

KH-19의 5-flurouracil 부작용 억제 효력 및 기전 연구

양동식 · 성현제* · 윤유식
한국한의학연구원, * 세명대학교 한의과대학

Abstract

Studies on medicinal protection with KH-19 against side effect of 5-flurouracil and its mechanism

Yang Dongsik, Sung Hyunjea*, Yoon yoosik

Korea Institute of Oriental Medicine

* College of Oriental Medicine, Semyung University

The objective on this study was to investigate medicinal protection with KH-19, which was composed of 9 kinds of oriental herbs tonifying the blood, against side effect of chemotherapy in mice and its mechanism through microarray. Not only WBC (white blood cell), and PLT (platelet) as a hematopoiesis toxicity indicator but also spleen weight as an immune toxicity indicator was reduced significantly 7 day after 5-flurouracil (FU) treatment. However, reduction of WBC, PLT, and spleen weight after 5-FU treatment was significantly recovered by KH-19. For mechanic study on KH-19 action, gene expression in mouse spleen treated 5-FU was compared with gene expression in mouse treated 5-FU and KH-19. The result indicates that 23 genes were increased in expression level over 2 fold and 41 genes were decreased in expression level more than 2 fold at mouse spleen by KH-19 treatment. KH-19 mechanism may be complicated more than other drug which of mechanism were composed of single compound because KH-19 was composed of various compounds.

Key words : Chemotherapy, Hematopoiesis, Melanoma cell, Microarray

I. 서론

종양세포를 선택적으로 파괴하는 화학요법제는 50년전에 소개되어져 수많은 우수한 항암제가 개발되어 왔다. 그 중에서 5-flurouracil(FU)은 가장 오

래된 화학요법제 중 하나로 1957년 최초로 합성되어 전 세계적으로 사용되어 지고 있다.¹⁾ Pyrimidine 대사를 저해하는 5-FU는 유방암, 대장암, 직장암, 위암, 췌장암, 식도암, 간암, 두경부암, 방광암, 피부암 등에 사용되고 있다.¹⁾ 그러나, 5-FU의 투여량과

투여계획에 따라 조혈기능억제, 메스꺼움 및 구토, 점막 궤양, 탈모증 등의 부작용이 심각하게 나타났다. 이러한 부작용들은 화학요법제들이 암세포와 활발하게 자라는 정상세포 (골수조혈세포 및 점막, 피부, 모근의 상피세포)에 구별됨이 없이 작용하기 때문이다.²⁾ 따라서 화학요법중의 암환자는 세밀한 관찰을 필요로하며 부작용이 너무 심각해지기 전에 화학요법적인 처치의 강약을 조절하는 것이 필요하다. 이와 같은 화학요법제의 부작용은 암환자의 일상생활의 활력 저하와 치료비용이 막대하게 지출되어 삶의 질 저하를 야기시킨다.³⁾

위와 같이 심각한 화학요법 부작용에 대책으로 수년 전부터 동양의학적 치료법이 제시되고 있다.

임상에서 화학요법의 부작용을 동양의학으로 경감하려는 시도에 있어서는 현재 중국이 가장 앞서 있다고 할 수 있다. 중국에서 수행된 동물연구에 의하면 한방제제와 화학요법을 병행할 경우 백혈구 수치를 높이고 골수유핵세포 및 골수조혈간세포의 증식을 촉진하였으며 생존율을 증가시켰다.^{4),5)} 또한 임상연구에서는 더욱더 다양한 시도가 이루어지고 있다.⁶⁾⁻¹⁰⁾

본 연구는 현재 임상적 활용범위가 가장 넓은 화학요법제 5-FU에 대하여 동물실험모델을 통해 한방 복합처방 KH-19의 조혈 및 면역독성억제에 대한 효력연구와 작용기전 연구를 수행하였다.

Table 1. List of genes which were increased in expression level over 2 fold at mouse spleen by KH-19 treatment.

