

## 二妙散에 의한 대장암 세포주 HCT116의 Caspases 활성화를 매개로 한 세포사멸

김선모, 윤현정, 이현우, 김판준, 이창현, 박원환, 박선동\*  
동국대학교 한의과대학 방제학교실

### ABSTRACT

### Imyosan induces caspases-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells

Kim Sun Mo, Yun Hyun Jeung, Lee Hyun Woo, Kim Pan Jun, Lee Chang Hyun,  
Park Won Hwan, Park Sun Dong

Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

The purpose of this study was to investigate the effect of Imyosan on apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. *Phellodendron amurense* Rupr. and *Atratyloides lancea* D.C. compose Imyosan. First of all, to study the cytotoxic effect of methanol extract of Imyosan (IMS-MeOH) on HCT116 cells, the cells were treated with various concentrations of IMS-MeOH and then cell viability was determined by XTT reduction method. IMS-MeOH reduced viability of HCT116 cells in a dose and time-dependent manner. 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 caspase-3, procaspase-8 and procaspase-9 were examined by western blot analysis. IMS-MeOH decreased procaspase-3,

- 
- 교신저자 : 박선동
  - 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실
  - Tel : 054-770-2654 E-mail : sundong@dongguk.ac.kr
  - 접수 : 2006/ 11/ 25 채택 : 2006/ 12/ 9

procaspase-8 and procaspase-9 levels in a dose-dependent manner and induced the cleavage of PARP. IMS-MeOH triggered the mitochondrial apoptotic signaling by increasing the release of cytochrome *c* from mitochondria to cytosol. Furthermore, IMS-MeOH also downregulated the anti-apoptotic Bcl-2 and upregulated the pro-apoptotic-Bax. Therefore, these results suggest that IMS-MeOH induced HCT116 cell death through the mitochondrial pathway. To explore whether the activities of caspases was required for induction of apoptosis by IMS-MeOH, caspase-3, -8, -9 activity measured by using substrates, respectively. IMS-MeOH increased caspase-3, -8, -9 activity. Co-treatment with inhibitors of caspase-3, -8, -9 and IMS-MeOH significantly blocked IMS-MeOH-triggered apoptosis in HCT116 cells. These results suggest that IMS-MeOH induces caspases-mediated apoptosis.

**Key word** : Imyosan, apoptosis, caspase activity

## 1. 緒 論

대장암은 미국에서 암에 의한 사망에 있어 폐암에 이어 2위를 차지하고 있다. 매년 152,000명이 발생하고 57,000명이 사망하는 것으로 알려지고 있다. 대장암은 일반적으로 50세 이후에 발생한다. 대장암의 대부분 원인으로는 환경적 인자들이 관련되어 보인다. 본 질환은 도시에 거주하는 사회 환경학적으로 상류층에서 더 흔하게 발생한다. 여러 지역에서 실시한 역학적 연구에서 대장암에 의한 사망과 열량 중 단위 capita소모량, 육류단백질, 지방, 혈중 콜레스테롤 수치나 관상동맥질환에 의한 사망률 간에 직접적인 관계를 보여주고 있다<sup>1)</sup>.

한의학에서의 대장암은 腸毒, 積聚, 腸風, 下痢, 腸覃 등의 범주에 속하는 것으로 대부분 병인을 '濕熱'로 간주하는데, 설사와 변비가 교대로 발생하고 대변에는 점액과 혈액이 혼재되어 있다. 아

울리 결장경색증상과 더불어 야위고 빈혈이 생기거나 체중이 감소하고 복진상 덩어리가 만져지는 등의 증상이 수반된다<sup>2)</sup>.

二妙散은 蒼朮 (Atractylodis Rhizoma)과 黃柏 (Phellodendri Cortex)이 각각 같은 양으로 구성되어 가루약으로서 한번에 3-5g씩 복용하거나 또는 물에 끓여서 복용한다고 [丹溪心法]<sup>3)</sup>에 기록된 이후 알려진 처방이다. 清熱燥濕하는 효능으로 濕熱의 走注로 筋骨이 동통하거나 혹은 濕熱이 下注하여 兩足이 痿軟無力하고 足膝이 紅腫熱痛, 혹은 濕熱로 인한 帶下 또는 下部濕瘡, 小便短黃, 舌苔黃膩 등의 증상을 치료한다<sup>4)</sup>. 현대연구에 의하면 두 약물을 동시에 사용하면 항균, 해열, 이노, 진정작용을 나타낸다고 하였다. 또한 임상적으로는 각기병, 요슬관절통, 습열대하, 세균성이질, 급성전염성황달형간염, 급성신우신염, 주기성마비 등에 활용된다<sup>5)</sup>.

