

千金葦莖湯의 인체 폐암세포 증식억제에 관한 연구

박봉규 · 박동일*

동의대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Anti-proliferative Effects of Cheonkumwikyung-tang in A549 Human Lung Carcinoma Cells

Bong Kyu Park, Dong Il Park*

Department of Oriental Medicine, Dongeui University

To investigate the anti-cancer effects of aqueous extract of Cheonkumwikyung-tang (CKWKT) on the growth of human lung carcinoma cell line A549, we performed various biochemical experiments such as the effects of CKWKT on the cell proliferation and viability, the morphological changes, the effects on expression of apoptosis and cell growth-regulatory gene products. Results obtained are as follow; CKWKT treatment declined the cell viability and proliferation of A549 cells in a concentration-dependent manner. The anti-proliferative effect by CKWKT treatment in A549 cells was associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. CKWKT treatment induced apoptotic cell death of A549 cells in a concentration-dependent manner, which was associated with inhibition and/or degradation of apoptotic target proteins such poly(ADP-ribose) polymerase, β -catenin and phospholipase C- γ 1. Western blot analysis revealed that the levels cyclin-dependent kinase inhibitor p21 expression were induced by CKWKT treatment in A549 cells. Taken together, these findings suggest that CKWKT-induced inhibition of human lung cancer cell proliferation is associated with the induction of apoptotic cell death via regulation of several major growth regulatory gene products and CKWKT may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : Cheonkumwikyung-tang(千金葦莖湯; CKWKT), PARP, β -catenin, PLC- γ 1, p21

서론

肺癌의 誘發因子는 흡연, 대기오염, 직업(석면, 우라늄)과 유전적 요인 등이 알려져 있으며¹⁾, 최근 우리나라의 폐암에 의한 사망률이 인구 10 만명 당 25명으로 암 중 가장 높은 사망률을 보여주고 있으며 흡연인구의 증가, 대기오염, 평균 수명의 증가 등으로 앞으로도 꾸준한 상승이 예상되고 있다^{2,3)}. 서양의학적 治療는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 등이 있으나 肺癌의 早期發見의 어려움으로 因해 病機가 진행된 경우가 많으므로 대체로 豫後가 不良하여 效果의인 治療法의 開發이 要求되고 있는 실정이다⁴⁾.

韓醫學의 肺癌은 臨床上 肺癰證의 범주에 속하는데, 肺癰 病리과정은 風熱侵襲肺衛, 邪熱內鬱于肺, 熱盛血腐潰膿 등으로 나눌 수 있으며, 治法도 임상증상의 특징에 따라 달리한다⁵⁾.

千金葦莖湯은 葦莖, 薏苡仁, 桃仁, 瓜蒂로 구성된 처방으로 《外臺秘要⁶⁾》, 《備急千金要方⁷⁾》에 처음으로 기재되었으며, 그 효능은 肺癰, 咳有微熱, 煩滿, 胸中甲錯에 사용된다⁸⁾. 千金葦莖湯의 개별 약재의 효능을 살펴보면 葦莖은 清肺胃熱, 止嘔除煩의 효능으로 溫熱病으로 인한 咳嗽 또는 濕溫喉疽咽痛과 胃熱로 인한 嘔吐 咳逆 등의 증을 다스리고, 薏苡仁은 利水滲濕, 除濕痺, 清肺排膿, 健脾止瀉의 효능으로 風濕痺痛, 筋脈拘攣, 肺癰, 肺痿, 腸癰 등의 증을 다스린다. 瓜蒂는 涌吐, 祛濕熱의 효능으로 痰涎, 宿食, 濕熱黃疸, 濕邪頭痛, 喉痺 등을 다스리며⁹⁾, 桃仁은 破血祛瘀, 潤燥滑腸의 효능으로 血滯經閉, 痛經, 肺癰, 腸癰, 腸燥便秘 등의 증상을 다스린다⁹⁾. 葦莖湯의 효능에 대한 연구로는 박 등¹⁰⁾이 葦莖湯·加味葦莖湯의 A549에 대한 세포독성과 S-180에 대한 항암 효과를 살펴본 바는 있으나, 千金葦莖湯으로 암의 기전을 연구한 바는 없었다.

