

Original article

加味八味丸의 elastase 유도성 A549 세포사멸에 대한 보호효과

오지석, 박양춘

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Protective Effects of *Gamipalmi-hwan* on Elastase-induced Apoptosis of A549 Cells

Ji-Seok Oh, Yang-Chun Park

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objective: This study aimed to evaluate the protective effects of *Gamipalmi-hwan* (GPH) on elastase-induced lung cell injury.

Materials and Methods: As an *in vitro* model of emphysema, the current study was performed to investigate potential activity of GPH in regulating injury responses of A549 human type II cell line mediated by elastase treatment.

Results: GPH treatment increased the number of A549 cells which was reduced by elastase digestion. Elastin protein level, which was reduced by elastase treatment, was increased by GPH treatment. Labeling intensity with caspase 3 protein in elastase-treated cells was reduced by GPH treatment. Both Erk1/2 and Cdc2 protein levels, which were decreased by elastase treatment, were increased to a level similar to that of the normal cells. mRNA levels encoding IL-1 β and TNF- α were increased by elastase and then down-regulated by GPH.

Conclusion: The present data suggest that A549 cells are subjected to inflammatory damage by elastase and can be recovered by GPH treatment. Further studies examining the protective activity of GPH in elastase-treated lung tissue would be useful for therapeutic strategies of emphysema treatment.

Key Words : *Gamipalmi-hwan* (Jiaweibawei-wan), emphysema, herbal medicine

서론

만성폐쇄성폐질환 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD)은 국내 유병률이 7.7%로 아주 높고, 사망률이 인구 십만 명당 14.5명으로 국내 10대 사망원인에 해당하는 주요 질환이다^{1,2)}. 또한 전 세계적으로도 장애보정손실연수(Disability Adjusted Life's Years)가 1990년 12위에서 2020년에는 5위로 올라설 것으로 예측되고 사망률도 3위에 이를 것으

로 추정되어 그 중요성이 점점 높아지고 있다^{3,4)}. 현재 COPD에 대한 약물치료는 증상 발현의 예방과 완화, 악화의 횟수와 중증도 감소, 건강 상태 향상, 운동 감내 능력 증진 등을 목적으로 시행되고 있다. 그러나 현존하는 어떤 약제도 폐기능이 장기간에 걸쳐 계속 감소되는 것을 완화시키지는 못하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 따라서 COPD의 경과를 개선할 수 있는 좀 더 안전하고 효과적인 제제 개발의 필요성이 높게 요구되고 있다.

• Received : 15 January 2010

• Revised : 2 March 2010

• Accepted : 2 March 2010

• Correspondence to : 박양춘(Yang-Chun Park)

충북 청주시 상당구 용담동 173-9 대전대학교청주한방병원 내과1

Tel : +82-43-229-3704, Fax : +82-43-253-8757, E-mail : omdpyc@dju.kr

COPD의 폐기종 양상은 韓醫學에서 咳而上氣하고 煩燥하는 肺脹證과 呼吸促急한 喘證의 범주에 속하는데, 주로 肺腎의 기능부족으로 인해 肺氣를 淸肅下降하는 생리기능의 장애에 기인한다고 보아 肺虛型은 益氣定喘하고 肺脾兩虛型은 健脾益氣하고 腎虛型은 補腎陰腎陽하는 처방을 사용한다⁶⁾.

加味八味丸은 命門火不足에 사용하는 八味丸⁷⁾에 補脾益胃하는 白朮, 補腎壯陽하는 淫羊藿, 菟絲子, 補骨脂, 胡桃肉, 止咳化痰平喘하는 杏仁, 蘇子, 蘿菔子, 百果, 消食健脾하는 神麩, 麥芽⁸⁾를 가하여 대전대학교부속한방병원 폐계내과에서 COPD를 비롯한 만성호흡기질환에 다용하고 있는 처방이다. 加味八味丸에 대한 기존의 연구로서 임 등⁹⁾은 호흡기 배상 세포의 뮤신 분비에 미치는 영향에 대한 연구에서 加味八味丸이 유의한 효과를 보이지 않았다고 보고하였다. 그러나 加味八味丸은 腎陽虛의 대표적인 처방인 八味丸에 溫腎助陽, 溫肺定喘하는 淫羊藿, 補骨脂, 菟絲子, 胡桃肉이 더해짐으로써 動作時 呼吸困難, 腰痛眩暈, 手足冷, 手足浮腫의 증상을 발하는 腎虛型 폐기종⁶⁾에 좀 더 부합하게 구성된 처방으로 점액조절에 대한 효과보다는 폐기종에 대한 실험에

서 의미 있는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대하였다.

이에 저자는 *in vitro* 배양세포 시스템에서의 폐기종에 대한 연구로서 폐포 세포주인 A549 세포에 elastase를 처리하여 세포 손상을 유도한 후 加味八味丸을 처리함으로써 세포증식 양상과 사멸양상 및 염증 반응성에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료와 방법

1. 재료

1) 세포주

실험에 사용된 A549 세포는 사람의 폐암에서 유래된 aneuploid cell line으로, 한국세포주 은행에서 구입하였다.

