

人間白血病 細胞株에서 苴貝散의 作用에 關한 研究

황기명

원광대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-leukemic effects of JIPAESAN and its components on leukemic cells HL-60

Hwang Kee-Myoung

Department of Oriental Medical Prescription Wonkwang University

In the hope of identifying anti-leukemic agents from traditional herbal medicines, this study was designed to investigate the anti-leukemic effects of the herbal medicine Jipaesan, which is composed of *Angelica Dahurica* and *Fritillariae Verticillata*, in acute promyeloid leukemia HL-60 cells. Jipaesan showed anti-proliferative effect through the induction of differentiation and apoptosis in HL-60 cells. Verticinone as a major differentiating agent and imperatorin as major apoptosis-inducing agent were isolated from the water extracts of *F. Verticillata* and *A. Dahurica*, respectively. Combined treatment of HL-60 cells with two major compounds showed synergy in the induction of differentiation. Since the induction of differentiation and/or apoptosis has therapeutic values in curing acute leukemic diseases, Jipaesan could be useful as an anti-leukemic agent.

Key word : *Jipaesan, Angelica Dahurica, Fritillariae Verticillata, imperatorin, Verticinone, leukemia*

I. 緒 論

苴貝散은 明代 李¹⁾의 醫學入門에 古苴貝散으로 처음 收錄되어 乳結核에 使用되었으며 許의 東醫寶鑑과 이후 여러 醫方書에서 乳結核, 乳痛症에 活用되는 것으로 알려져 있다. 苴貝散은 白芷와 貝母가

各等分으로 構成된 處方으로 祛風消腫, 清熱散結의 效能이 있어 乳結核에 使用된다고 하였다.²⁻⁸⁾

白芷는 繖形科에 屬한 多年生 草本인 구릿대 및 개구릿대의 根으로 祛風解表, 消腫止痛, 通鼻止帶의 效能이 있어⁹⁾ 頭痛, 眉稜骨痛, 齒痛, 鼻淵, 寒濕腹痛, 腸風, 痔漏, 赤白帶下, 癰疽, 瘡瘍, 皮膚乾燥, 瘙癢, 疥癬을 治療한다고 하였으며¹⁰⁻¹²⁾, 藥理學的으로는 解熱, 鎮痛作用과 抗菌作用이 있는 것으로 밝혀져 있다^{12-16, 28-29)}.

貝母는 百合科에 屬한 多年生 草本인 貝母 및 中

교신저자 : 황기명
원광대학교 한의과대학 방제학교실
Tel : 063-850-6834 E-mail : hwangkm01@korea.com
접수 : 2002/5/12 수정 : 2002/6/10 채택 : 2002/6/19

國貝母의 鱗莖으로 止咳化痰, 清熱散結의 效能이 있으며⁹⁾ 產地에 따라 浙貝母나 川貝母로 불린다. 浙貝母는 中國의 東海岸 地域인 浙江省에서 自生하며, 川貝母는 中國의 四川地域에서 自生하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 貝母는 虛勞咳嗽, 吐痰咯血, 心胸鬱結, 肺痿肺癰, 癭瘤, 瘰癧, 喉痺, 乳癰 등에 活用되어지며^{10,12)} 氣管支擴張作用을 하고 粘液分泌를 抑制하는 鎮咳祛痰劑로 알려져 있다.^{12-16, 18,28,29)}

東醫寶鑑에서 白芷와 貝母가 함께 配伍된 處方은 모두 17種으로 이중 10種이 癰疽에 活用되고 있다. 芷貝散에 天花粉 金銀花 皂角刺 穿山甲 當歸 瓜蒌仁 甘草가 加味된 加味芷貝散이 乳癰에 活用되는 것이 代表的인 例이다.²⁾

白芷는 주로 藁本 細辛 川芎 등과 配伍되어 頭痛에 活用하고, 貝母는 知母 杏仁 등과 配伍하여 咳嗽에 活用하며 그 외에 桔梗, 瓜蒌仁, 天花粉, 沙蔘 등과 주로 配伍한다¹⁵⁾. 이와 같이, 白芷는 一般적으로 外感으로 인한 頭痛에 使用하고, 貝母는 주로 咳嗽에 鎮咳祛痰의 目的으로 活用한다. 그러나 白芷와 貝母가 配伍되어 芷貝散이 되면 白芷와 貝母 各各의 一般적인 效能과는 전혀 다른 乳結核에 活用되는데 이는 方劑構成原理 中の 하나인 方向轉換說에 該當하는 것이다¹⁹⁾.

한편 白芷와 貝母는 모두 抗癌作用이 있는 것으로 報告된 바가 있으며 특히 貝母는 子宮頸部癌, 肺癌, 乳腺癌, 림프腺腫瘍 등에 效果가 있는 것으로 알려져 있으나 그 作用機轉은 밝혀지지 않고 있는 實情이며²⁰⁻²²⁾, 한편 結核이란 몸의 一定한 部位에 단단한 멍울이 생기는 것을 말한다고 한 것으로 보아²⁴⁾ 芷貝散에는 抗腫瘍效果 혹은 抗癌效果가 있을 것으로 생각할 수 있다.

著者는 芷貝散의 抗癌效果에 관하여 探究하던 중 貝母가 림프腺腫瘍에 效果가 있으며 림프性 白血病의 경우에 림프組織의 增大가 뚜렷이 나타난다는 점에³¹⁾ 着眼하여 芷貝散이 白血病에 미치는 效果를 考察하여 有意한 結果를 얻었으며 또한 芷貝散의 方劑

學的 意義를 알아보고자 芷貝散과 構成藥物인 白芷, 貝母로 各各 나누어 實驗하여 세 가지의 實驗群을 比較 觀察한 바 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 芷貝散 水溶性 抽出物

白芷 및 貝母는 圓光大學校 益山韓方病院에서 購入하여, 白芷 50 g과 貝母 50 g을 混合하여 芷貝散을 調劑하였다. 調劑된 芷貝散은 물 600 cc와 함께 대응약탕기 (DWP-1800P)에 2시간 30분간 100°C로 熱湯하여 上層 液을 濾過한 다음 凍結乾燥시켜 7.2 g의 固形物을 얻었다. 같은 方法으로 白芷 100 g과 물 600 cc 그리고 貝母 100 g과 물 600 cc에서 凍結乾燥된 固形物을 각각 白芷 12 g 貝母 6.15 g을 얻었다. 모든 固形物은 -70°C에 保管하여 實驗에 使用하였다.

