

인간 肺癌細胞柱 H-460세포에서 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 항종양 증진효과

송봉길* · 원진희 · 김동웅 · 이종덕 · 문 구

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

Antitumor Effect of the Cotreatment of *Paljintanghabhwajeoghwan* and As₂O₃ in Human Lung Cancer Cell Line H-460

Bong gil Song*, Jin Hee Won, Dong Woung Kim, Jong Duk Lee, Goo Moon

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

This study was designed to elucidate the synergistic cytotoxic mechanisms of the cotreatment of *Paljintanghabhwajeoghwan* (Paljin) and As₂O₃ in human lung cancer cell line, H-460. The combination of Paljin and As₂O₃ synergistically augmented the cytotoxicity of Paljin and As₂O₃ in H-460 cells. The nature of cytotoxicity was revealed as apoptosis which characterized by chromatin condensation and fragmentation in DAPI staining. Mitochondrial membrane potential transition was observed in H-460 cells treated with Paljin and As₂O₃. The apoptotic cytotoxicity of Paljin and As₂O₃ was accompanied by the cleavage of PARP and ICAD. Of note, pro-apoptotic Bak protein was obviously increased. However, the expression of p53 was not affected by the cotreatment of Paljin and As₂O₃. In addition, the expression of DR5 was increased by the cotreatment of Paljin and As₂O₃. This results suggest that the synergistic cytotoxicity of the cotreatment of Paljin and As₂O₃ might be caused by the changes of the expression levels of a lots proteins, such as PARP, ICAD, Bak, DR5, which play pivotal roles in survival or death of cells.

Key words : *Paljintanghabhwajeoghwan*(八珍湯合化積丸) As₂O₃ Apoptosis

서론

우리나라에서 최근 10년간 死亡率이 현저히 증가한 癌은 폐암, 대장암, 췌장암, 여성유방암 및 전립선암 등인데, 특히 肺癌은 2001년 국내 癌에 의한 사망 원인의 1위를 차지하였다. 성별 癌 死亡率 역시 남자에서는 肺癌으로 인한 死亡率이 36.1%로 1위를, 여성에서도 乳房癌에 이어 2위를 차지하고 있어 肺癌은 남녀 모두에서 가장 중요한 암 사망 원인을 보여주고 있다¹⁾. 癌이란 인체 내 정상세포가 여러 가지 요인으로 인하여 과도하게 증식하거나 이상 분화하여 형성되는 신생물^{2,4)}, 원인은 유전인자, 인종, 지역적 요인, 성별, 연령, 정신적 스트레스, 면역학적 요인 등의 내적 요인과 담배, 발암물질, 대기오염, 약물, 식이, 방사

선, 자외선 및 바이러스 등의 외적 요인으로 구분할 수 있다^{2,3,5)}.

韓醫學에서 腫瘍은 ‘腸覃’, ‘石瘕’, ‘石癰’, ‘癥積’, ‘積聚’, ‘噎膈’, ‘反胃’로 표현하였고⁶⁻¹⁰⁾, 그 원인을 正氣의 不足과 邪氣가 停滯하여 氣滯, 血瘀, 痰飲, 結聚되어 발병하는 것으로 인식하고 있다^{6,11)}. 치료에 있어서 西洋醫學에서는 수술·방사선·화학요법 등의 치료방법들이 사용되고, 韓醫學에서는 《內經》⁶⁾에 “治病必求本”의 학설에 근거하여 羅¹²⁾는 “養正則積自除”라고 하여 扶正培本을 강조하였고, 또한 《素問·至真要大論》⁶⁾의 “堅者削之”, “結者散之”, “留者攻之”처럼 攻邪를 더하여 扶正培本과 攻補兼施를 치료의 원칙으로 삼았다. 최근 항암제의 부작용을 줄이면서 항종양 효과를 극대화하기 위하여 한약을 병용한 실험적 연구가 이루어지고 있으며, 이에 白¹³⁻¹⁴⁾ 등은 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리에 의한 抗腫瘍 效果에 대하여, 金¹⁵⁾은 消積白朮散이 Bleomycin의 부작용 감소와 항암효과에 미치는 영향을 보고한 바 있다. 최근에 저농도의 As₂O₃는 백혈병에서 암세포의 고사를 유도하여 치료 효과가 있을 뿐만 아니라¹⁶⁾ 화학요법에 내성을 보

* 교신저자 : 송봉길, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 광주한방병원
· E-mail : kyklis76@hanmail.net, · Tel : 062-670-6527
· 접수 : 2004/03/19 · 수정 : 2004/04/22 · 채택 : 2004/05/21

이는 환자들에서 우수한 치료 효과가 있음이 보고되고 있다¹⁷⁻¹⁸⁾. 본 실험에 사용된 八珍湯合化積丸은 補氣利氣, 活血祛瘀, 軟堅消腫, 抗癌 등의 效能에 따라 腫塊日益增大堅硬, 按之痛甚, 痛有定處, 面色晦暗, 肌膚甲錯, 全身乾黃消瘦 등을 치료하는 처방으로 癌治療 원칙 중 攻補兼施에 부합되도록 立方된 암 치료제로서, 李¹⁹⁾ 및 林²⁰⁾ 등은 각각 八珍湯合化積丸 및 adriamycin의 병용처리에 의한 암세포의 사멸 효과가 증대될 수 있음을 보고하였다.

본 연구에서는 여러 가지 항암제와 八珍湯合化積丸의 병용투여에 의해 synergistic한 항종양 효과를 보이는 항암물질을 찾고자 연구를 시작하였고 이로부터 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용투여가 유용한 결과를 줄 수 있음을 확인하고 이에 대한 작용기전을 분석하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

八珍湯合化積丸의 처방내용은 潘敏求의 《中華腫瘤治療大成》²¹⁾에 의거하였으며, 본 실험에 사용한 약재는 원광대학교전주한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였다. 1첩의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Paljintanghabhwajeghwan*

本草名	生藥名	學名	分量(g)
人蔘	Radix ginseng	Panax ginseng C. A. MEYER.	12
白茯苓	Poria	Poria cocos WOLF.	12
生地黃	Rhizoma rehmanniae	Rehmannia glutinosa LIBOSCH.	12
鱉甲	Carapax amydae	Amyda sinensis WIENGMANN.	12
穿山甲	Squama manitis	Manis pentadactyla L.	12
白朮	Rhizoma atractylodiamacrocephalae	Atractylodes macrocephala KOIDZ.	10
當歸	Radix angelicae gigantis	Angelica gigas NAKAI.	10
赤芍藥	Radix paeoniae rubra	Paeonia japonica MIYABE.	10
三稜	Rhizoma scorpi	Scorpus flaviatilis A. GRAY.	10
蓬朮	Rhizoma curcumae zedoariae	Curcuma zedoaria ROSC.	10
香附子	Rhizoma cyperi	Cyperus rotundus L.	10
乳香	Mastix	Boswellia carteri BIRDW.	10
川芎	Rhizoma cndii	Cnidium officinale MAKINO.	9
甘草	Radix glycyrrhizae	Glycyrrhiza uralensis FISCH.	6
Total amount			145

2) 검액조제

실험에 사용된 약재는 에탄올 용매를 사용, 추출하여 실험에 이용하였다. 먼저 에탄올 추출물은 八珍湯合化積丸 145 g을 에탄올 1 L와 함께 플라스크에서 혼합하여 하루 동안 우려나오도록 한 다음 거즈로 여과하고 3,200 rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70 °C(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 것을 試料로 사용하였다. 이 八珍湯合化積丸 에탄올추출물을 'Paljin'이라 지칭하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Dubellco's minimum essential medium

