

當歸補血湯의 배합비율에 따른 대장암 세포주 HCT116의 세포사멸 효과

김병완, 윤현정, 전현숙, 윤형중, 김창현, 박선동^{##}

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Effect of Dangguibohyultang and its combinations on apoptosis in human colorectal adenocarcinoma HCT116 cells

Byung-Wan Kim, Hyun-Joung Yun, Hyung-Joong Yun,
Chang-Hyun Kim, Sun-Dong Park^{##}

Department of Herbal pharmacology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effect of Dangguibohyultang (DB) and its combination (DB-I; Astragali membranous BUNGE : Angelica gigas NAKAI=5:1, DB-II; Astragali membranous BUNGE:Angelica gigas NAKAI=1:1, DB-III; Astragali membranous BUNGE:Angelica gigas NAKAI=1:5,) on apoptosis in human colorectal adenocarcinoma HCT116 cells.

Methods : To study the cytotoxic effect of methanol extract of DB-I, DB-II and DB-III on HCT116 cells, the cell viability was determined by XTT reduction method and trypan blue exclusion assay. To confirm the induction of apoptosis, the cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP), a substrate for caspase-3 and a typical sign of apoptosis, and the activation of procaspase-3, -8 and -9 were examined by western blot analysis. Furthermore, DB-induced apoptosis was confirmed by DNA fragmentation. The release of cytochrome C from mitochondria to cytosol, the level of Bcl-2 and Bax, and the expressions of Raf/MEK/ERK were examined by western blot analysis.

Results : DB-I and DB-II reduced proliferation of HCT116 cells in a dose-dependent manner. DB-I and DB-II decreased procaspase-3, -8, -9 levels in a dose-dependent manner and induced the cleavage of PARP. DB-I and DB-II also triggered the mitochondrial apoptotic signaling by increasing the release of cytochrome C from mitochondria to cytosol, decreasing of anti-apoptotic Bcl-2, and increasing of pro-apoptotic Bax. DB-I and DB-II decreased the activation of Ras/Raf/MEK/ERK cascade in a dose-dependent manner.

Conclusion : These results suggest that DB-I and DB-II induce apoptosis via mitochondrial pathway in HCT116 cells. Furthermore, Raf/MEK/ERK cascade is involved in DB-induced apoptosis. These results suggest that DB is potentially useful as a chemotherapeutic agent in human liver cancer.

Key words : Dangguibohyultang (DB), apoptosis, mitochondrial pathway, Raf/MEK/ERK cascade

##제1저자, 교신저자 : 박선동, 동국대학교 한의과대학 방제학교실

· Tel : 054-770-2654, · e-mail : sundong@dongguk.ac.kr

· 접수 : 2006년 4월 25일 · 수정 : 2006년 5월 20일 · 채택 : 2006년 6월 24일

서론

대장암은 맹장, 결장과 직장에 생기는 악성종양으로 남, 여 모두에서 비슷한 비율로 나타나며 전 세계적으로 증가하고 있는 실정이다. 많은 연구들에 의하면, 암의 원으로는 유전적인 인자와 환경적인 인자가 복합적으로 작용하여 일어난다고 하며 그 중 환경적인 인자가 암 발생과 더 관련성이 깊다고 제시하고 있다. 또한 환경적인 인자 중에서 식생활이 암에 영향을 미치며, 이와 특히 관련 있는 암은 대장암이라고 생각되고 있다¹⁾. 대장암과 직장암은 동물성 지방질과 육류를 많이 섭취하는 미국이나 유럽에 사는 사람들에게 많이 발생하며, 특히 미국에서는 발생률과 사망률을 모두 폐암 다음으로 높은 암이다.

암의 치료는 외과적 절제와 방사선 요법, 항암제를 사용하는 화학적요법 등이 시도되고 있다. 그러나 대장암을 포함한 많은 진행성, 재발성 암은 흔히 사용되는 항암제에 대하여 저항성을 나타내기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위한 방편으로 최근 몇 가지 항암제를 조합하여 사용하는 방법이 시도되고 있다^{2,3)}. 한편 항암치료의 효과는 약제에 대한 저항성, 처리 농도나 계획에 따라 다양하게 나타난다^{4,5)}.

Apoptosis (Programed cell death)는 특히 외부 자극에 대해서 세포 내부에 이미 존재하는 일련의 프로그램에 의해 세포가 사멸하는 과정을 의미하는데, 최근 특정 종양세포에서 apoptosis를 유도하는 항암제들에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다^{6,7)}. 이러한 연구의 진행시 고려해야 할 사항들은 직접적인 apoptosis 발생기전 뿐만 아니라 cell type에 따라 다양하게 존재하는 소기관들을 규명하는 것이다^{8,9)}.

한의학에서의 대장암은 “腸毒”, “積聚”, “腸風”, “下痢”, “腸蕈” 등의 범주에 속한다.泄瀉와便秘가 교대로 생기고 便血이 생기며 粘液便이나 粘液血便이 생긴다.結腸梗塞 증상과 소견이 나타나고 여위며 빈혈이 생기거나 체중이 감소되고 배에서 腫物이 만져지는 등의 증상이 따른다¹⁰⁾.