2) 加味八味丸의 구성과 추출

加味八味丸 (Gamipalmi-hwan, GPH)의 구성 약물은 (주)옴니허브에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며 1첩의 분량은 다음과 같다 (Table 1). 加味八味

Table 1. The Compositions of Gamipalmi-hwan (GPH)

構成藥物	生藥名	用量(g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	16.0
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8.0
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	8.0
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6.0
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6.0
白茯苓	<i>Poria</i>	6.0
白朮	<i>Atractylodis macrocephalae Rhizoma</i>	6.0
附子	<i>Aconiti iateralis preparata Radix</i>	4.0
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	4.0
淫羊藿	<i>Epimedii Herba</i>	4.0
菟絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	4.0
補骨脂	<i>Psoraleae Fructus</i>	4.0
胡桃肉	<i>Juglandis Semen</i>	4.0
杏仁	<i>Armeniacae Arrarum</i>	4.0
蘇子	<i>Perillae Fructus</i>	4.0
蘿菔子	<i>Raphani Semen</i>	4.0
神麩	<i>Massa medicata Fermentata</i>	4.0
麥芽	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4.0
白果	<i>Ginkgo Semen</i>	10.0
Total		110.0

丸 1첩 분량에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 여과하여 감압 증류장치 (Rotary evaporator, Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물을 냉동 (-84 °C) 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 加味八味丸의 초기 약재로부터 21.8 g의 추출물을 얻어 19.8 %의 수율을 나타내었다.

3) 시약

본 실험에 사용한 elastase는 Sigma에서 구입하였으며, 80 unit의 농도로 증류수에 녹여 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다. Anti-Elastin rabbit pAb (Calbiochem, USA), cleaved caspase-3 (Cell signaling, USA), fluorescein goat anti-mouse IgG (Invitrogen, USA), rhodamine red-X goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA), Hoechst 33258 (Invitrogen, USA), anti-cyclin B1 developed in rabbit IgG fraction of antiserum (Sigma, USA), p-Erk 1/2 (Cell Signaling, USA), total Erk1/2 (Cell Signaling, USA), actin (MP Biomedicals, USA), goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

A549 세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)과 penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 media (Lonza, USA)로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Cell은 75 cm² flask (SPL, Korea)에서 충분히 증식시킨 후, 3일 간격으로 계대 배양하였다.

2) MTT assay

MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 환원법을 이용하여 측정하였다. 먼저 96 well plate에 1 × 10⁵ 개의 A549 세포를 plating하고, 加味八味丸을 농도별 (0.01 - 1 mg/ml)로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동

안 배양하였다. 각 well에 MTT solution을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{정상군의 흡광도}} \times 100$$

3) 면역형광염색

이중 면역형광 염색법 (double immunofluorescence staining)을 수행하기 위해, 유리 coverslip을 poly-L-ornithine (0.1 mg/ml, Sigma, USA)과 laminin (0.02 mg/ml, Collaborate Research, USA)을 혼합하여 실온에서 pre-coating 하였다. 1 × 10⁵ 개의 A549 세포를 pre-coating된 coverslip에 plating하고, (i) 정상군 (식염수), (ii) elastase (2unit), (iii) elastase와 加味八味丸 0.3 mg/ml 또는 5 mg/ml 처리군으로 나누어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양하였다. Coverslip 표면에서 자란 세포의 비특이적 결합을 막기 위해 blocking buffer에 담근 후 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 1:500의 비율로 혼합하여 처리한 후, 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 PBST (PBS plus 0.1% triton X-100)로 조직을 씻어내고, 2.5% BSA, 2.5% horse serum을 함유하고 있는 blocking buffer에 Fluorescein-goat anti-mouse (green)와 Rhodamine-goat anti-rabbit antibody (red)를 1:400으로 혼합하여 암실에서 1시간 30분 동안 2차 항체 처리를 수행하였다. 2차 항체 처리 후 3회에 걸쳐 PBST로 세척을 수행하였다. Hoechst 핵 염색을 수행하는 경우 2회 세척 후 0.25% Hoechst 33258 염료를 함유한 PBST 용액으로 처리 후 다시 PBST 용액으로 세척하였다. 면역 염색된 세포들은 형광현미경 (Zeiss fluorescent microscope)을 통해 관찰하였고, 디지털 카메라로 찍은 모든 images는 Adobe Photoshop (version 5.5)을 이용하여 green과 red의 밝기와 강도를 같은 비율로 증폭시켜 관찰하였다. 그리고 Photoshop program의 Layer blending

mode options를 이용하여 images를 중복시켜 관찰함으로써 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다.

4) Western blot 분석

A549 세포를 60 mm culture dish에 2 × 10⁵ cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군 (식염수), (ii) elastase (2unit), (iii) elastase와 加味八味丸 0.3 mg/ml 또는 5 mg/ml 처리군으로 나누어 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양한 A549 세포는 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50 - 200 μl의 triton lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β-glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1% Triron X-100, 10% glycerol, 5 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml aprotinin, 2 μM benzamidine, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담가 초음파 분해하였다. 그 후 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10 μg의 단백질을 western analysis에 사용하였다. 정량한 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel (1.5M Trizma base, 10% sodium dodecyl sulfate, 30% acrylamide, 10% ammonium sulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane (Pall Corporation, USA)에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA), 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응시키고 4℃에서 16시간 동안 blocking buffer 상에서 반응을 진행하였다. 반응을 끝낸 membrane을 washing한 후 1차 항체를 blocking buffer (1 × TBS buffer, 3% BSA, 0.1% Tween 20)에 1:1000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안

반응시켰다. 이후 membrane을 씻어내고 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz biotechnology, USA) 또는 anti-mouse IgG (Santa Cruz biotechnology, USA)가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1:1000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리하고 다시 한 번 씻어냈다. 마지막으로 membrane에 부착된 단백질을 western blotting detection system을 이용하여 측정하였으며 Kodak Scientific Imaging Film (Eastman Kodak Co, USA)에 감광하였다.

