

원 저

加減桔梗湯이 인체 폐암세포의 증식 및 사멸에 미치는 영향에 관한 연구

이충섭, 정희재, 신순식¹⁾, 정승기, 이형구
경희대학교 한의과대학 내과학교실, 동의대학교 한의과대학²⁾

Effects of *Gagamgilgyung-tang* on the Proliferation and Apoptosis of Human Lung Cancer Cell

Chung-Sub Lee, Hee-Jae Jung, Soon-Shik Shin¹⁾, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,
Collage of Oriental Medicine, Donggeui University²⁾

Objectives: The chemotherapeutic potential of *Gagamgilgyung-tang* for the treatment of human lung cancer, the antitumorigenic effects of *Gagamgilgyung-tang* on the proliferation and apoptosis of human lung cancer cell line A427 were investigated using molecular biological approaches.

Methods: To determine *Gagamgilgyung-tang* concentrations which do not evoke cytotoxic damage to the cell line, cell viability was examined by MTT assay. To prove *Gagamgilgyung-tang*'s antitumorigenic potential to human lung cancer, [³H]thymidine incorporation assay, trypan blue exclusion and Cpp32 protease activity assays and quantitative RT-PCR analysis were examined.

Results: While A427 cells treated with 0.1-2.0 μ g/ml of *Gagamgilgyung-tang* showed no recognizable effect, marked reductions of cell viability were detected at concentrations over 5.0 μ g/ml. DNA replication of A427 cells was inhibited by *Gagamgilgyung-tang* in a dose-dependent manner and *Gagamgilgyung-tang* induced the G1 cell cycle arrest through inhibition of DNA replication. *Gagamgilgyung-tang* triggered apoptotic cell death of A427 and enhanced the apoptotic sensitivity of the cells that were injured by a DNA damage-inducing chemotherapeutic drug etoposide. *Gagamgilgyung-tang* induces expression of growth-inhibiting genes such as p53 and p21/Waf1 whereas it inhibited expression of growth-promoting genes such as c-Myc and Cyclin D1. Expression of a representative apoptosis-inducing gene Bax was also found to be induced by *Gagamgilgyung-tang* while apoptosis-suppressing Bcl-2 expression was not changed.

Conclusions: *Gagamgilgyung-tang* could suppress the abnormal growth of tumor cells by suppressing the survival of genetically altered cells via induction of apoptosis. This study suggests that *Gagamgilgyung-tang* might have an antitumorigenic potential to human lung cancer cells, which might be associated with its growth-inhibiting and apoptosis-inducing properties. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(1):24-36)

Key Words: *Gagamgilgyung-tang*(*Jiajianjiegentang*), Lung Cancer, Antitumor effect, Apoptosis

· 접수 : 2001년 9월 18일 · 채택 : 11월 18일
· 교신저자 : 이형구, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 5내과 의사실
(Tel. 02-958-9147, Fax. 02-958-9148, E-mail: carpalis@netian.com)

서론

암은 악성종양의 일종으로 아직 그 원인과 기전이

정확히 밝혀지지 않았으나, 대략 생체내의 정상세포가 유전적 요인, 환경적 요인, 바이러스 감염 등에 의하여 암세포로 변형된 후 세포증식 조절기능을 잃고 급속히 성장하게 되는 것으로 알려져 있다¹⁾.

폐암은 폐장에서 발생하는 원발성 악성 종양을 지칭하는 것이며, 상피성 암종과 간질성 육종을 총합한 것으로²⁾, 폐암과 관련된 한의학의 병증은 肺積·肺疰·肺痿·肺癰에서 찾아 볼 수 있다³⁾.

加減桔梗湯은 肺癰에 주로 사용하는 桔梗湯⁴⁾에 淸熱解毒·消癰排膿·散瘀止血·利水降火의 작용⁵⁾을 가진 한약재를 가감하여 이루어진 방제이다.

桔梗湯에 대한 실험연구를 살펴보면, 이⁶⁾는 桔梗湯이 인체 폐세포에 미치는 영향에 대하여 중요 유전자들의 mRNA 발현을 정량적으로 연구 검토하여 유의성 있는 결과를 얻었고, 이⁷⁾ 등은 桔梗湯과 桔梗湯加味方을 이용하여 백서의 생존기간·종양의 크기·자연살해세포의 활성화 등의 항암효과를 연구 검토하여 유의성 있는 결과를 얻었다. 그리고 임상적으로 차⁸⁾ 등은 폐암에 병발된 폐렴환자에 桔梗湯을 기본방으로 사용하여 유의한 결과를 얻었다.

최근에는 암 발생과 진행에 대한 분자 생물학적인 연구에서 중대한 진보를 이루었고, 일련의 유전자군이 정상세포의 성장조절에 참여함과 동시에 각종 악성종양에서 발생하는 유전자 변이의 목표가 된다는 사실이 밝혀짐으로써, 이들 유전자의 변이에 의한 활성화 또는 불활성화가 종양발생의 근간을 이루고 있다는 개념이 정립되었다⁹⁾.

또한 비소세포 폐암의 화학요법에 이용되는 2제 또는 3제의 항암제 복합화학요법에 대한 실험결과와 임상보고를 볼 수 있으며¹⁰⁾, 고¹²⁾ 등은 원발성 비소세포 폐암에 있어서 미세혈관 신생에 대한 임상 관찰을 통하여 혈관신생을 반영하는 미세혈관 밀도가 낮을수록 예후 및 생존율은 유의하게 양호하였음을 보고하였고, 김¹¹⁾ 등은 폐암세포에 p16(MTS1) 유전자를 주입하는 유전자 치료법의 가능성을 보고하였다.

한약을 이용한 항암연구는 주로 동물실험을 이용한 생존일수에 미치는 영향, 종양성장 억제에 미치는 영향, colony 형성 억제와 SRB assay, 세포독성 측정

(MTT assay), 체중 측정, 상피종의 체적 변화에 미치는 영향에 관한 항목 등이었는데, 주로 補益藥·淸熱藥·活血祛瘀藥·利水滲濕藥·理氣藥·解表藥·芳香化濕藥·化痰止咳藥·瀉下藥·消食藥 등이 사용되었고, 그중 補益藥의 비중이 가장 높았다¹³⁾.

