

Adriamycin에 의해 손상된 심근세포에 대한 동과의 영향에 관한 연구

홍기연* · 이영미 · 이정현 · 이강창¹ · 조혜원² · 한경수²

원광대학교 의과대학, 1:원광대학교 한의학 전문대학원, 2:원광대학교 치과대학

Study on the Effect of Benincasae Semen on Cultured Mouse Myocardial Cells Damaged by Adriamycin

Gi Youn Hong*, Young Mi Lee, Jung Hun Lee, Kang Chang Lee¹, Hae Won Cho², Kyung Su Han²

School of Medicine, 1:Graduate School of Oriental Medicine, 2:College of Dental Medicine, Wonkwang, University

To examine the cardiotoxic effect of adriamycin on cultured rat myocardial cells, cytotoxicity was measured by MTT assay after cultured myocardial cells were grown with various concentrations of adriamycin(ADR) for 48 hours. The protective effect of Benincasae Semen(BS) on ADR-induced cardiotoxicity was also examined in these cultures. ADR decreased cell viability of cultured rat myocardial cells remarkably in a dose- and time-dependent manners. In protective effect of BS, it was very effective in blocking ADR-induced cytotoxicity. From these results, it is suggested that ADR shows cardiotoxicity, and the herba extract, BS is very effective in preventing ADR-induced cytotoxicity on cultured rat myocardial cells.

Key words : Adriamycin, Cultured myocardial cell, Benincasae Semen

서 론

최근 환경오염이 갈수록 심해지면서 대기나 수질의 오염으로 인하여 국민의 건강을 크게 위협하고 있는 반면 서구식 생활양식의 도입으로 의식주는 풍부하여 졌으나 운동부족과 과도한 업무에 의한 스트레스로 인하여 면역성이 감소되면서 암을 비롯한 당뇨 나 고혈압과 같은 각종 난치성질환에 노출되는 확률이 매우 높아졌다^{1,2)}. 특히 서구식의 식사습관으로 인하여 채식보다는 육식을 더욱 편애하면서 직장암을 비롯한 위암, 소화기암등이 증가하면서 암에 대한 예방이나 치료적 방법이 사회적 문제로 부각하게 되었다^{3,4)}. 지금까지 암을 완전히 정복할 수 있는 획기적인 치료방법이 아직까지 개발되어 있지 않으며 또한 암발생에 대한 기전도 확실히 밝혀져 있지 않다⁵⁾. 따라서 선진국에서는 암 정복을 위하여 국가산하기관에 암연구소를 설치하여 막대한 지원을 하고 있으며 암의 효과적인 치료를 위하여 신약개발에 많은 인력과 투자를 아끼지 않고 있다^{1,6)}. 최근 암발생기전을 DNA

전사수준에서 방어할 수 있는 연구의 하나로 백혈병의 치료제인 글리백과 같은 신약재가 개발되면서 암정복에 새로운 전환기를 맞이하게 되었다⁷⁾. 현재 암의 효과적인 치료를 위하여 항암제의 투여는 물론이고 방사선 치료나 레이저 치료를 병행함으로써 암의 치료에 효과적인 방법의 하나로 인정 받고 있다. 항암제는 암을 치료하는데 필수적인 약재로 암세포에 각각 특이한 기전으로 작용함으로써 효과적인 항암작용을 나타내고 있다^{2,8,9)}. 지금까지 밝혀진 항암작용을 보면 암세포에 대하여 DNA나 RNA와 같은 핵산물질의 합성저해를 비롯하여 단백질합성의 저해, 세포분열이나 증식 및 분화를 억제함으로써 암의 성장을 방해한다^{7,10)}. 즉, cytosine arabinoside는 DNA polymerase의 활성을 저해함으로써 DNA의 합성을 억제하며¹¹⁾ vincristin은 tubulin과 결합하여 microtubule의 생성을 억제하여 항암작용을 나타낸다¹²⁾. 항암제 중 adriamycin은 streptomyces peuceetii var. caesioides에서 추출하는 anthracycline 계통의 항암제로 DNA나 RNA의 염기사이로 삽입되어 그 결과 DNA나 RNA의 합성을 저해함으로써 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다^{13,14)}. 그러나 지금까지 개발된 대부분의 항암제들은 독성이 강할 뿐만 아니라 항암치료시 암세포뿐만 아니라 정상적인 세포까지도 손상을 줌으로서 심각한 부작용