Prescription of Jipaesan

韓藥名	生藥名	重量(g)
白 芷	Angelica Dahurica	50.0
貝 母	Fritillariae Verticillata	50.0
Total amount		100.0

2) 白芷 水溶性 抽出物 成分分離

白芷 水溶性 抽出物에서 Beak 등³³⁾의 方法에 따라서 imperatorin, isoimperatorin, bergapten, 그리고 oxypeucedanin 을 分離하였다.

3) 貝母 水溶性 抽出物 成分分離

貝母 水溶性 抽出物에서 Li 등³⁴⁾의 方法에 따라서 verticinone, ebedine, ebeidinone, isovericine, verticine, 그리고 hupehenine 을 分離하였다.

4) 急性白血病 細胞

HL-60 細胞는 韓國細胞 銀行에서 購入하여, Pae 等³⁵⁾의 方法에 따라서 RPMI 1640 (Sigma) 培養液에서 培養하여 實驗에 使用하였다.

5) 測定試藥

CD11b-FITC, CD14-PE 및 流式細胞 分析用 標準 試藥은 BD 社의 製品을 使用하였고, PARP 抗體는 Santa Cruz 製品을 使用하였다. DAPI 및 다른 測定 用 試藥은 모두 Sigma 社 製品을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 細胞增殖抑制 實驗法

Trypan blue 染色과 hemocytometer를 使用하였으며 光學顯微鏡을 이용하여 죽은 세포와 살아있는 細胞를 計數하였다.

2) 細胞毒性 測定法

細胞毒性은 MTT 測定法을 利用하였다. 세포배양 관(96 well plate)에 目的細胞를 200 μ l씩 分株하여 3 시간이상 細胞培養基 안에서 安定化시킨 후에, 여러 實驗條件의 細胞에 5 mg/ml의 MTT를 100 μ l/ml를 각각 添加하였다. 4시간 후에 살아있는 細胞에 의해 生成된 紫色 formazan의 檢出은 100 μ l의 10% SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24시간 細胞培養基에 放置한 다음 ELISA 分析裝置로 565 nm波長에서 吸光度를 測定하였다.

3) Wright-Giemsa 및 DAPI 染色法

細胞核의 染色은 國際診斷試藥(日本) 社의 製品인 Wright-Giemsa kit와 DAPI (Sigma)를 利用하였다. 먼저, 細胞를 slide에 cytospin를 利用하여 附着시키고 1차 固定液으로 5분간 固定한 다음 2차 Giemsa 核染色試藥으로 3분간 核을 染色하였다. 마지막으로 5분간 3차 染色液으로 細胞質을 染色하고, PBS로 3

회 洗滌하여 光學 顯微鏡하에서 觀察하였다. DAPI 染色은 1차 固定液으로 5분간 固定한 다음 2차 DAPI 螢光染色液으로 核을 5분간 染色하고 PBS로 3번 洗滌하여 暗室에서 螢光顯微鏡하에서 觀察하였다. 한 slide에 대하여 세 부분을 選擇하여 寫眞撮影하고, 이것을 結果算出에 使用하였다.

4) DNA 分節 確認法

Promega 社의 Wizard Genomic DNA isolation kitTM를 利用하여 모든 DNA를 核으로부터 分離하였다. 分離된 DNA 5 μ g을 1.5% agarose gel에서 전 기영동(50 V, 2시간)을 實施한 후에 ethidium bromide로 染色하여 UV 燈 下에서 DNA의 分節을 觀察하고 寫眞撮影하였다.

5) 流式細胞 分析法

HL-60 細胞를 24-well culture plate에 well 당 1 x 10⁵이 되도록 準備한 뒤에, 여러 濃度의 目的한 試料를 넣고 目的한 時間 동안 培養하였다. 培養된 細胞를 500 g에서 遠心分離하여 收去한 후에 0.5% BSA와 0.1% sodium azide를 포함한 PBS로 2번 洗滌한 다음, 200 μ l의 PBS에 1 x 10⁶의 細胞를 넣고 FITC가 結合된 CD11b 및 PE가 結合된 CD14 抗體를 最終濃度가 25 μ g/ml이 되도록 넣은 뒤 빛을 遮斷한 狀態로 4°C에서 30분간 反應시켰다. 反應이 끝난 후 反應하지 않은 抗體를 除去하기 위하여 0.5% BSA와 0.1% sodium azide를 포함한 PBS로 2번 洗滌한 뒤에 FACS vantage (Becton Dickinson, 미국)을 使用하여 細胞表面에 發現된 각각의 抗體를 觀察하였다. 한편, 細胞週期 分析을 위하여 試料가 目的에 따라서 處理된 細胞를 500 g에서 遠心分離하여 PBS로 2번 洗滌하였다. 5 x 10⁵의 細胞에 trypsin, trypsin inhibitor와 PI를 각각 200 μ l 첨가한 후, 室溫에서 10 분간 反應시킨 다음 FACS vantage를 使用하여 cell cycle의 각 phase 내에 있는 細胞 數를 測定하였다.

6) Western blotting

HL-60 細胞에 目的한 試料을 處理한 후, 細胞를 모아서 冷 HBSS로 2회 洗滌하였다. 얻어진 세포를 RIPA 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin)으로 얼음에서 溶解하였다. 溶解 細胞液을 2 x 試料緩衝溶液과 섞어 95°C에서 3분간 끓인 후, 10% SDS-PAGE를 施行하였다. 電氣泳動이 끝난 gel의 蛋白質을 nitrocellulose membrane으로 移動시킨 후, 10% skim milk로 室溫에서 2시간 동안 blocking하였다. Anti-PARP 抗體로 室溫에서 2시간 結合시킨 후에, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase 2차 抗體로 室溫에서 1시간 反應시켰다. 最終적으로 ECL kit (Amersham, 영국)를 利用하여 PARP 切斷 程度를 確認하였다.