當歸補血湯은 대출혈이나 지속성 만성출혈 후 중증의 빈혈증, 재생 불량성 빈혈, 만성위염, B-형간염, 육아형성부전 등에서 氣血兩虛인 증상에 응용한다¹¹⁾. 이에 빈혈과 便血등의 혈액이상소견에 주목하여 補氣生血의 기본치방인 當歸補血湯을 선택하였다.

이 연구에서는 補血處方으로 알려진 當歸補血湯이 고형암의 한 종류인 대장암에 대하여 항암작용을 나타내는지, 그리고 항암 작용을 나타냈다면 각 약제의 적절한 항암 작용 농도를 조사해보고, 또한 황기

와 당귀의 비율을 달리하여 복합처방 하였을 때 대장암에 서로 상승 작용으로 치료 효과를 나타내는지 또는 서로 길항 작용을 나타내는 저해제로 작용하는지 조사해 보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 시중에서 구입, 정선하여 사용하였으며, 當歸補血湯의 내용 및 한 貼의 비율 및 총량은 Table. 1과 같다. 약재 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 여과하여 농축한 것을 동결 건조하여 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition and contents of Dangguibohyultang (DB)

	DB-I	DB-II	DB-III
황기 (<i>Astragalus membranaceus</i> Fisch.)	400 g	250 g	80 g
당귀 (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	80 g	250 g	400 g
총량	480 g	500 g	480 g
수율	25.8%	18.5%	29.9%

2) 시약

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서, 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules, USA)사에서 구입하였고 NP-40, CAPS, protease inhibitors 등은 Sigma (St. Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 anti-caspase-3, anti-caspase-9, anti-Bax는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)사에서, anti-Bcl-2와 anti-cytochrome C는 BD PharMingen (San Jose, CA)사에서, anti-PARP, anti-P-MEK1/2, anti-P-Raf, anti-P-ERK1/2, beta-actin은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였

다. 2차 항체인 Anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)사에서 구입하였다. XTT assay용 kit는 Amersham Pharmacia Biotechnology (UK, USA)사에서 구입하였고 Enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit는 Oxford, UK에서, protein assay reagent는 Bio-Rad (Hercules, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이 상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

HCT116 (human colorectal adenocarcinoma cell line, KCLB)을 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 5% CO₂, 37°C 배양조에서 배양하였다.

2) XTT Assay

각 처방의 추출물이 HCT116에 대한 세포독성을 갖는 지 알아보기 위해 XTT assay 방법을 이용하였다. Well당 1×10⁵개의 cell을 96 well plate에 분주하고 serum free media로 16시간 starvation 시킨 후, 각 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Well당 100 μl의 XTT (Roche, USA) labeling mixture (5 ml XTT labeling reagent + 0.1 ml electron coupling reagent)를 처리하여 4시간 반응시킨 후, micro plate reader (DYNEX, Opsy MR)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) Trypan blue exclusion assay

60 mm 배양조에 1×10⁶ cells/ml로 세포를 심고 serum free media로 16시간동안 starvation 시킨 후, 각 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리한 후 원심 분리하여 세포들을 모아서 trypan blue dye (0.4%)로 염색하여 hemacytometer를 사용해서 생존한 세포의 수를 counting하였다.

4) DNA fragmentation analysis

1×10⁶ cells/ml의 세포를 1,000×g에서 10분간 원심 분리하여 모으고 4°C의 PBS로 2회 수세한 다음, lysis buffer (1% NP-40, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH7.5) 로 세포를 lysis한 후 1,600×g, 4°C에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 얻어서 1% SDS와 RNase (5 μg/ml)를 첨가하여 56°C에서 2시간 동안 반응시키고, proteinase K (2.5 μg/ml)를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨다. 총 부피와 동량의 PCI (phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)를 첨가하여 용액 중에 존재하는 단백질과 지질을 제거하고, 12,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻어 10 M ammonium acetate와 99.8% ethanol로 DNA를 침전시켜 1% agarose 전기영동으로 DNA fragmentation을 확인하였다.

5) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS ; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 수세한 후 lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간동안 반응시킨 후 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 수세한 다음, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG를 secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 검증하였다. 각 시료의 단백질 정량은 bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

3. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 편차로 표현하고 유의성 검증은 Sigma Plot 2001 (Window용 version 7.0)을 이용하여 unpaired *t-test*를 실시하였다.

