

人蔘瀉肺湯 추출물에 의한 인체 폐암세포의 Apoptosis 유도 기전에 관한 연구

박 철 · 이민우¹ · 김원일¹ · 이원호² · 박동일¹ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 1: 폐계내과학교실 및 한의학연구소, 2: 부산대학교 자연과학대학 생물학과

Induction of Apoptotic Cell Death by Insamsapye-tang Extract in Human Lung Cancer A549 Cells

Cheol Park, Min Woo Lee¹, Won Il Kim¹, Won Ho Lee², Dong Il Park¹, Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, and Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Donggeui University,

1: Research Institute of Oriental Medicine, 2: Department of Biology, College of Natural Sciences, Busan National University

We investigated the effects of Insamsapye-tang (ISSPT) water extract on the growth of human lung carcinoma A549 cells. Upon treatment with ISSPT extract, a concentration-dependent inhibition of cell viability was observed and cells developed many of the hallmark features of apoptosis, including condensation of chromatin. Flow cytometry analysis confirmed that ISSPT treatment increased populations of apoptotic-sub G1 phase. In addition, proteolytic degradation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and β -catenin protein were observed after treatment of ISSPT extract. These apoptotic effects of ISSPT in A549 cells were associated with marked inhibition of Bcl-xL expression in a dose-dependent manner, however the levels of Bcl-2 and Bax expression were not affected. ISSPT treatment also induced the expression of tumor suppressor p53 mRNA and inhibited the expression of caspase-3 mRNA. The previous and present results indicated that ISSPT-induced inhibition of lung cancer cell proliferation is associated with the blockage of G1/S progression and the induction of apoptosis.

Key words : Insamsapye-tang(人蔘瀉肺湯), lung carcinoma, apoptosis, PARP, β -catenin, Bcl-xL

서 론

세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의해 비정상적인 세포주기 반복을 통한 증식이 계속되는 것이 암세포라고 할 수 있다. 따라서 세포주기와 연관된 특정 유전자의 발현 조절을 통한 apoptosis 유발 기전의 해석은 암을 포함한 특정 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다. 특히 apoptosis (programmed cell death)는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다^{1,2)}. 또한 apoptosis는 개체 보존을 위한 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 세포주기 진행에

중요한 역할을 하는 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptosis 유발의 주원인이 될 수 있다³⁾. Apoptosis의 유발에는 세포증식 억제에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53이나 Cdk inhibitor p21 뿐만 아니라, apoptosis를 직접 조절하는 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다⁴⁻⁶⁾. 그중 가장 잘 알려진 유전자는 Bcl-2/Bax family 단백질로서 Bcl-2는 apoptosis를 억제 하면서 세포의 증식을 유도하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도한다⁴⁾. 이들 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 mitochondria에서 세포질 내로 cytochrome c의 유리 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다. 특히 DNA 손상에 의한 p53의 발현 증가는 p21과 연관되어 세포주기 상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로 알려지고 있다⁴⁻⁶⁾. 또한 caspase라고 이름 붙여진 ICE/

* 교신저자 : 최영현, 부산시 부산진구 양정동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choiyh@donggeui.ac.kr · Tel : 051-850-7413
· 접수 : 2003/03/15 · 수정 : 2003/04/30 · 채택 : 2003/05/28

CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases 로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다^{2,4}. 본 실험에 사용된 인삼사폐탕(人蔘瀉肺湯, Insamsapye-tang)은 “의학입문(醫學入門)에 처음 수록되어 있으며⁷, 처방에 포함된 개별 약물들은 각종 인체 종양에 항암 작용이 있는 것으로 알려져 있다⁸. 본 연구실에서의 선행연구에 의하면 인삼사폐탕 수용액 추출물의 처리에 의하여 처리 농도 증가에 따른 폐암세포의 성장억제 효과가 세포주기 G1 arrest와 연관이 있었으며, 이러한 현상은 세포주기 조절에 관여하는 특이 유전자들의 발현 변화와 연관성이 있었다⁹. 인삼사폐탕 추출물의 이러한 효과는 암세포의 apoptosis 유발과도 밀접한 연관성을 가질 수 있었기에 본 연구에서는 인삼사폐탕 추출물 처리에 따른 폐암세포의 apoptosis 유발 관련 기전 해석을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 사백산

