



Original Article / 원저

인체 간암세포에서 비기환(肥氣丸), 대칠기탕(大七氣湯) 및 목향빈랑환(木香檳榔丸) 열수 추출물의 항암 활성 비교

김민영^{1,2}, 이혜숙^{1,2}, 홍수현^{1,2}, 박 철³, 최영현^{1,2*}

¹동의대학교 항노화연구소, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³동의대학교
자연과학대학 분자생물학과

Comparison of Anti-cancer Potentials of Water Extracts of Bigihwan, Daechilgithang and Mokwhyangbinranghwan in Human Hepatocellular Carcinoma Cells

Min Yeong Kim^{1,2}, Hyesook Lee^{1,2}, Su Hyun Hong^{1,2}, Cheol Park³, Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Anti-Aging Research Center, Dong-eui University ,

²Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University,

³Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dong-eui University

ABSTRACT

Objectives : We selected three herb-combined remedies, Bigihwan (BGH), Daechilgitang (DCGT) and Mokwhyangbinranghwan (MHBRH), through Donguibogam text-mining analysis, and evaluated their anti-cancer effects on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells.

Methods : Cytotoxicity was assessed by an MTT assay. Apoptosis rate, autophagy and ROS level were detected by flow cytometry. The autophagy was also observed by Cyto-ID staining fluorescence microscopy. The expression of autophagy, mitophagy and pexophagy regulatory proteins was detected by Western blot analysis.

Results : BGH showed the strongest effect among the three prescriptions in inhibiting Hep3B cell viability, which was associated with the induction of apoptosis and autophagy. Autophagy blockers improved cell viability and

reduced apoptosis after BGH and DCGT treatments, indicating that autophagy by these prescriptions enhanced Hep3B cells against their cytotoxicity. However, MHRH enhanced the reduction of cell viability and apoptosis by autophagy blockers. Induction of autophagy by BGH treatment was associated with mitophagy due to mitochondrial dysfunction than DCGT and MHRH-treated cells. In addition, induction of apoptosis by BGH treatment was ROS-dependent and showed the possibility of pexophagy involvement.

Conclusion : Although further studies need to be conducted to study the efficacy and mechanism of accurate anticancer activity, the present results will serve as important sources of understanding the mechanism of action of herbal remedies prescribed for liver disease as documented in Donguibogam.

Key words : Bigihwan, Daechilgitang, Mokwhyangbinranghwan, liver cancer, apoptosis, autophagy, ROS.

I. 서론

간세포 암종(肝癌, hepatocellular carcinoma)은 간세포에서 유래된 악성 종양으로 암 관련 사망자 원인의 3 번째를 차지한다^{1,2)}. 간암 환자가 초기 단계로 진단되고 예후가 좋은 경우 5년 생존율이 70%를 초과하지만 대부분의 환자는 후기 단계에서 진단되어 5년 생존율은 16% 이하이다¹⁾. 간암 치료에는 수술 및 보조 화학 방사선 요법이 포함되지만, 환자 종양의 크기, 간 내 전이의 정도 및 간 기능적 예비성 불충분성에 따른 외과 치료의 한계가 매우 높다³⁾. 현재 미국 Food and Drug Administration에서 승인된 간암의 화학 요법 치료에 광범위하게 사용되고 있는 multikinase inhibitor인 regorafenib이나 sorafenib 역시 환자에 예후에 따라 치료에 제한적일 뿐 아니라 항암제 내성과 독성에 의한 다양한 부작용이 보고되고 있다⁴⁻⁶⁾. 따라서 항암제의 부작용을 경감시키면서 독성이 낮은 천연물 유래 간암 치료제의 발굴이 시급한 상황이며, 이를 위하여 전통적으로 사용되어온 약제들은 간암 선택적 치료제의 발굴을 위한 중요한 자원으로 잠재력을 가질 수 있다^{7,8)}. 이러한 측면에서 간암과 유사하거나 간과 연관된 질병의 치료에 사용되어 온 몇 가지 처방들의 효능에 대한 재검증이 요구된다.

비록 한의학에서 간암의 영역에 대한 명시는 없으나 현대의학적 관점에서 간암 치료에 적절한 처방전의 발굴에 따른 과학적인 재해석 및 효과 기전의 규명은 후보 처방전의 적용 가능성을 위한 자료로서 활

용될 수 있을 것이다. 한의학에서 흉복강 내에 덩어리가 있는 병증인 오적[五積: 간적(肝積), 심적(心積), 비적(脾積), 폐적(肺積) 및 신적(腎積)]에는 간비종대(肝脾腫大), 흉복부의 종괴(腫塊) 및 적액(積液)이 포함된다. 따라서 이러한 오적의 치료에 사용된 처방전들은 암의 치료를 위한 적용이 가능할 것이다. 특히 간(肝)과 관련되어 생긴 적(積)을 의미하는 간적(肝積, 또는 肥氣)은 간기(肝氣)가 잘 통하지 못하거나 간(肝)에 어혈이 몰려서 생기는 간암과 연계성을 가지는 간 질환의 일종으로 이를 위한 대표적인 처방전이 비기환(肥氣丸, Bigihwan)이다⁹⁾. 그리고 오적(五積)과 장기의 기능에 장애가 발생하는 병증인 적병(積病)에 사용되는 처방전으로 대칠기탕(大七氣湯, Daechilgithang)과 목향빈랑환(木香檳榔丸, Mokwhyangbinranghwan)을 예로 들 수 있다. 대칠기탕은 따뜻한 성질을 가짐으로써 한증(寒症)인 적병의 초기에 사용하며, 목향빈랑환은 찬 성질을 가짐으로써 열증(熱症)인 적병의 후기에 사용하며, 기체복통(氣滯腹痛), 식적복통(食積腹痛)에 대표적인 처방이다. 현재까지 연구된 바로는 비기환이 백혈병, 임파종 및 혈구암 세포에서의 항암 효능 및 신생혈관을 억제하는 효과가 보고된 바 있다^{10,11)}. 그리고 C6 신경 교질 세포에서 글루타민산염에 의해 유도된 세포의 죽음을 억제하는 것으로 알려져 있으며¹²⁾, 목향빈랑환은 위장관질환 및 궤양성 보호에 관한 효능이 밝혀진 바 있지만¹³⁾, 이들 처방전이 간암세포의 증식에 미치는 연구는 이루어진 바 없다.

