

# Cisplatin을 처리한 뇌세포에서 補血免疫丹의 세포방어효과

강태희\* · 문 구 · 문석재 · 원진희

원광대학교 한의과대학 내과학교실

## Cytoprotective Effects of Bohulmyunyuk-dan in Cisplatin-treated Brain Cells

Tai Hee Kang\*, Gu Moon, Suk Jae Moon, Jin Hee Won

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Bohulmyunyuk-dan is an Oriental herbal formulation to enhance the general body conditions as well as immune response against both endogenous and exogenous harmful challenges. This study was designed to investigate the effect of Bohulmyunyuk-dan on the cisplatin-induced toxicity of primary rat astrocytes and C6 glioma cells. After treatment of astrocytes and C6 glioma cells with cisplatin, MTT assay was carried out to measure cytotoxicity of brain cells. To explore the mechanism of cytotoxicity, astrocytes were treated with Bohulmyunyuk-dan and followed by the addition of cisplatin. Then, the protective effects of Bohulmyunyuk-dan were investigated in apoptosis signaling pathway. The results were obtained as follows ; Bohulmyunyuk-dan protected the death of astrocytes by cisplatin, which decreased the viability of astrocytes and C6 glioma cells in a time- and dose-dependent manner. Bohulmyunyuk-dan protected the apoptotic death of astrocytes from cisplatin induced cell apoptosis. Bohulmyunyuk-dan inhibited the activation of caspase-3 and -9 protease in astrocytes by cisplatin. Bohulmyunyuk-dan inhibited the cleavage of PARP in astrocytes by cisplatin. According to above results, Bohulmyunyuk-dan may prevent brain cells from cytotoxicity induced cell apoptosis induced by chemotherapeutic agents including displatin.

Key words : Bohulmyunyuk-dan(補血免疫丹), astrocytes, C6 glioma cells, cisplatin, cytotoxicity.

### 서 론

癌이란 조직의 자율적인 과잉성 성장이며, 이것은 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 파괴적인 것으로 그 발생원인과 기전이 명백히 밝혀져 있지 않은 질병이다<sup>1)</sup>. 韓醫學에서 癌에 대한 개념은 《黃帝內經》<sup>2,3)</sup>에서 積聚, 腸覃, 石瘕 등을 언급한 이래 역대 의서에서 病位와 병리적 특성에 따라 다양한 병증으로 표현되어 왔으며, 종양의 발생은 正氣가 먼저 虛해지고 그 후에 邪氣가 머물러 氣血阻滯, 血瘀, 痰飲, 濕熱 등의 病變을 야기시킨다고 인식하였다. 또한 腫瘍은 病이 비교적 복잡하고 여러 조직, 기관에 연관되어 寒熱交錯, 虛實挾雜되는 경우가 많으므로 주로 扶正培本을 위주로 하고 祛邪를 배합하여 치료한다<sup>4,5)</sup>. 반면에 서양의학의 항암치료는 대체로 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 활용되고 있다. 그 중 사용빈도가 높은 화학요법은 종양세포를 사멸하는 동시에 정상세포까지 독성을 나타내어 여러가지 부작용을 초래하는 경우가 많아지고 있어 최근 부작용 감소를 위해 單味韓藥이나 한방처방을 대상으로 연구

가 진행되고 있다<sup>6,7)</sup>.

補血免疫丹은 원광대학교 비계내과학교실에서 방사선요법, 화학요법으로 발생하는 부작용을 감소시키고 인체의 면역력을 회복시키기 위하여 만든 처방으로 健脾益氣, 滋陰補血의 扶正培本을 위주로 하며 清熱解毒의 祛邪를 겸한 처방이다. 최근 항암 치료제의 치료기전이 세포고사와 깊은 관련이 있다고 밝혀진 이래로, 세포고사 신호전달계를 이용하여 항암효과를 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 이에 대한 지금까지의 研究 報文으로는 金<sup>8)</sup>은 百合固金湯加味方을, 李 등<sup>9,10)</sup>은 八珍湯合化積丸을, 魯<sup>11)</sup>는 白花蛇舌草가 세포고사기전에 의하여 항암효과가 있음을 보고하였다. 그러나 지금까지는 암세포에서 한약의 항암치료효과에 관한 연구가 이루어졌으며, 항암치료시 정상세포에 발생하는 세포독성을 한약으로 억제시키는 연구는 아직 미흡하였다. 따라서 본 연구는 항암제를 통한 항암치료시 발생하는 암세포와 정상세포의 세포독성과정과 이러한 세포독성과정에서 補血免疫丹을 투여하여 세포독성 회복효과를 나타내는 것을 실험적으로 규명하고자 하였다. 먼저 뇌의 정상세포인 astrocytes와 뇌종양 세포인 C6 glioma 세포에 대표적 항암치료제인 cisplatin을 처리하여 세포독성을 확인하고, astrocytes에서 補血免疫丹의 세포독성 억제능력을 조사하였다. 또한 세포고사 기전을 규명하