실험에 사용한 사백산 구성 약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정제한 후 사용하였으며, 처방의 내용(Table 1)은 東醫寶鑑에 따랐다^{9,10}. 사백산 추출물의 준비는 Kang et al.¹¹의 방법에 준하였는데, 즉 약재 1 g당 증류수 10 ml을 가하고 환류 냉각장치를 이용하여 추출한 후 동결 건조하여 고형 성분을 얻어 시료로 사용하였다⁹.

Table 1. Prescription of Insamsapye-tang

韓藥名	生藥名	重量比
황금(黃芩)	Radix scutellariae	1
지자(梔子)	Fructus gardeniae	1
인삼(人蔘)	Radix Ginseng	1
지각(枳殼)	Fructus aurantii	1
박하(薄荷)	Herba menthae	1
연교(連翹)	Fructus forsythiae	1
행인(杏仁)	Semen armeniacae	1
상백피(桑白皮)	Cortex mori	1
대황(大黃)	Radix et rhizoma rhei	1
길경(桔梗)	Radix platycodonis	1
감초(甘草)	Radix glycyrrhizae	1

2. 암세포주 및 인삼사폐탕 추출물의 처리

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 생명공학연구소 (KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, Lee et al.¹²의 방법에 준하여 배양하였다. 인삼사폐탕 추출물의 처리를 위하여 암세포를 24시간동안 안정화시킨 후, 배양 배지에 인삼사폐탕 추출물을 적정 농도로 희석하여 처리하였다.

3. Hematocytometer를 이용한 세포 성장률의 측정

세포배양용 6 wells plate를 이용하여 암세포를 분주하고 24 시간 동안 안정화시킨 후, 인삼사폐탕 추출물을 48시간동안 처리하였다. 준비된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세한 후, trypan blue (Gibco BRL, Gaithersberg, MA, USA)

로 염색하였다. 이를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경 (x 200) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하였다¹³.

4. DNA flow cytometry에 의한 sub-G1기 세포 분석

인삼사폐탕 추출물에 의한 apoptosis 유발의 여부를 조사하기 위하여 정상 및 인삼사폐탕 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 염색한 후, RNase (Sigma)를 처리하여 4°C 암하에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 세포를 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 정량적 분석을 실시하였다¹³.

5. DAPI staining

인삼사폐탕 추출물 처리에 의한 암세포 핵의 형태적 변화 관찰을 위하여 정상 및 48시간 동안 인삼사폐탕 추출물이 처리된 암세포를 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액으로 염색한 후, 형광 현미경(x 400)을 이용하여 시료처리 농도에 따른 핵의 형태변화를 관찰하였다^{13,14}.

6. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

Choi et al.¹⁵의 방법에 준하여 정상 및 인삼사폐탕 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 수세한 후, 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였으며, 동량의 단백질을 SDS (sodium dodesyl sulfate) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 4°C에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체를 적용시킨 다음 Enhanced ChemiLuminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다^{13,15}. Western bolt analysis를 위해 사용된 항체인 rabbit polyclonal antibody인 PARP, β-catenin 및 caspase-3는 Santa Cruz Biotechnology Int. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

7. Rverse transcriptase polymerase chain reaction assay

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNazol B(TEL-TEST, INC., Texas, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi¹³의 방법에 준하여

oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Bax, Bcl-2, Bcl-xL 및 caspase-3 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 2). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

Table 2. Gene-specific primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
Bax	Sence	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-xL	Sence	5'-CGG-GCA-TTC-AGT-GAC-CTG-AC-3'
	Antisence	5'-CTT-CAA-CCG-CTG-GTT-CCT-GA-3'
Caspase-3	Sence	5'-ATG-GAG-AAC-ACT-GAA-AAC-TCA-3'
	Antisence	5'-GAA-CTC-TAT-TTT-TAT-CAC-TAA-3'
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