일반적으로 화학 요법에 적용되는 천연물은 합성 항암제와 마찬가지로 암세포의 증식을 억제할 수 있

*Corresponding author : Yung Hyun Choi, Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.
Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-890-3333, E-mail : choiyh@deu.ac.kr

•Received : January 27, 2020 / Revised : February 12, 2020 / Accepted : February 18, 2020

는 다양한 세포 내 신호계의 조절을 표적으로 하고 있다¹⁴⁾. 그중 공통적으로 광범위하게 적용될 수 있는 표적이 암세포의 죽음을 유도하여 암세포의 증식을 차단하는 것이다. 비록 세포의 죽음이 세포사멸(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)로 크게 대별될 수 있지만, 최근 세포 내 소기관의 중요성과 연관된 세포 죽음의 경로가 다양하게 세분화되고 있다^{15,16)}. 특히 특정 형태의 세포 죽음 형식이 암세포의 증식을 제어하는 측면에서 양면성을 가질 수 있기 때문에 항암활성을 가지는 후보물질들에 의한 암세포의 증식 억제를 위한 이들의 경로를 파악하는 것은 무엇보다도 우선되어야 할 것이다. 따라서 본 연구에서는 상기에서 서술된 3 가지 처방전에 의한 간암세포의 증식 억제에 관여하는 apoptosis 유도 과정에 동반될 수 있는 세포의 죽음 형식에 관한 차이점을 파악하였다.

II. 재료 및 방법

1. 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 준비

본 연구에 사용된 비기환[시호(柴胡, 40 g), 황련(黃連, 28 g), 후박(厚朴, 20 g), 화초(花椒, 16 g), 감초(甘草, 12 g), 봉아출(蓬莪朮, 10 g), 인삼(人參, 10 g), 곤포(昆布, 10 g), 조협(阜莢, 6 g), 백복령(白茯苓, 6 g), 건강(乾薑, 2 g), 과두상(巴豆霜, 2 g) 및 천오두(川烏頭, 0.8 g)], 대칠기탕[삼릉(三稜), 봉아출, 청피(靑皮), 진피(陳皮), 길경(桔梗), 곽향(藿香), 익지인(益智仁), 향부자(香附子), 육계(肉桂), 감초 각 4 g 과 생강(生薑) 3 쪽 및 대조(大棗) 2 개], 목향빈랑환[대황(大黃, 160 g), 흑축(黑丑: 만물가루, 80 g), 황금(黃芩, 80 g), 목향(木香, 40 g), 빈랑(檳榔, 40 g), 황련(40 g), 당귀(當歸, 40 g), 지각(枳殼, 40 g), 청피(40 g), 진피(40 g), 향부자(40 g), 봉아출(40 g) 및 황백(黃柏, 40 g)]은 동의대학교 한방병원에서 구입하였다. 각 처방전의 열수 추출물(water extracts of Bigihwan; BGH, water extracts of Daechilgithang; DCGT, water extracts of Mokwhyangbinranghwan; MHRH)을 얻기 위하여 약재 무게의 10 배에 해당하는 증류수로 100°C에서 3 시간 동안 추출하였고, 추출된 물질을 여과지(Whatman No. 3 filter paper, Whatman International Ltd,

Maidstone, England)를 이용하여 불순물을 제거하였다. 각 추출물의 수율은 비기환의 경우 19.42%였으며, 대칠기탕 및 목향빈랑환은 각각 23.47% 및 30.43%였다. 여과된 추출물을 동결건조기를 사용하여 건조 후 분말화하였으며, 100 mg/ml 농도로 증류수에 녹여 0.2 µm Minisart Syringe filter 로 여과한 후 세포 배양용 배지에 적절히 희석하여 사용하였다.

2. 세포 배양

본 연구에서 사용된 Hep3B 간암세포는 American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, WelGENE Inc., Daegu, Republic of Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGENE Inc.)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.

3. 세포 생존율 측정

비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물에 의한 세포독성을 비교하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석을 실시하였다. 이를 위하여 6 well plate 에 간암세포를 분주하여 안정화시킨 후에 각 추출물을 적정 농도로 처리하였다. 24 시간 배양 후 0.5 mg/ml MTT 용액(Amresco Inc., Solon, OH, USA)를 첨가하여 30 분 동안 반응시킨 후, MTT 가 포함된 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco Inc.)를 첨가하여 생성된 formazan 을 모두 녹이고 96 well plate 에 200 µl 씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. 아울러 각 추출물의 처리에 따른 세포의 형태 변화는 도립현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

4. Apoptosis 유도의 정량화

각 열수 추출물에 의한 apoptosis 유발의 정도를 비교하기 위하여 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit (BD Biosciences, Can Diego, CA, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 각 추출물을 0.5, 1.0 및 1.5 mg/ml 의 농도로 24 시간 동안 처리 후 phosphate buffered saline (PBS)

로 세척하고 FITC-annexin V와 propidium iodide (PI)로 암실에서 20 분 동안 염색한 후 flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 분석을 실시하였다.

5. Autophagy 유도의 확인

각 추출물 처리에 의한 간암세포의 apoptosis 유도가 autophagy와 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 Cyto-ID[®] autophagy detection kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 각 추출물이 처리된 세포에 assay buffer와 Cyto-ID green stain solution을 처리하여 37°C에서 30 분 동안 염색시키고, assay buffer로 세척한 후 PBS로 세포를 부유시켜 flow cytometry로 autophagy 유발 정도를 측정하였다. 또한 동일한 조건에서 배양된 세포들을 대상으로 Cyto-ID 및 형광현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 형광 강도를 관찰하였다.