이에 저자는 千金葦莖湯 추출물로 인체 폐암세포의 증식억제 기전을 살펴보고자 千金葦莖湯 추출물의 처리농도에 따른

* 교신저자 : 박동일, 부산광역시 진구 양정2동 동의대학교 한의과대학

· E-mail : dipark@demc.or.kr, · Tel : 051-850-8650

· 접수 : 2004/05/24 · 수정 : 2004/06/17 · 채택 : 2004/07/20

A549 폐암세포의 성장을 및 생존을 억제, 이로 인한 형태적 변화 및 단백질 발현을 관찰하고 apoptosis 조절 및 세포증식과의 연관성을 가지는 유전자 산물의 발현 및 변화를 관찰한 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 암세포주 및 배양조건

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포(human lung carcinoma cells)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA) 가 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다¹¹⁾. 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간마다 0.05% trypsin- ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

2. 시료의 준비

본 실험에 사용된 약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입(주, 광명 제약)하여 정선한 후 사용하였으며, 처방의 내용은 《東醫肺系內科學⁹⁾》에 준하였으며, 그 조성은 Table 1에 나타낸 바와 같다. 千金葦莖湯(CKWKT, aqueous extract of Cheonkumwikyung-tang)의 추출물을 얻기 위하여 약재 1 g당 증류수 1 ml을 가하여 환류 냉각장치가 장착된 가열기에서 180~200°C의 온도로 2시간 동안 끓이고, 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시킨 후, 그 상층액을 Whatman 필터(No. 2)로 걸러내고 감압 농축과 가열을 통해 고형성분을 얻어내어 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 초저온 냉동고에 보관하였다.

Table 1. Composition of Cheonkumwikyung-tang (CKWKT)

韓藥名	生藥名 (Herb name)	用量 (Weight, g)
葦莖	<i>Phragmitis Rhizoma</i>	30
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	30
瓜蒂	<i>Melo Pedicellus</i>	24
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	9
Total amount		93

3. 시료의 처리

千金葦莖湯 추출물의 처리를 위해 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 부유시킨 다음 1 × 10⁵개/ml 정도로 세포배양용 페트리 접시에 분주하여 24시간 동안 안정화 시켰다. 세포에 처리하기 직전 千金葦莖湯 추출물을 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

4. Hematocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

세포배양용 6 well plate에 A549 폐암세포를 2 × 10⁴개/ml 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 千金葦莖湯 추출물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA 0.5 ml를 처리하여 세포를 부유시킨 후 phosphate-buffered saline (PBS) 0.5 ml을 가하여 세포를 모은 다음 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞어 2분간 처리하였다. Pasteur pipette의 모세관 현상을 이용하여 세포를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰하여 푸른색으로 염색된 세포를 죽은 세포로 추정하고 염색이 되지 않은 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 이에 따른 결과는 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)을 사용하여 분석하였다.

5. 위상차 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포배양용 페트리 접시에 A549 폐암세포를 6 × 10⁵개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 千金葦莖湯 추출물을 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동 카메라용 필름을 이용하여 사진을 촬영하였다.

6. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

세포배양용 페트리 접시에 6 × 10⁵개/ml 정도로 폐암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 千金葦莖湯 추출물을 처리하였다. 48시간까지 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid : EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride ; PMSF, 1 M 1,4-dithio-DL-threitol ; DTT, protease inhibitor cocktail, DW)를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 13,500 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 동량으로 맞춘 다음 동량의 Laemmli sample buffer (β-melcaptomethanol 5%, Laemmli sample buffer 95%, Bio-Rad)을 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 sample 동량을 sodium dodesyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다.

