6. Ronald Swanstom et al. Transduction of a cellular oncogene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2519, 1983.
7. Schwab M; Varmus HE; Bishop JM, Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture, Nature, 316(6024):160-2, 1985.
8. Stuart A. Aaronson, Growth factor and cancer, Science, 254: 1146, 1991.
9. Robert A. Weinberg, Tumor suppressor gene, Science, 254:1138, 1991.
10. Wafik et al. WAF-1, a potential mediator of p53 tumor suppression, Cell, 75:817, 1993.
11. Haper J.A. et al. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, Cell, 75: 805, 1993.
12. Diamantis ID et al. Hepatitis X gene expression in hepatocellular carcinoma, J. hepatol, 15: 400, 1992.
13. Kekule et al. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signalling pathway, nature, 361(6414):742, 1993.
14. Benn J et al. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle check point controls, Proc Natl Acad Sci USA, ; 92(24):11215, 1995.

15. Schaefer S et al. Properties of tumor suppressor p53 in murine hepatocyte lines transformed by hepatitis B virus X protein, 79(4): 767, 1998.
16. Chisari FV et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. Cell ; 59: 1145, 1989.
17. Anthony PB. Liver cell dysplasia: what is its significance? Hepatology, 7: 394, 1987.
18. Baker ME et al. Hepatic metastasis: Basic principle and implications for radiologist. Radiology, 197: p329, 1995.
19. 우홍정, 만성 B형 간염에 대한 인진청간탕의 효과, 제2회 한중학술대회(간장병)논문집, 대한한의사협회, p.18, 1995.
20. 김승호 외, 천연물 이용 간염치료제 개발에 관한 연구, 과학기술처, p.35, 1992.
21. 이장훈, 간질환치료제의 효능에 관한 실험적 연구, 제2회 한중학술대회(간장병)논문집, 대한한의사협회, 123, 1995.
22. 車念聰, 病毒性乙型肝炎의辨證論治. 第二次中韓學術研討會 中方論文全輯, p.15, 1995.
23. Jong-Chol Cyong, Minoru Furuya, The elimination of HCV in chronic hepatitis C patients by Kampo medicine. The 8th Int'l Congress of Oriental Medicine, p166, 1995.
24. 우홍정, 이장훈, 김영철, A study on the therapeutic effect of oriental medicine on hepatitis B, 경희의학, 13(3):298, 1997.
25. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희, 한약임상응용, 전통의학연구소, pp.184-5, 1993.
26. Timothy A. Bird et al. Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein(MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, raf-1, and MAP kinase kinase, Journal of biological chemistry, 269(50):31836-44, 1994.
27. Jacqueline Benn et al. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a ras, raf, MAP kinase signaling cascade, Proc. Natl. Acad. SCI. USA. 91 :10350-4, 1994.
28. Margherita Doria et al. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of ras and nuclear activator of transcription factors, The EMBO Journal, 14(19):4747-57, 1995.