대한한방내과학회지 제21권 1호(2000년 8월)
Korean J.Orient.Int. Med. 2000;21(1):65-73

八珍湯合化積丸의 抗腫瘍 效果에 關한 硏究

김성진*, 송봉길*, 이건업*, 원진희*, 문 구*, 문석재*, 소홍섭**, 박래길**

* 원광대학교 한의과대학 소화기내과학교실, ** 원광대학교 의과대학 미생물학교실

Experimental Studies on Antitumor Effects of Paljin-tang hab Hwajuck-hwan

Sung-Jin Kim, Bong-Gil Song, Gun-Up Lee, Jin-Hee Won, Gu Moon, Seok-Jae Moon, Hong-Sup So, Rea-Gil Park

* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang university
** Dept. of Microbiology, College of Medicine, Wonkwang University

Objectives : The effects of cotreatment of adriamycin and ethanol extract of herb (Palgin-tang hab Hwajuck-hwan a traditional medicine for cancer treatment in oriental medicine) on the induction of apoptotic cell death were investigated in human liver origin cell lines, Chang.

Methods : Chang(ATCC) liver cells were cultured in RPMI-1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) badge including 10% fetal bovine serum. Chang liver cells were treated with various concentrations(from 10 to 0.16㎍) of adriamycin and herb extract(from 500 to 31.25㎍). After 48h later, the cells were tested for viability by Crystal violet staining assay. Adriamycin and Herb extract induced ladder pattern of DNA fragmentation in Chang cells. Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gels. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Results : The death of Chang cells was synergistically induced by the cotreatment of adriamycin and ethanol extract of herb. In addition, the cotreatment-induced cell death of Chang cells was mediated by apoptotic death signal processes.

The phosphotransferase activity of JNK1 remained in a basal level in Chang cells which was treated individually with the adriamycin and ethanol extract of herb. However, it was markedly increased in Chang cells which was cotreated with adriamycin and ethanol extract of herb. In addition, the expression of Fas and FasL was markedly induced by the cotreatment of adriamycin and herb extract. For a while, the expression of Bax was a eminently increased by the ethanol extract of herb. However, Bcl2 expression was not affected by the individual or cotreatment of adriamycin and herb extract.

Conclusions : our results suggest that the cotreatment of adriamycin and ethanol extract of herb induces synergistic apoptotis of human liver origin Chang cells via the upregulation of JNK, Fas, FasL and Bax.

Key Word : Antitumor Effect, Paljin-tang hab Hwajuck-hwan, Adriamycin

I. 緖 論

癌이란 人體內에서 성숙한 또는 발육중인 정상세포가 여러 가지 요인으로 인하여 과도하게 증식하거나 이상 분화하여 형성되는 新生物로, 첫째 不規則하고 빠른 成長을 하며 둘째 浸潤性 혹은 侵入性 成長을 하여 정상조직을 破壞하고 셋째 체내 여러 부위로 擴散 및 轉移를 일으켜 인간의 健康과 生命에 危害를 주는 엄중한 疾病이다[1].

西洋醫學에서는 癌의 發生因子로 電離放射線, 담배, 飮酒 및 바이러스, 장기간 다량의 藥物 服用, 食餌的 問題, 寄生蟲 疾患 등과 함께 飮食, 水質, 大氣등의 환경오염과 복잡한 산업사회에서의 각종 정신 심리적 스트레스 등으로 발생한다고 인식하고 있다[2-3]. 그 治療로는 外科的 手術, 放射線, 化學藥物, 內分泌, 免疫調節 등의 방법을 活用하고 있으나 불확실한 효과와 毒性 및 副作用으로 인한 傷害등이 문제점으로 대두되고 있다.

韓醫學에서의 癌治療는 癌의 原因을 脾·肺·腎의 機能失調로 인하여 氣血滯로 痰이 形成되는 것으로 보아 病因, 病位, 性質 및 病人의 상태에 따라 陰陽氣血과 臟腑의 虛實에 근거하여 益氣補脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 방법의 단순히 補益藥만을 위주로 하는 扶正固本法과 行氣理氣, 活血化瘀, 淸熱利濕, 軟堅散結하는 攻邪法 및 扶正固本法과 攻邪法을 并用하는 扶正祛邪法 등의 3가지로 分類하여 활용하고 있다[4-5].

最近에는 西洋醫學에서 사용되는 抗癌劑의 副作用을 줄이면서 抗腫瘍效果를 極大化하기 위하여 韓藥을 결합하는 治療硏究[6-7]가 활발히 진행되어지고 있다. 이러한 硏究의 일환으로 본 연구에서는

교신저자 : 김성진 (주소 : 인천시 서구 석남2동 583-44 김성진한의원, 전화 : 032)573-0114, FAX : 032)576-9219)

西洋醫學에서 白血病이나 lymphoma 등의 癌治療에 광범위하게 사용되고 있는 adriamycin과 韓醫學에서 癌治療에 사용되고 있는 八珍湯合化積丸 抽出物을 사람의 간세포에서 유래된 Chang 간암세포에 각각 혹은 병용을 사용하여 관찰한 바 유의성이 있기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥 材

八珍湯合化積丸의 處方內容은 潘敏求의 中華腫瘤治療大成[8]에 依據하였으며, 本 實驗에 使用한 藥材는 圓光大學校附屬全州韓方病院에서 購入하여 嚴選한 것을 使用하였다. 1貼의 分量은 다음과 같다(Table 1).

2) 檢液調製

實驗에 使用된 藥材는 에탄올용매를 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 먼저 물 추출물(H_2O extract)은 八珍湯合化積丸 145g을 에탄올 1 *l*와 함께 플라스크 넣어 하루 동안 우러나오도록 방치한 다음 거즈로 濾過하고 3,200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(Rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥시킨 것을 試料로 使用하였다. 이 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물을 이하 Herb extract라 부른다.

2. 方 法

1) Chang 肝癌細胞株 培養

사람의 간세포로부터 유래된 肝癌細胞株인 Chang(ATCC)는 CO_2 세포배양기에서(37℃, 5% CO_2) 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 한약제를 처리한 뒤 세포의 아포토시스 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다. 이 Chang 세포는 hela marker를 가지고 있는 암세포이며 nude mouse에 이식시 종양을 형성한다.