5) RNA 분리 및 RT-PCR

A549 세포를 60 mm culture dish에 2 × 10⁵ cells/ml 로 분주한 후 (i) 정상군 (식염수), (ii) elastase (2unit), (iii) elastase와 加味八味丸 0.5 mg/ml 처리군으로 나누어 각각 6시간, 24시간 동안 배양하였다. RNA는 약재 처리 후 6시간, 24시간 뒤에 easy-BLUE 시약 (iNtRon Biotechnology, Korea)을 사용하여 분리하였다. 배양된 세포에 1 ml의 easy-BLUE 시약을 넣고, 상온에서 10초간 세포를 용해시킨 후, 여기에 200 μl의 chloroform을 추가하여 잘 혼합한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액 400 μl에 동일한 양의 2-propanol을 첨가하고 상온에 10분간 방치시킨 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 RNA는 1 ml의 75% ethanol을 첨가하여, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 75% Ethanol을 제거한 뒤, diethylprocarbonate (DEPC)가 첨가된 증류수에 용해시킨 후 260 nm에서 흡광도를 측정하고, 농도를 정량하여 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 1 μg oligo-dT와 역전사효소 (MMLV-RT, Promega, USA)를 사용하여 합성하였다. PCR은 Taq polymerase (Promega, USA)와 각각의 특이 primer를 이용하여 실험하였으며, PCR

Table 2. Primer Sequences

Target Gene		Primer Sequence	Product Size (bp)
IL-1β	Forward	GCT GAT GGC CCT AAA CAG	672
	Reverse	GAA GAC GGG CAT GTT TTC	
TNF-α	Forward	AGC CCA TGT TGT AGC AAA CC	516
	Reverse	GGT TGA GGG TGT CTG AAG GA	

조건은 94°C-5min, 94°C-30sec, 55°C-30sec, 72°C-30sec, 72°C-7min으로 30 cycle로 진행하였다. 실험에 사용된 primer는 Homo IL-1β (Bioneer, Korea), Homo TNF-α (Bioneer, Korea) 이었다. 실험에 사용된 primer 염기서열은 Table 2와 같다.

결 과

1. 세포 생존력에 미치는 영향

加味八味丸의 처리농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. A549 세포의 加味八味丸 처리에 따른 생존율은 加味八味丸의 농도 0.5 mg/ml 까지 정상군의 90% 수준을 유지하였고 처리농도를 1 mg/ml로 증가시킬 경우 생존율이 80%로 감소하였다 (data not shown).

A549 세포에 elastin 단백질 분해효소인 elastase를 처리하고 세포사멸수준을 조사하기 위하여 加味八味丸을 0.3 mg/ml 혹은 0.5 mg/ml의 농도로 처리하고 Hoechst 염색 실험으로 배양세포상의 세포핵의 수의 변화를 조사하였다. 배양세포에 加味八味丸을 처리한 경우 세포핵의 수나 핵의 형태가 처리를

가하지 않은 정상군에 비교하여 뚜렷한 차이점이 관찰되지 않았다. 배양세포에 elastase를 처리한 경우 세포핵의 수는 정상군에 비하여 9.5배 이하 수준으로 감소하였고 加味八味丸을 동시에 처리하였을 경우 세포핵의 수치는 정상군 대비 90% 이상 수준으로 유의적 수준으로 회복하는 것이 관찰되었다(Fig. 1).

2. Elastin 단백질 생성수준의 변화

A549 세포에서 elastase에 의한 elastin 단백질의 세포내 생성수준의 변화를 조사하기 위하여 elastin 단백질에 대한 면역형광염색과 western blot 분석을 실시한 결과, elastase를 처리한 세포는 처리하지 않은 정상군 세포에 비하여 elastin 단백질 염색수준이 크게 감소하였으며, elastase를 처리한 세포에 加味八味丸을 0.3과 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 경우 elastin 염색세포수가 다소 증가하였다(Fig. 2A). Elastin 단백질에 대한 면역형광염색세포와 Hoechst 핵 염색을 실시한 세포 이미지를 중첩 관찰한 결과 정상군에서 elastin 단백질은 핵염색 외부 부위에서도 폭 넓게 관찰된 반면 elastase 처리시 elastin 염색부위는 줄어든 것을 관찰하였다. 반면 elastase 처리와 더

