

원 저

폐암세포주 H-157에서 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 抗腫瘍效果

이병호, 원진희, 김동웅, 이종덕, 문구
원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

Antitumor Effect of *Gagamjengac-tang* and As₂O₃ in Human Lung Cancer Cell Line, H-157

Byoung-Ho Lee, Jin-Hee Won, Dong-Woung Kim, Jong-Duk Lee, Goo Moon

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : This study was designed to elucidate the synergistic cytotoxic mechanisms of the co-treatment of *Gagamjengac-tang* (GGJAT) and As₂O₃ in human lung cancer cell line, H-157.

Methods : The combination of GGJAT and As₂O₃ synergistically augmented the cytotoxicity of GGJAT and As₂O₃ in H-157 cells. The cytotoxicity by the combination of these two drugs was revealed as apoptosis which was characterized by chromatin condensation and fragmentation in DAPI staining.

Results : Antioxidant NAC completely blocked the apoptotic death of H-157 cells by GGJAT and As₂O₃. The apoptotic cytotoxicity of GGJAT and As₂O₃ was accompanied by the induction of DR4 and DR5 in RT-PCR. In addition, antioxidant enzymes such as SOD1, GSH synthetase and GSH reductase were also increased in H-157 cells treated with GGJAT and As₂O₃. However, of note, p53, Fas, FasL and TRAIL were not detected in H-157 cells treated with GGJAT and As₂O₃ by RT-PCR.

Conclusions : These results suggest that the synergistic cytotoxicity of the co-treatment of H-157 cells treated with GGJAT and As₂O₃ may cause induction of death receptors DR4 and DR5 as well as reactive oxygen species.

Key Words: *Gagamjengac-tang*, As₂O₃, Apoptosis

서론

癌이란 惡性腫瘍을 총칭하는 용어로 개체를 구성하는 정상세포가 각종 자극에 의하여 유전자의 형질 전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학, 면역학적 행동이 변화된 변형세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형 세포의 집단, 즉 새로이 생긴 종괴를 뜻한다. 암의 발생빈도는 지역, 인종, 생활양식에 따라 크게 다

- 접수 : 2004년 8월 10일 · 논문심사 : 2004년 8월 19일
- 채택 : 2004년 8월 30일
- 교신저자 : 이병호, 원광대학교 광주한방병원 3내과
(Tel: 062-670-6527, Fax: 062-670-6529, E-mail: kyklis76@hanmail.net)
- 이 논문은 2004년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

르나 일반적으로 인구 10만명당 연간 300~400명 정도 발생한다¹⁾.

한의학에서 癌은 병정의 발생과 진행과정에 따라 石瘤, 腸覃, 石瘕, 積聚, 癥瘕, 噎膈, 反胃 등의 다양한 병증으로 표현되어 왔다²⁾. 암의 발생은 正氣가 먼저 虛해지고 그 후에 邪氣가 머물러 氣血阻滯, 血瘀, 痰飲, 濕熱 등의 病變을 야기시킨다고 인식하였으며, 암의 치료에서는 病程이 비교적 복잡하고 여러 조직과 기관에서 寒熱交錯, 虛實狹雜되는 경우가 많으므로 陰陽氣血과 臟腑의 虛實에 근거한 辨證施治에 따라 清熱, 解毒, 化痰, 活血 등의 祛邪法과 滋陰, 養血, 助陽, 健脾, 益氣 등의 扶正法을 함께 배합하여 사용하고 있다³⁾.

최근 동·서의 결합치료에 대한 관심이 증대되면서 항암제와 한약과의 병용에 의하여 항암효과를 높이거나 항암제로 인한 부작용을 억제시키고 면역력을 증강시키려는 노력이 많이 시도되고 있으며, 항암치료제의 치료기전이 세포고사와 깊은 관련이 있다고 밝혀진 이래, 세포고사 신호전달계를 이용하여 항암효과를 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 대한 研究로는 金⁴⁾은 百合固金湯加味方이, 李 등⁵⁾은 八珍湯合化積丸이, 姜⁶⁾은 補陰免疫丹이, 魯⁸⁾는 白花蛇舌草가 세포고사기전에 의하여 항암효과가 있음을 보고하였다.

加減增液湯은 張⁹⁾의《臨床腫瘤綜合治療大全》에 수록된 처방으로 清熱解毒, 滋陰潤燥의 효능이 있으며,

특히 피부암 방사선요법후 熱毒傷陰, 津枯熱燥의 경우에 적용된다.

본 연구에서는 최근 백혈병치료제로 사용되고 있는 As₂O₃과 加減增液湯의 병용처리시 폐암세포에 대한 세포독성 상승효과를 확인하고 그 세포고사 작용기전을 밝히고자 세포생존율, 미토콘드리아 막전위 변화, 항산화제 NAC의 영향, Fas/FasL, TRAIL과 이의 수용체들의 발현양상 변화등을 분석하여 유의한 효과가 있어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용한 약재는 圓光大學校 光州韓方病院에서 구입한 후 精選하여 실험에 사용하였다. 처방 내용은《臨床腫瘤綜合治療大全》¹²⁾에 의거하였으며 1

As₂O₃

Control	20mM	10mM	5mM	2.5mM	1.3mM	0.7mM	0.3mM
GGJAT 13µg/ml							▶
GGJAT 25µg/ml							▶
GGJAT 50µg/ml							▶
GGJAT 100µg/ml							▶
GGJAT 200µg/ml							▶
	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼

Table 1. Prescription Contents of Gagamjengac-tang Per Pack

本草名	生藥名	學名	分量(g)
生地黃	Radix rehmanniae recens	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH.	7.5
金銀花	Flos lonicerae	<i>Lonicera japonica</i> THUNB.	7.5
天花粉	Radix trichosanthis	<i>Trichosanthes kirilowii</i> MAXIM.	7.5
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	7.5
穀芽	Fructus oryzae germinatus	<i>Oryza sativa</i> L.	7.5
麥芽	Fructus hordei germinatus	<i>Hordeum vulgare</i> L.	7.5
玄參	Radix scrophulariae	<i>Scrophularia oldhamii</i> OLIV.	6
麥門冬	Radix ophiopogonis	<i>Ophiopogon jaonicus</i> KER-GAWL.	6
連翹	Fructus forsythiae	<i>Forsythia suspensa</i> VAHL.	6
白芍藥	Radix Paoniae	<i>LactifloraePaeonia lactiflora</i> PALL.	6
黃連	Rhizoma coptidis	<i>Coptis japonica</i> MAKINO.	5
甘草	Radix glycyrrhizae	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	3
Total amount			77

貼의 분량은 다음과 같다.