2) 細胞 viability 測定

세포의 활성도는 crystal violet staining 방법[9]을 이용하였다. 간기하면 세포배양판(24-well plate)에 세포를 1×105씩 1*ml*의 배양액에 넣어 분주한 후, 8시간이상 CO_2 세포배양기 안에서 방치시켜 부착시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 한약제등을 처리한 다음 crystal violet staining 용액(0.5% crystal violet(w/v), 30%(v/v) ethanol, 3% formaldehyde)을 200*μl*씩 넣고 상온에서 10분간 염색시킨다. 이후 흐르는 물에 세척하면 부착된 상태로 고정된 살아있는 세포에만 염색이 이루어지며 죽은 세포들은 부착능력을 상실하기 때문에 세척시 제거케 된다. 염색정도는 1*ml*의 1% SDS 용액으로 3시간 동안 교반기에서 반응시켜 녹인 후 ELISA reader로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) DNA추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega Co, Medison, WI)를 이용하여 추출하였다. 먼저 한약제가 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260nm와 280nm의 Spectrophotometer(Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 OD 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5*μg*을 1.8 % agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등

Table 1.

韓藥名	生 藥 名	重 量(g)
人 蔘	Radix ginseng	12
茯 苓	Poria	12
生地黃	Rhizoma rehmanniae	12
鱉 甲(醋)	Carapax amydae	12
穿山甲	Squama manitis	12
白 朮	Rhizoma atractylodia macrocephalae	10
當 歸	Radix angelicae gigantis	10
赤芍藥	Radix paeoniae rubra	10
三 稜	Rhizoma scirpi	10
蓬 朮	Rhizoma curcumae zedoariae	10
香附子	Rhizoma cyperi	10
乳 香	Mastrix	10
川 芎	Rhizoma cnidii	9
甘 草	Radix glycyrrhizae	6
Total		145

아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

4) Hoechst saining

약제가 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342(Sigma Biosciences, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 10㎛M이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 씻어서 형광 현미경으로 관찰하였다.

5) In vitro immunocomplex kinase assay

배양된 HL-60 세포(2×10^6 세포/treatment)에 다양한 시간 동안 200㎍/㎖ 농도의 백화사설초 메탄올 추출물을 처리한 후에 포집하여 cold PBS로 2회 세척한다. 이를 1㎖의 추출용해완충액(Extraction Buffer(EB))를 가하여 30분동안 파쇄얼음상에서 용해시킨 후, 30분동안 12,000rpm, 4oC에서 원심분리하여 상층액만을 다른 튜브에 모았다. 여기에 JNK1 대한 항체(Anti-JNK1 (C17), Santa Cruz Biotechnology Inc, CA. U.S.A)를 1㎍ 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 여기에 미리 EB buffer로 씻어준 10%(v/v)의 pansorbin (Calbiochem, CA, U.S.A) 용액 100㎕씩을 넣고 1시간 동안 얼음 위에서 반응시켜 준 후 4,000rpm에서 5분동안 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 다시 동일 EB buffer로 1회, PAN buffer(10mM Pipes, pH 7.4, 0.1M NaCl, 0.1% aprotinin)로 2회 더 세척한 후 상층액을 버리고 면역반응 침전체만을 얻었다. 카이네이즈 효소활성측정은 여기에 1㎍ GST-c JUN과 2 ㎕Ci의 γ-^{32}P ATP를 최종 20㎕의 kinase reaction buffer(Tris-HCl pH 7.5, 20mM, $MgCl_2$, 20mM, DTT 2mM, cold ATP 20mM)를 넣고 voltexing에 의해 resuspensiom 시킨 후 30oC에서 20분 동안 반응을 진행시켰다. 여기에 20㎕의 SDS-PAGE sample buffer 를 넣고 98oC에서 5분간 끓인 후 12.5%의 SDS-PAGE를 행한다. 이후 이 gel을 말린 후 autoradiography에 의해 활성정도를 판단하였다. JNK1의 기질인 GST-c-Jun 단백질은 full sequence c-Jun cDNA의 아미노산 서열 1-79까지만을 pGEX 2T vector에 삽입 후에 E. coli BL-21(DE3)에서 발현시켰다. E. coli에서 발현된 GST-cJUN 단백질은 glutathione-conjugated Sepharose beads(Pharmacia Co, Sweden)을 이용하여 순수분리한 후 정량하여 사용하였다.

6) 한약제의 Chang 간암세포의 세포고사시 Fas, Fas L, Bcl2 및 Bax 단백질의 발현변화측정 - Western blotting

배양된 Chang 간암세포에 한약제를 다양한 시간 동안 처리 후 세포를 포집하여 차가운 Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 RIPA 용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 ㎍/㎖ aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2×sample buffer와 섞어 100℃에서 3분간 끓인 후, 10% sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4℃, 30V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking buffer (10% skim milk)로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Fas, Fas L, Bcl2 및 Bax 등에 대한 항체를 Tris-buffered saline에 1 : 1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 상기 항체들은 모두 미국의 Santa Cruz사로부터 구입하여 사용하였다. 2차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase(TBS로 1 : 1,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit : Amersham, England)를 사용하여 필림에 노출시켰다.

III. 實驗成績

1. Ardiamycin 및 Herb extract가 간암세포주 Chang의 細胞生存率에 미치는 影響

Adriamycin 처리군의 경우 농도 의존적인 세포죽음이 관찰되었다. 10㎍/㎖ 농도의 adriamycin 처리시 대략 40%정도의 생존율을 보여주었으며 0.5㎍/㎖ 이하의 ADR농도하에서는 거의 세포독성을 보이지 못하였다(Fig. 1A). 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물의 경우도 농도의존적으로 Chang세포의 생존율을 감소시켰다. 특히 500㎍/㎖의 에탄올 추출물 처리시 거의 모든 세포의 세포죽음을 초래하였다. 그러나 62.5㎍/㎖의 에탄올 추출물 처리 농도하에서는 거의 세포사멸을 유도하지 못하였다(Fig. 1B).

