

# 清燥救肺湯의 항암효과에 관한 연구

박민철 · 정한솔 · 이광규\*

우석대학교 한의과대학 병리학교실

## Effect of Chungjokupye-tang on the Anti-cancer Property

Min Chul Park, Han Sol Jeong, Kwang Gyu Lee\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effects of Chungjokupye-tang(CJKPT) on the anti-carcinogenic action. The cell viability of mouse splenocytes and thymocytes were enhanced by the addition of CJKPT. CJKPT were increased of splenic and thymic T lymphocytes, such as T<sub>H</sub> cells were markedly increased by the treatment of CJKPT in vivo. CJKPT treatment induced the apoptotic cell death of Jurkat and HL60 leukemia cells. CJKPT reduced mitochondrial transmembrane potential and increased the expression of ICE, c-myc and p53 gene in Molt-4 cells dose dependant manner. These results suggest that CJKPT have an anti-carcinogenic action via immunoregulatory mechanism.

Key words : Chungjokupye-tang(清燥救肺湯), mitochondrial transmembrane potential, ICE, c-myc, p53

### 서 론

질병의 발생은 《素問·刺法論》에 “정기가 내부에서 보존 되면 사기가 침범할 수 없으면서 그 독기도 물리친다.”라 하여<sup>1)</sup> 正氣 부족이 발병의 근본이고, 病邪가 발병의 조건이 된다. 正氣의 부족은 크게 물질적인 부족과 기능적인 쇠퇴로 구분할 수 있다. 물질적인 부족은 통칭 陰虛라고 하고 精虛, 血虛, 津液不足 등으로 세분할 수 있다<sup>2)</sup>. 한의학적 치료 범위 중 면역을 증강시키는 방법으로 ‘扶正’법을 주로 사용한다<sup>3)</sup>. 이와 관련된 연구보고로 扶正法은 다시 補氣法, 補血法, 補陰法, 補陽法으로 세분하는데 이 중 尹 등<sup>4-10)</sup>의 補氣·補血법을 이용한 연구, 李 등<sup>11-14)</sup>의 補陽藥을 이용한 연구가 있으며, 孫 등<sup>15)16)</sup>은 陰虛時에 인체의 면역방어작용이 감소되어 쉽게 감염될 뿐만 아니라 腫瘤를 유발시키기 때문에 補陰藥을 사용하면 체액성 면역반응을 증강시킬 뿐만 아니라 비특이적 면역기능을 증강시킨다고 보고하였다.

清燥救肺湯은 喻昌의 《醫門法律·傷燥門》<sup>17)</sup>에 기재된 처방으로 溫燥邪가 傷肺시켜 肺의 氣와 陰이 함께 손상되어 발생되는 頭痛身熱, 乾咳無痰, 氣逆而喘, 咽喉乾燥, 胸滿脅痛, 心煩口渴, 舌乾無苔 등의 증후에 사용되는<sup>18)19)</sup>방제로서 清燥潤肺<sup>20)21)</sup>,

清宣肺氣, 潤燥止咳<sup>22)</sup>하는 효능을 가지고 있다.

清燥救肺湯의 구성약물 중 石膏<sup>23)</sup>는 폐포대식세포의 탐식능력을 증강시키고, 桑葉<sup>24)</sup>은 기관지의 분비물과 경련을 감소시키며, 阿膠<sup>25)</sup>는 단핵세포의 탐식능과 NK세포의 활성도를 증가시키고, 麥門冬<sup>26)</sup>은 대식세포의 탐식능을 증가시키며, 人蔘<sup>27)28)</sup>은 세포성면역과 체액성면역에 광범위한 작용을 가지고 있기 때문에 면역기능에 작용할 것으로 사려되었다.

이에 저자는 清燥救肺湯이 T, B림프구 등의 주요 면역세포 활성화와 Jurkat, Molt-4 백혈병세포 등의 암세포에 미치는 효과를 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) 동물 및 백혈병세포주

본 실험에 사용한 마우스는 BALB/c계통 웅성(8 주령, 18±2 g)을, 흰쥐는 SD계통의 웅성(8주령, 150±10 g)을 대한실험동물(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2℃, 습도 55±5%, dark/light(12 시간)조건 하에서 고품질 pellet사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다. 계대배양 세포주로서는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받은 Jurkat (human acute T cell leukemia cell line)세포, HL60(human acute promyelocytic leukemia cell line)

\* 교신저자 : 이광규, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학  
· E-mail : kwangl@core.woosuk.ac.kr · Tel : 063-290-1562  
· 접수 : 2003/09/08 · 수정 : 2003/10/30 · 채택 : 2003/11/12

세포 및 Molt-4 (human acute lymphoblastic leukemia cell line) 세포를 사용하였다.