한편 국내 실험적 연구로는 二妙散이 抗류마티

증 효능이 있다는 연구만이 있을 뿐<sup>6)</sup> 대장암 세포주에서 二妙散이 어떻게 Apoptosis를 유도하는지에 대한 자료는 확인되지 않았다. 이에 본 실험에서는 사람 대장암 세포주인 HCT116을 이용하여 二妙散의 메탄올 추출물의 항암 효과를 조사하였다. 먼저, 세포독성여부를 확인하기 위하여 XTT assay를 수행하였고, apoptosis (programmed cell death)가 유도되는 지 확인하기 위하여 apoptosis에 관련된 단백질의 발현 양상을 western blot을 통해 알아보았다. 또한 caspase-3, -8, -9의 activity 측정을 통해 apoptosis의 기전에 관하여 조사한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 본초학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 二妙散의 구성 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. 이 분말은 세포배양액인 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM)에 녹여 (IMS-MeOH) 사용하였다.

Table. 1. Composition and contents of lmyosan

	학명	사용량 (g)
황백	<i>Phellodendron amurense Rupr.</i>	250
창출	<i>Atratyloides lancea D.C.</i>	250
Total		500
수율		15.2 %

### 2) 시약

Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서, 배양조는 Corning사 (Rochester, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고 NP-40, CAPS, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 anti-procaspase-3, anti-procaspase-8, anti-procaspase-9, anti-Bax는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서, anti-Bcl-2와 anti-cytochrome c는 BD PharMingen사 (San Jose, USA)에서, anti-PARP, anti-beta-actin은 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 Anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Caspase activity 측정에 사용된 Ac-DEVD-CHO (caspase-3 저해제), Z-IETD-FMK (caspase-8 저해제), Z-LEHD-FMK (caspase-9 저해제)는 R&D System사에서 구입하였다. XTT assay용 kit는 Amersham Pharmacia Biotechnology사 (Arlington Heights, USA)에서 구입하였고, protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 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 배

지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다.

## 2) XTT assay

二妙散의 추출물이 HCT116에 대한 세포독성을 갖는 지 알아보기 위해 XTT assay 방법<sup>7)</sup>을 이용하였다. Well당 5×10<sup>4</sup>개의 cell을 96 well plate에 분주하고 24시간동안 배양한 다음 serum free media로 16시간 starvation 시킨 후, 각 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Well당 100 μl의 XTT labeling mixture (5 ml XTT labeling reagent + 0.1 ml electron coupling reagent)를 처리하여 4시간 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

## 3) Caspase-3, -8, -9 activity assay

60 mm 배양조에 1×10<sup>5</sup> 개의 세포를 심고 24시간 배양한 후 serum free media로 교체하여 16시간동안 starvation시켰다. 二妙散의 메탄을 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포를 모아 lysis buffer를 넣은 다음 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 4°C, 13,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 모은다. 96 well plate에 각각의 sample을 10 μl씩 loading하고 75-85 μl의 반응액을 넣은 후, caspase-3, -8, -9의 저해제 (Ac-DEVD-CHO, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK)를 첨가한다. 여기에 caspase-3, -8, -9 각각의 substrate인 Ac-DVED-pNA, Z-IETD-pNA, Z-LEHD-pNA를 넣고 assay buffer를 첨가하여 37°C에서 12시간 이상 반응시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 4) Cytochrome c release analysis

二妙散의 메탄을 추출물을 처리한 세포를 ice-cold PBS로 두차례 수세하여 원심분리를 통해

모은 후, lysis buffer (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin, and 10 μg/ml aprotinin)를 넣고 pipeting을 통해 세포를 풀어준 다음 4°C에서 30분간 반응시킨다. Homogenator를 이용하여 세포를 균질화시킨 후 4°C, 1,200 ×g에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 따서 다시 4°C, 100,000 ×g에서 1시간 동안 원심분리한다. 얻어진 상층액으로 12.8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행한 후, cytochrome c 항체를 사용한 immunoblotting을 통해 세포질로 방출되는 cytochrome c를 분석하였다.