2. Ardiamycin 및 Herb extract의 동시처리가 간암세포주 Chang의 細胞生存率에 미치는 影響

Adriamycin 단독으로는 그리 크게 세포죽음을 일으키지 못하는 1, 0.5 및 0.4㎍/㎖ 농도와 여기에 250에서 15.6㎍/㎖ 농도까지의 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물을 각각의 조합으로 병용처리 후 24시간 후에 생존율을 측정하였다. 1㎍/㎖ 농도의 adriamycin 단독으로는

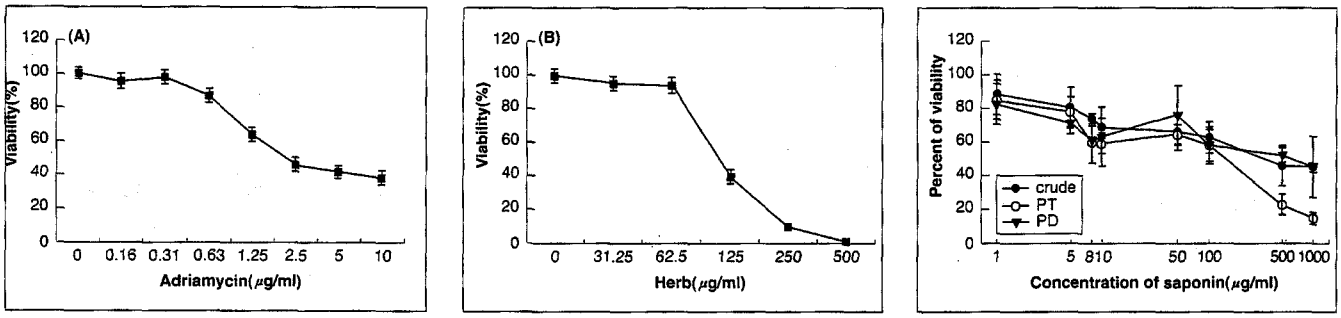

Fig 1. Effects of adriamycin and herb extract on the viability of Chang cells in a dose dependent manner. Chang liver cells were treated with various concentrations(from 10 to 0.16μg) of adriamycin(A) and herb extract(from 500 to 31.25μg)(B). After 48h later, the cells were tested for viability by Crystal violet staining assay. The data represented mean + S. D. of triplicates.

Fig 3. Cotreatment of adriamycin and herb extract induced chromatin condensation and fragmentation in Chang cells. The cells were treated with 1μg/*ml* of adriamycin alone(B), 31.25μg/*ml* of herb extract alone(C), or adriamycin(1μg/*ml*) plus herb extract(31.25μg/*ml*)(D). Control cells were shown in A. Then, the cells were stained with Hoechst dye 33342 and observed by fluorescence microscopy.

Table 2. Effects of cotreatment of adriamycin and herb extract on the viability of Chang cells. Chang cells were treated with each drug(adriamycin or herb extract) alone or combination of adriamycin and herb extract for 24h. Then, the cells were tested for viability by crystal violet staining assay.

Herb(μg/*ml*) / ADR(μg/*ml*)	--	250	125	62.5	31.25	15.6
-	100	1.5	38.5	98.02	96.9	97.2
1	72.4	1.3	18.2	26.9	20	21.4
0.5	90.2	1.5	32.9	65	67.4	82.5
0.4	98.9	1.7	31.7	95.1	100	97

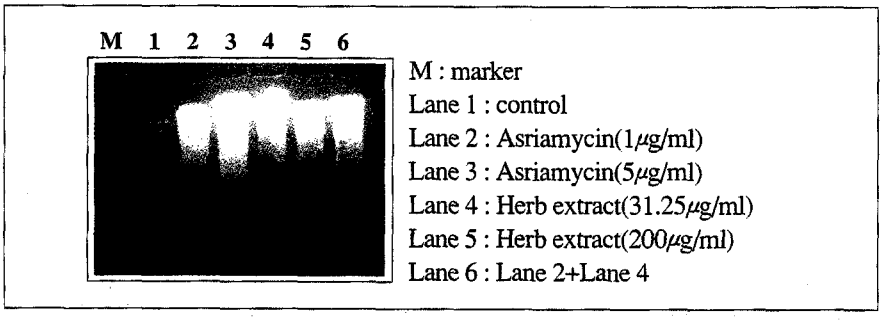

Fig 2. Adriamycin and Herb extract induced ladder pattern of DNA fragmentation in Chang cells. The cells were treated with 5 and 1μg/*ml* of adriamycin alone(lane 2, 3), 200 or 31.25μg/*ml* of herb extract(lane 4, 5) or adriamycin (1μg/*ml*) plus herb extract(31.25μg/*ml*)(lane 6). Genomic DNA was isolated and separated on 1.5%agarose gels. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

대략 20% 정도의 Chang 세포의 세포 죽음을 유발시킬 수 있으며, 31.25μg/*ml* 농도의 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물 단독으로는 거의 Chang 세포에 대한 세포독성을 보일 수 없었으나 이들의 병용처리시는 현저하게 Chang 세포에 대한 세포죽음을 야기시켰다(Table 2). 이러한 시너지적인 항종양효과의 증진은 다른 농도의 조합에서도 역시 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 세포죽음을 유도하는 시간도 각각의 고농도 단독처리시 보다 훨씬 빠른 시간내에 일어남을 확인하였다.