2) 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), Hank's balanced salt solution(HBSS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide(PI), percoll, Ca<sup>2+</sup>-Locke solution, anti-murine IFN- $\gamma$  antibody, anti-murine IL-4 antibody(Pharmingen Co.), anti-rabbit Bcl-2 antibody(Santa cruz Inc.), TEMED, Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo(dT), PCR marker(Promega), dNTP set(Amersham pharmarcia), PE conjugated anti-mouse CD4, B220 antibody, FITC conjugated anti-mouse CD8, Thy-1 antibody(Caltag), 기타 시약은 특급시약 및 세포배양용 시약을 사용하였다. 사용기구로는 culture flask(Nunc), 96well microplate(Costar), micrometer (Mitutoyo), inverted microscope (Zeiss), ELISA reader(Dynatech, MR5000), laser flow cytometer (Coulter, EPICS-XL), centrifuge (VS-15000CF), CO<sub>2</sub> incubator, freeze dryer 등(Vision Scientific Co)을 사용하였다.

3) 검액의 조제

본 실험에 사용한 淸燥救肺湯의 처방은 『醫門法律』<sup>17)</sup>에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 한방병원에서 정선해서 사용하였고, 처방 2貼분량(87.75 g)을 증류수 360 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 18 g(회수율 20.5%)을 얻어 동물실험시에는 생리식염수, 세포배양용에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다. 실험동물은 1군에 5마리를 배정하여 경구투여(500 mg/kg)하였으며 1주일 동안 매일 정해진 시간에 한번씩 투여하였다. 淸燥救肺湯 1貼의 처방구성내용은 table 1.과 같다.

Table 1. Contents of Chungjokupye-tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
桑葉	Mori Folium	11.25
石膏	Gypsum Fibrosum	9.375
甘草	Glycyrrhizae Radix	3.75
人參	Ginseng Radix	2.625
胡麻仁	Sesami Semen Nigrum	3.75
眞阿膠	Asini Gelatinum	3.0
麥門冬	Liriope Tuber	4.5
杏仁	Armeniaca Amarum Semen	2.625
枇杷葉	Eriobotryae Folium	3.0
總量		43.875

2. 방법

1) 비장 및 흉선세포의 증식반응 측정 (in vitro)

생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음, 각 세포 부유액을 조제하여 1 × 10<sup>6</sup> cells/well이 되도록 세포수를 조정하고 비장세포 부유액에는 lipopolysaccharide(5  $\mu$ g/ml), 흉선세포 부유액에는 Con A(0.5  $\mu$ g/ml)를 첨가하고 여기에 CJKPT(1~100  $\mu$ g/ml)를 가하여 48 시간 동안 37℃의 CO<sub>2</sub> 배양기(5%-CO<sub>2</sub>, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가

하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu$ l로 용해시켜 18 시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정 후 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다<sup>29)</sup>.

2) 비장 및 흉선림프구의 아집단 세포(subpopulation) 측정

생쥐에 7일 동안 CJKPT(500 mg/kg)를 경구 투여한 다음 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 후, 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하고 1 × 10<sup>6</sup> 세포/well에 PE/FITC conjugated-anti mouse B220 antibody 및 FITC conjugated-anti mouse Thy-1 단클론항체와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 단클론항체 (1:20 dilution)로 이중 염색하여 4℃에서 30분간 반응시키고 laser flow cytometer (excitation:488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각 세포 중의 lymphocyte의 아집단을 측정하였다<sup>30)</sup>.

3) SRBC에 대한 적혈구 응집소(HA) 측정

생쥐 8마리를 1군으로 하여 Ha의 방법<sup>31)</sup>에 따라 1 × 10<sup>7</sup>개/생쥐의 SRBC를 복강주사하여 면역조치(immunization)하고 1일 1회씩 CJKPT(500 mg/kg)를 7일간 경구 투여한 다음, 8일째에 생쥐를 도살하여 채혈하고 원심분리(3,000 rpm, 10 분)해서 혈청을 분리한 후, 56℃에서 30 분간 incubation해서 보체를 실활시켰다. U자형 microtitration tray의 각각의 well에 상기의 혈청을 인산 완충액(pH 7.4)으로 20배 희석한 다음 2배씩 단계희석을 행한 20  $\mu$ l와 0.5% SRBC 부유액 50  $\mu$ l를 혼합하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 배양한 후, 적혈구응집을 일으킨 혈청의 최고희석배수를 응집소(log2)로 판독하였다.

4) Jurkat세포의 증식반응 측정

계대배양한 Jurkat세포의 세포부유액을 조제(1 × 10<sup>6</sup> cells/well)하고 DJSKT(1~100  $\mu$ g/ml)를 가하여 48시간 동안 37℃의 CO<sub>2</sub> 배양기(5%-CO<sub>2</sub>, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu$ l로 용해시켜 18 시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정 후 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다<sup>33)</sup>.