2) 檢液調製

加減增液湯 77g을 에탄올 1 l 와 함께 플라스크에 넣어 하루동안 방치한 다음 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12 시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 것을 試料로 사용하였다. 이 加減增液湯 에탄올추출물을 이하 GGJAT라 부른다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Dubellico's minimum essential medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였으며, 배양용기(96-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.) 제품을 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), Rhodamine 123, 항암제 As₂O₃는 Sigma사(St. Louis, Missouri, U.S.A.) 제품을 사용하였다.

2. 方法

1) H-157 폐암세포주 배양

인간 폐암 세포주인 H-157 세포주는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배양액으로 배양하였으며 2~3일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase 에 있는 세포에 한약재 등을 처리한 뒤 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 변화실험을 수행하였다.

2) 세포 생존율 측정

세포 생존을 조사는 MTT assay 방법을 이용하였다. 간략하게 설명하면 세포 배양판(48-well plate)에 세포 (1×10⁵세포수/ml)를 0.25ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 Fig. 1에 표시된 바와 같이 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음 (최종 부피 0.5ml) 44시간 동안 배양기에서 배양한다. 이후 MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 50µl씩 첨가하였다. 4시간

후 상층액은 제거한 후 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시킨 후 여기에 500µl의 DMSO 용액으로 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) DAPI 염색

세포핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H-157 세포에 加減增液湯 및 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리 후, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 포름알데히드(3.7%)로 실온에서 10분 고정된 후, 10µM DAPI 용액으로 실온에서 20분 염색하여 다시 PBS로 세척한다. 염색된 세포는 형광현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) 미토콘드리아 막전위 측정

세포내 소기관의 하나인 미토콘드리아의 막전위(membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 Rhodamine-123 염색을 시행하였다. 加減增液湯 및 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리된 세포들은 PBS로 2회 세척하였다. Rhodamine-123 (10µg/ml)은 각각 DMEM 배지에 희석하여 20분간 37℃, CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Olympus, JAPAN)으로 관찰하였다.

5) Total RNA의 분리

약제가 처리된 세포로부터 total RNA의 분리는 RNAzol™B(Tel-Test, Friendswood, TX)를 이용하여 수행하였다. 배양판에 붙어 있는 3~5×10⁶ 세포는(6cm dish) 차가운 생리식염수로 1회 세척한 후 1ml의 RNAzol™B로 용해시킨다. 이를 eppendorf tube에 옮긴 후 여기에 100µl chloroform을 첨가하여 완전하게 섞어준 후 12,000×g, 4℃에서 20분간 원심 분리한 후, 상층액은 새로운 튜브에 옮겼다. 위 상층액에 0.5ml의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 4℃에서 30분간 반응시킨 후 다시 12,000×g, 4℃에서 20분간 원심 분리하고, 침전물은 80% 에탄올로 세척하였다. 세척한 RNA는 건조 후 DEPC를 처리하여 RNase 활성이 제거된 증류수 20µl로 용해시켰다. 이를 동 증류수로 200배 정도 희석하여 분광광도계로 260nm의 파장에서 흡광도를 측정하고 1OD 당 40µg/ml의 농도로 계

산하여 각각 시료의 total RNA의 양을 정량하였다.

6) 역전사 중합효소 연쇄반응

역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)은 2µg total RNA와 reverse transcriptase(Superscript II, Invitrogen, USA)를 이용하여 수행하였다. Total RNA를 70℃에서 10분간 변성시킨 후, 4℃에서 급냉하였다. 역전사 반응에 의한 cDNA의 합성은 total RNA(2µg), oligo d(T)(1µg), 2µl dNTP(10mM), 2µl Superscript II reverse transcriptase(5U/µl), DTT(10 mM), RNasin(1 µl)을 최종적으로 20µl 완충용액(50mM Tris-Cl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) 조건으로 되도록 한 후 42℃에서 60분간 반응시켜 준비하였다. 원하는 유전자들을 증폭하기 위한 중합효소 연쇄반응은 2µl 역전사 반응액, 2µl dNTP(2.5mM), 2.5µl sense 와 antisense primer(1.1µM), Taq DNA polymerase(0.6 U; TAKARA)가 함유된 최종적으로 30µl 반응액(20mM Tris-Cl pH 8.0, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT)조건이 되도록 한 후 반응을 시행하였다. 이 때 사용한 각 유전자들에 대한 sense 및 antisense primer 서열 및 반응조건은 다음과 같다.

Primer Sequences

1. p53
5' -ttc ttg cat tct ggg aca gcc-3' 5' -ggc ctc att cag ctc tgc gaa-3'
2. GAPDH
5' -cat cct gca cca cca act gct tag-3' 5' -gcc tgc ttc acc acc ttc ttg atg-3'
3. Fas
5' -cca ttt ttc ttc caa atg cag aag-3' 5' -taa att tat tgc cac tgt ttc agg-3'
4. FasL
5' -atg cag cag ccc ttc aat tac c-3' 5' -ttc tcc aaa gat gat gct gfg tg-3'
5. TRAIL
5' -gta aag ctt atg gct atg atg gag gtc-3' 5' -act ctc gag taa gcc aac taa aaa ggc c-3'
6. Death Receptor 4 (DR4)
5' -tgc tgc agc tgc tac cta gct c-3' 5' -ttg ctg ctc aga gac gaa agt gg-3'
7. Death Receptor 5 (DR5)
5' -ctg caa ctg tga ctc cta tg-3' 5' -gtc tgc tct gat cac cca ac-3'
8. SOD1
5' -gtg tgg ccg atg tgt cta ttg-3' 5' -tac agc tag cag gat aac aga tg-3'
9. Catalase (CAT)