최근에 분자 생물학적 방법을 통하여 斑蝥의 항암효과가 보고되었고¹⁴⁾, 한약을 이용한 DNA topoisomerase-I의 활성 억제효과, 세포부착 저지효과, 폐암전이 억제효과, 신생혈관형성 억제 효과 등을 보고하였다¹⁵⁻¹⁷⁾.

이에 저자는 실험실 환경에서 인정된 항암효과와 인체 폐세포의 유전자 발현에 유의한 효과가 인정된 길경탕에 淸熱解毒·消癰排膿·散瘀止血·利水降火의 작용⁵⁾을 가진 한약재를 가감한 가감길경탕이 인체 폐암세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 폐암세포의 세포 분열에 미치는 영향을 처리 농도와 시간에 따라서 flow cytometry를 통하여 분석하였고, 손상된 폐암세포의 활성화복에 미치는 효과를 DNA 손상물질인 etoposide를 처리한 후에 세포주기의 정상 회복시간을 관찰함으로써 분석하였으며, 이러한 효과가 이에 관련한 유전자들의 발현 변화에 의해 일어나는가를 확인하기 위하여, quantitative RT-PCR을 이용하여 중요 유전자들의 mRNA 발현을 정량적으로 연구한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며, 처방의 내용과 1첩 용량은 Table 1과 같다.

2) 검액의 조제

검액의 조제는 일반 환류 추출기를 사용하여 총시료 276g(2첩 분량)을 3차 증류수 2L로 2시간 동안 2회 환류 추출한 후, 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압농축하고, 동결 건조기

Table 1. Gagamgilgyung-tang

Herbs	Scientific Name	Dose
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	12 g
赤茯苓	<i>Poria</i>	12 g
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	12 g
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	8 g
杏 仁	<i>Armeniacae amaran Semen</i>	8 g
貝 母	<i>Fritillariae cirrhosae Bulbus</i>	8 g
前 胡	<i>Peucedani Radix</i>	8 g
葶 藶 子	<i>Lepidii Semen</i>	8 g
蘇 葉	<i>Perillae Folium</i>	8 g
蒲公英	<i>Taraxaci Herba</i>	8 g
當 歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	8 g
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	6 g
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4 g
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	4 g
赤芍藥	<i>Paeoniae Radicis rubura</i>	4 g
三七根	<i>Notoginseng Radix</i>	4 g
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4 g
石菖蒲	<i>Acori graninei Rhizoma</i>	4 g
荊 芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4 g
防 風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	4 g
Total amount		138g

(Christ LDC-1.Alpha/4, Germany)를 이용하여 22.4g의 가감길경탕의 건조 추출물을 얻었으며 수율은 8.1%이었다. 위에서 얻은 약물을 3차 증류수를 이용하여 녹인 후, 100mg/ml의 농도로 stock solution을 제작하였다.

2. 방법

1) 세포배양 및 약물처리

(1) 세포배양

인체의 폐암세포주인 A427을 american type culture collection(ATCC, Rockville, MD)에서 구입하여 DMEM 배지 90%와 fetal bovine serum 10% 혼합배지에서 배양하였다. 세포들은 5%의 CO2 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

(2) 폐암세포에 대한 약물처리

3차 증류수에 녹인 약제를 0.1µg/ml, 0.5µg/ml, 1.0µg/ml, 2.0µg/ml, 5.0µg/ml, 10.0µg/ml의 농도로 약 1×10⁵개의 배양 A427 세포에 투여하고, 각각 6시간, 12시간, 24시간, 48시간이 경과한 후, 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 protein, DNA, RNA를 추출하였다.

(3) 폐암세포 DNA 손상의 유도

A427 세포의 DNA 손상을 유도하기 위하여 1×10⁵개의 세포에 DNA damaging agent인 etoposide를 10µM의 농도로 12시간 처리하였다.

PBS(phosphate buffer saline)를 이용하여 세포를 2회 세척한 후, 정상배지로 교환하였으며 약제의 처리에 의하여 DNA 손상회복이 향상되는가를 분석하였다.

2) MTT 반응

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5mg/ml을 PBS에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후, 0.22µm의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1×10⁵개의 세포를 포함하고 있는 100µl의 cell suspension에 10µl의 MTT stock solution을 첨가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광 측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 보존한 후, 100µl의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals을 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570nm에서 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader로 OD(optical density)를 측정하였다.

3) 세포분열주기 분석

(1) [³H]thymidine incorporation assay

DNA 합성에 미치는 약제의 영향은 [³H]thymidine incorporation assay를 통하여 분석하였다. A427 세포를 2×10⁴cells/well로 24-well multiplates에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 약제를 농도별로 처리하였다. 약제처리 20시간 후에 1.0Ci/ml의 [³H]thymidine(amersham, arlington heights, IL)를 4시간 동안 pulse-labeling하였고 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

(2) Flow cytometric analysis

Cells pellete(5×10⁶)를 0.2ml PBS에 현탁시킨 후, 2

ml의 ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정시킨다. PBS에 강력하게 다시 현탁시켜 100 μ g/ml RNase와 40 μ g/ml propidium iodide(PI)가 포함된 PBS에서 37 $^{\circ}$ C로 30분간 배양한 후, 세포를 회수하여 FACScan(FACS caliber cellquest program(Becton Dickinson)을 이용하여 DNA를 정량하였다.

4) Cpp32 protease assay for colorimetric p-nitroanilide

100 μ l의 lysis buffer(0.5% NP-40, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl and 50mM Tris, pH 7.5)에 세포(7×10^6 cells)를 용해시킨 후, 15000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 20 μ l의 cell lysate를 180 μ l의 reaction buffer(100mM, pH7.5 HEPES, 20% glycerol, 5mM DTT, 5mM EDTA and 100 μ M peptide substrate)에서 37 $^{\circ}$ C에 방치하고, 405nm에서 ELISA reader를 이용하여 OD값의 변화곡선을 얻었다.

5) Quantitative RT-PCR을 이용한 유전자 발현의 분석

(1) RNA 추출

Total RNA는 single-step method에 의하여 아래와 같이 추출하였다. (Chomczynski and Sacchi, 1987).

① GSS solution 제작

250g의 guanidine isothiocyanate를 293ml의 3차 증류수에 넣은 후, 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 넣어 65 $^{\circ}$ C에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다.

② Solution D 제작

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 넣어 제작하였다.

