

혈관내피세포에서 cisplatin에 의한 세포고사에 대한 산약보정방암탕 에탄올 추출물의 방어효과

권강범 · 김은경 · 이영래¹ · 주성민² · 류도곤 · 김성훈^{3*} · 전병훈^{2*}

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 전북대학교 의과대학 생화학교실,
2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 3: 경희대학교 한의과대학 병리학교실

Protective Effects of Sanyakbojungbangam-tang Ethanol Extracts on Cisplatin-induced Apoptosis in ECV304 Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Young Rae Lee¹, Sung Min Ju²,
Do Gon Ryu, Sung Hoon Kim^{3*}, Byung Hun Jeon^{2*}

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School,
2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, KyungHee University

This study was designed to investigate the protective effect of Sanyakbojungbangam-tang Ethanol Extracts (SB Et-OH) on the cisplatin-induced apoptosis of human endothelial cell line ECV304 cells. After cells were treated with cisplatin, MTT assay was performed for cell viability test. To explore the mechanism of cytotoxicity, we used the several measures of apoptosis to determine whether this processes was involved in cisplatin-induced cell damage in ECV304 cells. Also, cells were treated with SB Et-OH and then, followed by the addition of cisplatin. Cisplatin decreased the viability of ECV304 cells in a dose-dependent manner and increased the caspase-3 enzyme activity. ECV304 cells treated cisplatin were revealed as apoptosis characterized by nuclear staining. SB Et-OH protected ECV304 cells from cisplatin-induced nuclear fragmentation and chromatin condensation. Also, SB Et-OH inhibited the activation of caspase-3 protease and the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in cisplatin-treated ECV304 cells. According to above results, SB Et-OH may protect ECV304 cells from the apoptosis induced by cisplatin.

Key words : Sanyakbojungbangam-tang, ECV304 cells, caspase-3, apoptosis

서 론

서양의학에서 암에 대한 주요한 치료법으로 사용되고 있는 화학요법은 전신요법으로 수술 전 1차 치료로 미세 전이 병소를 조기에 제거하고, 국소 종양의 크기를 축소 또는 소실시켜 수술이나 방사선요법의 효과를 극대화시키기 위하여 사용하거나, 암의 근치적 수술 후에 잔류 세포암이나 미세전이 암세포의 완전

파괴·사멸을 위하여 사용되고 있다¹⁾.

화학요법제란 암세포의 각종 대사경로에 개입하여 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA복제(replication), 전사(transcription), 번역(translation)과정을 차단하거나 핵산의 합성을 방해하고, 세포분열을 저해함으로써 항암활성, 즉 암세포에 대한 세포독성을 나타낸다. 그러나 이들 약제는 정상세포에 대한 세포독성이나 골수억제, 오심, 구토, 구내염, 탈모증, 신장독성 등의 부작용이 보고되고 있다^{2,3)}. 화학요법제로 쓰이는 대표적인 약물로 알려진 cisplatin은 세포고사를 유도하여 암세포를 죽이는 DNA 손상 물질이나 다양한 부작용도 나타내는 것으로 알려져 있다⁴⁾.

산약은 蓰蓂科(마과 ; Dioscoreaceae)에 속한 多年生纏繞草

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : omdjbh@wonkwang.ac.kr, sungkim7@khu.ac.kr

· Tel : 063-850-6843, 031-201-2179

· 접수 : 2005/12/13 · 수정 : 2006/01/09 · 채택 : 2006/02/10

본인 마, 및 참마의 괴경으로서 甘, 平 無毒하고 脾·肺·腎 三經에 작용하며 補脾胃·益肺腎 등의 효능이 있어 脾胃虛弱, 少食體倦, 泄瀉, 虛勞咳嗽, 消渴, 遺精, 帶下, 小便頻數 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 실험적으로 김 등은 산약보정방암탕 에탄올 추출물이 류마티스 관절염에 보호효과가 있음을 보고하였다⁶⁾.