(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA.)에서 구입하였으며, 배양용기(48-well plate, 10cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.) 제품을 사용하였다. As₂O₃ 및 apicidin은 Sigma 사로부터 구입하였고, Rofecoxib는 Merck 사로부터 구입하여 사용하였다. MTT (methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), Rhodamine-123은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA.) 제품을 사용하였다. PARP, phospho H2AX, ICAD, DR4, DR5, phophos p53, p53 그리고 Bak 등의 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA.), anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 ECL kit (Enhanced chemiluminescence kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) H-460 인간 肺癌細胞株 배양

인간 肺癌細胞株인 H-460 細胞株는 한국 세포주 은행에서 분양받아 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 10 % 우태아 혈청이 포함된 DMEM(Gibco BRL, England) 배양액으로 배양하였으며, 48시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 한약재 등을 처리한 후 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 변화실험을 수행하였다

2) 세포 생존율 측정

Table 2. Rofecoxib, Sulindac, As₂O₃, Apicidin*

Control	20 μM	10 μM	5 μM	2.5 μM	1.3 μM	0.7 μM	0.3 μM
Paljin 200 μg/ml							▶
Paljin 100 μg/ml							▶
Paljin 50 μg/ml							▶
Paljin 25 μg/ml							▶
Paljin 13 μg/ml							▶

* From 1 μg/ml to 0.016 μg/ml

세포 생존율 조사는 MTT assay 방법을 이용하였다. 간단히 기술하면 세포 배양판(48-well plate)에 세포(1×10⁵ 세포수/ml)를 0.25 ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 Table 2에 표시된 바와 같이 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음 (최종 부피 0.5 ml) 44시간 동안 배양기에서 배양하였다. 이후, MTT 용액(5 μg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 50 ul씩 첨가하였다. 4시간 후 상층액은 제거한 다음 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시킨 후 여기에 500 ul의 DMSO 용액으로 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) DAPI 염색

세포핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H-460 세포에 八

珍湯合化積丸 및 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리 후, 생리식염수 (PBS, pH 7.4)로 2회 세척하였다. 세포는 포름 알데히드(3.7 %)로 실온에서 10분 고정한 후, 10 μM DAPI 용액으로 실온에서 20분 염색하여 다시 생리식염수로 세척하였다. 염색된 세포는 형광 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) 미토콘드리아 막전위 측정

세포내 소기관의 하나인 미토콘드리아 막전위 (mitochondrial membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 Rhodamine-123 염색을 시행하였다. 八珍湯合化積丸 및 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리된 세포들은 생리식염수로 2회 세척하였다. Rhodamine-123(10 μg/ml)은 각각 DMEM 배지에 희석하여 20분 간 37 °C, CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 다시 생리식염수로 세척하여 형광현미경(Olympus, JAPAN)으로 관찰하였다.

5) Western blot analysis

세포는 항암제 등을 처리 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin)과 4 °C에서 30분간 반응시켰다. 세포 파쇄액은 13,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하고, 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포 파쇄액(단백질: 200 μg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100 °C에서 5분간 가열한 후 12.5 % SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5 % skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. PARP, phospho H2AX, ICAD, DR4, DR5, phospho p53, p53 그리고 Bak 등에 대한 일차 항체는 0.01 % (v/v)의 Tween-20이 포함된 3 % skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

6) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험 결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value 가 최대치 0.05(p < 0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. 八珍湯合化積丸과 다양한 항암제의 병용처리가 肺癌細胞株 H-460의 생존율에 미치는 영향

선행연구에서 보고된 八珍湯合化積丸과 adriamycin의 병용 투여시 얻어지는 상승된 항종양효과 이외에도 여러 항암제와 八珍湯合化積丸의 병용투여에 의해 synergistic한 항종양 효과를 보이는 항암물질을 찾고자, 본 연구에서는 먼저 인간의 폐암세포 중의 하나인 H-460세포에 현재 임상에서 사용되고 있거나 임상 시험 중인 다양한 항종양 약물을 선정하여 단독 및 병용투여시

세포독성 효과를 조사하였다. 선정된 항암제로는 먼저 Nonsteroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs)인 rofecoxib와 sulindac을 선정하였다. Rofecoxib는 NSAID 약물로서 항염증 작용을 가지는 약물로 개발되어 Prostaglandin의 생합성 과정에 관여하는 cyclooxygenase II (COX-II)를 선택적으로 저해하며, 항염증 작용 외에도 뛰어난 효과를 보여주는 항암제로서의 가능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 물질이다²²⁾. Sulindac 역시 NSAIDs 약물이지만 Rofecoxib와는 달리 COX-I 이나 COX-II를 저해하지 못하나 생체 내 약물대사 과정에서 약물화학적으로 활성을 갖는 sulfide와 sulfone 유도체로 변환되어 암세포의 세포사멸을 유도하는 작용이 보고 되고 있다²³⁾. 또 다른 항암제로는 histone deacetylase inhibitor로 알려진 apicidin을 사용하였다. 유전자의 발현과정에서 chromatin구조의 folding을 조절하는 histone의 acetylation과 deacetylation은 유전자 발현에 매우 중요하게 작용하고 있는데 apicidin은 이러한 과정에 관여하는 효소 중의 하나인 histone deacetylase(HADC)를 선택적으로 저해하는 저해제(HDAC inhibitors)로 알려져 있다. 최근 많은 연구 결과에서 apicidin이 암세포의 세포고사를 유도할 수 있음이 보고 되고 있다²⁴⁾. 여기에 더하여 최근에 백혈병의 치료제로 주목 받고 있는 As₂O₃도 비교약물로 선정된 후 다양한 농도로 八珍湯合化積丸과의 단독 혹은 병용처리 후 세포 생존율을 MTT 방법으로 조사하였다 (Fig. 1). 八珍湯合化積丸 단독처리는 200 μg/ml 농도 하에서도 거의 세포독성을 유도하지 않았다. COX-II 저해제인 Rofecoxib는 20 uM의 농도까지도 단독처리시나 八珍湯合化積丸과의 병용처리시에도 거의 세포독성을 유도하지 않았다 (Fig. 1A). 또한, Sulindac 역시 20 uM의 농도에서도 단독처리 혹은 八珍湯合化積丸과의 병용처리시에도 세포독성은 현저하지 않았다 (Fig. 1B). Histone deacetylase 저해제인 apicidin의 경우는 처리 최고 농도인 1 μg/ml 및 0.5 μg/ml 단독처리시에 현저한 세포독성을 유발하였고, 八珍湯合化積丸과의 병용투여시 미미한 정도의 세포독성 증가가 관찰 되었다 (Fig. 1C). 하지만 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용투여군에서는 다른 병용투여군과는 달리 현저하게 암세포에 대한 세포독성 효과가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 1D). 이를 보다 더 확인하기 위하여 먼저 八珍湯合化積丸과 As₂O₃에 대한 폐암 세포주 H-460세포의 감수성을 조사하였다. Fig. 2A 에서 八珍湯合化積丸 단독처리 시 200 μg/ml 농도에서도 유의한 세포독성은 관찰되지 않았다. 그러나 As₂O₃는 5 uM 농도에서 세포독성 효과가 없었지만 10 uM 과 20 uM 에서는 각각 60 % 와 47 %의 세포 생존율을 나타내었다 (Fig. 2B). 이들 약물의 병용투여시 세포독성 증진효과를 알아보기 위하여 八珍湯合化積丸 200 μg/ml 혹은 As₂O₃ 2.5 uM의 단독 및 병용처리군의 세포 생존율을 조사하였다. 약물 단독처리 시 각각의 세포 생존율이 91 % 와 93 % 에 비하여 두 약물의 병용처리는 H-460 세포에서의 이들 약제에 대한 감수성 (sensitivity)을 증가시켜 65 % 세포 생존율을 나타내어 세포독성이 현저히 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 3). 이러한 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 세포독성 상승효과는 두 약물의 다양한 농도 조합에서도 관찰되었다(Fig. 1D).