③ 107개의 세포에 solution D 500 μ l, 2M sodium acetate 50 μ l(pH 4.0)를 넣어 잘 혼합한 후, water-saturated phenol 500 μ l, chloroform : isoamyl alcohol(24:1) 100 μ l를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

④ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액의 4/5를 회수하고 동일한 cold

isopropanol 1000 μ l를 넣어 -70 $^{\circ}$ C에서 24시간 침전시켰다.

⑤ 15000rpm에서 20분간 원심 분리하여 용액을 제거하고, RNA pellete을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후, 30 μ l의 RNase-free water에 녹이고 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

(2) cDNA 제작

① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

Reverse transcriptase buffer	2 μ l
Random hexamer(10pM)	1 μ l
MoMuLV-RT(10U/ μ l)	1 μ l
dNTP(10pM)	1 μ l
RNase inhibitor	0.5 μ l
RNA	1 μ l

② 혼합용액이 20 μ l가 되도록 sterile water를 첨가한 후, 42 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하였다.

③ 각 시료에 80 μ l의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

(3) Primer 제작

mRNA 발현양상을 분석하고자 하는 각 유전자의 exon 지역에 특이적으로 annealing 할 수 있도록 oligonucleotide primer를 제작하였다

① House keeping gene (internal control gene)

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase

② Apoptosis-regulating genes

④ Apoptosis-suppressing genes Bcl-2, Bcl-XL

⑤ Apoptosis-promoting genes Bax, Bad, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9

③ Cell cycle-regulating genes

④ Proto-oncogens c-Jun, c-Fos, c-Myc, Cyclin D1, CDK4, Cdc2

⑤ Tumor suppressor genes p53, p21/Waf1, RB1, p16/INK4a

(4) Quantitative RT-PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10X amplification Buffer	10.0 μ l
Mixture of dNTP(10pM)	2.0 μ l
GAPDH primer 1(10pM)	1.0 μ l
GAPDH primer 2(10pM)	1.0 μ l
Template cDNA	1.0 μ l
rTaq polymerase	0.4 μ l
H ₂ O	84.6 μ l

② GAPDH primer를 이용하여 다음의 조건으로 36 cycles PCR반응을 시행하였다.

First cycle

Denaturation	5 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	1 min at 72°C

Subsequent cycle (34 cycles)

Denaturation	1 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	1 min at 72°C

Last cycle

Denaturation	1 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	10 min at 72°C

③ PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 정량화 하였다.

④ 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 \pm 20%내로 정량화 하였다.

⑤ 위의 결과를 바탕으로 target 유전자에 의한 PCR 반응을 시행하여 상대적인 정량화를 시행하였다.

결 과

1. 세포독성 측정을 위한 MTT assay

加減桔梗湯의 세포독성을 확인하기 위하여, 3차 증류수에 녹인 약제를 0.1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 2.0 μ g/ml, 5.0 μ g/ml, 10.0 μ g/ml의 농도로 약 1×10^5 개의 배양 A427 세포에 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 처리한 후, MTT assay를 각각 2회에 걸쳐 반복 수행하였으며, ELISA를 이용하여 세포활성을 측정하였다.

대조군과 비교할 때 검액 0.1-2.0 μ g/ml의 농도에서는 48시간 처리 시까지 세포독성이 전혀 관찰되지 않은 반면, 5.0 μ g/ml 및 10.0 μ g/ml로 처리된 실험군에서는 현저한 세포활성의 저하가 관찰되었다. 특히 5.0 μ g/ml 및 10.0 μ g/ml의 농도로 48시간 처리할 경우, 세포괴사가 현미경적으로 관찰되었다. 이러한 결과에 기초하여 이후 실험에 적용될 약제의 처리농도는 세포독성을 일으키지 않는 0.1-2.0 μ g/ml의 범위로 결정하였다(Table 2).

2. 인체 폐암세포의 증식에 미치는 영향

가감길경탕의 항암효과에 대한 분석을 위하여 폐암세포의 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. 인체 폐암 세포주 A427의 세포분열능력에 대한 영향을 분석하기 위해, 먼저 가감길경탕이 DNA

Table 2. MTT Assay to Determine the Treatment Concentrations of *Gagamgilgyung-tang* which do not Evoke Cytotoxic Damage

Concentration (μ g/ml)		6 hrs		12 hrs		24 hrs		48 hrs	
		Exam.1	Exam.2	Exam.1	Exam.2	Exam.1	Exam.2	Exam.1	Exam.2
Control	0.0	0.562	0.532	0.546	0.558	0.561	0.562	0.557	0.559
	0.1	0.536	0.527	0.536	0.541	0.535	0.558	0.551	0.560
	0.5	0.541	0.519	0.529	0.537	0.533	0.543	0.548	0.549
Sample	1.0	0.558	0.522	0.544	0.532	0.537	0.538	0.549	0.541
	2.0	0.569	0.537	0.537	0.532	0.538	0.539	0.535	0.533
	5.0	0.361	0.364	0.341	0.357	0.329	0.332	0.316	0.309
	10.0	0.229	0.297	0.280	0.273	0.251	0.229	0.222	0.215

Control : Untreated group

Sample : *Gagamgilgyung-tang*(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μ g/ml) treated group

replication을 억제하는 기능이 있는지의 유무를 $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assay를 이용하여 분석하였다. 위 MTT assay의 결과를 기초로 하여 가미길경탕의 처리농도는 세포독성이 일어나지 않는 농도인 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 범위로 정하였다. 약제는 총 24시간 동안 처리하였으며, 세포회수 4시간 전에 $[^3\text{H}]$ thymidine을 투여하였고, DNA내에 incorporation된 $[^3\text{H}]$ thymidine의 양을 대조군과 비교한 결과, A427 세포의 DNA 합성능력은 가미길경탕의 투여에 의하여 감소함이 관찰되었으며, 이러한 DNA 합성 억제는 처리한 약제의 농도에 의존적임을 보여주었다 (Table 3).

3. Flow cytometric analysis를 통한 세포주기 분석
위에서 관찰된 가미길경탕에 의한 DNA 합성억제 효과가 세포분열 주기의 특정단계를 조절함으로써 유도되는가를 확인하기 위하여, flow cytometry를 이용하여 세포분열 주기에 대한 분석을 수행하였다. DNA 합성억제가 가장 현저히 나타난 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 A427 세포를 48시간 처리한 후에, 10,000개의 세포에 대한 DNA content를 분석하였고, 이를 대조군과 비교하였다. 실험은 2회 반복하였으며 실험 결과는 매우 유사하였다.