5) Flow cytometer에 의한 백혈병세포의 apoptosis 측정

Nicoletti 등의 방법<sup>32)</sup>으로 계대배양 중인 Jurkat세포 및 HL60세포에 0.1, 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml의 CJKPT를 첨가한 후, 24시간 및 48시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정(×3회, 1,500 rpm, 5분)한 후, 침전시킨 세포분획에 PI(10  $\mu$ g/ml)를 20  $\mu$ l/1 × 10<sup>6</sup> cells의 농도로 염색 (4℃, 30분간 반응)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm emission: 620 nm)를 이용해서 DNA fragmentation (sub-G1 peak)을 정량하였다. 단편화된 DNA의 확인은 상기의 검체에 100  $\mu$ l의 nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 4℃에서 10 분간 방치한 후, 16,000 rpm으로 20 분간 원심분리한 다음 상층액을 별도의 원심관에 취한다. RNase A(20 mg/ml) 2  $\mu$ l를 가해 37℃에서 1시간 배양한 후 다시 20 mg/

mL의 proteinase K액 2 μl를 가하여 37°C에서 1시간 배양하고 여기에 5M NaCl 20 μl와 isopropyl alcohol 120 μl를 가해 -20 °C에서 overnight시키고 16,000 rpm으로 20 분간 원심 분리해서 상층액을 제거한 다음 TE buffer 20 μl에 용해하여 1.2% agarose gel 전기영동(minigel: Mupid-II, 50V, 2 시간)을 해서 ethidium bromide(10 μg/ml)로 염색한 다음 단편화된 DNA를 정성적으로 확인하고 gel documentation reader로 판독하였다<sup>33)</sup>.

6) Mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ ) 측정

계대배양 중인 Jurkat세포에 1, 10 및 100 μg/ml의 CJKPT를 첨가한 후, 48시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집하여 세정(×3회, 1,500 rpm, 5분)한 후, 1×10<sup>6</sup>cells/well이 되도록 세포를 조정해서 원심분리(250g, 10분)하고 침전시킨 세포분획에 DiOC6(최종농도: 40nM)로 염색시켜 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 laser flow cytometer (excitation: 488 nm emission: 525 nm)에서 mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ )을 측정하였다<sup>34)</sup>.

7) RT-PCR에 의한 ICE, c-myc, p53 mRNA의 발현(in vitro)

CJKPT를 농도별로 처리(1, 10, 100 μg/ml)한 후, 48 시간 동안 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양한 Molt-4 세포로부터 RNA를 분리하였다. Total RNA는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. cDNA는 M-MLV reverse transcriptase와 random hexamer를 primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Perkin Elmer 2400 thermocycler에서 30 cycle 동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 95°C에서 30 초간 denaturation 시킨 후, 55°C에서 30 초간 annealing 시키고, 72°C에서 30 초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색을 하였다<sup>35)</sup>. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다: ICE sense(5'-AAT GCT GCT ACA AAA TCT GG-3'), ICE antisense(5'-ATC ATC CTC AAA CTC TTC TG-3'), c-myc sense(5'-CGT CTC CAC ACA TCA GCA CA-3'), c-myc antisense(5'-CCG CAA CAA GTC CTC TTC AG-3'), p53 sense(5'-CCT CCT GGC CCC TGT CAT CT -3'), p53 antisense(5'-ACA AAC ACG CAC CTC AAA GC -3').

8) 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, p<0.05이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다<sup>36)</sup>.

실험 결과

1) 비장 및 흉선세포 증식에 미치는 효과(In vitro)

생쥐의 비장세포 배양계에서 대조군에 비해 CJKPT 10 및 100 μg/ml 첨가군에서 비장세포의 유의성있는 증식이 관찰되었으며, 또한 흉선세포 배양계에서도 대조군에 비해 CJKPT 1 및 10 μg/ml 첨가군에서 흉선세포의 증식을 촉진시키는 효과를 나타내었다(Fig. 1).

2) 비장 및 흉선림프구의 아집단세포의 변화에 미치는 효과

CJKPT를 1주일 간 경구 투여한 생쥐의 비장 및 흉선림프구의 아집단 변화를 살펴본 결과(Table 2), 비장세포는 대조군에서

B, T세포가 각각 37.4±3.5% 및 19.9±2.0%이고 CJKPT 투여군에서 각각 38.7±3.9% 및 26.1±2.4%로 T세포가 유의성있게 증가하였으며, 비장 T세포 중 TH세포가 대조군에서 14.5±1.3%, Tc세포는 5.7±0.5%이고 CJKPT투여군은 각각 18.9±1.4% 및 8.1±0.7%로 TH세포 및 Tc세포 모두 유의성있게 증가하였다. 또한 흉선세포에서는 대조군에서 TH세포가 10.7±0.8%, Tc세포는 4.1±0.4%인데 비하여 CJKPT 투여군은 각각 14.9±1.3% 및 4.6±0.5%로, 특히 TH세포가 유의성있게 증가되었다.