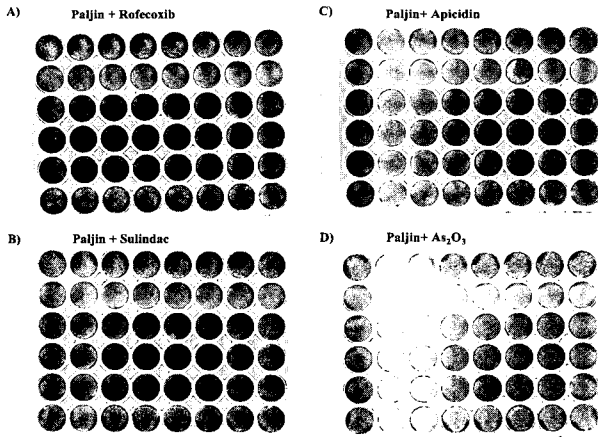


Fig. 1. The synergistic cytotoxic effects of the cotreatment of Paljin and anticancer drugs in H-460 cells. Cells were treated with various concentrations of anticancer drugs and Paljin as described in Material and Methods for 48 hr. Then, cell viability was measured by MTT assay. A) Paljin vs Rofecoxib, B) Paljin vs Sulindac, C) Paljin vs apicidin, D) Paljin vs As₂O₃

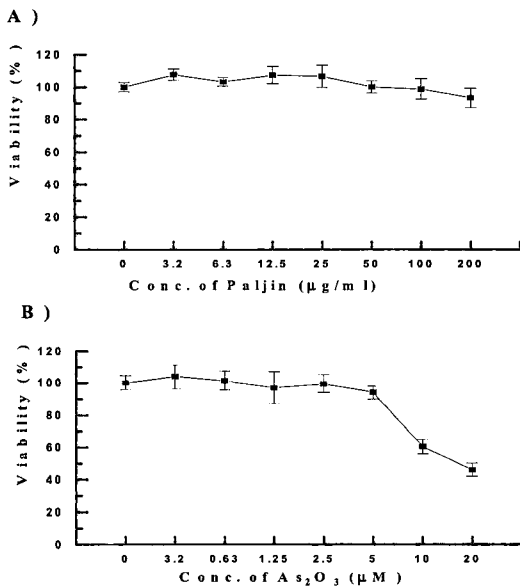


Fig. 2. The cytotoxic effects of Paljin or As₂O₃ in H-460 cells. Cells were treated with various concentrations of Paljin or As₂O₃ alone for 48 hr. Then, cell viability was measured by MTT assay and the data represented as mean of three independent experiments. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates.

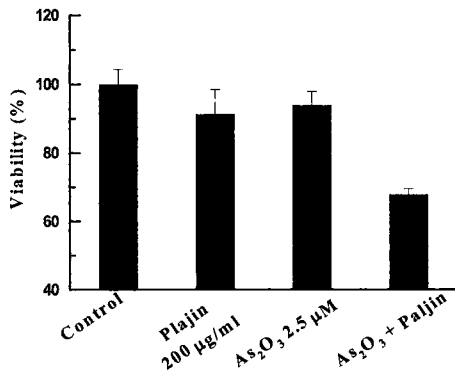


Fig. 3. The synergistic cytotoxic effects of the cotreatment of Paljin and As₂O₃ in H-460 cells. Cells were treated with Paljin (200 µg/ml) and As₂O₃ (2.5 µM) for 48 hr. Then, cell viability was measured by MTT assay and the data represented as mean of three independent experiments. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates.

2. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리가 H-460 細胞株의 cytopathic effect에 미치는 영향

八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 H-460 세포에 八珍湯合化積丸 200 µg/ml 단독, As₂O₃ 5 µM 단독, 혹은 이 두 약물을 병용처리하고 36시간 이후에 광학현미경 하에서 암세포의 형태를 관찰하였다. 八珍湯合化積丸 혹은 As₂O₃ 단독으로는 별다른 세포병변 현상 (cytopathic effect)을 관찰할 수 없었으나, 두 약물의 병용처리 시 세포가 배양판의 표면에서 분리되며 분해되는 뚜렷한 세포병변 현상이 관찰되었다 (Fig. 4).

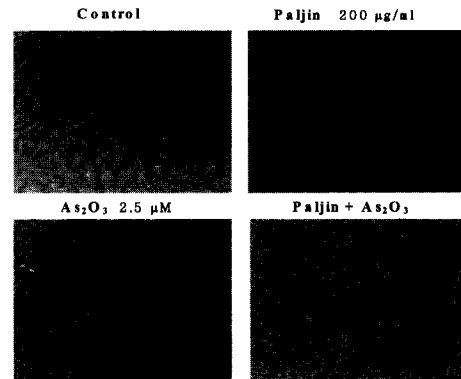


Fig. 4. The cytopathic effect of the cotreatment of Paljin and As₂O₃ in H-460 cells. Cells were treated with Paljin (200 µg/ml), As₂O₃ (2.5 µM) alone, or Paljin (200 µg/ml) and As₂O₃ (2.5 µM) for 36 hr. The cytopathic effect was observed under light microscopy (Olympus, Japan).

3. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 H-460 細胞株의 세포 죽음 성격 규명

八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포 죽음이 세포고사 기전에 의하여 매개될 가능성을 조사하고자 세포고사 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 약제가 처리된 세포의 핵을 DAPI 염색을 시행하였다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃를 36시간 단독 혹은 병용처리 후 DAPI 염색을 시행한 결과, 정상 대조군 및 As₂O₃, 八珍湯合化積丸 단독처리군에서는 모두 타원형의 온전한 형태의 핵 모양이 관찰되었으나, 병용처리군의 세포에서는 chromatin 구조의 응축(condensation)과 분절(fragmentation)된 핵 모양이 관찰되었다 (Fig. 5).

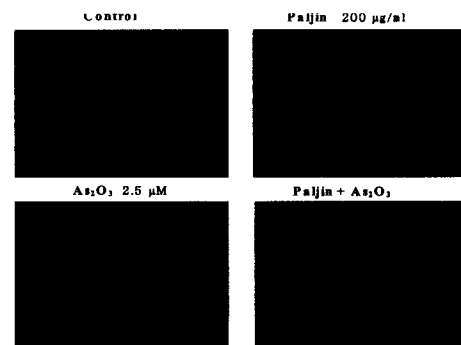


Fig. 5. The cotreatment of paljin and As₂O₃ induced the chromatin condensation and fragmentation of H-460 cells. Cells were treated with Paljin (200 µg/ml), As₂O₃ (2.5 µM) alone, or Paljin and As₂O₃ for 36 hr. After staining with DAPI, cells were observed under fluorescent microscopy (Olympus, Japan).

이러한 결과로부터 八珍湯合化積丸 및 As₂O₃의 병용처리에 의한 synergistic H-460 肺癌細胞의 세포죽음이 세포고사 이전에 의해서 매개됨을 확인할 수 있었다.

4. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리가 H-460 세포 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 영향

八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포 죽음시 나타나는 미토콘드리아의 막전위 변화 여부를 조사하기 위하여 약제가 처리된 세포에 Rhodamine-123 염색을 시행하여 이를 관찰하였다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃을 24 시간 단독 혹은 병용처리 후 Rhodamine-123 염색을 시행한 결과, 정상 대조군 및 As₂O₃, 八珍湯合化積丸 단독처리군에서는 모두 녹색의 형광이 세포질에서 점상형태(punctuated)로 분포하는 양상, 즉 막전위 변화가 일어나지 않았으나 八珍湯合化積丸 및 As₂O₃를 병용처리한 군에서는 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만성(diffuse)으로 산재하는 녹색 형광이 관찰되어 미토콘드리아의 막전위 변화가 일어났음을 시사하였다 (Fig. 6).