약제처리에 의한 뚜렷한 세포증식억제가 관찰되었으며, 대조군에 비하여 실험군에서는 G1期の 세포수는 증가하고, S期の 세포수는 감소함이 발견되었다.

따라서 가미길경탕은 A427 폐암세포의 DNA 합성을 억제함을 통하여 세포분열 주기의 진행을 차단하는 효과가 있음이 관찰되었으며, 세포분열 주기중 주

로 G1期에 작용하여 S期로의 세포분열 진행을 차단하는 효과가 있음이 확인되었다(Table 4)

4. Apoptosis 유발효과에 대한 분석

가미길경탕의 apoptosis 유발효과 유무를 분석하기 위하여, 약제 처리에 의한 A427 세포의 apoptosis 유발을 tryphan blue exclusion assay를 이용하여 조사하였다. 가미길경탕은 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 72시간 투여한 후 2,000개의 세포를 조사하여, apoptosis가 일어난 세포의 수를 대조군과 비교하였다. 실험은 2회 반복하였으며, 실험간의 오차는 크지 않았다.

0.1-1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리된 세포에서는 큰 변화가 관찰되지 않은 반면, 1.5 및 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리된 실험군에서는 대조군과 비교하여, apoptosis의 뚜렷한 증가가 확인되었다(Table 5).

Table 4. Effect of *Gagamgilgyung-tang* on Cell Cycle Progression by Flow Cytometric Analysis

	G1(%)	S	G2/M
Exam. 1			
Control	54.2	28.7	17.1
Sample	69.9	14.3	15.8
Exam. 2			
Control	60.2	25.2	14.6
Sample	74.8	10.1	15.1

G1, G2 : Gap1, Gap2

S : Synthesis

M : Mitosis

Control : Untreated group

Sample : *Gagamgilgyung-tang*(2.0 $\mu\text{g/ml}$) treated group

Table 3. Effect of *Gagamgilgyung-tang* on Inhibitor of DNA Replication of Human Lung Cancer Cell Line A427 by $[^3\text{H}]$ thymidine Incorporation Assay

concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Control	Sample				
		0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
Exam. 1	51310	49800	48760	45320	40330	39860
Exam. 2	50210	49690	48200	44920	39270	37540
Exam. 3	49130	47740	45210	41080	37260	33840

Control : Untreated group

Sample : *Gagamgilgyung-tang*(0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/ml}$) treated group

5. DNA 손상에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는 영향

가감길경탕에 의한 apoptosis 유발효과가 약제의 항암효과와 연계될 수 있는 지에 대한 보다 구체적인 분석을 위하여, 세포의 DNA 손상에 의하여 유도되는 apoptosis에 가감길경탕이 영향을 미치는 지를 분석하였다. 세포의 DNA 손상은 DNA damaging agent로 알려진 etoposide의 처리 (0.1-1.0 μ m)에 의하여 유발하였으며, apoptosis의 분석은 위의 실험과 동일하게 tryphan blue exclusion을 이용하였다. Etoposide 처리 12시간 후에 세포를 세척하였고, 위의 실험을 통하여 가감길경탕 자체만으로는 apoptosis를 유발하지 않는 것으로 확인된 0.1-1.0 μ g/ml의 농도로 가감길경탕을 투여하여, 48시간 후에 apoptosis의 발생을 분석하였다.

Etoposide에 의한 apoptosis 유발은 투여한

Table 5. Effect of Gagamgilgyung-tang on Apoptosis of Human Lung Cancer Cell Line A427 by Tryphan Blue Exclusion Assay

Concentration (μ g/ml)	Number of Apoptotic Cells	
	Exam. 1	Exam. 2
Control	121/2000	114/2000
Sample	0.1	109/2000
	0.5	115/2000
	1.0	120/2000
	1.5	183/2000
	2.0	259/2000

Control : Untreated group

Sample : Gagamgilgyung-tang(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ g/ml) treated group

etoposide의 농도에 따른 증가를 보였으며, 가감길경탕의 투여에 의하여 apoptosis의 발생이 증가됨이 관찰되었다(Table 6).

6. Cpp32 protease assay

Apoptosis signal을 전달하는 세포내 단백효소의 하나인 Cpp32 protease 활성도가 가감길경탕에 의하여 영향을 받는지를 분석하기 위하여, 0.1-2.0 μ g/ml 농도의 가감길경탕을 24시간 처리한 후, Cpp32 protease의 activity를 ELISA를 이용하여 분석한 결과, 0.1 및 0.5 μ g/ml 실험군에서는 뚜렷한 변화가 발견되지 않은 반면, 1.0, 1.5, 2.0 μ g/ml 실험군에서는 농도 의존적인 Cpp32 protease activity의 증가가 관찰되었다(Table 7).

7. 세포분열 주기 관련 유전자 발현에 미치는 영향

세포증식억제와 apoptosis 유발효과가 관찰된 현재까지의 결과에 기초하여, 가감길경탕이 이러한 세포학적 현상을 유도하는 유전자의 발현 조절에 관여하는 지를 quantitative RT-PCR을 통하여 분석하였다. 대조군 및 실험군으로부터 RNA를 추출하고, 이로부터 cDNA를 합성한 후 관찰하고자 하는 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR products는 전기영동을 통하여 확인하고, 유전자 발현양은 laser densitometer를 이용하여 정량 하였다. 가감길경탕의 투여농도는 위의 실험들을 통하여 세포독성을 보이지 않으면서 세포분열의 억제와

Table 6. Effect of Gagamgilgyung-tang on Apoptosis of DNA-damaged Human Lung Cancer Cell Line A427

Concentration (μ g/ml)		Number of Apoptotic Cells	
		Exam. 1	Exam. 2
Control		117/2000	124/2000
Sample 1	Etoposide 0.1 μ m	139/2000	152/2000
	Etoposide 0.5 μ m	195/2000	209/2000
	Etoposide 1.0 μ m	238/2000	269/2000
Sample 2	Etoposide (0.5 μ m)+ G.G.T. 0.1 μ g/ml	234/2000	241/2000
	Etoposide (0.5 μ m)+ G.G.T. 0.5 μ g/ml	277/2000	293/2000
	Etoposide (0.5 μ m)+ G.G.T. 1.0 μ g/ml	306/2000	337/2000