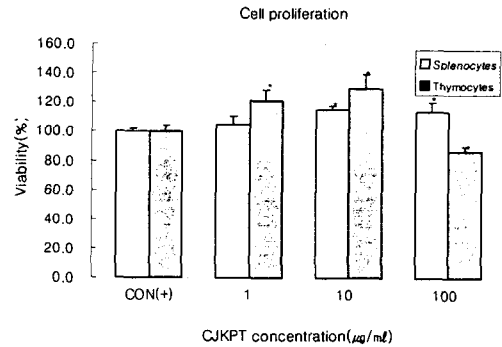


Fig. 1. Effect of CJKPT on the cell viability in cultured mouse splenocytes and thymocytes in vitro. CJKPT(1.0~100 μg/ml) were treated to cultured splenocytes or thymocytes for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. The data represents the mean±S.E of 3 experiments. \*, Significantly different from control group(p<0.05).

Table 2. Effect of CJKPT on the subpopulation cells change of splenocytes and thymocytes in CJKPT-administered mice

Cell Type	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)	
	B cell	T cell	TH	Tc
CONTROL	37.4±3.5	19.9±2.0	10.7±0.8	4.1±0.4
		14.5±1.3		
CJKPT	38.7±3.9	26.1±2.4*	14.9±1.3*	4.6±0.5
		18.9±1.4*		

CJKPT(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter the cells were collected and the subpopulation was measured by a laser flow cytometer staining with PE/FITC conjugated anti-mouse B220/Thy1 antibody or anti-mouse CD4/CD8 monoclonal antibody. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*, Significantly different from control group (p<0.05).

3) 적혈구응집소(HA)에 미치는 효과

생쥐에 SRBC를 복강주사(1×10<sup>7</sup>개/생쥐)해서 immunization 하고 1일 1회씩 CJKPT(500 mg/kg)를 7 일간 경구 투여한 다음 경추 탈구해서 도살하고 혈청을 취한 후, 적혈구응집소(log<sub>2</sub>), 즉 총 항체가에 미치는 CJKPT의 효과를 관찰한 결과(Table 3), CJKPT투여 생쥐의 SRBC에 대한 총 항체가는 대조군의 3.3±0.2 인데 비하여 4.6±0.4로 항체가가 증가되었다.

Table 3. Effect of CJKPT on the hemagglutination(HA) titer

Samples	HA titers(log <sub>2</sub> )
Control	3.3±0.2
CJKPT	4.6±0.4*

Hemagglutination(HA) titers were assayed at 7 days after SRBC sensitization. CJKPT(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. The data represents the mean±SE of 8 mice. \*, Significantly different from control group (p<0.05).

4) Jurkat세포의 증식에 미치는 효과

Jurkat세포 배양계에 1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CJKPT를 첨가하고 48시간동안 배양해서 Jurkat세포증식에 미치는 효과를 MTT assay로 측정한 결과(Fig 2), 대조군(100%)에 비하여 각각  $86.5 \pm 5.9\%$ ,  $80.1 \pm 6.3\%$  및  $69.4 \pm 6.7\%$ 의 세포 생존율을 보여 CJKPT가 Jurkat세포의 증식을 농도의존적으로 억제하는 항암작용을 가지고 있음을 나타낸다.

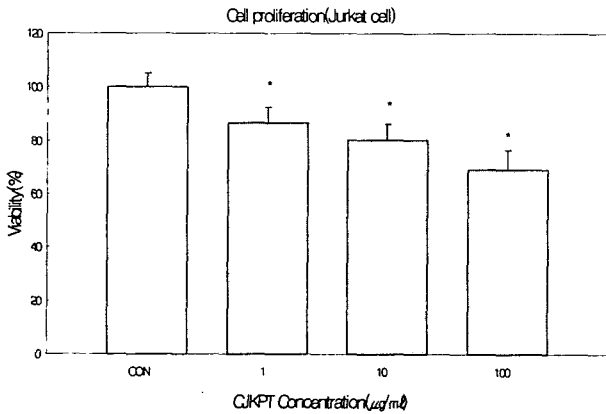


Fig. 2. Effect of CJKPT on the cell proliferation of Jurkat cell line in vitro. CJKPT(1.0~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were treated to cultured Jurkat cells for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. The data represents the mean  $\pm$  S.E of 3 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).