결과 및 고찰

1. 암세포의 증식에 미치는 인삼사폐탕 추출물의 영향

준비된 인삼사폐탕 추출물 (ISSPT)을 인체 폐암세포주 A549 세포에 48시간 동안 처리한 후, 살아있는 세포의 수를 계수하여 인삼사폐탕이 처리되지 않은 대조군의 세포 수와 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 인삼사폐탕 추출물이 처리되지 않은 정상 배지에서 48 시간 동안 성장한 암세포는 초기(2×10^4 /ml)에 비하여 약 8.9 배정도 증가(17.8×10^4 /ml)되었으나 0.1 mg/ml 및 0.2 mg/ml 농도로 희석된 배지에서 배양된 경우 약 7.6 배(15.6×10^4 /ml) 및 7.45 배정도(14.9×10^4 /ml) 증가되었다. 그러나 0.3 mg/ml 처리군에서는 4.3 배(8.4×10^4 /ml) 증가 정도로 나타났으며, 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군에서는 3.9 배(7.7×10^4 /ml) 및 2.5 배 (5.0×10^4 /ml) 증가로 인삼사폐탕 추출물이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 생존율은 상대적으로 감소되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과들에서 인삼사폐탕이 처리된 배지에서 자란 암세포는 인삼사폐탕 추출물의 처리농도에 의존적으로 모두 정상적인 암세포 증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다. 그러나 본 연구실에서 수행한 바 있는 율폐산(潤肺散)¹¹⁾ 및 사백산(瀉白散)^{9,16)}의 경우와 비교해 보면, 동일 조건에서 인삼사폐탕에 의한 암세포의 증식 억제 효과는 최소한 그들에 비하여 약 10배 이상의 강한 암세포 증식 억제 효과가 있었다.

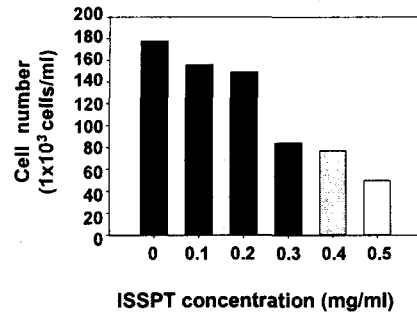


Fig. 1. Growth inhibition by water extract of Insamsapye-tang treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and treated with various concentrations of ISSPT for 48 h. The viable cells were counted with hemacytometer. Results are expressed as percentage of the untreated control obtained from two separate experiments.

2. 인삼사폐탕 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발

이상의 인삼사폐탕 추출물에 의한 암세포의 성장억제가 apoptosis 유발과 강한 연관성이 있을 것으로 기대되어 DNA flow cytometry를 이용하여 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 분석하였다¹³⁾. 이를 위해 실험 방법에 서술한 것처럼 정상 및 인삼사폐탕이 함유된 배지에서 자란 세포들을 고정한 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 PI로 염색하여 flow cytometry로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다.

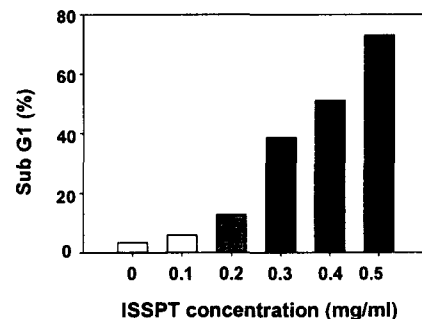


Fig. 2. Induction of apoptotic cell death by ISSPT treatment in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were treated with ISSPT for indicated concentrations for 48 h. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry. Data are means average of two separate experiments.