\* 교신저자 : 강태희, 광주광역시 남구 주월동 원광대학교 광주한방병원

E-mail : littlebighero@hanmail.net, Tel : 062-670-6527

· 접수 : 2002/02/04 · 수정 : 2002/03/08 · 채택 : 2002/03/27

기 위하여 cisplatin으로 처리한 세포에서 flow cytometry를 이용하여 세포고사를 확인하였다. 또한 세포고사 기전을 규명하기 위하여 caspase 활성, PARP의 절단을 관찰하였으며, 이후 補血免疫丹의 세포고사 억제효과를 관찰하였는 바 유의한 효과가 있어 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 補血免疫丹은 원광대학교 비계내과 처방에 의거하였으며 1첩의 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription contents of Bohyulmyunyu-dan Per Pack

本草名	生藥名	學名	分量(g)
黃芪	Radix astragali	Astragalus membranaceus BUNGE.	20
人蔘	Radix ginseng	Panax ginseng C. A. MEYER.	8
紫河車	Placenta hominis	Homo sapiens L.	8
鵝血藤	Mucunae caulis	Spatholobus suberectus Dunn.	8
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	Astragalus membranaceus BUNGE.	8
白朮	Rhizoma atractylodia macrocephalae	Atractylodes maceocephala KOIDZ.	8
當歸	Radix angelicae gigantis	Angelica sinensis DIELS.	4
Total amount			64

#### 2) 시약

Cisplatin은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여, phosphate buffered saline(PBS, pH7.4)와 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 용해한 후 0.2µm filter(Millipore, Bedford, MA, USA)로 통과시켜서 사용하였다. 세포 및 핵의 염색 관찰에 이용한 세포배양판은 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며 PARP 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 MTT, Hoechst 33258, HRP, DMSO, JC-1, Rhodamine 123 등은 Sigma사에서 구입하여 사용하였고 DMEM, 우태아혈청, 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입, 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액조제

실험에 사용된 약재는 에탄올 용매로 사용한 추출하여 본 실험에 이용하였다. 먼저 에탄올 추출물은 補血免疫丹 64g을 에탄올 1ℓ와 함께 플라스크에 넣어 하루 동안 우려나오도록 방치한 다음 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 20분 원심 분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음, -70℃(Deep freezer)에서 12시간 이상 동결 시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 것을 시료로 사용하였다.

#### 2) 세포배양

렛트에서 astrocytes를 분리하여 10% 우태아 혈청이 포함된 세포 배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37℃ 세포 배양기에서 10cm 세포 배양판에 배양하였다. 또한 악성 신경교종인 C6 glioma 세포는 한국 세포주은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양받아 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 세포배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37℃ 세포 배양기에서 10 cm 세포 배양판에 배양하였다. 24시간 간격으로 EDTA를 사용하여 계대배양하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포에서 항암제에 의한 세포사멸 현상과 이와 관련한 분자생물학적인 실험을 수행하였다.

#### 3) 세포 생존율 측정

Astrocytes와 C6 glioma 세포를 24 well 세포 배양판에 1×10<sup>5</sup> cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포 배양판에 부착시키고 cisplatin을 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 살아 있는 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540nm 파장에서 ELISA reader(THERMO max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정한 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

#### 4) Flow cytometry 분석

실험조건의 세포를 모아서 원심분리를 한 다음, propidium iodide(PI) 용액을 넣고 20분간 세포 배양기에 반응시킨 후, flow cytometry를 이용하여 세포고사를 동반한 세포의 생존율을 측정하여 백분율로 측정(%)하였다.

#### 5) 핵 염색(Hoechst staining)

세포핵의 형태를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 먼저 4% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하고 Hoechst 33258을 10µM로 희석하여 10분 염색한 후에 다시 PBS로 세척하여 관찰하였으며 역상광학현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용해서 10×10의 배율로 사진을 찍었다.

#### 6) Caspase family cysteine protease 활성도 측정

실험조건의 세포를 4℃에서 30분 세포 파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)으로 파쇄하여 14,000rpm으로 15분 원심분리를 하고 이 때 얻어진 상층액은 Bicinchoninic acid 용액에 30분간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 정량 하였다. 정량하여 얻어진 100µg의 세포 파쇄액은 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)에 희석되어 형광표지된 기질과 37℃에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer로 caspase activity (caspase3: AMC-DEVD, caspase8: Z-IETD-AFC, caspase9: Ac-LEHD-AFC)를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength(460nm)를 사용하였다.

#### 7) Western blotting

실험조건의 세포에 cisplatin을 시간별로 처리한 후 세포를 포함한 다음 세포 파쇄용액으로 4℃ 하에서 파쇄한 후 BCA용액

에 의하여 동량으로 정량하였다. 두 배의 sample buffer (5mM EDTA, 4% sodium dodesyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)를 혼합하여 100℃에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도하고 10% sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로 0.8mA/cm<sup>2</sup>의 전기를 걸어주면서 이동시킨 후 blocking buffer(5% skim milk)로 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. PARP에 대한 항체 (Santa Cruz Co., Santa Cruz, CA, USA)를 TBS에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응 시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)은 membrane과 상온에서 1시간 반응시켜 ECL kit(Amersham, England)를 사용하여 발색 후 필립에 노출하였다.