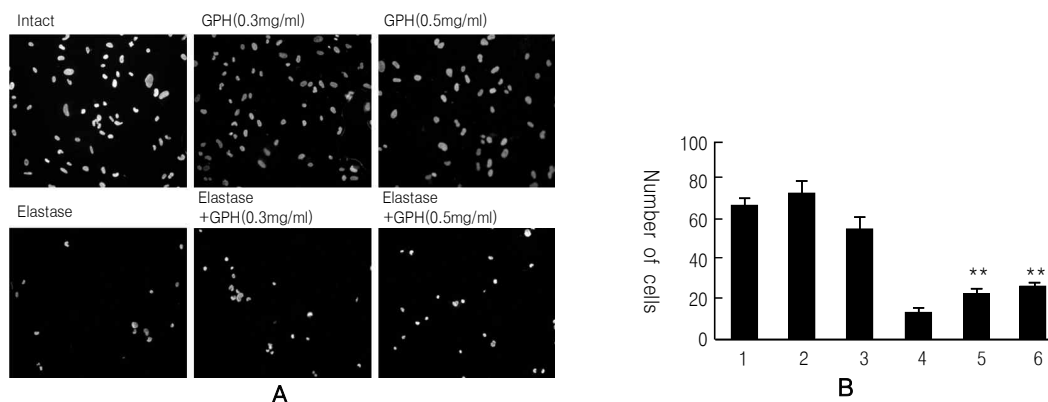


Fig. 1. Hoechst nuclear staining of A549 cells treated with GPH in the presence or absence of elastase. (A) Changes of Hoechst-stained nuclei and morphological feature after different treatments. (B) Comparison of cell number after different treatments. The number of cells were determined by counting Hoechst-stained nuclei in the microscopic field (20 × magnification). N = 4 (mean ± SEM) 1: untreated, 2: 0.3 mg/ml of GPH, 3: 0.5 mg/ml of GPH, 4: elastase treated, 5: elastase + 0.3 mg/ml of GPH, 6: elastase + 0.5 mg/ml of GPH. Statistical comparison of the group treated with elastase plus 0.3 mg/ml or 0.5 mg/ml GPH was made with elastase-treated group (**p<0.01, Student's t-test)

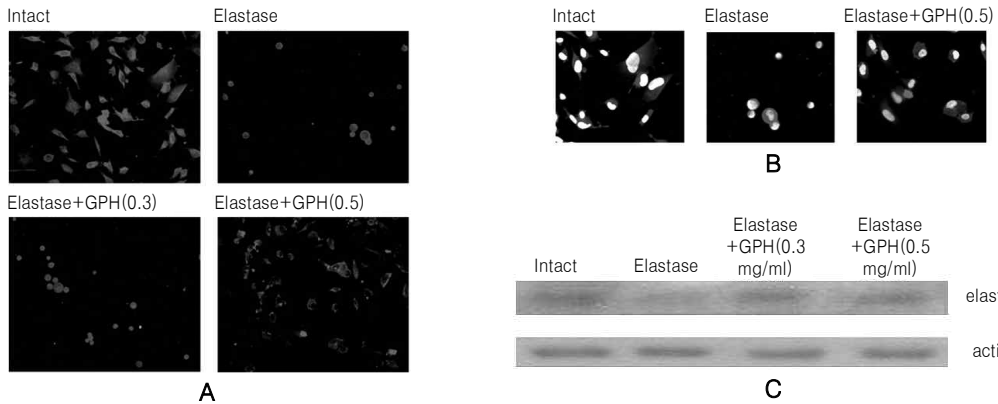


Fig. 2. Immunofluorescence staining and western blot analysis of A549 cells with elastin protein. Cell were treated with elastase alone, or elastase together with 0.3 mg/ml or 0.5 mg/ml of GPH. (A) Comparison of elastin protein staining intensity among different treatments. (B) The cells immunostained with elastin were additionally stained with Hoechst 33259 dye to identify individual nuclei. The merged images show the different pattern of elastin staining in individual cells. (C) Cell lysate (20 μ g) with different treatment were used for western blotting with anti-elastin antibody.

불어 0.5 mg/ml의 농도로 加味八味丸을 처리한 경우 elastin 단백질의 염색범위는 정상군과 유사한 양상으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2B). Western blot 방법에 의하여 분석한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 정상군의 경우 관찰된 elastin 단백질은 elastase를 처리한 집단에 비하여 상당 수준 감소하는 것이 확인되었다. Elastase 처리한 세포에 加味八

味丸을 처리한 경우 elastin의 단백질이 다소 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2C).

3. Caspase 3 단백질 생성수준의 변화

A549 세포에 elastase나 加味八味丸의 처리에 의하여 세포자멸과정에서 활성화되는 것으로 알려진 caspase 3의 생성수준의 변화를 조사하였다. Elastase

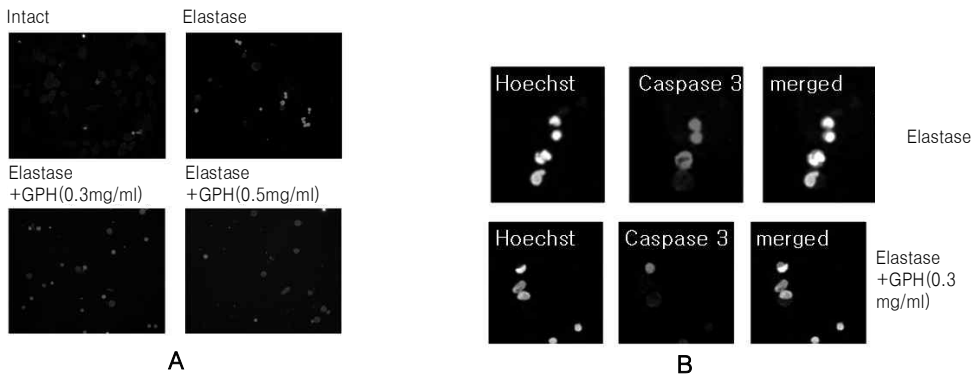


Fig. 3. Histological analysis of caspase 3 protein in A549 cells. (A) Immunofluorescence staining of A549 cells with caspase 3 protein. Cell were treated with elastase alone, or elastase together with 0.3 mg/ml or 0.5 mg/ml of GPH, and staining intensity of caspase 3 protein was compared among different treatments. (B) Merged images of caspase 3 staining with Hoechst nuclear staining for cells treated with elastase alone (upper panel) or with elastase plus GPH (lower panel).