3. Ardiamycin 및 Herb extract 유도성 간암세포주 Chang의 세포죽음성격(apoptotic or necrotic death) 규명

Adriamycin 및 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물에 의한 Chang세포의 죽음 기전이 세포고사(apoptosis)성 혹은 괴사(necrosis)성 과정에 의하여 이루어졌는지를 확인하기 위해 agarose electrophoresis 법을 이용한 아포토시스 현상의 특징인 ladder형 DNA 분절 및 Hoechst staining에 의한 nucleus의 염색을 통하여 chromatin의 condensation과 fragmention을 확인하였다(Fig. 2,3). Agarose electrophoresis에 의한 DNA 분절 현상을 관찰키 위해 adriamycin, herb extract 단독 혹은 이들을 병용처리 후 DNA를 추출하여 1.5% agarose

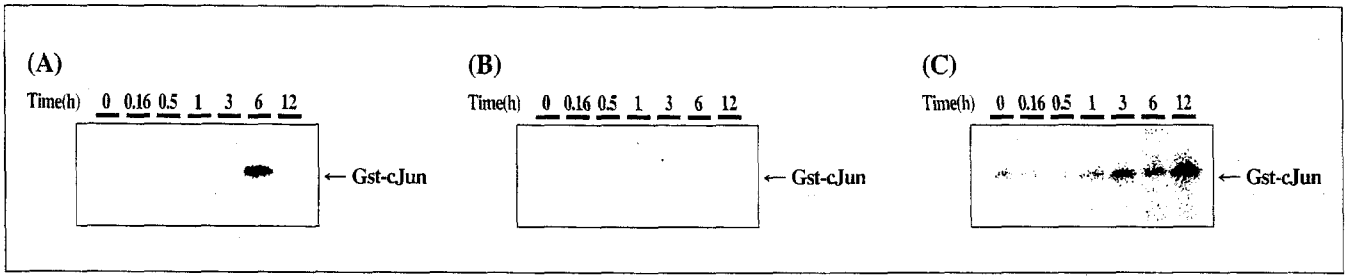

Fig 4. Cotreatment of adriamycin and herb extract activated JNK in Chang cells. The cells were treated with 1μg/ml of adriamycin(A), 31.25μg/*ml* of herb extract(B), or adriamycin(1μg/*ml*) plus herb extract (31.25μg/*ml*)(C) for various periods and the cell lysates were immunoprecipated with anti-JNK1 antibodies. The immune complex was reacted with 32P-ATP and c-Jun as substrate. The phospho- transferase activity of JNK1 was determined by using PhosphoImage analyzer(Fuji Co., Japan).

gel에 전기영동하였다. 이 후 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, adriamycin 및 200μg/*ml*농도의 herb 추출물 처리군 모두에서 ladder형의 DNA 분절이 관찰되었으며(Fig. 3), 또한 Hoechst staining에 의한 세포의 형광 현미경하에서의 관찰에서도 세포고사를 확인할 수 있는 chromatin의 응축 및 분절이 관찰되었다(Fig. 3B,3D). 따라서 adriamycin 혹은 Herb extract 처리시 나타나는 Chang 세포의 세포죽음은 세포고사(apoptosis)성격을 띠며 이들 저농도의 병용처리에 의한 세포죽음 역시 apoptosis과정임을 알 수 있다.

4. Ardiamycin 및 Herb extract의 동시처리가 Chang 간암세포에서의 JNK활성화에 미치는 影響

JNK/SAPKs는 세포가 자외선에 노출되었을 때 전사인자인 c-Jun을 인산화시키는 단백질로서 처음 발견되었으며, 생리적/환경적 스트레스 등의 자극에 의해 일련의 JNK kinase 군들이 활성화되어 세포고사(apoptosis), 분화(differentiation)와 활성화(activation) 등에 밀접한 관련을 보여주고 있음이 보고되고 있다. 따라서 저농도의 adriamycin(1μg/*ml*), 저농도 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물(31.25μg/*ml*) 및 이 둘의 병용처리시에 JNK 카이네이즈의 활성은 어떤 변화를 보이는지를 조사하였다. 먼저 1μg/*ml* 농도의 adriamycin 처리 후 처리시간에 따른 JNK1의 활성 변화를 조사하였다. JNK1 활성은 adriamycin 처리 3시간까지는 전혀 활성을 보이지 않다가 6시간째에 transient하게 활성을 보인 후 사라졌다(Fig. 4A). 한편, 八珍湯合化積丸 에탄올추출물 단독처리군에서는 어느 시간대에도 JNK 카이네이즈의 활성은 나타나지 않았다(Fig. 4B). 그러나 흥미롭게도 adriamycin(1μg/*ml*)과 八珍湯合化積丸 에탄올추출물 병용처리군에서는 1시간 후부터 JNK의 활성이 나타나기 시작하였으며, 12시간째 최고치에 달했다(Fig. 4C).

5. Ardiamycin 및 Herb extract의 동시처리가 Chang 간암세포에서의 Fas 및 Fas L발현양상 변화에 미치는 影響

Fas는 FasL에 결합함으로써 세포의 고사를 유발시킨다고 알려진 세포막의 단백질이며, Resting 상태의 림파구는 Fas의 발현이 낮거나 없는 상태이며 세포의 활성화시 발현이 증가되어 Fas-FasL 매개성 apoptosis를 촉진시키게 된다. 따라서 본 실험에서는 저농도의 adriamycin(1μg/*ml*), 저농도 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물(31.25μg/*ml*) 및 이 둘의 병용처리시에 Fas 및 Fas L의 발현양상 변화를 조사함으로서 adriamycin과 herb 추출물의 병용투여시 보여지는 synergistic cytoxicity의 기작을 설명하고자 하였다. 이를 위해 배양된 Chang 세포에 adriamycin (1μg/*ml*), 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물(31.25μg/*ml*) 및 이 둘의 병용처리 메탄올 추출물을 다양한 시간 동안 처리 후 세포를 포집하여 세포 파쇠액(cell lysate)을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착등을 거친 후 Fas 및 FasL에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. Fas 단백질은 adriamycin이나 herb 추출물 단독처리 군에서는 별다른 발현을 나타내지 않았으나 병용처리시에는 시간 의존적으로 그 발현이 현저하게 증가하였으며 6시간째에 최고 발현량을 보여주었다(Fig. 5). 한편 Fas L의 발현은 adriamycin이나 herb 추출물 단독처리군에서 모두 발현이 증가되어 나타난다. 그러나 병용투여시의 FasL의 발현이 각각의 단독처리시 보다 훨씬 증가되어 나타나다(Fig. 6). 따라서, 이러한 Fas와 FasL단백질의 발현시 adriamycin이나 herb 추출물의 단독처리군보다 병용처리 군에서 현저하