Title	Expression ratio
Troponin T1, skeletal, slow	3.51
Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2	2.93
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	2.86
Cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 14 (leukotriene B4 omega hydroxylase)	2.79
Wingless-related MMTV integration site 7B	2.78
Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	2.59
Keratin complex 1, acidic, gene 16	2.58
Insulin-like 5	2.57
Nucleoporin-like protein 1	2.51
G protein-coupled receptor 105	2.43
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	2.36
Ribosomal protein L27a	2.36
Thioredoxin 1	2.34
Lymphocyte antigen 6 complex, locus F	2.33
Myeloid leukemia factor 1	2.28
Alcohol dehydrogenase 1	2.26
Endothelin 1	2.24
Calcium binding protein P22	2.21
Amylase 2, pancreatic	2.19
Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	2.14
Rab6 interacting protein 1	2.14
Mitochondrial ribosomal protein L11	2.12
Hypothetical protein MGC36635	2.07

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

조혈기능을 강화시키는 9가지 약용식물로 구성된 한약재를 KH-19라 명명하였다. KH-19에 구성된 한약재는 규격품으로 산지가 명시된 것을 약재상으로부터 구입하였다. KH-19를 구성하는 한약재 중 국내에서 생산되지 않는 2종을 제외하고는 모두 국내 재배품을 구입하였으며, 나머지 2종은 중국 사천성에서 재배, 수확된 제품을 구입하였다. 구입한 한약재는 즉시 추출하여 사용하였다. 5-flurouracil(FU)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 사용 직전 0.9% saline에 녹여서 사용하였다.

2. 한약재 조성물 KH-19의 제조

백작약, 산수유, 숙지황 등 건조시킨 한약재 1800g에 정제수 11ℓ를 가하여 3시간동안 130℃의 온도에서 1~2 kgf/cm²의 압력으로 추출하였다. 압력은 처음에는 높였다가 점차로 떨어지게 하였다. 추출액을 망사로 거르고 침전물을 제거한 후 -70℃에서 얼린 후 동결건조기(일신, Bondiro)를 이용하여 -55℃, 10 mTorr의 조건에서 용매를 완전히 제거한 추출물을 얻었다. 이렇게 얻어진 추출물을 약사발로 분쇄하여 가루 형태로 만들어 밀봉된 tube에 넣어 보관하였다.

3. 세포배양 및 실험동물

3-1. 세포배양

본 연구에서 사용된 세포주 B16-BL6는 MD Anderson Cancer Center(Texas, USA)의 I.J. Fidler

박사로부터 제공받았고, 5% fetal bovine serum을 포함한 DMEM배지에서 배양되었으며 passage number가 30회 이내의 것이 사용되었다.

3-2. 실험동물

4주령 된 C57BL/6 mouse 수컷을 대한바이오링크로부터 구입하여, 1주일간 동물 사육실 환경에 순응시킨 후, 부작용 억제효능 실험에 사용하였다.

4. 화학요법제 부작용 억제 효능 측정

현재 임상적으로 가장 널리 쓰이는 항암제인 5-FU의 부작용 억제 효능을 Sugiyama 등 (1995)의 방법을 변형하여 측정하였다.

각각의 실험군은 10마리로 구성되었다. C57BL/6 마우스를 군당 10마리씩으로 나누고 오른쪽 옆구리의 털을 깎은 후, B16-BL6 melanoma 세포를 한 마리당 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ cell 씩 0.1ml의 부피로 피하에 주사하였다. 각각의 마우스에 5-FU를 200mg/Kg 1회씩 복강 투여한 후 oral zonde를 사용하여 한약재를 매일 1회 7일간 경구투여 하였고, 투여시 한약재 용량은 인간용량(human dose)을 기준으로 각각 1배, 5배였다. 하루동안 절식시키고 다음날 마우스를 무게를 측정하고, ether로 마취시킨 후 심장으로부터 채혈하여 1.4% K₂EDTA용액이 소량 담긴 tube에 혈액을 받은 후 Coulter counter(Coulter cooperation, USA)를 사용하여 적혈구(RBC), 백혈구(WBC), 혈소판(PLT)을 측정하였고, 비장을 적출하여 무게를 측정하였다.

Table 2. List of genes which were decreased in expression level over 2 fold at mouse spleen by KH-19 treatment.