이에 저자는 산약보정방암탕 에탄올 추출물이 cisplatin에 의해 유도된 혈관내피세포 고사 유도에 대한 방어효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

항암제 cisplatin은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)과 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 용해한 후, 0.2 μ m filter(Millipore, Bedford, MA, USA)에 여과한 후에 사용하였다. 세포배양에 사용한 세포 배양관은 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, PARP 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Hoechst 33258 등은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양액 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 혈관내피세포인 ECV304 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 95% 공기과 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되는 습기가 충분한 대기에서 37℃를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. 산약보정방암탕 에탄올 추출물 제조

본 연구에 사용된 산약보정방암탕 에탄올 추출물은 경희대학교 동서의화대학원 중앙학교실에서 얻어서 사용하였다.

4. MTT 분석

ECV304 세포를 96 well 세포배양 용기에 1 \times 10⁴ cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 세포에 산약보정방암탕 에탄올 추출물을 처리하여 MTT (0.5mg/ml)와 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5. Caspase-3 protease 활성도 측정

세포를 4℃에서 30분 세포파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)과 반응 후, 14,000rpm으로 15분 원심분리하여 이 때 얻어진 상층액의 단백질량을 bicinchoninic acid(BCA) 용액을 이용하여 정량하였다. 세포파쇄액(30 μ g)은 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)로 희석한 형광 기질(caspase-3: Ac-DEVD-AFC)과 37℃에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 caspase 활성을 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(400nm)와 emission wavelength(505nm)를 사용하였다.

6. 핵 염색(Hoechst staining)

세포 핵 형태의 관찰은 4% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하였다. 핵 염색 시약 Hoechst 33258을 10 μ M로 희석하여 10분 염색하고 다시 PBS로 세척한 후 형광현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 핵 형태를 관찰하면서 10 \times 10의 배율로 사진을 찍었다.

7. Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4℃에서 30분 반응시킨 후, 동량의 단백질을 BCA용액으로 정량하였다. 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodesyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후, 100℃에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10% gel에서 sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm²)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차항체는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, ECL kit(Amersham Co., England)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

8. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법⁷⁾에 의거하여 정량하였다.

9. 통계 분석

실험 결과는 mean \pm S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 Microcal Origin(Version 6.0)을 이용하여 ANOVA one-way test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Cisplatin에 의한 세포 독성 및 고사 유도 효과

혈관내피세포인 ECV304세포에 여러 농도의 산약보정방암탕 에탄올 추출물을 72시간 동안 처리한 후 세포 증식에 대한 효과를 MTT 분석법을 이용하여 조사 하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포 생존율을 감소시켰다. 특히 40, 80, 100 μ M의 농도로 처리한 군은 대조군에 비하여 각각 55%, 44%, 27%의 생존율을 나타냈다(Fig. 1). 이러한 cisplatin의 세포독성 효과가 세포고사에 의한 것인지 조사하고자 caspase-3 효소 활성도와 DNA 절단과 염색체 응축을 조사하였다. Fig. 2와 Fig. 3에서 나타났듯이 cisplatin은 caspase-3 효소 활성도를 농도의존적으로 증가시켰으며 40 μ M cisplatin 처리한 군에서 세포고사의 특징적인 현상중의 하나인 DNA 절단과 염색체 응축이 나타났다.

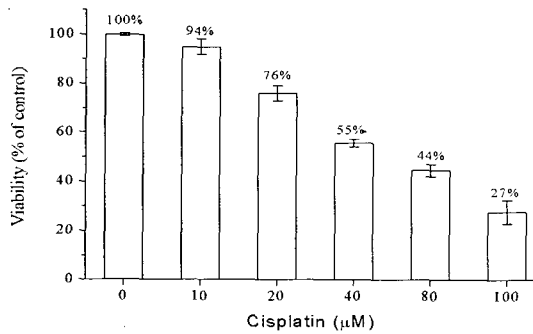


Fig. 1. Cisplatin decreased the viability of ECV304 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of cisplatin for 72 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