8) 결과산출

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 그 결과를 student-t test을 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. Cisplatin과 補血免疫丹이 세포독성에 미치는 영향

Cisplatin의 세포독성을 알아보기자 astrocytes와 C6 glioma 세포에 cisplatin을 농도별, 시간별로 처리하고 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 먼저 astrocytes와 C6 glioma 세포에 cisplatin을 농도별로 24시간동안 처리하여 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소됨을 확인하였다(Fig. 1A). 세포독성의 시간 의존적인 변화를 알아보기자 astrocytes와 C6 glioma 세포에 cisplatin 10µg/ml를 처리하고 시간적 차이에 의한 세포독성을 관찰하였다.

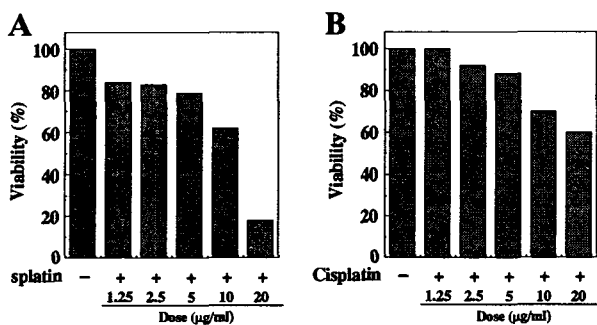


Fig. 1 Cisplatin decreased the viability of brain cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of cisplatin for 24 hr. (A) astrocytes, (B) C6 glioma cells. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean(%)±S.D. of three independent experiments.

Astrocytes에서는 cisplatin을 처리한지 12시간 이후부터 세포의 독성이 관찰되었고, 24시간이 경과하자 세포 생존율이 정상 세포에 비교하여 60%정도 감소하였다(Fig. 2A). C6 glioma 세포에서는 cisplatin을 처리한지 12시간 이후부터 세포독성을 보이

기 시작했으며, 24시간이 경과한 후 세포의 생존율이 정상세포에 비해 40% 감소하였다(Fig. 2B).

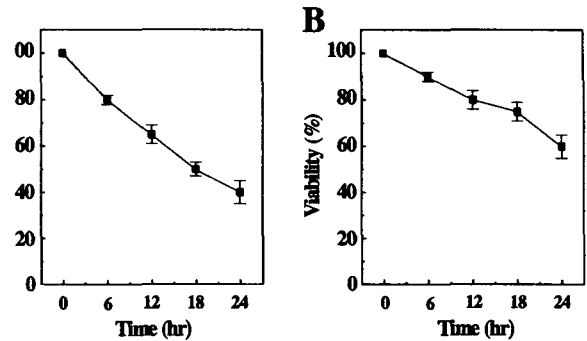


Fig. 2 Cisplatin decreased the viability of brain cells in a time-dependent manner. Cells were treated with 10 µg/ml cisplatin for the indicated periods. (A) astrocytes, (B) C6 glioma cells. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean(%)±S.D. of three independent experiments.

Cisplatin에 의한 astrocytes의 세포 독성에 대한 補血免疫丹의 보호효과로 확인하기 위하여 astrocytes에 cisplatin 10µg/ml과 補血免疫丹을 농도별로 24시간동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 補血免疫丹은 cisplatin에 의한 astrocytes 세포독성을 농도 의존적으로 억제시켰으며, 200µg/ml를 투여하였을 때는 세포 생존율이 cisplatin 단독처리군에 비교하여 20%정도 증가되었다.(Fig. 3).

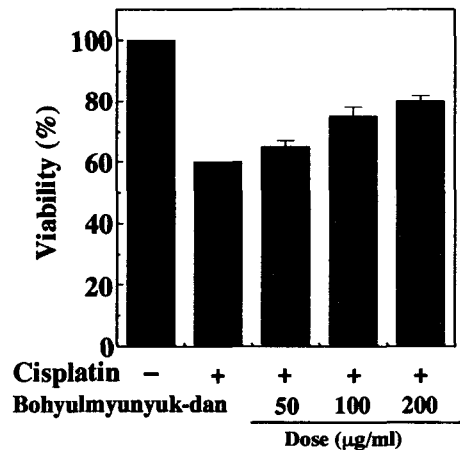


Fig. 3 Bohyulmyunuk-dan protected astrocytes from cisplatin. Cells were treated with various concentration of Bohyulmyunuk-dan and followed by the addition of 10 µg/ml cisplatin for 24 hr. The viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean(%)± S.D. of three experiments.