7) NBT 測定法

目的한 試料에 의해서 細胞分化된 HL-60 細胞를 96-well plate에 100 μl씩 分株하여 3 시간이상 細胞 培養基 안에서 安定化시킨 후에, 200 nM PMA 10 μl 와 NBT 10 μl (50 mg/ml)를 處理하여 細胞 培養基에 1시간 放置한 다음 100 μl의 10% SDS로 紫色 formazan을 溶解시켜 ELISA 分析器機로 吸光度를 測定하여 細胞分化程度를 算出하였다.

Ⅲ. 實驗 結果

1. 芫貝散(Jipeasan) 水溶性 抽出物에 依한 細胞增殖 抑制效果

急性白血病은 未分化된 幹細胞가 無制限으로 增殖하는 疾病으로, 이 病症治療에는 白血病細胞의 增殖를 抑制시키는 것이 가장 效果의이다. 따라서, 著者는 먼저 芫貝散 水溶性 抽出物이 急性白血病 細胞

인 HL-60 細胞의 細胞增殖에 어떠한 影響을 주는지 調査하였다. 芫貝散 水溶性 抽出物은 濃度 依存的으로 HL-60 細胞의 細胞增殖를 抑制시켰다 (Fig.1).

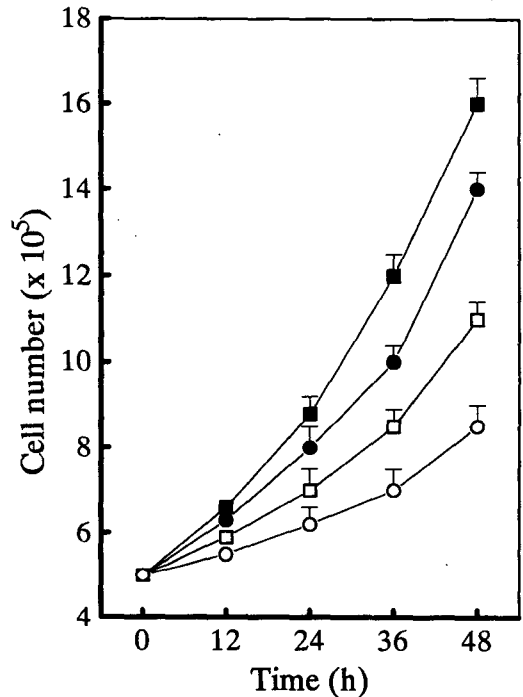


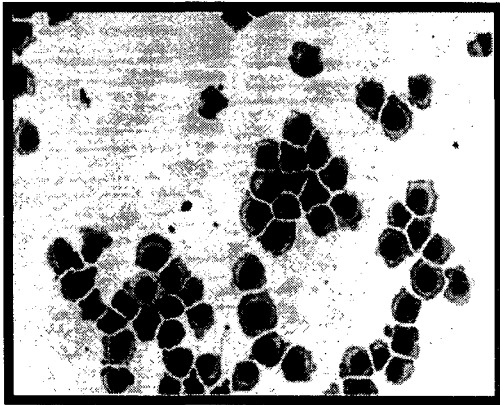
Figure 1. Effect of water extracts of *Jipeasan* on the growth of HL-60 cells. Cells (5×10^5) were cultured for indicated times without (—■—) or with 10 μg/ml(—●—), 50 μg/ml(—□—), and 100 μg/ml(—○—) of water extracts of *Jipeasan*.

2. 芫貝散 水溶性 抽出物에 의한 細胞 分化 및 細胞枯死 誘發效果

芫貝散 水溶性 抽出物에 의한 HL-60 細胞의 增殖 抑制效果를 考察하고자 芫貝散 水溶性 抽出物이 處理된 HL-60 細胞의 核을 Wright-Giemsa 染色法으로 調査하였다. 芫貝散 水溶性 抽出物은 HL-60 細胞의 細胞分化 ("D"로 표시) 및 細胞枯死 ("A"로 표시)를

誘導하였다 (Fig.2). 이러한 結果는 芫貝散 水溶性 抽出物이 HL-60 細胞를 細胞分化 및 細胞枯死를 誘導하여 白血病細胞의 增殖抑制效果를 보이는 것으로 判斷된다.

Untreated



100µg/ml of water extracts of Jipaesan

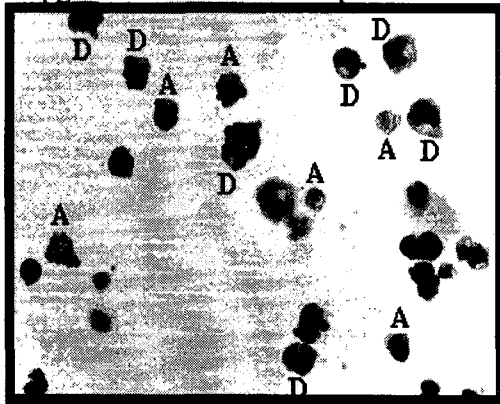


Figure 2. Effect of water extracts of *Jipaesan* on the morphology of HL-60 cells. Cells (5×10^4) were cultured for 48 h with or without 100 µg/ml of water extracts of *Jipaesan*. "D" and "A" in the figure represent differentiating and apoptotic cells, respectively.

3. 白芷 및 貝母 水溶性 抽出物에 의한 細胞分化 및 細胞枯死 誘發效果

芫貝散은 白芷 (*Angelica Dahurica*) 와 貝母 (*Fritillariae Verticillata*)로 構成되어 있다. 따라서, 各各의 藥材成分의 細胞分化 및 細胞枯死 誘發效果를 調査하여 Table 1에 보였다. Table 1의 調査結果에 의하면 芫貝散의 細胞分化 誘發效果는 貝母의 水溶性 抽出物에 의한 것이며, 細胞枯死 誘發效果는 白芷의 水溶性 抽出物에 의한 것으로 判明되었다.

Table 1. Effects of water extracts of *Fritillariae Verticillata* and *Angelica Dahurica* on the morphology of HL-60 cells^{a)}.

^{a)} Cells (5×10^4) were cultured for 48 h with medium alone or water extracts of *Jipaesan*, *Fritillariae Verticillata*, or *Angelica Dahurica*.