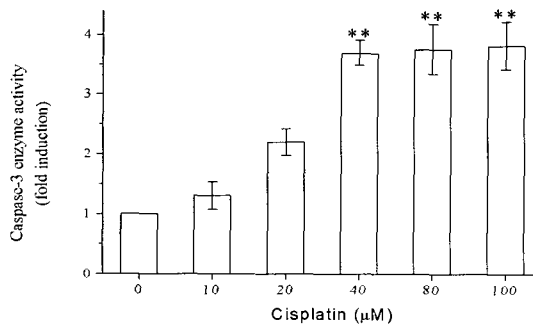


Fig. 2. Activation of caspase-3 protease in cisplatin-treated ECV304 cells. Cells were seeded for 24 hr and followed by the addition of various concentrations of cisplatin for 72 hr. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 protease using fluorogenic peptide, Ac-DEVD-AFC as a substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Results represent as the mean \pm S.D. of three independent experiments. **, P<0.01.

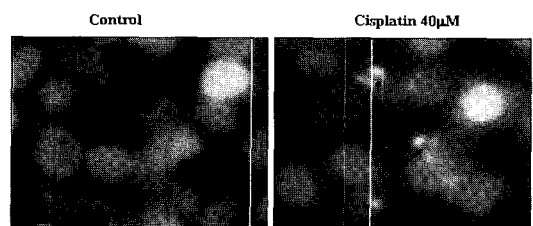


Fig. 3. Cisplatin induced the apoptosis of ECV304 cells. Nuclear fragmentation shown in ECV304 cells treated with cisplatin revealed by Hoechst 33258 staining.

2. 산약보정방암탕 에탄올 추출물의 방어 효과

혈관내피세포에 대한 cisplatin의 독성 효과에 대한 산약보정방암탕 에탄올 추출물(SB Et-OH)의 방어효과를 조사하고자 caspase-3 효소 활성도(Fig. 4), PARP의 절단(Fig. 5), DNA 절단 및 염색체 응축(Fig. 6)을 조사하였다.

0.2, 0.4mg/ml의 농도로 3시간 동안 전 처리 한 후 40 μ M cisplatin을 72시간 동안 처리한 후 caspase-3 효소 활성도를 측정 한 결과 산약보정방암탕 에탄올 추출물을 전 처리한 군은 cisplatin에 의한 caspase-3 효소 활성도의 증가와 PARP의 절단을 유의하게 억제 하였다(Fig. 4, Fig. 5). 이러한 산약보정방암탕 에탄올 추출물의 방어효과는 Fig. 6에 나타났듯이 cisplatin에 의한 DNA 절단의 억제로 나타났다.

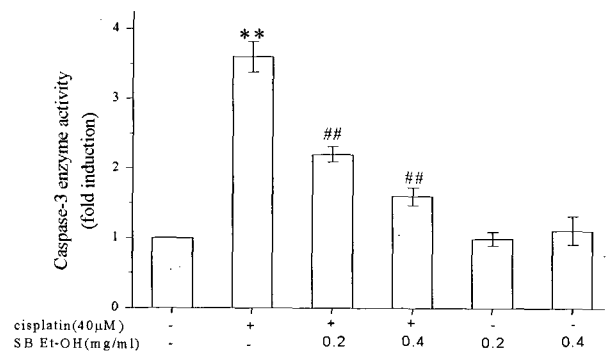


Fig. 4. Protective effects of Sanyakbojungbangam-tang Ethanol Extracts(SB Et-OH) on the cisplatin-induced activation of caspase-3 protease in ECV304 cells. Cells were treated with 0.2, 0.4mg/ml of SB Et-OH for 3 hr and followed by the addition of 40 μ M cisplatin for 72 hr. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 protease using fluorogenic peptides as substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Results represent as the mean \pm S.D. of three independent experiments. ** P<0.01 vs control, ## P<0.01 vs cisplatin alone.

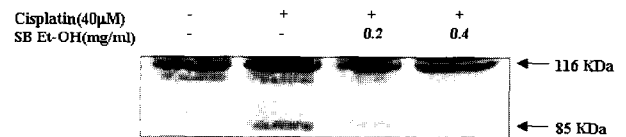


Fig. 5. Protective effects of Sanyakbojungbangam-tang Ethanol Extracts(SB Et-OH) on the cisplatin-induced PARP cleavage of ECV304 cells. Lysate from cells was separated on 10.0% SDS-PAGE. PARP protein was probed with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit. Other legends are same as Fig. 4.