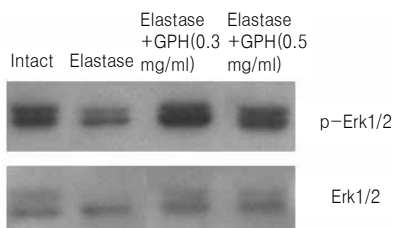


Fig. 4. Western blot analysis of phospho-Erk1/2 and Erk1/2 proteins in A549 cells. Cell lysate (20 μ g) with different treatment were used for western blotting analysis with antiphospho-Erk1/2 antibody.

를 처리하였을 경우 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비하여 caspase 단백질의 면역형광 수준은 뚜렷이 증가하는 것으로 관찰되었다. Elastase 처리와 더불어 加味八味丸을 처리한 경우 caspase 단백질의 형광염색은 다소 관찰되었으나 elastase 처리 집단에 비하여 약한 수준으로 관찰되었다(Fig. 3A). Caspase에 의하여 형광 염색된 세포에 대해 Hoechst 핵염색 이미지를 중첩시킨 결과, caspase 양성반응을 나타내는 세포는 Hoechst에 의한 핵염색에 대하여 응축된 핵 형태와 강한 신호를 나타내는 반면 caspase 음성반응을 나타내는 세포는 Hoechst 핵 염색에 대해 상대적으로 큰 핵 형태와 약한 염색수준을 나타내었다(Fig. 3B).

4. 세포의 생존 및 증식 관련 단백질 생성수준의 변화

세포의 생존 및 분화 기능에 기능적으로 관련하는 것으로 알려진 Erk1/2 단백질의 생성수준 변화를

A549 세포에서 조사한 결과, phospho-Erk1/2 단백질 수준은 elastase 처리에 의하여 정상군에 비해 다소 감소하였으나, elastase와 加味八味丸을 동시에 처리한 경우 정상군 수준으로 다시 증가하였으며, 비인산화 단백질을 포함한 전체 Erk1/2 단백질 수준은 모든 처리군에서 유사한 수준으로 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

加味八味丸이 A549 세포의 세포증식 기전에 미치는 영향을 조사하기 위하여 cell cycle 단백질인 Cdc2 및 조절 단백질 cyclin B1의 생성수준의 변화를 조사하였다. Cdc2 단백질은 아무런 처리를 하지 않은 정상세포에서 높은 생성수준을 보였고, elastase를 처리한 경우 낮은 수준으로 감소하였으나, 加味八味丸을 동시에 처리한 경우 증가양상을 나타내었다(Fig. 5A). Cyclin B1 단백질은 elastase 처리에 의하여 생성수준이 감소하였으나, 加味八味丸을 동시에 처리한 경우 생성수준이 증가하였다 (Fig. 5B).

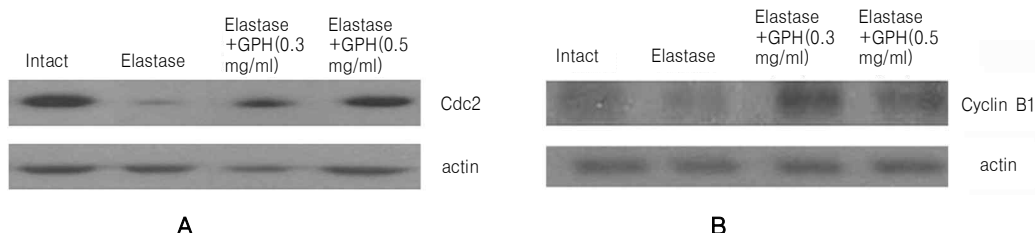


Fig. 5. Western blot analysis of Cdc2 and cyclin B1 proteins in A549 cells. Cell lysate (20 μ g) with different treatment were used for western blotting analysis with antiphospho-Cdc2 antibody (A) or anti-cyclin B1 antibody (B).

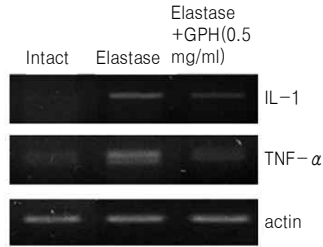


Fig. 6. RT-PCR analysis of IL-1 β and TNF- α mRNA expression in A549 cells. Cells were treated with normal saline (intact) or elastase or elastase plus GPH (0.5 mg/ml) for 6 hrs.

6. IL-1 β 및 TNF- α mRNA 발현수준의 변화

Elastase의 처리에 의하여 유도된 A549 세포의 손상에서 염증 반응 관련 기전의 가능성을 조사하기 위하여 염증반응성 대표적 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 의 mRNA 발현수준을 RT-PCR에 의하여 조사한 결과, elastase 처리 6시간 후 분석한 세포에 대해 elastase 처리는 IL-1 β 와 TNF- α mRNA 생성수준의 증가를 유도하였고, elastase와 加味八味丸을 동시에 처리한 경우 두 사이토카인 mRNA 생성수준이 감소하였다(Fig. 6). Elastase나 加味八味丸을 24시간 처리한 경우 IL-1 β 와 TNF- α mRNA 생성의 변화는 관찰되지 않았다 (data not shown).