## 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 상층액을 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 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 수세한 다음, 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

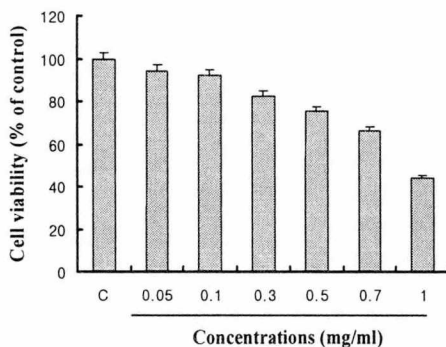
실험결과는 평균과 표준 편차로 표현하고 유의성 검증은 Sigma Plot 2001 (Window용 version 7.0)을 이용하여 unpaired *t-test*를 실시하였다.

## III. 實驗結果

### 1. 二妙散의 메탄올 추출물의 HCT116 세포의 생존율에 미치는 영향

二妙散의 메탄올 추출물을 처리 한 경우 사람 대장암 세포주인 HCT116 의 증식에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 다양한 농도 (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml)로 24시간 처리한 후 XTT assay를 수행하였다. 그 결과, 처리농도에 의존적으로 세포생존율이 저해되는 것을 볼 수 있었다. Fig. 1(A)에서 볼 수 있듯이 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml의 농도에서 각각 82.2%, 75.4%, 66.6%까지 세포생존율이 감소되었고 1 mg/ml의 고농도에서는 44.4%까지 감소되었다. 세포의 생존율을 50%까지 저해하는 농도 (IC<sub>50</sub>)인 0.7 mg/ml을 세포에 처리한 후 0~48시간까지 반응시켜 세포생존율의 변화를 알아보았다. 12시간 처리 시 69.7%까지, 24시간 처리 시에는 52.3%까지 저해되었다 (Fig. 1(B)).

(A)



(B)

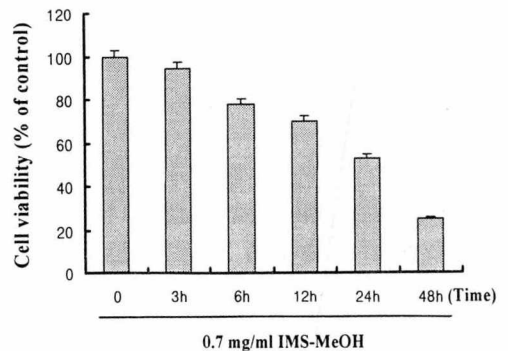


Fig. 1. Effect of IMS-MeOH on the cell viability of the HCT116 cells.

HCT116 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of IMS-MeOH for 24 h (A) and various time (0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24h, 48 h) with 0.7 mg/ml IMS-MeOH (B). Cell viability was measured by XTT assay as described in materials and methods. Data were chosen from five independent triplicate experiments

### 2. 二妙散의 메탄올 추출물에 의한 HCT116의 세포사멸

二妙散의 메탄올 추출물에 의해 HCT116세포의 증식이 저해되는 것이 apoptosis에 의해 유도되는 것인지 알아보았다. 二妙散의 메탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 세포내의 apoptosis 과정에 관여하는 단백질의 발현 및 활성을 조사함으로써 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. Apoptosis에 관련된 단백질들의 발현 양상을 조사하기 위하여 각각의 항체를 이용하여 western blot을 수행하였다. Procaspase-3, -8, -9의 발현양상을 조사함으로써 caspase의 활성화 정도를 알아보고 apoptosis의 지표인 PARP의 cleavage를 관찰하였다. 그 결과, 0.3 mg/ml의 농도에서 PARP의 cleavage가 관찰되기 시작하였고 그 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한 procaspase-3, procaspase-8, procaspase-9의 발현이 농도 의존적

으로 점차 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2).

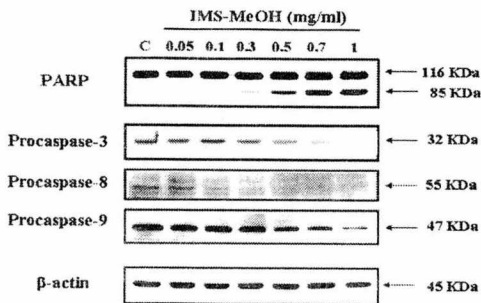


Fig. 2. Apoptotic effect of IMS-MeOH in HCT116 cells.

HCT116 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of IMS-MeOH for 24 h. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 10% SDS-PAGE. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase-3, -8, -9 were detected by Western blot. β-actin levels were used as internal markers for loading variation.