Control : Untreated group

Sample 1 : Etoposide(0.1, 0.5, 1.0 μ m) treated group

Sample 2 : Etoposide(0.5 μ m)+Gagamgilgyung-tang(0.1, 0.5, 1.0 μ g/ml) treated group

G.G.T : Gagamgilgyung-tang

apoptosis 유도에 영향을 미치는 것으로 확인된 1.0 μ g/ml로 정하였으며 6, 12, 24시간 처리한 후 유전자 각각에 대한 분석을 수행하였으며, 동일한 과정을 2회 반복 실시하여 재현성이 높은 결과를 얻었다. 먼저 가감길경탕의 세포분열 억제효과와 유전자 발현과의 상관성을 파악하기 위하여, 세포분열 주기의 촉진을 유도하여 종양세포의 증식을 촉진하는 것으로 잘 알려진 c-Fos, c-Jun, c-Myc, Cyclin D1, CDK4, Cdc2 유전자 및 세포분열을 억제함으로써, 종양의 성장을 억제하는 p53, RB1, p21/Waf1, p16/INK4a 유전자의 발현이 가감길경탕의 투여에 의하여 변화하는 양상을 분석하였다.

대조군과 비교할 때 이들 유전자 발현의 변화는 투여한 가감길경탕의 처리시간에 비례하였으며 c-Jun, c-Fos, CDK4, Cdc2, RB1, p16/INK4a 유전자의 발현은 큰 변화를 보이지 않았다(Table 8). 반면에 Cyclin D1, c-Myc 유전자 발현의 뚜렷한 감소와 p53과 p21/Waf1 유전자의 발현 증가가 관찰되었다(Table 8).

8. Apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

위 7과 동일한 방법으로 apoptosis 조절에 관여하는 유전자의 발현을 분석하였다. 분석된 유전자는 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 통하여 종양발생을 촉진하는 대표적 유전자로 알려진 Bcl-2, Bcl-XL와 apoptosis의 유발을 촉진함으로써 종양발생을 억제하는 Bax, Bad, Caspase-3 (Cp32), Caspase-8, Caspase-9 유전자를 분석한 결과, apoptosis를 억제하

는 Bcl-2와 Bcl-XL 유전자의 발현은 큰 변화를 보이지 않은 반면(Table 9), apoptosis를 촉진하는 대표적인 유전자인 Bax의 발현은 가감길경탕의 처리시간에 비례하는 증가를 나타내었다. 이에 반하여 apoptosis를 촉진하는 다른 유전자인 Bad, Caspase-3

Table 8. Quantitative RT-PCR Analysis for the Effect of *Gagamgilgyung-tang*(1.0 μ g/ml) on Cell Cycle Gene Expressions

Genes	0 h	6 h	12 h	24 h
Proto-Oncogenes				
c-Jun	0.89	0.92	0.83	0.91
c-Fos	0.72	0.77	0.71	0.76
c-Myc	0.86	0.74	0.65	0.50
Cyclin D1	0.97	0.82	0.61	0.41
CDK4	0.64	0.70	0.62	0.69
Cdc2	0.93	0.88	0.93	0.92
Tumor Suppressor Genes				
p53	0.58	0.72	0.88	0.98
p21/Waf1	0.62	0.75	0.92	1.23
RB1	0.96	1.01	0.97	0.94
p16/INK4a	0.85	0.89	0.82	0.83

Table 9. Quantitative RT-PCR Analysis for the Effect of *Gagamgilgyung-tang*(1.0 μ g/ml) on Apoptosis Gene Expressions

Genes	0 h	6 h	12 h	24 h
Apoptosis-suppressing Genes				
Bcl-2	0.74	0.81	0.79	0.77
Bcl-XL	0.52	0.57	0.58	0.59
Apoptosis-promoting Genes				
Bax	0.68	0.76	0.92	1.14
Bad	0.82	0.79	0.85	0.83
Caspase-3	0.92	0.97	0.93	0.94
Caspase-8	0.5	0.58	0.52	0.56
Caspase-9	0.59	0.54	0.52	0.56

Table 7. Effect of *Gagamgilgyung-tang* on Cpp32 Protease Activity

Concentration (μ g/ml)	30 min		60 min	
	Exam. 1	Exam. 2	Exam. 1	Exam. 2
Control(0.0)	0.462	0.488	0.416	0.428
Sample	0.1	0.472	0.487	0.425
	0.5	0.468	0.493	0.430
	1.0	0.499	0.562	0.429
	1.5	0.572	0.611	0.549
	2.0	0.610	0.642	0.622

Control : Untreated group

Sample : *Gagamgilgyung-tang*(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ g/ml) treated group

(Cyp32), Caspase-8, Caspase-9의 발현은 변화를 보이지 않았다(Table 9).

고찰

암은 소위 면역감시기능인 개체 방어능력이 약화되어, 암세포화된 비정상세포를 파괴·제거하는 작용을 못하게 되면, 정상세포가 세포증식 조절기능을 잃고서 제멋대로 성장하게 되는 것이다¹⁾.

인간에게 발생하는 대부분의 암은 다단계로 발생(multistep genesis)하며, 각 단계에서 체세포 변화는 특정 유전자 또는 유전자 등의 이상(aberration)에 의하여 일어나는 현상으로 인식되고 있다. 발암과정에서, 유전자의 변이는 암 유전자(oncogene)의 활성화와 유전자의 결손(deletion)이나 변이(mutation) 등의 원인으로 발생하는 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)의 비활성화로 크게 구분된다¹⁸⁻²¹⁾.

폐암은 폐장에서 발생하는 상피성 암종과 간질성 육종을 종합한 원발성 악성 종양을 지칭하는 것으로, 폐암의 대부분은 흡연과 연관된 발암물질과 종양 촉진자에 의하여 유발되는데, 원인으로는 흡연·대기오염·석면 취급자 혹은 우라늄 광산 종사자 등의 직업력·유전적 소인·식이습관 등 여러 가지가 있다^{22,23)}.

