

원 저

## 百合固金湯加味方の 항종양 효과에 관한 연구

김병주, 문구, 문석재, 원진희, 김태균, 배남규  
원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

### Study on Anti-Cancer Effects of *Backhapgogumtangami-bang*

Byoung-Ju Kim, Gu Moon, Seok-Jae Moon, Jin-Hee Won, Tae-Gyun Kim, Nam-Gyu Bae

Department of Digestive internal medicine, College of Oreintal Medicine, Wonkwang University

**Objectives :** The effects of aqueous extract of *Backhapgogumtangami-bang* (BGTG, a newly devised herb medicine) on the induction of apoptotic cell death were investigated in human lymphoid origin leukemia cell lines, HL-60.

**Methods :** Cells were treated with various concentrations and 400 µg/ml BGTG for 12 hr. Genomic DNA was isolated and separated on 1.8% agarose gels. Lysates from the cells were used to measure the activity of caspase-2, -3, -8, and -9 protease by using fluorogenic peptide. Cells were preincubated with SB-203580 for 30 min. Nuclear protein from the cells was incubated with oligonucleotide probe of AP-1 and NF-κB. Nuclear extracts from the cells were isolated and reacted with antibodies.

**Results :** The viability of HL-60 cells were markedly decreased by BGTG extract in a dose- and time-dependent manner. BGTG extract induced the apoptotic death of HL-60 cells which was characterized by the DNA fragmentation. The activations of Caspase-2, 3, and 9 were induced by BGTG. However, selective inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase pathways by SB-203580 did not affect the extent of BGTG extract-induced cell death. Furthermore, we observed the transient activations of transcriptional factors such as AP-1 and NF-κB.

**Conclusions :** These results suggest that BGTG extract induced apoptotic death of HL-60 cells and caspase activations as well as the modulation of transcriptional factors such as AP-1 and NF-κB. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(2):64-74)

**Key Words:** *Backhapgogumtangami-bang*, HL-60 cell, apoptotic death

## 서 론

암을 비롯한 많은 질병은 正氣와 邪氣의 消長에 의하여 발생된다<sup>1,2)</sup>고 보는 한의학적 관점은 서의학

에서의 종양의 발생이 면역기능과 상당히 밀접한 관계가 있으며 면역요법이 새로운 암의 치료법으로 관심을 끌고 있는 점과 그 관련성을 찾을 수 있다. 암의 치료 또한 證型에 따라 祛邪法과 扶正法을 응용하는데, 病程에 따라 초기에는 攻法을, 중기에는 攻補兼施를, 말기에는 扶正을 치료원칙으로 한다<sup>3,4)</sup>. 특히 正氣의 허약이 질병 발생발전의 관건이 된다고 하여 그 중요성을 강조하였다<sup>5)</sup>.

한편, 서양의학에서의 치료법은 수술요법, 방사선

· 접수 : 2001년 4월 20일 · 채택 : 5월 21일  
· 교신저자 : 김병주, 광주광역시 남구 주월동 543-8 원광대부속 광주한방병원 3내과 비계내과학교실  
(Tel. 062-670-6527, Fax 062-670-6529, E-mail: bjpgim21@hitel.net)  
· 연구비지원:본 논문은 2000년도 교비지원에 의하여 수행되었음

요법, 화학요법 등이 주를 이루고 있으며 기존의 항암제들은 주로 암세포주에 대하여 직접적인 살상작용을 목표로 하기 때문에 세포독성의 효과를 가지는 약물들이 대부분으로 부작용 등을 비롯한 여러가지 문제점들이 있다. 근래에는 세포독성은 약하지만 기존 항암제와 병용투여하여 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 면역요법이나 apoptosis, 細胞分導法, 血管形成阻害法 등과 관련된 새로운 방법의 연구가 활발히 진행중이다<sup>4,5)</sup>.

최근에는 한약을 이용하여 항암제의 부작용을 줄이면서 항종양효과를 극대화하기 위한 연구<sup>6)</sup>에 관심이 모아지고 있다.

百合固金湯加味方은 《中華腫瘤治療大成》<sup>7)</sup>에서 陰虛內熱證의 암치료에 활용한 百合固金湯에 면역기능증진 및 항종양효과가 있는 白花蛇舌草, 山豆根, 黃芩, 胡桃, 魚腥草, 黃芪, 仙鶴草 등의 약물을 가미한 攻補兼施 목적의 처방이다.

저자는 百合固金湯加味方의 항암효과 및 그 기전을 알아보고자 하는 일련의 연구 과정에서, 세포고사 신호전달계의 활성화 및 Caspase계 단백질분해효소의 활성화, 유전자 전사인자인 AP-1 및 NF-κB의 기능을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 개요

#### 1) 약재

百合固金湯加味方의 처방내용은 《中華腫瘤治療大成》<sup>7)</sup>에 의거한 百合固金湯에 원광대학교 전주한방병원 3내과에서 임상활용하는 약물을 가미한 것으로서, 본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 1첩 분량은 다음과 같다(Table 1).

#### 2) 관련 시약

세포 관찰에 이용한 세포배양판은 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium blomide (MTT)와 peroxidase (HRP), 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one (scopoletin), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)사로부터 구입, 사용하였다. RPMI medium, fetal bovine serum (FBS), horse serum, 항생제 등은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) 사로부터 구입하였다.