Fig. 2에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에서는 apoptosis 현상을 3% 전후였으나, 0.1 mg/ml 처리군에서 5.90% 정도였으며, 0.2 mg/ml 처리군에서 12.86%로 나타났었다. 0.3 mg/ml 처리군 이상에서는 apoptosis 유발의 정도가 매우 증가(38.56%)되기 시작하여 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군에서는 50.99% 및 73.03%의 암세포가 apoptosis의 과정을 통하여 사멸되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 인삼사폐탕의 처리에 의한 apoptosis 유발의 직접적인 증거를 제시하기 위하여 정상 및 인삼사폐탕 추출물이 함유된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 핵의 형태적인 변화를 조사하였다. Fig. 3은 DAPI 염색에 의한 핵의 형태에 미치는 인삼사폐탕 추출물의 영향을 나타낸 결과로

서, 인삼사폐탕 추출물이 처리된 배지에서 자란 암세포의 경우 정상배지에서 자란 세포들에서 관찰할 수 없는 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 apoptotic body의 출현^{16,17}이 인삼사폐탕 추출물 처리 농도 의존적으로 증가됨을 알 수 있었다. 이상의 결과는 인삼사폐탕 추출물의 처리에 의한 암세포 성장 억제에 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있다는 정량적인 결과 및 인삼사폐탕 추출물 처리에 의한 세포 증식의 억제 정도와도 밀접한 연관성을 지닌다고 할 수 있겠다. 이러한 효과 역시 기존의 결과들과 비교해 볼 때 인삼사폐탕 추출물의 경우 저농도에서 매우 효과적으로 apoptosis를 유발하였음을 알 수 있었다^{11,16}.

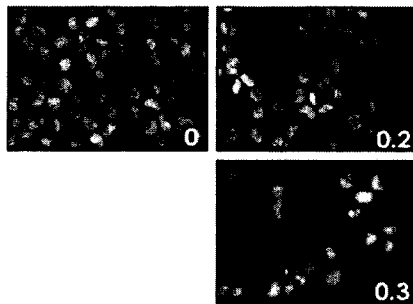


Fig. 3. Formation of apoptotic bodies by ISSPT treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with ISSPT for 48 h, and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

3. PARP 및 β -catenin 단백질의 발현에 미치는 인삼사폐탕 추출물의 영향

다음은 인삼사폐탕 추출물에 의한 apoptosis 유발의 생화학적 증명을 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질인 PARP^{18,19}의 발현에 미치는 인삼사폐탕 추출물의 영향을 Western blot 분석으로 조사하였다. 특정 내, 외부 신호 전달에 의하여 세포 내에서 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질의 분해가 수반되며, 그 결과 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편을 관찰할 수 있다^{18,19}. 특히 PARP는 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며²⁰, apoptosis의 과정 중 caspase의 활성화에 의해 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다²⁰. 이를 확인하기 위하여 48시간 동안 정상 및 인삼사폐탕 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포의 총 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 전이 시켜 PARP 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있었다. 인삼사폐탕 추출물이 처리된 배지에서 배양된 세포의 경우 본 실험 조건에서 85 kDa 위치에서 발현되는 band는 관찰할 수 없었으나 PARP 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다.

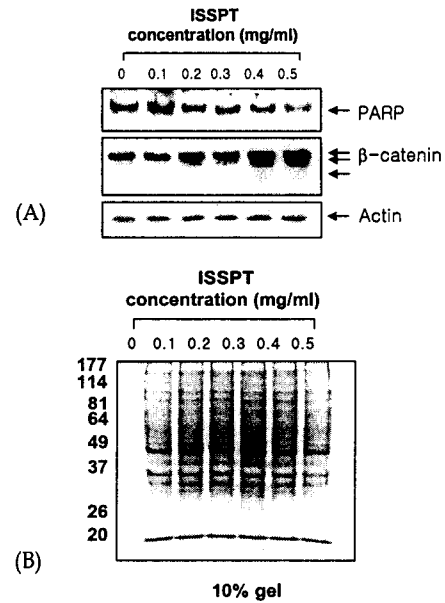


Fig. 4. (A) Degradation of PARP and β -catenin protein by ISSPT treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with ISSPT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 6% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-PARP and anti- β -catenin antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a internal control. **(B) Total protein patterns of A549 cells after ISSPT treatment.** Cells were treated with ISSPT for 48 h and the cell lysats were prepared. Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and visualized by coomassie blue staining.

