

清肺湯의 실험적 폐전이암에 대한 항암 및 면역효과에 관한 연구

이동주 · 김명동¹ · 김영삼¹ · 유영민 · 이선구*

상지대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 상지대학교 한의과대학 생리학교실

Anticancer and Immune Effects of *Chungpae-tang* on the Metastasis of Lung Cancer Cell

Dong Ju Lee, Myung Dong Kim¹, Young Sam Kim¹, Yeong Min Yoo, Seon Goo Lee*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Sangji University,

1: Department of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Sangji University

Chungpae-tang is suggested to have the antitumor activity on lung cancer. This study was performed to investigate apoptotic effect in vitro and antitumor effect and immune response after injection of B16-F10 melanoma cells and *Chungpae-tang* into a tail vein of C57BL/6 mice and administration of *Chungpae-tang* in A549 human lung cancer cell line in vivo, respectively. Experimental studies were obtained by measuring the median survival time and cytokine expression through RT-PCR, and ELISA assay. The results were summarized as follows: 5 mg/ml of *Chungpae-tang* causing DNA fragmentation, caspase-3 enzyme activation, PARP fragmentation, and cytochrome c release, suggested that *Chungpae-tang* has in vitro apoptotic effect in A549 human lung cancer cell line in the apoptosis-induced experiment. The median survival time of the *Chungpae-tang* treated group was 21 days and that of control group was 22 days, suggesting that the median survival time between the *Chungpae-tang* treated group and the control group was not significant. Cytokine expression between the *Chungpae-tang* treated group and the control group was noticeable, but was not significant in the RT-PCR. In the ELISA assay, IL-2 productivity in the *Chungpae-tang* treated group was to increase more than that in the normal group ($p < 0.05$) and was no significant between the *Chungpae-tang* treated group and the control group. INF- γ productivity of the control group decreased more than that of the normal group ($p < 0.05$) and that of the *Chungpae-tang*-treated group increased more than that of the control group ($p < 0.05$). IL-12 productivity of the control group increased more than that of the normal group ($p < 0.05$) and that of the *Chungpae-tang*-treated group decreased more than that of the control group ($p < 0.05$) and the normal group. IL-4 productivity of the *Chungpae-tang*-treated group increased more than that of the normal group and the control group ($p < 0.05$). IL-10 productivity of the *Chungpae-tang*-treated group increased more than that of the normal group and the control group ($p < 0.05$). Accordingly the results show *Chungpae-tang* could induce apoptosis in A549 human lung cancer cell line and bring to antitumor effect and immune response against injection of B16-F10 melanoma cells into a tail vein of C57BL/6 mice but it needs more research on the precise mechanism of such effects.

Key words : *Chungpae-tang*, apoptotic effect, antitumor effect, IL-2, IL-4, IL-12, IL-10, INF- γ

서 론

우리나라 2002년 현재 암으로 인한 사망률이 인구 10만명당

131.9명으로 전체 사망원인의 25.75%를 차지하며, 그 중 기관, 기관지 및 폐암으로 인한 사망은 인구 10만명당 26.2명으로 전체 암 사망의 19.86%를 차지한다¹⁾. 폐암 환자 전체의 5년 생존율은 약 14%이며, 진단시에 환자 반수이상에서 전신전이가 있는데, 이러한 환자의 5년 생존율은 불과 2%에 불과하다²⁾.

정상 세포에는 독성을 나타내지 않으면서 면역체계를 활성화 시킴으로써 암을 치료하려는 노력이 여러 방면에서 이루어지

* 교신저자 : 이선구, 원주시 우산동 660번지 상지대학교 한의과대학

· E-mail : returnto@sangji.ac.kr, · Tel : 033-730-0664

· 접수 : 2005/07/27 · 수정 : 2005/08/26 · 채택 : 2005/09/28

고 있으며, 최근에는 여러 가지 천연자원에서 새로운 항암성분을 탐색하여 항암제를 개발하려는 연구를 하고 있다³⁾.

최근에 천연물이나 한약을 이용한 폐암관련 연구로는 **李 등⁴⁾의 牧榆湯**이 인체 폐암세포에 미치는 분자생물학적 연구, **李 등⁵⁾의 전이암에 대한 한방 치험**, **노 등⁶⁾의 마늘과 양파 추출물**을 이용한 인체 폐암 세포에 대한 연구, **이 등⁷⁾의 경옥고와 경옥고 가미방의 폐암에 미치는 영향**, **박 등⁸⁾의 봉독성분의 melitin**을 이용한 Apoptosis 유도 연구, **이 등⁹⁾의 길경의 항암능 실험**, **박 등¹⁰⁾의 人蔘瀉肺湯**을 이용한 폐암세포의 Apoptosis 연구, **이 등¹¹⁾의 完肺湯**의 실험적 폐전이암에 대한 연구, **이 등¹²⁾의 瀉白散** 추출물의 인체 폐암세포에서의 Apoptosis 유도 실험, **강 등¹³⁾의 길경 추출물**의 폐암 세포 성장억제 연구, **최 등¹⁴⁾의 Ginsenoside Rc**에 의한 Apoptosis 연구, **이 등¹⁵⁾의 인삼사포탕**에 의한 p27의 발현 증가와 pRB의 인산화 억제 실험, **전 등¹⁶⁾의 소삼산 I**의 효능에 관한 연구 등이 진행되었다.

청폐탕(淸肺湯, *Chungpae-tang, Qingfei-tang*)은 萬病回春 咳嗽問¹⁷⁾에 ‘**痰嗽者 嗽動便有痰聲 痰出嗽止是也 嗽而痰多者 是脾虛也**’, ‘**肺脹嗽者 嗽則喘滿氣急也 喘急不得眠者 難治**’, ‘**久嗽不止 成勞怯 若久嗽聲啞 或喉生瘡者 是火傷肺金也 俱難治之 若血氣衰敗 聲音失音者 亦難治也**’에 사용하는 것으로, ‘**一切咳嗽上焦痰盛**’에 효능이 있는 것으로 기재 되어 있다.

폐암의 일반적인 증상이 계속적인 기침, 호흡곤란, 화농성 또는 피가 섞인 가래, 흉통 및 기관지염이나 폐렴의 잦은 재발임을 고려할 때, 청폐탕의 적응증은 현대의 폐암과 매우 유사한 점이 있다. 또한, 청폐탕을 이용한 항암관련 연구는 보고된 바 없다.

이에 본 연구는 청폐탕의 실험적 폐암에 대한 효과를 알아보기 위하여 A549 인체 폐암 세포에 대한 Apoptosis 기작을 살펴보고, B16-F10 마우스 melanoma 암세포를 C57BL/6 마우스의 미정맥에 주입하여 만든 실험적 폐전이암에서 생존율 및 Cytokine의 발현정도를 mRNA RT-PCR, ELISA를 이용하여 측정된 결과 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 동물

항암능 및 면역능에 사용한 동물은 생후 4주령, 체중 20g내외의 웅성 C57BL/6 마우스로써, 대한바이오링크로부터 구입하여 시판사료(삼양사료(주), 한국)와 수돗물을 자유롭게 급식시키면서, 온도 21±2℃, 습도 55±3%의 항온항습기(명진기계, 한국)에서 1주일간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 처방

청폐탕은 만병회춘의 해수문에 기재된 처방으로 구성 약제를 한의과대학 본초학교실에서 精選한 것을 사용하였다. 청폐탕 10첩 분량인 514g(Table 1.)을 3000cc의 물과 함께 5000cc의 둥근 플라스크에 넣어 3시간 전탕하였고, 전탕 후 16겹의 거여즈로 두 번 걸렀다. 이후 -70℃의 동결건조기(Biocryos, 한국)에서 48시간

동안 동결건조하여 건조분말 108.8g(수득율 21.17g)을 얻었다.