**Table 1.** Prescription of *Backhapgogumtangami-bang*

韓藥名	學名	生藥名	用量(g)
百合	<i>Lilium longiflorum</i> THUNB	<i>Bulbus Lilii</i>	15
生地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH	<i>Radix Rehmanniae Recens</i>	15
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH	<i>Radix Rehmanniae Preparata</i>	15
玄蔘	<i>Scrophularia buergeriana</i>	<i>Radix Scrophulariae</i>	15
麥門冬	<i>Ophiopogon japonicus</i> KER-GAWL.	<i>Radix Ophiopogonis</i>	15
白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> WILLD.	<i>Herba Hedyotis Diffusae</i>	15
黃芪	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	<i>Radix Astragali</i>	15
白芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	<i>Radix Paeoniae Alba</i>	12
當歸	<i>Angelica sinensis</i> DIELS	<i>Radix Angelicae Sinensis</i>	10
貝母	<i>Fritillaria cirrhosa</i> D. DON.	<i>Bulbus Fritillariae</i>	10
山豆根	<i>Sophorae subprostratae</i> CHUN et T. CHEN	<i>Radix Sophorae Subprostratae</i>	10
胡桃	<i>Juglans regia</i> L.	<i>Semen Juglandis</i>	10
魚腥草	<i>Houttuynia cordata</i> THUNB.	<i>Herba Houttuyniae</i>	10
仙鶴草	<i>Agrimonia pilosa</i> LEDEB. var. <i>japonica</i> NAKAI	<i>Herba Agrimoniae</i>	10
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.	<i>Radix Platycodi</i>	9
黃芩	<i>Scutellaria baikalensis</i> GEORGI	<i>Radix Scutellariae</i>	9
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	6
總用量			201

## 2. 방법

### 1) 약재의 조제

百合固金湯加味方 4첩 분량을 증류수 1,500ml와 함께 3,000ml 환저 플라스크에 넣은 다음, 2시간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과한 뒤 5,000 rpm으로 30분 원심분리하고 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 시료를 조제하였으며, Eppendorf tube에 10mg/ml 농도로 증류수에 녹여서 121°C에서 15분 가열하여 멸균한 후 냉장보관하면서 사용 시에는 세포배양액인 RPMI에 희석해서 사용하였다.

### 2) 세포 배양

사람 백혈구 癌細胞주인 HL-60(Human myeloid leukemia, American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입)는 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 10% fetal bovine serum(PAA Laboratories, Austria)이 포함된 RPMI 1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD, USA) 세포배양액으로 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하여 주며, log phase에 있는 세포에 百合固金湯加味方을 처리하여 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 3) 세포 생존율 측정

세포의 생존율 측정은 24 wells 세포배양판에 HL-60 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/ml씩 분주하고 百合固金湯加味方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 0.01N HCl이 들어있는 용액 1ml씩을 넣고 12시간 용해한 후 540nm 파장에서 ELISA reader(THERMO max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 정상 대조군 및 실험군의 흡광도와 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

### 4) DNA 분절현상

Genomic DNA purification kit(Promega Co., Madison, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다. 먼저 정상세포나 약재가 처리된 세포(1×10<sup>6</sup>세포)를 포집한 후 여기에 nuclei lysis buffer를

첨가하여 세포를 파쇄하고 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA만을 선택적으로 제거한다. 이후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 iso-propanol 침전에 의하여 DNA를 응축시킨 후 다시 70% 에탄올로 세척한 후 자연상태에서 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)을 가하여 DNA를 용해한 후 260nm와 280nm의 spectrophotometer(Beckman Co., Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)를 이용, 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5μg을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50 voltage, 30분)을 실시한 후, ethidium bromide로 염색하여 자외선등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

### 5) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HL-60 세포를(2×10<sup>6</sup>) 4°C에서 15분 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)로 용해하여 14,000rpm으로 15분 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA(Bicinchoninic acid, Sigma Co, St. Louis, MO, USA)법으로 단백질 양을 정량하여 assay buffer(100mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 2mM DTT)에 적절하게 희석시킨 후, 형광기질(fluorogenic biosubstrate)과 37°C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

### 6) 전사인자 AP-1과 NF-κB의 활성측정(Electrophoretic mobility shift assay: EMSA)

전사인자 활성을 측정키 위해 먼저 약재가 처리된 HL-60 세포에서 핵추출물은 Jeong 등의 방법으로 모아졌다<sup>8)</sup>. 세포는 저삼투압 용해용액(0.2mM PMSF, 10 g/ml aprotinin, 20 M pepstatin A, 0.1mM antipain)으로 10분 얼음에서 팽창시켜 최종적으로 Nonidet P-40를 0.1%되게 처리한 후 2,500rpm에서 원심분리하여 핵단백질만을 모았다. NF-κB의 활성측정은 NF-κB의 consensus binding site을 가진 oligonucleotide probe를 10mM Tris-HCl 용액(pH 8.0,

50 mM NaCl, 10 MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT 함유)에 희석한 후 85°C에서 5분 annealing한 후 100ng을 Rediprime kit(Amersham, England)를 이용하여 <sup>32</sup>P를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 5-10 $\mu$ g의 핵단백질과 실온에서 30분 반응시킨 후 냉온실에서 4% polyacrylamide gel에 전기영동하였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF- $\kappa$ B 활성을 측정하였다. AP-1의 활성도 측정은 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입한 probe를 이용하여 NF- $\kappa$ B와 유사한 방법으로 방사선 동위원소 labeling 후 사용하였다.

7) 전사인자 AP-1과 NF- $\kappa$ B 구성단백질 확인(Supershift EMSA)

HL-60 세포의 핵추출물을 저삼투압 용해용액과 10분 얼음에서 팽창시킨 후, Nonidet P-40를 0.1%로 반응시킨 다음 핵에서 핵단백질만을 모았다. AP-1의 구성단백질을 확인하기 위하여 Santa Cruz사에서 구입한 anti-c-Jun, anti-JunB, anti-JunD, anti-panJun, 및 anti-panfos 항체를 사용하였으며, NF- $\kappa$ B의 구성단백질을 확인하기 위하여 anti-c-rel, anti-p50과 anti-p65 항체를 사용하였다. Supershift assay를 위해서는 상기의 항체 1 $\mu$ g을 방사선 동위원소가 labeling된 probes와 반응시키기 전에 추출된 핵단백질과 미리 30분 반응시킨 후 EMSA를 시행하였다.