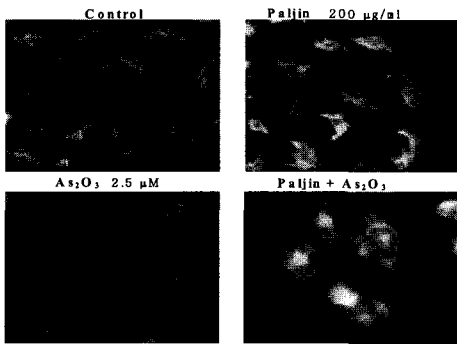


Fig. 6. The cotreatment of Paljin and As₂O₃ induced the mitochondrial membrane potential transition in H-460 cells. Cells were treated with Paljin (200 µg/ml), As₂O₃ (2.5 µM) alone, or Paljin and As₂O₃ for 36 hr. After staining with Rhodamine-123 (5 µM), cells were observed under fluorescent microscopy (Olympus, Japan).

5. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에서 PARP 및 ICAD cleavage 관찰

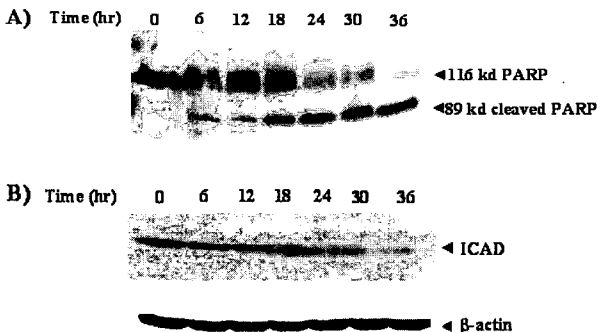


Fig. 7. The cotreatment of Paljin and As₂O₃ induced PARP and ICAD cleavage in H-460 cells. Cells were treated with Paljin (200 µg/ml) and As₂O₃ (2.5 µM) for the various periods. Cleavage of PARP (A) and ICAD (B) was measured by Western blotting with anti-PARP or ICAD antibodies.

세포고사에서 caspases라 불리는 일련의 단백 분해효소 (proteases)가 활성화된다. 이중 세포 사멸과정의 실행인자로 여

겨지는 caspase-3는 procaspase-3 상태로부터 상위 활성 유도인자인 caspase-8 혹은 caspase-9에 의해 활성화되며 활성화된 caspase-3는 이후의 세포고사 과정의 중요한 실행인자인 ICAD를 분해시켜 DNA 분절을 유도하거나 PARP cleavage등을 야기한다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시에도 이러한 PARP cleavage가 관찰되었으며 (Fig. 7A), 또한 ICAD의 시간 의존적인 분해가 관찰되었다 (Fig. 7B). 이때 전기영동에 전개된 단백질은 β-actin을 통하여 동량임을 확인하였다. 이러한 결과는 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시 암세포 사멸은 caspase-3의 활성화를 매개로 하는 전형적인 세포고사과정을 거치는 것으로 생각된다.

6. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에서 세포고사 신호전달 분자 Bak 단백질의 변화에 미치는 영향

세포고사 신호전달계에서 caspase-3의 활성화에 중요한 기관인 미토콘드리아에 연관된 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bax, Bak, Bcl-2, BclXL 및 BclXS 등은 미토콘드리아의 기능을 조절하여 세포의 성장이나 사멸에 중요한 역할을 수행한다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포죽음시 이러한 Bcl-2 family 단백질 중 Bak 단백질의 발현양상 변화를 조사하였다. 이를 위해 八珍湯合化積丸과 As₂O₃를 다양한 시간동안 처리한 후 세포를 포집, 과쇄하여 완충액에 녹아있는 총 단백질을 추출하였다. 이들 세포 단백질은 12.5 %의 SDS-PAGE에서 분리하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 후 Western blot 방법으로 발현 정도를 조사하였다. Fig. 8 에서와 같이 pro-apoptotic Bak 단백질의 발현이 증가되는 양상을 나타내었으며, 이러한 Bak 증가가 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포죽음과 밀접하게 연관되어 있으리라 사료된다.

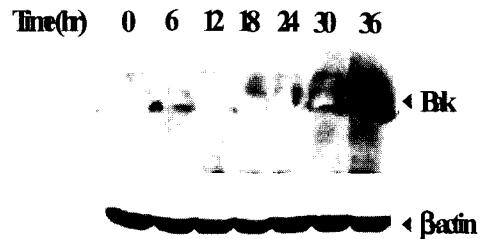


Fig. 8. The cotreatment of Paljin and As₂O₃ increased the expression of Bak. Cells were treated with Paljin (200 µg/ml) and As₂O₃ (2.5 µM) for the various periods. The same amounts of protein from cell lysates were separated on 12.5 % SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-Bak antibody and the immunoreactive band was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL system, Amersham, England).

7. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에서 histone 단백질 H2AX의 인산화 관찰

세포고사에 의한 세포사멸 현상의 초기에 이중가닥 DNA의 손상이 초래되고, 이러한 손상된 DNA에 의하여 histone 단백질의 인산화가 유도된다고 알려져 있다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시에도 이러한 세포죽음에서 histone 단백질 중 H2AX의 인산화가 유도되는지를 확인하기 위하여, 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 후 H-460 세포주의 세포 과쇄액을 15 %

SDS-polyacrylamide gel에서 전기 영동시킨 후 anti-phospho-H2AX 항체를 사용하여 Western blotting을 수행하였다. 그 결과 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 6시간 후부터 H2AX의 인산화가 관찰되기 시작하였으며, 처리 시간이 증가할수록 H2AX의 인산화 정도가 증가하였다 (Fig. 9).

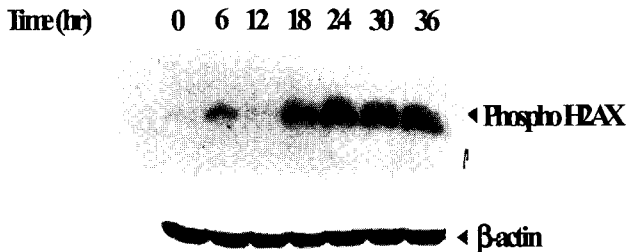


Fig. 9. The cotreatment of Paljin and As₂O₃ induced the phosphorylation of H2AX in a time-dependent manner. Cells were treated with Paljin (200 μ g/ml) and As₂O₃ (2.5 μ M) for the various periods. The same amounts of protein from cell lysates were separated on 12.5 % SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-phospho H2AX antibody and the immunoreactive band was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL system, Amersham, England).

8. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에서 암 억제 유전자 p53 발현양상 변화에 미치는 영향

DNA 손상을 유발하는 항암제는 세포고사에 관련된 p53의 발현과 활성화에 영향을 준다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시에도 이러한 세포죽음에서 p53 유전자 발현 및 활성변화가 관련되어 있는지를 알아보기 위하여 p53 단백질의 활성화에 관여하는 인산화 부위인 ser15의 아미노산에 대한 phospho-p53 (ser15) 항체를 사용하여 Western blot을 수행하였다. Fig. 10에서와 같이 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시에도 인산화된 p53 단백질의 변화는 관찰되지 않았으며, 또한 p53 단백질도 처리시간에 따른 유의한 발현 변화양상은 관찰되지 않았다. 따라서 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시에도 유도되는 肺癌細胞株 H-460의 세포죽음은 p53의 활성 및 발현양상 변화와는 무관한 기전에 의하여 매개된다고 판단된다 (Fig. 10).

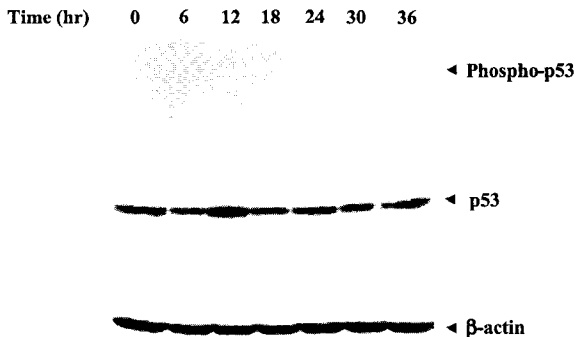


Fig. 10. The cotreatment of Paljin and As₂O₃ did not affect the expression of p53. Cells were treated with Paljin (200 μ g/ml) and As₂O₃ (2.5 μ M) for the various periods. The same amounts of protein from cell lysates were separated on 12.5 % SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-phospho p53 or anti-p53 antibodies and the immunoreactive band was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL system, Amersham, England).

9. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에서 death receptor DR4 와 DR5의 발현양상 변화에 미치는 영향

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL 혹은 Apo2L라 불림)은 Fas-L과 매우 유사한 구조를 갖는 TNF family에 속하는 리간드이다²⁵. TRAIL은 type II membrane protein으로 33-35 kda의 분자량을 갖는다, FasL 와 Fas의 상호작용에 의한 세포고사 유도와 유사하게 TRAIL은 수용체 DR4 나 DR5와 결합하여 많은 종양 세포주에서 세포사멸을 유도하는 것으로 알려지고 있다²⁶⁻²⁷. 한편 Decoy Receptor 1(DcR1; TRID, TRAIL-R3, LIT)는 glycosyl phosphatidylinositol (GPI)이 존재하는 세포막 단백질로서 DR4, DR5와는 비슷하지만 세포질 부위가 결핍되어 있다. DcR1은 TRAIL에 결합하며, 그 결과 Apo2L이 death receptor에 결합하는 것을 DcR1이 억제하며, decoy receptor 2는 (DcR2, TRAIL-R4, TRUNDD) DcR1과 마찬가지로 TRAIL이 DR4와 DR5에 결합하는 것을 저해하여 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시의 H-460 폐암세포의 세포죽음에서 DR4 와 DR5 유전자의 발현양상 변화를 Western blot을 통하여 확인하였다. Fig. 11에서와 같이 DR4의 발현양상은 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 전에서 발현되는 것으로 나타났으며, 두 약물의 병용처리에 의해 현저하게 변화되지는 않았다. 그러나 DR5 수용체는 병용처리 6시간 후부터 발현 및 증가되기 시작하여 18시간에 최고 발현양상을 보였으며, 36시간 까지 발현이 유지되었다 (Fig. 11).

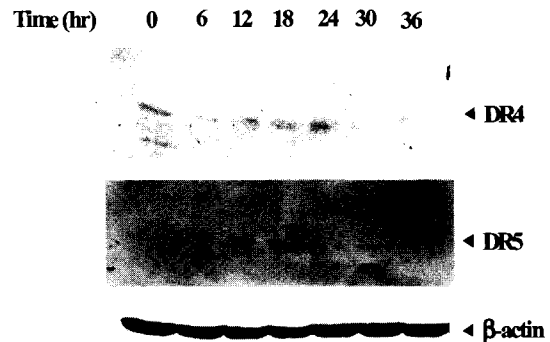


Fig. 11. The cotreatment of Paljin and As₂O₃ increased the expression of DR5. Cells were treated with Paljin (200 μ g/ml) and As₂O₃ (2.5 μ M) for the various periods. The same amounts of protein from cell lysates were separated on 12.5 % SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-DR4 or anti-DR5 antibodies and the immunoreactive band was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL system, Amersham, England).

고찰

우리나라 인구의 최근 10년간 각종 癌에 의한 死亡率 변화를 보면 인구 십만 명 당 1990년 110.4명에서 2000년 122.1명으로 10.6 %의 증가를 보이고 있다. 지난 90년에 비해서 死亡率이 증가한 癌은 폐암, 대장암, 췌장암, 여성유방암, 전립선암 등인데, 특히 肺癌은 인구의 노령화 및 대기오염의 심화 등으로 크게 증가하여 2000년에는 암 중 가장 높았던 癌 死亡率을 보였던 위암

(24.3 %) 보다도 더 높은 死亡率(24.4 %)을 보임으로써 국내 암 사망 원인의 1위를 차지하였다. 성별 癌 死亡率을 비교하면, 남 자에서는 肺癌으로 인한 死亡率이 36.1 %로 1위를 차지하고, 여 성에서도 12.6 %로 유방암에 이어 2위를 차지하고 있어 肺癌은 남녀 모두에서 가장 중요한 암 사망 원인을 보여주고 있다¹⁾.

癌의 발생은 생체내 정상세포가 발암물질들의 환경적 요인과 바이러스 감염, 유전적 요인, 만성자극 및 돌연변이 등의 어떤 과정을 거쳐 암세포로 형성되면 암세포화의 癌 성장기전을 거쳐 자라는데, 인체 항병능력이 저하된 상태에서 각종의 면역방어기능이 약화되어 암세포화된 비정상적인 세포를 파괴·제거하지 못하게 되면 세포조절기능을 잃고 증식하게 된다고 보고 있다^{28,29)}. 또한, 癌은 처음 생겨난 부위에 국한되지 않고 血管이나 림프관 등 여러 경로를 따라 다른 신체 부위로 移植되어 그곳에 정착 증식하게 되는 전이의 특성을 가지고 있다²⁴⁾. 癌 발생에 영향을 미치는 주요 원인으로는 흡연, 음주, 여러 발암물질들에 대한 직업적인 노출, 환경오염, 전리 방사선에의 노출, 자외선, 각종 약물, 바이러스 등이 있으며, 식이 및 영양의 결핍, 음식 첨가물, 유전적인 소인도 관여하는 것으로 알려져 있다^{2,3,5)}. 韓醫學에서는 癌의 발병원인을 正氣의 不足과 邪氣가 停滯하여 氣滯, 血瘀, 痰飲, 結聚하면 발병하는 것으로 보고 있으며¹¹⁻¹²⁾, 肺癌에 대한 원인에 대하여도 熱毒壅肺, 脾虛痰濕, 氣滯血瘀 및 氣陰兩虛 등으로 요약되고, 病理는 正氣가 부족한 상태에서 邪毒이 肺를 침범하여 肺氣가 贖鬱에 이르고 宣降기능과 通調水道 기능이 실조되어 氣機가 不利하고 血行이 不暢하며 津液이 不布되어 痰瘀가 肺絡에 형성되는데 蘊熱火毒 때문에 肺氣가 不通되고 熱毒을 발생하여 耗傷氣陰하고 損傷血脈하여 더욱 증상이 악화되는 것으로 인식되고 있다^{8,9)}. 《素問·奇病論》에서 “病脇下滿 氣逆……病名曰息賁”이라 하여 肺癌과 비슷한 의미로 “息賁”이 언급된 이래, 《素問·咳論》에 “… 咳而喘息有音 甚則唾血 …”, 《靈樞·邪氣臟腑病形》에 “肺脈……滑甚 爲息賁上氣”, “肺脈……微急 爲肺寒熱 急惰 咳唾血 引腰背胸”, 《靈樞·玉機真藏論》에 “胸中氣滿 喘息不便 內痛引肩項 身熱 脫形破脈”, 《難經·論五臟積病》³⁰⁾에 “肺之積名曰息賁……久不已”, 《濟生方》³¹⁾ “息賁之狀, 在于脇下 腹大如杯 喘息噴溢 是爲肺積”이라 하여 症狀과 病理의 측면에서 ‘肺脹’, ‘息賁’, ‘肺痿’, ‘胸痺’, ‘肺癰’, ‘肺喘’ 등은 모두 肺癌의 범주에 해당된다고 볼 수 있다^{32,34)}. 치료 또한 원인에 따라 養陰清肺, 解毒散結, 益氣養陰, 清火痰熱, 行氣寬中, 活血消腫, 和絡化痰 등이 다용된다^{35,36)}. 《素問·百病始生篇》에 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人 突然逢疾風暴雨而不病者 皆無虛 故邪不能獨傷人”, 《素問·刺法論》에 “正氣存內 邪不可干”, 《素問·上古天真論》 “真氣從之精神內守 病安從來”, 《素問·評熱病論》 “邪氣所瘵 其氣必虛”, 《靈樞·口問篇》에서 “邪之所在皆爲不足”이라 하여 많은 질병의 발생이 正氣의 不足으로 야기되며 인체의 抗病能力에 결정적인 인소가 正氣임을 강조하였다⁹⁾.