Table 1. Prescription of *Chungpae-tang*

Herbal Name	Pharmaceutical Name	Scientific Name	Amount (g)
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>	12
黃 芩	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis Georgi</i>	60
桔 梗	Platycodi Radix	<i>Platycodon grandiflorum(Jacq)</i>	40
茯 苓	Poris	<i>Poria cocos (SCHW.) Wolf</i>	40
陳 皮	Citri Pericarpium	<i>Citrus unshiu Markovich</i>	40
當 歸	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas Nakai</i>	40
貝 母	Fritillariae Cirrhosae Bulbus	<i>Fritillaria cirrhosa D. Don.</i>	40
桑白皮	Mori Cortex	<i>Morus alba L.</i>	40
天門冬	Asparagi Radix	<i>Liriope platyphylla Wang et Tang</i>	28
梔 子	Gardeniae Fructus	<i>Gardenia jasminoides for. Grandiflora Makino</i>	28
杏 仁	Armeniacae Amarum Semen	<i>Prunus armenaca L. var. ansu Maxim</i>	28
麥門冬	Liriois Tuber	<i>Liriope platyphylla Wang et Tang</i>	28
五味子	Schizandrae Fructus	<i>Schizandra chinensis(Turcz.) Baill.</i>	10
生 薑	Zingiberis Rhizoma ecens	<i>Zingiber officinale ROSC.</i>	40
大 棗	Jujubae Fructus	<i>Zizyphus jujuba Mill. Var. inermis REHDER</i>	40
總 量			514(g)

3. 세포배양

1) 세포

본 실험에 사용한 세포는 A549(KCLB 10185) human Lung carcinoma cell과 B16-F10 (KCLB 80008) mouse melanoma cell을 사용하였다. A549 세포는 Apoptosis 관련 항목 측정에 사용되었고, B16-F10세포는 마우스 폐전이암 발생에 사용되었다. 사용된 세포는 모두 한국세포주은행으로 부터 분양받아 5% CO2와 95% air의 배양기(존샘, 한국)에서 37℃를 유지하며 배양하였다. 배양된 세포는 매일 위상차 현미경(HUND, Germany)을 통하여 관찰하고 주 1-3회의 계대배양을 하면서 적정하게 성장시켜 사용하였다.

2) 배지

기본배지는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 3.7 g/L sodium bicarbonate (Shinyopure Chemicals Co, Japan), Penicillin G (100,000 Units/ml, Sigma, USA) 1 ml, Streptomycin (100 mg/ml, Sigma, USA) 1 ml, fungizone (Gibco, USA) 4 ml을 첨가하여 혼합한 뒤, bottle top filter (Corning, USA)로 멸균하여 사용하였다. FBS(Gibco, USA)는 56℃의 항온수조에서 30분간 inactivation시킨 후 사용하였다. 혼합배지는 RPMI 1640 기본배지에 FBS를 10% 첨가하여 사용하였으며, 암세포 배양 전반에 사용하였다.

4. 암 유발 및 군분리

암을 유발하는 B16-F10 세포를 5 × 10⁶ cells/ml로 맞춘 후, C57BL/6 마우스의 미정맥을 통하여 0.2ml씩 30G1/2(Becton Dickinson, USA)의 주사기를 사용하여 조심스럽게 주입하여 암

을 유발 시켰다. B16-F10세포 주입 후 마우스를 무작위로 군을 분리하였다. 실험에 사용된 군은 정상군(Normal), 대조군(Control), 실험군(CPT)으로 하였다. 정상군은 항온항습기에서 충분한 사료와 물을 공급하며 안정되게 사육되었다. 대조군은 정상군과 같은 조건에서 실험기간동안 식염수 0.2ml을 경구 투여하였으며, 실험군은 정상군과 같은 조건에서 실험기간동안 0.2ml의 청폐탕을 경구 투여하였다. 생존율의 경우 각 군은 10마리씩 나누었고, 다른 실험은 6마리씩 군을 분리하여 실험에 임하였다 (Table 2).

Table 2. Scheme of Experimental Grouping

Group		실험동물수	
		Survival time	Others
Normal	negative control group	10	6
Control	positive control group	10	6
CPT	Chungpae-tang treated group	10	6

사용된 청폐탕은 성인 1일 분량을 동물의 체중에 맞게 환산하여 사용하였으며, 21.76g의 건조분말을 120ml의 증류수에 희석하여 일정량씩 밀봉된 상태로 병에 넣어 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. 비장세포의 분리 및 Colony 관찰

1) 비장세포의 분리

청폐탕의 면역능과 항암능에 대한 효능을 살펴보기 위하여 Cytokine을 측정하였다. 이때 비장세포에서 분리한 임파구를 사용하였다. 비장세포는 각각의 실험 마지막날 치사시킨 마우스에서 무균상태로 적출하여 4℃의 HBSS로 2회 세척 한 뒤 이를 직경 60 mm의 세포배양용 접시에 옮기고, HBSS를 가한 후 두 장의 멸균된 slide glass로 부드럽게 압착하여 잘게 부순 뒤 반복 여과시켜 작은 조직편을 제거하고 부유세포를 모았다. 이 세포 부유액을 300 xg로 원심 분리한 후 1 ml의 증류수로 5-6초간 처리하여 Hypotonic shock으로 적혈구를 용해시킨 뒤 10 × HBSS (Gibco, USA)로 희석하고 원심분리하여 임파구를 분리하였다. 분리된 임파구는 완전배지에 재부유 시킨 후, 각각의 실험 항목에 맞추어 세포수를 조정 한 뒤 본 실험에 사용하였다. 비장에서 얻은 임파구를 5×10⁶ cells/ml로 조정 한 뒤, 여기에 100 μg/ml로 조정된 Conavalin-A(Sigma, USA) 100 μl를 가하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 상층액을 수거하여 Cytokine의 생산능을 측정하였다.

2) Colony 관찰

실험시작 7일, 14일, 21일째 개복하여 시료를 채취 한 후, 폐를 적출하여 폐에 형성된 Colony를 관찰하고 디지털카메라(삼성, 한국)를 이용하여 촬영 하였다.

6. 측정항목 및 방법

1) Apoptosis 측정

(1) A549 폐암 세포주 배양 및 세포생존율 측정

A549 폐암 세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI

(GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2×10⁵ cells를 넣어 배양한 후 금은화 약침을 50, 100, 200, 300, 400 mg/ml 농도로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300 μl/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 μl 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10⁷의 세포 당 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100 μl로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출한 다음, 19,502 xg에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

(3) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준 곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 μg/μl)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 μg/μl에 BCA 용액 100 μl를 첨가하여 20분간 37℃에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준 곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플 2 μl와 BCA 용액 100 μl를 섞은 뒤 20분간 37℃에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

(4) 전기영동 및 Western blot

단백질 100 μg를 caspase-3와 cytochrome C를 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 PARP, cytochrome c, caspase-3등의 monoclonal 항체 (PharMingen, USA)를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase 으로 conjugated된 antimouse IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Kodak X-Omat film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

(5) DNA fragmentation

처리한 배양세포를 얼음에서 차게유지한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700 μl의 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45분간 항온 시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 lysis를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4℃에서 16,816 xg로 20분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium

acetate/isopropanol로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40 μ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)로 용해시키고, 200 μ g/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37°C에서 1시간 항온시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light하에서 사진을 찍어 가시화하였다.