Treatment	Differentiating cells (%)	Apoptotic cells (%)
Medium	< 1	< 3
<i>Jipaesan</i> (100 µg/ml)	52 ± 3	33 ± 5
<i>Fritillariae Verticillata</i> (100 µg/ml)	48 ± 3	5 ± 1
<i>Angelica Dahurica</i> (100 µg/ml)	7 ± 1	38 ± 4

4. 白芷 水溶性 抽出物에서 細胞枯死 誘發效果 成分分離

白芷 水溶性 抽出物에서 細胞枯死 誘發效果가 있는 物質을 分離하고자 하였다. 白芷 (*Angelica Dahurica*) 에는 多量의 furanocoumarin 誘導體가 含有되어 있는 것으로 알려져 있다³³⁾. 白芷 水溶性 抽出物에서 imperatorin, isoimperatorin, bergapten, 그리고 oxypeucedanin 등이 分離되었다. 이들 중에서 imperatorin (Fig.3) 은 HL-60 細胞에 대하여 細胞枯死 誘發效果가 있었다. 그러나, 다른 物質에 대해서는 細胞分化 및 細胞枯死 活性이 없었다.

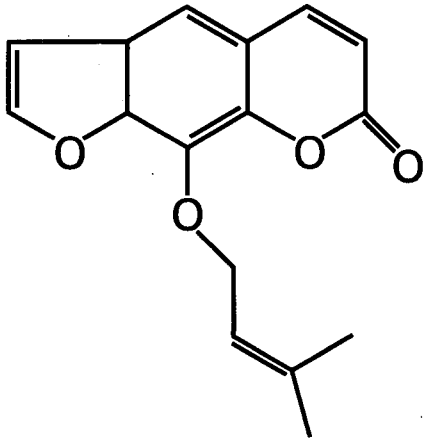


Figure 3. Chemical structure of imperatorin isolated from the water extracts of *Angelica Dahurica*.

5. Imperatorin 의 細胞枯死 誘發效果

Figure 4는 白芷 水溶性 抽出物에서 純粹하게 分離된 imperatorin의 細胞增殖抑制 效果를 調査한 것으로 IC₅₀ 값이 10 ± 0.4 μM로 判明되었다. 이 濃度에서 imperatorin 은 HL-60 細胞의 genomic DNA 分節을 誘導하였다 (Fig.5). 또한, imperatorin 이 處理된 HL-60 細胞의 核은 여러 조각으로 切片化되어 있는 典型的인 細胞枯死 現象을 보였다 (Fig.6). 細胞枯死의 程度를 調査하고자 流式細胞分析器를 利用하여 分節된 DNA 量을 定量하였다 (Fig.7).

Imperatorin 10 μM에서 細胞枯死는 57.3% 發生되었다. 또한, imperatorin 은 細胞枯死를 誘導하는 caspase-3 酵素活性을 增加시켰고 (Fig.8), DNA 損傷 復舊酵素(PARP)를 切斷시켰다 (Fig.9). 즉, imperatorin 은 HL-60 細胞를 caspase-3 酵素依存的으로 細胞枯死를 誘發시켰다.

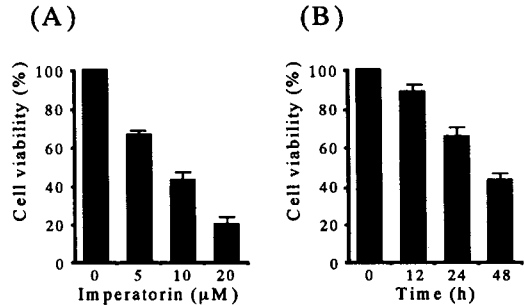


Figure 4. Effects of imperatorin on the viability of HL-60 cells. A) HL-60 cells were treated with indicated concentrations of imperatorin for 48 h. B) HL-60 cells were incubated with 10 μM of imperatorin for indicated periods. Cell viability was determined by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium assay as described. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of absorbance (490 nm) of treated cells and control cells (treated with 0.1% dimethylsulfoxide; vehicle). Data represent means ± SE of three determinations.



Figure 5. DNA fragments were separated by electrophoresis in 1.8% agarose gel. Cells were treated with indicated concentrations of imperatorin for 48 h.



Figure 6. Cells were incubated without or with 10 μ M of imperatorin for 48 h. Asterisks represent fragmented nuclei.

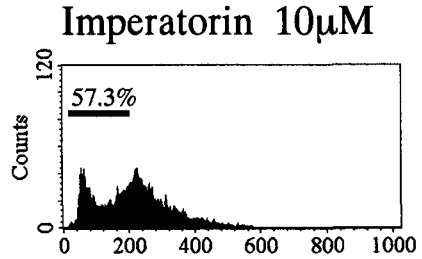
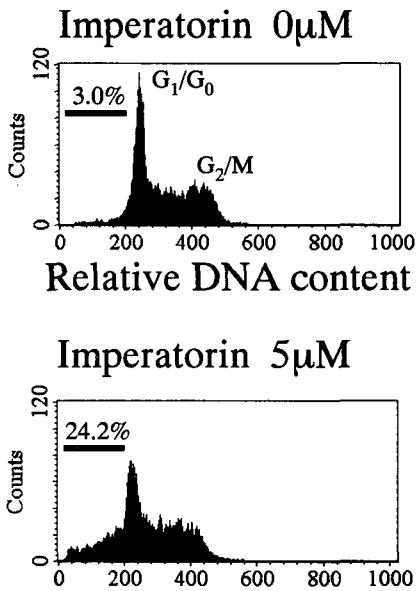


Figure 7. Determination of hypodiploid cells by flow cytometry. HL-60 cells were cultured with indicated concentrations of imperatorin for 48 h. The method of flow cytometry used is described in Materials and Methods. Bar represents % of hypodiploid cells. Similar results were obtained in three separated experiments.