Title	Expression ratio
Transmembrane 4 superfamily member 6	0.50
Leptin receptor	0.50
Cbfp300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	0.49
Kruppel-like factor 16	0.48
Sperm associated antigen 5	0.48
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	0.47
Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	0.47
Myocyte enhancer factor 2A	0.47
Chondroitin sulfate proteoglycan 2	0.47
TEA domain family member 1	0.46
Fibrinogen-like protein 2	0.46
Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog	0.46
T-cell leukemia, homeobox 3	0.46
Synaptosomal-associated protein, 91 kDa	0.46
Homeo box D10	0.45
Zinc finger protein 278	0.45
Solute carrier family 12, member 7	0.45
Keratin complex 1, acidic, gene 3	0.45
Calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	0.45
CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	0.44
Alpha 1 microglobulin/bikunin	0.43
Arkadia	0.43
Neutrophil cytosolic factor 4	0.42
Exportin 4	0.42
Hypothetical protein MGC12070	0.42
Transcription factor 21	0.41
Plexin B3	0.40
Nuclear pore membrane protein 121	0.40
Torsin family 1, member B	0.38
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	0.38
Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	0.37
Interleukin 7	0.36
Amiloride binding protein 1 (amine oxidase, copper-containing)	0.35
Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	0.33
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	0.33
Delta-like 1 (Drosophila)	0.32
Proline dehydrogenase	0.31
Oxysterol binding protein-like 1A	0.28
RAB6, member RAS oncogene family	0.28
Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	0.27
Homeo box A10	0.22

5. Total RNA 분리

Total RNA 분리는 Trizol Reagent(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)를 사용하여 guanidinium-thiocyanate 법으로 분리하였다. 먼저 부고환 지방조직을 액체질소 하에서 파쇄한 다음, 1ml의 Trizol 용액을 부가하고 200ul의 chloroform을 부가하여 완전히 섞은 다음 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 phenol: chloroform을 부가하고 원심분리 후 상층액에 0.6배의 isopropanol과 0.1배의 3M sodium acetate를 부가하여 RNA를 침전시켰다.

6. Microarray assay

Microarray assay를 수행하기 위하여 chip은 14K mouse cDNA (Digital-Genomic)을 사용하였다. 부고환 지방조직에서 추출된 total RNA 20ug에 1ug의 Oligo(dT) primer, 10×RT buffer 2ul, Reverse transcriptase 100 U를 부가하여 first cDNA strand를 합성하였다. first strand cDNA가 합성되는 동안에 cDNA를 labeling하기 위하여 control에는 cy3, 실험군에는 cy5를 부가하여 각각 labeling 하였다. 이들 probe를 cDNA chip과 hybridization을 수행하고 1×SSC로 2번 washing 한 다음 dry하였다. 이를 가지고 Microarray assay를 수행하였다. Microarray 분석을 위한 program으로는 Genecluster 및 Treeview program (Stanform Uni. USA)를 사용하였다.

7. 통계처리

실험결과와 통계처리는 모든 data는 mean±S.E.M.으로 나타내었으며, 통계분석은 SPSS 프로그램(윈도우용 7.5)을 사용하여 일원배치 분산분석과 사후검정으로서 Duncan test에 의해 수행되었다.

III. 결과 및 고찰

1. KH-19의 효력 연구

1. 1. 조혈독성에 미치는 영향

5-FU의 부작용은 실험동물 mouse를 이용한 기초연구가 이미 진행되었고 백혈구 수치의 감소 등의 조혈 독성에 대한 결과가 보고되었다.⁹⁾

5-FU치리에 따른 mouse의 백혈구(WBC) 수치는 이미 보고된 바와 같이 51.6%의 감소로 5-FU가 심각한 조혈 독성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 1). 5-FU 투여는 WBC 수치뿐만 아니라 혈소판(PLT)에서도 40.1%의 큰 감소를 보였고(Fig. 2), 적혈구(RBC)에서도 14.6% 감소를 관찰 할 수 있었다(Fig. 3). 위 결과에서는 5-FU의 조혈독성을 명백히 나타내고 있지만 적혈구의 감소폭이 적은 것으로 보아 조혈 기능 중에서 적혈구 생성 기능이 가장 저항성이 강한 것으로 사료된다.

5-FU의 조혈 독성을 경감시키기 위하여 조혈기능과 관련된 9가지의 한약제로 구성된 KH-19를 인간 용량 1배를 처리 한 결과 5-FU에 의해 심각하게 감소된 WBC 수치를 48.0% 증가시켰고, PLT 수치에서도 20.6% 회복을 관찰할 수 있었다. WBC와 PLT 증가현상은 KH-19가 조혈기능 억제에 대항하는 생체방어 시스템을 발현하는 것에 영향을 미치는 것이라고 생각된다. 또한 인간 용량 5배의 KH-19 처리시 64.2%, 63.4%의 회복으로 용량의존적으로 회복이 증가함을 보였다.