고찰

COPD는 완전히 가역적이 아닌 기류제한을 특징으로 하는 질병상태로서, 기류제한은 일반적으로 점차 진행되며, 이는 유해한 입자나 가스에 대한 폐의 비정상적 염증반응과 연관되어 있다고 정의된다¹⁰. COPD에서 점차적으로 진행되는 만성 기류제한은 기관지벽의 손상과 복구가 반복되어 초래하는 말초기도의 협착과 호흡세기관의 파괴와 확장을 일으키는 소엽성폐기종 형태의 폐실질 손상으로 발생한다¹¹.

단백분해효소의 증가와 항단백분해효소의 감소는 COPD 발병기전에서 중요한 역할을 한다. 특히 elastase는 elastin의 분해를 촉진하는 단백질 분해효소로서 폐기종 환자에서 여러 가지 원인에 의하여 유도되어

폐포 조직의 기능손상을 유발하는 것으로 알려져 있다^{3,12,13}. 인간의 경우 염증반응이나 흡연 등에 의하여 활성화된 중성구에서 elastase의 생성이 증가하며 이는 폐조직의 주성분인 elastin 단백질의 분해를 초래하게 된다. 또한 기도부위 조직의 elastin의 손실은 고정적인 기도폐쇄를 가져와 말초기도 저항을 증가시킨다³.

폐포의 확장, 폐의 탄성 소실과 과도한 팽창, 환기 장애, 가스교환장애, 혈류장애의 특징을 갖는 COPD의 폐기종 양상은 한의학의 咳而上氣하고 煩燥하는 肺脹證과 呼吸促急한 喘證의 범주에 속한다⁶. 폐기종은 肺腎의 기능부족으로 인해 肺氣를 淸肅下降하는 생리기능의 장애에 기인하므로 肺腎에 중점을 두어 益氣定喘, 補腎陰腎陽하는 처방을 사용한다⁶. 八味丸⁷에 白朮, 淫羊藿, 菟絲子, 補骨脂, 胡桃肉, 杏仁, 蘇子, 蘿菘子, 神麩, 麥芽, 百果를 가한 加味八味丸은 대전대학교부속한방병원 폐계내과에서 COPD를 비롯한 만성호흡기질환에 대응하는 처방으로 호흡기 배상세포의 뮤신 분비에 미치는 영향에 대한 연구는 있었으나⁹ 호흡기 세포를 대상으로 세포 조직학적 수준에서의 작용에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 폐기종 연구에 대한 *in vitro* 모델로서 A549 세포에 elastase를 처리하여 세포손상을 가한 후 加味八味丸의 처리에 의한 손상수준의 변화를 관찰하였다. Elastin은 폐포를 비롯한 탄력적 생체 조직에서 중요한 구성성분으로 알려져 있으며 폐기종의 환자의 경우 elastin 단백질의 분해에 의해

여 폐포조직의 붕괴에 관여하는 것으로 알려져 있다^{14,15}. 기존의 여러 연구보고에 따르면 배양세포에 elastase를 처리하거나 elastase의 기도 흡입을 통하여 생체 폐조직에 처리할 경우 폐기종과 유사한 세포 조직학적 변화를 유도할 수 있는 것으로 확인되었다^{16,17}.

먼저 加味八味丸은 배양세포에 1 mg/ml 농도범위까지의 처리에서 세포의 생존율을 80% 이상으로 유지할 수 있는 것으로 확인되었으며 본 연구에서 표적으로 조사하고자 하는 단백질들인 elastin, caspase 3의 생성수준에 변화를 나타내지 않았다. 즉 加味八味丸 자체가 A549 세포에 독성이나 부반응을 유도하지 않는다는 것을 확인하였으며, 본 연구에서는 세포의 생존을 90% 이상으로 유지하는 것으로 관찰된 0.3 - 0.5 mg/ml 농도범위에서 elastase를 처리한 세포에 대한 세포 반응성을 조사하였다.

먼저 elastase 처리에 의하여 세포수의 변화를 Hoechst staining을 통하여 확인한 결과 세포수는 20% 수준으로 감소하는 것을 확인하였으며 加味八味丸의 처리에 의하여 세포수가 30% 정도로 다소 상승하는 것을 발견하였다. Elastin의 세포내 염색수준은 elastase 처리에 의하여 유사하게 감소하였고 加味八味丸의 처리에 의하여 다소 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 加味八味丸의 처리가 elastase 처리로 elastin이 분해하여 발생하는 세포 사멸에 대하여 보호효과를 갖고 있음을 암시하는 것이다.