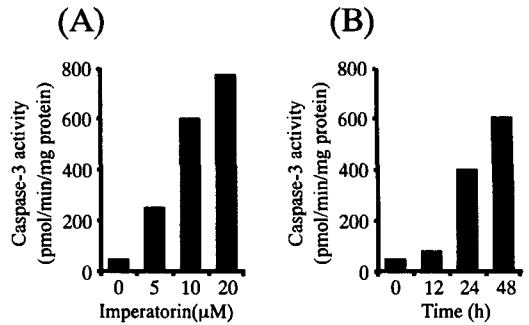


Figure 8. Caspase-3 activation in imperatorin-treated HL-60 cells. A) Concentration-dependent activation of caspase-3 by imperatorin in HL-60 cells. Cells were incubated with indicated concentrations of imperatorin for 48 h. B) Time-dependent activation of caspase-3 by imperatorin in HL-60 cells. Cells were treated with 10 μ M of imperatorin for indicated periods. The caspase-3 activity was determined as described in Materials and methods.

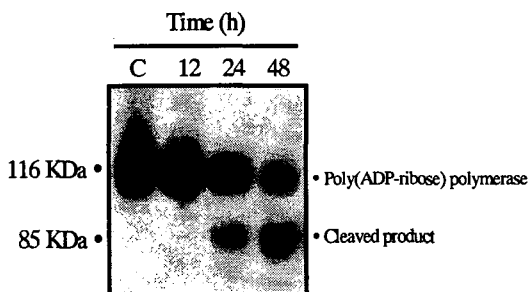


Figure 9. Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during imperatorin-induced apoptosis of HL-60 cells. Cells were incubated with 10 μ M of imperatorin for indicated periods, and the cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase was detected by Western blotting with an anti-poly(ADP-ribose) polymerase antibody. Similar results were obtained in three separate experiments. C; imperatorin-untreated control.

6. 貝母 水溶性 抽出物에서 細胞分化 誘發效果 成分分離

貝母 水溶性 抽出物에서 細胞分化 誘發效果가 있는 物質을 分離하고자 하였다. 貝母 (*Fritillariae Verticillata*) 에는 多量의 isosteroidal alkaloid 誘導體가 含有되어 있는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 貝母 水溶性 抽出物에서 verticinone, ebeidine, ebeidionone, isoverticine, verticine, hupehenine 등이 分離되었다. 이들 중에서 verticinone (Fig.10) 은 HL-60 細胞에 대하여 細胞分화를 誘導하였다.

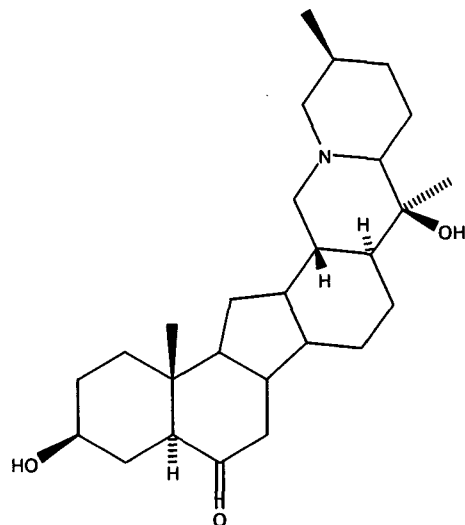


Figure 10. Chemical structure of verticinone isolated from the water extracts of *Fritillariae Verticillata*.

7. Verticinone 의 細胞分化 誘發效果

NBT 測定法에 의해서 verticinone 의 細胞分化 程度를 調査하였다. Verticinone 은 濃度 및 處理時間 依存的으로 HL-60 細胞를 細胞分化시켰다 (Fig.11). Verticinone 에 의해서 細胞分化된 HL-60 細胞의 核의 形態는 granulocyte 의 核의 形態와 類似하였다 (Fig.12). 一般적으로 HL-60 細胞는 細胞分化 促進劑에 의해서 monocyte 또는 granulocyte 로 細胞分化한다. CD11b 는 granulocyte 와 monocyte 에서 發現되며, CD14 는 monocyte 에서 發現된다. Figure 13 은 verticinone 이 HL-60 細胞를 granulocyte 로 細胞分화를 誘導시킴을 보인 結果로, 오직 CD11b만 發現된 細胞만 觀察되었다. 以上の 結果로부터 貝母 水溶性 抽出物에 의한 細胞分化 效果가 주로 verticinone 에 의한 것임을 알 수 있었다.

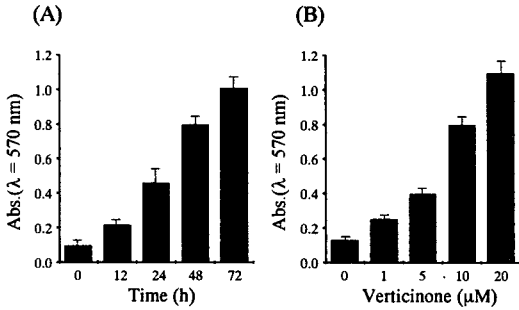
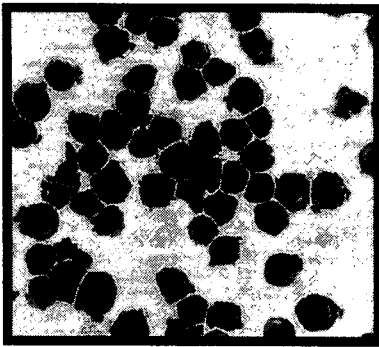


Figure 11. Effect of verticinone on the differentiation of HL-60 cells. NBT reduction by the HL-60 cells cultured for indicated times with $10\ \mu\text{M}$ of verticinone was assayed as described in the text. Values are the mean \pm SE of five different experiments.

Verticinone $0\ \mu\text{M}$



Verticinone $10\ \mu\text{M}$

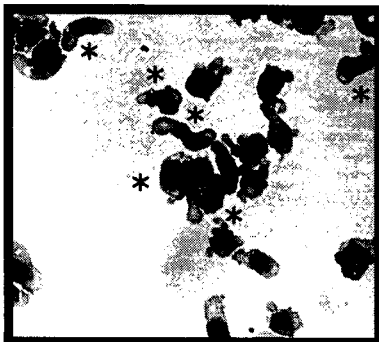


Figure 12. Morphological change of HL-60 cells treated with verticinone. HL-60 cells were cultured with medium ($0\ \mu\text{M}$) or $10\ \mu\text{M}$ of verticinone for 48 h, and nuclei were stained with Wright-Giemsa solution. The asterisks inside the figure represent a granulocytic nucleus.