* 교신저자 : 홍기연, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학

E-mail : hong57@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-1228

· 접수 : 2002/09/10 · 수정 : 2002/10/15 · 채택 : 2002/12/02

을 초래하게 되며 치료후에도 심각한 후유증으로 인하여 많은 괴로움에 시달리게 된다^{1,15,17}. 따라서 세계 각국은 독성이 없거나 부작용이 적은 항암제를 개발하기 위하여 꾸준히 연구를 진행하고 있다^{3,8,16}. 한편, 한약추출물이 암을 비롯한 뇌졸중이나 고혈압과 같은 각종 난치성 질환치료에 효과적인 약리활성을 가지고 있다는 것이 보고되면서 한약추출물을 이용한 병변의 치료에 많은 관심을 끌게 되었다¹⁸. 예를 들면 암의 독성을 완화시키는데 인삼의 약리활성이 매우 효과적 이었다는 보고가 된 바 있다¹⁹. 따라서 한약추출물을 이용한 치료약재의 개발이 매우 활발히 시도되고 있으며 한약추출물은 양약에 비하여 독성이 거의 없거나 적기 때문에 약의 부작용을 최소화 시킬수 있다는 잇점이 있다. 또한 한약추출물은 각 성분을 가감함으로써 새로운 약리활성을 나타내기 때문에 이의 작용기전을 밝히는 데는 매우 어려운 점이 없지는 않다^{18,19}. 근래에 세포배양법이 널리 보급됨에 따라 각종 세포를 이용하여 병변의 모델이나 이의 치료를 위한 신약재의 개발등이 각광을 받고 있다. 따라서 본 연구는 ADR의 독성효과를 규명하기 위하여 흰쥐의 심근세포를 배양한 하여 여러 농도의 ADR을 처리한 다음 이의 독성효과를 분석하였으며, 또한 ADR의 세포독성에 대한 한약추출물인 동과(Bennicasae Semen, RPM)의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

흰쥐의 심근세포의 분리는 Olson 등⁸의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 심장에서부터 분리된 심근세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척한 후 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)에 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음 미리 poly-L-lysine (Sigma)으로 전 처리한 96-multiwell plate에 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 7일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, 분주후 3일째에 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

2. 한약재추출

본 실험에 사용한 한약재의 추출은 한약재와 증류수를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결 건조하여 분말 시료를 얻었다.

3. 시약제조

본 실험에 사용된 adriamycin(ADR, Sigma)은 1mM, 10mM, 100mM, 1M 등의 저장액을 각각 만들어 냉암소에 보관후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. Adriamycin(ADR)의 처리

배양중인 심근세포를 여러 농도의 ADR이 포함된 배양액내

에서 48시간 배양한 후 ADR의 독성효과를 약제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 분석하였다.

5. 한약추출물 처리

일정 시간 배양한 심근세포에 MTT50값의 ADR을 처리하기 2시간 전에 여러 농도의 동과(Bennicasae Semen, BS)가 포함된 배양액에서 배양한 후 BS가 adriamycin에 미치는 영향을 조사하였다.

6. 세포독성 조사

배양 심근세포에 여러 농도의 ADR을 처리한 후 ADR이 흰쥐의 심근세포에 미치는 독성효과와 또한 배양 심근세포에 대한 BS의 방어효과를 Mosmann¹⁷의 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)분석법에 의하여 spectrophotometer로 490nm에서 흡광도를 조사하여 대조군과 비교 측정하였다.