폐암의 증상은 호흡기 증상과 전신증상으로 나타나는데, 기침·객담·가벼운 흉통·빈혈·체중감소·혈담이 나타나며, 진행되면서 호흡곤란·견갑골간 견인성 동통·늑간 신경통·쇠약감·체중감소 등이 나타날 수 있다^{22,23)}.

폐암의 치료는 비소세포암은 수술요법이 주 치료법이며, 소세포암은 항암 화학요법으로 치료하고 있으나, 진단시 이미 병의 기간이 진행된 경우가 많아서 5년 생존율은 10-13%에 지나지 않으므로 더 효과적인 치료법의 개발이 요구되고 있는데, 근래 발암기전의 분자적 이해, 수술기법의 발전과 병합요법의 발전으로 치료효과의 상승이 기대되고 있다²⁾.

폐암을 한의학의 병증과 비교하여 보면, 그 발병과정 및 증상면에서 肺積·肺疽·肺痿·肺癰 등의 병

증에서 찾아 볼 수 있으며³⁾, 痰癥²⁴⁾ 또한 흉격내의 종양(심폐의 종양)을 설명하는 것으로 보아 폐암의 범위에 포함될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 肺癰證 중 咳則胸中隱隱痛·咳唾膿血 等症^{25,26)}과 肺疽證 중에 重症인 四肢微腫·咳唾膿血·腥臭濁沫·胸中隱隱痛 等症^{27,28)}은 폐암의 증상과 유사하다고 볼 수 있다.

폐암이 발생하는 기전을 보면, 瘀熱內結·痰濕鬱肺·肺熱陰虛·氣滯氣阻 등 병리변화의 상호작용에 의해 시일이 지나면서 점점 癌瘤가 형성된다²⁹⁾.

加減桔梗湯은 肺癰·氣痛·肺膿瘍·肺癰疽에 응용되고 있는 桔梗湯⁴⁾에 瓜蒌仁·薏苡仁·桑白皮·枳殼·黃芪·百合·生薑을 빼고, 清熱解毒·消癰排膿·活血化癥·利水降火的 작용⁵⁾이 있는 金銀花·赤茯苓·魚腥草·前胡·葶藶子·蘇葉·蒲公英·天門冬·牡丹皮·赤芍藥·三七根·陳皮·石菖蒲·荊芥 등을 가미한 방제이다. 따라서 加減桔梗湯은 清熱解毒·消癰·活血祛癥·止痛·行氣·潤肺·補中의 약물로 구성되어 肺와 脾를 보하는 약물과 肺의 사기를 치료하는 扶正祛邪의 내용이 포함된 방제로, 폐암의 치료를 위하여 구성된 것이다.

桔梗湯에 대한 연구를 살펴보면, 이⁶⁾는 길경탕이 관련 유전자들의 발현의 변화에 미치는 효과에 대하여 중요 유전자들의 mRNA 발현을 조사 연구하였고, 이⁷⁾ 등은 길경탕과 길경탕가미방이 항암효과 및 면역증강작용에 미치는 영향에 대하여 백서를 이용하여 항암효과로는 생존기간·종양의 크기를 관찰하였고, 면역반응에 대한 작용 등을 검토하였다. 임상 보고로 차⁸⁾ 등은 길경탕을 기본방으로 폐암에 병발된 폐렴환자에 투여하여 유의한 결과를 보고하였다.

최근 한약재 및 한약처방으로 분자 생물학적인 연구방법을 통하여 bcl-2 유전자의 발현을 억제시키는 효과¹⁴⁾, DNA topoisomerase- I 의 활성화 억제효과, 세포 부착저지효과, 폐암전이 억제효과, 신생혈관 형성 억제효과 등을 보고하였다¹⁵⁻¹⁷⁾.

이에 저자는 加減桔梗湯이 인체 폐암세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 폐암세포의 세포분열에

미치는 영향, 손상된 폐암세포의 활성화복에 미치는 효과, 그리고 이에 관련한 유전자들의 발현 변화를 관찰 연구하였다.

MTT법은 1983년 Mosmann³⁰⁾에 의해 처음 시도되었고, 1986년 Cole³¹⁾가 사용하면서 최근에 널리 보급된, 세포의 생존능력을 측정하는 방법이다. 加減桔梗湯의 세포독성 측정을 위한 MTT assay 법에서 대조군과 비교할 때, 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도 실험군에서는 48시간 처리시까지 세포독성이 전혀 관찰되지 않은 반면, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 및 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서는 현저한 세포활성의 저하가 관찰되었다. 특히 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 및 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 48시간 처리된 실험군에서는 세포괴사가 현미경적으로 관찰되었다.

加減桔梗湯 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 및 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 약재의 독성으로 인해 세포괴사가 관찰된 것으로 판단되며, 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 세포독성이 전혀 관찰되지 않아 加減桔梗湯 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 보다 높은 효과를 나타낼 것으로 판단되어 실험에 적용될 加減桔梗湯의 농도를 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 결정하였다.

인체 폐암세포의 세포증식에 미치는 영향을 살펴보면, 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군을 대조군과 비교하였을 때, A427 세포의 DNA 합성능력은 加減桔梗湯의 투여에 의하여 감소됨이 관찰되었으며, 이러한 DNA 합성 억제제는 처리한 加減桔梗湯의 농도에 의존적인 결과를 보여주었다.

加減桔梗湯이 세포의 DNA 합성능을 억제하는 효과는 그와 관련된 유전자 발현에 영향을 미쳐 합성억제가 나타난 것으로 추정된다.

그리고 加減桔梗湯에 의한 DNA 합성 억제효과가 세포분열 주기의 특정 단계를 조절함으로써 유도되는가를 확인하기 위하여, flow cytometry를 이용하여 세포분열 주기에 대한 분석을 하였는데, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서 뚜렷한 세포증식억제가 관찰되었으며, 대조군에 비하여 실험군에서는 G1기의 세포수는 증가하고 S기의 세포수는 감소함이 관찰되었다.

따라서 加減桔梗湯은 A427 폐암세포의 DNA 합성을 억제하여 세포분열 주기의 진행을 차단하는 효과

가 있음이 관찰되었으며, 세포분열 주기중 주로 G1기에 작용하여 S기로의 세포분열 진행을 차단하는 효과가 있음이 확인되었다.