한편 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다²¹⁻²³. 정상 세포의 경우 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다. 인삼사폐탕에 의한 apoptosis가 이러한 세포 유착과 밀접한 관계를 지니는지의 여부를 조사하기 위해서 윤페산이 함유된 배지에서 자란 세포들의 β -catenin 발현을 조사한 결과 Fig. 4에서 처럼 인삼사폐탕 추출물 처리 농도의 증가에 따라 단편화 현상에 이한 저분자 β -catenin 단백질 발현의 출현 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 실험 과정에서 관찰된 인삼사폐탕 추출물이 함유된 배지에서 배양된 암세포의 부착력 상실과 밀접한 연관성이 있었음을 알 수 있었다⁹. 그러나 사백산 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발에서 92 kDa인 주 β -catenin 단백질의 발현이 매우 감소된 반면 단편화 현상은 관찰 할 수 없었으며¹⁶, 윤페산 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발에서는 PARP의 분해 현상이 관찰되었음에도 β -catenin의 발현에는 아무런 변화가 없었다¹¹. 동일 실험조건에서 이러한 서로 다른 결과를 볼 수 있는 것은 apoptotic 유발은 일어나지만 그 과정에서 수반되는 세포 부착관련 단백질의 작용은 매우 다르게 조절될 수 있을 가능성을 제시하는 흥미로운 결과였다.

4. Apoptosis 관련 유전자의 발현에 미치는 인삼사폐탕 추출물의 영향

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 인삼사포탕 추출물이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제에는 PARP 및 β -catenin 단백질의 분해와 연관된 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 인삼사포탕에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 몇 가지 유전자 산물들의 발현을 조사하였다. 그중 Bcl-2/Bax family의 대표적 유전자인 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다⁴⁾. 이들 두 유전자군은 세포 내 소기관 중 mitochondria로 부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspases 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 효소 활성을 조절한다^{4,24)}. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. Fig. 5는 RT-PCR에 의한 결과로서 인삼사포탕 추출물의 농도 증가에도 Bax 및 Bcl-2의 발현에는 큰 변화가 없었다. 그러나 Bcl-2 family에 속하는 Bcl-xL의 발현은 인삼사포탕 추출물의 처리농도 의존적으로 발현이 감소되었음을 알 수 있었다. 따라서 인삼사포탕 추출물의 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발에는 Bax의 발현 증가보다는 Bcl-xL의 발현 감소와 연관성이 있을 것으로 사료된다.

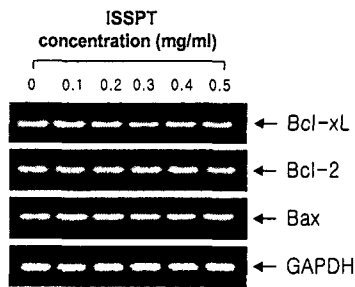


Fig. 5. Inhibition of Bcl-x/L mRNA expression by ISSPT in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with ISSPT for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

한편 ICE/CED-like protease family인 caspase 역시 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로서 작용하는데^{1,2)}, 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며, Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성도가 조절되는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 따라서 지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 (CPP32)의 발현 정도를 조사하였다. 아울러 Bcl-2/Bax family의 up-stream 조절인자로서 세포주기 교란 및 apoptosis 유발에서 매우 중요한 역할을 하는 p53 및 p53의 down-regulator인 Cdk inhibitor p21의 mRNA 발현에 미치는 인삼사포탕의 영향을 조사하였다. Fig. 6의 결과에서 볼 수 있듯이 인삼사포탕 추출물의 처리에 의하여 p53 mRNA의 발현은 처리 농도의존적으로 증가되었으나 caspase-3의 mRNA 발현은 다소 감소되었으며, p21 mRNA 발현의 변화는 관찰할 수 없

었다. 즉 인삼사포탕의 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발은 p53의 발현 증가에 따른 Bcl-2/Bax family의 발현 변화에 의한 caspase-3의 활성화와 관련이 있을 것으로 추측되나 p21의 역할 및 caspase-3의 활성화 등에 관해서는 추가적인 연구가 보완되어야 할 것이다.