7. DNA 합성 조사

DNA의합성은 [3H] thymidine 10Ci/ml를 세포에 일정시간 동안 처리한 다음 이를 섬광계수기에 의하여 조사하였다.

8. 통계처리

실험 결과에 대한 유의성 검정은 ANOVA후 Student's t-test에 의하였으며 p값이 0.05이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Adriamycin(ADR)의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

ADR이 6~15 μ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 흰쥐의 배양 심근세포를 48시간 동안 배양한 후 ADR의 독성효과를 MTT분석법에 의하여 조사한 결과 6 μ M ADR의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 86%로 나타났으며 9 μ M과 12 μ M ADR처리에서는 각각 73%와 52%($p < 0.05$)로 나타났다. 또한 15 μ M ADR의 처리에서는 27%($p < 0.01$)로 나타났다(Fig. 1).

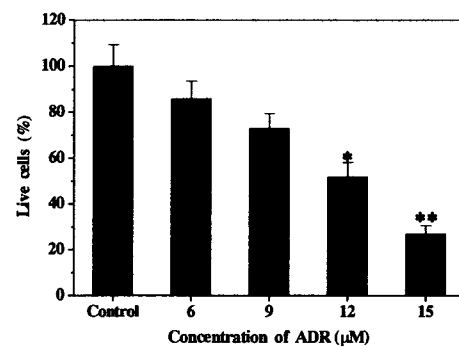


Fig. 1. A dose-response of adriamycin(ADR). ADR-induced myotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 6, 9, 12 and 15 μ M ADR for 48 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SD (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2) 시간에 따른 영향

시간의 변화에 따른 ADR의 독성효과를 조사하기 위하여 12 μ M ADR이 포함된 배양액에서 심근세포를 24~60시간 배양 후 세포의 생존율을 조사한 결과 24시간 배양에서는 대조군에 비하여 84%로 나타났으며 36시간 배양에서는 65%로 나타났다. 또한 48시간과 60시간 배양에서는 세포의 생존율이 각각 49%($p<0.05$)와 24%($p<0.01$)로 나타났다(Fig. 2).

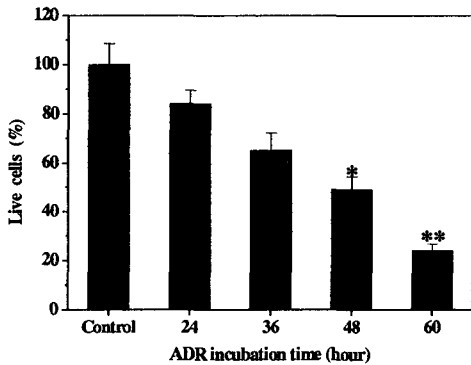


Fig. 2. A Time-response of adriamycin(ADR). ADR-induced myotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 24, 36, 48 and 60 hours at 12 μ M ADR, respectively. The results indicate the mean \pm SD (n=6). * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2. 한약추출물의 효과

한약추출물인 동과(BS)가 ADR의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 12 μ M ADR에 배양 심근세포를 노출시키기 2시간 전에 BS가 20~120 μ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 BS가 ADR의 독성에 미치는 영향을 DNA 합성율에 의하여 조사하였다. 그 결과 12 μ M ADR만을 처리한 경우 DNA 합성율은 대조군에 비하여 48%로 나타났는데 비하여 20 μ g/ml의 BS 처리에서는 62%로 나타났다. 또한 70 μ g/ml의 처리에서는 DNA 합성율이 75%로 나타났다. 그러나 120 μ g/ml BS를 처리한 경우 DNA 합성율은 ADR만의 처리에 비하여 89%로 나타났으며 이는 ADR만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다($p<0.01$)(Fig. 3).