결 과

1. 當歸補血湯의 HCT116 세포에 대한 독성

당귀와 황기의 비율을 다르게 하여 처방하는 경우 대장암 세포주인 HCT116 세포의 증식에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보기 위하여 다양한 농도 (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mg/ml)로 24시간 처리하여 XTT assay 와 trypan blue exclusion assay 를 수행하였다. XTT assay 결과, 당귀와 황기의 비율을 1:5로 한 當歸補血湯 I 처리 시 0.4, 0.5 mg/ml의 농도에서 각각 55.6%, 49.8%까지 세포의 증식이 억제되었고, 1:1로 한 當歸補血湯 II를 처리한 경우에는 0.4, 0.5 mg/ml의 농도에서 각각 76.8%, 67%까지 억제 되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 당귀와 황기의 비율을 5:1로 한 當歸補血湯 III를 처리한 경우에는 HCT116 세포의 증식에 큰 영향을 주지 않았다 (Figure 1). Trypan blue 염색을 통해 세포 생존율을 알아 본 결과, 當歸補血湯 I 처리한 경우 농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하였고 0.3 mg/ml의 농도에서 52.7%까지 생존율이 감소하였다. 當歸補血湯 II의 경우에도 농도가 증가할수록 생존율의 감소를 보였지만 當歸補血湯 I에 비해 감소하는 정도가 낮게 나타났다. 반면 當歸補血湯 III를 처리했을 경우에는 생존율의 변화에 거의 영향을 미치지 않았다 (Figure 2).

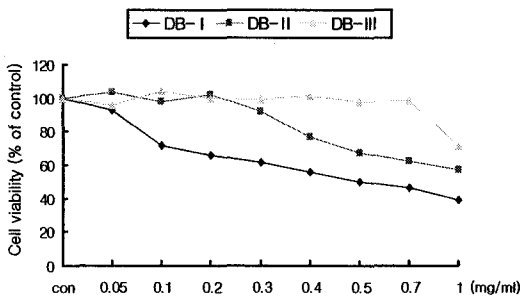


Figure 1. Effect of Dangguibohyultang (DB) on the cell proliferation of the HCT116 cells. HCT116 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of DB-I, DB-II, DB-III for 24 hrs. Cell viability was measured by XTT assay as described in Materials and methods. Data were chosen from six independent triplicate experiments.

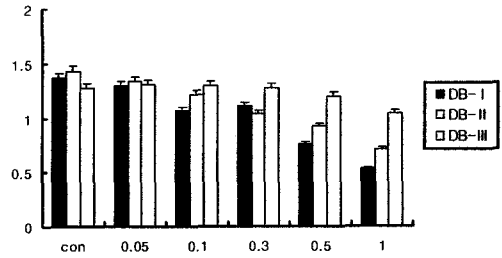


Figure 2. Effect of Dangguibohyultang (DB) on the cell viability of the HCT116 cells. HCT116 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of DB-I, DB-II, DB-III for 24 hrs. After 24 hrs, the cells were stained with trypan blue (0.4%, w/v) for 5 min at room temperature before the cells were examined under the microscope. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion, and the results were expressed as the % of control. Data were chosen from six independent triplicate experiments. Values are mean±S.D.

2. 當歸補血湯에 의한 HCT116의 세포사멸

當歸補血湯 I, II에 의한 세포사멸에 의한 것인지 확인하기 위하여 HCT116 세포에 농도 별로 처리하여 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. 세포는 세포사멸 과정 동안 회복 기능을 상실하게 되는데, 여기에 중요한 polymerase가 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)이다. 이 PARP의 cleavage는 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다. Caspases는 cystinyl aspartate-specific protease로 세포질에서 pro-form으로 존재하고 특정 위치의 proteolytic 과정에 의해 활성화된다. 이로 인해 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성 유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다. 이에 western blot을 통해 procaspase-3, -8, -9의 발현양상과 PARP의 cleavage를 관찰하였다. 그 결과, Figure 3(A)에서 보듯이 當歸補血湯 I 처리 시 0.05 mg/ml 이상의 농도에서 PARP의 cleavage가 관찰되었고, procaspase-3와 procaspase-9은 농도 의존적으로 점차 감소하는 것을 볼 수 있었다. 當歸補血湯 II 처리 시 농도가 증가함에 따라 PARP의 cleavage가 관찰되었고 procaspase-3와 procaspase-9가 감소하였으나 當歸補血湯 I에 비해 감소하는 정도가 약하게 나타났다 (Figure 3(B)). 반면, 當歸補血湯 III 처리한 경우에는 PARP의 cleavage가 나타나지 않았고

procaspase-3와 procaspase-9 발현에도 거의 변화가 없었다 (Figure 3(C)). 또한 세포사멸의 가장 큰 특징인 DNA fragmentation이 유도되는지 확인해 본 결과, 當歸補血湯 I 을 처리한 경우 농도 의존적으로 DNA fragmentation이 확인되었고, 當歸補血湯 II 의 경우에는 0.3 mg/ml 이상의 농도에서 확인되었으나 當歸補血湯 III 에 의해서는 유도되지 않았다 (Figure 4).