2. Cisplatin과 補血免疫丹의 細胞枯死 유도 효과

Cisplatin 독성에 의한 astrocytes의 형태학적인 변화를 알아보기자 astrocytes에 cisplatin 10µg/ml를 처리하고 24시간이 경과한 후 4% paraformaldehyde로 세포를 고정하고, Hoechst 33258로 핵 염색을 시행하였다. 정상 대조군 astrocytes에서는 타원형이고 둥근 형태의 핵이 관찰되었으나, cisplatin을 처리한 실험군에서 세포고사의 형태학적 특징중 하나인 염색사 응축

(chromatin condensation)현상이 관찰되었다(Fig. 4).

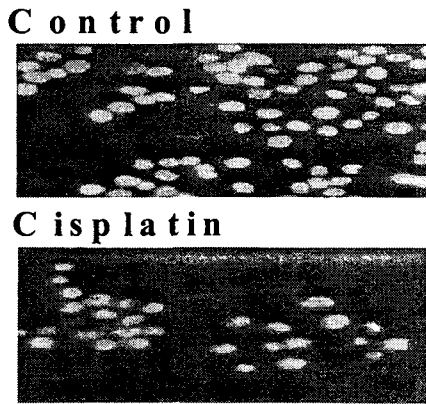


Fig. 4 Cisplatin induced the apoptotic changes of astrocytes. Nuclear fragmentation shown in astrocytes treated with cisplatin by Hoechst 33258 staining.

이 실험에서 염색사의 응축현상을 관찰하였으므로, flow cytometry 분석법을 이용하여 세포고사 현상을 확인하였다. astrocytes에 cisplatin 10 $\mu$ g/ml을 처리하고 24시간이 경과한 후 세포를 포집하여 PI 용액을 첨가하여 세포의 DNA를 염색한 후에 flow cytometry 분석을 이용하여 세포주기를 분석하였다<sup>12,13</sup>.

정상 세포에서는 세포고사 비율이 2.50%였으나 cisplatin을 처리한 실험군에서는 43.93%로 세포고사 비율이 현저히 증가하였으나 astrocytes에 cisplatin 10 $\mu$ g/ml과 補血免疫丹 200 $\mu$ g/ml을 처리한 실험군에서는 세포고사를 나타내는 sub G0/G1 세포군이 13.03%로 cisplatin 단독처리군에 비교하여 현저한 생존율의 회복을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

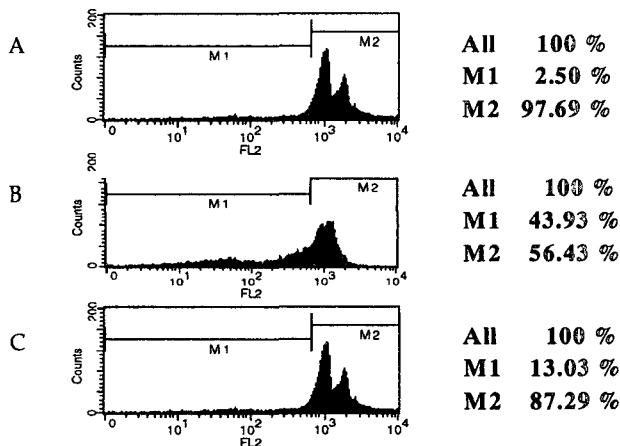


Fig. 5 DNA content analysis of astrocytes by propidium iodide staining. DNA content of nuclei was measured by flow cytometric analysis at 24 hr after treatment with cisplatin. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml of cisplatin for 24 hr and analysed their cell lyate by flow cytometry. The results are representative of two independent experiments.

### 3. Cisplatin과 補血免疫丹이 caspase 활성에 미치는 영향

Cisplatin에 의한 세포사멸 과정에서 세포고사가 caspase의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 caspase계 cysteine proteases중에서 caspase -3, -8 및 -9 cysteine proteases의 활성

변화 정도를 조사하였다.

Astrocytes에 cisplatin 10 $\mu$ g/ml을 처리하고 6시간 후부터 caspase-3 protease가 활성화되기 시작하여 18시간에 최고치(55배)를 나타냈다. 또한 caspase-9 protease도 cisplatin 처리 후 6시간부터 활성화되기 시작하여 12시간에 15배, 18시간에 30배까지 활성이 증가하였지만, caspase-8 protease의 활성 변화는 관찰되지 않았다. C6 glioma 세포에서도 동일한 효과를 보였다. Cisplatin 10 $\mu$ g/ml을 처리하고 6시간 후부터 caspase-3 protease의 활성화 정도를 증가하기 시작하여 24시간에 15배까지 증가하였으며, caspase-9 protease는 24시간에 3배 이상 활성증가를 나타냈다. 그러나 caspase-8 protease는 활성의 유의한 변화를 나타내지 않았다. (data not shown)

다음으로 補血免疫丹이 cisplatin에 의한 caspase 활성을 억제시키는지 알아보기 위해 astrocytes에 cisplatin 10 $\mu$ g/ml과 補血免疫丹을 농도별로 24시간 처리한 후 caspase family caspase protease인 -3, -8, 및 -9 protease의 활성을 측정하였다. 그 결과 補血免疫丹은 200 $\mu$ g/ml처리시 caspase -3, 및 -9 protease의 효소적 활성을 정상세포 수준으로 회복시켰다(Fig. 6).