2) 생존율 측정

대조군과 실험군의 C57BL/6 마우스에 5×10^6 cells/ml로 맞춘 B16-F10 세포를 0.2 ml씩 30G1/2의 주사기를 이용하여 미정맥으로 주입하였다. 이때 시간이 지남에 따라 세포들의 뭉치는 것을 방지하기 위하여 일정 시간 간격으로 vortexing하였다. B16-F10세포 주입 다음날부터 오전 10시에서 12시 사이에 동물 상태를 확인 하였고, 이 시간을 기준으로 생존여부를 결정하였다. 생존율은 아래의 Median Survival time을 이용하여 생존증가율을 산출하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X + Y}{2}$$

$$\text{생존증가율} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

X : 생존 동물이 전체 동물수의 1/10이 되는 최초의 시간(day)
 Y : 생존 동물이 전체동물의 1/1이 되는 최초의 시간(day)
 T : 실험군의 median survival time(day)
 C : 대조군의 median survival time(day)

3) mRNA RT-PCR

(1) Total RNA isolation

Tissue RNA PrepMate kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 마우스의 비장으로부터 total RNA를 추출하였다. 비장 100mg을 1ml의 lysis buffer를 넣고 갈아서 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 여기에 chloroform을 0.4배 부피로 첨가하여 4°C에서 5분 동안 반응시킨 후, 14,328 \times g에서 10분동안 원심 분리하여 상층액만을 분리한 후, Phenol : Chloroform (5:1)(Sigma, USA)을 같은 부피로 처리하여 원심분리 하였고 다시 상층액을 새 tube로 옮겼다. 여기에 같은 부피의 isopropyl alcohol을 넣고 -20°C에서 1시간 반응한 후 다시 원심분리 하였다. Pellet을 80% 에탄올(in DEPC-treated water)로 세척하고 speed vacuum(Heto, Denmark)에서 건조시킨 후 RNase-free water에서 용해시켜 얻어진 total RNA를 UV spectrophotometer (Hitachi, Japan) (260/280nm)로 정량하였다.

(2) RT-PCR

비장 조직으로부터 분리한 total RNA 2 μ g를 가지고 β -actin과 IFN- γ 에 대해서는 oligo-(dT)15 primer (Promega, USA) 1 μ l를 사용하고, IL-2, IL-4, IL-12에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1 μ M를 사용하여 70°C에서 10분 동안 preincubation한 후, dNTP mixture 1mM, MgCl₂ 5mM, reaction buffer [10mM Tris-HCl (pH9.0 at 25°C), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100], RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, USA) 1U/ μ l, AMV reverse transcriptase (Promega, USA) 15U를 넣고 잘 섞은 후 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 5분

간 AMV reverse transcriptase를 불활성 시켰다. 여기서 얻은 cDNA를 2 μ l씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20°C에 보관하였다. Reverse transcription으로부터 얻은 cDNA 2 μ l를 dNTP mixture 200 μ M, gene specific primer 300nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer [10mM Tris-HCl (pH9.0 at 25°C), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100], Taq polymerase 2U을 잘 섞어 PCR thermal cycler(Hybaidd, UK)에서 denaturation은 94°C 5min으로, annealing은 IL-2은 60°C, IL-4은 48°C, IL-10은 72°C, IFN- γ 은 56°C, IL-12는 59°C, β -actin은 60°C로 35cycles를 하였고, extension은 72°C 10min하였다. PCR product를 확인하기 위하여 agarose(2%) TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer(pH 8.3)에 녹여 사용하여 시료 5 μ l를 loading buffer를 gel에 주입하여 100 volt에서 30분간 전기영동하여 확인하였다. 전기영동이 끝난 DNA는 UV transilluminator(Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였다. 이때 사용한 싸이토카인과 β -actin의 primer는 다음과 같다(Table 3).

Table 3. Specific Primers for Cytokines and β -actin

Name (Product size)		primer
β -actin (349 bp)	forward	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
	reverse	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
IL-2 (168 bp)	forward	5'-TGA TGG ACC TAC AGG AGC TCC TGA G-3'
	reverse	5'-GAG TCA AAT CCA GAA CAT GCC GCA G-3'
IL-4 (132 bp)	forward	5'-TTC TCG AAT GTA CCA GGA GC-3'
	reverse	5'-AAC GCT ACA CAC TGC ATC TT-3'
IL-10 (421 bp)	forward	5'-AGA CTT TCT TTL AAA CAA AGG ACC AGC TGG A-3'
	reverse	5'-CCT GGA GTC CAG CAG ACT CAA TAC ACA CTG C-3'
IL-12 (381 bp)	forward	5'-AAG GAA GAT GGA ATT TGG TCC ACT G-3'
	reverse	5'-GAT GAT GTC CCT GAT GAA GAA GCT G-3'
IFN- γ (247 bp)	forward	5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3'
	reverse	5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'

4) ELISA assay

(1) Interleukin-2 활성 측정

IL-2 측정엔 mouse IL-2 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate 에 plate reagent 용액을 50 μ l첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한 바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 실온에서 2시간 방치하였다. 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 conjugate reagent를 100 μ l씩 첨가 후 37°C Incubator(Jouan IGO-150A, France)에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료시에 0.18 M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550 nm에 측정하였다.

(2) Interleukin-4 활성 측정

IL-4 측정엔 mouse IL-2 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate 에 plate reagent 용액을 50 μ l첨

가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 plate cover를 덮은채 37 $^{\circ}$ C Incubator에서 2시간 방치하였다. 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 conjugate reagent를 100 μ l씩 첨가 후 plate에 cover를 덮은 후 37 $^{\circ}$ C Incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 세척용액으로 5번 동안 세척하고 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료시에 0.18 M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550 nm에 측정하였다.

(3) Interleukin-10 활성 측정

IL-10 측정은 mouse IL-2 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate 에 assay buffer 용액을 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 plate cover를 덮은채 실온에서 3시간 방치하였다. 계속해서 미리 조제된 biotinylated antibody reagent를 50 μ l 첨가하고 실온에서 1시간 방치하였다. 각 well에 희석시킨 streptavidin-HRP 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응시키고, 세척용액으로 3번 세척하였으며 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가한 후 30분간 반응하였다. 반응 종료시에 0.18 M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550 nm에 측정하였다.

(4) Interleukin-12 활성 측정

IL-12 측정은 mouse IL-2 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate 에 standard diluent를 각 well에 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 plate cover를 덮은채 실온에서 1시간 방치하였다. 세척용액으로 3번 세척하고 각 well에 biotinylated antibody reagent를 100 μ l 첨가하고 실온에서 1시간 방치하였다. 세척용액으로 3번 세척하고 각 well에 streptavidin-HRP 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응시켰으며 반복해서 세척용액으로 3번 세척하였다. 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가한 후 암실에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료시에 0.18 M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550 nm에 측정하였다.

(5) Interferon- γ 활성 측정

IFN- γ 측정은 mouse IFN- γ ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한바와 같이 처리한 것을 96 well polystyrene plate에 50 μ l 첨가하였고 실온에서 2시간 방치하였으며 biotinylated antibody를 각 well에 50 μ l 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용액으로 3번 세척하고 streptavidin-HRP 용액을 각 well에 100 μ l 첨가한 후 실온에서 30분 반응시켰으며 상기와 같은 방법으로 3번 세척하였다. 계속해서 TMB substrate 용액을 각 well에 100 μ l 첨가 후 30분 동안 반응시킨 후 0.18 M의 황산 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular

Device, USA)를 이용하여 550 nm에 측정하였다.

7. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 STATISTICA 6.0(Statsoft, USA)를 이용하였으며, 통계방법으로 시험관내 세포독성의 결과는 회귀분석하여 IC₅₀을 구하였고, ELISA의 결과는 student's T-test를 하고, p-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

실험결과

1. Cell Viability

청폐탕의 세포사멸 효과를 알아보기 위하여 먼저 A549 폐암 세포주에대한 청폐탕의 세포독성을 알아보았다. 청폐탕을 1, 2, 5, 10 mg/ml 농도로 처리하여 세포생존율을 조사하였더니, 각각 93.7, 86.7, 27.9, 4.9%로 나타났다(Fig. 1). IC₅₀은 4.05 mg/ml로 나타났다.

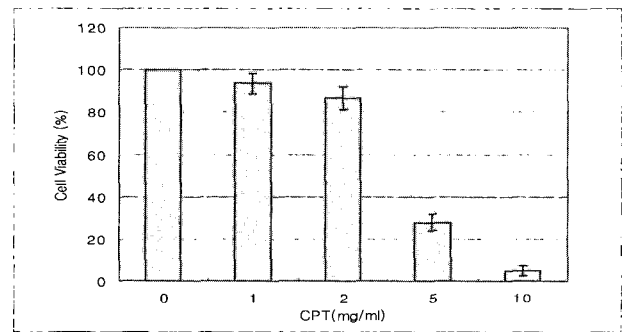


Fig. 1. Cell survivals ratio in A549 lung cancer by Chungpae-tang treatment.