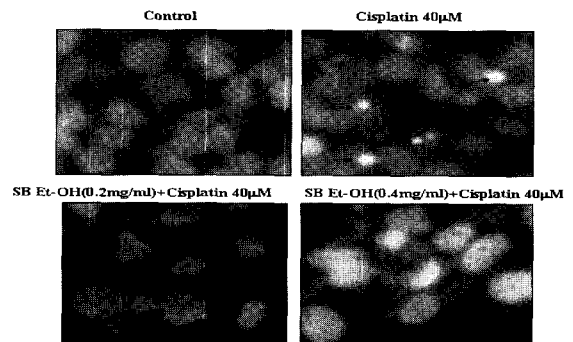


Fig. 6. Sanyakbojungbangam-tang Ethanol Extracts(SB Et-OH) protected the nuclear fragmentation of ECV304 cells by cisplatin. Nuclear fragmentation shown in ECV304 cells treated with cisplatin or SB Et-OH revealed by Hoechst 33258 staining. Other legends are same as Fig. 4.

고찰

cisplatin(cis-dichlorodiammineplatinum)은 platinum원자가 chloride와 ammonia원자에 의해 둘러싸여진 inorganic complex로서 epithelial tumor에 효과적인 항암제로 1972년부터 사용되어 왔다. 이는 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중 나선구조에 부착되어 DNA복제를 저해하여 암세포의 성장 및 증식을 억제하고 암세포를 제거하는 항암효과를 나타낸다. 특히 cisplatin은 전이 고환암과 난소암의 치료에 좋은 효과를 나타내며, 방광암, 두경부의 편평세포암, 기관지암, 자궁암, 임파종에도 많이 사용된다. 그러나 신독성, 골수조직 억제작용, 심한 구토, 신경 장애 등의 부작용이 문제시 되고 있다^{8,9)}.

세포고사(apoptosis)란 apo(off: 분리되다)와 ptosis(falling: 떨어지다)의 합성어로 세포괴사(necrosis)와 구별하면 전자는 physiological cell death 혹은 programmde cell death, 즉 세포자멸이고, 후자는 pathological cell death 즉 괴사를 가리킨다¹⁰⁾.

이에 저자는 암에 대하여 cisplatin을 이용한 화학요법 치료시 정상세포인 혈관내피세포에 미치는 세포사멸 과정과 이에 대한 산약보정방암탕 에탄올 추출물의 세포고사 방어능력을 실험적으로 규명하고자 하였다. 먼저 cisplatin에 의한 세포독성이 세포고사 현상임을 확인하고, 산약보정방암탕 에탄올 추출물의 세포독성에 대한 방어효과를 확인하였다.

실험에서 cisplatin을 혈관내피세포주인 ECV304세포에 처리한 결과 농도 의존적인 생존율의 감소를 나타냈다(Fig. 1). 이러한 생존율의 감소는 Fig. 3에서 보여주듯이 DNA 절단과 같은 세포고사에 의한 것임을 확인하였다.

Cisplatin과 같은 항암제들은 다양한 암세포에서 세포고사 신호전달 기전을 통하여 암세포를 세포사멸로 유도한다고 알려져 있다. 최근 세포고사 유도 기전으로 중요시되고 있는 caspase protease family는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화 되며, 현재까지 14종류가 알려져 있다¹¹⁻¹³⁾. 그 중 caspase-3 protease는 caspase cascade의 하방에 위치하여 상방에 위치한 caspase-8 protease와 -9 protease의 활성화가 합류하는 효소로서 손상된 DNA 복구와 스트레스 관련 발현유전자의 활성화 기능 유지에 중요한 단백질인 PARP를 절단하여 세포고사를 유도한다^{14,15)}. Cisplatin을 처리한 ECV304세포는 caspase-3 protease 활성도를 농도 의존적으로 증가시켰으며(Fig. 2) 이러한 활성도의 증가는 PARP의 절단을 유도하였다(Fig. 5, lane 2). 이상의 결과는 cisplatin은 혈관내피세포에 독성을 증가시켰으며 이러한 세포 독성은 세포고사의 의한 것이고 그 기전에 caspase-3 활성도의 증가가 관여하는 것을 시사한다.