### 3. Mitochondrial pathway를 통한 세포사멸

二妙散의 메탄올 추출물에 의해 유도되는 세포사멸이 세포내 어떠한 신호전달을 통해 일어나는지 알아보기 위하여 세포사멸의 경로 중 하나인 mitochondrial pathway에 관여하는 Bcl-2와 Bax의 발현양상과 cytochrome *c*가 mitochondria로부터 세포질로 방출되는 정도를 알아보았다. 그 결과, Fig. 3에서 보듯이 처리한 二妙散의 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포질내의 cytochrome *c*의 양이 점차 증가하였다. 또한, 농도 의존적으로 antiapoptotic Bcl-2가 감소하였고 proapoptotic Bax가 증가됨으로서 Bcl-2와 Bax의 비 (ratio)를 나타내는 Bcl-2/Bax 값이 점차 낮아질 것으로 보인다. 이러한 결과로 보아, 二妙散의 메탄올 추출물에 의한 apoptosis는 mitochondrial pathway를 경유하는 것으로 볼 수 있었다.

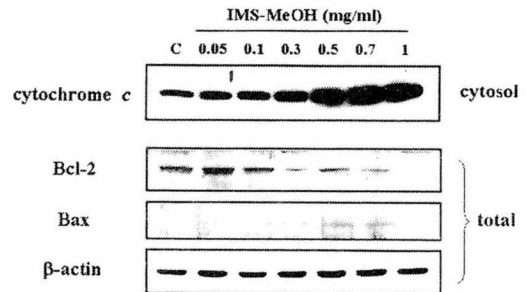


Fig. 3. Effect of IMS-MeOH on cytochrome *c* release from mitochondria to cytosol and the expression of Bcl-2 and Bax in HCT116 cells.

Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of IMS-MeOH for 24 h. 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. β-actin levels were used as internal markers for loading variation.

### 4. 二妙散의 메탄올 추출물에 의한 caspase-3, -8, -9의 활성변화

二妙散의 메탄올 추출물에 의해 HCT116의 세포사멸 유도 시 procaspase-3, -8, -9의 발현이 감소되는 것을 관찰하였다. 이에 caspases의 활성화를 매개로 apoptosis가 유도되는 것인지 확인하기 위하여 caspase-3, -8, -9의 activity를 측정하였다. 二妙散의 메탄올 추출물을 농도별로 24시간 동안 처리한 후, 각각의 substrate를 이용하여 caspase-3, -8, -9의 activity를 측정한 결과, 농도 의존적으로 caspase-3, -8, -9의 activity가 증가하였다 (Fig. 4).

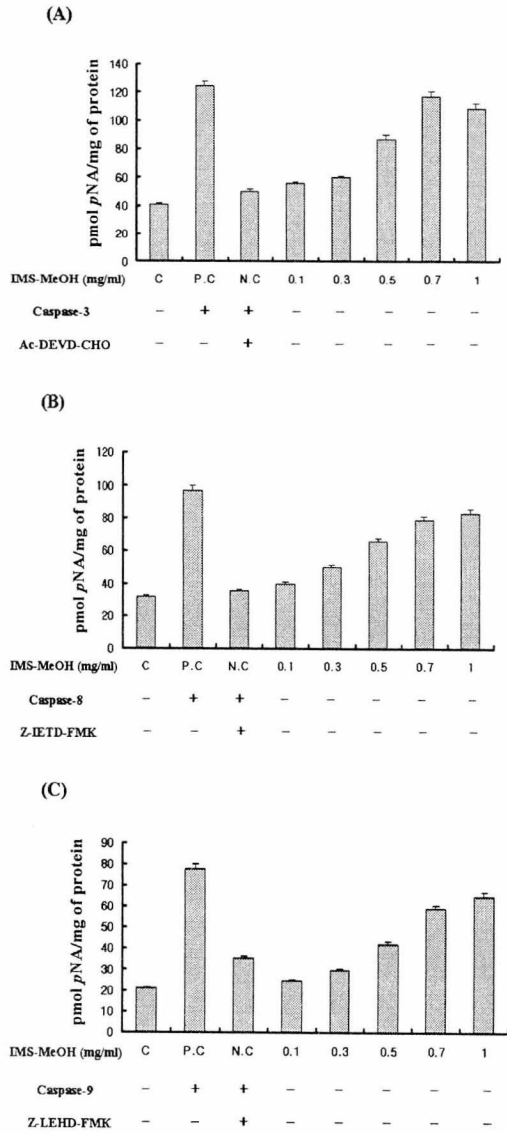


Fig. 4. Analysis of caspase-3, -8, -9 activities.