5' -aat cct cag aca cat ctg aag-3' 5' -agg gct cct ttc ctg tgg c-3'

10. Glutathione peroxidase (GPX1)

5' -gtc cca tat cac gtg gaa gag-3' 5' -cac aat cac ata atc atg gt-3'

11. GSH synthetase (GSH S)

5' -aat ctt gcc tcc tgc tgt gt-3' 5' -ttc aca atg acc gaa tac cg-3'

12. Glutathione reductase (GSSG R)

5' -agt ggg act cac gga aga tga-3' 5' -cct gca gca ttt cat cac ac-3'

PCR Reaction Conditions

Denaturation	94oC	30 sec
Annealing	55oC	30 sec
Elongation	72oC	45 sec
cycles 35		

7) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며 p-value가 최대치 0.05이하(p<0.05)인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 加減增液湯 및 As₂O₃가 인간 폐암세포주의 생존율에 미치는 영향

항암화학요법제인 As₂O₃와 加減增液湯의 병용처리에 의한 폐암세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 인간 폐암 세포주인 H-157세포에 다양한 농도의 加減增液湯과 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리한 후 세포생존율을 MTT 방법으로 조사하였다. 먼저 加減增液湯 및 As₂O₃의 단독처리시에는 고농도일 때, 각각의 농도에 의존적으로 암세포 세포죽음을 유발시켰다(Fig. 1). 하지만 두 약물의 병용처리는 H-157 세포에서의 이들 약제에 대한 감수성(sensitivity)을 증가시켜서 세포독성이 현저히 증가됨을 나타내었다(Fig. 2). 이러한 加減增液湯과 As₂O₃와의 세포독성에 대한 병용처리의 상승효과는 두 약물의 다양한 농도 조합에서도 관찰되었다. 또한 250µg/ml 농도의 加減增液湯을 다양한 농도의 As₂O₃와 병용 투여한 결과 Fig. 2에서와 같이 병용투여시 유의하게 암세포 세포죽음 효과를 항진시켰다.

2. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시 H-157 세포의 세포죽음 성격 규명

加減增液湯과 As₂O₃와의 병용처리에 의한 암세포의 세포 죽음이 세포고사 기전에 의하여 매개될 가능성이 조사하였다. 세포고사 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 加減增液湯과 As₂O₃를 36시간 단독 혹은 병용처리 후 세포의 핵에 DAPI 염색을 시행한 결과, 정상 대조군 및 As₂O₃, 加減增液湯 단독 처리군 에서는 모두 타원형의 온전한 형태의 핵 모양이 관찰되었으나, 병용처리군의 세포에서는 크로마틴구조의 농축(condensation)과 분절(fragmentation)된 핵 모양이 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 결과로부터 加減增液湯 및 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-157 폐암세포의 세포죽음이 세포고사 기전에 기인됨을 확인할 수 있었다.

3. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시 H-157 세포 미토콘드리아의 막전위변화에 미치는 영향

加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포 죽음시 나타나는 미토콘드리아의 막전위 변화 여부를 조사하기 위하여 약제가 처리된 세포를 Rhodamine-123 염색을 시행하고 이를 관찰하였다. 加減增液湯과 As₂O₃를 24시간 단독 혹은 병용처리 후 Rhodamine-123 염색을 시행한 결과, 정상 대조군 및 As₂O₃, 加減增液湯 단독처리군에서는 모두 녹색 형광이 세포질에서 점상 형태(punctuated)로 분포하는 양상, 즉 막전위 변화가 일어나지 않았으나, 加減增液湯 및 As₂O₃를 병용 처리한 군에서는 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만성(diffuse)으로 산재하는 녹색 형광이 관찰되어 미토콘드리아 막전위의 변화가 일어났음을 보여주었다(Fig. 4).

4. 항산화제가 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-157 폐암세포 세포죽음에 미치는 영향

加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포 죽음이 활성산소에 의해서 매개되어질 가능성을 조사하기 위하여 항산화제인 10mM의 N-acetyl

cystein(NAC)를 30분 전처리한 후 加減增液湯과 As₂O₃를 병용처리하여 48시간 배양 후 MTT 방법으로 세포생존율을 조사하였다. 48시간 후의 MTT 방법에 의한 세포 생존율을 측정시 항산화제인 NAC를 전처리하지 않고 두 약제를 병용처리시에는 생존율이 대조군의 16%정도로 감소하였으나 항산화제인 NAC 10mM을 전처리 하였을 때 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포독성이 유의하게 억제되어 40% 생존율을 나타냈다(Fig. 5). 그러나 NAC 10mM을 단독처리 하였을 때 H-157세포의 고사율에 유의한 변화를 초래하지 않았다. 이상의 결과들은 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시 나타나는 세포고사에 부분적으로 활성산소의 생성이 관여되고 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

5. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 p53 유전자 발현변화 양상

DNA 손상을 유발하는 항암제는 세포고사에 관련된 p53의 발현과 활성화에 영향을 준다. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포죽음에서 p53 유전자 발현변화가 관련되어 있는지를 알아보기 위하여 먼저 250 μ g/ml의 加減增液湯 및 5 μ M의 As₂O₃와 병용 투여하고 3, 6, 12, 16, 24, 30, 36시간 후에 각각의 세포로부터 RNAzol을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA를 260nm의 자외선분광광도계로 정량하여 동량을 1.0% 아가로스 겔 전기영동을 실시하여 RNA의 분해(degradation) 여부를 확인한 결과 RNA의 degradation없이 28S, 18S의 RNA가 모두 잘 나타났다(Fig. 6).