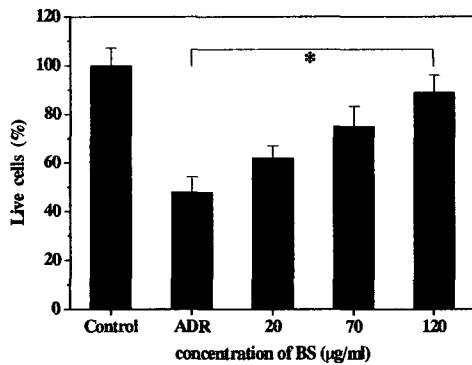


Fig. 3. Dose-response relationship of Benincasae Semen(BS) for its protective effect on adriamycin(ADR)-induced cardiotoxicity by MTT assay. Cultured rat myocardial cells were preincubated with BS for 2 hours before exposure to 12 μ M ADR for 48 hours. The results indicate the mean \pm SD (n=6). ** $p<0.01$

고찰

항암제는 위암을 비롯하여 식도암, 간암, 직장암과 같은 소화기계의 암이나 폐암과 같은 호흡기계의 암 등의 치료에 효과적인 항암작용을 나타냄으로서 널리 사용되고 있다^{2,15)}. 즉, cytosine arabinoside는 백혈병의 치료에, puromycin은 악성종양 및 포진성 종양치료에 actinomycin D는 윌름스종양(Wilm's tumor)에 각각 사용되고 있다^{4,12)}. 그러나 이들 대부분 항암제들은 독성이 강하기 때문에 암세포는 물론 정상적인 세포에 손상을 주기 때문에 강한 세포독성을 가지고 있다^{2,13)}. 따라서 항암제를 장기간 환자에 투여한 경우 심각한 후유증을 초래하게 된다는 잘 알려진 사실이다^{4,14)}. 본 실험에서는 항암제의 일종인 adriamycin (ADR)이 흰쥐의 심근세포에 미치는 세포독성을 조사하기 위하여 배양 심근세포에 6~15 μ M의 농도로 ADR이 각각 포함된 배양액에서 처리한 결과 ADR을 처리한 농도와 시간에 비례하여 흰쥐의 심근세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다. 이러한 본 실험 결과는 Olson 등⁶⁾이 토끼의 심근세포에 ADR을 처리한 결과 ADR이 세포의 퇴행성 변화를 나타냄으로서 세포독성 효과를 나타냈다고 보고함으로써 본 실험의 결과와 일치하였다. 또한 Chung 등²⁾도 백서의 심근세포에 ADR을 처리한 결과 ADR이 세포에 독성을 나타냈다고 보고함으로써 ADR이 여러 종류의 세포에 세포독성효과를 가지고 있음을 증명하였다. 이러한 연구 결과들은 ADR이 세포의 DNA나 RNA의 합성을 저해함으로써 세포에 손상을 주어 세포생존율의 감소를 초래하였을 가능성이 클 것으로 생각한다¹⁰⁾. 이러한 이유의 하나로 본 실험에서 MTT assay에 의하여 세포생존율이 감소되었는데 이는 사립체내의 효소의 활성화와 밀접한 관련이 있기 때문이다¹⁷⁾. 그 외에도 ADR이 세포내 내형질세망이나 리보솜과 같은 세포소기관에 영향을 주어 세포의 단백질합성을 억제했을 가능성도 배제할 수는 없다¹⁶⁾. 한편, 한약추출물인 동과(BS)가 ADR의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 12 μ M ADR을 48시간 동안 배양 심근세포에 처리하기 전에 20~120 μ g/ml BS를 2시간 동안 처리한 경우 세포의 생존율이 ADR만의 처리인 38%에 비하여 모두 증가한 것으로 나타났으며 특히 120 μ g/ml 처리에서는 ADR만의 처리에 비하여 89%로 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다($p<0.01$).

본 실험 결과는 BS가 ADR의 세포독성을 방어하는 약리활성을 가지고 있음을 말해주고 있음을 말해주고 있다¹⁸⁾. 그러나 이의 정확한 분석을 위하여서는 DNA나 RNA의 전사수준에서의 신호전달체계나 또는 단백질합성에 관여하는 효소활성과 같은 측면의 연구가 병행되어야 할 것으로 생각한다.