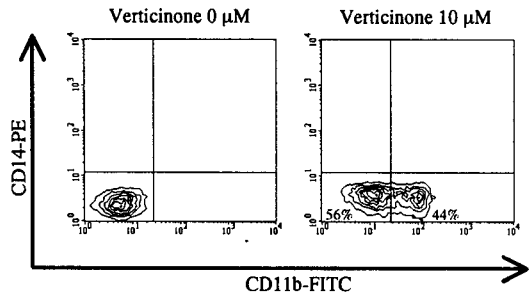


Figure 13. Expression of CD11b in HL-60 cells by verticinone. HL-60 cells were cultured for 48 h with medium ($0\ \mu\text{M}$) or $10\ \mu\text{M}$ of verticinone. CD11b expression in the cells was measured with a flow cytometer as described in the text. The percentages inside the figure represent CD11b-negative or CD11b-positive cells; 44% of HL-60 cells were differentiated by verticinone.

8. Imperatorin 과 verticinone 간의 相互作用 效果

茛貝散은 白茛 및 貝母로 構成된 藥物로 두 藥劑 成分에 包含된 白血病 治療 有效成分인 verticinone 과 imperatorin 간 相互作用이 있을 可能性이 있다. 이러한 可能性을 調査하여, Table 2에 調査結果를 보였다. Verticinone 및 imperatorin 을 單獨處理한 結果보다 複合處理했을 경우 細胞分化 效果가 有意

하게 增加되었다. 이러한 細胞分化 上昇效果를 合理的으로 說明할 수 있는 보다 深度있는 研究가 要請된다.

Table 2. Effects of bioactive components of *Fritillariae Veriticillata* and *Angelica Dahurica* on the differentiation and apoptosis of HL-60 cells^{a)}.

Treatment	Differentiation index CD11b-positive cells (%)	Apoptosis index Hypodiploid cells (%)
Medium	< 1	< 2
Imperatorin (5 μM)	< 2	24 ± 3
Verticinone (5 μM)	21 ± 2	4 ± 1
Imperatorin (5 μM) + Verticinone (5 μM)	63 ± 2	28 ± 4

^{a)} Cells (1 x 10⁶) were cultured for 48 h with medium alone, imperatorin, verticinone, or imperatorin plus verticinone.

IV. 考 察

苴貝散은 白苴와 貝母가 各等分으로 構成되어 있다. 白苴는 消腫止痛의 效能이 있어 癰疽, 瘡瘍 등에 活用할 수 있으나 주로 外感으로 인한 頭痛 및 頭面部的 諸疾患에 使用되고 있다. 貝母 또한 清熱散結의 效能이 있어 癆瘵, 乳癰 등에 活用할 수 있으나 주로 咳嗽에 鎮咳祛痰의 目的으로 많이 活用된다²⁵⁻²⁷⁾. 이렇게 外感으로 인한 頭痛에 使用되는 白苴와 咳嗽에 鎮咳祛痰의 目的으로 活用되는 貝母가 配伍된 苴貝散이 白苴와 貝母 各各의 一般的인 效能과는 전혀 다른 乳結核에 活用되는 것은 方劑學의 理論 중 方向轉換說로 說明할 수 있다. 方向轉換說이란 각기 다른 性質과 氣味效能을 가지고 있는 藥

物들을 配伍하여 서로의 偏勝을 調節하거나 본래의 效能을 變化시키므로써 새로운 效果를 얻어낸다는 學說로서 古芎朮湯에서 黃芩과 白朮이 配伍되어 安胎作用을 나타낼 수 있는 境遇가 여기에 該當된다.¹⁹⁾

東醫寶鑑에서 白苴와 貝母가 함께 配伍된 處方은 모두 17種으로 이중 10種이 癰疽에 活用되고 있다. 癰疽란 몸의 骨節과 臟腑 등이 膿는 病症으로 주로 感染에 의한 化膿性 炎症으로 볼 수 있다. 그러나 東醫寶鑑에서는 “俗以癰疽瘰, 付於癰疽之列, 豈知瘰癧與癰疽, 不過癰疽之一物乎”라고 하였으며 또한 癰은 처음에 核과 같은 것이 생겨서 이후 돌처럼 堅硬하고 不痛하며 一般的으로 몇 年後에야 潰爛되어, 血汁이 나오며 膿은 없는 것이라고 하였으니 이는 癰疽가 cancer와도 關聯이 있음을 示唆하는 것이다.^{2,23)}

또한 東醫寶鑑에서 “乳房結核, 不痛不痒, 五七年後, 外腫紫黑, 內漸潰爛, 名曰乳癰”이라 하여 乳結核이 오래되면 乳癰이 된다고 하였으니 이는 乳癰이 곧 乳房癌임을 示唆하는 것이다.²⁾

苴貝散의 抗癌效果에 대해서는 報告된 바가 없으나 白苴와 貝母는 모두 抗癌作用이 있는 것으로 알려져 있다. 結核이란 몸의 一定한 部位에 단단한 멍울이 생기는 것으로 東醫寶鑑에 “瘰癧之證, 內經謂之結核”²⁾이라 하여 瘰癧과 結核을 같은 것으로 보았다. 瘰癧은 주로 목, 가슴, 옆구리, 겨드랑이 등에 생긴 멍울로 淋巴節結核, 慢性淋巴節炎 등에 該當된다. 따라서 本 研究에서는 苴貝散이 抗癌效果가 있을 것으로 생각되며 또한 림프성 白血病의 境遇에 림프조직의 增大가 뚜렷이 나타난다는 점에 着眼하여 苴貝散이 白血病細胞에 미치는 影響을 實驗하였다.