8) 통계처리

실험 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, p값이 0.05이하일 때 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

### 실험성적

1. 百合固金湯加味方이 HL-60 세포생존율에 미치는 영향

百合固金湯加味方 추출물이 HL-60 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양액에 첨가되

는 우태아혈청(FBS)의 양을 5%와 10%로 조정한 후 추출물의 농도를 변화시키면서 12시간 처리하여 세포생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. Fig. 1에서 10% 우태아혈청을 처리한 실험군은 百合固金湯加味方に 대한 세포생존율이 600 $\mu$ g/ml에서 약 80%를 나타냈으나, 5% 우태아혈청을 함유된 RPMI 1640 배지에서 百合固金湯加味方 추출물을 처리하였을 때는 400 $\mu$ g/ml에서 약 40%의 생존율을 나타냈다. 이러한 결과에 의하여 본 연구에서는 5% 우태아혈청이 함유된 RPMI 1640 배지에서 400 $\mu$ g/ml의 百合固金湯加味方を 처리하여 생화학적인 실험을 하였다.

Agarose electrophoresis에 의한 DNA분절 현상을 관찰키 위해 百合固金湯加味方 400 $\mu$ g/ml을 HL-60세포에 처리후 세포를 수집, DNA를 추출하여 1.8% agarose gel에 전기영동 하였다. Gel은 ethidium bromide 염색후 자외선등 하에서 조사한 결과, 百合固金湯加味方を 처리한 후 6시간에 DNA 분절현상이 나타나기 시작하였고 12시간에서는 현저한 DNA 분절을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과는 百合固金湯加味方이 HL-60세포에서 생존율을 저하시키며, 百合固金湯加味方에 의한 세포의 죽음은 세포고사 현상

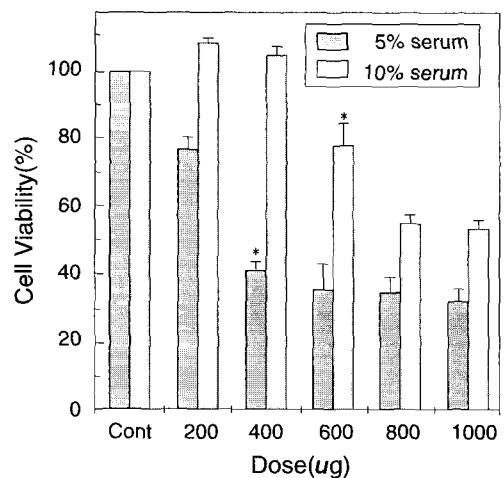
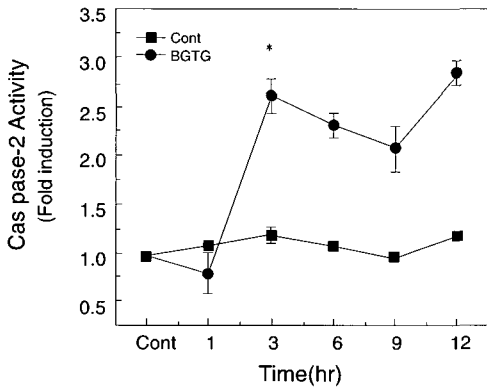


Fig. 1. BGTG increased the cytotoxicity of HL-60 cells. Results were presented as mean  $\pm$  S.D. of four independent experiments. \*, P < 0.05 compared with control.

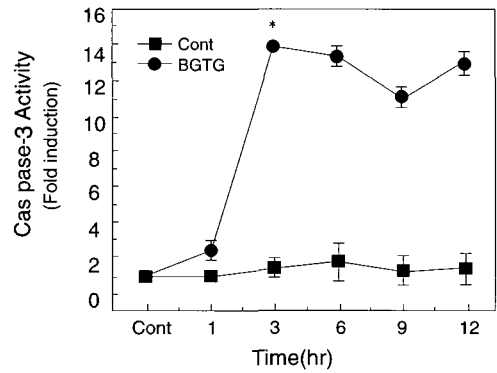
에 의해 초래됨을 의미하였다. 또한 百合固金湯加味方に 의한 HL-60세포의 세포고사 현상은 百合固金湯加味方の 처리 농도와 시간에 의존적임을 알 수 있었다.

2. 百合固金湯加味方이 caspase family cysteine protease 활성화에 미치는 영향  
세포고사의 특징적인 현상인 DNA 분절현상이 관

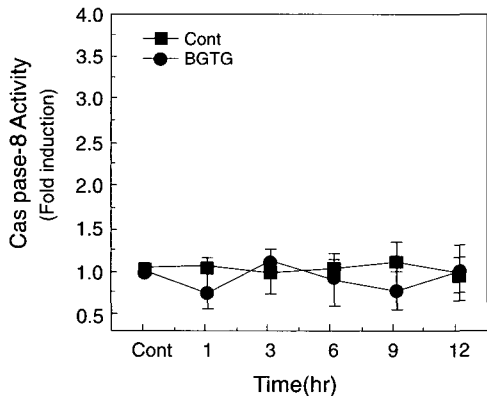
찰되었기에 그 작용기전을 확인하기 위하여 caspase 계 단백질분해효소의 활성도를 측정하였다. HL-60세포에 百合固金湯加味方 400 $\mu$ g/ml을 다양한 시간 처리한 후 caspase-2, -3, -8, 및 -9 proteases의 효소적 활성을 측정하였다. Fig. 2의 결과에서처럼 百合固金湯加味方 추출물 처리시 caspase-2 protease의 효소적 활성은 12 시간 후 최고 2.8배 이상 증가된 활성을 나타냈다. Caspase-3 protease는 百合固金湯加味方を 처