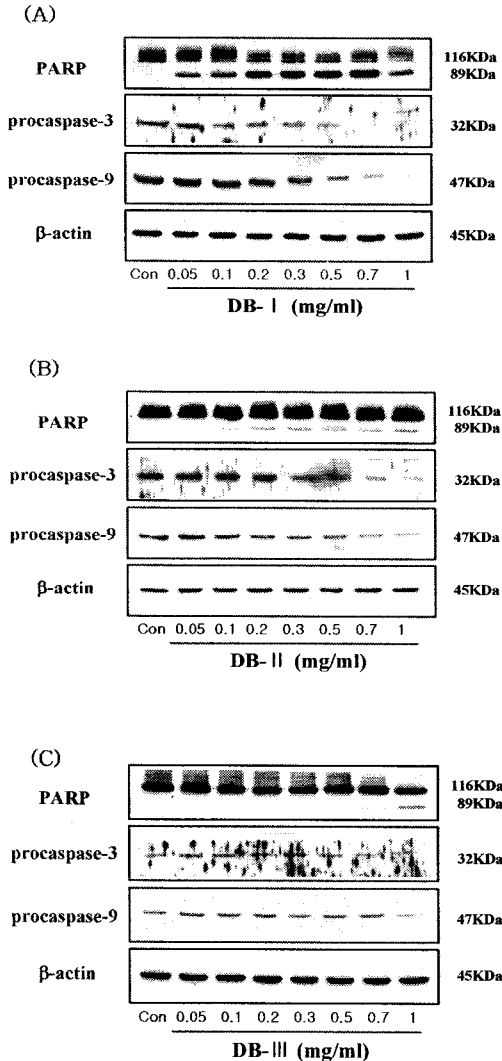


Figure 3. Dangguibohyultang (DB) induces apoptosis in HCT116 cells. HCT116 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of DB- I (A), DB- II (B), DB- III (C) for 24 hrs. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 10% SDS-PAGE. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase-3,

-9 were detected by Western blot. b-actin levels were used as internal markers for loading variation.

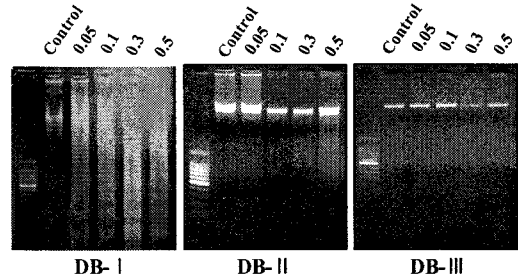


Figure 4. DNA fragmentations by Dangguibohyultang (DB). HCT116 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of DB- I (A), DB- II (B), DB- III (C) for 24 hrs. Internucleosomal DNA fragmentation was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in the presence of EtBr.

3. Mitochondrial pathway를 통한 세포사멸

當歸補血湯에 의해 유도되는 세포사멸이 세포내 어떠한 신호전달을 통해 일어나는지 알아보기 위하여 세포사멸의 경로 중 하나인 mitochondrial apoptosis에 관여하는 Bcl-2와 Bax의 발현양상과 mitochondria로부터 세포질로 cytochrome c가 방출되는 정도를 알아보았다. 그 결과, 當歸補血湯 I 처리 시 0.2 mg/ml 이상의 농도에서부터 cytochrome c의 방출량이 점차 증가하였고 농도 의존적으로 Bcl-2의 발현이 점차적으로 감소하였고 Bax의 발현이 점차 증가하였다. 當歸補血湯 II 처리 시에는 0.3 mg/ml 이상의 농도에서 cytochrome c의 방출량이 점차 증가하였고 농도 의존적으로 Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 볼 수 있었다. 반면, 當歸補血湯 III를 처리한 경우에는 세포질 내 cytochrome c가 거의 detection되지 않았으며 Bcl-2와 Bax의 발현에 거의 변화가 없었다 (Figure 4). 이러한 결과로 보아, 當歸補血湯 I 當歸補血湯 II 에 의한 apoptosis는 mitochondrial pathway를 경유하는 것으로 볼 수 있다.

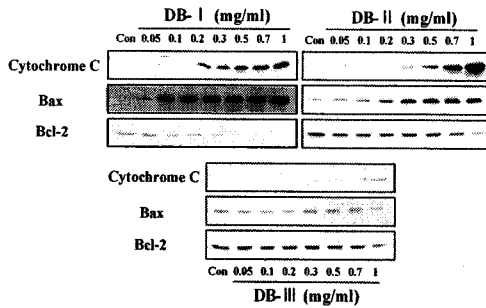


Figure 4. Effect of Dangguibohyultang (DB) on cytochrome c release from mitochondria to cytosol and the expression of Bcl-2 and Bax in HCT116 cells. Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of DB-I (A), DB-II (B), DB-III (C) for 24 hrs. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions. Cytosolic fractions were isolated and analyzed by Western blot using an anti-cytochrome c antibody.