2. DNA fragmentation

암세포 사멸이 어떠한 기작에 의하여 일어나는지를 확인하기 위하여 세포독성에서 확인된 농도를 근거로 하여 DNA 분절 실험을 실시하였다. 그 결과 청폐탕 5 mg/ml, 10 mg/ml의 농도에서 DNA 분절현상이 나타났으나 2 mg/ml이하에서는 DNA 분절 현상이 나타나지 않았다(Fig. 2).

CPT(mg/ml) 0 2 5 10

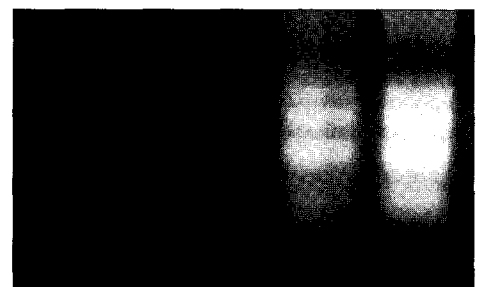


Fig. 2. DNA fragmentation in A549 lung cancer line by Chungpae-tang treatment.

3. Western Blotting

청폐탕이 5mg/ml 농도 이상에서 DNA fragmentation이 일어난 것이 apoptosis 과정을 통하여 일어났는지를 확인하기 위하여 caspase-3, poly(ADP-riboseyl) polymerase(PARP) 및 cytochrome C에 대한 Western blot를 수행하였다. 그 결과 청폐탕 5 mg/ml, 10mg/ml에서 caspase-3가 활성화되어 p17이 보였으며 PARP의 p85 분절화 및 cytochrome C의 방출이 일어남을 확인하였다(Fig. 3).

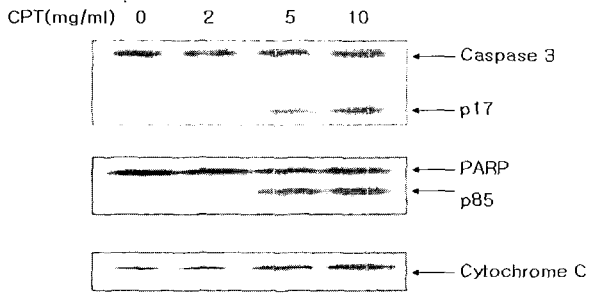


Fig. 3. Caspase-3 Activation, PARP Fragmentation, and Cytochrome C Release in A549 Lung Cancer Cell Line.

4. 생존율

B16-F10 세포를 마우스에 주입한 이후 매일 일정시간에 생존여부를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 대조군은 주입 20일째부터 사망하였고 실험군은 19일째부터 사망하기 시작하였다. 대조군의 median survival time은 23일이었고, 실험군은 22일로 나타났다(Fig. 4).

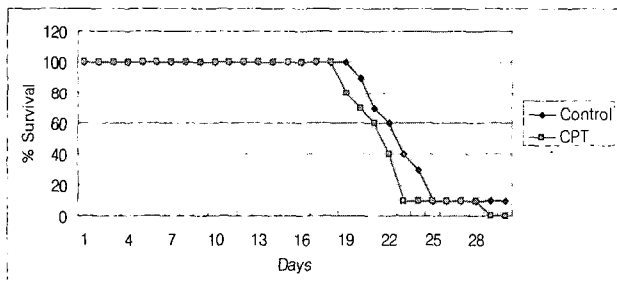


Fig. 4. Survival ratio of the B16-F10 cell bearing and Chungpae-tang treated Mice. Control : Saline-treated group after B16-F10 being implanted. CPT : Chungpae-tang-treated group after B16-F10 being implanted

5. Colony

B16-F10 세포를 C57BL/6에 주입 후 7일, 14일, 21일째 폐를 적출하여, 폐에 발생된 Colony를 육안으로 관찰하였다. 그 결과 7일째에는 실험군과 대조군에서 비슷한 양상을 보였으며, 14일째는 대조군에 비하여 실험군에서 Colony수가 적게 관찰 되었으며, 21일째에는 실험군과 대조군의 차이가 없었다(Fig. 5).

6. mRNA RT-PCR

1) Interleukin-2

IL-2 mRNA의 발현양상은 정상군에서는 B16-F10를 C57BL/6 마우스에 접종후 7일이 경과하였을 때 증가하였다가

14일 후 감소하였고 21일 후 다시 증가하는 양상을 보여주었는데, 대조군과 실험군에서는 7일이 경과 하였을 때 정상군보다는 적게 발현되었고 14일 후 발현이 현저히 감소하였다가 21일후에 다시 발현이 증가하였다(Fig. 6).

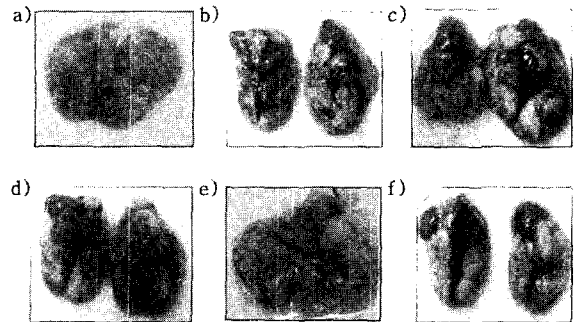


Fig. 5. Colony morphogenesis in lung of C57BL/6 mice after injection of B16-F10 melanoma cell line. Control group : Saline-treated group after B16-F10 being implanted. 7day(a), 14day(b, c), 21day(d, left) CPT group : Chungpae-tang-treated group after B16-F10 being implanted. 7day(e), 14day(f), 21day(d, right)

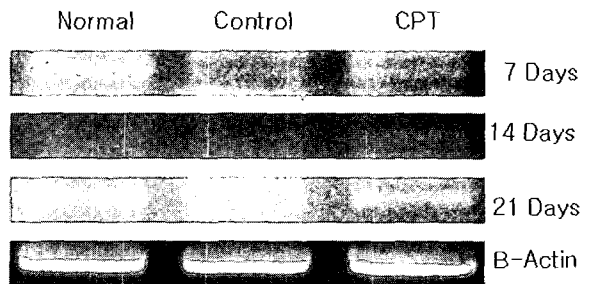


Fig. 6. IL-2 mRNA expression in spleen of C57BL/6 mice. Normal group: Non-treated group. Control group: Saline-treated group after being implanted. CPT group: Chungpae-tang-treated group after being implanted.

2) Interleukin-12

IL-12 mRNA의 발현양상은 정상군에서는 B16-F10 접종 후 7일이 경과하였을 때 증가하였고 14일과 21일에서도 계속적으로 발현이 증가하였다. 대조군에서는 7일이 경과 하였을 때 정상군보다 발현이 낮아 으며 14일과 21일에서 증가하였으며 실험군에서는 정상군과 같이 7일이 경과하였을 때 증가하였고 14일과 21일에서도 계속적으로 발현이 증가하였다(Fig. 7).

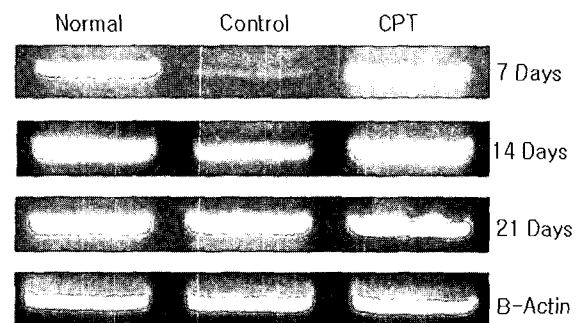


Fig. 7. IL-12 mRNA expression in spleen of C57BL/6 mice. Normal group: Non-treated group. Control group: Saline-treated group after being implanted. CPT group: Chungpae-tang-treated group after being implanted.