5) 백혈병세포의 apoptosis에 미치는 효과

Jurkat세포 배양계에 1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CJKPT를 첨가하고 24시간 또는 48시간 동안 배양해서 apoptosis를 측정된 결과 (Table 4), 24시간 배양시 대조군에서  $15.3 \pm 1.5\%$ 인데 비하여 1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 CJKPT첨가군에서 각각  $19.1 \pm 1.7$ ,  $27.3 \pm 2.8$  및  $37.5 \pm 4.2\%$ 로서 Jurkat세포의 apoptosis가 농도의존적으로 촉진되었으며 또한 48시간 배양한 결과에서도 대조군이  $27.6 \pm 2.3\%$ 인데 비하여 1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 CJKPT첨가군에서 각각  $32.5 \pm 3.3$ ,  $48.3 \pm 4.7$  및  $59.2 \pm 4.9\%$ 로 apoptosis가 현저하게 촉진되었다(Table 4). 또한 HL60세포 배양계에서도 24시간 배양한 결과, 대조군이  $21.5 \pm 2.2\%$ 인데 비하여 1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 CJKPT첨가군에서 각각  $28.4 \pm 2.7$ ,  $32.9 \pm 3.0$  및  $39.1 \pm 3.6\%$ 로 HL60세포의 apoptosis가 유의성있게 촉진되었다. Fig. 3에는 Jurkat세포에서의 CJKPT첨가에 의한 DNA단편화의 패턴을 나타내었다.

Table 4. Effect of CJKPT on the apoptosis of Jurkat and HL60 leukemia cells

Treatment ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Jurkat cell(%)		HL60 cell(%)
	24hr	48hr	24hr
CONTROL	$15.3 \pm 1.5$	$27.6 \pm 2.3$	$21.5 \pm 2.2$
CJKPT (1)	$19.1 \pm 1.7$	$32.5 \pm 3.3$	$28.4 \pm 2.7^*$
CJKPT (10)	$27.3 \pm 2.8^*$	$48.3 \pm 4.7^{**}$	$32.9 \pm 3.0^*$
CJKPT (100)	$37.5 \pm 3.2^{**}$	$59.2 \pm 4.9^{**}$	$39.1 \pm 3.6^{**}$

CJKPT(1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was treated with cultured Jurkat or HL60 cells, and incubated for 24 or 48 hours, and then cells were collected and the sub-G1 peak was measured by a laser flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean  $\pm$  S.E of 3 experiments. \*: Significantly different from control group ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ).

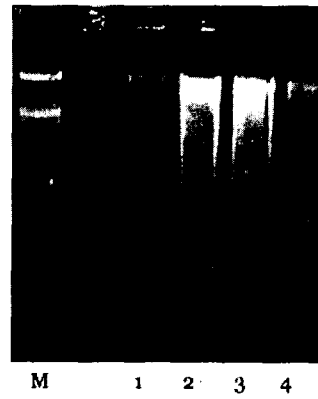


Fig. 3. Effect of CJKPT on the DNA fragmentation of Jurkat leukemia cells. CJKPT(1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was treated with cultured Jurkat cells, and incubated for 48 hours, and genomic DNA was then purified and subjected to agarose gel electrophoresis. DNA was electrophoresed in a 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide and photographed by UV illumination. M: molecular marker, Lane 1: CJKPT 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Lane 2: CJKPT 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Lane 3: CJKPT 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Lane 4: Control.

6) Jurkat세포의 mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ )에 미치는 효과

세포사의 과정 중 mitochondria의 swelling이 일어나기 전 단계에서 mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ )의 감소가 선행되어 일어나는 것을 확인하기 위하여 Jurkat세포 배양계에 1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CJKPT를 첨가해서 apoptosis가 유도되었을 때에  $\Delta\psi_m$ 의 감소가 일어나고 있는지를 검토한 결과(Fig. 4), 대조군( $77.8 \pm 7.6\%$ )에 비하여 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CJKPT첨가군에서 각각  $58.1 \pm 5.4\%$  및  $49.6 \pm 4.5\%$ 로  $\Delta\psi_m$ 가 유의성 있게 감소하였다.

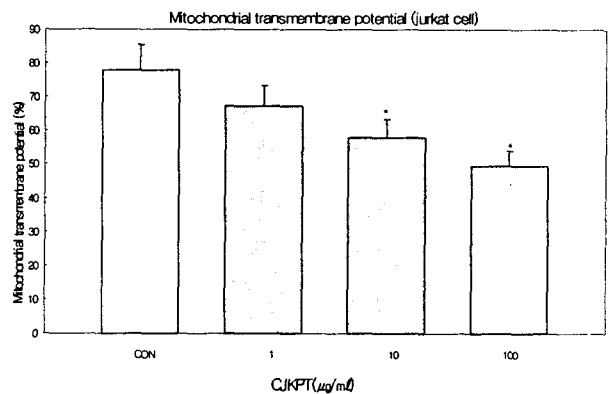


Fig. 4. Effect of CJKPT on the reduction of mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ ) in cultured-Jurkat cell line. CJKPT (1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were treated with cultured Jurkat cells, and incubated for 48 hours, and then cells were collected and the  $\Delta\psi_m$  was measured by a flow cytometer staining with DiOC6(40nM). The data represents the mean  $\pm$  S.E of 3 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).