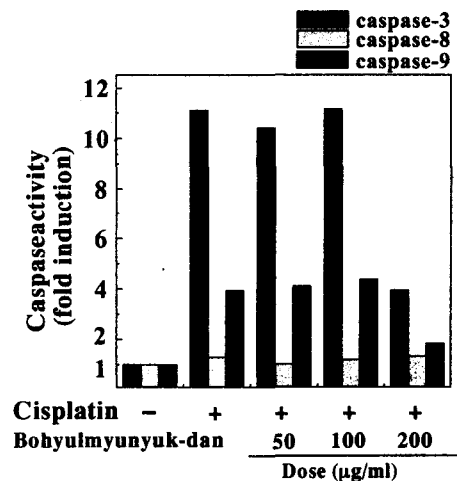


Fig. 6 Protective effects of Bohuimyuyuk-dan on the cisplatin-induced caspase activation in astrocytes. Cells were treated with various concentrations of Bohuimyuyuk-dan and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for 24 hr. Lysate from cells was used to measure activity of caspase family protease using fluorogenic peptides Ac-DEVD-AMC (50 $\mu$ M) for caspase-3 protease, Z-IETD-AFC for caspase-8 protease and Ac-LEHD-AFC for caspase-9 protease as substrates. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control values. Results represent as the mean(%) $\pm$ S.D. of three experiments.

### 4. Cisplatin과 補血免疫丹에 의한 PARP의 절단

Caspase-3 protease는 DNA 합성의 촉매 효소인 116kDa의 PARP 단백질을 절단하여 이 효소를 불활성화시키며, DNA의 손상을 회복하지 못하도록 하여 세포고사를 촉진시킨다(14-15). Astrocytes와 C6 glioma 세포에 cisplatin 10 $\mu$ g/ml을 처리한 후 PARP의 절단을 확인하기 위해 각각의 세포를 포집하여 세포 파쇄액을 얻은 이후 전기영동 후 PARP에 대한 항체를 사용하여 Western blotting를 시행하였다. 그 결과 caspase-3 protease가 높은 활성을 보인 astrocytes에서 cisplatin을 처리한 12시간에 PARP의 절단이 관찰되었다(Fig. 7).

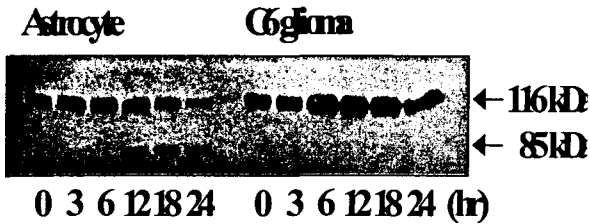


Fig. 7 Cleavage of PARP in cisplatin-treated brain cells. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml cisplatin for various periods. Lysate from cells was separated on 12.5% SDS-PAGE. PARP on the nitrocellulose membrane was proved by anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

다음으로 astrocytes에 cisplatin 10 $\mu$ g/ml과 補血免疫丹을 농도별로 24시간 처리하여 절단되었던 PARP의 회복여부를 관찰하였다. 그 결과 補血免疫丹 400 $\mu$ g/ml을 PARP의 분절이 방해되어 온전한 형태인 116kDa의 단백질로 관찰되었다(Fig. 8).

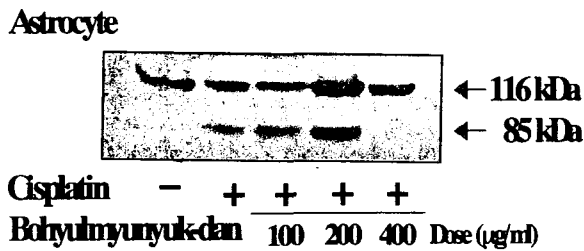


Fig. 8 Protective effects of Bohulmyunyeuk-dan on the cisplatin-induced PARP cleavage of astrocytes. Cells were treated with various concentrations of Bohulmyunyeuk-dan and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for 24 hr. Lysate from cells was separated on 12.5% SDS-PAGE. PARP was proved by anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

## 고찰

癌이란 좁은 의미로는 악성 종양을 지칭하는 말이나 일반적으로는 肉腫을 포함한 모든 악성 신생물을 일컫는다. 癌은 신체의 모든 기관에서 발생할 수 있으며, 뚜렷한 자극이 없는데도 불구하고 세포가 무제한 증식하여 마침내 개체를 죽음에 이르게 하는 질환이다<sup>22)</sup>. 서양의학에서 항암치료는 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 활용되고 있다. 그 중 수술요법과 방사선요법은 국소적인 치료법이기 때문에 한계성이 있으며, 화학요법이 항암치료에 활용도가 높다. 그러나 화학요법은 대부분 전신적인 효과를 나타내므로 암세포뿐 아니라 정상세포에도 작용하며, 독성이 커서 신체의 면역기능에 부정적인 영향을 미쳐 소화장애, 간장장애, 탈모, 면역기능저하, 골수조절장애 등의 부작용을 초래하는 경우가 많다<sup>23-26)</sup>. 한의학에서는 癌에 대하여 積聚, 癥瘕, 痰癖, 疔腫, 反胃, 癰疽 등에 포함시켜 설명하였으며<sup>33-34)</sup>, 癌의 발생을 正氣가 虛해진 후 飲食不節, 外邪, 七情鬱結 등에 의하여 臟腑機能과 氣血이 失調되어 氣血阻滯, 血瘀, 痰飲, 濕熱 등의 병리변화가 나타나고 이런 변화가 단독 혹은 상호교착하여 발생한다고 인식하였다<sup>4-5)</sup>. 한의학에서 항암치료는 일반적으로 腫瘍