3) Interferon- γ

IFN- γ 의 발현 양상은 모든 군들에서 발현의 차이는 있으나 발현이 7일, 14일 및 21일에서 모두 증가하였다(Fig. 8).

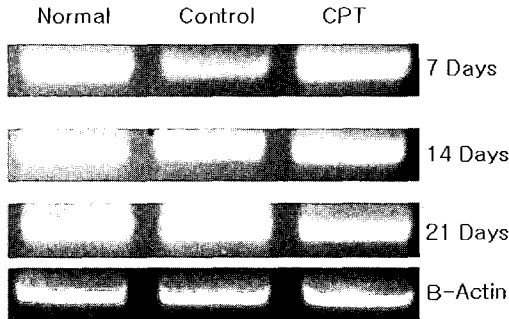


Fig. 8. IFN- γ mRNA expression in spleen of C57BL/6 mice. Normal group: Non-treated group. Control group: Saline-treated group after being implanted. CPT group: Chungpae-tang-treated group after being implanted.

4) Interleukin-4

IL-4의 발현 양상은 각 군들에서 발현의 차이는 있으나 발현이 7일, 14일 및 21일에서 모두 증가하였다(Fig. 9).

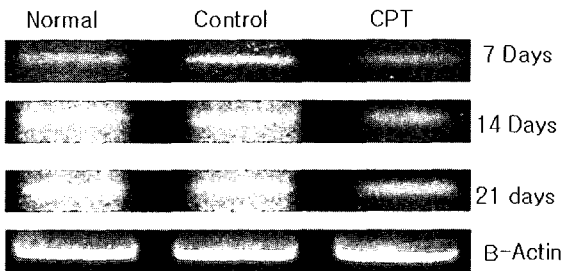


Fig. 9. IL-4 mRNA expression in spleen of C57BL/6 mice. Normal group: Non-treated group. Control group: Saline-treated group after being implanted. CPT group: Chungpae-tang-treated group after being implanted.

5) Interleukin-10

IL-10의 발현 양상은 정상군에서는 7일에서 증가 하였다가 14일에서는 감소하였고 21일에서 다시 약간 증가하였으며, 대조군의 경우 7일, 14일, 21일에 모두 발현이 나타났다. 실험군에서는 7일에 증가하였다가 14일에는 감소하였고 21일에는 다시 증가하였다(Fig. 10).

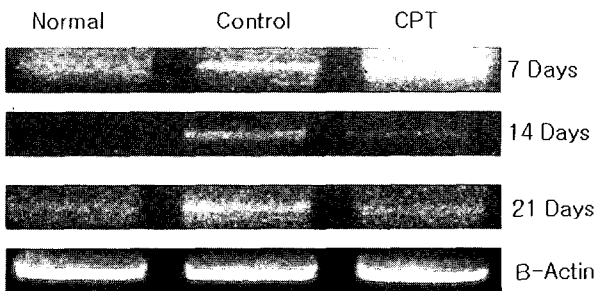


Fig. 10. IL-10 mRNA expression in spleen of C57BL/6 mice. Normal group: Non-treated group. Control group: Saline-treated group after being implanted. CPT group: Chungpae-tang-treated group after being implanted.

7. ELISA assay

1) Interleukin-2

Interleukin-2의 함량은 정상군은 3040.42±38.26 pg/ml, 실험군은 3128.40±26.00 pg/ml, 실험군은 3117.26±38.40 pg/ml을 나타내었으며, 실험군은 정상군과 비교하여 유의하게 증가(p<0.05)되었고, 대조군에 비하여 차이가 없었다(Table 4).

Table 4. Interleukin-2 Productivity after Injection of the B16-F10 Cell in Chungpae-tang-treated C57BL/6 Mice.

Group	Interleukin-2 (pg/ml) ^a
Normal	3040.42±38.26
Control	3128.40±26.00
CPT	3117.26±38.40 ^{ab}

Mean ± Standard Deviation a) Statistical Significant (VS Normal) (p<0.05) Normal group : Non-treated group. Control group: Saline-treated group after B16-F10 being implanted. CPT group: Chungpae-tang-treated group after B16-F10 being implanted.

2) Interleukin-12

Interleukin-12의 함량은 정상군은 353.89±67.74 pg/ml, 대조군은 467.21±16.00 pg/ml, 실험군은 268.46±65.97 pg/ml을 나타내었다. 대조군은 정상군에 비하여 유의하게 증가(p<0.05)하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 감소(P<0.05)하였고, 정상군에 비하여도 감소하는 경향을 보였다(Table 5).

Table 5. Interleukin-12 Productivity after Injection of the B16-F10 Cell in Chungpae-tang-treated C57BL/6 Mice.

Group	Interleukin-12 (pg/ml) ^a
Normal	353.89±67.74
Control	467.21±16.00 ^{ab}
CPT	268.46±65.97 ^{ab}

Mean ± Standard Deviation a) Statistical Significant (versus Normal) (p<0.05) b) Statistical Significant (versus Control) (p<0.05) Normal group : Non-treated group. Control group : Saline-treated group after B16-F10 being implanted. CPT group : Chungpae-tang-treated group after B16-F10 being implanted.

3) Interferon- γ

Interferon- γ 는 정상군은 5252.60±48.00 pg/ml, 대조군은 4995.76±209.18 pg/ml, 실험군은 5293.83±86.10pg/ml로 나타났으며, 대조군은 정상군에 비하여 유의하게 감소(p<0.05)하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 증가(p<0.05)하였다(Table 6).

Table 6. Interferon- γ Productivity after Injection of the B16-F10 Cell in Chungpae-tang-treated C57BL/6 Mice.

Group	Interferon- γ (pg/ml) ^a
Normal	5252.60±48.00
Control	4995.76±209.18 ^{ab}
CPT	5293.83±86.10 ^{ab}

Mean ± Standard Deviation .a) Statistical Significant (versus Normal) (p<0.05) b) Statistical Significant (versus Control) (p<0.05)

4) Interleukin-4

Interleukin-4의 함량은 정상군은 24.38±7.39 pg/ml, 대조군은 29.29±4.14 pg/ml, 실험군은 43.30±6.20 pg/ml을 나타냈으며, 실험군은 정상군과 대조군에 비하여 유의있는 증가(p<0.05)를 나타내었다.

타내었다(Table 7).

Table 7. Interleukin-4 Productivity after Injection of the B16-F10 Cell in Chungpae-tang-treated C57BL/6 Mice.

Group	Interleukin-4 (pg/ml) ^a
Normal	24.38±7.39
Control	29.29±4.14
CPT	43.30±6.20 ^{a) b)}

Mean ± Standard Deviation a) Statistical Significant (versus Normal) (p<0.05) b) Statistical Significant (versus Control) (p<0.05) Normal group : Non-treated group, Control group : Saline-treated group after B16-F10 being implanted, CPT group : Chungpae-tang-treated group after B16-F10 being implanted.

5) Interleukin-10

Interleukin-10의 함량은 정상군은 105.70±14.00 pg/ml, 대조군은 116.91±2.01 pg/ml, 실험군은 147.09±21.40 pg/ml을 나타내었고, 실험군은 정상군과 대조군에 비하여 유의있는 증가(p<0.05)를 보였다(Table 8).

Table 8. Interleukin-10 Productivity after Injection of the B16-F10 Cell in Chungpae-tang-treated C57BL/6 Mice.

Group	Interleukin-10 (pg/ml) ^a
Normal	105.70±14.00
Control	116.91±2.01
CPT	147.09±21.40 ^{a) b)}

Mean ± Standard Deviation a) Statistical Significant (versus Normal) (p<0.05) b) Statistical Significant (versus Control) (p<0.05) Normal group : Non-treated group, Control group : Saline-treated group after B16-F10 being implanted, CPT group : Chungpae-tang-treated group after B16-F10 being implanted.