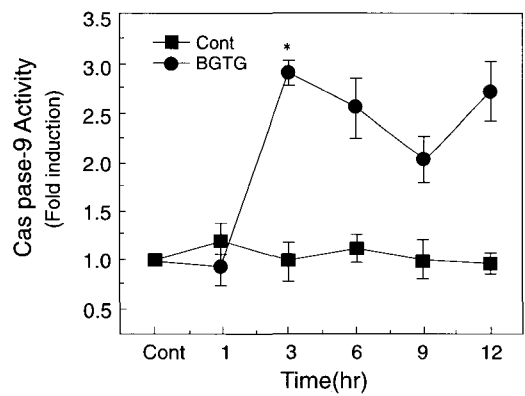
**Fig. 2.** BGTG increased the catalytic activity of caspase-2 of HL-60 cells in a time-dependent manner. Results were represented as means  $\pm$  S.D. of four independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with control.



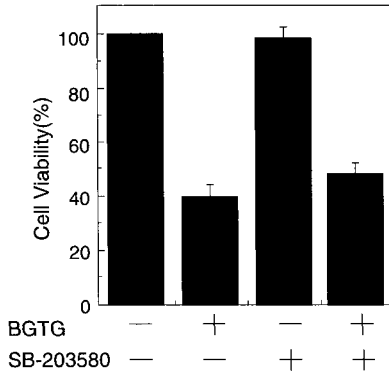
**Fig. 3.** BGTG increased the catalytic activity of caspase-3 of HL-60 cells in a time-dependent manner. Results were represented as means  $\pm$  S.D. of four independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with control.



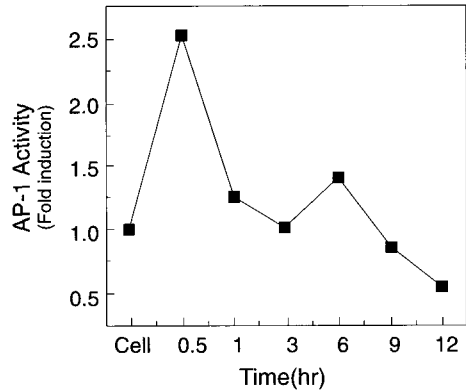
**Fig. 4.** BGTG increased the catalytic activity of caspase-8 of HL-60 cells in a time-dependent manner. Results were represented as means  $\pm$  S.D. of four independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with control.



**Fig. 5.** BGTG increased the catalytic activity of caspase-9 of HL-60 cells in a time-dependent manner. Results were represented as means  $\pm$  S.D. of four independent experiments. \*,  $P < 0.05$  compared with control.



**Fig. 6.** Effect of p38 MAP kinase inhibitor, SB-203580 on cytotoxicity of HL-60 cells by BGTG. Results were represented as means  $\pm$  S.D. of four independent experiments.



**Fig. 7.** BGTG induced the transient activation of transcriptional factor AP-1 in HL-60 cells. Data shown one of the representatives of four independent experiments.

리한 후 3시간에 가장 높은 활성을 나타냈는데 약 14 배 증가하였으며 이후 12시간까지도 활성이 유지되었다(Fig. 3). 그러나, caspase-8 protease의 활성은 百合固金湯加味方に 의하여 변화되지 않았다(Fig. 4) Caspase-9 protease의 활성은 약제처리 1시간 후부터 증가하기 시작하여 3시간째에 최고에 달하였다가 점차 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5).

### 3. 百合固金湯加味方に 의한 HL-60 세포독성에서 p38 kinase 역할

MAP kinase 신호전달계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하여 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여한다<sup>9,10)</sup>. 百合固金湯加味方に 의해 유도된 HL-60 세포고사에 MAP kinase의 하나인 p38 신호전달경로를 경유하는지를 알아보기, p38 kinase 활성을 저해하는 SB-203580을 처리한 후 MTT방법으로 세포 생존율을 조사하였다. 그러나 SB-203580은 百合固金湯加味方に 의한 HL-60 세포 죽음에 아무런 영향을 주지 못했다(Fig. 6). 이는 百合固金湯加味方を 처리한 HL-60에서 세포죽음이 MAP kinase의 하나인 p38 신호전달과정을 거치지 않는다는 것을 의미하였다.

### 4. 百合固金湯加味方が 전사활성인자(transcriptional activator) AP-1 활성화에 미치는 영향

JNK/SAPKs는 MAP kinase의 하나로 세포가 자외선, nitric oxide 및 종양괴사인자(TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1(IL-1)과 같은 inflammatory cytokines, 단백질 합성저해제 또는 osmotic shock과 같은 생리적/환경적 스트레스 등의 자극에 의해 활성화되어 세포고사, 분화(differentiation)와 활성화(activation) 등에 관여한다. 활성화된 JNK/SAPK는 c-Jun의 N-말단부위를 인산화시키고, 인산화된 c-Jun은 또 다른 Jun family protein과 homodimer 혹은 Fos와 heterodimer를 구성하여 전사조절인자인 AP-1을 형성한다<sup>11)</sup>. 百合固金湯加味方に 의한 HL-60 세포고사 신호전달이 AP-1 전사인자의 활성화를 통하여 일어나는지를 확인하기 위해 EMSA 방법으로 분석하였다. 百合固金湯加味方は HL-60세포에서 AP-1을 시간 의존적으로 활성화시켰으며, 처리 30분 후에 최대 활성을 보이다가 점차 감소하였다(Fig. 7).