6. 단백질 분리 및 Western blot analysis

각 추출물이 24 시간 동안 처리된 세포를 PBS로 수세 후, lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% nonidet P-40, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 14,000 rpm, 4°C, 30 분간 원심분리 후 상층액을 얻었다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량하였고, Laemilni sample buffer (Bio-Rad Lab.)를 섞어서 loading sample을 만들었다. 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰고, 5% skim milk를 30 분 간 처리하고 적정 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc. 및 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 처리하여 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T (PBS with Tween 20)를 사용하여 10 분간 3 번 세척하였다. 그 후 해당 2 차 항체(Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)를 상온에서 1 시간 30 분 동안 반응시킨 후 PBS-T로 10 분간 3 번 세척

하고 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Corp.)을 적용시킨 후 Chemi-smart (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 분석하였다.

7. Reactive oxygen species (ROS) 생성의 측정

각 추출물의 처리에 따른 ROS 생성 양의 측정을 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색법을 이용하였다. 이를 위하여 각 추출물이 1 시간 동안 처리된 세포들을 모아 10 μM의 DCF-DA 용액(Molecular Probes Inc., Leiden, Netherlands)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20 분 염색시키고 flow cytometer를 이용하여 ROS 생성 변화 여부를 조사하였다.

8. 통계 분석

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차(mean ± standard deviation, SD)로 표시하였고 Sigma Plot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다. 모든 통계처리의 유의성은 *p*<0.005 수준에서 검증하였다.

III. 결과

1. Hep3B 간암세포의 증식에 미치는 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 영향

비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물이 Hep3B 간암세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3 가지 열수 추출물을 24 시간 처리 후 MTT 분석을 이용한 세포 생존율을 조사하였다. Fig. 1A의 결과에서 알 수 있듯이, 3 가지 열수 추출물이 처리된 Hep3B 간암세포의 생존이 처리 농도 의존적으로 감소하였으며, 대칠기탕 추출물 처리군에서 세포 독성이 상대적으로 낮게 나타났다. 동일 조건에서 관찰된 세포의 형태 변화에서 세포질 내에서의 공포 형성이 대칠기탕 처리군에서 가장 빈번하게 관찰되었으며, 비기환 추출물 처리군에서는 이러한 현상이 다소 약하게 관찰되었다(Fig. 1B).

2. 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물에 의한 Hep3B 간암세포의 apoptosis 유발

이상에서 관찰된 3 가지 추출물의 Hep3B 세포 생존율의 억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사한 결과, 비기환 추출물 처리군에서 apoptosis 유발 효과가 가장 높게 나타났으며, 대칠기탕 추출물 처리군에서 apoptosis 유발 빈도가 비교적 낮게 나타났다(Fig. 2A). 비록 대칠기탕 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발의 빈도는 낮지만, 대조군에 비하여 유의적인 증가임은 확실하다. 아울러 necrosis 억제제인 necrostatin-1 이 전처리된 Hep3B 세포에서 3 가지 추출물에 의한 apoptosis 유발의 빈도에는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 2B).

3. Hep3B 간암세포의 autophagy 유발에 미치는 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 영향

다음은 Hep3B 세포에서 3 가지 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발에 autophagy 가 관여하는지의 여부를 조사하였다. Fig. 3A 에 제시된 flow cytometry 결과에서처럼, 대칠기탕 추출물 처리군에서 autophagy 유발 빈도가 가장 높게 관찰되었으며, 비기환 추출물 처리군에서 autophagy 가 거의 유발되지 않았다. 아울러 Cyto-ID 를 이용한 형광 현미경적 관찰에서도 이와 유사한 결과를 보여주었으며(Fig. 3B), autophagy 유발에 관여하는 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II 의 발현 또한 대칠기탕 추출물 처리군에서 가장 높게 나타났다(Fig. 3C). 이러한 autophagy 유발이 apoptosis 유도에 어떠한 역할을 하는지를 조사하기 위하여 autophagy 저해제인 bafilomycin A1 (BA1)과 3-methyladenine (3MA)를 1 시간 전처리 후 3 가지 추출물을 24 시간 처리하여 apoptosis 유발 정도를 비교하였다. Fig. 3D 에 나타난 결과에 의하면, 대칠기탕 추출물에 의한 apoptosis 유발은 autophagy inhibitor 에 의하여 감소된 반면, 목향빈랑환 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발의 빈도는 증가되었다.

4. Hep3B 간암세포에서 mitophagy 및 pexophagy 조절인자들의 발현에 미치는 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 영향

Hep3B 세포에서 3 가지 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발에 mitophagy 가 동시에 관여하는지를 조사하기 위하여 대표적인 mitophagy 조절 단백질인 Parkin 과 serine/threonine kinase phosphatase

and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1)의 발현에 미치는 3 가지 추출물의 영향을 조사하였다. Fig. 4A 의 immunoblotting 결과에서 알 수 있듯이, 3 가지 추출물이 처리된 세포에서 Parkin 의 발현은 큰 변화가 나타나지 않았으나, PINK1 의 발현은 비기환과 대칠기탕 처리 농도 증가에 따라 다소 감소된 반면, 목향빈랑환 추출물 처리군에서는 다소 증가되었다. 반면 pexophagy 유발 조절 단백질인 pexophagy (PEX) 5 의 발현은 비기환과 목향빈랑환 추출물 처리군에서 감소된 반면, 대칠기탕 처리군에서는 처리 농도 의존적으로 다소 증가되었으며, peroxisomal membrane protein of 70 kDa (PMP70)의 발현은 처리군 전체에서 약간 상승된 경향성을 보였다.

5. Hep3B 간암세포의 ROS 생성에 미치는 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 영향

비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물에 의한 Hep3B 간암세포의 증식 억제에 ROS 생성이 관여하는지를 조사하기 위하여 DCF-DA 염색을 통한 flow cytometry 분석을 실시하였다. Fig. 4B 의 결과에서 알 수 있듯이, ROS 의 생성은 3 가지 추출물의 처리에 따라 농도 의존적으로 모두 증가하였으나, 비기환 추출물 처리군에서 가장 높게 나타났다. ROS 의 생성이 가장 높게 나타난 비기환 추출물 처리군에서 ROS 의 생성이 Hep3B 간암세포의 증식 억제에 직접 관여하는지의 여부를 조사하기 위하여 ROS 의 생성을 N-acetyl-L-cysteine (NAC) 처리에 의하여 인위적으로 차단한 결과(Fig. 5A), 비기환 추출물에 의한 생존력의 감소와 apoptosis 유발이 유의적으로 억제되었다(Fig. 5B 및 C).