고찰

폐암은 기관, 기관지, 폐포의 세포가 정상적인 기능을 잃고 무질서하게 증식하는 것으로 원인은 분명치 않으나 흡연, 대기오염, 작업장 오염등이 요인으로 추정되고 있으며, 임상적 증상은 일반적으로 처음에는 무증상이지만 암의 진전과 더불어 기침, 가래, 혈담, 객혈, 흉통, 방산통이 나타나며 발열이 있는 경우도 있고, 천식, 호흡곤란 등이 일어나고 결국에는 전신쇠약에 이르게 된다. 뇌, 뼈, 부신피의 온몸 곳곳으로 전이하면서 국소증상을 나타내기도 한다¹⁸⁾.

폐암은 한의학적으로 正氣가 損傷되어 肺氣가 虛해지면, 邪毒이 肺에 침범하여 宣發과 肅降機能이 失調되고 氣機가 不暢하여 津液이 散布되지 못하므로 絡脈이 阻塞되어 氣滯血瘀하고 痰濕이 內聚하여 腫塊가 형성되는 것으로 인식한다¹⁹⁾.

암의 일반적인 치료는 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 면역요법, 내분비요법, 보조요법 등이 이용되며²⁰⁾, 폐암의 치료는 현재 여러 가지 치료를 병합하고 있지만 그 결과는 만족스럽지 못하며, 최근 분자생물학, 세포유전학의 발전으로 폐암의 발암 및 전이 기전이 점차 밝혀져 폐암 치료에 새로운 방향을 제시하고 있다²¹⁾.

악성 종양을 갖고 있는 숙주에서 면역기능은 병의 예후와 매우 밀접한 관계가 있으며, 면역기능이 활성화된 환자는 면역기능이 약화된 환자보다 예후가 좋은 것으로 알려져 있다²²⁾. 대

부분의 악성종양 환자들은 면역기능이 감소되며, 또한 항암제의 투여 및 방사선 치료 등에 의해 더욱 심한 면역기능 저하를 초래하기 때문에 면역요법에 의한 치료방법의 개발이 절실히 요망되는 실정이다²³⁾.

본 연구는 폐암의 증상처럼 잘 낫지 않는 咳嗽, 咯痰, 聲啞, 血氣衰敗등에 사용되는 淸肺湯이 암세포를 직접 사멸하고, 면역기능에 영향을 주어 개체의 항암능에 작용 하는지 알아보고자 한 것이다. 이에 A549 인체유래 폐암세포를 대상으로 Apoptosis 여부와 C57BL/6마우스에 B16-F10 악성흑색종세포를 꼬리정맥 내로 주사하여 폐전이를 유도하고 淸肺湯을 투여하여, 폐에 형성되는 흑색종의 전이 정도와 면역능을 측정하였다.

淸肺湯은 15가지의 본초로 구성된 처방으로, 炙甘草, 茯苓, 陳皮, 貝母, 天門冬, 杏仁, 麥門冬, 五味子是 폐암의 치료에 다용되는 본초이다²⁴⁾. 세포사멸(apoptosis)은 외부자극에 대하여 세포 내부에 이미 존재하는 일련의 세포사 프로그램에 의하여 세포가 죽는 과정으로 세포의 형태학적 변화, DNA 분절, 세포주기의 변화 등으로 이를 확인 할 수 있으며, 세포내 기관들이 보존된 상태로 염증을 동반하지 않으면서 세포 부피의 축소, 세포막의 돌출, membrane-bound apoptotic body의 형성, 핵염색질의 농축, DNA의 단편화 등이 일어나고, 죽은 세포는 이웃세포의 대식작용에 의해 사라진다²⁵⁾. 세포사멸은 거의 모든 종양에서 나타나면 여러 종양유전자나 종양억제유전자에 의하여 유발 또는 억제된다²⁶⁾. 이러한 변화들은 고유 자살기구에 의해 나타나게 되며, caspase로 알려진 단백질분해효소군(proteases)의 단백질용해체계(proteolytic system)가 필수적인 역할을 한다²⁷⁾.

많은 항암제들이 특정 세포종에 따라 세포사멸을 유도하여 DNA 분절을 일으킴이 보고되어졌고²⁸⁻³⁰⁾, 이를 이용하여 종양세포에 특이적으로 세포사멸을 유도하는 항암제의 작용 기전에 관한 연구가 이루어지고 있다³¹⁾. 본 실험에서 淸肺湯을 인체 유래 폐암세포주인 A549에서 처리하여 세포사멸이 일어나는지 확인하였다.

Caspase-3는 세포사멸의 초기 단계에 작용하며, 32 kDa 효소전구체(proenzyme)의 분리에 의해 유도된 17 및 12 kDa 이중이합체(heterodimer)가 활성화 된 형태이며³²⁾, caspase-8과 caspase-9의 초기 신호를 증폭시킨다³³⁾.

세포사의 매개체인 caspase-3 protease가 활성화 되어 DNA 합성의 촉매 효소인 poly(ADP-ribosyl) polymerase(PARP) 단백질을 절단하여 불활성화 시키는데, 이는 DNA의 손상이 회복되지 못하게 함으로써 세포사멸을 촉진한다. 자극에 의하여 미토콘드리아에서 cytochrome c가 방출되면 활성화되는 caspase-9 protease는 caspase-3 protease를 활성화시키고, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease(ICAD)를 포함한 여러 기질 단백질을 caspase-3 protease가 절단하여 세포사멸을 촉진하는데³⁴⁾, caspase-activated deoxyribonuclease(CAD)와 결합하고 있던 ICAD가 caspase-3 protease에 의하여 절단되면 CAD가 활성화하여 핵에 존재하는 chromosomal DNA를 절단함으로써 DNA 분절을 유도하게 된다³⁵⁾.

본 실험에서는 淸肺湯이 5 mg/ml, 10 mg/ml의 농도에서

DNA 분절현상을 나타냈으며, 2mg/ml에서는 DNA 분절이 확인되지 않아 necrosis가 일어남을 알 수 있었다, 청폐탕 5 mg/ml, 10 mg/ml에서 caspase-3가 활성화되어 p17이 보였으며, PARP의 p85 분절화 및 cytochrome c의 방출이 확인되었다.

이는 청폐탕이 5 mg/ml와 10 mg/ml 농도에서 cytochrome c를 방출시키고, caspase-3를 활성화시켜 PARP의 p85 분절화를 불활성화 시킴으로써 결국 DNA가 분절되어 세포사멸이 일어나는 것을 확인하였다.

B16-F10 세포를 C57BL/6에 주입 한 후 청폐탕을 투여하여 항암능을 보이는지 실험 하였다. 먼저 암세포 주입 후 30일간 생존율을 살펴본 결과 대조군의 median survival time은 23일이었고, 실험군은 22일로 나타났다(Fig. 4).

B16-F10 세포를 C57BL/6에 주입 후 7일, 14일, 21일째 폐를 적출하여, 폐에 발생한 Colony를 육안으로 관찰하였다. 그 결과 7일째에는 실험군과 대조군에서 비슷한 양상을 보였으며, 14일째는 대조군에 비하여 실험군에서 Colony수가 적게 관찰되었으며, 21일째에는 실험군과 대조군의 차이가 없었다(Fig. 5). 이는 청폐탕이 암의 초기에는 억제하는 경향을 보이지만, 암이 크게 확대되는 경우에는 별 다른 효과를 보이지 않는 것으로 생각된다.

천연물 및 한약제를 포함한 면역요법체는 비특이적 면역 감시체계인 대식세포 및 NK 세포의 활성화와 cytokine의 유도로 직접 혹은 간접적으로 항암작용을 나타내는데, 특히 NK 세포 및 대식세포의 세포독성 증가에는 T 림프구 및 NK세포에서 분비되는 INF- γ 및 IL-2가 관여하며, T 림프구는 cytokine의 생성에 따라 T helper 1(Th1)과 T helper 2(Th2)로 분류되고 있다³⁶⁾.