4. 當歸補血湯이 Ras/Raf/MEK/ERK pathway에 미치는 영향

Ras/Raf/MEK/ERK pathway는 대부분의 성장인자 수용체들의 downstream으로 세포의 생존과 성장, 분화, 형질전환 등을 조절하는 데 필수적인 신호전달 체계이다. 當歸補血湯이 Ras/Raf/MEK/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 그 결과, 當歸補血湯 I을 처리한 경우 농도 의존적으로 P-Raf, P-MEK1/2, P-ERK의 발현이 점차적으로 감소하는 것으로 보아 Raf/MEK/ERK 활성이 감소하는 것을 알 수 있었고 (Figure 5(A)), 當歸補血湯 II를 처리하였을 때에도 같은 결과를 나타냈지만 當歸補血湯 I에 비해 그 감소의 정도가 약했다 (Figure 5(B)). 반면, 當歸補血湯 III를 처리한 경우에는 Raf/MEK/ERK 활성에 거의 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다 (Figure 5(C)).

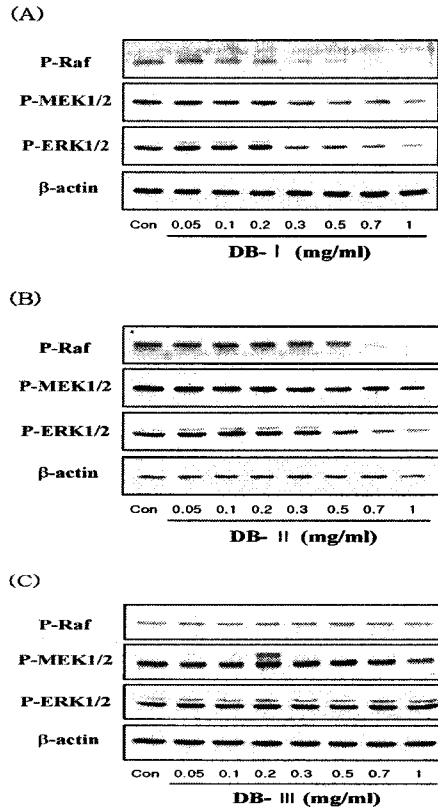


Figure 5. Effect of Dangguibohyultang (DB) on Ras/Raf/MEK/ERK pathway in HCT116 cells. Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of DB-I (A), DB-II (B), DB-III (C) for 24 hrs. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 10% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions. b-actin levels were used as internal markers for loading variations.

고찰

대장암과 직장암은 동물성 지방과 육류를 많이 섭취하는 미국이나 유럽에 사는 민족에게서 많이 발생하며, 특히 미국에서는 발생률과 사망률 모두 폐암 다음으로 높은 암이다. 한국이나 일본을 비롯한 아시아 각국에서는 서구에 비하여 발생률이 낮으나 근래에는 식생활이 점차 서구화 되어감에 따라 예전에 비하여 대장, 직장암의 발생률이 증가되어 가고 있는 추세로 우리나라의 경우 발생률과 사망률이 4번째로 높은 암으로서 인구 십만 명당 약 7명이 대장암으로 사망하고 있으며, 최근 10년 사이 대장암에 의한 사

망물은 약 80% 정도 증가하여 그 상승속도가 높아지고 있는 추세이다¹²⁾. 대장암은 성별에 따른 큰 차이가 없이 비슷한 비율로 발생하고, 연령의 증가에 따라 늘어나는 경향이 있다. 대장암의 원인으로는 식이요소, 담즙산, 담낭질체술 과거력, 염증성 장 질환, 가족성 요소, 방사선 조사 등이 있으며 대장암의 90%는 가족성 유전적 소질이 명확하지 않은 결장암이고, 대장암의 약 10%에서는 유전적 요인에 의해서 발생하는 것으로 밝혀져 있다¹³⁾.

대장암의 증상은 여러 가지 요인에 의해 다양하게 표현되며, 배변습관의 변화, 출혈, 점액변, 항문동통, 복통, 체중감소, 천공 등이 있다. 한의학에서 대장암은 "腸藪", "腸毒", "積聚", "腸風", "下痢" 등의 범주에 속한다.泄瀉와便秘가 교대로 생기고 便血이 생기며 粘液便이나 粘液血便이 생긴다.結腸梗塞 증상과소견이 나타나고 여위며 貧血이 생기거나 체중이 감소되고 배에서 腫物이 만져지는 등의 증상이 따른다¹⁰⁾.

우측대장암의 경우에는 케양성 병변이 흔하며 대변형태의 변화 없이 만성적으로 지속적인 혈액소실을 일으킨다. 결국 상행결장암 환자에서는 疲勞感, 心悸亢進, 및 狹心症 같은 증상을 종종 볼 수 있고, 철 결핍 시 보일 수 있는 저혈색소성 소핵구성 빈혈을 보일 수 있다. 하지만 중양은 간헐적인 출혈을 보일 수 있기에 大便潛血檢査에서 음성반응을 보일 수 있다¹⁴⁾.

이에 본 연구에서는 貧血과 便血등의 血液異常所見에 주목하여 補氣生血의 基本處方인 當歸補血湯을 선택하였다. 當歸補血湯은 補氣生血하는 基本方劑로써 氣血兩虛로 인한 疲勞內傷, 肌熱面赤, 煩渴欲飲 증후에 脈이 洪大하고, 그 위에 虛 또는 婦人의 月經期나 產後의 血虛로 인한 發熱頭痛 瘡瘍이 潰한 후에 癒合되지 않는 등의 증상을 치료한다. 현재 임상응용에서는 大出血이나 지속성 慢性出血 후 重症의 貧血症, 再生 불량성 빈혈, 알레르기성 紫斑症, 만성위염, B-형간염, 육아형성부전, 慢性微熱 등에서 氣血兩虛인 증상에 응용한다¹¹⁾.