Elastase 처리에 의한 세포 사멸에 있어 자멸경로의 활성화가 관여하는지 조사하기 위하여 caspase 3 단백질의 생성 변화에 대하여 조사하였다. 생체의 대부분 세포는 세포외부에 유해적 스트레스 자극이나, 세포성장 인자의 제거, 손상 유발성 물질 자극이 주어질 때 세포막의 수용기의 활성화를 통하여 자멸경로를 활성화하게 된다^{18,19}. 세포내 자멸신호경로의 활성화에 있어 caspase와 Bcl-2 계열의 단백질의 활성화가 핵심적인 역할을 수행하게 되는데 Bcl-2 계열의 단백질은 미토콘드리아를 통한 신호전달을 통하여 caspase 신호전달 경로를 활성화 시킨다²⁰⁻²². 이러한 경로상의 caspase 3는 실제 세포의

자멸을 초래하는 핵심적 단백질 분해효소로서 DNA 분해효소, 세포내 골격단백질 분해, 기타 세포내 주 요구성성분의 분해반응을 초래하는 단백질이다. Caspase 3는 전구체 형태로 합성되고 상위 caspase에 의하여 절단된 후 활성화된다. 본 연구에서는 elastase와 elastase 및 加味八味丸 처리 후 활성화 형태의 caspase 3의 생성수준을 배양세포에서 조사하였다. Elastase 처리에 의하여 caspase 3의 세포내 생성수준은 증가하였으며 加味八味丸 처리 후 세포상의 염색수준이 약화되는 것을 관찰하였다. 따라서 加味八味丸의 처리가 elastase 매개성 세포 사멸을 억제하는 효과가 있음을 제시하고 있다. Caspase 3는 세포 자멸사의 집행과정에 관련된 단백질 분해효소이기 때문에 본 효소의 활성화 억지에 의하여 자멸의 진행속도가 지연될 수 있을 것이다. 加味八味丸의 처리에 의한 세포사멸 자체의 진행의 억제 등에 대한 기전을 조사하기 위하여 상위 자멸경로의 신호전달 물질들, 예를 들어 Caspase 8이나 9 또는 Bcl-2 계열의 단백질의 활성 변화를 조사함으로써 보다 구체적인 세포내의 반응성을 알아낼 수 있을 것이다.

세포 생존성의 변화를 보다 조사하기 위하여 Erk1/2 (External signal-regulated protein kinase) 단백질의 생성수준의 변화를 조사하였다. Erk1/2는 mitogen activated protein kinase (MAP kinase)에 속하는 단백질로서 분자량이 42와 44 kDa으로 탐지되며 많은 종류의 세포에서 세포의 증식 및 변화 과정시 활성화되는 것으로 알려져 있다²³⁻²⁶. Erk1/2는 세포에 성장인자 등 외부적 자극이 주어질 때 다른 단백질 인산화 효소에 의하여 인산화 됨으로써 활성화 된다. 즉 대부분의 세포에서 Erk1/2는 일정 수준으로 유전자 발현을 통하여 생성되며 인산화에 의하여 그 자체가 단백질 인산화 효소로서 활성도를 갖게 되는데 세포의 핵부위로 전달되어 전사인자로 작용하는 단백질로서 CREB (cAMP responsiveness element binding protein)의 인산화나 MEF-2 등의 활성화를 통하여 특정유전자 발현의 유도를 통하여 세포의 활성도를 증가시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{27,28}. 본 실험결과에 의하면 정상적 분열상태의 A549 세

포에서 인산화 형태의 phospho-Erk1/2 단백질은 뚜렷이 관찰되었으며 elastase의 처리에 의하여 그 생성수준이 상당히 감소하는 것으로 관찰되었다. 그러나 加味八味丸의 처리에 의하여 다시 생성수준이 정상세포와 유사한 수준으로 관찰되었는데 이는 세포의 활성도가 加味八味丸의 처리에 의하여 상당수준 회복되는 것과 연계되어 있음을 암시하고 있다.

세포생존력의 변화뿐 아니라 세포 증식의 지표 단백질의 변화를 좀 더 조사하기 위하여 cell cycle 단백질 계통의 단백질인 Cdc2와 cyclin B1의 생성수준 변화를 조사하였다. Cdc2는 Cell division cycle 2를 뜻하는데 Cdk (cyclin-dependent kinase) 계열에 속하는 단백질로서 다른 Cdk 계열의 단백질과 마찬가지로 Cdc2는 cyclin 조절단백질의 결합에 의하여 활성도가 증가하는 것으로 알려져 있으며 특히 cell cycle의 G2 (growth phase 2)에서 M (mitosis; 체세포분열) 단계를 진행시키는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. Cdc2 kinase의 기질은 체세포 분열상에서 활성화하는 방추사구조나 핵융축, 핵막구조의 변화 등에 관련된 단백질들이 Cdc2에 의한 인산화 표적으로 제시된 바 있다. Cdc2 뿐 아니라 Cdk2, 4, 6 등은 특히 G1 (growth phase 1)에서 S (DNA synthesis; DNA 복제) 단계의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔으나 최근 암세포주를 통한 연구에 따르면 Cdc2의 활성화가 전체적 cell cycle의 진행을 조절할 수 있음이 제시되기도 하였다^{30,31)}. 본 연구결과는 elastase의 처리에 의하여 생성수준의 저하를 나타낸 Cdc2가 加味八味丸의 처리에 의하여 생성수준의 회복이 진행되었음이 명확하게 관찰되었다. 한편 Cdc2 활성화 조절단백질인 cyclin B1의 생성 및 변화는 Cdc2 단백질의 생성수준의 변화만큼 뚜렷하게 탐지되지 않았으나 加味八味丸의 처리에 의한 생성수준의 향상의 양상을 나타내었다. Cdc2의 protein kinase로서의 활성도의 변화를 *in vitro* kinase assay 등을 통하여 측정하면 加味八味丸이 Cdc2 활성화 변화에 미치는 영향에 대하여 추가적 증거를 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