Th2는 알레르기 물질 등에 의해 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생성하여 항체생성을 위한 항체매개성 면역반응(antibody-mediated immunity)을 활성화시키는 반면, Th1은 주로 세포내 세균과 바이러스에 의해 자극받아 IL-2 와 IFN- γ 를 생성하며 세포매개성 면역반응을 활성화 시킨다. Th2에서 주로 생성되는 IL-4 및 IL-10은 Th1에 의한 cytokine의 생성을 억제하며, Th1에 의해 생성되는 IFN- γ 역시 보조 T 림프구의 Th1으로 분화를 촉진하며, Th2에 의한 cytokine의 생성을 억제하는 작용을 가지고 있다³⁷⁾. IL-12는 세포내 세균과 바이러스에 의해 주로 대식세포와 B 림프구 등에 의해 분비되어 NK 세포를 자극하여 IFN- γ 의 생성을 증가시켜, 보조 T세포를 Th1 세포로 분화를 유도하며 분화된 Th1 세포에 의해 생성된 IL-2 및 IFN- γ 는 NK 세포 및 대식세포의 세포독성능을 증가시키고, 대식세포의 지연성 과민반응에 관여하며, 또한 immunoglobulin 중 IgM과 IgG의 항체생성에 관여한다고 한다.

Th2 세포는 알레르기 물질 등에 의해 분화되어 IL-4와 IL-10을 주로 생성하며 IFN- γ 의 생성을 억제하는데, 특히 IL-4와 IL-10은 대식세포에서 주로 분비되는 IL-12의 생성을 억제함으로써 Th2 세포의 분화를 유도하고, Th1 세포의 분화는 억제하는 cytokine으로 보고되고 있다³⁸⁾.

본 실험에서는 세포매개성 면역반응에 관여하는 cytokine인 IFN- γ 와 IL-2, 12의 생성능과 이에 상반되는 항체매개성 면역반응에 관여하는 cytokine인 IL-4와 IL-10의 생성능을 변화를 알아

보기 위하여 cytokine을 대상으로 RT-PCR 및 ELISA를 수행하였다.

RT-PCR의 경우는 IL-2 mRNA의 발현양상이 정상군에서는 7일, 21일째 증가하였고, 14일째 감소하였으며, 대조군과 실험군은 정상군에 비하여 경과 일수에 상관없이 발현이 감소하였고, 21일째에는 대조군보다 실험군에서 발현이 증가되었는데, 청폐탕을 복용하면서 점차 IL-2의 발현이 증가되는 것으로 추측된다. IL-12 mRNA의 발현양상은 정상군에서는 경과 일수에 관계없이 발현이 뚜렷하였고, 대조군에서는 7일째 정상군보다 발현이 낮았고, 14일, 21일째에는 증가하였으나 정상군에 비하여 발현이 뚜렷하지 않았고, 실험군은 정상군과 비슷한 결과를 보여주고 있다. IL-12의 항암능은 이미 보고 되었으며³⁹⁾, 본 실험의 경우는 발현이 뚜렷하여 항암능과 관계된다고 생각된다.

IFN- γ 는 IL-2와 IL-12에 의하여 유도되는 사이토카인으로 대식세포로 하여금 몸 안으로 들어온 미생물을 죽이는 기능을 가지고 있다. 본 실험 결과 각 군들에서 발현의 차이는 있으나 경과 일수와 군에 관계없이 비슷한 발현 양상을 보이고 있다. 이러한 발현 양상은 증가한 IL-2에 의하여 자극을 받아 모두 mRNA가 증가하여 계속적으로 몸 안에 들어온 항원에 대하여 대항하기 위한 것으로 한 것으로 추측된다.

IL-4는 IL-2에 의하여 유도되는 사이토카인으로 단핵구 및 호중구를 유도하는 조절자로 알려져 있다. 본 실험에서는 각 군들에서 발현의 차이는 있으나 발현이 경과 일수가 지남에 따라 모두 증가하는 양상을 보여주고 있으며, 이러한 발현 양상은 증가한 IL-2에 의하여 자극을 받아 모두 mRNA가 증가하여 계속적으로 몸 안에 들어온 항원에 대하여 대항함으로써 염증반응을 유발하기 위한 것으로 추측된다.

IL-10은 IL-2에 의하여 유도되거나 활성화된 대식세포에 의해서도 생성되는 사이토카인으로 TNF와 IL-12의 생성을 억제하는 기능을 가지고 있다. Namita 등⁴⁰⁾은 IL-10이 암의 전이를 억제하는 보고를 하였는데, 본 실험에서는 대조군의 경우 7일, 14일, 21일째에 발현이 나타났으나, 실험군에서는 7일, 21일째에 발현이 나타났으며, 이러한 발현양상은 IL-10이 IL-4와 IFN- γ 에 의하여서도 조절을 받는 때문으로 추측되며, 암의 전이에 대한 청폐탕의 영향이 적은 것으로 생각된다.

ELISA에 의한 Cytokine의 생성능을 살펴본 결과, 청폐탕에 의한 IL-2의 생성능은 정상군보다 처리군이 유의하게 증가($p<0.05$)되었고, 대조군에 비하여 차이가 없었다(Table 4). IFN- γ 의 생성능은 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 감소($p<0.05$)하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 증가($p<0.05$)하였다(Table 6). 그러나 IL-12의 생성능은 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가($p<0.05$)하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 감소($P<0.05$)하였지만 정상군에 비하여도 감소하는 경향을 보였다(Table 5). mRNA의 결과에서는 증가되었으나, ELISA에서 감소되는 결과를 보여 서로 상반되고 있는데, 아마도 세포외로 분비되는 과정에서 다른 기전이 작용되는 것으로 생각된다. 또한 실험군이 정상군이나 대조군보다 IFN- γ 및 IL-2의 생성능이 유의성이 있게 나타났으므로 NK 세포 및 대식세포의 세포독성능을 증가시킬 수 있으며, 특히 실험군이 대조군이나 실험군보다

높은 암억제 효과를 나타내는 경향을 보이므로, NK 세포 및 대식세포의 세포독성능이 증가한 것은 IFN- γ 및 IL-2 생성의 증가와 관계되는 것으로 생각된다.

Interleukin-4는 실험군이 정상군과 대조군에 비하여 유의있는 증가($p < 0.05$)를 나타내었다(Table 7). Interleukin-10는 정상군과 대조군에 비하여 유의있는 증가($p < 0.05$)를 보였다(Table 8).

이상의 결과로 보아 청폐탕은 5mg/ml이상이 농도에서 직접적인 Apoptosis를 유발하고, 암이 이식되어 성장하는 과정에서는 초기 단계에서 억제 경향을 보이지만 암의 성장이 확대할때는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 Apoptosis와 면역 및 항암능에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 청폐탕의 항암능 및 면역능에 대한 연구로서, in vitro에서 A549 인체 유래 폐암세포에 대한 Apoptosis 유도를 실험하였고, in vivo에서 B16-F10 세포를 C57BL/6에 주입하여 폐 전이를 유도하고 청폐탕을 투여하여 폐에 형성되는 흑색종의 전이를 감소시키는 지를 알아보기 위하여 생존율 및 RT-PCR 및 ELISA를 통하여 cytokine의 발현 정도를 측정하였다.

Apoptosis 유도실험에서 청폐탕 5 mg/ml이상의 농도에서 DNA 분절현상이 나타났으며 그 결과 caspase-3가 활성화되어 p17이 보였으며 PARP의 p85 분절화 및 cytochrome C의 방출이 일어남을 확인하였다. 즉 cytochrome c가 방출되어 caspase-3가 활성화됨으로써 PARP의 p85 분절화를 불활성화를 시킴으로써 결국은 DNA가 분절되어 apoptosis가 유도됨을 확인할 수 있었다. 생존율은 실험군과 대조군이 각각 21일, 22일을 나타내었다. ELISA에 의한 IL-2의 생성능은 처리군이 정상군보다 유의하게 증가($p < 0.05$)되었고, 대조군에 비하여 차이가 없었다. ELISA에 의한 IFN- γ 의 생성능은 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 감소($p < 0.05$)하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 증가($p < 0.05$)하였다. ELISA에 의한 IL-12의 생성능은 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가($p < 0.05$)하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 감소($P < 0.05$)하였지만 정상군에 비하여도 감소하는 경향을 보였다. ELISA에 의한 IL-4의 생성능은 실험군이 정상군과 대조군에 비하여 유의있는 증가($p < 0.05$)를 나타내었다. ELISA에 의한 IL-10의 생성능은 실험군이 정상군과 대조군에 비하여 유의있는 증가($p < 0.05$)를 보였다.