인체의 정상적인 생명현상을 유지하기 위해서는 陰陽의 평형이 이루어져야 하는데 여러 원인에 의해 陰陽의 평형이 깨지고 虛實이 발생하며, 이때 질병발생과 병변과정은 正氣와 邪氣의 抗爭 및 消長進退로 偏盛偏衰가 나타난다고 보는 것이 한의학의

病理觀이며 이러한 偏盛偏衰를 바로 잡아주는 것 즉, 陰陽을 조화시켜주는 것이 한의학 치료의 기본 원칙으로 이는 人體의 恒常性 유지를 목적으로 삼는 免疫理論과 부합된다고 볼 수 있다^{37,38)}. 또한 治療法에 있어서 朱³⁹⁾는 消積의 방법을 쓰되 正氣를 배양하고 清熱, 解毒, 散結시켜야 한다하고 하였고, 張⁹⁾은 正氣의 배양으로 積을 제거할 수 있다 하였으며, 李⁴⁰⁾는 攻伐之藥을 써서 치료할 때에도 扶正을 겸하여 原氣를 傷하지 않게 하여야 한다고 하였다. 《內經》⁶⁾에 “治病必求本”의 학설에 근거하여 羅¹³⁾는 “養正則積自除”라고 하여 扶正培本을 강조하였고, 또한 《素問·至真要大論》⁶⁾의 “堅者削之”, “結者散之”, “留者攻之”처럼 攻邪를 더하여 扶正培本과 攻補兼施를 치료의 원칙으로 삼았다.

악성종양인 癌에 대하여 서양의학에서 癌을 치료하는 방법은 크게 手術療法, 抗癌化學療法, 放射線療法 세 가지로 구분이 되며, 이외에 局所治療法, 호르몬療法, 광역학治療法, 레이저治療法 등이 있으며, 최근에는 免疫療法, 遺傳子療法까지 포함시키기도 한다³⁴⁾. 이 중에서 抗癌劑는 암세포에 대한 細胞毒性을 나타내는 약제를 말하는데 治療用量을 증가시키면 이에 비례하여 암세포의 破壞率도 증가되나 용량증가에 따른 毒性 특히 消化器障礙, 골수 억제작용 등 많은 부작용이 따르기 때문에 만족스러울 만한 효과를 기대하기 어렵다. 따라서 轉移된 癌에 대한 치료의 한계와 生體損傷, 免疫低下, 正常細胞破壞 등의 부작용이 발생되어 최근에는 이에 대한 대안으로 癌治療에 있어서 韓·洋方 并用治療가 유효하다는 방향으로 관심이 모아지고 있으며⁴¹⁾, 최근에는 免疫療法이 많이 이용되고 있으며 韓方治療法의 一種인 灸法과 韓藥을 이용한 체질개선 등의 방법도 병용되고 있다^{42,43)}. 이러한 치료는 생존기간 연장, 病巢의 緩解 및 安定, 생활의 질 향상, 통증 감소, 면역기능 조절, 암세포의 성장과 轉移의 억제, 癌前病變抑制 등의 효과가 있다⁴⁴⁾. 한편 최근에는 抗癌治療劑의 작용기전에 세포고사 기전에 의존한다는 사실이 밝혀진 이래로 세포고사 신호전달계의 기능변화를 통한 항암치료의 효능을 높이려는 연구에 관심이 모아지고 있다. 특히 많은 암 환자에서 치료 도중에 암세포가 항암 치료제에 강한 내성을 유발하여 항암치료제에 대한 감수성이 저하된다고 알려져 있다²⁸⁾. 이러한 관점에서 전통적으로 癌治療에 사용되어온 한약재 중에서 세포고사 신호전달계를 활성화 시킬 수 있는 복합처방, 단일처방, 혹은 효능성분을 규명하는 연구는 癌治療에 대단히 유용할 것으로 사료된다.

본 연구에 사용된 八珍湯合化積丸의 처방내용은 潘敏求의 《中華腫瘤治療大成》²¹⁾에 의거하였으며 구성약물 중 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草는 補氣健脾하고, 生地黃, 當歸, 赤芍藥, 川芎은 補肝腎하며, 香附子, 乳香, 三稜, 蓬朮은 行己破血, 消積止痛, 消腫하고, 穿山甲은 活血通經, 消腫排膿하고, 鱗甲은 滋陰潛陽, 軟堅消結하는 효능을 지니고 있어 이러한 약물들은 면역기능향상이나 抗腫瘍하는 치료효과를 가지고 있다^{21,45-47)}.

세포고사(apoptosis)는 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요 기전⁴⁸⁾으로 인식되면서 1980년대 후반기부터는 생명과학에서 중요 관심영역으로 인식되어 많은 발전을 가져왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다⁴⁹⁻⁵⁰⁾. 세포고사 기전의 이상은

암, 자가면역질환, 퇴행성 질환 및 HIV 등의 병리에 중요한 역할을 수행함이 보고되었다⁵¹⁻⁵². 특히 항암 치료에 대한 내성(resistance) 발현이나 감수성(sensitivity) 저하 등도 세포고사 신호전달기전의 기능과 밀접한 관계가 있다. 최근 연구에 의하면 항암 치료에 흔히 사용되는 많은 화학요법제들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 암조직이나 세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀져 있고 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin /ceramide 경로, 초기발현 유전자(early immediate gene) 발현, 단백질 분해효소 caspase family cysteine protease활성화, DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 활성화등이 관여하는 것으로 보고되고 있다⁴⁹. 이러한 이유로 항암 치료의 효율성은 세포고사 기전의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 성공적인 암치료법의 개발을 위해 세포고사 현상에 대한 정확한 생화학적 작용기전에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다. 그러나 서양의학에서 사용되고 있는 항암 치료제들의 대부분은 그 효능에도 불구하고 치료과정에서 동반되는 심각한 부작용, 즉 세포독성이나 장기독성 때문에 그 사용에 제약을 가지고 있다. 한방적인 증양의 치료기술이나 약제는 수세기 동안 사용되어 오면서 그 효능의 작용기전은 실험적으로 제공되어 있지 않지만 부작용 등으로 인한 안전성의 문제는 없는 것으로 이미 입증되어 있는 상황이다. 이러한 사실에 근거하여 본 연구자는 韓·洋方에서 사용되는 항암치료제의 장점을 이용하여 두 분야 약제의 병용처리에 의한 항암치료의 상승효과에 대하여 치료법의 개발에 관심을 가지게 되었다. 특히, 李¹⁵ 및 林¹⁶등에 선행연구에서 본 八珍抗癆丹과 白花蛇舌草가 들어 있지 않은 것 외에는 동일한 약제로 구성되는 八珍湯合化積丸과 adriamycin 과의 병용투여로 암세포의 세포고사효과를 높일 수 있다는 보고하였다. 본 연구에서는 八珍湯合化積丸과 adriamycin의 병용투여 시 얻어지는 상승된 항종양 효과 이외에도 여러 가지 항암제와 八珍湯合化積丸의 병용투여에 의해 synergistic한 항종양 효과를 보이는 항암물질을 탐색하여 이로부터 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용투여가 다른 약물의 조합보다도 훨씬 synergistic한 항종양효과를 유도함을 확인하였다.