7) RT-PCR에 의한 ICE, c-myc, p53 mRNA의 발현양상

CJKPT를 농도별로 투여하고 48 시간 동안 배양한 Molt-4세포에서 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 PCR을 시행하였고, 1% agarose gel에서 전기영동한 결과(Fig. 5), 대조군(lane 1)

에 비하여 CJKPT 첨가군(lane 2, 3, 4)에서 apoptosis 관련 유전자인 c-myc, ICE, p53의 mRNA 발현이 전반적으로 증가하고 있음을 관찰하였다. 이는 CJKPT이 Jurkat세포의 apoptosis를 유도하고 있다는 결과를 재확인하는 결과이다.

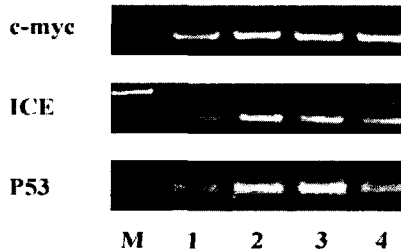


Fig. 5. Expression of c-myc, ICE and p53 gene. Treatment of CJKPT for 48 hours leads to increase the expression of c-myc, ICE and p53 in Molt-4 cells in a dose dependant manner. Poly(A+)RNA isolated from untreated cells(control, lane 1) and cells treated with 1  $\mu$ g/ml (lane 2), 10  $\mu$ g/ml (lane 3), or 100  $\mu$ g/ml (lane 4) of CJKPT for 48 hours.

## 고찰

인간은 누구나 건강하기를 원하며 건강하게 살아갈 권리가 있다. 세계보건기구헌장에서는 건강의 개념을 신체뿐만 아니라 육체적 정신적 사회적인 면까지를 포함해서 완전히 편안한 상태라고 말하였다. 韓醫學에서는 질병의 발생여부를 正氣와 邪氣간의 투쟁의 결과에 달려 있다고 본다. 正氣란 인간의 精血津液 등의 陰液性 물질뿐만 아니라 장부와 경락 등의 기능을 기초로 해서 형성되어 기후환경에 대한 적응능력, 六淫에 대한 항거능력, 체내 邪氣에 대한 제거능력, 자아조절능력, 이미 손상된 기능에 대한 회복능력, 파괴된 조직에 대한 재생능력 등을 의미하며<sup>37)</sup>, 서양의학의 관점에서 본다면 인체의 방어기능, 손상된 조직의 회복력이나 혹은 면역기능 등이 모두 正氣의 범주에 속한다<sup>38)</sup>고 하였다. 때문에 발병에 있어서 《素問·刺法論》<sup>3)</sup>에 “정기가 내부에서 보존되면 사기가 침입할 수 없으면서 그 독기도 물리치기 때문이다.”라 하여 正氣허손이 발병의 근본이고, 病邪가 발병의 조건임을 나타내주고 있다. 正氣의 허손은 크게 물질적인 부족과 기능적인 쇠퇴로 구분할 수 있다. 물질적인 부족은 통칭 陰虛라고 하며 이것은 다시 精虛 血虛 津液不足 등으로 세분할 수 있다<sup>2)</sup> 동시에 물질의 부족은 기능의 쇠퇴를 초래하기도 한다. 때문에 이 둘 사이에는 陰陽互根적 관계에 놓여 있다<sup>39)</sup>.

‘正氣’에 대한 개념을 서양의학적으로 살펴보면 백혈구가 체내로 침입해 들어 온 자기의 조직(self)과 다른 비자기(non-self)를 인식하여 그것을 파괴하고 소멸시키는 체계인 면역이라는 개념을 통해서 알 수 있다. 면역의 종류에는 호중구와 대식세포 등의 식세포와 세포상해활성을 가진 NK세포 등이 주된 임무를 담당하는 선천성 면역(비특이적)과 T림파구 및 B림파구 등이 반응의 주역인 후천성 면역(특이적)으로 대별되며, 이 중 후천성 면역은 T림파구 등의 세포가 반응을 담당하는 세포성 면역과 체액성 면역으로 분류된다<sup>40)</sup>.

면역에는 감독기능이 있는데 감독기능이 떨어짐으로 인하여 생체 내에서 형질전환된 세포의 제거가 효과적으로 수행되지 못했을 경우에는 암과 같은 악성종양이 유발된다<sup>41)</sup>. 한편 생체의 생리적인 과정에서 야기되는 불필요하게 된 세포나 악성종양세포, 노쇠세포의 자살 등에서 나타나고 있는 대표적인 세포사의 형태로서 apoptosis가 있다<sup>42)</sup>. Apoptosis는 정상적인 기관의 형성 및 개체의 항상성유지에 필수적인 생리현상이며 개체의 효율적 생존을 위한 세포의 예정된 죽음(programmed cell death)의 개념으로서 세포괴사로 알려져 있는 necrosis와는 작용기전이 다르며, 세포질과 핵 chromatin이 농축되면서 핵내의 nuclease의 활성화로 인해 180-200bp의 DNA의 절편이 관찰되는 것이 특징이다.