Caspase-3 substrate (Ac-DEVD-pNA) cleaved by caspase-3 was measured at 405 nm. Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) of MeOH-RP for 24 h. Ac-DEVD-CHO (caspase-3 inhibitor), Z-IETD-FMK (caspase-8 inhibitor), Z-LEHD-FMK (caspase-9 inhibitor) were used as a negative control, respectively. Three separate experiments were done. Results are presented as

mean±S.D.

5. Caspase-3, -8, -9의 활성 저해가 二妙散의 메탄올 추출물에 의해 유도되는 세포사멸에 미치는 영향

Caspase-3의 특이적인 저해제인 Ac-DEVD-CHO와 caspase-8의 특이적 저해제인 Z-IETD-FMK, caspase-9의 특이적 저해제인 Z-LEHD-FMK를 二妙散의 메탄올 추출물과 함께 처리하여 세포 생존율의 변화와 세포사멸이 진행되는 정도를 알아보았다. Fig. 5(A)에서 보듯이 각각의 저해제를 함께 처리한 경우에는 二妙散의 메탄올 추출물에 의해 나타나는 PARP의 cleavage가 감소되는 것을 확인할 수 있다. 또한 XTT assay를 통해 조사해 본 결과, 각각의 caspases의 저해제를 처리한 경우 二妙散의 메탄올 추출물에 의한 저해되는 세포 생존율 감소가 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 5(B)). 이러한 실험 결과로 보아 二妙散의 메탄올 추출물에 의한 세포사멸이 caspases를 매개로 하는 것임을 알 수 있었다.

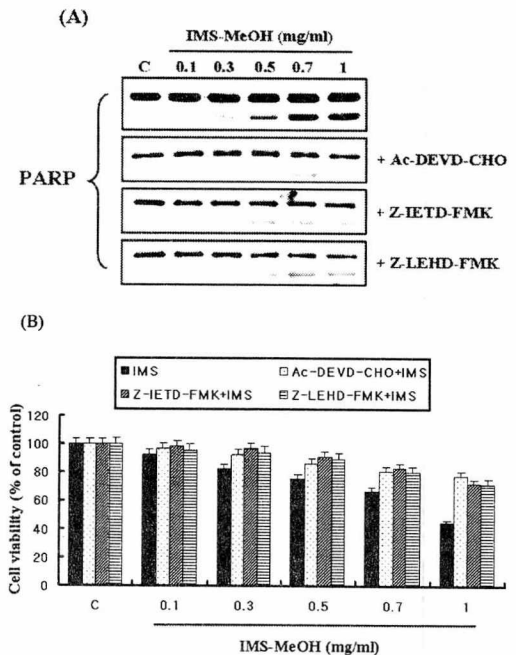


Fig. 5. Effect of caspase-3, -8, -9 inhibitors on IMS-MeOH-induced cell death.

HCT116 cells were pretreated with caspase-3 (Ac-DEVD-CHO), -8 (Z-IETD-FMK), -9 (Z-LEHD-FMK) inhibitors, respectively. And then the cells were treated with various concentrations (0~1 mg/ml) of MeOH-RP for 24 h. The cleavages of PARP were detected by Western blot and the activities of caspase-3, -8, -9 were determined by a microplate reader ( $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ).

#### IV. 考 察

二妙散은 蒼朮 (Atractylodis Rhizoma)과 黃柏 (Phellodendri Cortex)이 각각 같은 양으로 구성되어 가루약으로서 한번에 3-5g씩 복용하거나 또는 물에 끓여서 복용한다고 [丹溪心法]<sup>3)</sup>에 기록된 이후 알려진 처방이다. 현대연구에 의하면 두 약물을 동시에 사용하면 항균, 해열, 이뇨, 진정작용을 나타낸다고 하였다. 또한 임상적으로는 각기병, 요슬관절통, 습열대하, 세균성이질, 급성전염성황달형간염, 급성신우신염, 주기성마비 등에 활용된다<sup>5)</sup>.

처방중의 黃柏은 苦寒하여 淸熱燥濕하고 오직 하초로 작용하여 濕熱下注의 證을 치료하고, 蒼朮은 苦溫하여 燥濕健脾케 한다. 이와 같이 두 약물을 합용하면 淸熱하나 脾陽을 손상하지 않고, 燥濕하나 助火하지 않아 淸熱燥濕하는 효능을 갖추게 되므로 濕邪가 사라지게 되고, 열이 제거되어 諸症이 스스로 제거하게 된다<sup>4-5)</sup>.