Cell cycle은 전통적으로 G1(gap1), S(DNA synthesis), G2(gap2), M(mitosis)의 4기(phase)로 구분한다. G1 세포주기 관련 단백질 중의 하나인 CDK4의 억제제로 알려져 있는 p16 유전자는 최근에 밝혀진 종양억제 유전자중의 하나로서 MTS1(multiple tumor suppressor 1)이라고도 불린다. p16 단백질을 발현하지 못하는 비소세포 폐암 세포주에 p16 유전자를 주입할 경우, 주입한 유전자에서 생성되는 p16 단백질이 CDK와 결합하여 Rb 단백질의 인산화를 저하시켜 궁극적으로 암 억제 효과를 일으킬 수 있다고 하여, 향후 비소세포 폐암의 유전자 치료에 있어서 p16 유전자의 이용 가능성을 확인한 기초자료를 보고 하였다⁹⁾.

따라서 加減桔梗湯은 암 발생에 매우 중요한 역할을 하는 G1/S 이행에 관여하는 세포주기관련 단백질들에 영향을 미쳐, DNA 합성 억제와 세포분열 주기의 진행을 차단하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

加減桔梗湯의 apoptosis 유발효과를 살펴보면, 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서 apoptosis가 일어난 세포수를 대조군과 비교하였는데, 0.1-1.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도 실험군의 세포에서는 큰 변화가 관찰되지 않은 반면, 1.5 및 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 가 처리된 실험군에서는 대조군과 비교하여 apoptosis의 뚜렷한 증가가 확인되었다.

그러므로 加減桔梗湯의 apoptosis 증가 현상은 이와 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미치는 것으로 생각되며, 암세포에 대한 세포제거 효과가 있을 것으로 판단된다.

加減桔梗湯의 항암효과에 대하여 세포의 DNA 손상에 의하여 유도되는 apoptosis에 加減桔梗湯이 영향을 미치는 지를 분석하였다. 0.1-1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여된 실험군을 48시간 후에 apoptosis의 발생율을 분석한 결과, 대조군과 etoposide만 투여된 실험군에 비하여 加減桔梗湯과 etoposide가 같이 투여된 실험군에서 더 많은 apoptosis의 발생이 증가됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 加減桔梗湯이 세포손상에 의한

細胞死滅을 촉진함으로써 비정상적인 세포의 생존을 차단하고, 이를 통하여 DNA 손상으로부터 촉발될 수 있는 종양세포의 출현을 억제할 수 있음을 시사하는 결과라고 생각된다. 또한, 加減桔梗湯이 종양세포를 제거하는 기존 항암치료의 효과를 촉진하는 기능을 가질 수 있음을 시사하는 결과라고 판단된다.

조¹³⁾는 수술적 절제가 불가능한 병기 IIIb, IV의 비소세포성 폐암에서 etoposide, ifosfamide, cisplatin(VIP) 3제 복합화학 요법은 그 부작용이 심하지 않으나, 기존의 복합화학 요법에 비하여 반응율이 우수하지 않다는 임상결과를 보고하였다.

Apoptosis signal을 전달하는 세포내 단백질효소의 하나인 Cpp32 protease 활성도에 대한 加減桔梗湯의 효과를 분석한 결과, 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군중에서 0.1 및 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 실험군에서는 뚜렷한 변화가 발견되지 않은 반면, 1.0, 1.5, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서는 농도 의존적인 Cpp32 protease activity의 증가가 관찰되었다.

Apoptosis 억제 단백질을 중에는 IAP 가족군이 있다. NIAP를 제외한 다른 IAP 가족군들은 활성화된 effector caspases인 Caspase-3, Caspase-7을 직접 억제하여 apoptosis 신호 전달체계의 한 가운데에 있는 caspases를 차단함으로써 암세포를 항암제나 다른 apoptosis를 유발하는 물질들로부터 보호하는 것이다²⁰⁾.

이처럼 加減桔梗湯의 농도 의존적인 Cpp32 protease activity의 증가효과는 인체세포의 apoptosis 유발을 증가시키는 효과가 있는 것으로 생각되며, 또한 비정상적인 세포의 제거를 유도할 것으로 생각된다.

加減桔梗湯의 세포증식 억제와 apoptosis 유발효과가 관련 유전자의 발현에 관여하는지를 quantitative RT-PCR을 통하여 분석하였다. RT-PCR은 미량의 RNA만으로도 특정 유전자의 분석이 가능하고 민감도가 뛰어나서, 최근 대부분의 분자 생물학적 연구에 사용되고 있다^{33,34)}.

1.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서 대조군과 비교할 때, 세포분열 주기의 촉진을 유도하여 종양세포의 증식을 촉진하는 유전자 중에서는 Cyclin D1, c-Myc 유전자 발현의 뚜렷한 감소와 세포분열을 억제함으로써,

종양의 성장을 억제하는 유전자들 중에서 p53과 p21/Waf1 유전자의 발현 증가가 투여한 약제의 처리 시간에 비례하는 것이 관찰되었다. 그러나 c-Jun, c-Fos, CDK4, Cdc2, RB1, p16/INK4a 유전자의 발현은 큰 변화를 보이지 않았다.

Apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴 보면, apoptosis를 억제하여 종양을 유발하는 Bcl-2와 Bcl-XL 유전자의 발현은 큰 변화를 보이지 않은 반면, apoptosis를 촉진하여 종양발생을 억제하는 대표적인 유전자인 Bax의 발현은 약제의 처리시간에 비례하는 증가를 나타내었다. 이에 반하여 apoptosis를 촉진하는 다른 유전자인 Bad, Caspase-3(Cpp32), Caspase-8, Caspase-9의 발현은 변화를 보이지 않았다.

따라서 加減桔梗湯은 세포증식을 억제하는 효과, DNA 손상에 의한 apoptosis의 촉진효과 등이 세포증식을 촉진하는 발암 유전자인 Cyclin D1, c-Myc의 발현감소와 세포분열을 억제하는 종양억제 유전자인 p53, p21/Waf1의 발현증가, apoptosis를 촉진하는 Bax의 발현증가와 관련이 있음이 관찰되었다. 이는 加減桔梗湯이 DNA 손상과 apoptosis 유발을 통하여 종양세포를 제거하는 기존의 화학적 항암치료와 병행할 경우, 항암치료의 효과를 향상시킬 것으로 판단된다.