초기나 증기에는 正氣가 허약하지 않으므로 祛邪 위주의 치료법을 사용하나 病程의 발전에 따라 종양이 中·末期에 이르고 正氣가 허약해졌을 때는 攻補兼施방법을 사용한다. 특히 腫瘍患者가 종양절제수술을 받았거나 혹은 방사선요법이나 화학요법을 받았을 때는 종양은 비록 제거되었거나 혹은 억제되었지만 인체 역시 일정 정도의 손상을 받았으므로 扶正을 위주로 치료하여야 한다. 그러나 수술이나 방사선, 화학요법 후에도 여전히 邪氣가 남아 있어 재발이나 전이가 발생할 수 있으므로 祛邪를 결합하여야 좋은 치료효과를 거둘 수 있다<sup>4,35)</sup>.

補血免疫丹은 원광대학교 비계내과학교실에서 방사선요법, 화학요법에 의해 손상된 인체의 항암능력을 회복시키기 위해 만든 처방으로 健脾益氣, 滋陰補血 등의 扶正이 위주가 되며 清熱解毒의 祛邪를 겸하였다. 構成藥物을 살펴보면 黃芪는 益衛固表·補中益氣하고, 인삼은 大補元氣·固脫生津하고, 白朮은 補脾胃·燥濕和中하여 위암, 식도암, 폐암 등에 항종양효과가 있으며 면역기능을 증강시켜 화학요법으로 유발되는 위장관 반응 및 감소된 백혈구를 증가시킨다. 鷄血藤은 補血活血·舒筋通絡하며, 紫河車는 補氣·養血益精하고, 當歸는 補血和血·調經止痛하여 자궁경부암, 백혈병 등에 항종양 효과가 있으며 면역기능을 증강시켜 화학요법으로 유발되는 조혈기능 손상을 감소시킨다. 白花蛇舌草는 清熱解毒·利濕하여 소화기, 임파선계통 종양에 항종양효과가 있으며, 직접 혹은 간접적으로 종양세포 억제효과가 있다<sup>36)</sup>. Cisplatin은 DNA cross-linking agent로 항암효과가 우수하며 비교적 치료범위가 넓어 난소암을 비롯하여 고환암, 방광암 및 두경부 종양 등에 많이 사용되고 있는 항암제이다. 그러나 cisplatin도 대부분의 항암제와 마찬가지로 신장독성, 혈액학적 장애, 위장관장애 및 골수억제와 비장위축으로 인한 면역억제 효과 등의 부작용을 유발할 뿐 아니라 질환의 치료 후에도 이상의 후유증으로 심한 고통을 겪게 된다<sup>27-32)</sup>.

이에 저자는 화학요법 치료시 정상세포에 미치는 세포사멸 과정과 이후 補血免疫丹의 세포회복능력을 실험적으로 규명하고자 cisplatin에 의한 astrocytes와 C6 glioma의 세포독성과 세포고사 현상을 확인하고, 補血免疫丹의 astrocytes 세포독성의 억제효과를 확인하였다. 그리고 세포고사 기전을 규명하기 위하여 cisplatin으로 처리한 세포의 caspase 활성화, PARP의 절단을 조사하였으며, 이후 補血免疫丹의 세포고사 억제효과를 관찰하였다. 먼저 cisplatin의 세포독성과 補血免疫丹의 회복효과를 살펴보고자 MTT assay를 이용하여 cisplatin을 처리한 astrocytes와 C6 glioma 세포의 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 모든 세포에서 농도 및 시간 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며(Fig. 1, 2), astrocytes에 cisplatin과 補血免疫丹을 처리하여 세포생존율을 측정하였을 때 정상세포의 80% 정도의 생존을 회복을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 한편, cisplatin과 같은 항암제들은 암세포에 세포고사를 유도한다고 알려져 있다. 세포고사는 다세포 생물체의 정상 발달과 항상성 유지에 중요한 현상으로 세포고사(necrosis)와는 달리 정상적인 세포내 소기관의 구조를 유지하면서 세포수축, 염색체농축, DNA분절, 아포토포시스 소포체 형성등의 특징적인 형태학적 변화가 동반되는 세포의 죽음이다<sup>37-38)</sup>. 세포고사를 확인하는 방법중에는 세포의 DNA양을 측정하여 종양의 생물학적인