창출은 국화과에 속한 다년생 초본으로 뿌리줄기를 건조한 것으로 우리나라에는 삼주 Atractylodis japonica KOIDZ.로서 시중에서 창출로 사용된다. 주성분은 정유로서 beta-eudesmol, hinesol, atractylodin, atractylone, atractyloside 등이다. 이 외에 비타민 A류 물질, 비타민 B를 함유하고 있다. 약리작용으로는 혈당강화작용과 전해질대사에서 요중  $\text{Na}^+$ 의 농도, 배출률 및  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

수치를 뚜렷하게 증가시키며, 진정, 항경련작용이 있다. 또한 해독, 이담작용을 하며, 항궤양작용과 혼중소독작용이 있다.

황백은 운향과에 속한 낙엽교목인 황백나무 Phellodendron amurense RUPRECHT 또는 기타 동속식물의 주피를 벗긴 수피를 건조한 것이다. 황백은 여러 종류의 alkaloids를 함유하며, 주성분은 berberine이다. 기타 alkaloids로는 palmatine, jatrorrhizine, phellodendrine, menisperine, candicine, magnoflorine 등이 있으며 이 외에 limonene과 obacunone을 함유한다. 약리작용으로는 주성분인 berberine이 황련과 같이 항균, 항바 이러스, 해독, 해열, 소염, 면역증강작용이 있으며, 항부정맥 및 혈압강하, 혈소판 응집 억제작용이 있으며, 그리고 혈당강하 및 항암작용이 있다<sup>8)</sup>.

이 두가지 약물로 구성된 二妙散을 기초로 활용한 처방은 임상적으로 다양한데, 대표적으로 濕病의 범주에 속하는 각기병에 淸熱瀉濕湯, 역질풍에 疎風活血湯이 그것이다. 또한 두통에서도 淸上瀉火湯, 半夏白朮天麻湯 등이 二妙散을 기초로 구성되어 임상적으로 활용되고 있다. 그리고 內托羌活湯과 人蔘黃耆湯은 癰疽치료에 활용되는데 이 또한 二妙散을 기초로 구성되어 있음을 알 수 있다. 이외에도 諸瘡, 內傷, 안과, 諸疝, 鼻塞, 暑病補氣, 구토, 胃風證, 女勞疽, 癱木, 虛火耳鳴, 木腎, 그리고 陰虛火動에서도 본방을 기초로 활용한 처방들이 많다<sup>9)</sup>.

본 실험에서는 二妙散이 사람 대장암 세포주인 HCT116의 세포사멸에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 먼저, HCT116 세포에 대한 二妙散의 독성효과를 조사하기 위하여 二妙散의 메탄올 추출물을 농도별, 시간별로 처리한 후 XTT assay를 수행하여 세포 생존율의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 농도의존적으로 세포생존율의 감소가 나타났다.  $\text{IC}_{50}$  값인 0.7 mg/ml을 48시간까지 처리한 경우 처리시간에 의존적으로 세포생존율의 감소가 관찰되었고 24시간째에 52.3%까지 생존율이 감소



하였다 (Fig. 1). 이러한 二妙散의 메탄을 추출물에 의한 세포 생존율의 감소가 apoptosis에 의한 것인지 알아보았다.

Apoptosis는 능동적이고 자발적인 반응으로 programmed cell death라고 표현하기도 한다. 1972년 Kerr 등이 쥐 유방암 세포가 죽는 것을 관찰한 후 이를 shrinkage necrosis라고 표현하였는데, 그 후 그리스어인 apo (off)와 ptosis (falling)의 합성어로서 apoptosis라고 처음 명명하게 되었다. 정상적인 조직에서 apoptosis의 조절에 이상이 생기게 되면 세포의 증식과 사멸의 균형이 깨어지게 됨으로써 악성 종양으로 변형된다<sup>10-12)</sup>. 따라서 암세포의 apoptosis를 인위적으로 유도함으로써 세포의 증식을 억제할 수 있다. 세포는 apoptotic 자극에 의해 세포사멸이 유도되는 과정동안 회복 기능을 상실하게 되는데, 여기에 중요한 polymerase가 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)이다. 따라서 PARP의 cleavage는 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다<sup>13-14)</sup>. 또한 cystinyl aspartate-specific protease (caspases)로 외부의 자극이 없는 경우에 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<sup>15-17)</sup>. 이에 본 실험에서는 二妙散의 메탄을 추출물을 처리한 경우 apoptosis에 관여하는 단백질들의 발현양상을 조사하기 위하여 PARP와 procaspase-3, -8, -9의 각각의 항체를 이용하여 western blot을 수행한 결과 농도의존적으로 PARP의 cleavage 증가와 procaspase-3, -8, -9의 감소가 관찰되었다 (Fig. 2). 또한 세포질로 방출되는 cytochrome *c*<sup>18-19)</sup>의 증가와 이러한 방출을 막는 antiapoptotic Bcl-2<sup>20-21)</sup>가 감소되는 것으로 나타났다. 또한 proapoptotic Bax<sup>22)</sup>가 농도의존적으로 증가하였다 (Fig. 3). 이로써 二妙散의 메탄