Western blot analysis를 위하여 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 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)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 (5분간 3번) 정도 세척하였다. 세척 후 1차 항체 (PBS-T로 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 over night시킨 다음 PBS-T로 세척 (15분간 1번, 5분간 5번)하고

처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체 (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척 (10분간 3번, 5분간 3번)하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양상을 비교 분석하였다^{12,13}. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며 (Table 2), 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

7. RT-PCR을 이용한 RNA 발현의 분석

정상 및 千金葶藶湯 추출물이 들어 있는 배지에서 48시간 동안 자란 암세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 세포만 모았다. 24시간 후 세포를 disposable cell lifter (Fisher scientific)로 암세포를 모아 50 ml tube에 옮긴 후 1,000 rpm에서 5분동안 원심분리를 하였다. Pellet에 PBS를 첨가하여 현탁한 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 pellet에 RNAzol B 1 ml를 첨가하여 약하게 현탁을 하고 e-tube에 옮겨서 4℃에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 여기에 chloroform 200 μl를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 (4℃)하여 부색의 상층액만을 400 μl 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 (4℃)하여 얻은 pellet (RNA)에 75% ethanol (25% DEPC treated water, Nalgene) 500 μl를 넣어 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 (4℃)하고 ethanol을 완전히 날린 후에 DEPC water 50 μl를 넣어서 RNA를 용해하여 A260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다. 분리한 RNA에 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 동안 방치한 다음 10 × buffer, 10 mM dNTP, RNasin, AMV Reverse transcriptase, 50mM MgCl2 및 DEPC treated water를 넣고 42℃에서 1시간 동안 반응시켜서 reverse transcriptase (RT) product를 만들었다(반응에 필요한 각각의 시약은 Table 3 참조). 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10 × buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 polymerase chain reaction (PCR)을 행하였다 (Table 4 및 5 참조). 또 ONE-STEP RT-PCR PreMix (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 실험하였을 경우에는 분리한 RNA에 iNtRON ONE-STEP RT-PCR PreMix, premixed primer 및 DEPC treated water를 넣고 RT-PCR을 행하였다(반응에 필요한 각각의 시약의 조성과 사용 및 RT-PCR의 조건은 Table 6, 7 및 8 참조). PCR을 행하여 만들어진 DNA의 양을 확인하기 위하여 1 × TAE buffer로 1% agarose gel을 만들

고 well에 각각의 primer (Table 9)에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution(5 ×, QUALITY BIOLOGICAL, INC.)을 섞어서 loading한 후 100 V에서 전기영동을 하여 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다¹².

결과 및 고찰

1. 인체 폐암세포의 생존율에 미치는 千金葶藶湯 추출물의 영향
 千金葶藶湯 추출물의 항암작용 해석을 위하여 A549 인체 폐암세포를 대상으로 암세포의 증식에 미치는 千金葶藶湯 추출물의 영향을 조사하였으며, 먼저 A549 인체 폐암세포의 생존율에 미치는 千金葶藶湯 추출물의 영향을 알아보았다. 이를 위하여 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 인체 폐암세포 A549를 적정 시간 안정화 시킨 후 48시간 동안 배지에 千金葶藶湯 추출물을 적정 농도로 희석하여 처리한 후, trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하여 千金葶藶湯 추출물이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 Fig. 1에 나타내었다. 이때 trypan blue에 의해 염색이 되지 않은 세포를 살아있는 세포로 hemocytometer를 이용하여 계수하여 정상 배지에서 배양된 암세포의 수와 비교하였다.

Fig. 1의 결과에서 알 수 있듯이 48시간 동안 정상 배지에서 자란 정상 A549 세포의 수에 비하여 千金葶藶湯 추출물이 함유된 배지에서의 암세포 생존율은 千金葶藶湯 추출물 첨가 농도 의존적으로 감소하였다. 즉 2 mg/ml 처리군의 경우 대조군에 비하여 약 35% 이상의 세포 생존율 감소가 관찰되었으며, 4 mg/ml 처리군 이상에서 살아있는 세포는 50% 미만으로 나타나 千金葶藶湯 추출물이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 생존율은 거의 증가되지 않았음을 알 수 있었다.