Elastase와 加味八味丸의 처리에 따른 염증 반응성의 변화를 조사하기 위하여 염증반응시의 활성화되는 것으로 알려진 IL-1 β 와 TNF- α 단백질에 대한 유전자 발현조절을 RT-PCR을 통하여 조사하였다. IL-1 β 와 TNF- α 는 체내 다양한 병리적 손상 자극에 따른 염증반응시 거의 예외 없이 생성수준이 증가하는데 IL-1 β 와 TNF- α 는 COPD의 중증도와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다³²⁾. 본 실험의 경우 elastase의 처리에 의하여 A549 세포에서 IL-1 β 와 TNF- α mRNA의 생성이 유도되는 것을 발견하였으며 加味八味丸의 처리에 의하여 그 생성수준이 다소 감소하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 elastase가 세포수준에서 염증유발성 반응을 나타내었으며 이러한 변화가 加味八味丸의 처리에 의하여 억제될 수 있음을 나타내고 있다. 차후 연구에서 이러한 mRNA의 생성수준의 변화가 실질적으로 단백질 생성수준과 직접적으로 관련하는지 ELISA 등을 통하여 분석함으로써 그들의 실질적 역할에 대한 보다 구체적인 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과는 加味八味丸이 폐세포의 손상에서 세포의 생존력을 개선시키고, 염증성 손상에 대한 보호효과를 나타내어 COPD의 치료에 활용될 수 있음을 나타내는 것으로 향후 *in vivo* 실험동물을 통한 추가연구에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

加味八味丸이 인체 폐세포의 세포손상에 따른 세포증식 양상과 사멸양상 및 염증 반응성에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味八味丸은 A549 세포에서 elastase로 유도된 세포수의 감소를 증가시켰다.
2. 加味八味丸은 A549 세포에서 elastase로 유도된 elastin의 감소를 증가시켰다.
3. 加味八味丸은 A549 세포에서 elastase로 유도된 caspase 3의 증가를 감소시켰다.
4. 加味八味丸은 A549 세포에서 elastase로 유도된 Erk1/2와 Cdc2 단백질의 감소를 증가시켰다.

5. 加味八味丸은 A549 세포에서 elastase로 유도된 IL-1 β 와 TNF- α mRNA 발현증가를 감소시켰다.

참고문헌

1. Korea National Statistical Office, Republic of Korea [Internet]. Dajeon: Korea National Statistical Office; c1996-[cited 2008 Mar]. Available from: <http://www.nso.go.kr>
2. Kim DS, Kim YS, Jung KS, Chang JH, Lim CM, Lee JH, et al. Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Korea: a population-based spirometry survey. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Oct 1;172(7):842-7.
3. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(6):532-55.
4. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998;4(11):1241-3.
5. Chang J. Pharmacologic treatment of COPD. *Tuberculosis and Respiratory Diseases.* 2005;59(3):231-42.
6. 전국한의학대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 한문화사. 2002:338-46.
7. 허준. 동의보감. 서울: 남산당. 1986:147.
8. 전국한의학대학 본초학교실. 本草學. 서울: 영림사. 1994:370-568.
9. Lim DH, L JE, Han YJ, Hwang JH, Cho CJ, Bae HH, et al. Effects of HaengSoTang (HST), GamiPalMiHwan (GPMH) on mucin secretion from airway goblet cells. *Korean J Orient Int.* 2005; 26(1):221-8.
10. Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease NHLBI/WHO Workshop report. Rev. ed. 2003.
11. Kim HK, Lee SD. Pathophysiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases.* 2005;59(1):5-13.
12. Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(2):555-64.
13. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Pitfalls in antiprotease therapy of emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(6 Pt 2):S131-7.
14. Ranes J, Stoller JK. A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Semin Respir Crit Care Med.* 2005;26(2):154-66.
15. Suki B, Bates JH. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;163(1-3):33-43.
16. Gardi C, Arezzini B, Martorana PA. Testing of compounds in models of pulmonary emphysema. *Curr Med Chem.* 2008;15(8):803-8.
17. Churg A, Wright JL. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. *Contrib Microbiol.* 2007;14:113-25.
18. Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10(6): 649-55.
19. Rossi AG, Sawatzky DA, Walker A, Ward C, Sheldrake TA, Riley NA, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med.* 2006;12(9):1056-64.
20. Budd RC. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(3):356-62.
21. Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol.* 2000;30(5):609-27.
22. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A.

- Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(2):170-7.
23. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:463-89.
24. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 2007;26(22):3227-39.
25. Bogoyevitch MA, Court NW. Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal.* 2004;16(12):1345-54.
26. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153-83.
27. Tu H, Rondard P, Xu C, Bertaso F, Cao F, Zhang X, et al. Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cell Signal.* 2007;19(9):1996-2002.
28. Cañón E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A. Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5583-92.
29. Dorée M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 12):2461-4.
30. Nebreda AR. CDK activation by non-cyclin proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(2):192-8.
31. Goga A, Yang D, Tward AD, Morgan DO, Bishop JM. Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat Med.* 2007;13(7):820-7.
32. Sapay E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, et al. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD. *J Clin Immunol.* 2009;29(4):508-16.