다음으로 역전사반응으로 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 생성된 cDNA를 주형으로 하여 p53 primer 쌍을 사용하여 증합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이를 1.0% 아가로스 겔 전기영동을 실시하여 유전자의 발현변화 양상을 확인하였다. Fig. 7의 결과에서처럼 약물 처리 시간에 따른 p53 유전자의 유의한 발현 변화는 관찰되지 않았다. 모든 증합효소 연쇄반응을 시행시 역전사반응으로 합성된 cDNA가 동량을 확인하고 PCR 조건의 작동 여부를 확인키 위해 GAPDH를

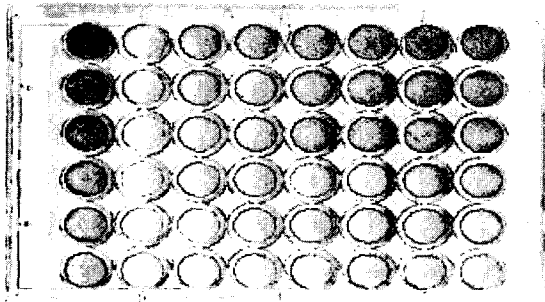


Fig. 1 The synergistic cytotoxic effects of *Gagamjengac-tang* (GGJAT) and As_2O_3 in H-157 cells.

H-157 cells were treated with various concentrations of GGJAT and As_2O_3 as described in 'Materials and Methods' for 48 hr. Then, the cell viability was measured by MTT assay.

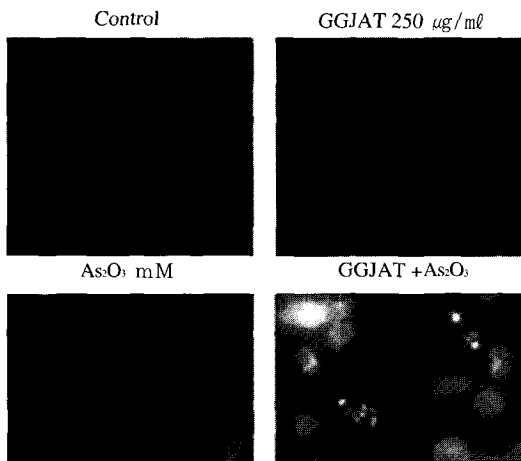


Fig. 3 The co-treatment of GGJAT and As_2O_3 induced the chromatin condensation and fragmentation of H-157 cells.

Cells were treated with GGJAT ($250\mu g/ml$), As_2O_3 ($5\mu M$) alone, or GGJAT plus As_2O_3 for 36 hr. After stained with DAPI, cells were observed under fluorescent microscopy (Olympus, Japan).

대조 유전자로 사용하였다. GAPDH 유전자의 PCR 발현은 모든 시간대에 동일하게 나타남을 확인하였다.

6. 加減增液湯과 As_2O_3 의 병용처리에 의한 Fas 및 FasL 유전자 발현변화 양상

Fas는 FasL에 결합함으로써 세포의 고사를 유발시킨다고 알려진 세포막의 단백질이며, Fas는 UV 조사,

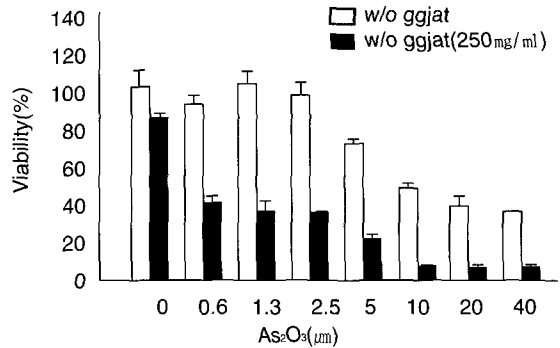


Fig. 2 The co-treatment of GGJAT and As_2O_3 induced synergistically the death of H-157 cells.

H-157 cells were treated with various doses of As_2O_3 in the absence or in the presence of GGJAT ($250\mu g/ml$) for 48 hr. Then, the cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean of three independent experiments. Results were expressed as mean \pm S.D. of quadruplicates.

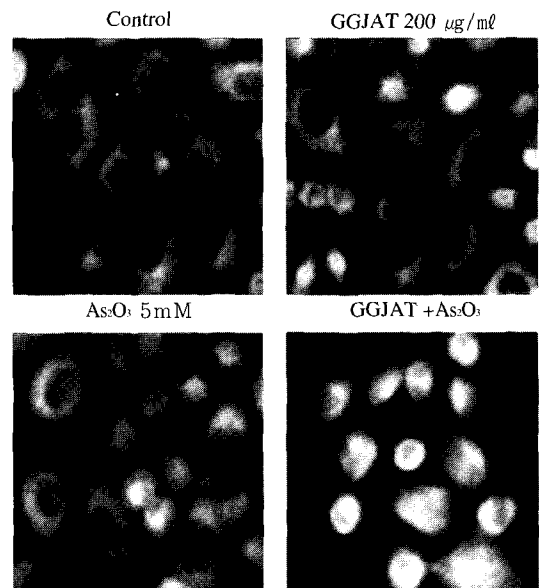


Fig. 4 The cotreatment of GGJAT and As_2O_3 induced the mitochondrial membrane potential transition in H-157 cells.

Cells were treated with GGJAT ($250\mu g/ml$), As_2O_3 ($5\mu M$) alone, or GGJAT and As_2O_3 for 36 hr. After stained with Rhodamine 123 ($5\mu M$), cells were observed under fluorescent microscopy (Olympus, Japan).

바이러스 감염, wild-type p53, 저산소증(hypoxia)등에

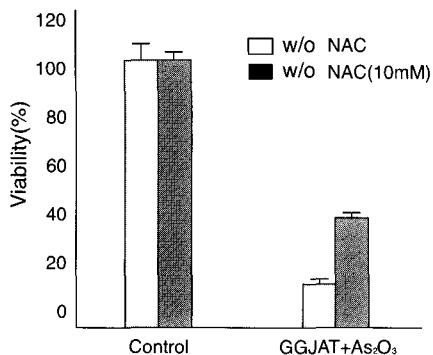


Fig. 5 Antioxidant, NAC prevented the death of H-157 cells by the cotreatment of GGJAT and As₂O₃.