처방의 구성약물의 효능 및 약리작용을 살펴보면, 黃芪 (Astragali Radix)는 豆科 (Leguminosae)에 속한 다년생 초본이 黃芪 (Astragali membranaceus BUNGE)의 뿌리를 봄과 가을에 채취하여 건조한 것으로 性味が 微溫無毒.甘하며, 歸經은 脾肺經으로 補氣升揚, 固表止汗, 托毒排膿, 利水退腫의 효능이 있다고 하였다^{15,16)}. 주성분으로 β -sitosterol, linolic acid, linolenic acid, choline, flavonoids, 수종의 아미노산을 함유하고 있다^{17,18,19)}. 當歸 (Angeicae gigantis Radix)는 散形科 (Umbelliferae)

에 속한 다년생 초본인 참당귀(Angelica gigas NAKAI)의 뿌리를 가을에 채취하여 건조한 것을 이용하고 있다. 주성분은 Pyranocoumarin계인 decursin이며 그 밖에 decursinol, umbelliferon, β -sitosterol 등을 함유한다. 性味는 無毒性.甘辛하며, 歸經은 心肝脾經으로 補血和血, 行氣止痛, 潤燥滑腸의 효능이 있으며 眩暈을 治療한다고 하였다^{17,20,21)}. 참당귀의 성분 중 decursin은 PKC를 활성화하는 작용으로 亢奮활성이 있는 것으로 보고되었다²²⁾.

이 연구는 當歸補血湯이 고형암의 한 종류인 대장암에 대하여 항암작용을 나타내는지, 그리고 항암작용을 나타냈다면 각 약재의 적절한 작용 농도를 조사해보고, 또한 黃芪와 當歸 비율을 달리하여 複合處方하였을 때 대장암에 서로 상승 작용으로 치료 효과를 나타내는지 또는 서로 길항 작용을 나타내는 지해제로 작용하는지를 조사해 보았다. 當歸補血湯 元方은 黃芪와 當歸의 배합비율이 5:1이다²³⁾. 그러나 본 연구에서 當歸補血湯의 배합비율에 따른 대장암 세포주 HCT116의 세포사멸효과를 알아보기 위하여 황기와 당귀의 배합비율을 5:1 (當歸補血湯 I), 1:1 (當歸補血湯 II), 1:5 (當歸補血湯 III)로 하여 실험에 사용하였다.

먼저, 當歸補血湯 I, II, III에 의한 HCT116 세포의 증식 억제 효과를 확인하기 위해 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 當歸補血湯 I, II를 처리한 경우에 농도 의존적으로 세포의 증식이 저해되었고, 當歸補血湯 I에 의해 세포의 증식의 억제가 현저히 나타났다. 반면 當歸補血湯III를 처리한 경우에는 거의 영향을 미치지 않았다. 또한 Trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 當歸補血湯 I, II의 경우에는 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소한 반면 當歸補血湯III를 처리한 경우에는 거의 변화가 없었다. 또한 當歸補血湯 I, II에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 처리한 當歸補血湯 I, II의 농도에 의존적으로 procaspase-3, -9의 발현이 감소하였고 PARP의 cleavage와 DNA fragmentation이 유도되었다. 특히 當歸補血湯-I에 의해 apoptosis가 효과적으로 유도되었다.

Apoptosis가 일어나는 세포의 경우 mitochondrial membrane depolarization이 생기고 mitochondria내의 cytochrome c가 세포질로 방출된다²⁴⁾. 當歸補血湯을 처리한 후 cytochrome c의 방출과 이에 관여하는 Bcl-2와 Bax의 발현양상을 조사하였다. Figure 4에서 보듯이, 當歸補血湯 I, II 처리 시 각각 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml 이상의 농도에서부터 cytochrome c의 방출량이

점차 증가하였고 농도 의존적인 Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 볼 수 있었다. 반면, 當歸補血湯Ⅲ를 처리한 경우에는 세포질 내 cytochrome c가 거의 detection되지 않았으며 Bcl-2와 Bax의 발현에 거의 변화가 없었다. 이러한 결과로 보아, 當歸補血湯Ⅰ 當歸補血湯Ⅱ에 의한 apoptosis는 mitochondrial pathway를 통해 유도됨을 알 수 있었다.