IV. 고찰

본 연구에서는 Hep3B 간암세포의 미치는 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 영향을 조사하였다. 먼저, MTT 분석의 결과에 의하면 3 가지 열수 추출물 중에서 비기환 및 목향빈랑환 추출물 처리군에서 대칠기탕 추출물 처리군에 비하여 항암활성이 높게 나타났다(Fig. 1A). 이러한 Hep3B 세포의 증식 억제는 necrosis 가 아닌 apoptosis 유발과 연관성이 있었으며, 비기환 추출물 처리군에서 apoptosis 유발

이 가장 높게 나타났음을 flow cytometry 분석의 결과로 알 수 있었다(Fig. 2). 아울러 전형적인 autophagy가 유발된 세포의 세포질 내에서 관찰되는 공포 형성의 빈도는 대철기탕, 목향빈랑환, 비기환 추출물 순으로 높게 관찰되어 3 가지 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발에는 autophagy가 관여할 가능성을 보여주었다(Fig. 1B).

Autophagy는 세포 내에서 불필요하거나 기능이 손상된 세포 성분을 제거하거나 재활용에 관여한다^{17,18}). 이는 분해 대상 성분들이 세포 내의 다른 성분들과 격리되도록 이중막에 둘러싸여 자가소화포(autophagosome)이 형성하여 라이소좀과 융합되는 단계를 포함한다^{19,20}). Autophagy가 일어나는 동안 LC3-I는 LC3-II로 가공되어 autophagosome 막으로 전위되고, ubiquitin-like protein conjugation이라는 Atg (autophagy related gene) 계열 단백질들이 막에 부착되는 현상이 동반된다. 이러한 근거로 LC3-II의 발현 증가는 autophagy 유도의 핵심적인 지표로 활용된다^{17,21}). 따라서 3 가지 추출물 처리에 따른 apoptosis 유발에 autophagy가 동반되는지를 Cyto-ID를 이용하여 조사한 결과, 대철기탕 추출물 처리군에서 autophagy 유발의 빈도가 가장 높게 나타났으며 비기환 추출물 처리군에서 가장 낮게 관찰되어 형태적 변화의 결과와 매우 일치하였다(Fig. 3A). 아울러 형광현미경을 이용한 결과에서도 flow cytometry에 의한 이러한 결과와 잘 일치되었다(Fig. 3B). 아울러 LC3-II의 발현도 비기환 및 목향빈랑환 처리군에 비하여 대철기탕 추출물 처리군에서 가장 높게 나타났다(Fig. 3C). 따라서 3 가지 처방전에 의한 Hep3B 세포의 증식억제에는 autophagy가 관여하고 있음을 알 수 있다.

다음은 이상에서 관찰된 3 가지 추출물 처리에 의한 autophagy의 유도가 Hep3B 세포의 증식억제에 어떠한 역할을 하는지를 조사하기 위하여 autophagy 저해제가 존재하는 조건에서 각 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발 빈도를 조사하였다. 본 연구에 사용된 autophagy 저해제인 BA1는 autophagy 후기의 autolysosome 형성을 억제하며, 3MA는 autophagy 초기의 phosphoinositide 3-kinase III complex를 억제하는 작용을 한다²²⁻²⁴). Fig. 3B의 결과에서 알 수 있듯이, 목향빈랑환 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발의 빈도는 autophagy 저해제가 존재하는 조건에

서 증가되었지만, 대철기탕 추출물에 의한 apoptosis 유발은 감소되었다. 잘 알려진 바와 같이, 특정 상황에 처한 세포에서 autophagy는 apoptosis 유도를 촉진하거나 억제하기 위한 수단으로 해석될 수 있다. 따라서 이러한 결과는 비기환 및 대철기탕 추출물 처리에 의한 autophagy는 증식억제와 연관된 apoptosis 유발에 관여하며, 목향빈랑환 추출물에 의한 autophagy는 세포의 생존을 위한 과정으로 유추할 수 있다.

Autophagy가 세포의 손상된 부분이나 수명이 다한 세포 내 기관들을 기본적인 단위로 재활용하는 포괄적인 내용이라면, mitophagy는 에너지 생성을 책임지는 부분인 mitochondria의 재활용 과정을 의미하는 더 구체적인 세포 내 활동이다. 즉 autophagy에 의한 mitochondria의 선택적 분해 과정으로 손상된 mitochondria의 제거 과정이다^{25,26}). 본 연구의 결과에 의하면, serine-threonine kinase의 일종으로 mitophagy에 중심적으로 관여하는 조절자인 PINK1의 발현^{25,27})이 비기환과 대철기탕 추출물 처리군에서 대조군에 비하여 큰 감소를 보여주었으나, 목향빈랑환 추출물 처리군에는 다소 증가하였다. 그리고, E3 ubiquitin ligase에 해당하는 또 다른 mitophagy 조절 인자인 Parkin의 발현^{27,28})은 3 가지 추출물이 처리된 Hep3B 세포에서 큰 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4A). 비록 이들 단백질의 발현 변화만으로 결론짓기는 어려우나, 3 가지 추출물 중, 대철기탕 추출물 처리에 의한 Hep3B 세포에서의 apoptosis 유도에는 mitochondria 기능 손상에 따른 mitophagy가 다른 2 가지 추출물 처리군에서 보다 더 관여하는 것 같다.