### 5. 百合固金湯加味方に 의한 HL-60 세포고사에 있어서 활성화된 AP-1의 구성 단백질

전사활성인자인 AP-1은 세포의 일반적인 기능에 연관되어 있다<sup>12)</sup>. AP-1은 Jun family (JunB, c-Jun, 및

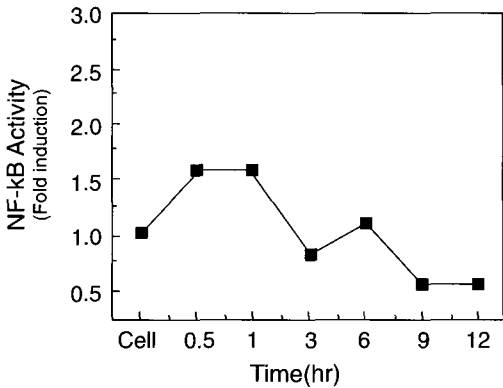


Fig. 8. BGTG induced the transient activation of transcriptional factor NF-kB in HL-60 cells. Data shown one of the representatives of four independent experiments.

Jun D)의 homodimer 혹은 Jun 및 Fos family(c-fos Fra-1, Fra-2, 및 FosB)의 heterodimer에 의해서 구성되어 있다. 百合固金湯加味方에 의해 활성화된 AP-1의 구성 단백질을 확인하기 위하여 약재를 처리한 30분 후에 세포의 핵단백질을 모아 다양한 AP-1 구성인자들에 대한 항체와 30분 전처리 후에 EMSA를 시행하였다. 그 결과 JunD나 Fos에 대한 항체를 전처리한 경우에 밴드가 사라짐이 관찰되었으며 JunD가 major form으로 존재하였다. 이상의 결과는 百合固金湯加味方에 의한 AP-1의 활성이 JunD와 Fos 단백질의 heterodimer에 의해서 이루어짐을 의미하였다.

6. 百合固金湯加味方에 의한 HL-60 세포고사에 있어서 전사활성자인 NF-kB의 활성화

NF-kB는 유사분열촉진제, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 와 같은 cytokines, 세균의 당단백질, 바이러스, 방사선 등에 의해 활성화되며 또한 세포죽음과정에서 활성화됨이 보고되었다<sup>13)</sup>. 따라서, 본 실험에서는 百合固金湯加味方을 처리한 HL-60 세포죽음에서 NF-kB 전사인자가 활성화되는지를 확인하였다. 百合固金湯加味方을 처리한 HL-60 세포로부터 핵추출물을 얻은 후 NF-kB에 특이적으로 결합하는 probes를 이용하여 EMSA법에 의해 활성화 여부를 측정하였다. 그 결과 百合

固金湯加味方을 처리한 HL-60 세포에서 NF-kB의 활성은 30분 후에서 부터 증가하기 시작하여 1시간에서 최고 활성을 보여주었으며, 6시간까지 활성이 감소하다가 소실되었다(Fig. 8).

7. 百合固金湯加味方에 의한 HL-60 세포고사에 있어서 활성화된 NF-kB의 구성 단백질

NF-kB는 c-Rel, p65(Rel A), Rel B, p50(NF-kB1), 및 p52(NF-kB2)등의 단백질로 구성되어 있다. 百合固金湯加味方에 의하여 활성화된 NF-kB 구성 단백질을 확인하기 위해 약재를 처리한 HL-60 세포 핵추출물을 anti-c-Rel, anti-p65, 및 anti-p50 antibodies 등과 반응시킨 후, NF-kB probe와 반응시켜 EMSA를 시행하였다. 그 결과 c-rel과 p65에 대한 항체는 NF-kB 활성화에 영향을 주지 못하고, anti-p50 항체를 처리한 실험군에서 NF-kB 활성이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 百合固金湯加味方에 의해서 활성화되어지는 HL-60세포의 NF-kB는 p50의 homodimer로 이루어졌음을 의미하였다.

고 찰

한의학에서 암에 대한 인식은《內經》<sup>4)</sup>의 “腸覃”, “石瘕”의 기록에서 엿볼 수 있으며, 그 후 宋代의《衛濟寶書》에 최초로 기록된 이래<sup>14)</sup>, 역대 의서에서 위치와 병리적 특성에 따라 腫瘍 및 積聚, 癥瘕, 疝癖, 瘤, 石癰, 反胃, 翻胃, 噎膈, 腸覃, 妬乳, 石疽, 癰疽, 舌疔 등으로 다양하게 기술하고 있다.<sup>4,15-17)</sup>

한의학에서 암의 발생원인은 外感六淫, 內傷七情, 飲食不節 및 邪氣 등으로 정리할 수 있는데, 이들은 인체의 正氣虛와 복합적으로 작용한다고 볼 수 있다. 즉, 암을 비롯한 많은 질병은 正氣와 邪氣의 消長에 의하여 발생된다고 인식<sup>12)</sup>하였는데, 그 중에서도《內經》에서 “正氣存內 邪不可干”, “邪氣所湊 其氣必虛”라 하여 正氣의 허약이 질병의 발생발전의 관건이 된다는 점을 강조하였다<sup>4)</sup>. 이처럼 한의학에서의 正氣는 인체의 정상적인 면역기능을 대표하며 正氣가 虛하면 면역능력도 저하된다<sup>18)</sup>. 암의 경우에 있어서도,

암환자의 면역기능이 정상인에 비하여 현저히 저하되어 있고<sup>19,20)</sup>, 면역억제요법을 받은 환자에서 암발생율이 크게 상승하며<sup>21)</sup>, 어떤 원인으로라도 면역부전이 생길 경우에는 암의 발생율이 높아진다<sup>22)</sup>는 것으로 보아 암세포가 일반적인 항원과 같이 면역반응이 관계함을 알 수 있다<sup>20)</sup>.