Cells were pretreated with 10mM NAC for 30 min. Then, cells were treated with GGJAT (250 μ g/ml), As₂O₃ (5 μ M) alone, or GGJAT plus As₂O₃ for 48 hr. Then, the cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean of three independent experiments. Results were expressed as mean \pm S.D.

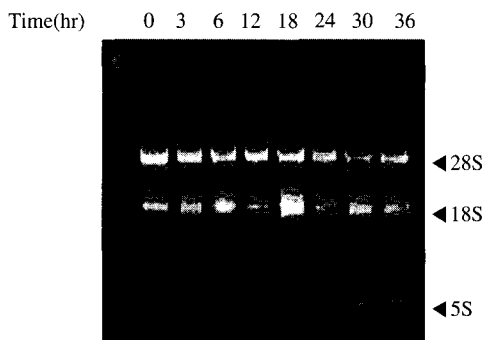


Fig. 6 Total RNA preparation from H-157 cells treated with GGJAT and As₂O₃.

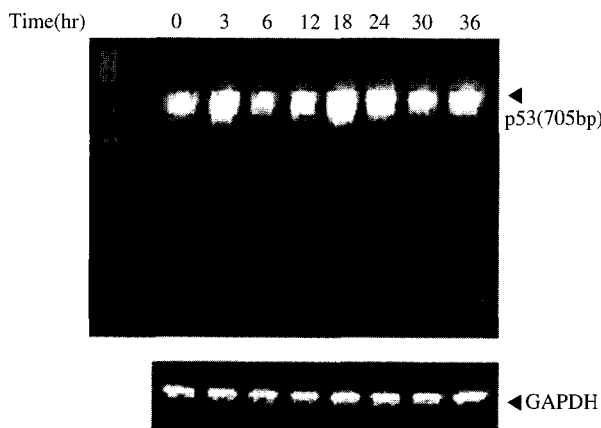


Fig. 7 Expression pattern of p53 in H-157 cells treated with GGJAT and As₂O₃.

Cells were treated with GGJAT (250 μ g/ml) and As₂O₃ (5 μ M) for the indicated time period. Total RNA was isolated by RNAzol, then cDNA was synthesized by reverse transcriptase. p53 and GAPDH genes were amplified with each gene's primer set, respectively. PCR products were resolved on a 1% agarose gel and were stained with ethidium bromide.

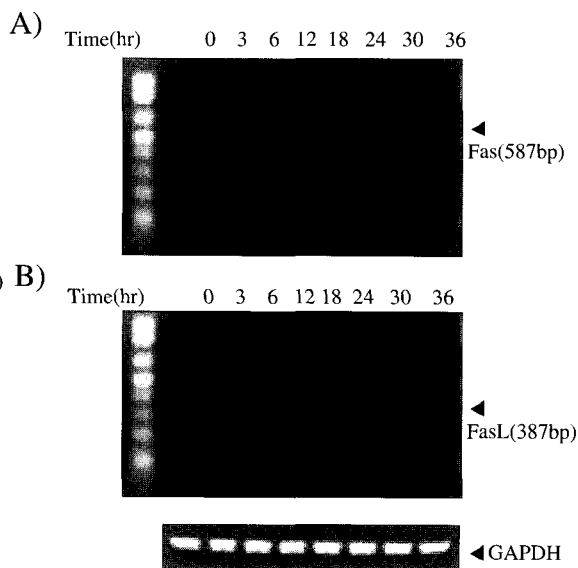


Fig. 8 Expression pattern of Fas and FasL in H-157 cells treated with GGJAT and As₂O₃.

Cells were treated with GGJAT (250 μ g/ml) plus As₂O₃ (5 μ M) for the indicated time period. Total RNA was isolated by RNAzol, then cDNA was synthesized by reverse transcriptase. Fas and FasL were amplified with each gene's primer set, respectively. PCR products were resolved on a 1% agarose gel and were stained with ethidium bromide.

의해서 림과구 및 간세포 등에서 발견되어진다¹⁰⁾. 본 실험에서는 Fas 및 FasL이 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시 보여지는 synergistic cytotoxicity의 유도과 관련되어 있는지를 확인하기 위하여, 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시에 Fas 및 Fas L의 발현양상 변화를 중합효소연쇄반응을 통하여 확인하였다.

Fig. 8A와 B의 결과에서처럼 약물 처리 시간에 따른 Fas 및 FasL 유전자의 발현은 관찰되지 않았다. 따라서, 이러한 Fas/FasL 등을 매개로 하는 세포 죽음 신호전달과정은 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시 보여지는 synergistic cytotoxicity의 유도에는 직접적인 관련이 없는 것으로 사료된다.

7. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 TRAIL 및 TRAIL Receptors 유전자 발현변화 양상

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL 혹은 Apo2L)은 FasL과 매우 유사한 구조를 갖는 TNF family에 속하는 ligand이다¹¹⁾. FasL과 Fas의 상호작용에 의한 세포고사유도와 유사하게 TRAIL은 receptor인 DR4나 DR5에 결합하여 많은 종양 세포주에서 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

따라서 본 연구에서는 加減增液湯과 As₂O₃의 병용 처리시의 H-157 폐암세포의 세포고사에서 TRAIL, DR4, DR5 유전자의 발현양상 변화를 중합효소연쇄 반응을 통하여 확인하였다. Fig. 9A의 결과에서처럼 약물 처리 시간에 따른 TRAIL 유전자의 발현은 관찰되지 않았다. 그러나 Fig. 9B와 9C에 나타난 바와 같이 DR4와 DR5 유전자의 발현은 加減增液湯과 As₂O₃의 병용 처리시간에 의존적으로 현저하게 증가하였다. 따라서 DR4와 DR5 유전자가 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시 보여지는 synergistic cytotoxicity의 유도에 직접적으로 연관되어 있으리라 사료된다.