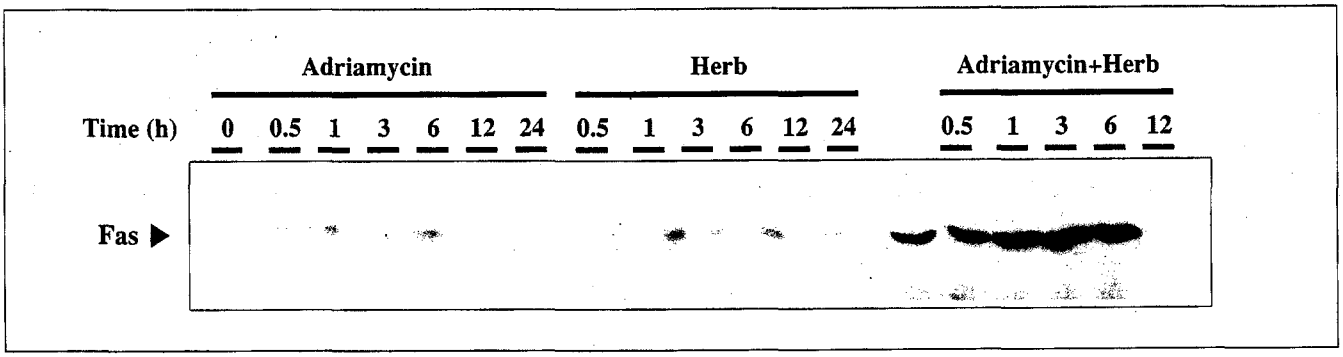

Fig 5. Cotreatment of adriamycin and herb extract induced the expression of Fas in Chang cells in a time dependent manner. The cells were treated with 1$\mu g/ml$ of adriamycin, 31.25$\mu g/ml$ of herb extract, or adriamycin(1$\mu g/ml$) plus herb extract(31.25$\mu g/ml$) for various periods and the cell lysates were analyzed with anti-Fas antibodies.

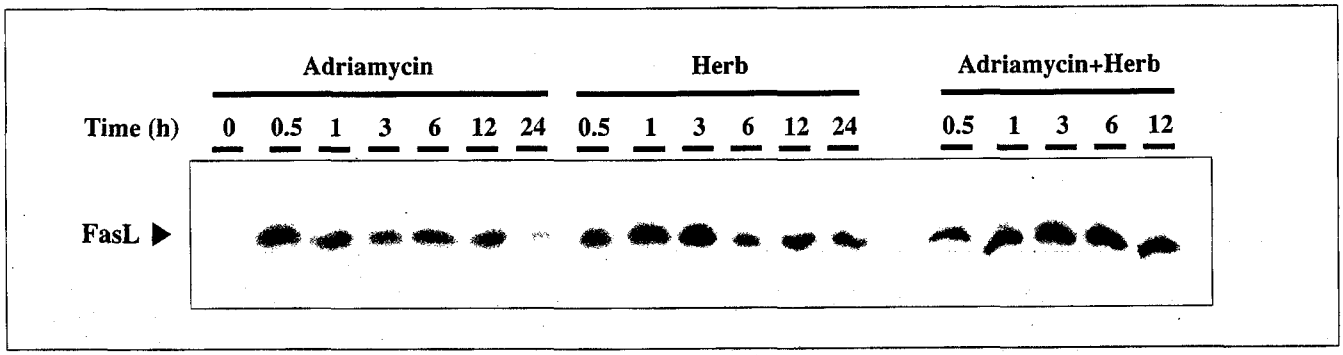

Fig 6. Cotreatment of adriamycin and herb extract induced the expression of FasL in Chang cells in a time dependent manner. The cells were treated with 1$\mu g/ml$ of adriamycin, 31.25$\mu g/ml$ of herb extract, or adriamycin(1$\mu g/ml$) plus herb extract(31.25$\mu g/ml$) for various periods and the cell lysates were analyzed with anti-FasL antibodies.

게 발현이 증가되어 있는 것은 이 병용처리 군에서 훨씬 큰 cytotoxicity를 보여주는 것과 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있다.

6. Ardiamycin 및 Herb extract의 동시처리가 Chang 간암세포에서의 Bcl2 및 Bax 단백질의 발현양상 변화에 미치는 影響

세포고사(apoptosis)를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암유발 유전자 산물의 하나인 Bcl2는 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포의 사멸을 억제하는 기능이 있다. 한편 Bcl2 family에 속하는 Bax 단백질은 세포사멸을 촉진시키는 단백질로 처음 밝혀졌으며, Bcl2와의 hetero 혹은 homodimer를 형성함으로서 세포사멸의 조절에 깊이 관여하고 있다고 알려져 왔다. 따라서 본 실험에서는 저농도의 adriamycin(1$\mu g/ml$), 저농도 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물(31.25$\mu g/ml$) 및 이 둘의 병용처리시에 Bcl2 및 Bax의 발현양상 변화를 조사함으로서 adriamycin과 herb 추출물의 병용투여시 보여지는 synergistic cytoxicity의 기작을 설명하고자 하였다. 이를 위해 배양된 Chang 세포에 adriamycin(1$\mu g/ml$), 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물(31.25$\mu g/ml$) 및 이 둘의 병용처리 메탄올 추출물을 다양한 시간 동안 처리 후 세포를 포집하여 세포파쇠액(cell lysate)을 얻었다. 이후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착등을 거친 후 Bcl2 및 Bax 등에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. Bcl2의 발현은 adriamycin 이나 herb 추출물 단독처리 혹은 이 둘의 병용처리군에서도 모두 발현양상의 변화를 보이지 않았다(Fig. 7). Bax 단백질은 adriamycin이나 herb 추출물 단독처리군에서 모두 발현의 증가가 관찰되지만 adriamycin보다 herb 추출물에서 훨씬 시간 의존적으로 증가되어 나타났다(Fig. 8). 한편, 병용처리군에서는 adriamycin이나 herb 추출물이 단독처리군의 중간정도 발현을 나타내었다. 이러한 결과는 herb 추출물이 Bax의 발현량을 증가시킴으로서 adriamycin에 의한 cytotoxicity를 증가시키는데 밀접하게 연관되어 있음을 추측할 수 있다.