百合固金湯은 肺腎陰虛로 內部에 熱이 生하고 虛火가 上炎하여 發生하는 咽喉燥痛, 咳嗽氣喘痰血, 手足煩熱, 骨蒸盜汗, 舌紅苔少, 脈細數 등의 증상에 養陰清熱, 潤肺化痰, 止咳의 작용을 한다<sup>23,24)</sup>. 百合固金湯加味方은 原方 약물의 용량을 증량하고, 여기에 항암 및 면역증진작용이 있는 白花蛇舌草, 山豆根, 黃芩, 魚腥草, 仙鶴草, 胡桃, 黃芪를 가미하여 암치료 원칙중 攻補兼施에 부합되도록 입방된 암치료제이다.

서양의학에서의 치료법은 수술요법, 방사선요법, 화학요법등이 주를 이루고 있으며 기존의 항암제들은 그 치료의 우수성에도 불구하고 주로 암세포주에 대하여 직접적인 살상작용을 목표로 하기 때문에 세포독성의 효과를 가지는 약물들이 대부분으로<sup>15)</sup>, 각 암종에 대한 감수성의 차이, 부작용, 재발 및 합병증 등의 문제점때문에 인체에 무해하면서도 효과적으로 암을 치료할 수 있는 새로운 약제 및 치료법의 개발이 요구되고 있다. 이러한 이유로 수세기 동안 사용되어 오면서 그 효능의 작용기전은 실험적으로 제공되어 있지 않지만 부작용 등으로 인한 안전성이 경험으로 이미 입증된 한방적인 종양의 치료가 시행되고 있다.

한편 최근에는 항암 치료제의 작용기전이 세포고사 기전에 의존한다는 사실이 밝혀진 이래로 세포고사 신호전달계의 기능 변화를 통한 항암 치료의 효능을 높이려는 연구에 관심이 모아지고 있다. 특히 많은 암환자에서 치료 도중에 암세포가 항암 치료제에 강한 내성을 유발하여 항암 치료제에 대한 감수성(sensitivity)이 저하된다고 알려져 있다. 이러한 이유로 종양치유의 관점에서 종양세포의 세포고사와 관련된 세포고사 유도인자, 신호전달경로 그리고 관련 유전자들과 단백질들을 연구하여 항암기전을 연구하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>25)</sup>.

따라서 본 실험에서는 한방에서 암환자의 치료에 사용되는 百合固金湯加味方의 항암 효과를 사람의 백혈구 세포에서 유래된 HL-60 세포주를 사용하여, 百合固金湯加味方 추출물들이 직접적으로 암세포주에 다양한 신호전달 과정에 관여하여 세포고사를 일으켜 세포 죽음을 초래할 수 있는지를 밝히고자 실험하였다.

먼저 百合固金湯加味方 추출물이 HL-60 세포주에 세포독성을 나타냈으며(Fig. 1), 그 기전이 세포고사 기전에 의해서 매개됨이 DNA 분절현상으로 확인되었다. 세포고사 중요 작용기전의 하나인 caspase family<sup>26)</sup>는 정상적으로 세포내에 불활성화 형태로 존재하다가 세포고사 유도 자극 시 활성화되어 세포고사의 특징적인 현상을 초래한다. Caspase는 분해(proteolytic cleavage)를 일으키는 표적단백질 아미노산 서열상동성(sequence homology)에 따라 3개의 family로 구분한다. Caspase-1 like family는 caspase-1, caspase-4, 그리고 caspase-5 등이 속한다. Caspase-3 like family는 caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8, caspase-9 그리고 caspase-10이 속한다. 마지막 family는 아직까지는 caspase-2이 단독으로 구성되어 있다<sup>27)</sup>.

Caspase-2의 과발현은 다양한 세포에서 세포고사를 유발하며, FDC-P1 영양인자 요구 세포주에서 영양인자 결핍에 의한 세포사멸시 caspase-2의 anti-sense를 넣어주어 caspase-2의 합성이 저해되면 apoptosis도 저해됨이 보고 되고 있다<sup>28,29)</sup>. 본 연구에서는 caspase-2의 활성화는 百合固金湯加味方 추출물을 처리 후 3시간에 활성화가 최대로 나타났으며 이후 caspase-2의 활성화가 유지되어 세포고사 신호전달이 하방의 신호전달계로 지속적으로 이어지고 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

Caspase-3는 protease cascade의 하방에 위치하여 여러 세포사망경로가 공통으로 통과하는 중요한 경로로 32 kDa의 전구물질로부터 활성화되면 20 kDa 과 11 kDa 아단위로 분해되어 DNA 복구와 스트레스 관련 발현유전자의 활성화 기능유지에 중요한 PARP를 분해하여 세포고사에 필수적이다<sup>30,31)</sup>. 본 연구에서



도 caspase-3의 활성화는 대조군에 비해 14배 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 한편, Fas 혹은 TNF 매개성 apoptosis에서의 caspase-3의 활성화는 caspase-8에 의하여 매개된다고 보고되고 있다<sup>31,32</sup>. 본 실험에서 caspase-8의 활성화는 관찰되지 않아 fas에 의한 신호 전달이 확인되지 않았다(Fig. 4).