이러한 cisplatin에 의한 혈관내피세포의 고사 유도에 대한 산약보정방암탕 에탄올 추출물의 방어효과를 조사하였다. 산약보정방암탕 에탄올 추출물은 실험적으로 류마티스 관절염과 관련된 synoviocytes의 염증 유발을 억제하고 그 기전에 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현 억제가 관여한다고 발표되었다⁹⁾. 이러한 연구 결과를 바탕으로

산약보정방암탕 에탄올 추출물을 cisplatin에 72시간 동안 노출시키기 3시간 전에 0.2, 0.4mg/ml의 농도로 처리한 후 caspase-3 protease 활성도, PARP 절단, DNA 절단을 관찰하였다. 그 결과 산약보정방암탕 에탄올 추출물을 처리한 군은 cisplatin에 의해 유도되는 caspase-3 protease 활성도를 유의하게 억제 하였다. 또한 cisplatin에 의한 PARP의 절단과 DNA 절단을 억제하였다.

최근에는 항암제의 독성에 대하여 정상세포의 선택적 보호 작용을 할 수 있는 세포 보호제가 집중적으로 연구되고 있는데, 그 약제로는 dexrazoxane, 및 amifostine, glutathion, mensa, ORG2766 등이 있다^{3,16)}.

이상의 결과는 위에서 언급한 세포보호제와 같이 산약보정방암탕 에탄올 추출물도 화학요법 치료시 나타나는 부작용을 완화시키는 제제로서 개발가능성을 시사한다 하겠다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(B050007)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 문구 외. 암 동서의 결합치료 1권. 익산, 원광대학교 출판국, pp 1-22, 255-258, 381-386, 413-419, 477,488, 1999.
2. 김용범 외. cisplatin을 포함한 항암화학요법 치료시 환자에서 발생하는 오심 및 구토에서의 정맥주사용 및 경구용 tropisetron과 ondansetron의 비교연구, 대한산부회지 41(10):2544-2550, 1998.
3. 이린화 외. 부인과 악성종양 환자에서 복합 항암화학요법에 따른 세포독성에 대한 amifostine의 임상효과에 관한 연구. 대한산부회지 44(11):1961-1967, 2001.
4. Y.M. Gonzalez, M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Perez. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. Mol. Pharmacol. 59, 657-663, 2001.
5. 신민교. 임상분초학. 서울, 영림출판사, pp 171-172, 1989.
6. Kim, M.J., Kim, H.N., Kang, K.S., Baek, N.I., Kim, D.K., Kim, Y.S., Jeon, B.H., Kim, S.H. Methanol extract of Dioscoreae Rhizoma inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. International Immunopharmacology 4, 1489-1497, 2004.
7. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254, 1976.
8. 白承學. 消積白朮散의 항암효과 및 cisplatin 부작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원, 1991.
9. 황영희 외. cisplatin의 신독성에 관한 연구. 영남의대학술지 9(2):327-333, 1992.
10. 분자암학회 한국유전자이식 연구재단. 화학적 암 예방. 서울,

고려의학, pp 142-162, 2000.

11. Goldberg, Y.P. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genetics* 13, 442-449, 1996.
12. Kim, T.W., Warren, H., Jung, Y.K., Kovacs, D., Tanzi, R. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 277, 373-376, 1997.
13. Takahashi, A. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 93, 8395-8400, 1996.
14. Lazebnik, Y.A. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
15. Wang, Z.Q. Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* 9, 509-520, 1995.
16. 박지욱 외. 진행된 난소암의 복강내 cisplatin 함암화학요법. *대한산부회지* 36(10):3635-3641, 1993.