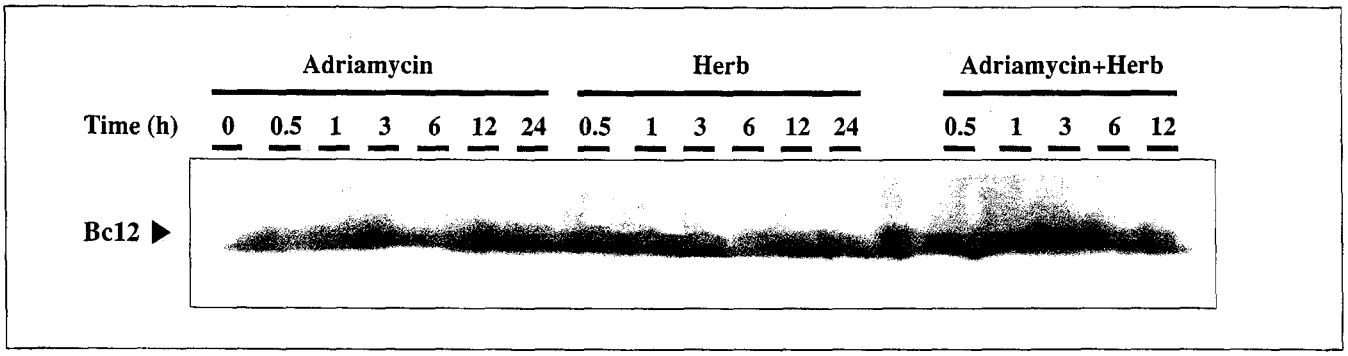

Fig 7. Cotreatment of adriamycin and herb extract did not affect the expression of Bcl2 in Chang cells. The cells were treated with 1$\mu g/ml$ of adriamycin, 31.25$\mu g/ml$ of herb extract, or adriamycin(1$\mu g/ml$) plus herb extract(31.25$\mu g/ml$) for various periods and the cell lysates were analyzed with anti-Bcl2 antibodies.

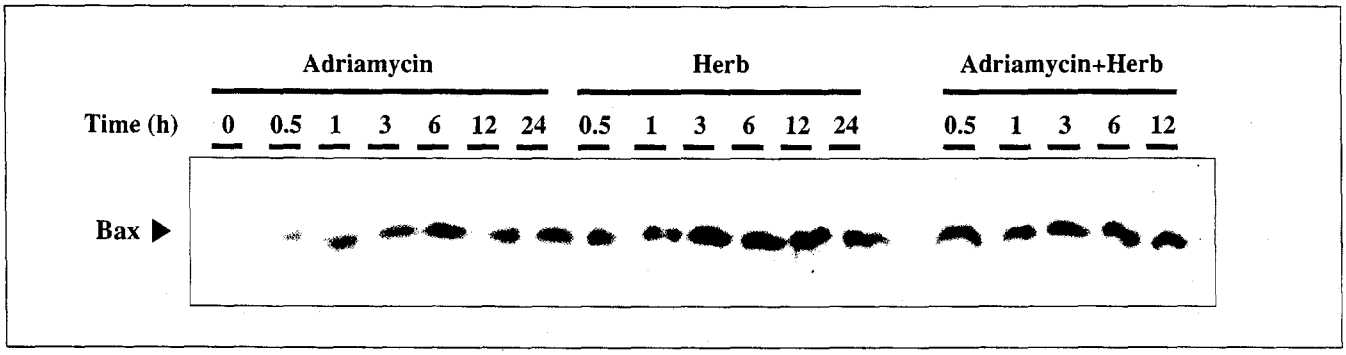

Fig 8. Cotreatment of adriamycin and herb extract induced the expression of Bax in Chang cells in a time dependent manner. The cells were treated with 1$\mu g/ml$ of adriamycin, 31.25$\mu g/ml$ of herb extract, or adriamycin(1$\mu g/ml$) plus herb extract(31.25$\mu g/ml$) for various periods and the cell lysates were analyzed with anti-Bax antibodies.

IV. 考 察

腫瘍에 관한 記述은 殷墟의 甲骨文에서 "瘤"라 한 것이 처음이며[10], 그 후 『內經』11)에서 積聚, 腸覃, 石 , 瘤, 五臟之積 등에 대하여 구체적으로 언급한 이래 歷代 醫書에서 腫瘍의 位置와 病理的 特性에 따라 瘤[12], 陰菌[13], 石疽[14], 失榮[13], 惡核[14], 喉痧[15], 茅菌[13], 舌疳[15],兎醇[13], 缺盆疽[12] 등으로 다양하게 記述하고 있다.

최근 들어 癌에 대한 理解와 治療에 많은 進步를 이루고 있지만, 아직 旣存의 化學療法과 放射線 療法이 抗癌療法의 主流를 차지하고 있다1[6]. 하지만 放射線 療法과 化學療法은 癌細胞를 抑制하는 效果가 뛰어난 장점이 있으나, 세포분열이 왕성한 정상 세포에도 손상을 입혀 骨髓機能障碍, 胃腸障碍, 脫毛症등의 副作用이 거의 모든 환자에게서 발생하며[17], 또한 耐性 증가로 再發과 合併症이 발생하는 단점이 있다[18].

따라서 최근에는 韓方과 洋方을 혼합한 새로운 治療法이 대두되고 있는데, 韓藥劑에 의한 治療方法은 人體의 正氣를 補養하거나(扶正固本法) 邪氣를 물리치기 위한 방법(祛邪法), 혹은 補養과 祛邪를 幷用(扶正祛邪法)하는 방법을 사용한다[19]. 人體內 臟腑機能이 均衡을 이루고 있으면 건강하다는 韓醫學的 見解는 腫瘍免疫學에서 밝히고 있는 癌의 發生과 成長에 있어서 免疫反應의 疫學과 유사성을 갖고 있다. 이러한 관점에서 韓藥劑에 대한 抗腫瘍免疫學的 연구가 진행되고 있으며, 四君子湯[20], 六君子湯[21], 扶正抗癌湯[6], 君里湯加減方[7], 半夏白朮天麻湯[22] 등이 抗癌 및 免疫增强 效果가 있는 것으로 보고되고 있다.