Cytochrome c는 정상적으로는 미토콘드리아의 내외막 사이에 존재하여 respiration chain에서의 전자전달자의 역할을 수행하나 세포고사시 세포질로 방출되며 AP-1 및 dATP 등과 함께 caspase-9을 활성화시킨다. 본 실험에서 百合固金湯加味方 추출물을 HL-60에 처리하였을 때 caspase-9의 활성이 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 5). 이는 百合固金湯加味方 추출물이 HL-60의 미토콘드리아에 손상을 주어 cytochrome c의 방출을 유도하였음을 추측할 수 있다.

유핵세포의 신호전달경로의 가장 주된 형태는 mitogen activated protein kinases (MAPKinase)로 기질특이성이나 외부 자극에 대한 반응이 다양하지만 기본적인 구조와 활성화 방법 등은 매우 유사한 것으로 밝혀지고 있다. 현재까지 밝혀진 MAPK계는 ERKs, JNK/SAPKs, 그리고 p38로 구분되는 3개의 아군으로 구분되어있다. 이 중 JNK/SAPKs는 세포가 자외선에 노출시 전사인자인 c-Jun을 인산화시키는 단백질로서 처음 발견되었다. 한편, p38는 JNK/SAPKs와 마찬가지로 TNF, IL-1, lipopolysaccharide(LPS), 혹은 삼투압 등에 의해 활성화된다<sup>33</sup>. 본 실험에서는 百合固金湯加味方 추출물이 세포내 항상화계에 영향을 주는 것으로 판단되기 때문에 이러한 산화적 손상이 MAPK, 특히 p38과 JNK 신호전달계를 통하여 세포고사를 유도하는지를 확인하였다. p38의 저해제인 SB-203580를 전처리한 후 百合固金湯加味方 추출물을 처리하였을 때 세포죽음을 감소시키지 못하는 것을 관찰하였다(Fig. 6). 따라서 百合固金湯加味方 추출물에 의한 HL-60의 세포죽음이 p38 MAPK를 경유하지 않는 것으로 사료된다. HL-60 세포주에 百合固金湯加味方 추출물을 처리하였을 때 JNK가 활성화가 이루어졌다면 기질인 c-Jun의 인

산화에 의한 AP-1이 생성되었을 것을 가정하고 AP-1의 활성을 측정된 결과 30분에 활성이 증가하는 것을 관찰하여 百合固金湯加味方 추출물에 의한 신호 전달이 JNK를 경유하는 것을 확인하였다(Fig. 7).

전사활성인자 AP-1은 jun 단백질(c-jun, junB, 및 junD)과 fos 단백질(c-fos, fosB, fra1, 및 fra2)이 leucine repeat라 불리는 부위를 통하여 동종 혹은 이종 결합하는 형태로 구성되며, 수많은 자극이나 세포주기에 따라 다양하게 발현되어 조절된다<sup>34</sup>. 최근 이러한 AP-1 전사인자가 세포고사 조절에 깊이 관여하고 있다고 보고되고 있다. 본 연구에서도, 세포죽음이 유발되는 百合固金湯加味方 추출물 등의 한약제 처리 시 AP-1 전사인자의 활성이 증가되었다가 감소가 유도되는 결과를 나타내었으며, 이러한 전사인자의 활성감소는 세포의 정상적인 성장 및 기능수행에 필요한 유전자들의 발현 장애를 가져와 암세포의 세포고사에 이르게 하는 것으로 사료된다.

NF- $\kappa$ B는 RNA와 단백질합성에 의존하는 유전자의 발현을 조절함으로써 세포죽음을 억제한다. 최근에 NF- $\kappa$ B에 의해서 발현이 증가되는 유전자가 알려지기 시작하였다. NF- $\kappa$ B의 부적절한 활성화는 급성 염증반응, 급성기반응, 방사선 손상, 죽상경화증 및 악성종양과 같은 여러 가지 질병의 유발과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 HL-60 세포주는 百合固金湯加味方 추출물 처리 시 30분에 활성이 최대로 증가하다가 활성이 감소형태를 나타내다가 6시간 이후에는 나타나지 않았다(Fig. 8). 이러한 초기 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화에 의해 HL-60 세포주에서 세포죽음을 억제하는 유전자의 발현이 증가했을 것이라 思料된다. 그러나 이후 NF- $\kappa$ B의 활성 감소가 일어나면서 세포는 증식 및 유지 등에 필요한 유전자의 발현이 저하되어 세포의 죽음을 초래하리라 思料된다. 百合固金湯加味方 추출물에 유도된 활성화 형태인 NF- $\kappa$ B는 p50의 동종이합체 형태를 가지는 것을 확인하였다.

이상의 연구결과를 종합하면 百合固金湯加味方 추출물에 의한 사람 백혈구유래 암세포의 세포 사멸은 이 추출물이 암세포의 세포고사 신호전달기전인

CPP32-like cysteine protease 중 caspase-2, 3, 9을 활성화 시키고, 세포내 antioxidant system에 영향을 주며, AP-1과 NF- $\kappa$ B 같은 전사활성인자의 활성을 조절함으로써 암세포의 세포고사에 관여하고 있는 것으로 사료된다. 따라서 한의학에서 응용되고 있는 암치료제로서의 百合固金湯加味方은 매우 유용한 항암효과를 지니고 있음을 알 수 있으며, 더욱더 많은 연구가 진행되어야 하리라 사료된다.

## 결론

陰虛生內熱證의 암치료에 활용할 수 있는 百合固金湯加味方의 항암효과를 세포고사 신호전달계의 활성화를 통하여 그 효능을 알아보고자 하였다. 대표적인 세포고사 신호전달계의 caspase인 단백분해효소의 활성화, 유전자 전사인자인 AP-1 및 NF- $\kappa$ B의 조절작용에 미치는 百合固金湯加味方의 효과는 아래와 같다.