을 추출물에 의해 apoptosis가 유도되며 이는 mitochondrial pathway를 통해 일어난다는 것을 알 수 있었다.

二妙散의 메탄을 추출물에 의해 procaspase-3, -8, -9의 발현이 감소되는 것으로 보아 caspases의 활성화를 통해 apoptosis가 매개되는 것인지 알아보기 위해 caspase-3, -8, -9의 activity를 측정<sup>23-25)</sup>한 결과, 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 caspase-3, -8, -9의 activity가 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이에 각각의 특이적 저해제를 추출물과 함께 처리한 후 세포생존율과 apoptosis에 어떠한 변화가 있는지 알아보았다. Fig. 5에서 보듯이 추출물에 의한 세포생존율의 감소가 억제되는 것으로 관찰되었고, 또한 PARP cleavages가 감소되는 것으로 보아 二妙散의 메탄을 추출물에 의한 세포사멸이 저해되는 것을 알 수 있었다.

이러한 실험결과들로 보아, 二妙散의 메탄을 추출물은 대장암 세포주인 HCT116의 apoptosis를 유도할 수 있으며, 이는 mitochondria를 경유하며, 또한 caspases를 매개로 한 apoptosis임을 알 수 있었다. 이로써 二妙散이 대장암 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 보이며 앞으로 더 많은 실험을 통하여 이에 관여하는 분자적 기전에 대해 알아보아야 할 것이다.

## V. 結 論

창출과 황백을 1:1로 배합한 二妙散의 메탄을 추출물이 사람 대장암 세포주 HCT116에 어떠한 영향을 주는 지 알아보았다.

1. XTT assay를 수행하여 二妙散의 메탄을 추출물에 의한 HCT116 세포 생존율의 억제 효과를 확인하였다. 추출물의 처리농도와 처리시간에 의존적으로 세포의 생존율이 저해되는 것으로 나타났다.

2. Apoptosis의 지표가 되는 PARP와 caspases의 발현양상을 조사하기 위하여 각각의 항체를 사용하여 western blot을 수행한 결과, 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 PARP의 cleavages가 관찰되었고 procaspase-3, -8, -9의 발현이 감소하는 것을 볼 수 있었다.
3. 추출물에 의한 apoptosis의 경로를 알아보기 위해 mitochondrial pathway에 관여하는 Bcl-2, Bax, cytochrome c의 발현양상을 조사한 결과, 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 mitochondria로 부터 세포질로 cytochrome c의 방출량이 증가하였고, anti-apoptotic Bcl-2의 감소와 pro-apoptotic Bax의 증가가 관찰되었다.
4. 二妙散의 메탄올 추출물에 의한 apoptosis가 caspases를 매개로 한 것인지 확인하기 위해 각각의 substrate를 이용하여 caspase-3, -8, -9의 activity를 측정한 결과, 농도가 증가함에 따라 caspases의 activity가 증가하였다. 또한 caspase-3, -8, -9의 특이적인 저해제인 Ac-DEVD-CHO, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK를 각각 二妙散의 메탄올 추출물과 함께 처리한 경우 二妙散의 메탄올 추출물에 의한 세포의 생존을 감소가 억제되었고 apoptosis도 저해되는 것을 확인하였다.

이 같은 결과로 보아, 二妙散의 메탄올 추출물은 대장암 세포주인 HCT116의 생존율을 감소시키고 mitochondrial pathway를 통한 apoptosis를 유도할 수 있으며, 또한 caspases를 매개로 하여 apoptosis를 유도하는 것으로 생각된다.