세포내의 signaling pathway 중 세포의 증식과 분화, apoptosis 등 세포의 다양한 생물학적 기능 조절에 관여하는 것으로 알려져 있는 MAP kinase family (MAPK)는 serine/threonine kinase이며 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK, c-jun N-terminal kinase (JNK)로 크게 구분된다²⁵⁾. 그 중 ERK는 성장 요인들의 반응에 의해 활성화되는데, 이들의 활성화는 tyrosine 인산화와 상호 작용한다. ERK1/2 (p42/p44)는 세포내에서 광범위하게 발현되고, 유사분열과 감수분열의 조절, postmitotic 기능에 관여하며, 성장 인자와 cytokine, 바이러스 감염, carcinogen 등과 같은 많은 자극에 의해 활성화된다^{26,27)}. ERK1/2는 c-Raf, B-Raf, A-Raf 등의 인산화에 의해 활성화되는데 이들은 protooncogene인 Ras에 의해 활성화된다²⁸⁾. 암세포에서의 Ras는 ERK1/2 경로를 활성화시키고 암세포의 증식률을 높이는 데에 기여한다. 따라서 ERK 경로의 저해가 잠재적으로 항암 치료의 하나의 target이 될 수 있다. Ras/Raf/MEK/ERK pathway는 대부분의 성장인자 수용체들의 downstream으로 세포의 생존과 성장, 분화, 형질전환 등을 조절하는데 필수적인 신호전달체계이다²⁹⁾. 當歸補血湯이 Ras/Raf/MEK/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. Figure 5에서 보듯이, 當歸補血湯Ⅰ을 처리한 경우 농도 의존적으로 Raf/MEK/ERK 활성이 감소하였고 當歸補血湯Ⅱ를 처리하였을 때에도 같은 결과를 나타냈지만 當歸補血湯Ⅰ에 비해 그 감소의 정도가 약했다. 반면, 當歸補血湯Ⅲ를 처리한 경우에는 Raf/MEK/ERK 활성에 거의 영향을 미치지 않았다. 이로써 Raf/MEK/ERK 활성이 當歸補血湯Ⅰ,Ⅱ에 의한 apoptosis에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

이러한 실험결과로 보아 黃芪와 當歸로 구성된 當歸補血湯에서 抗腫 효과가 있다고 알려진 참당귀를 증량한다고 하여서 반드시 대장암세포의 증식 억제에 유의적인 효과가 나타나지 않는다는 사실을 추론할 수 있었다. 또한 黃芪의 분량이 많은 처방 (當歸補血湯Ⅰ)에서 가장 효과적인 항암억제효과가 있는 것으로 보아 黃芪의 托毒排膿 효능이 항암효과가 있을 것으로 추정할 수 있었다.

이상의 결과에서 當歸補血湯 本方인 當歸補血湯

Ⅰ에서 apoptosis 효과가 현저하였음을 보여주고 있는데, 임상에서 처방구성을 할 때 合方이나 加減處方の 구성에 좀더 신중함이 필요하다고 생각된다. 아울러 黃芪의 抗腫 효과에 관한 더욱 세밀한 연구가 필요할 것이다.

결론

당귀와 황기의 비율을 달리한 當歸補血湯Ⅰ(황기:당귀=5:1), Ⅱ(황기:당귀=1:1), Ⅲ(황기:당귀=1:5)에 의한 대장암 세포주 HCT116의 세포사멸 유도와 그 mechanism에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ에 의한 HCT116 세포의 증식 억제 효과를 확인하기 위해 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ를 처리한 경우에 농도 의존적으로 세포의 증식이 저해되었고, 當歸補血湯Ⅰ에 의해 세포의 증식의 억제가 현저히 나타났다. 반면 當歸補血湯Ⅲ를 처리한 경우에는 거의 영향을 미치지 않았다. 또한 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ의 경우에는 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소한 반면 當歸補血湯Ⅲ를 처리한 경우에는 거의 변화가 없었다.
2. 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 처리한 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ의 농도에 의존적으로 procaspase-3, -9의 발현이 감소하였고 PARP의 cleavage와 DNA fragmentation이 유도되었다. 특히 當歸補血湯Ⅰ에 의해 apoptosis가 효과적으로 유도되었다.
3. 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ를 처리한 후 mitochondrial pathway에 관여하는 Bcl-2, Bax, cytochrome C의 발현양상을 조사한 결과, 처리한 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ의 농도가 증가함에 따라 세포질내의 cytochrome C의 양이 증가하였고, anti-apoptotic Bcl-2의 발현이 감소하였고 pro-apoptotic Bax의 발현이 증가하였다.
4. 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ가 Ras/Raf/MEK/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 當歸補血湯Ⅰ, Ⅱ에 의해 농도 의존적으로 Raf/

MEK/ERK 활성이 감소했으며 특히 當歸補血湯 I에 의해 활성이 현저히 저해되었다. 반면 當歸補血湯 III는 Raf/MEK/ERK 활성에 거의 영향을 주지 않았다.

이 같은 결과로 보아, 當歸補血湯 I, II는 대장암 세포주인 HCT116의 증식을 저해하고 mitochondrial pathway를 통한 apoptosis를 유도할 수 있으며, 또한 Raf/MEK/ERK의 활성을 저해함으로써 apoptosis에 영향을 줄 것으로 생각된다.

감사의 글

-본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임.

-본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학 연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호: R13-2005-013-01000-0).