면역기능을 증강시키는 방법으로 한의학에서는 ‘扶正’의 방법을 위주로 사용되어야 한다고 주장하였다<sup>3)</sup>.

폐포대식세포의 탐식능력을 증강시키는 石膏<sup>23)</sup>와 기관지의 분비물과 경련을 감소시키는 桑葉<sup>24)</sup>, 단핵세포의 탐식능과 NK세포의 활성도를 증가시키는 阿膠<sup>25)</sup>, 대식세포의 탐식능을 증가시키는 麥門冬<sup>26)</sup>, 세포성 면역과 체액성 면역에 광범위한 작용을 가지고 있는 人蔘<sup>27)28)</sup> 등으로 구성된 清燥救肺湯은 清代때 喻昌의 《醫門法律·傷燥門》<sup>17)</sup>에 기재된 처방으로 溫燥邪가 傷肺시켜 肺의 氣와 陰이 함께 손상되어 발생하는 頭痛身熱, 乾咳無痰, 氣逆而喘, 咽喉乾燥, 胸滿脅痛, 心煩口渴, 舌乾無苔 등의 證候에 사용되는 방제로서<sup>18)19)</sup> 清燥潤肺<sup>20)21)</sup>, 清宣肺氣, 潤燥止咳<sup>22)</sup>하는 효능을 가지고 있다.

이와 같이 清燥救肺湯을 구성하고 있는 약물들은 주로 清燥潤肺藥物로 免疫을 增強시키는 작용을 할 것으로 사려되어 생체의 면역반응을 중심으로 항암활성을 관찰하였다. 본 연구에서 면역계에 대한 실험으로는 비장과 흉선세포의 증식반응과 림프구 아집단의 측정 및 SRBC에 대한 적혈구 응집소(HA)측정을 하였고, 항암효과를 관찰하기 위해 Jurkat세포의 증식반응과 백혈병세포의 apoptosis, RT-PCR에 의한 ICE, c-myc, p53 mRNA의 발현양상 등을 측정하였다.

清燥救肺湯의 각종 면역반응에 대한 실험결과, 주요 면역장기인 비장 및 흉선세포의 증식을 촉진시켰으며, 비장 및 흉선세포의 아집단을 분석한 결과, 비장세포에서 T세포가 증가되었으며 그 중에서도 TH세포와 Tc세포가 유의성있게 증가되었으며, 흉선세포에서도 TH세포가 증가되었는데 이것으로 보아 清燥救肺湯이 세포성 면역능을 증강시키는 작용이 있는 것으로 나타났다. 또한 清燥救肺湯은 적혈구응집소(HA)에 미치는 효과에서 항체가를 유의하게 증가시키는 체액성면역능 항진작용을 보유하고 있었다. 이상의 결과들로 미루어 보아 清燥救肺湯은 주요 면역세포의 활성을 항진시키는 면역조절제로서의 가치가 있는 것으로 추정된다. 한편, apoptosis기전에 異常이 발생하면 암이나, 자가면역질환, 퇴행성질환 및 AIDS 등의 질환을 초래한다고 알려져 있으며 특히 각종 항암요법제들은 이러한 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>43)44)</sup>. 본 실험 결과에서도 세포배양계에서 검토한 결과, 清燥救肺湯이 인체유래의 백혈병세포주인 Jurkat세포의 생존율을 억제시켰고, Jurkat세포와 HL60세포의 apoptosis를 유의성있게 촉진하는 작

용이 확인되었다. 또한 Jurkat세포에서 mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ )을 감소시켰으며, Molt-4세포에서는 ICE, c-myc, p53의 mRNA발현을 전반적으로 증가시켰는데 이러한 결과는 清燥救肺湯이 항암활성을 보유하고 있음을 시사하는 결과이다.

이상의 실험결과를 종합하면, 清燥救肺湯은 전반적으로 T, B림프구 등의 면역세포의 활성을 증가시키는 세포성면역 및 항체가 촉진 등의 체액성 면역능을 증강시켰으며, 사람 백혈병 세포의 apoptosis를 촉진하는 항암활성을 보유하고 있는 것으로 추정된다.