결론

Adriamycin(ADR)이 심근세포에 미치는 세포독성효과를 조사하기 위하여 흰쥐의 배양 심근세포에 여러 농도의 ADR을 48시간 동안 처리한 후 세포생존율에 의하여 독성효과를 조사하였으며, 또한 ADR의 독성효과에 대한 한약추출물인 동과(BS)의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 ADR은 배양 심근세포에 처리한

농도와 시간에 비례하여 세포생존율의 감소를 나타냈으며 또한 한약추출물인 BS가 ADR에 의해 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 ADR에 의한 세포독성을 방어하였다. 위의 결과로 부터 ADR은 흰쥐의 배양 심근세포에 독성효과를 나타냈으며 한약추출물인 BS가 ADR의 독성을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 말

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. Danenberg P. V., Lockshin A. : Thydylate synthetase substrate complex formation. *Mol Cell Biochem* 43:48-57, 1982.
2. Silverstrini R, Gambarucci C, Daedia T : In Vitro Biological Activity of Adriamycin. *Tumor* 56:137-148, 1970.
3. Iijima S, Spindle A, Pederson RA : Developmental and cytogenetic effect of potassium dichromate mouse embryos in vitro. *Teratology* 27:109-115, 1983.
4. Phillips SG, Phillips DM : Nucleoli of diploid cell strains. Their normal ultrastructure and the effects toycamycin and actinomycin D. *Cell Biol* 49:785-802, 1971.
5. Fiume L, Wieland T : Amamitins, chemistry and action. *FEBS Letters* 8:1-5, 1970.
6. Ghione M, Bertazzolli C : In biochemical and clinical aspects of coenzyme Q(Folkers. K.& Yamamura, Y, eds). pp.183-189 Elsevier Amsterdam, 1977.
7. Kramer B : The effects of actinomycin D on the nucleolus and on pigment synthesis in pigment cells of *Xenopus laevis*: An ultrastructural study. *J Anat* 130:809-820, 1980.
8. Olson HM, Young DM, Priem DJ, Leroy HF, Reagan RI : Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in Adriamycin treated rabbits. *Am J Pathol* 77:439-454, 1974.
9. Heine U, Langloi AJ, Beard JW : Ultrastructural alterations in avian leukemic myoblasts exposed to actinomycin D in vitro. *Cancer Res* 26:1847-1858, 1966.
10. Lowry OH, Rosenbrough NG, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
11. Furlong NB, Suto J, Brown T, Chavez H, Huriberi RB : Induction of limited DNA damage by the antitumor agent cainis acridine. *Cancer Res* 38:1329-1335, 1978.
12. Russo A, Paccierotti F : Meiotic arrest and aneuploidy induced by vinblastine in mouse oocytes. *Mut Res* 202:215, 1988.
13. Bonadonna G, De Lena M, Beretta G : Preliminary clinical screening with adriamycin in lung cancer. *Eur J Cancer* 7:365-367, 1971.
14. Takahashi K, Fujita Y, Mayumi T, Hama T, Kishi T : Effect of adriamycin cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem pharm Bull* 35:326-334, 1987.
15. Chung TY, Choi MK, Kim JJ, Kim JM, Park ST : A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. *Chonnam J Med Sci* 1:221-226, 1988.
16. Kasten FH : Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cells in culture. *Acta Histochem* 9:637-647, 1971.
17. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65: 55-63, 1983.
18. 성현재 외 : 암치료에 있어서 체질과 항암효과에 관한 한의학 적 연구. 서울. 한국한의학연구원논문집 3(1):85-101, 1997.
19. 배만종 : 인삼 엑기스의 경구 면역 관용에 관한 연구. 한국식품영양학회지. 9:176-180, 1996.