아포토시스는 특히 신경계와 免疫系細胞의 생성, 분화 및 기능 발현 등에 중요하게 작용함이 밝혀졌다[23]. 이런 아포토시스 機轉 障碍시는 癌發生, 抗癌治療에 대한 耐性發顯, 自家免疫疾患의 발생, 退行性 疾患 및 HIV에 의한 病理에 중요한 역할을 수행함이 보고되었다[24]. 최근 연구에 의하면 흔히 사용되는 많은 抗癌劑들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및

bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 세포주에서 아포토시스를 유도함이 밝혀져 있고 그 作用機轉으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide경로 즉 발현 초기유전자(early immediate gene) 발현, 아포토시스 관련 단백분해효소인 caspase, DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다[25]. 따라서 抗癌劑의 效率性은 apoptosis 유도능력과 밀접한 관련이 있다고 알려지고 있다.

한편 西洋醫學에서 사용되고 있는 암치료제들은 그 유용성에도 불구하고 부작용 때문에 그 사용이 매우 제한적으로 이루어지고 있다. 그러나 韓方治療는 수세기 동안 사용되어 오면서 직접적인 抗癌藥效에 있어서는 약간 뒤지지만 상대적으로 훨씬 안전하게 사용되어 왔다. 이러한 사실에 기초하여 본 연구자는 洋方에서 사용되는 抗癌劑들의 심각한 부작용은 줄이면서 韓方의 藥效가 加味되어 훨씬 우수한 抗癌效能을 가지는 약물의 개발에 관심을 가지게 되었다. 이중 특히 본 연구에서는 癌치료제로 가장 흔히 사용되고 있으면서도 계속적인 사용에 의한 약물축적시 심각한 심장관련 질환을 야기시키는 adriamycin 및 韓方에서의 八珍湯合化積丸을 연구대상 藥物로 선정하고 이 둘의 并用處理에 의한 암세포 枯死에 있어 시너지효과 및 그 작용기전을 밝히고자 하였다.

먼저 이러한 adriamycin 및 herb 추출물들이 Chang 간세포에 각각 직접적으로 殺傷作用을 일으키는지를 알아보기 위하여 각각의 추출물을 농도별로 처리한 결과, 농도 의존적으로 Chang 세포의 죽음을 초래하는 세포독성 효과를 나타냄을 확인하였으며, 이 세포죽음이 아포토시스 혹은 壞死(necrosis) 과정에 의하여 매개되는지를 확인하기 위해 아포토시스 현상의 특징의 하나인 ladder형 DNA 분절 및 Hoechst staining에 의한 nucleus의 염색을 통하여 chromatin의 fragmentation을 확인하여 apoptotic 과정에 의함을 확인하였다(Fig. 1,2,3). Adriamycin 및 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물의 并用投與에 의한 세포독성 증진효과를 측정하기 위해 細胞死滅을 거의 일으키지 못하는 adriamycin 농도에 다양한 농도의 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물을 并用處理 후 生存率을 측정한 결과 이들의 并用處理는 현저하게 Chang 세포에 대한 세포죽음을 야기시킴을 확인하였다(Table 2). 따라서, 이러한 서로 다른 약물의 并用投與에 의한 시너지적인 抗腫瘍 효과의 증진은 副作用이 많은 약물의 사용농도를 현저하게 줄이면서도 강한 抗腫瘍 활성을 유도할 수 있기에 그 유용성은 대단하리라 사료된다.

본 硏究에서는 이러한 서로 다른 두 약물의 사용에서 나타나는 시너지적인 抗腫瘍효과의 기전이 무엇인지 밝히고자 하였다. 먼저 유핵세포의 신호전달경로의 주된 형태의 하나로서 아포토시스와 밀접한 관련이 있다고 보고된 JNK/SAPKs라 불리는 신호전달계에의 활성변화를 관찰하였다. 본 연구에서 JNK 신호전달 기전이 저농도의 adriamycin 또는 herb 추출물 단독처리시 및 이 둘의 并用處理시에 어떠한 활성변화를 야기시키는지 관찰하였다. JNK1 활성은 adriamycin 혹은 八珍湯合化積丸 에탄올추출물 단독 처리군에서는 각각 transient한 JNK 활성화가 나타나거나 거의 JNK kinase의 활성은 나타나지 않았다. 그러나 흥미롭게도 adriamycin과 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물 并用處理群에서는 1시간 후부터 JNK의 활성이 나타나기 시작하였으며, 12시간째 최고치에 달했다(Fig. 4). 이 결과 并用處理에 의해 유도된 강하고 지속적인 JNK활성이 시너지스틱한 세포고사효과유도와 밀접한 관련이 있으리라 사료된다.

한편 APO-1 혹은 CD95라고도 알려져 있는 Fas 및 이의 ligand인 FasL의 상호작용을 통한 세포고사 유도를 유도할 수 있음은 잘 알려져 있다. 본 연구에서도 adriamycin과 herb 추출물의 개별투여시 Fas의 발현은 거의 나타나지 않았으나 并用投與시 현저한 증가를 보여주었다(Fig. 5). FasL 발현 역시도 并用投與시 개별처리보다 현저한 증가가 관찰되었다(Fig. 6). 따라서 并用投與시의 이러한 Fas와 FasL단백질의 현저한 발현증가는 시너지스틱한 세포고사 유도의 중요기전 중의 하나로 사료된다.