1. 2. 비장에 미치는 영향

5-FU는 조혈독성뿐만 아니라 비장중량감소, 임파구 감소 등의 면역 독성을 유발함이 보고되었다.⁹⁾

동물실험에서 5-FU에 의해 가장 심하게 영향을

받는 장기인 비장은 면역독성의 지표로 이용되고 있다. 비장 중량에 있어서는 대조군 대비 24.1%의 유의적 중량감소를 관찰 할 수 있었다(Fig. 4). 그러나, KH-19를 인간용량의 1배, 5배 처리함에 따라 각각 57.5%, 40.8%씩 회복함을 관찰할 수 있었다. 비장중량감소 회복은 조혈 면역 독성 완화를 의미함을 알 수 있었다.

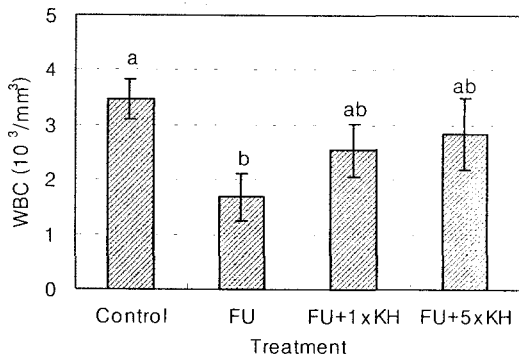


Fig. 1. Effect of KH-19 on WBC against hematopoiesis toxicity in B16-BL6 melanoma cell inoculated mice.

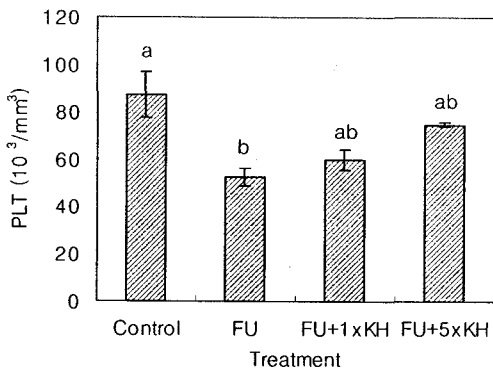


Fig. 2. Effect of KH-19 on PLT against hematopoiesis toxicity in B16-BL6 melanoma cell inoculated mice.

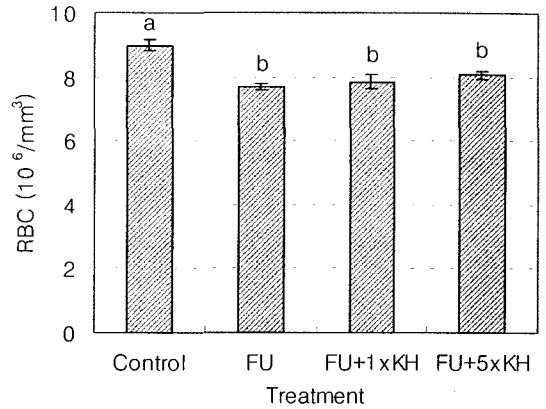


Fig. 3. Effect of KH-19 on RBC against hematopoiesis toxicity in B16-BL6 melanoma cell inoculated mice.

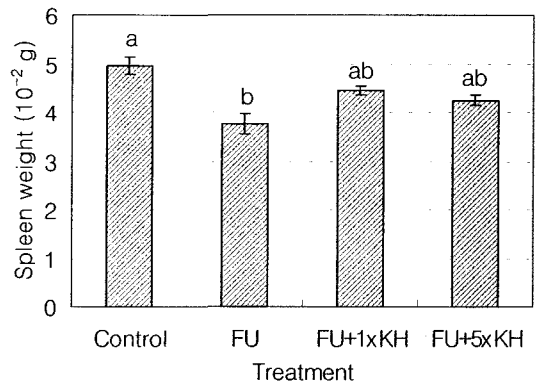


Fig. 4. Effect of KH-19 on spleen weight against 5-FU immunological toxicity in B16-BL6 melanoma cell inoculated mice.

2. KH-19의 작용기전 연구

KH-19의 조혈 및 면역계 부작용 억제 기전 연구를 위하여 5-FU를 투여한 쥐의 비장과 5-FU와 KH-19를 병용한 쥐의 비장으로부터 mRNA를 분리

하여 유전자군의 발현정도를 비교함으로써, 생체 조직 내에서 발현양상의 변화가 나타나는 유전자군들을 찾아내고, 발현양상 변화와 조혈독성과 면역독성 완화의 작용기전을 알아 보았다.