활성도를 연구하는 flow cytometry가 많이 이용되고 있다. flow cytometry는 배양된 암세포의 DNA를 염색하여 이때 세포고사가 일어나지 않은 암세포 수와 세포고사가 일어나 조각난 DNA를 가진 세포의 수를 측정하여 세포고사정도를 확인하는 방법이다<sup>39)</sup>. 최근 세포고사 유도 기전으로 중요성이 제기되고 있는 caspase family는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 현재 14종류가 알려져 있다<sup>40)</sup>. 그 중 caspase-3 protease는 caspase cascade의 하방에 위치하여 상방에 위치한 caspase-8 및 -9 protease의 활성화신호가 합류하는 효소로서 손상된 DNA 복구에 관련된 단백질인 PARP를 절단하여 세포고사를 유도한다<sup>14-15)</sup>. 또한 cytochrome c는 정상적으로는 미토콘드리아의 내외막 사이에 존재하여 전자전달자 역할을 수행하며, 세포고사시에는 세포질로 방출되어 Apaf-1, procaspase-9 protease와 결합하게 된다. 결합한 후에 caspase-9 protease를 활성화시키고 지속적으로 caspase 계열을 활성화시킨다<sup>17-18)</sup>.

본 실험에서는 cisplatin에 의한 astrocytes 세포 손상에 세포고사가 유도됨을 알아보기 위해 cisplatin으로 처리한 astrocytes에서 핵염색을 하여 형광현미경으로 관찰한 결과 세포고사의 형태학적 특징인 염색사 응축을 확인하였다(Fig. 4). 또한 flow cytometry 분석 결과 정상세포에 비해 세포고사 비율이 증가함을 확인할 수 있었다. 이후 cisplatin과 補血免疫丹을 처리하여 다시 flow cytometry로 분석한 결과 세포고사비율이 감소되었다(Fig. 5). 이는 cisplatin에 의한 세포사멸 과정이 세포고사를 매개로 이루어지며, 補血免疫丹이 세포고사를 억제시켜 손상된 세포를 회복시킨다는 것을 의미한다. 다음으로 세포고사와 관련된 caspase family들의 활성과 PARP의 절단 여부를 살펴보고, 이후 補血免疫丹의 회복효과를 관찰하였다. cisplatin으로 처리한 astrocytes와 C6 glioma 세포에서 모두 caspase-3 및 -9 protease이 증가하였으며, 또한 astrocytes에서 caspase-3 protease 활성화에 따른 PARP 절단을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 그리고 astrocytes에 cisplatin과 補血免疫丹을 처리하여 caspase-3 및 -9 protease와 PARP 모두 정상수준으로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6, 8).

이상의 실험 결과, 補血免疫丹은 항암제의 부작용으로 인한 정상세포의 세포사멸 즉 세포고사 유도를 억제시켜 항암제의 부작용을 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며, 추후 補血免疫丹의 유효성분 규명 및 구체적인 작용기전에 관한 지속적인 연구가 필요하리라 판단된다.

## 결론

Cisplatin을 처리한 뇌세포에서 補血免疫丹의 세포방어효과에 관한 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. Cisplatin은 astrocytes와 C6 glioma cells에서 농도, 시간 의존적으로 세포독성을 나타냈으며, astrocytes에 cisplatin과 補血免疫丹을 처리하였을 때 astrocytes의 세포독성을 회복시켰다. Cisplatin으로 처리한 astrocytes에서 세포고사의 형태학적 특징인 염색사 응축을 관찰하였으며, flow cytometry 분석으로 세포고사를 확인하였다. 補血免疫丹은 cisplatin에 의한 세포고사를 억제하였다. Cisplatin은 astrocytes와 C6 glioma cells에서

caspase-3 및 -9 protease의 활성을 증가시켰으나 補血免疫丹 처리 시 caspase-3 및 -9 protease의 효소적 활성이 정상수준으로 회복되었다. Cisplatin으로 처리한 astrocytes에서 PARP의 절단을 확인하였으나 補血免疫丹은 cisplatin에 의한 PARP의 분절을 억제하였다.

이상의 결과들을 종합하면 補血免疫丹은 항암제로 인한 정상세포의 손상 즉, 항암제에 의해서 활성화된 세포고사 신호전달계의 기능 억제를 통하여 정상세포를 보호하였다. 이는 화학요법으로 발생한 부작용에 補血免疫丹을 투여하여 부작용을 예방할 수 있는 실험적 증거를 제시하고 있다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년도 원광대학교 승산연구기금 지원에 의하여 연구됨.