고 찰

腫瘍이란 우리 몸을 구성하는 기본 단위인 세포가 그 정상적인 조절기능의 범주와 주위 장기의 정상적

인 영향력을 벗어나 자율성을 지니고 비가역적으로 과잉 증식을 하는 것으로, 임상 및 병리 형태적인 소견에 의하여 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 구분된다¹³⁾. 이중 일반적으로 암이라고 하는 모든 악성종양은 빠른 성장, 침윤, 체내 각 부위로 확산 및 전이 등과 같은 특성이 있어 생명에 위협을 초래한다. 우리나라에서도 癌은 1991년이래 순환기계질환 다음으로 전체 사망원인 2위를 차지하면서 국민보건을 위협하는 가장 큰 요인이 되고 있다¹⁴⁾.

韓醫學에서 癌이란 용어는 宋代《衛濟寶書》에 최초로 기재되었으며, 이후 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 乳癌, 石疽, 石癰 등이 증상과 병리면에서 비슷한 병증으로 인식되고 있다³⁾. 癌은 正氣가 虛해진 후 飮食不節, 外邪, 七情鬱結, 過勞 및 邪氣 등에 의하여 臟腑機能과 氣血이 失調되어 氣血阻滯, 血瘀, 痰飲, 濕熱, 經絡瘀阻 등의 병리변화가 나타나고 이런 변화가 단독 혹은 相互交錯하여 발생한다고 인식하였다³⁾.

최근에는 한·양방을 결합한 치료법들이 점차로 시행되고 있으며, 특히 항암제와 한약제를 병용처리하여 항암효과 증진을 유도하는 연구가 시행되고 있다. 이에 대한 연구로는 李³⁾의 八珍湯合化積丸과 adriamycin의 병용처리, 白¹⁵⁾의 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리에 의한 항종양효과 등을 들 수 있다.

본 연구에 사용한 加減增液湯은 張⁹⁾의《臨床腫瘍綜合治療大全》에 수록된 處方으로 清熱解毒, 滋陰潤燥의 효능이 있어 扶正과 祛邪를 겸하고 있으며, 특히 피부암 방사선요법후 熱毒傷陰, 津枯熱燥의 경우에 적용된다. 구성약물을 살펴보면 玄參, 麥門冬, 生地黃은 增液湯之劑¹⁶⁾로 滋陰清熱, 潤腸通便의 효능이 있으며, 金銀花, 連翹, 黃連, 白花蛇舌草는 清熱시키며, 天花粉은 清熱生津消腫하며, 白芍藥은 血液을 滋養하여 痛症을 緩和시키고, 穀芽, 麥芽, 甘草는 下氣和中시켜 消化를 도와준다¹⁷⁾. 이상으로 볼 때 加減增液湯은 화학요법으로 인한 陰液虧損과 소화기장애를 치료하며 화학요법중 나타날 수 있는 각종 염증성 반응을 치료하고 항암효과를 높일 수 있는 처방으로 사료된다.

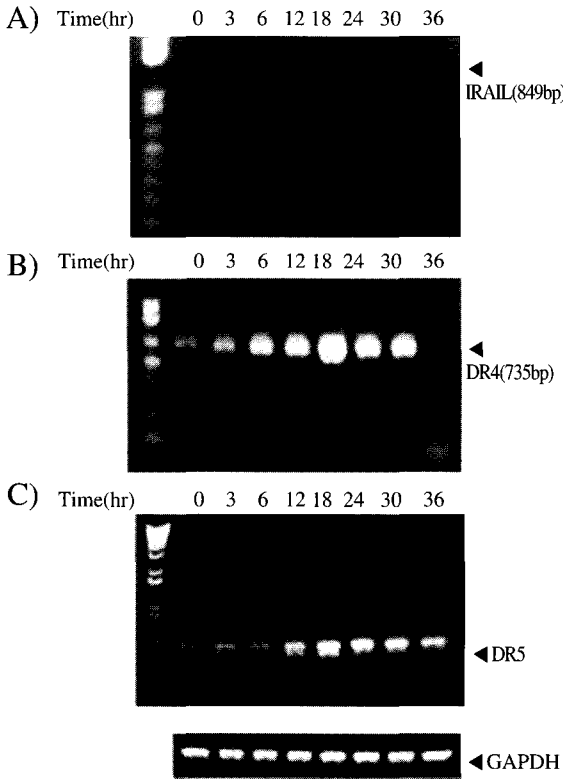


Fig. 9 Expression pattern of TRAIL, DR4 and DR5 in H-157 cells treated with GGJAT and As₂O₃.

Cells were treated with GGJAT (250 μ g/ml) plus As₂O₃ (5 μ M) for the indicated time period. Total RNA was isolated by RNazol, then cDNA was synthesized by reverse transcriptase. TRAIL, DR4 and DR5 genes were amplified with each gene's primer set, respectively. PCR products were resolved on a 1% agarose gel and were stained with ethidium bromide.

일반적으로 비소(As)는 無色, 無味, 無臭의 치명적인 독극물질로서 자연계에서는 As₂S₂, As₂S₃, KAsO₂로 존재하며, 특히 As₂O₃는 1992년 중국의 Sun¹⁹⁾등에 의해 급성 전골수성 백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)환자에서 처음 치료효과가 보고된 이래, 비소화합물에 대한 관심이 높아지고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 2000년 미국식품의약청(FDA)에서 백혈병치료제로 승인된 이후 급성 전골수성 백혈병, 신경 모세포종, 골수종, 위암, 전립

선 및 난소암 등에서 세포고사 효과가 보고되었다¹⁹⁾. 또한 As₂O₃의 백혈병 치료 효과가 정확하게 밝혀져 있지는 못하지만, APL에서 As₂O₃의 생체의실험을 통한 항암효과는 bcl-2 발현의 down regulation과 PML-RAR α /PML protein의 조절을 통한 세포사의 직접유도 때문으로 보고 있다²⁰⁾.

이에 저자는 加減增液湯과 As₂O₃의 병용치리시 폐암세포에 대한 세포독성 상승효과를 확인하고, 세포고사 작용기전을 밝히고자 하였다. 또한 이를 위하여 두 약물의 병용투여 후에 세포생존율, 세포의 형태학적 변화, 미토콘드리아 막전위변화, 항산화제 NAC의 영향, p53, Fas/FasL, TRAIL과 이의 수용체, 항산화효소들의 발현양상 변화등을 분석하였다.