### 감사의 글

-본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임.

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

-본 연구는 2005학년도 동국대학교 연구년 지원에 의하여 이루어졌음.

### 참고문헌

1. 해리슨내과학편찬위원회. 내과학. 정담. 서울. p1531, 1997.
2. 김갑성의 7인. 실용동서의학임상총서1. 정담. 서울. p624, 2001.
3. 주진형. 단계심법. 북경시중국서점출판. p264, 1986.
4. 김상찬외 10인. 방제학. 도서출판 영림사. 서울. p500-501, 1990.
5. 宗全和1. 中醫方劑通釋 권1. 하북과학기술출판사. 중국. p61-163, 1995.
6. 임창경. Anti-rhenmatiod arthritis effects of I-Myo-San water extract. 원광대박사학위. 2003.
7. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography mass spectrometry. J Dent. 26:137 - 145, 1998.
8. 김호철. 한약약리학. 집문당. 서울. p134-140, p209-211, 2004.
9. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 의성당. 서울. p132-145, 1998.
10. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia. Feb;18(2):189-218, 2004.

11. Liu Y, Kulesz-Martin M. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Carcinogenesis*. Jun;22(6):851-860, 2001.
12. Capello F, Branes L. Synovial sarcoma and malignant mesothelioma of the pleura: review, differential diagnosis and possible role of apoptosis. *Pathology*. May;33(2):142-148, 2001.
13. Thoren FB, Romero AI, Hellstrand K. Oxygen Radicals Induce Poly(ADP-Ribose) Polymerase-Dependent Cell Death in Cytotoxic Lymphocytes. *J Immunol*. Jun;176(12):7301-7307, 2006.
14. Ilnytska O, Lyzogubov VV, Stevens MJ, Drel VR, Mashtalir N, Pacher P, Yorek MA, Obrosova IG. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Alleviates Experimental Diabetic Sensory Neuropathy. *Diabetes*. Jun;55(6):1686-1694, 2006.
15. Prunet C, Lemaire-Ewing S, Menetrier F, Neel D. Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7beta-hydroxycholesterol-induced cell death: A morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol*. Nov;19(5):311-326, 2005.
16. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*. Aug;13(8):1979-1987, 2004.
17. Kreuter M, Langer C, Kerkhoff C, Reddanna P, Kania AL, Maddika S, Chlichlia K, Bui TN. Stroke, myocardial infarction, acute and chronic inflammatory diseases: caspases and other apoptotic molecules as targets for drug development. *Arch Immunol Ther Exp*. May;52(3):141-155, 2004.
18. 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):984-990, 2006.
19. Xi L., Chen G., Zhou J., Xu G., Wang S., Wu P., Zhu T., Zhang A., Ma D. Inhibition of telomerase enhances apoptosis induced by sodium butyrate via mitochondrial pathway. *Apoptosis* 9, 2006.
20. Bayir H, Fadeel B, Palladino MJ, Witasp E, Kurnikov IV, Tyurina YY, Tyurin VA, Amoscato AA, Jiang J, Kochanek PM, Dekosky ST, Greenberger JS, Shvedova AA, Kagan VE. Apoptotic interactions of cytochrome c: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. Mar:[Epub ahead of print], 2006.
21. Mihara K. Regulation of mitochondrial biogenesis and morphogenesis. *Fukuoka Igaku Zasshi*. Jan;97(1):8-14, 2006.
22. Dumay A, Laulier C, Bertrand P, Saintigny Y, Lebrun F, Vayssiere JL, Lopez BS. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene*. May;23(22):3196-3205, 2006
23. Mao WP, Ye JL, Guan ZB, Zhao JM, Zhang C, Zhang NN, Jiang P, Tian T. Cadmium induces apoptosis in human embryonic kidney (HEK) cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Toxicol In Vitro*. Sep;14:[Epub ahead of print], 2006.
24. Fauvet R, Dufournet C, Poncelet C, Uzen C, Huqol D, Darai E. Expression of

pro-apoptotic (p53, p21, bax, bak and fas) and anti-apoptotic (bcl-2 and bcl-x) proteins in serous versus mucinous borderline ovarian tumours. *J Surg Oncol*. Dec:92(4):337-343, 2005.

25. Lin HI, Lee YJ, Chen BF, Tsai MC, Lu JL,

Chou CJ, Jow GM. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*. 2005 Dec:230(2):248-259, 2005.