## 참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울대학교 출판부, pp. 1-2, 27, 1990.
2. 王冰 : 黃帝內經 素問, 서울, 고문사, p. 91,166,229,326, 1977.
3. 王冰 : 黃帝內經 靈樞, 서울, 고문사, p. 76,88, 1977.
4. 문구 외 : 암 동서의 결합치료 1권, 익산, 원광대학교 출판국, pp.256-264, 1999.
5. 趙峰肖 : 癌症治療之研究, 臺北, 紅綾印刷社, p. 1, 1959.
6. 성현제 외 : 암치료에 있어서 체질과 항암효과에 관한 한의학적 연구, 서울, 韓國韓醫學研究院論文集, 3(1):85-86, 1997.
7. 최승훈 : 東醫腫瘍學, 서울, 행림출판, pp. 78-81, 1995.
8. 金柄住 : 百合固金湯加味方의 抗腫瘍 效果에 관한 研究, 圓光大學校 博士學位論文, 2000.
9. 李並求 : 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용처리시 나타나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 관한 研究, 圓光大學校 博士學位論文, 2000.
10. 金成鎭 : 八珍湯合化積丸의 抗腫瘍 效果에 관한 研究, 圓光大學校 碩士學位論文, 1999.
11. 魯勳政 : 白花蛇舌草 메탄올 抽出物의 抗腫瘍效果 및 抗癌 機轉에 관한 研究, 圓光大學校 博士學位論文, 1999.
12. Wang JJ, Liu TY, Yin PH, Wu CW, Chem YT, Chi CW, Adamantyl maleimide induced changes in adhesion molecules and ROS are involved in apoptosis of human gastric cancer cells. Anticancer Res. 20(5):3067-3073, 2000.
13. Chang LC, Tsai TR, Wang JJ, Lin CN, Kuo KW, The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 242(1):21-25, 1998.
14. Lazebnik YA, Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature. 371:346-347,1994.
15. Wang ZQ, Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)

- ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* 9:509-520, 1995.
16. Kroemer G, Dallaporta B, M. Resche-Rigon, The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:619-642, 1988.
  17. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136, 1997.
  18. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X, Apaf-1, a human protein homologues to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413, 1997.
  19. Kulkarni GV, Lee W, Seth A, McCulloch CA, Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 245:170-178, 1998.
  20. Buckman J. F., Reynolds I. J., Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons. *J Neurosci.* 21(14):5054-5065, 2001.
  21. Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, Nagley P, Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp Cell Res.* 246(1):26-37, 1999.
  22. 新太陽社編輯局百科事典部 : 原色最新醫療大百科事典 12권, 서울, 新太陽社, p. 155, 1991.
  23. Fish B., Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, *Cancer*, 54:2609, 1984.
  24. Kim, S. H., Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, *J.Kor. Cancer Assoc*, 21:11, 1989.
  25. Park C.G., Lim D.K., Kook Y.H., Cha C.R., and Paik C.G., In vitro chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines, *J.Kor. Cancer Assoc* 22:61, 1990.
  26. 洪元植 : 現代中共의 癌治療, 서울, 英文社, pp. 373-376, 1980.
  27. Honda C, Tabuchi K, Effects of cisplatin on cultured glioma cells. *Gan To Kagaku Ryoho.* Japanese May 13(5):1921-1926, 1986.
  28. Noda S, Yoshimura S, Sawada M, Naganawa T, Iwama T, Nakashima S, Sakai N, Role of ceramide during cisplatin-induced apoptosis in C6 glioma cells. *J Neurooncol.* 52(1):11-21, 2001.
  29. Krajci D, Mares V, Lisa V, Spanova A, Vorlicek J, Ultrastructure of nuclei of cisplatin-treated C6 glioma cells undergoing apoptosis. *Eur J Cell Biol.* 79(5):365-376, 2000.
  30. Krajci D, Mares V, Lisa V, Ultrastructural response of the nuclear envelope (NE) of C6 glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Gen Physiol Biophys.* 18(1):59-63, 1999.
  31. Poppenborg H, Munstermann G, Knupfer MM, Hotfilder M, Wolff JE, C6 cells cross-resistant to cisplatin and radiation. *Anticancer Res.* 17(3):2073-2077, 1997.
  32. Honda C, Tabuchi K, Effects of cisplatin on cultured glioma cells. *Gan To Kagaku Ryoho.* Japanese 13(5):1921-1926, 1986.
  33. 郁仁存 : 中醫腫瘍學, 北京, 北京科學技術出版社, pp.1-10,1983.
  34. 錢伯文 : 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, p. 2-20, 1980.
  35. 李家庚 外 : 中醫腫瘤防治大全, 北京, 科學技術文獻出版社, pp. 156-157, 1996.
  36. 劉春安 外 : 抗癌中草藥大辭典, 湖北, 湖北科學技術出版社, p.15-21,340-343,367-371,441-445,593-595,903-909,1019-1022,1994.
  37. 高忠顯 外 : 現代腫瘤診斷治療學, 北京, 科學技術文獻出版社, pp.53-58, 1997.
  38. Ling CC., Guo M., Chen CH., Deloherey T., Radiation-induced apoptosis : Effects of cell age and dose fractionation, *Cancer Res* 55:5207-5212, 1995.
  39. Hedly DW, Flow cytometry using paraffin-embedded tissue:five years on. *Cytometry* 10:229, 1989.
  40. Goldberg YP, Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genetics* 13:442-449, 1996.