14,000여 가지 유전자 군중에서 5-FU 처리군과 비교하여 5-FU와 KH-19을 병용한 쥐의 비장에서 2배이상 발현량이 변화한 유전자군은 증가 23개, 감소 41개로 결과는 Table 1, 2와 같다.

이중에서 KH-19에 의해 발현증가가 일어난 유전자군은 macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, kinesin-associated protein 3를 포함하여 23종이었다 (Table 1). KH-19에 처리에 의해 macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2는 2.93배, acyl-Coenzyme A dehydrogenase는 2.86배 발현량이 증가하였다. Cytochrome P450, subfamily IVF는 주로 간에서 약물의 대사에 관여하는데 비장에서도 일부 발현된 것으로 보이며 KH-19에 의해 179% 발현증가 하였다. 이는 KH-19이 생체내의 대사작용을 활성화시킴을 보여주고 있다. 단백질 합

성에 역할을 하는 Ribosomal protein L27a의 경우 KH-19에 의해 136% 발현증가하여 KH-19가 단백질 합성을 촉진함을 암시해준다. Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1은 성장인자 및 adhesion 단백질들의 coreceptor 역할을 한다고 알려져 있다. KH-19은 이것의 발현을 114% 증가시켜서 세포들이 성장인자에 보다 잘 반응하도록 도와주는 역할을 한다고 볼 수 있고 세포간의 상호작용에도 도움을 줄 수 있다. Rab6 interacting protein 1은 세포의 GTPase와 관련된 신호전달에 관여하고 있으며 KH-19에 의해 114% 발현증가하였다. KH-19이 GTPase 관련 세포내의 신호전달을 촉진할 가능성을 제시한다.

위의 결과로부터 복잡한방인 KH-19의 경우에는 작용기전이 다양할 것이고, 생체내에서 하나의 target에 작용하지 않고 여러 가지 target에 작용하리라 생각되며 이를 위하여서는 분석적으로 하나의 작용점을 찾는 연구보다는 작용의 pattern을 분석하는 방법이 유용할 수도 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Duschinsky R, Plevan E, Heidelberg C. The synthesis of 5-fluorouracil. J. Am. Chem. Soc. 1957. 79, 4559-4560.
2. Skeel RT, Handbook of Cancer Chemotherapy Fifth Ed. 1999, Lippincott Williams & Wilkins, pp.108-109
3. Calhoun E.A., Chang C., Welshman E.E., Fishman D.A., Lurain J.R., Bennett C.L. Evaluating the total costs of chemotherapy-induced toxicity. The Oncologist 2001. 6, 441-445.
4. Sugiyama, K., Ueda, H., Ichio, Y., and Yokota, M., Improvement of cisplatin toxicity and lethality by Juzen-taiho-to in mice. Biol. Pharm. Bull. 1995. 18(1), 53-58.
5. Kumura Y, Okuda H, Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity, and immunocompetent organic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice. Jpn. J. Cancer Res. 1999. 90: 765-774.
6. Cheng JH. Clinical study on prevention and treatment to chemotherapy caused nephrotoxicity with jian-pi yi-qi li-shui Decoction. Chung-Kuo Chung Hsi i Chieh Ho Tsa Chih. 1994. 14:331-3.
7. Liu JQ, Wu DW. 32 cases of postoperative osteogenic sarcoma treated by chemotherapy combined with Chinese medicinal herbs. Chung-Kuo Chung Hsi i Chieh Ho Tsa Chih. 1993. 13:150-2.
8. Ning CH, Wang GM, Zhao TY, Yu GQ, Duan FW.

- Therapeutical effects of jian pi yi shen prescription on the toxicity reactions of postoperative chemotherapy in patients with advanced gastric carcinoma. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 1988. 8:113-6.
9. Wang GM, Chen CH, Sun GZ. Clinical and experimental study in treating gastric cancer with replenishing qi and invigorating spleen oral liquid combined with chemotherapy. *Chung-Kuo Chung Hsi i Chieh Ho Tsa Chih*.1994. 14:661-3.
 10. Yu G, Ren D, Sun G, Zhang D. Clinical and experimental studies of JPYS in reducing side-effects of chemotherapy in late-stage gastric cancer. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 1993. 13:31-7.