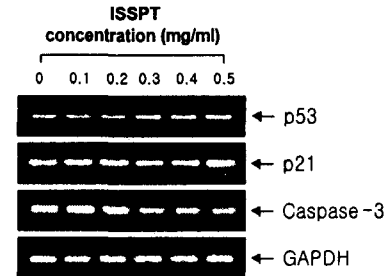


Fig. 6. Induction of p53 and inhibition of caspase-3 mRNA by ISSPT treatment in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with ISSPT for 48 h, lysed and cellular total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53, p21 and caspase-3 primer described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

6. COXs의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향

한편 염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다^{27,28)}.

Prostaglandin의 합성에서 2가지의 cyclooxygenases (COXs) isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다^{29,30)}. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다^{31,32)}. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 specific inhibitor에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등³³⁾의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다^{31,33,34)}.

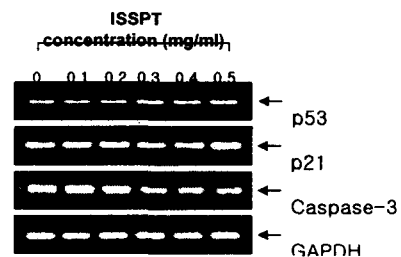


Fig. 7. Effect of ISSPT on the mRNA levels of cyclooxygenases (COXs) in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with ISSPT for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using COX-1 and COX-2 primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

참고 문헌

따라서 인삼사폐탕 추출물 처리에 의한 이상의 암세포의 증식억제 효과와 prostaglandin 합성 억제와의 상관성 여부를 조사하기 위하여 두 가지 종류의 COX 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향을 비교하였다. RT-PCR의 결과인 Fig. 7에서 볼 수 있듯이 인삼사폐탕 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포의 COX-1 및 COX-2의 전사수준에서의 발현 변화에는 큰 영향이 없었다.

이상의 결과를 최근 본 연구실에서 보고한 바 있는 결과⁹⁾와 종합하여 볼 때, Fig. 8과 같이 암세포의 성장억제와 연관된 인삼사폐탕 추출물의 작용 기전을 제시할 수 있었다. 즉 선행연구의 결과에 의하면 인삼사폐탕 추출물의 처리에 의한 암세포의 성장억제 효과는 세포주기 G1 arrest와 연관성이 있었으며, 이는 세포주기 조절 양성 인자인 cyclins 및 Cdk의 발현 변화보다는 Cdk inhibitor p27 특이적인 발현의 증가 현상 및 종양억제 유전자 retinoblastoma 단백질의 인산화 억제와 연관성이 있었다⁹⁾. 이러한 특이 유전자들의 발현과 연관된 암세포의 성장억제는 상기 본 연구에서 제시한 몇 가지 유전자들의 발현 변화를 통하여 apoptosis 유발로 연결될 것으로 추측되어진다. 따라서 인삼사폐탕 및 인삼사폐탕 구성 한약재의 개별 약재에 관한 암세포 증식억제 효과의 차이점 해석 등의 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

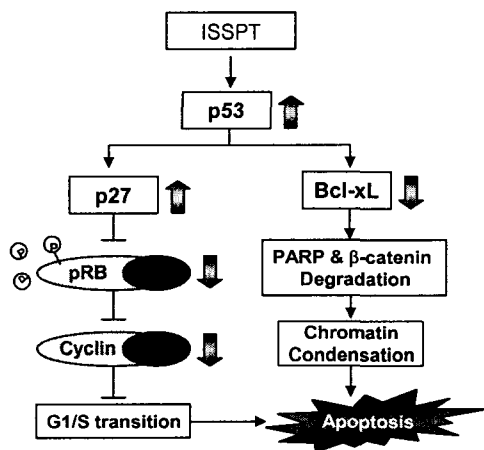


Fig. 8. Proposed schematic model for ISSPT treatment-mediated cell cycle dysregulation and apoptosis of A549 cells.