八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 다른 항암제의 병용처리와는 달리 현저하게 암세포에 대한 세포독성 효과가 증가됨을 확인하였으며 (Fig. 1), 八珍湯合化積丸과 As₂O₃에 대한 肺癌細胞株 H-460세포의 감수성을 조사한 결과 八珍湯合化積丸 단독처리 시 200 µg/ml 농도에서도 유의한 세포독성은 관찰되지 않고, As₂O₃는 5 µM 농도에서 세포독성 효과가 없었지만 10 µM과 20 µM에서는 각각 60 %와 47 %의 세포 생존율을 나타내었다 (Fig. 2). 반면 두 약물의 병용처리는 H-460 세포에서의 이들 약제에 대한 감수성(sensitivity)을 증가시켜 세포독성 상승효과를 현저히 증가시켰다 (Fig. 3). 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포독성이 세포고사 현상에 의한 DAPI 염색법에 의한 핵의 형태학적 관찰로 확인하였다. 두 약물의 병용처리 시 세포가 배양판의 표면에서 분리되어 분해되는 뚜렷한 세포병

변 현상이 관찰되었으며 (Fig. 4), 전형적인 세포고사의 특징인 chromatin 구조의 응축과 분절이 관찰되었다 (Fig. 5). 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포독성이 세포고사 현상임을 확인하였기에 그 작용기전의 하나인 caspase family cysteine protease의 활성화 여부를 이들의 기질인 PARP와 ICAD의 분해 여부를 확인함으로 조사하였다. 1986년 Ellis 및 Horvitz에 의하여 nematoid C. elegans에서 ced-3 및 ced-4의 mutation이 세포고사를 억제한다는 보고 이래로 ced-3의 mammalian homologue인 ICE가 clone되었으며 이는 후에 caspase-1 protease로 명명되었다⁵³. 그 이후에 약 14종류의 caspase family cysteine protease의 subfamily가 밝혀져 있으며 이들 유전자는 cysteine기반을 선택적으로 절단하는 단백질 분해효소를 coding하고 있다⁵⁴⁻⁵⁶. Caspase-3는 mammalian ced-3 homologue로서 ICE라고도 알려져 있으며 세포질에서는 proenzyme 형태로 존재한다. Proenzyme 형태의 caspase-3는 caspase-8 및 caspase-9 같은 initiator caspase에 의하여 전구형(pro-form)이 절단되어 활성화된 형태로 변환된다. 세포고사 과정에서 caspase-3의 세포내 표적인자로는 protein kinase C(PKC), lamin, 및 PARP 등이 알려져 있으며 endonuclease의 활성화도 caspase-3 protease의 활성화에 의해 ICAD(DFF45)라 불리는 단백질을 분해함으로 이루어진다^{57,58}. 본 연구에서도 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 116 kd 크기의 PARP가 89 kda로 시간 의존적으로 절단됨을 확인하였고 또한 ICAD의 시간 의존적인 감소를 확인하여 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 죽음 역시 caspase-3의 활성화를 매개로 하는 전형적인 세포고사 과정을 거치는 것으로 판단되어진다(Fig. 7). 한편, 세포고사 신호전달계에서 caspase-3의 활성화에 중요한 기관인 미토콘드리아에 연관된 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bax, Bak, Bcl-2, BclXL 및 BclXS 등은 미토콘드리아의 기능을 조절하여 세포의 성장이나 사멸에 중요한 역할을 수행한다. 이러한 Bcl-2 family중의 Bax와 Bak는 caspase-8에 의해 잘려지는 Bid 단백질의 산물인 tBid라는 단백질에 의하여 활성화되어 미토콘드리아의 막에 통로를 만들고, 이 통로를 통해 cytochrome c가 세포질로 흘러가 caspase-3 등의 활성화가 이루어진다고 보고되고 있다⁵⁹. Fig. 8의 결과와 같이 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 pro-apoptotic Bak 단백질의 발현이 증가되는 양상을 나타냈으며 (Fig. 8), 이러한 Bak 증가가 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리를 한 군에서 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만성으로 미토콘드리아의 막전위 변화를 유도하였으며 (Fig. 6), 하방의 caspases를 활성화시켜 암세포 죽음을 증진시켰으리라 사료된다. 또한 세포고사에 의한 세포사멸 현상의 초기에 이 증가된 DNA의 손상이 초래되고, 이러한 손상된 DNA에 의하여 histone 단백질의 인산화가 유도된다고 알려져 있다. 본 연구에서도 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리시에 6시간 후부터 histone 단백질 중 H2AX의 인산화가 관찰되기 시작하였으며, 처리 시간이 증가할수록 H2AX의 인산화 정도가 증가하였다 (Fig. 9). p53 단백질은 UV나 다른 방사선에 의해서 DNA가 손상을 입었을 때 합성된다. 이 p53은 세포주기의 G1 phase에서 S phase로 들어가기 전 check point로써 역할을 한다. 일단 p53이 세포주기

를 중단시켜 손상된 DNA를 회복할 수 있는 시간을 벌고 DNA 손상 정도에 따라 회복하여 다시 세포 성장이 활성화되어 세포주기의 S phase로 들어가게 하거나, 만약 DNA의 손상 정도가 심각하여 회복할 수 없다면 프로그램화된 죽음의 경로로 진행시키는 역할을 수행한다. 본 연구 결과는 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 인산화된 p53 단백질의 변화는 관찰되지 않았으며, 또한 p53 단백질도 처리시간에 따른 유의한 발현 변화양상변화는 관찰되지 않았다. 따라서 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리에 유도되는 肺癌細胞株 H-460의 세포죽음은 p53의 활성화 및 발현양상 변화와는 무관한 과정에 의하여 일어나는 것으로 사료된다 (Fig. 10). 한편 TRAIL과 이의 수용체인 DR4 나 DR5의 발현양상을 살펴본 바, 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 DR4의 발현양상은 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 전에서 발현되는 것으로 나타나며 두 약물의 병용처리에 의해 현저하게 변화되지는 않았으나, 세포고사기전 중의 하나인 TRAIL/Death receptors의 상호작용에 관여하는 DR5 수용체는 병용처리 6시간 후부터 발현 및 증가되기 시작하여 18시간 때에 최고 발현양상을 보였으며, 36시간 까지도 발현이 유지되어 나타났다 (Fig. 11). 이것은 DR5의 발현증가를 통해 이 두 약물의 병용투여가 암세포 사멸 증진 효과를 유도할 수 있는 것으로 사료되나 앞으로 이에 대한 더 많은 연구가 진행되어야 하리라 생각된다.

결 론

본 연구에서는 여러 항암제와 八珍湯合化積丸의 병용투여에 의해 synergistic한 항종양 효과를 보이는 항암물질을 찾고자 연구를 시작하였고, 이로부터 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용투여가 유용한 결과를 줄 수 있음을 확인하고 이에 대한 작용기전을 분석하였다. 이를 위하여 肺癌細胞株 H-460에 두 약물의 단독 및 병용처리 후 세포 생존율의 비교, 세포병변 현상 및 chromatin 구조의 응축과 분절, 미토콘드리아의 막전위 변화, PARP cleavage, Bak 단백질의 발현, histone 단백질 H2AX의 인산화 관찰, p53 발현증가 및 활성화, 그리고 DR4 와 DR5의 발현양상 분석을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

八珍湯合化積丸과 항암제로 알려진 rofecoxib, sulindac, apicin과의 병용처리에 의한 암세포 사멸 증진효과를 보이는 항암제를 탐색하는 과정에서, 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리군은 肺癌細胞株 H-460 세포에서 유의하게 세포독성의 상승효과를 유발시켰다. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 세포병변 현상과 chromatin 구조의 응축과 분절된 핵 모양이 관찰되어 세포고사에 의한 세포독성임을 확인하였다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만성으로 산재하는 녹색형광이 관찰되어 미토콘드리아의 막전위 변화가 일어났음을 보여주었다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 H-460세포에서 caspase-3의 활성화에 의해 분해되는 PARP 와 ICAD 의 분절을 나타내었다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시에 histone 단백질 중 H2AX의 인산화가 유도된 반면, 인산화된 p53 단백질의 변화는 관찰되지 않았으며, 또한

p53 단백질도 처리시간에 따른 유의한 발현 변화 양상은 관찰되지 않았다. 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시, 세포고사 신호전달분자인 DR5의 발현이 증가되었고, pro-apoptotic 역할을 수행하는 Bak의 발현이 증가되었다.