1. 百合固金湯加味方 추출물은 HL-60 세포주의 세포생존율을 감소시켰으며, 세포고사의 전형적인 형태인 사다리형의 DNA 분절을 나타냄으로써 HL-60 세포주에서 세포고사를 유도했음을 확인하였다.
2. 百合固金湯加味方 추출물은 세포고사에서 단백질분해작용에 중요한 역할을 하는 caspase family 특히, caspase-2, caspase-3, 그리고 caspase-9의 활성화를 유도하였다.
3. 百合固金湯加味方 추출물은 MAPKinase 중 p38 MAPKinase 경로를 이용하여 세포고사를 유도하지 않았음을 p38 MAPKinase의 저해제인 SB-203580의 전처리에 의해서 확인하였다.
4. 百合固金湯加味方 추출물은 MAPKinase 중 SAPK/JNK 경로를 활성화 시킴을 AP-1의 활성 측정으로 확인하였다.
5. 百合固金湯加味方 추출물을 처리한 HL-60 세포주의 AP-1 및 NF- $\kappa$ B는 초기에 활성화가 유도되었지만, 이후에는 나타나지 않았다. 이러한 초기 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화에 의해 HL-60 세포주에서 세포

죽음을 억제하는 유전자의 발현이 증가했을 것이라 사료된다. 그러나 이후 NF- $\kappa$ B의 활성 감소가 일어나면서 세포는 증식 및 유지 등에 필요한 유전자의 발현이 저하되어 세포의 죽음을 초래하리라 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 百合固金湯加味方 추출물이 HL-60 세포주에서 농도에 의존적으로 세포고사를 유발시켰고, 이러한 세포의 사멸은 caspase-2, -3, -9의 활성화에 의해 유도됨을 알 수 있었다. 또한 oxidative stress의 indicator인 AP-1과 NF- $\kappa$ B의 활성을 조절함으로써 HL-60 세포주의 세포고사를 유도하였음을 확인 할 수 있었다.

## 감사의 말씀

본 논문은 2000년도 교비지원에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의결합치료 卷1, 익산: 圓光大學校出版局. 1999;253-303,383-460.
2. 鄭遇悅 外. 韓方臨床病理學, 서울:永林社. 1998;19-45.
3. 郁仁存. 中醫腫瘤學, 北京:北京科學技術出版社. 1983;1-10.
4. 王 水. 黃帝內經素問, 서울:高文社. 1977;91,166, 229,326.
5. 서울대학교 의과대학편.종양학, 서울:서울대학교출판부. 1998;137-148,193-205.
6. 韓相日. 榆根皮抽出液이 HepG2 肝癌細胞에 미치는 抗癌效果 및 機轉에 對한 研究, 대한한방내과학회지. 2000;2:259-266.
7. 潘敏求 外. 中華腫瘤治療大成, 河北:河北科學技術出版社. 1996;65.
8. Jeong JY, Jue DM. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Immunol.1997;158:4901-4907.
9. Ahn NG, Seger R, and Krebs EG. The mitogen-activated protein kinase activator. Curr. Op. Cell Biol.

- 1992;4:992-999.
10. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinase. *Nature*. 1994;369: 156-160.
  11. McBride K, Nemer M. The c-terminal domain of c-fos is regulated for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:5073-5081.
  12. Im SY, Han SJ, Ko HM, Choi JH, Chun SB, Lee DG, Ha TY and Lee HK. Involvement of nuclear factor-kappa B in platelet-activating factor-mediated tumor necrosis factor-alpha expression. *Eur J Immunol.* 1997;27:2800-2804.
  13. Ming Guo and Bruce AH. Cell proliferation and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology.* 1999;11: 745-752.
  14. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治, 上海:上海科學技術出版社. 1980;1-10.
  15. 臥字魚 外. 中國醫學史, 北京:人民衛生出版社. 1991;238.
  16. 羅天益. 衛生寶鑑(醫部全錄) 12권, 서울:大星文化社. 1986;120-131.
  17. 東漢巨事. 衛濟寶書(中國醫學大系) 9권, 서울:정담도서출판사. 1987;817.
  18. 傅芳. 中醫免疫思想及成就. *中醫雜誌.* 1984; 25(11):55-58.
  19. 김재광 외. 암환자에서의 T, K, NK 세포 및 단구의 기능저하. *대한면역학회지.* 1983;5(1):106.
  20. 김춘추. 암환자의 세포성 면역. *대한면역학회지.* 1987;33(3):290-291.
  - 21.李文鎬 外. 내과학, 서울:금강출판사. 1979;2458-2466.
  22. 金吉英. 면역부전질환과 악성종양. 연세의대논문집. 1978;11(1):61-64.
  23. 申載鏞. 方藥合編解說, 서울:成輔社. 1989;171-172.
  24. 康秉秀 外. 臨床配合本草學, 서울:永林社. 1994;112,154,175-176,598-599,746.
  25. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol* 1997; 41:461.
  26. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 1998;254:439-459.
  27. Thornberry NA, and Lazebnik Y. Caspase: enemies within. *Science.* 1998;281:1312-1316.
  28. 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.* 1994;78:739-750.
  29. Kumar S, and Harvey NL. Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett.* 1995;375:169-173.
  30. Harvey NL, Butt AJ, and Kumar S. Functional activation of Nedd2/ICH-1 (Caspase-2) is an early process in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997;272:13134-13139.
  31. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding C K, Gallant M. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 1995;376:37-43.
  32. Alemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem.* 1997;64:33-42.
  33. Verheij M, Bose R, Lin, Yao B, Jarvis W, Grant S, Birrer M, Szabo E, Zon L, Kyriakis J, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, and Kolensnick R. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature.* 1996;380:75-79.