이상의 결과로서 청폐탕은 직접적으로 폐암세포에 작용하여 세포사멸을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 면역기능에 영향을 주어 폐암의 증상을 소실 혹은 억제시킬 수 있는 것으로 추측되나, 정확한 작용기작에 대하여서는 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. National Statistical office. : Annual Report on the cause of death statistics(<http://www.nso.go.kr>), Republic of

Korea, 2003.

2. Minna, J.D., Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L. Harrison's of principles of internal medicine, McGraw-Hill, 14th ed., p 562, 1998.

3. O'shaugnessy, J.A. Chemoprevention of breast cancer, JAMA. Vol.275, 1349-1353, 1996.

4. 李炯周, 金相贊, 徐富一, 金先熙, 卞晟傳. 牧榆湯이 人體 肺癌細胞의 變化에 미치는 影響에 關한 分子生物學의 研究, 대한본초학회지, 4(1):167-179, 1999.

5. 이원철, 신광식. 폐암에서 전이된 뇌종양환자의 한방 치험 1예, 대한한방종양학회지, 5(1):151-158, 1999.

6. 노숙령, 한지혜. 인체 폐암세포주에 대한 마늘과 양파 에탄올 추출물의 세포독성, 한국식품영양과학회지, 29(5):870-875, 2000.

7. 이준우, 이능숙, 서부일, 배진승. 경육고 및 경육고 가미방이 폐암에 미치는 영향, 대한본초학회지, 17(2):101-109, 2002.

8. 박진수, 윤현민, 안창범, 임춘우, 최영형. 약침용 봉독성분 melitin의 영향에 의한 인체 폐암세포의 Apoptosis 유도, 대한침구학회지, 20(5):93-106, 2003.

9. 이성열, 김원일, 박동일. 桔梗이 人體 肺癌細胞에 미치는 영향에 대한 실험적 연구, 동의생리병리학회지, 17(4):1019-1030, 2003.

10. 박 철, 이민우, 김원일, 이원호, 박동일, 최영현. 人蔘瀉肺湯 추출물에 의한 인체 폐암세포의 Apoptosis 유도 기전에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 17(3):677-683, 2003.

11. 이선구, 이동주, 윤근찬, 하지용. 完肺湯의 실험적 폐전이암에 대한 항암 및 면역효과에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 17(3):711-718, 2003.

12. 이재훈, 강병령, 감철우, 박동일, 최영현. 瀉白散 추출물에 의한 인체 폐암세포의 Apoptosis 유도 기전에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 17(2):451-456, 2003.

13. 강락원, 이재훈, 감철우, 최병태, 최영현, 박동일. 길경 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 성장억제 기전 연구, 동의생리병리학회지, 17(2):183-189, 2003.

14. 최수락, 명평근, 정승일, 천현자, 백승화. 인체 흑색종세포에서 Ginsenoside Rc에 의한 Apoptosis의 유도, 동의생리병리학회지, 17(2):209-212, 2003.

15. 이민우, 서창훈, 박 철, 이원호, 최영형, 박동일. 인체 폐암세포에서 인삼사폐탕에 의한 Cdk inhibitor p27의 발현 증가 및 pRB의 인산화 억제, 동의생리병리학회지, 17(2):213-219, 2003.

16. 전병훈, 김원신. B16 흑색종 세포의 폐전이에 대한 소암산 I의 억제효과, 동의생리병리학회지, 16(6):1122-1126, 2002.

17. 龔廷賢 著, 朱甲惠 譯. 國譯 萬病回春 上卷, 癸丑文化社, pp 242-243, 1997.

18. Fung, P.Y., Longenecker, B.M. Specific immunosuppressive activity of epiglycanin, a mucin-like glycoprotein secreted by a murine mammary adenocarcinoma (TA3-HA). Cancer Res, Vol.51, 1170-1176, 1991.

19. 王擘玉. 實用腫瘤臨床, 中國醫藥科技出版社, pp 94-102, 1995.

20. 한윤복, 노유자, 김문실. 암환자, 수문사, pp 72-183, 1997.
21. 조군제. 폐암의 치료방법, 대한내과학회지, 2(6):600-607, 2002.
22. Hersh, E.M., Whitecar, J.P. Jr, McCredie, K.B., Bodey, G.P. Sr, Freireich, E.J. Chemotherapy, immunocompetence, immunosuppression and prognosis in acute leukemia. *N Engl J Med*, 285(22):1211-1216, 1971.
23. Lee, D.H., Kim, Y.C., Cho, S.H., Lee, M.G. Clinicopathologic analysis of malignant melanoma, *Korea Journal of Dermatology*, Vol.40, pp 914-923, 2002.
24. 배기채, 김성훈. 肺癆의 辨證과 治方에 대한 文獻的 考察, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 제5권 제2호, pp 243-264, 1997.
25. Jacobson, M.P., Weil, M. and Raff, M.C. Programmed cell death in animal development, *Cell*, Vol.88, pp 347-354, 1997.
26. Leist, M., Jäättelä, M. Four deaths and a funeral :from caspases to alternative mechanisms, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, pp 589-598, 2001.
27. Chang, H.Y., Yang, X. Protease for cell suicide : Functions and regulations of caspase, *Microbiol Mol Biol Rev* 64, pp 821-846, 2000.
28. Kaufmann, S.H. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs : a cautionary note, *Cancer Res.* 49(21):5870-5878, 1989.
29. Lorico, A., Toffoli, G., Boiocchi, M., Erba, E., Broggin, M., Rappa, G., D'Incalci, M. Accumulation of DNA strand breaks in cells exposed to methotrexate or N10-propargyl-5,8-dideazafolic acid. *Cancer Res.* 48(8):2036-2041, 1988.
30. Yoshioka, A., Tanaka, S., Hiraoka, O., Koyama, Y., Hirota, Y., Ayusawa, D., Seno, T., Garrett, C., Wataya, Y. Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death, *J Biol Chem*, 262(17):8235-8241, 1987.
31. Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R.N. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis, *Nature*, 380(6569):75-79, 1996.
32. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 269, pp 30761-30764, 1994.
33. Grüter, M.G. Caspase : Key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10, pp 649-655, 2000.
34. Konstantinidou, A.E., Korkolopoulou, P., Patsouris, E. Apoptotic markers for tumor recurrence-a minireview. *Apoptosis.* 7(5):461-470, 2002.
35. Shabbits, J.A., Krishna, R., Mayer, L.D.R. Molecular and pharmacological strategies to overcome multidrug resistance, *Expert Rev Anticancer Ther.* 1(4):585-594, 2001.
36. Mosmann, T.R., Cherwinski H, Bond MW, Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol*, Vol.136, pp 2348-2357, 1986.
37. Cho, C.H., Lee, B.K., Chu, M.K., Kim, S.K. and Kim, J.D. Antitumor effect of monophosphoryl lipid A, Polyadenylic-polyuridylic acid and cisplatin on B16 melanoma-induced pulmonary metastasis in mice, *J Korean Soc*, 29(2):231-244, 1994.
38. Romagnani, S. Induction of TH1 and TH2 response : A key role for the natural immune response?, *Immunology Today*, Vol.13, pp 379-381, 1992.
39. Hsieh, C.S., S. E. Macatonia, and S. Tripp : Development of Th1 CD41 T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, p 547, 1993.
40. Namita Kundu, Amy M. Fulton : Interleukin-10 Inhibits Tumor Metastasis, Downregulates MHC Class I, and Enhances NK Lysis, *CELLULAR IMMUNOLOGY*, 180, p 5561, 1997.