이상의 결과 八珍湯合化積丸과 As₂O₃의 병용처리 시 세포고사 신호전달계인 caspase 활성화, 세포병변 현상 및 chromatin 구조의 응축과 분절, 미토콘드리아의 기능변화, histone 단백질 H2AX의 인산화, death receptor의 발현 변화 등에 의해 세포고사를 증진시키는 효과가 있었으며, 임상적으로 폐암 환자에게 좋은 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2003년 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 이루어짐

참고문헌

1. 통계청 : 사망원인통계연보, 대전, 통계청, pp. 8-10, 2001.
2. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp. 201-202, 212-216, 1997.
3. 문 구 외 : 암 동서의 결합치료 1권, 익산, 원광대학교출판국, pp. 55-90, 99-120, 383-452, 1999.
4. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교출판부, pp. 1-3, 31-44, 1992.
5. 李 岩 : 腫瘍學, 人民衛生出版社, pp. 2-8, 1982.
6. 洪元植 編 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院出版部, pp. 37-38, 77-78, 304-305, 347-378, p. 44, 55, 57, 82, 94, 118, 122, 181, 213, 215, 249, 319, 326, 1981.
7. 巢元方 : 諸病源候論, 北京, 人民衛生出版社, p. 575, 624, 625, 879, 1983.
8. 李 梃 : 醫學入門, 서울, 翰成社, p. 358, 390; 1982.
9. 張介賓 : 景岳全書, 서울, 大星文化社, p. 479, 1988.
10. 賈 毅 : 癌瘤防治研究, 서울, 成輔社, pp. 25-29, 1984
11. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版社, pp. 13-14, 15, 245-255, 1995.
12. 羅天益 : 衛生寶鑑, 서울, 金剛出版社, p. 220, 1981.
13. 白根基:인간 간암세포주 HepG2에서 八珍抗癌丹과 Adriamycin의 병용처리에 의한 抗腫瘍 效果, 圓光大學校 大學院, 2002.
14. 金成鎭 : 八珍湯合化積丸의 抗腫瘍 效果에 관한 研究, 圓光大學校 大學院, 1999.
15. 김태운 외 : 消積白朮散이 Bleomycin의 副作用減少와 抗癌效果에 미치는 영향, 大韓韓方腫瘍學會誌, 5(1):77-102, 1999.
16. Barry MA, Behbke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death(apoptosis) by cisplatin, other cancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem Pharmacol. 40:2353-2362. 1990.
17. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qui QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z and Wang ZY. Use of arsenic trioxide As₂O₃ in the treatment

- of acute promyelocytic leukemia (APL). Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*. 89: 3354-3360. 1997.
18. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, Deblasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell R. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*. 339:1341-1348. 1998.
 19. 李竝求 : 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용처리시 나타나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 관한 作用機轉 研究, 圓光大學校 大學院, 2000.
 20. 林允淑 : 八珍湯合化積丸과 Adriamycin을 병용처리시 나타나는 synergistic 항암효과, 圓光大學校 大學院, 2001.
 21. 潘敏求 外 : 中華腫瘤治療大成, 河北, 河北科學技術出版社, p.60, 1996.
 22. Fenwick SW, Toogood GJ, Lodge JP, Hull MA. The effect of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on human colorectal cancer liver metastasis. *Gastroenterology*. 125, 716-729, 2003.
 23. Babbar N, Ignatenko NA, Casero RA, Gerner EW. Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer. *J. Biol. Chem.* Manuscript M307265200, 2003 .
 24. Kwon SH, Ahn SH, Kim YK, Bae GU, Yoon JW, Hong S., Lee HY, Lee YW, Lee HW, and Han JW. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 277, 2073-2080, 2002.
 25. 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*. 3, 673-682, 1995.
 26. 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*. 137, 221, 1997.
 27. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. 274, 1363-1366, 1996.
 28. Sasake S : Antitumor agents from medical plants, *Jpn, Kokai Tokyo koho Jp*, pp. 58, 118, 820, 1983.
 29. Chang Kiu Moon, Bueong Gon Lee, Soo Whan Lee and Tak Lim Kang . Effect of antitumor polysaccharides from Albizza julibrissin on Immune function. *Arch, Pharmacol Res*. 8(4): 277-282, 1985.
 30. 扁鵲 : 難經, 昭人出版社, pp. 187-193, 1985.
 31. 嚴用和 : 濟生方, 人民衛生出版社, p. 542, 1985.
 32. 張倫 : 肺癌237例積辨證論治, *新中醫*, 13:24-25, 1985.
 33. 張民翔 : 腫瘤良方大全, 安徽科學技術出版社, pp. 1340-1343, 1992.
 34. 沈學寧 : 腫瘤免疫抑制因子研究進展, *癌症*, 10(2):160-162, 1991.
 35. 方藥中外 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 621-636, 1986.
 36. 上海中醫學院 : 中醫內科學, 上海, 上海商務印書館, pp. 302-341, 1976.
 37. 徐範錫 外 : 免疫과 關聯된 輸穴考察, 대전대한의학연구소, 2:133-166, 1994.
 38. 趙鐘寬 : 免疫에 관한 東洋醫學적 考察, *東洋醫學*, 12(1): 19-23, 1986.
 39. 朱震亨 : 丹溪心法 卷 68, 臺灣, 五洲出版社, p. 1, 1963.
 40. 李仲梓 : 醫宗必讀, 서울, 醫學社, pp. 254-257, 1976.
 41. 김노경 : 抗癌化學療法, *大韓內科學會誌*, 36(3) : 299-301, 1989.
 42. 洪元植 編 : 現代中國의 癌治療法, 서울, 英文社, pp. 17-35, 81-84, 361-388, 1980.
 43. 張代釗 外 : 中醫藥對腫瘤放化療的增敏感毒作用, *中國中西結合雜誌*, 12(3) : 135-138, 1992.
 44. 慶熙大學校 제 1회 동양의학 국제 심포지엄 조직위원회 : 암과 성인병에 대한 동양의학의 역할, 서울, pp. 76-84, 1996.
 45. 李家康 外 : 中醫腫瘤方治大全, 北京, 科學技術文獻出版社, p. 599, 1994.
 46. 劉春安 外 : 抗癌中草藥大辭典, 湖北, 湖北科學技術出版社, p. 14, 33, 45, 100, 260, 340, 440, 638, 710, 752, 776, 1994.
 47. 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南, 湖南科學技術出版社, p. 7, 16, 19, 96, 122, 194, 213, 235, 343, 1987.
 48. Fadeel B, Henter JI, Orrenius S. Apoptosis required for maintenance of homeostasis: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by too little cell death. *Lakartidningen*. 97:1395-1400, 1402, 2000.
 49. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol*. 41: 461, 1997.
 50. Dai J, Weinberg SR, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood*. 93:268-277. 1999.
 51. Huang S, Huang CF, Lee T. Induction of mitosis-mediated apoptosis by sodium arsenite in HeLa S3 cells. *Biochem Pharmacol*. 60:771-780. 2000.
 52. Desagher S, Martinou JC : Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10(9):369-77, 2000.
 53. Alnemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171, 1996.
 54. Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R and Roth GS. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved

- SAPK/JNK activation pathways. *J Biol Chem.* 273: 3756-3764, 1998.
55. Han J, Lee JD, Bibbs L, and Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 265:808-811, 1994.
56. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 41:61, 1997.
57. Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273(12): 7141-7147, 1998.
58. Kim Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase 3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272:31138, 1997.
59. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 50, 343-352, 2002.