白血病은 白血球가 腫瘍性 增殖을 招來한 疾患으로 모든 血球의 起原인 多機能 幹細胞(multipotential stem cell)가 어떤 原因에 의해서 分化 및 成熟이 이루어지지 않고 계속적으로 增殖을 반복하는 疾患으로 增殖의 主體가 되는 白血球系 細胞의 性狀에 따라 크게 骨髓性 白血病과 림프성 白血病으로 分類한

다. 白血病의 症狀은 病型에 따라 다르지만 貧血에 의해 숨이 차거나, 心悸亢進, 出血, 感染, 倦怠感, 微熱, 림프節 腫脹 等의 症狀이 나타나며 韓醫學에서는 熱勞, 急勞, 血證, 溫病, 積聚, 痰核 等의 範疇에 속한다^{30,31)}. 白血病은 好發對象이 廣範圍하여 어떤 年齡 또는 性別에도 發生하는 매우 致命的인 疾患 중 하나로 早期發見 그리고 效果的인 治療法 및 治療劑가 절실히 필요하다. 白血病 治療法으로 化學療法, 免疫療法, 放射線療法, 遺傳子治療法 그리고 細胞分化 및 細胞枯死 誘導 治療法 등이 提案되었으나 急性 白血病은 細胞分化 및 細胞枯死 調節機能의 異常에 의한 것이므로, 細胞分化 및 細胞枯死 誘導 治療法이 가장 理想的인 治療法이라고 볼 수 있다.

急性白血病은 未分化된 幹細胞가 무제한으로 增殖하는 疾病으로, 이 病症治療에는 白血病細胞의 增殖을 抑制시키는 것이 가장 效果的이다. 따라서, 著者는 먼저 茛貝散 水溶性 抽出物이 急性白血病 細胞인 HL-60 細胞의 細胞增殖에 어떠한 影響을 주는지 調査한 바 茛貝散 水溶性 抽出物은 濃度 依存的으로 HL-60 細胞의 細胞增殖을 抑制시켰다(Fig.1). 이러한 HL-60 細胞의 增殖抑制가 어떻게 일어나는지 알아보고자 茛貝散 水溶性 抽出物이 처리된 HL-60 細胞의 核을 Wright-Giemsa 染色法으로 조사해보니 茛貝散 水溶性 抽出物은 HL-60 細胞의 細胞分化 ("D"로 표시) 및 細胞枯死 ("A"로 표시)를 유도하였다 (Fig.2). 따라서 茛貝散 水溶性 抽出物은 HL-60 細胞의 細胞分化 및 細胞枯死를 유도하여 白血病細胞의 增殖抑制效果를 보이는 것으로 判斷된다.

茛貝散은 白芷 (*Angelica Dahurica*) 와 貝母 (*Fritillariae Verticillata*)로 構成되어 있다. 따라서, 各各의 藥材成分의 細胞分化 및 細胞枯死 誘導效果를 調査하여 Table 1에 보였다. Table 1의 調査結果에 의하면 茛貝散의 細胞分化 誘導效果는 貝母의 水溶性 抽出物에 의한 것이며, 細胞枯死 誘導效果는 白芷의 水溶性 抽出物에 의한 것으로 判明되었다.

白芷 (*Angelica Dahurica*) 에는 다량의

furanocoumarin 誘導體가 含有되어 있는 것으로 알려져 있으며 白芷 水溶性 抽出物에서 imperatorin, isoimperatorin, bergapten, 그리고 oxypeucedanin 등이 分離되었다. 이들 중에서 imperatorin (Fig.3)이 HL-60 細胞에 대하여 細胞枯死 誘發效果가 있었으나 다른 물질에 대해서는 細胞分化 및 細胞枯死 活性이 없었다. 文獻에 의하면, imperatorin 은 抗炎症, 癌誘發抑制 및 肝保護 活性이 있는 것으로 알려져 있으나³³⁾, 細胞枯死 誘發效果는 보고된 바 없다.

Figure 4는 白芷 水溶性 抽出物에서 純粹하게 分離된 imperatorin의 細胞增殖抑制效果를 조사한 것으로 IC₅₀ 값이 10 ± 0.4 μM로 判明되었다. 이 濃度에서 imperatorin 은 HL-60 細胞의 genomic DNA 分節을 誘導하였다 (Fig.5). 또한, imperatorin 이 처리된 HL-60 細胞의 핵은 여러 조각으로 切片化되어 있는 典型的인 細胞枯死 現象을 보였다 (Fig.6). 細胞枯死의 程度를 調査하고자 流式細胞分析器를 利用하여 分節된 DNA 量을 定量하였다 (Fig.7). Imperatorin 10 μM에서 細胞枯死는 57.3% 發生되었다. 또한, imperatorin 은 細胞枯死를 誘導하는 caspase-3 酵素活性을 增加시켰고 (Fig.8), DNA 損傷 復舊酵素(PARP)를 切斷시켰다 (Fig.9).

즉, imperatorin 은 HL-60 細胞를 caspase-3 酵素 依存的으로 細胞枯死를 유발시켰다. 以上の 結果로부터 白芷 水溶性 抽出物에 의한 細胞枯死 誘發效果가 imperatorin 에 의한 것임을 알 수 있었다.

貝母 (*Fritillariae Verticillata*) 에는 다량의 isosteroidal alkaloid 誘導體가 含有되어 있는 것으로 알려져 있으며, 貝母 水溶性 抽出物에서 verticinone, ebeidine, ebeiedinone, isovericine, verticine, hupehenine 등이 分離되었다.

이들 중에서 verticinone (Fig.10)이 HL-60 細胞에 대하여 細胞分化를 誘導하였으나 Verticinone에 의한 細胞分化 活性은 지금까지 報告된 바 없었다. NBT 測定法에 의해서 verticinone의 細胞分化 程度를 調査해 보니 Verticinone 은 濃度 및 處理時間 依存的

으로 HL-60 細胞를 細胞分化시켰다 (Fig.11). Verticinone 에 의해서 細胞分化된 HL-60 細胞의 핵의 形態는 granulocyte 의 핵의 形態와 類似하였다 (Fig.12). 일반적으로 HL-60 細胞는 細胞分化 促進劑에 의해서 monocyte 또는 granulocyte 로 細胞分化한다. CD11b 는 granulocyte 와 monocyte 에서 發現되며, CD14 는 monocyte 에서 發現된다. Figure 13 은 verticinone 이 HL-60 細胞를 granulocyte 로 細胞分化를 誘導시킴을 보인 結果로, 오직 CD11b만 發現된 細胞만 觀察되었다. 以上の 結果로부터 貝母 水溶性 抽出物에 의한 細胞分化 效果가 주로 verticinone에 의한 것임을 알 수 있었다.