한편 purine의 이화 작용, 지방산의 베타 산화, 담즙산 합성 및 에테르 인지질 합성을 위한 주요 대사가 일어나는 peroxisome은 대부분의 진핵생물에서 발견되는 세포 내 소기관의 하나이며, peroxisome 효소들은 다양한 신호에 대한 대사 반응의 조절에 관여한다^{29,30}). 또한, peroxisome은 ROS 및 반응성 질소종(reactive nitrogen species)의 생성 및 소거를 위한 중요한 산화 환원 조절 소기관이다^{31,32}). 다른 세포 내 소기관과 마찬가지로 peroxisome은 비정상적인 병리학적인 상황을 차단하기 위해 적절한 수와 크기 및 기능을 유지하기 위해서는 peroxisome의 biogenesis가 엄격하게 조절되어야 한다^{33,34}). 따라서 peroxisome을 표적으로 하는 pexophagy는 peroxisome과

연관된 질환에서 peroxisome의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 선택적 분해에 대한 이화적인 과정이며, pexophagy에 대한 몇몇 주요 조절인자들이 최근 확인되었다. Peroxisome의 biogenesis의 중요한 역할을 하는 PEX 단백질은 30여 종 알려져 있으며, 이들은 peroxisome 기질로의 PMP 이동을 조절함으로써 정상적인 peroxisome의 기능 유지를 필수적이다^{35,36}. 그중 PEX5는 peroxisome 막의 peroxisomal targeting signals (PTSs) 수용체에 결합하여 peroxisome biogenesis에 요구되는 단백질들을 peroxisome 기질로 이동하는데 관여한다^{35,37}. 본 연구의 결과에 의하면 3가지 추출물이 처리된 Hep3B 세포에서 PMP70의 발현에는 큰 변화가 없었다(Fig. 4A). 그러나 비기환 및 목향빈랑환 추출물이 처리된 세포에서는 PEX5의 발현이 현저하게 저하되었으나, 대칠기탕 추출물 처리군에서는 다소 증가하거나 감소되는 경향성은 보이지 않았다. 따라서 비기환 추출물 처리에 의한 Hep3B 세포의 증식 억제에는 pexophagy가 우세하게 작용하고, 대칠기탕의 경우 autophagy 유도와 연관성이 있음을 알 수 있다. 비록 목향빈랑환 추출물의 경우에도 pexophagy가 관여할 가능성을 보였으나, pexophagy에 대한 반응성이 다른 점을 고려할 경우, 비기환 및 대칠기탕 추출물 처리군과는 차이가 있음은 확실하며, 이에 대한 추가 연구가 요구된다.

정상적인 호흡 과정에서 생성되는 적정 수준의 ROS는 세포의 기능 유지를 위한 신호분자로 작용하지만, 항산화 시스템의 파괴나 과도한 ROS의 축적은 세포 내 구성물들의 산화적 변형을 통한 세포의 죽음을 유도할 수 있다^{38,39}. 특히, mitochondria는 ROS의 생성을 담당하는 주요 세포 내 소기관이면서 apoptosis 유도를 위한 ROS의 주요 표적이기도 하다^{40,41}. ROS의 과도한 생산으로 인한 mitochondria 내부 막에서 호흡기 사슬의 기능 상실을 초래하여 에너지 대사를 교란하며, mitochondria 기능 장애에 의한 mitochondria 막 전위(mitochondrial membrane potential)의 소실은 cytochrome c를 세포질로 유리시켜 intrinsic apoptosis 경로의 활성을 개시한다^{42,43}. 따라서, 세포 내 ROS 생성을 증가시키는 것은 intrinsic apoptosis 경로의 활성화를 통해 암세포를 사멸시키기 위한 이상적인 메커니즘 중 하나로 여겨진다^{39,40}. 따라서 3가지 추출물 처리에 따른 Hep3B

세포의 증식 억제 및 apoptosis 유도에 ROS 생성이 관여하는지를 조사하였으며, 비기환 추출물이 처리된 Hep3B 세포에서 ROS의 생성이 가장 높게 나타났다(Fig. 4A). 이는 아마도 비기환 추출물 처리군에서 pexophagy가 높게 나타났던 것과 연관성이 있는 것으로 생각된다. 이러한 비기환 추출물 처리에 의한 ROS의 과다 축적이 Hep3B 세포의 증식 억제와 apoptosis 유도에 직접 관여하는지를 조사한 결과, ROS의 생성을 인위적으로 차단하였을 경우, 비기환 추출물 처리에 의하여 감소되었던 세포의 증식율이 대조군 수준으로 회복이 되었으며, apoptosis 유도의 빈도도 현저하게 감소되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 비기환 추출물 처리에 의한 Hep3B 세포의 증식억제와 apoptosis 유도에 ROS 의존적으로 이루어짐을 의미하는 것이며, apoptosis 유도에는 mitochondria 기능 장애와 연관된 intrinsic apoptosis 경로의 활성화가 관여하였을 것으로 추정된다. 그러나 대칠기탕 및 목향빈랑환 추출물 처리군에서는 유의성의 판단이 어려웠다. 이는 아마도 두 추출물에 의한 apoptosis 유발 빈도가 낮기 때문이라 추정된다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이, 본 연구에서 사용된 3가지 처방전에 대한 Hep3B 간암세포에 대한 항암 활성은 비기환 추출물에서 가장 높게 나타났으며, 이는 오적과 적병에 사용되어 온 대칠기탕과 목향빈랑환 보다 비기환이 간접에 사용되어온 처방이란 점과도 연계된다⁹). 아울러 ROS의 생성 증가와 연관된 mitochondria 기능 손상에 의한 mitophagy 활성 또는 pexophagy가 관여할 가능성도 비기환 추출물 처리군에서 높게 나타났다. 그리고 비기환 추출물뿐 만 아니라 대칠기탕 추출물 처리에 의한 autophagy는 apoptosis에 의한 세포의 죽음에 기여하였을 것으로 추정된다. 또한 목향빈랑환 처리군에서 관찰되는 autophagy는 Hep3B 세포의 증식억제 및 apoptosis 과정에서 세포의 생존을 위한 과정으로 해석된다. 그러나 이들 3가지 추출물에 대한 Hep3B 세포의 서로 다른 반응에 대한 연구는 추가적으로 더 조사되어야 할 것이며, 이러한 결과들은 간 기능 손상과 연관된 처방전들의 기전을 이해하기 위한 기초 자료로서 활용될 것이다.