결 론

A549 인체 폐암 세포의 성장에 미치는 인삼사폐탕의 영향을 분석하기 위하여 인삼사폐탕 추출물 처리에 의한 암세포 성장 억제와 연관된 apoptosis 유발 여부를 조사하였다. 인삼사폐탕 추출물의 처리농도 증가에 따른 암세포의 성장은 농도 의존적으로 대조군에 비하여 매우 감소되었고, 이는 sub G1기의 증가, chromatin의 응축에 의한 apoptotic body의 증가, PARP 및 β-catenin 단백질의 분해와 연관된 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있었음을 알 수 있었다. 인삼사폐탕 추출물에 의한 apoptosis의 유발에는 Bax의 발현 변화보다는 Bcl-2 family에 속하는 Bcl-xL의 발현 억제에 의한 것이었으며, cyclooxygenase와는 연관성이 없는 것으로 사료된다.

1. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
2. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476, 1993.
3. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.
4. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
5. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174, 1994.
6. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
7. 安秉國 譯, 國譯編註 醫學入門, 서울, 崇文社, Vol.4, p.424, 1974.
8. 李軍德, 抗癌中草藥彩色圖譜, 湖北, 中國中醫藥出版社, 1996, p.2,116,150,170, 184.
9. Lee, M.W., C. Park, W.H. Lee, Y.H. Choi, D.I. Park, Induction of Cdk inhibitor p27 and inhibition of pRB phosphorylation by Insamsapye-tang treatment in human lung cancer A549 cells, *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* (submitted).
10. 許浚, 東醫寶鑑, p 470, 南山堂, 서울, 1994.
11. Kang, Y.K., D.I. Park, J.H. Lee, Y.H. Choi, The effects of Yunpyesan on cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human lung cancer A549 cells, *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* 16, 745-755, 2002.
12. Lee, J.H., Kang, G.H., Kim, G.C., Kim, K.M., Choi, B.T., Kang, H.S., Lee, Y.T., Choi, Y.H. Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 21, 1239-1244, 2002.
13. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study, *Exp. Mol. Med.* 33, S15-36, 2001.
14. Choi, Y.H., Im, E.O., Suh, H.S., Jin, Y.E., Lee, W.H., Yoo, Y.H., Kim, K.W., Kim, N.D. Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int. J. Oncol.* 18, 979-984, 2001.
15. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* 272, 28479-28484, 1997.
16. Lee, J.H., B.R. Kang, C.W. Kam, D.I. Park, Y.H. Choi, Induction of apoptotic cell death by sabaeksan extract in human lung

- cancer A549 cells, *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* (submitted).
16. Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92, 57-70, 2001.
 17. Lieberthal, W., Koh, J.S., Levine, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol.* 18, 505-518, 1998.
 18. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985, 1993.
 19. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
 20. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809, 1995.
 21. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87, 992-1005, 2000.
 22. Debruyne, P., Vermeulen, S., Mareel, M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol. Belg.* 62, 393-402, 1999.
 23. Choi, Y.H., Baek, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, N.D., Kim, K.W. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 17, 565-571, 2000.
 24. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499, 1998.
 25. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251, 1993.
 26. Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136, 1997.
 27. Turini, M.E., DuBois, R.N. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 53, 35-57, 2002.
 28. Giercksky, K.E. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 15, 821-833, 2001.
 29. Vainio, H. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer* 94, 613-614, 2001.
 30. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 411-417, 2001.
 31. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* 480-481, 243-268, 2001.
 32. Chiarugi, V., Magnelli, L., Gallo, O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int. J. Mol. Med.* 2, 715-719, 1998.
 33. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest.* 79, 1469-1477, 1999.
 34. Thun, M.J., Henley, S.J., Patrono, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 252-266, 2002.