苳貝散은 白苳 및 貝母로 構成된 藥物로 두 藥劑 成分에 包含된 白血病 治療 有效成分인 verticinone 과 imperatorin 간 相互作用이 있을 可能性이 있으므로 이러한 可能性을 調査하여 Table 2 에 調査結果를 보였다. Verticinone 및 imperatorin 을 單獨處理한 結果보다 複合處理했을 경우 細胞分化 效果가 有意하게 增加하였다. 이러한 結果는 方劑構成原理 중 두 가지 藥物이 配伍될 때 한 藥物이 다른 藥物의 主作用을 補助하는 配合關係인 相使關係가 있음을 示唆하는 것이나¹⁹⁾, 이러한 細胞分化 上昇效果를 合理的으로 說明할 수 있는 보다 深度있는 研究가 要請된다.

V. 結 論

著者は 苳貝散이 急性 白血病 HL-60 細胞에서 미치는 影響에 대하여 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

- 1) 苳貝散은 HL-60 細胞를 細胞分化 및 細胞枯死를 誘導시켜 白血病 細胞의 增殖을 有意하게 抑制시켰다.
 - 2) 苳貝散을 構成하는 貝母는 HL-60 細胞의 細胞分化를 誘導하였다.
 - 3) 苳貝散을 構成하는 白苳는 HL-60 細胞의 細胞枯死를 誘導하였다.
 - 4) 貝母에서 分離된 verticinone 은 細胞分化 效果가 있었다.
 - 5) 白苳에서 分離된 imperatorin 은 細胞枯死 效果가 있었다.
 - 6) Verticinone 과 imperatorin 을 HL-60 세포에 複合處理하게되면 verticinone 에 의한 細胞分化 效果가 有意하게 增加되었다.
- 本 研究結果는 보다 深度있는 研究 후에 苳貝散이 急性 白血病 治療의 目的으로 使用될 수 있음을 보였다.

參 考 文 獻

1. 李 槿 : 醫學入門婦人小兒外科, 大星文化社, 서울, p. 364, 1990.
2. 許 浚 : 東醫寶鑑, 법인문화사, 서울, p. 690-692, 1409, 1475, 1999.
3. 黃 度淵 : 方藥合編, 永林社, 서울, p. 216, 1991.
4. 江 克 明 外 : 校正方劑大辭典, 醫聖堂, 서울, p. 500, 1991.
5. 彭 懷 仁 外 : 中華醫方精選辭典上卷, 上海科學技術文獻出版社, 上海, p. 993, 1998
6. 張 浩 良 外 : 中國方劑精華辭典, 天津科學技術出版社, 天津, p. 542, 1996.
7. 江 克 明 外 : 簡明方劑辭典, 上海科學技術出版社, 上海, p. 500, 1989.
8. 彭 懷 仁 外 : 中醫方劑大辭典, 人民衛生出版社, 北京, p. 146, 1996.
9. 辛 民 教 : 臨床本草學, 永林社, 서울, p. 506, 636, 1996.
10. 梁 基 相 : 漢藥의 配合과 應用, 傳統醫學研究所,

- 서울, p. 43, 44, 287, 1993.
11. 辛民教 : 本草求真, 木과士, 서울, pp. 245-246, 1999.
 12. 辛民教 外 : 鄉藥生藥大事典, 永林社, 서울, pp. 170-171, 409-411, 1990.
 13. 楊濟 : 臨證用藥配伍指南, 中國醫藥科技出版社, 北京, p. 29, 332, 1996.
 14. 李尙仁 外 : 漢藥臨床應用, 成輔社, 서울, p. 45, 447, 449, 1986.
 15. 熊輔信 : 臨床韓藥辭典, 醫聖堂, 서울, p. 10, 161, 1994.
 16. 張文康 外 : 中藥現代研究與應用, 學苑出版社, 北京, 一卷 p. 703, 二卷 p. 1521 四卷 p. 3831
 17. 김형균 외 : 한약의 약리, 고려의학, 서울, p. 179, 248-249 2000.
 18. 王溶生 外 : 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京, p. 128, 1983.
 19. 尹用甲 : 東醫方劑와 處方解說, 醫聖堂, 서울, p. 63, 65, 1998.
 20. 李宇彬 外 : 抗癌中藥藥理與應用, 黑龍江科學技術出版社, 哈爾濱, pp. 194-195, 444-445, 1999.
 21. 苗明三 外 : 法定中藥藥理與臨床, 世界圖書出版公司, 西安, p. 339, 1998.
 22. 張廷模 外 : 中華臨床中藥學下卷, 人民衛生出版社, 北京, p. 1323, 1998.
 23. 洪元植 外 : 漢醫學辭典, 成輔社, 서울, p. 561, 1990.
 24. 김동일 외 : 東醫學事典, 까치, 서울, p. 62, 1990.
 25. 서부일 외 : 國譯本草備要, 一中社, 서울, pp. 157-159, 188-191, 2000.
 26. 李尙仁 : 本草學, 書苑堂, 서울, pp. 222-224, 352-354, 1997.
 27. 凌一揆 外 : 中藥本草學, 保健新聞社, 서울, p. 172, 173, 544, 545, 1998.
 28. 陸昌洙 外 : 亞細亞本草學, 癸丑文化社, 서울, p. 27, 556, 557, 1998.
 29. 김호철 : 한약약리학, 집문당, 서울, p. 74, 357, 359, 2001.
 30. 문구 외 : 암 동서의 결합치료2, 원광대학교출판국, 익산, p. 741, 745, 1999.
 31. 金在洵 외 : 原色最新醫療大百科事典8, 新太陽社, 서울, pp. 93-96, 1998.
 32. 강세윤 외 : 오늘의 진단 및 치료 I, 한우리, 서울, pp. 570-574, 754-782, 1999.
 33. Baek NI, Ahn EM, Kim HY, Park YD. Furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. Arch Pharm Res. 2000 23:467-470.
 34. Li SL, Lin G, Chan SW, Li P. Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. J Chromatogr A. 2001 909:207-214.
 35. Pae, H.O., Seo, W.G., Kim, N.Y., Oh, G.S., Kim, G.E., Kim, Y.H., Kwak, H.J., Yun, Y.G., Jun, C.D. and Chung, H.T. (2001) Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. Leukemia Research 25, 339-346.