V. 결론

본 연구의 결과에 의하면 조사된 3 가지 처방전의 열수 추출물 중에서 비기환 추출물이 대칠기탕과 목향빈랑환 추출물에 비하여 Hep3B 간암세포에 대한 항암활성이 가장 높게 나타났다. 이들의 항암활성은 necrosis 가 아닌 apoptosis 및 autophagy 유도와 연관성이 있었고, 비기환 및 대칠기탕 추출물 처리에 의한 autophagy 는 apoptosis 유발에 관여하며, 목향빈랑환 추출물에 의한 autophagy 는 세포의 생존을 위한 과정으로 나타났다. 그리고 비기환 추출물 처리에 의한 apoptosis 유도에는 mitochondria 기능 손상에 따른 mitophagy 가 다른 2 가지 추출물 처리군에서 보다 더 유도되었다. 아울러 비기환 추출물 처리에 의한 Hep3B 세포의 apoptosis 에는 pexophagy 가 관여할 가능성을 보여주었으며, ROS 의 생성도 비기환 추출물 처리군에서 가장 높게 나타났다. 또한 비기환 추출물의 항암활성은 ROS 의 의존적인 현상임을 확인하였다. 현재까지 항암활성을 지니는 약물에 의한 암세포의 죽음에서 apoptosis 와 autophagy 유도 사이에서의 연계성은 여전히 논란의 여지가 있다. 특히 세포의 운명 조절에서 autophagy 가 apoptosis 를 촉진시키거나 억제할 수 있다는 측면에서 항암제 발굴의 중요한 표적임은 확실하다. 이 과정에서 mitophagy 와 pexophagy 의 연관성 또한 해결해야 할 문제이다. 따라서 이들 처방전에 의한 간암세포의 apoptosis 유도에 동반된 autophagy 가 mitophagy 와 pexophagy 와의 어떤 연계성이 있는지를 밝히는 연구는 지속적으로 이루어져야 할 것이다. 본 연구의 결과는 이러한 추가 연구를 통하여 간암과 연관된 전통 처방전의 효능과 기전을 이해하기 위한 기초 자료로서 활용될 것이다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (2018R1A2B2005705).

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69:7-34.
2. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *J Epidemiol Glob Health.* 2019;9:217-22.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87-108.
4. Brown ZJ, Heinrich B, Greten TF. Mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and highlights for immunotherapy research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15:536-54.
5. Soussi T, Ishioka C, Claustres M, Bérout C. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:83-90.
6. Xu W, Yu J, Wong VW. Mechanism and prediction of HCC development in HBV infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31:291-8.
7. Chow HC, So TH, Choi HCW, Lam KO. Literature review of traditional Chinese medicine herbs-induced liver injury from an oncological perspective with RUCAM. *Integr Cancer Ther.* 2019;18:1534735419869479.
8. Xi SY, Minuk GY. Role of traditional Chinese medicine in the management of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2018;10:799-806.
9. Heo J, 2012. In: Kang C.H. (Eds.), *DonguiBogam (Principles and Practice of Eastern Medicine)*. Seoul, Korea, Bubin Publishers Co.
10. Han SI, Kang BK. Antitumor effects of bigihwan on tumor cells derived from leukemia and lymphoma patients. *J Int Korean Med.* 1991;12:1-15.
11. Kang DG, Kang BK. Antitumor effects of sigbunhwan and bigihwan on tumor cells derived from leukemia and lymphoma patients. *J Int Korean Med.* 1991;12:96-112.

12. Kim HY, Ko SJ, Bang CH, Shin SH, Lee DY, Lee I. Effects of daechilgi-tang on glutamate-induced apoptosis in C6 glial cells. *Korean J Orient Int Med.* 2010;31:693-705.
13. Baik TH, Lee I. An experimental study on the effects of mkwhyangbinrang-whan. *J Int Korean Med.* 1997;18:373-90.
14. Wang Y, Zhong J, Bai J, Tong R, An F, Jiao P, He L, Zeng D, Long E, Yan J, Yu J, Cai L. The application of natural products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways. *Curr Drug Metab.* 2018;19:739-49.
15. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43:582-92.
16. Lee YS, Lee DH, Choudry HA, Bartlett DL, Lee YJ. Ferroptosis-induced endoplasmic reticulum stress: Cross-talk between ferroptosis and apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2018;16:1073-6.
17. Yan X, Zhou R, Ma Z. Autophagy-cell survival and death. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:667-96.
18. Lin L, Baehrecke EH. Autophagy, cell death, and cancer. *Mol Cell Oncol.* 2015;2:e985913.
19. Condello M, Pellegrini E, Caraglia M, Meschini S. Targeting autophagy to overcome human diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20:E725.
20. Russo M, Russo GL. Autophagy inducers in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2018;153:51-61.
21. Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72:4721-57.
22. Galluzzi L, Green DR. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery. *Cell.* 2019;177:1682-99.
23. Castino R, Bellio N, Follo C, Murphy D, Isidoro C. Inhibition of PI3k class III-dependent autophagy prevents apoptosis and necrosis by oxidative stress in dopaminergic neuroblastoma cells. *Toxicol Sci.* 2010;117:152-62.
24. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct.* 1998; 23:33-42.
25. Biel TG, Rao VA. Mitochondrial dysfunction activates lysosomal-dependent mitophagy selectively in cancer cells. *Oncotarget.* 2017; 9:995-1011.
26. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 462:245-53.
27. Miller S, Muqit MMK. Therapeutic approaches to enhance PINK1/Parkin mediated mitophagy for the treatment of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2019;705:7-13.
28. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12:9-14.
29. Wanders RJ, Waterham HR, Ferdinandusse S. Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Front Cell Dev Biol.* 2016;3:83.
30. Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. Peroxisomal beta-oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763:1413-26.
31. Du H, Kim S, Hur YS, Lee MS, Lee SH, Cheon CI. A cytosolic thioredoxin acts as a molecular chaperone for peroxisome matrix proteins as well as antioxidant in peroxisome. *Mol Cells* 2015;38:187-94.
32. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822:1363-73.
33. Honsho M, Yamashita S, Fujiki Y. Peroxisome homeostasis: Mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863:984-91.