먼저 加減增液湯과 As₂O₃의 병용치리에 의한 폐암세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 인간 폐암세포주인 H-157세포에 다양한 농도의 加減增液湯과 As₂O₃를 단독 혹은 병용치리한 후 세포생존율을 MTT 방법으로 조사하였다. 그 결과 각각의 농도에 의존적으로 암세포의 세포죽음을 유발시켰으며, 두 약물의 병용치리시에는 세포독성이 현저히 증가되었다(Fig. 1, 2).

세포고사(apoptosis)는 다세포 생물체의 정상 발달과 항상성 유지에 중요한 현상으로 세포괴사(necrosis)와는 달리 정상적인 세포내 소기관의 구조를 유지하면서 세포수축, chromatin의 농축과 분절 등을 특징으로 하는 형태학적 변화를 동반하는 세포죽음이다²¹⁾. 또한 세포고사의 조절에 미토콘드리아가 중요한 역할을 담당하고 있으며, 최근 보고에 의하면 미토콘드리아의 기능조절은 세포질로 방출되는 cytochrome c, caspase activators, 막전위차의 변화 그리고 Bcl-2 family 단백질 등이 관여하는 것으로 알려져 있다²²⁾.

加減增液湯과 As₂O₃의 병용치리에 의한 세포독성이 세포고사(apoptosis) 현상에 유도됨을 알아보기 위해 DAPI 염색법으로 핵을 염색하여 형광현미경으로 관찰한 결과, 두 약물의 병용치리시 H-157 세포는 전형적인 세포고사의 특징인 chromatin의 농축과 분절이 관찰되었다(Fig. 3). 또한 미토콘드리아 막전위의

변화를 알아보기 위해 Rhodamine123으로 염색하여 살펴본 결과, 세포 전체에 미만성(diffuse)으로 산재하는 녹색 형광이 관찰되어 미토콘드리아의 막전위 변화를 살펴볼 수 있었다(Fig. 4).

한편, cisplatin 등의 다양한 항암제의 암세포 사멸 과정에서 자유활성산소의 형성이 중요한 기전 중의 하나로 보고 되고 있다. 이에 본 연구에서도 加減增液湯과 As₂O₃의 병용 처리에 의한 세포 죽음이 활성산소에 의해서 매개되어질 가능성을 조사하기 위하여, 항산화제 N-acetyl cysteine (NAC)를 전처리 한 후 加減增液湯과 As₂O₃를 병용처리하여 세포생존율을 측정 한 결과 세포생존율이 유의하게 감소하였다. 이는 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의해 유발되는 세포고사가 이러한 활성산소 등의 산화적 손상에 기인된 것임을 나타낸다(Fig. 5).

세포고사과정을 통한 세포사멸은 여러 유전자들 및 그 발현 단백질들에 의해 조절되며, 여러 신호전달계가 관여됨이 알려져 있다.

p53은 53kDa의 단백질로 UV나 다른 방사선에 의해서 DNA가 손상을 입었을 때 합성된다. p53은 17번 염색체의 단완에 위치하는 종양억제 유전자로서 wild type과 mutant type이 존재한다. Wild type p53은 세포증식 과정중 G1에서 S phase로의 전환시 check point로 작용하여 세포고사로의 진행여부를 결정한다²³⁾. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 폐암세포주 H-157의 세포죽음에서 p53 유전자 발현변화가 관련되었는지 알아보기 위하여, 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 p53의 유의한 발현변화는 관찰되지 않았다(Fig. 7). 이는 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 유도되는 폐암세포주 H-157의 세포고사는 p53과 무관한 과정에 의하여 일어나는 것으로 사료된다.

APO-1 혹은 CD95라고도 알려져 있는 Fas 및 이의 ligand인 Fas-L은 세포고사 신호를 전달하는 activation-induced cell death(AICD)의 mediator라고 알려져 있다²⁴⁾. 특히 면역반응을 약화시키거나 cytotoxic T 세포의 활성 혹은 자연살해세포(natural killer cells)를 활성화시켜 종양세포를 제거하는데 Fas/Fas-L system은 중요하다고 알려져 있다²⁵⁻²⁶⁾. 본 연구결과에

서는 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 중합효소연쇄반응에서 Fas, FasL 등의 유전자 발현은 관찰되지 않았다(Fig. 8). 따라서 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리에 유도되는 폐암세포주 H-157의 세포고사는 Fas와 FasL에 의한 세포고사 신호전달 과정과는 무관하게 일어나는 것으로 사료된다.

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL 혹은 Apo2L)은 FasL과 매우 유사한 구조를 갖는 TNF family에 속하는 ligand이다¹¹⁾. Fas와 TNF 수용체인 TNF-R1의 아미노산 배열을 비교하면, 세포질쪽 부위에 약 80개의 아미노산 배열이 유사하며, 특히 이 부위는 세포사멸 촉진 신호 전달에 중요한 역할을 하고 있기 때문에 death domain이라고 불린다. 이러한 death domain을 가지는 여러 세포막 수용체들을 death receptor(DR)라고 명명하였다. TRAIL은 FasL과 Fas의 상호작용에 의한 세포고사유도와 유사하게 receptor인 DR4 나 DR5에 결합하여 많은 종양 세포주에서 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있으며¹²⁾, 최근 paclitaxel이나 CDDP 같은 다양한 항암제들이 DR4와 DR5 등의 발현을 증가시켜 TRAIL에 의한 암세포 세포고사능력을 증진시킬 수 있음이 보고 되고 있다²⁷⁻²⁹⁾.