참고문헌

- Potter JD., Slattery ML., Bostrick RM., Gapstur SM. Colon cancer: Review of epidemiology. *Epidemiol Rev.* 15(2). 1993:499-545.
- Agami R., Blandino G., Oren M., Shaul Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature.* 399(6738). 1999:809-813.
- Demidenko ZN., Halicka D., Kunicki J., McCubrey JA., Darzynkiewicz Z., Blagosklonny MV. Selective killing of adriamycin-resistant (G2 checkpoint-deficient and MRP1-expressing) cancer cells by docetaxel. *Cancer Res.* 65(10). 2005:4401-4407.
- Tabe Y., Konopleva M., Contractor R., Munsell M., Schober WD., Jin L. Tsutsumi-Ishii Y., Nagaoka I., Igari J., Andreeff M. Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood.* 107(4). 2006:1546-1554.
- Durja J., Zazrivcova K., Bodo J., Sulikova M., Sedlak J. Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma.* 52(4). 2005:273-279.
- van der Sp다 E., Bloem AC., van de Donk NW., Bogers LH., van der Griend R., Kramer MH., de Weerd O., Wittebol S., Lokhorst HM. Dose-finding study of high-dose simvastatin combined with standard chemotherapy in patients with relapsed or refractory myeloma or lymphoma. *Haematologica.* 91(4). 2006:542-545.
- Cao W., Ma SL., Tang J., Shi J., Lu Y. A combined treatment TNF-alpha/doxorubicin alleviates the resistance of MCF-7/Adr cells to cytotoxic treatment. *Biochim Biophys Acta.* 1763(2). 2006:182-187.
- Sirotnak FM., Zakowski MF., Miller VA., Scher HI., Kris MG. Efficacy of cytotoxin agents against human tumor xenograft is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res.* 6(12). 2000:4885-4892.
- Hahm HA., Dunn VR., Butash KA., Deveraux WL., Woster PM., Casero Jr. RA., Davidson., Davidson NE. Combination of standard cytotoxic agents with polyamine analogues in the treatment of breast cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 7(2). 2001:391-399.
- 김갑성, 김명동, 김윤범, 김장현, 김중호, 이원철, 임양근, 정찬길. 實用東西 醫學臨床總書1. 서울. 정담출판사. 2001:624.
- 강병수, 김영관. 臨床配合本草學. 서울. 영림사. 1994:724-725.
- 이주영, 정성창, 박순홍, 김보완, 김정국, 하승우, 이신원, 정귀화. 말단비대증 환자에서 대장 용종의 유병율에 영향을 미치는 요인. *대한내과학회지*, 68(7). 2005:55-60.
- 박재갑, 김일진. 유전대장암. *대한소화기학회지*. 45(2). 2005:78-87.
- 김갑성, 김명동, 김윤범, 김장현, 김중호, 이원철, 임양근, 정찬길. 實用東西 醫學臨床總書1. 서울. 정담출판사. 2001:630.
- 전국한의과대학 본초학교실, 본초학. 서울. 영림사. 1992:578-579.
- 신민교. 原色임상본초학. 서울. 영림사. 1991:169.
- 이상인. 本草學. 서울. 修書院. 1981:101-102.

18. 이상인. 韓藥臨床應用. 서울. 成輔社. 1986:298-301.
19. 최태섭. 韓國의 補藥. 서울. 열린책들. 1990:173.
20. 黃爽緝. 神農本草經. 北京. 中醫古籍出版社. 1991:169-172.
21. 吳大平. 論川芎藥性與臨床應用. 中醫學會報. 1996:44-45.
22. Ahn KS., Sim WS., Kim IH. Decursin A cytotoxic agent and protein kinase C activator from the Root of *Angelica gigas*. *Planta Med.* 63(4). 1997:360-361.
23. 김상찬, 김선희, 노승현, 박선동, 서부일, 이상인의. 方劑學. 영림사. 1999:289.
24. Li MH, Cha YN., Surh YJ. Carbon monoxide protects PC12 cells from peroxynitrite-induced apoptotic death by preventing the depolarization of mitochondrial transmembrane potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 342(3). 2006:984-990.
25. Tamura S, Hanada M, Ohnishi M, Katsura K, Sasaki M, Kobayashi T. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem.* 269(4). 2002:1060-1066.
26. Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 25(5). 2004:647-659.
27. Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Yoshida H, Jinno H, Ando M. Arsenite and arsenate activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 by an epidermal growth factor receptor-mediated pathway in normal human keratinocytes. *Br J Dermatol.* 149(6). 2003:1116-1127.
28. Jung JW, Cho SD, Ahn NS, Yang SR, Park JS, Jo EH, Hwang JW, Jung JY, Kim SH, Kang KS, Lee YS. Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate. *Cancer Lett.* 225(2). 2005:199-206.
29. Schuierer MM., Heilmeier U., Boettcher A., Ugocsai P., Bosserhoff AK., Schmitz G., Langmann T. Induction of Raf kinase inhibitor protein contributes to macrophage differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 342(4). 2006:1083-1087.