34. Waterham HR, Ferdinandusse S, Wanders RJ. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:922-33.
35. Giannopoulou EA, Emmanouilidis L, Sattler M, Dotz G, Wilmanns M. Towards the molecular mechanism of the integration of peroxisomal membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:863-9.
36. Kiel JA, Veenhuis M, van der Klei IJ. PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic*. 2006;7:1291-303.
37. Platta HW, Hagen S, Reidick C, Erdmann R. The peroxisomal receptor dislocation pathway: to the exportomer and beyond. *Biochimie*. 2014;98:16-28.
38. Bolhassani A. Cancer chemoprevention by natural carotenoids as an efficient strategy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2015;15:1026-231.
39. Badrinath N, Yoo SY. Mitochondria in cancer: In the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. *Carcinogenesis*. 2018;39:1419-30.
40. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;80:50-64.
41. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med*. 2017;104:144-64.
42. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25:4798-811.
43. Hata AN, Engelman JA, Faber AC. The BCL2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discov*. 2015;5:475-87.

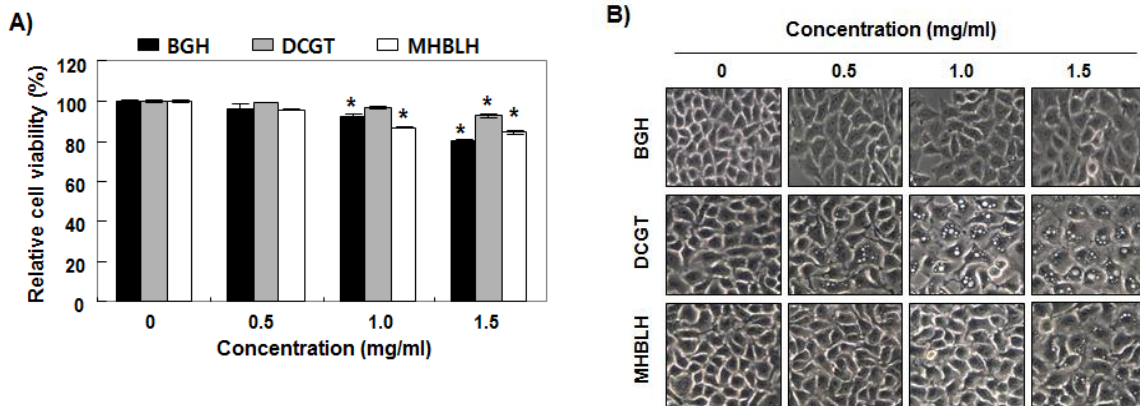


Fig. 1. Effects of water extracts of Bighwan (BGH), Daechilgitang (DCGT) and Mokwhyangbinranghwan (MHBRLH) on the cell viability of Hep3B hepatocellular carcinoma cells. Hep3B cells were treated with different concentrations of BGH, DCGT and MHBRLH for 24 h. (A) Cell viability was assessed by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments (* p <0.005 compared to control). (B) Morphological changes of Hep3B cells were observed by a phase-contrast microscope. Representative photographs of the morphological changes are presented.

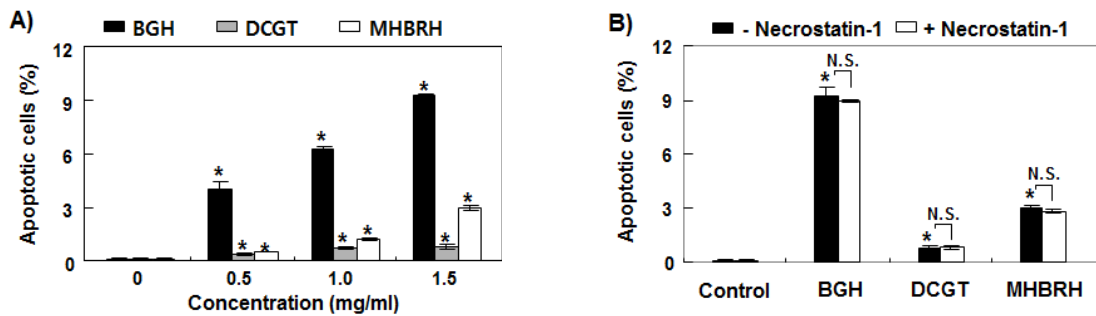


Fig. 2. Effects of BGH, DCGT and MHBRLH on the induction of apoptosis in Hep3B cells. (A) After treatment with the indicated concentrations of BGH, DCGT and MHBRLH for 24 h, the cells were collected, fixed, and stained with annexin V-FITC and PI for flow cytometry analysis. (B) The cells were pretreated with or without 60 μ M necrostatin-1, a pharmacological inhibitor of necrosis, for 1 h, before 1.5 mg/ml BGH, DCGT and MHBRLH treatment for 24 h. The percentages of apoptotic cells were determined by expressing the numbers of Annexin V⁺ cells as percentages of all the present cells.(AandB)The results are presented as the mean \pm SD of three independent experiments (* p <0.005 compared to control; N.S., not significant).