향후 加減桔梗湯의 연구 결과를 바탕으로 긍정적인 효과를 보이는 농도별로 다양한 sample군을 만들어 추가적인 연구를 통한 유의성 검증이 필요할 것으로 생각된다.

결론

加減桔梗湯의 항암효능을 관찰하기 위하여, A427 폐암 세포주를 이용하여 폐암세포의 세포분열에 미치는 영향, 손상된 폐암세포의 활성회복에 미치는 효과, 그리고 apoptosis 관련 유전자들의 발현 변화를 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加減桔梗湯은 A427 폐암 세포주에 대하여 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 뚜렷한 세포독성을 나타내었다.

2. 加減桔梗湯은 A427 폐암 세포주의 DNA 합성을 처리농도에 비례하여 억제하고, 세포분열은 G1期에서 억제되었다.

3. 加減桔梗湯은 1.5 μ g/ml 이상의 농도에서 A427 폐암 세포주의 apoptosis를 유발하였고, DNA 손상을 세포에 가하였을 경우 손상세포의 apoptosis의 발생이 더욱 증가되었고, apoptosis 촉진효과는 Cpp32 protease의 활성촉진을 통하여 이루어짐이 확인되었다.

4. 加減桔梗湯은 세포증식을 촉진하는 발암 유전자인 Cyclin D1, c-Myc의 발현을 감소시키고, 세포분열을 억제하는 종양억제 유전자인 p53, p21/Waf1의 발현을 증가시켰다.

5. 加減桔梗湯은 apoptosis를 촉진하는 Bax의 발현을 증가시켰다.

세포에서 p16(MTS1) 유전자 주입후 암생성능의 변화 및 세포주기관련 단백질 변동에 관한 연구. 폐연구소 연구보고. 1998;9(1):85-94.

10. 이춘택. 폐암세포주(PC-14)에서 복합항암제 처치시 암세포살해능의 증강에 관한 연구. 결핵 및 호흡기 질환. 1997;44(3):525-533.

11. 조용선, 김시영, 김정희, 윤휘중, 조정삼. 진행성 비소세포 폐암에서 Etoposide, Ifosfamide, Cisplatin(VIP) 복합화학요법의 효과. 대한암학회지. 2000;32(1):86-92.

12. 고혁재, 박정현, 국향, 양세훈, 정은택. 원발성 비소세포 폐암에 있어서 미세혈관 신생의 임상적 예후인자로서의 의의. 결핵 및 호흡기질환. 2000;48(5):757-765.

13. 김현아, 임성우, 이원철. 韓藥을 이용한 抗癌 實驗研究의 傾向에 關한 考察. 대한한방중양학회지. 1998;4(1):211-232.

14. 김진성, 이지향, 류봉하, 박재훈, 지성길, 유진화. 수종한약제의 위암세포에 대한 항암작용 효능검색 및 약리작용에 관한 분자생물학적 연구. 대한한방중양학회지. 1999;5(1):47-60.

15. 김성훈, 전기석. 蔘苓白朮散加味方의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究. 大韓韓方腫瘍學會. 1999;5(1):19-32.

16. 김용태, 전영수, 김정효, 김성훈. 加味金匱腎氣丸의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究. 大韓韓方腫瘍學會. 1999;5(1):19-32.

17. 배문용, 강인철, 김성훈. 四味軟堅湯加味方의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究. 大韓韓方腫瘍學會. 1999;5(1):19-32.

18. Bishop. J. M. The molecular genetics of cancer. Science. 1987;235:305.

19. Fearon E. R., Vogelstain B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990;61:759.

20. Knudson, A. G. Jr. Hereditary cancer, oncogene, antioncogenes. Cancer Res. 1985;45:1437.

21. Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A. The p53 tumor suppressor gene. Nature. 1991;351: 453.

참고문헌

1. 김진복. 암면역학과 면역요법. 大韓免疫學會誌. 1986;8(1):73-83.
2. 광승민. 폐암의 최신지견. 癌學術誌. 1990;9(1):55-62.
3. 陳熠. 世界傳統醫學腫瘤學. 北京:科學出版社. 1999:157.
4. 慶熙大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院. 慶熙韓方處方集. 서울;트윈기획. 1997:46.
5. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울;永林社. 1992:125,127,131,194,195,198,201,212,302,347,400,458,460,463,478,485,523,540,578,589.
6. 李珩九. 桔梗湯이 人體 肺細胞에 미치는 影響에 關한 分子生物學的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1999;20(2): 88-97.
7. 李周姬, 鄭熙才, 鄭昇紀, 李珩九. 桔梗湯과 桔梗湯加味方이 S-180에 대한 抗癌效果 및 免疫反應에 關한 實驗的 研究. 慶熙韓醫大論文集(50주년). 1998;21(1): 225-250.
8. 차은수, 조일현, 이경기, 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 閉塞性 肺炎를 兼한 肺癌患者의 韓方治療 1例. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1997;3(1):207-219.
9. 김영환, 김재열, 유철규, 한성구, 심영수, 이계영. 폐암

22. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울:아트동방. 2000:12,386-388.
23. 鄭熙才, 鄭昇杞 李珩九. 臨床肺系內科學. 서울:아트동방. 2000:165-167.
24. 이경섭, 송병기. 징가병태에 관한 문헌고찰. 동양의학. 1980;6(2):46-50.
25. 巢元方. 諸病源候論. 第33卷, 台北:昭人出版社. 1980:12-13.
26. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:一中社. 1988:309-315.
27. 王肯堂. 六科準繩. 서울:翰成社. 1982:182-189.
28. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울:大星文化社. 1983:548.
29. 黃文東. 實用中醫內科學. 서울:一中社. 1988:621-624.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunologic methods. 1983;65(1-2):55-63.
31. Cole S. P. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. Cancer chemother Pharmacology. 1986;17(3):259-263.
32. 고미혜, 명나혜, 이재환, 조은미, 박재석, 김건열, 이계영. 비소세포 폐암에서 아포프토시스 억제 단백질 Survivin 발현에 관한 면역조직학적 분석. 결핵 및 호흡기질환. 2000;48(6):909-921.
33. Ferre F. Quantitative or semi-Quantitative PCR, reality versus myth. PCR Methods and Applications. 1992;2:1-9.
34. Wang A. M. W., Doyle M. V., and Mark D. F. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989;86(24):9717-9721.