TRAIL과 수용체인 DR4나 DR5의 발현양상을 살펴본 바, 加減增液湯과 As₂O₃의 병용 처리시 DR4와 DR5 유전자의 현저한 발현증가가 관찰되었다. 발현양상은 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리전에 약간 발현되는 것으로 나타났으며, 두 약물의 병용처리시부터 현저하게 증가되어 DR4와 DR5는 병용처리 18시간 때에 최고 발현양상을 보였으며, 30시간까지도 발현이 유지되어 나타났다(Fig. 9). 그러나 흥미롭게도 TRAIL 유전자의 발현은 관찰할 수 없었다. 두 약물의 병용투여시 DR4와 DR5의 발현증가를 통해 암세포 사멸 증진 효과를 유도할 수 있는 것으로 사료되나 TRAIL과의 반응 없이도 세포사멸을 일으킬 수 있는가에 대해 더 많은 연구가 진행되어야 하리라 생각된다.

이상의 결과들을 종합할 때 加減增液湯과 As₂O₃의

병용치리는 As₂O₃ 단독치리시에 비하여 현저한 암세포 고사 능력을 증진시킬 수 있으며, 미토콘드리아의 막전위 변화, 활성산소종의 생성을 매개로 하는 산화적 손상이 중요하게 관련되어 있으리라 여겨진다. 또한 加減增液湯과 As₂O₃의 병용 처리시 DR4와 DR5 유전자의 현저한 발현증가가 관찰되어 이 DR4와 DR5를 통해 암세포 사멸 증진 효과를 유도할 수 있는 것으로 사료된다. 그러나 TRAIL의 발현은 관찰되지 않아 TRAIL과의 반응 없이도 세포사멸을 일으킬 수 있는가에 대한 더 많은 연구가 진행되어야 하겠다.

결론

폐암세포주인 H-157세포에 加減增液湯과 As₂O₃를 병용처리한 후 항종양효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용치리시 폐암세포주 H-157 세포에서 세포독성의 상승효과가 관찰되었다.
2. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용치리시 세포독성은 chromatin의 농축과 분절 등이 관찰되는 세포고사(apoptosis)에 의한 세포독성임을 확인하였다.
3. 加減增液湯과 As₂O₃의 병용치리시 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만성(diffuse)으로 산재하는 녹색 형광이 관찰되어 미토콘드리아 막전위의 변화가 일어났음을 보여주었다
4. 항산화제인 NAC는 加減增液湯과 As₂O₃의 병용치리에 의한 세포독성을 유의하게 억제하였다.
5. DR4와 DR5 유전자의 발현은 加減增液湯과 As₂O₃의 병용처리시간에 의존적으로 현저하게 증가하였다.

이상의 실험 결과, 加減增液湯은 As₂O₃와 병용치리시 뚜렷하게 암세포 고사를 유도할 수 있음을 확인하였고, 이에 대한 기전은 Death receptors 및 항산화효소 등의 여러 세포고사 유전자의 발현양상 변화임을 확인할 수 있었다. 추후 加減增液湯의 유효성분 규명 및 구체적인 작용기전에 관한 지속적인 연구가 필요하리라 판단된다.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 제 3판. 서울:고문사. 1997:201-2
2. 錢伯文. 腫瘤의辨證施治. 上海. 上海科學技術出版社. 1980:1-10
3. 문구 외. 암 동서의 결합치료 1권. 익산: 원광대학교 출판국. 1999:253-92
4. 金柄住. 百合固金湯加味方의 抗腫瘍 效果에 關한 研究. 圓光大學校 博士學位論文. 2000.
5. 李竝求. 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용치리시 나타나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 關한 研究. 圓光大學校 博士學位論文. 2000.
6. 金成鎭. 八珍湯合化積丸의 抗腫瘍 效果에 關한 研究. 圓光大學校 碩士學位論文. 1999.
7. 姜泰熙. Cisplatin을 처리한 腦細胞에서 補血免疫丹의 細胞防禦效果. 圓光大學校 博士學位論文. 2001.
8. 魯勳政. 白花蛇舌草 메탄올 抽出物의 抗腫瘍效果 및 抗癌 機轉에 關한 研究. 圓光大學校 博士學位論文. 1999.
9. 張宗岐. 臨床腫瘤綜合治療大全 第1版. 北京: 奧林匹克出版社. 1995:499
10. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. Leukemia. 1999;13(11):1854-8
11. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity. 1995;3(6):673-82
12. Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Krammer PH. Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. J Cell Biol. 1997;137(1):221-948,49
13. 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울: 杏林出版: 1995:13-15, 245-255
14. 성현제 외. 암치료에 있어서 체질과 항암효과에 관한 한의학적 연구. 서울: 韓國韓醫學研究院論文集. 1997;3(1):85-101

15. 白垠基. 인간 간암세포주 HepG2에서 八珍抗癌丹과 Adriamycin의 병용치리에 의한 抗腫瘍 效果. 圓光大學校 碩士學位論文. 2002.
16. 江克明, 包明蕙. 校正 方劑大辭典. 서울:의성당. 1991:1247
17. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:南山堂. 1997:172-175, 240-242, 252-254, 265-267, 285-287, 369-370, 402-404, 411-412, 431-432, 569-570, 581-582, 584-585, 1997.
18. Sun HD, Ma XC, Hu XC, et al. Ai-Lin I treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia. Chinese J Integr Chin West Med. 1992;12:170-1
19. Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K. Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase-3 in vitro. FEBS Lett. 1999;455:59-62
20. Boonchai W, Walsh M, Cummings M, Chenevix-Trench G. Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. Arch Dermatol. 2000;136:195-8
21. 高忠顯 外. 現代腫瘤診斷治療學. 北京. 科學技術文獻出版社. 1997:53-8
22. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends Cell Biol. 2000;10(9):369-77
23. Elledge RM, Fuqua SAW, Clark GM, Pujol P, Allred DC. The role and prognostic significance of p53 gene alterations in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1993;27:95-102
24. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. J Biol Chem. 1992;267(15):10709-15
25. Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like protease during Fas-mediated apoptosis. Nature. 1996; 380:723-726
26. Leverkus M, Yaar M, Gilchrist BA. Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. Exp. Cell Res. 1997; 232:255-262
27. Nimmanapalli R, Perkins CL, Orlando M, O' Bryan E, Nguyen D, Bhalla KN. Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. Cancer Res. 2001;15;61(2):759-63
28. Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. Cancer Res. 2000; 15;60(4):847-53