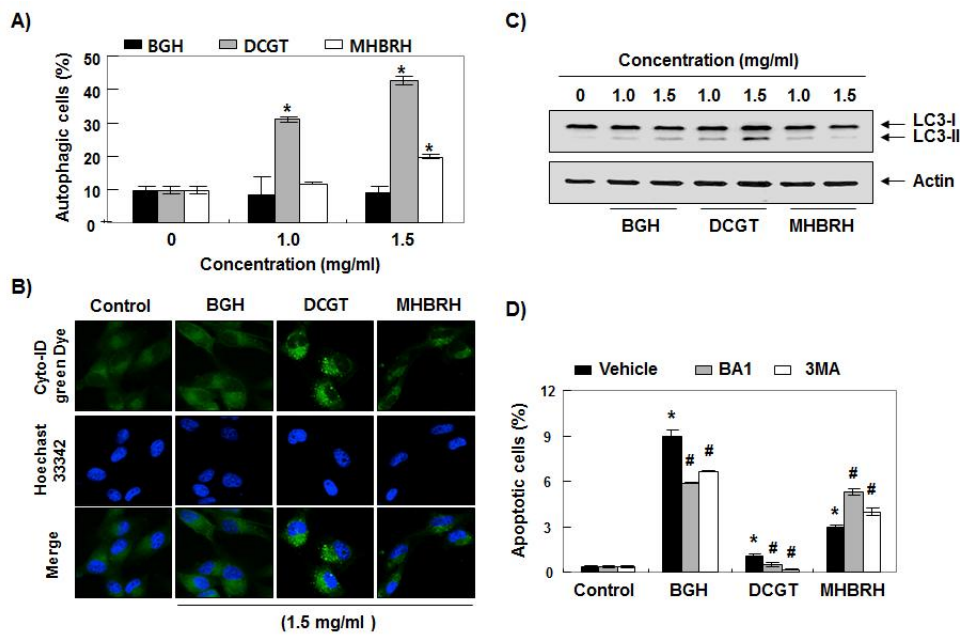


Fig. 3. Effects of BGH, DCGT and MHRBH on the induction of autophagy in Hep3B cells. Cells were treated with different concentrations (A and C) or 1.5 mg/ml (B) BGH, DCGT and MHRBH (C) for 24 h. (A) The cells were stained by the Cyto-ID autophagy detection kit and analyzed using the green (FL1) channel of the flow cytometer. (B) Hoechst 33342 staining (blue) indicates nucleus and Cyto-ID green staining (green) autophagy status. (C) The equal amounts of proteins were subjected to Western blot analysis using anti-LC3 antibody and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (D) Cells were pretreated with 0.5 μ M BA1 or 0.5 mM 3MA 1 h prior to BGH, DCGT and MHRBH treatment for 24 h. The percentages of apoptotic cells were determined by expressing the numbers of Annexin V⁺ cells as percentages of all the present cells. The results are presented as the mean \pm SD of three independent experiments (* p <0.005 compared to control; # p <0.005 compared to BGH-, DCGT- or MHRBH-treated cells).

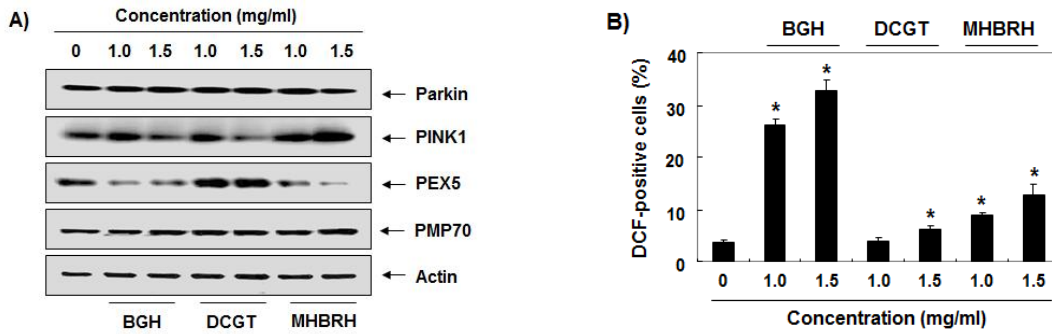


Fig. 4. Effects of BGH, DCGT and MHRBH on the expression of mitophagy and pexophagy regulatory proteins in Hep3B cells. (A) After treatment with the indicated concentrations of BGH, DCGT and MHRBH for 24 h, the equal amounts of proteins were subjected to Western blot analysis using the indicated antibodies and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) After treatment with the indicated concentrations of BGH, DCGT and MHRBH for 1 h, the medium was discarded and the cells were incubated with medium containing DCF-DA. ROS generation was measured using flow cytometry. Each bar presents the mean \pm SD of three independent experiments (* p <0.005 compared to control).

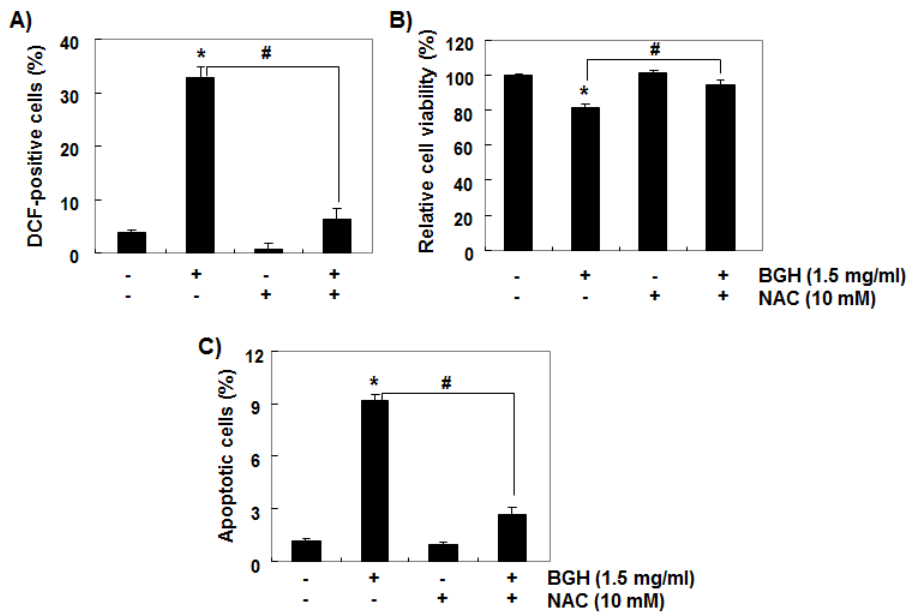


Fig. 5. Effects of ROS generation on the apoptosis induced by water extracts of BGH in Hep3B cells. The cells were pre-treated with or without 10 mM NAC for 1 h before 1.5 mg/ml BGH treatment for 1 h (A) or 24 h (B and C). (A) The cells were incubated for 20 min with medium containing DCF-DA and then ROS generation was measured using flow cytometry. (B) Cell viability was assessed by the MTT assay. (C) The percentages of apoptotic cells were determined using flow cytometry by expressing the numbers of Annexin V⁺ cells as percentages of all the present cells. The results are presented as the mean \pm SD of three independent experiments (* p <0.005 compared to control; # p <0.005 compared to BGH-treated cells).