## 감사의 글

본 논문은 우석대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음

## 참고문헌

1. 金達鎬, 李鍾馨, 注解補注 黃帝內經素問, 下卷, 醫聖堂 p.746, 正氣存內 邪不可干 避其毒氣, 2001.
2. 李尙仁 外 1인, 韓方臨床處方學, 永林社, p.201, 1998.
3. 안덕균 역, 면역과 한방, 열린책들, pp.19-21, 23-27, 67-73, 1998.
4. 尹相協, 육군자탕, 소시호탕, 어성초의 膽癌생쥐의 생존기간 연장효과와 면역반응에 관한 실험적 연구, 경희의학, 7(3): 342-357, 1991.
5. 閔泳奎, 清熱大補湯의 免疫調節作用을 통한 항종양효과, 대한동의병리학회지 14(2):199-214, 2000.
6. 南于烈, 八物湯이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향, 동의 병리학회지 9(2):295-315, 1995.
7. 정규만, 補腦湯이 免疫反應에 미치는 실험적 연구, 대한한의 학회소아과학회지 1(1):13, 1986.
8. 裴廷燁, 小兒補血湯, 加味小兒補血湯, 加減小兒補血湯이 생쥐의 免疫反應에 미치는 연구, 경희대학교 대학원, 1989.
9. 金奉成, 인삼양위탕의 면역증강효과에 대한 연구, 경희대학교대학원, 1987.
10. 鄭連熙, 加味補兒湯이 면역기능 증진효과에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1998.
11. 李元範, 龍角散의 免疫調節 抗癌 및 항알레르기 작용에 관한 연구, 우석대학교 대학원, 박사학위논문 2002.
12. 孫孝洪, 中醫治療學原理, 사천과학기술출판사, p228, 1990.
13. 朴鎮浩, 補陽藥類의 免疫藥理學的 考察, 대전대학교한의학연구소 논문집 9(1):215-223, 2000.
14. 崔用德, 淫羊藿 水抽出物이 생쥐의 免疫글로블린 및 Cytokine 生成에 미치는 영향, 又石大學校大學院, 博士學位論文, 2001.
15. 孫孝洪, 中醫治療學原理, 四川科學技術出版社, p.631, 1990.
16. 鄭鎮碩, 육미지황탕이 구속 stress원취의 항stress와 면역반응
17. 中華醫書集成, 二十七冊 卷 八, 中醫古籍出版社, p. 117, 1999.
18. 楊醫并 中醫學問答 上冊 p.677, 1985.
19. 이광규의 실용온병학 도서출판 정담 p.295, 2001.
20. 段苦寒,中醫類方辭典,天津大學出版社,p.461, 1995.
21. 孫世發, 名方配伍分析及應用, 人民衛生出版社, p.528, 2002,
22. 許萍群, 方劑學, 人民衛生出版社, p.460, 1997.
23. 孫本韜 等, 石膏對氣管支氣管肺樹的清除防禦機能的作用. 醫衛通信 6(1):10, 1978.
24. 《全國中草藥匯編》編寫組. 884, 紫蘇. 全國中草藥匯編, 上冊, 人民衛生出版社, p.835, 1976.
25. 路承彪 等, 中藥阿膠對正常小鼠細胞免疫功能的影響. 中藥藥理與臨床 2(4):25, 1991.
26. 余伯陽 等, 湖北麥冬與浙麥冬質量的研究: 免疫活性比較. 中國中藥雜誌 16(10):584-585, 1991.
27. Soldati, F., Immunological studies of ginseng, Proceedings of the 5th international ginseng symposium, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul, Korea, 108, 1988.
28. 楊貴貞 等, 人蔘對體內外免疫調整作用的初步研究, 白求恩醫科大學學報 9(3):388, 1983.
29. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983.
30. Shortman, K., Backson, H., The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. Cell. Immunol. 12:230-246, 1974.
31. 하대유, 박영민, 최태훈, 이정호, Naloxane에 의한 면역반응 변조. 대한면역학회지, 11:129-145, 1989.
32. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G., Riccardi, C.A., Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods 139:271-279, 1991.
33. Telford, W.G., King, L. E., Fraker, P.J., Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. Cell Prolif. 24:447-459, 1991.
34. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., Kroemer, G., Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp.
35. Birch, D.E., Kolmodin, L., Laird, W.J., McKinney, N., Wong, J., Young, K.K.Y., Zangenberg, G.A., Zoccoli, M.A., Simplified Hot-Start PCR. Nature 381:445-446, 1996.
36. Dowdy, S, Weardon, S., Statistics for research. p. 262. Wiley, New York, 1983.
37. 成肇智, 中醫病機論, 中國醫藥科技出版社, p.16, 1997.
38. 대한병리학회, 병리학(4판) 고문사, p.127, 2001.
39. 中醫研究院, 中醫名詞術語選釋, 知識出版社, p3
40. Abbas, A.K., Lichman, A.H. and Poper, J.S.: Cellular and

- molecular immunology. 2: 241-260, W.B. Saunders Co., U.S.A, 1994.
41. Kumar, Cotran, Robbins: ROBBINS BASIC PATHOLOGY 7th edition, p.201-202, 2002.
42. Willie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., The significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68:51-306, 1980.
43. Nagata, S.: Apoptosis by death factor. Cell, 88: 355-365, 1997.
44. D'Amico, A.V. and McKenna, W.G.: Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. Radiotherapy & Oncology 33(1): 3-10, 1994.