한편, Bcl2는 사람의 림프종(human follicular lymphomas)과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26Kda이며 다른 암유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여하고 있다[26]. 본 연구결과에서는 adriamycin 및 herb 추출물의 단독 혹은 并用處理시 Bcl2의 발현 및 cleavage는 별다른 변화를 나타내지 못했다(Fig. 7). 그러나 Bax 단백질의 발현은 adriamycin 보다 herb 추출물 단독 처리시에 훨씬 시간 의존적인 발현증가현상을 보여 주었으며, 并用處理시는 herb 추출물 단독처리보다는 약간 떨어지지만 Bax 발현이 증가되었음을 보여준다(Fig. 8). 따라서 Bax 발현측면에서는 Herb 추출물이 Bax 발현을 훨씬 잘 유도시켜 adriamycin에의 세포고사를 촉진하는 방향으로 진행시키는 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 adriamycin 및

八珍湯合化積丸의 并用投與는 시너지스틱한 抗癌效果를 유도할 수 있으며 그 작용기전으로는 并用投與시 JNK의 강하고 지속적인 활성유도, Fas 및 Fas L의 현저한 발현증가 유도, 八珍湯合化積丸 에탄올 추출물에 의해 현저하게 발현이 증가하는 Bax 단백질 등이 복합적으로 작용하는 것으로 사료되며, 추후 더욱 더 많은 연구가 진행되어 유용한 癌治療劑 및 治療方法의 개발이 이루어져야 하리라 사료된다.

V. 結 論

서양의학에서 암치료제로 가장 흔히 사용되고 있는 adriamycin 및 八珍湯合化積丸의 并用處理시 癌細胞 枯死에 있어 시너지효과 및 그 作用기전을 규명하고자 두 藥物의 個別 및 并用投與 후 세포생존율, cysteine c-Jun N-terminal kinase(JNK), Fas 및 Fas L, 그리고 Bcl2 및 Bax의 발현변화 등을 관찰하였던 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. Adriamycin 및 八珍湯合化積丸의 에탄올 추출물 并用處理시 Chang 간세포의 세포고사 능력에 있어 현저한 증가가 수반되는 시너지 효과가 관찰되었다.

2. Adriamycin 및 八珍湯合化積丸의 에탄올 추출물 個別 및 并用處理시의 세포죽음은 DNA분절 및 chromatin의 fragmentation 등이 관찰되는 apopotosis에 의한 세포죽음이 진행임을 확인하였다.

3. Adriamycin 및 八珍湯合化積丸의 에탄올 추출물 并用處理시 강하고 prolong한 JNK활성이 시간 의존적으로 나타났다.

4. Adriamycin 및 八珍湯合化積丸의 에탄올 추출물 并用處理시에만 현저한 Fas 단백질의 발현이 나타났으며, Fas L단백질의 경우에도 并用處理시에 발현증가가 관찰되었다.

5. Adriamycin 및 八珍湯合化積丸의 에탄올 추출물 個別 및 并用處理시 Bcl2의 발현양상은 변화가 없었으나, Bax의 경우는 八珍湯合化積丸 에탄올 처리군보다 현저한 Bax 발현증가가 관찰되었다.

以上의 結果로 보아 Adriamycin 및 八珍湯合化積丸의 에탄올 추출물 并用處理시에 시너지스틱한 Chang 암세포의 세포고사(apoptosis)와 이 때 시너지를 가지게 하는 機轉은 并用處理에 의한 JNK의 활성화, Fas, Fas L 그리고 Bax 등의 아포토시스 유도 단백질등의 활성 및 발현을 증가시키는 과정을 통해서 이루어지는 것으로 사료된다.

VI. 參考文獻

1. 郁仁在 外. 癌症診治康復350問. 北京 : 金盾出版社 : 1989, 98-105
2. 金承濟. 腫瘍學의 發展을 中心으로 한 個個腫瘍의 文獻的 考察. 現代醫學別冊. 1967 : 7(5)
3. 大韓病理學會. 病理學. 서울 : 高文社 : 1991, 183-5,196-7,225,239-52,256-9, 269-70
4. 楊寶仁. 癌症的中醫治療. 河北 : 河北科學技術出版社 : 1992, 1,6,7,12-22
5. 趙峯樵. 癌症治療之硏究. 臺北 : 經緯印刷所 : 1959, 2, 3, 28-32
6. 林美良 外. 扶正抗癌湯이 抗腫瘍免疫反應에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1997 ; 3(1) : 67-84.
7. 유경태 외. 君里湯加減方이 抗腫瘍 免疫反應과 抗癌劑로 誘發한 副作用에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1998 ; 4(1) : 71-88.
8. 潘敏求 外. 中華腫瘤治療大成. 河北 : 河北科學技術出版社 : 1996, 60
9. Bian X, Hughes FM Jr, Huang Y, Cidlowski JA, and Putnev JW Jr. Roles of cytoplasmic Ca2+ and intracellular Ca2+ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am J Physio* 1997 : 272 : C1241-1249
10. 郁仁在. 中醫腫瘤學(上冊). 北京 : 科學出版社 : 1991, 1-25,65-74
11. 任應秋 外. 黃帝內經章句索引. 北京 : 人民衛生出版社 : 1986
12. 薛己. 薛氏醫案. 上海 : 上海古籍出版社 : 1980, 315
13. 張 . 張氏醫通. 上海 : 上海科學技術出版社 : 1963, 132-6, 486,579-80
14. 王維德. 外科證治全生集. 北京 : 人民衛生出版社 : 1989, 9
15. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울 : 大星出版社 : 1983, 215-7,222,346,779
16. 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울 : 杏林出版 : 1995, 142-65
17. 백남선. 癌의 藥物治療. 서울. 臨床藥學 : 6(1) : 1986,74-82
18. James B, Lyoyd H. Cecil textbook of medicine : W.B. Saunders : 1985, 1090-100
19. 신천호 역. 癌瘤防治硏究. 서울 : 成輔社 : 1984, 252
20. 이남구. 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK細胞의 細胞毒性에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1989 : 10(2) : 115-21
21. 윤상협. 六君子湯 小柴胡湯 魚腥草의 抗癌生存期間 延長效果와 免疫反應에 관한 實驗的 硏究. 慶熙醫學. 1991 : 7(3) : 342-57
22. 백태현. 半夏白朮天麻湯과 半夏白朮天麻湯加味方의 抗癌效果와 免疫反應에 관한 實驗的 硏究. 慶熙韓醫大論文集. 1994 : 17(1) : 121-43
23. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Patho* 1994 : 173 : 1-4
24. Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995 ; 267 : 1456-62
25. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol* 1997 : 41 : 461
26. Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R and Roth GS. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/ JNKactivation pathways. *J Biol Chem* 1998 : 273 : 3756-64