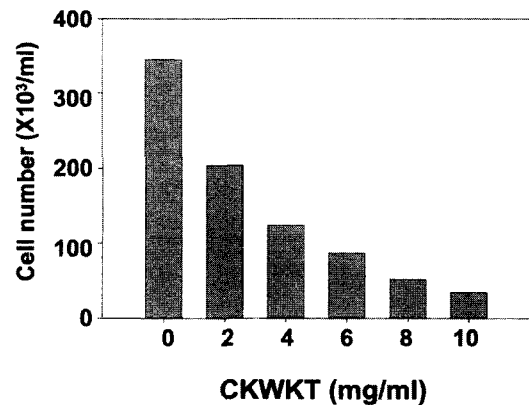


Fig. 1. Effect of an aqueous extract of Cheonkumwikyung-tang (CKWKT) on the viability in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and the viable cells were counted after 48 h. Results are expressed as average from two separate experiments.

2. 인체 폐암세포의 형태 변형에 미치는 千金葶藶湯 추출물의 영향
 千金葶藶湯 추출물의 처리에 따른 A549 암세포의 증식 억제에 따른 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위의 千金葶藶湯 추출물을 48시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 千金葶藶湯 추출물이 처리된 조건에서 배양된 암

세포의 모양을 관찰하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이千金葦莖湯 추출물의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 처리된千金葦莖湯 추출물의 농도가 증가될수록 전체적으로 세포질이 응축되면서 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였다. 그리고 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다. 특히 고농도 처리군에서 배양된 세포들은 신경세포에서 볼 수 있는 dendrite-like한 형태적 변화가 특이적으로 관찰되었다.

이러한 결과는千金葦莖湯 추출물 처리에 의한 암세포의 부착 능력 상실 및 암세포의 분화(differentiation)가 수반되었을 가능성을 의미하는 것으로 사료된다. 아울러 암세포의 형태적 변형 및 부착 능력 상실 등의 정도는千金葦莖湯 추출물 처리에 따른 암세포의 생존율 감소 및 성장억제와 잘 일치되는 결과였다.

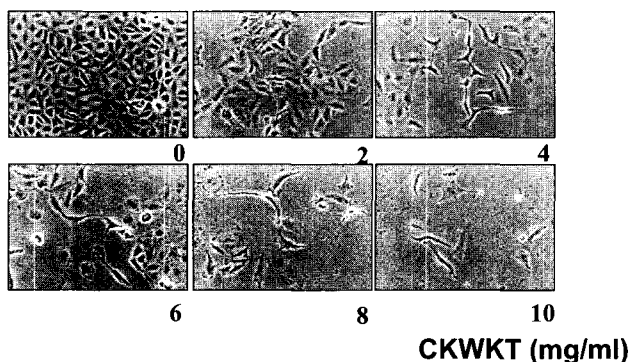


Fig. 2. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with CKWKKT. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or CKWKKT for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$.

3. 총 단백질의 발현에 미치는千金葦莖湯 추출물의 영향

千金葦莖湯 추출물의 처리에 따른 A549 폐암세포의 생존율 저하 및 apoptosis 유발과 관련된 생화학적 연구를 수행하기 위한 첫 번째 접근으로 A549 세포의 전체 단백질의 발현에 미치는千金葦莖湯 추출물의 영향을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 방법으로 조사하였다. 이를 위하여 A549 세포를 세포 배양용 dish에 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음千金葦莖湯 추출물이 적정 농도로 희석된 배지에서 배양하였다. 48시간 동안 배양 후 세포를 모아 총 단백질을 분리하여 8% 및 12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하여 coomassie blue 염색 용액으로 20분간 염색한 후 탈색하여 단백질 발현 양상을 비교하였다.

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 전체단백질의 발현양상에서 정상 배지에서 배양된 세포나千金葦莖湯 추출물이 함유된 배지에서 배양된 세포 모두 약간의 차이(화살표)가 있었지만 거의 동일하였음을 관찰 할 수 있었다. 즉千金葦莖湯 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들이 정상배지에서 자란 세포들에 비하여 증식이 억제되었고 apoptosis가 유발되었으나, 총 단백질의 함량 면에서는 큰 변화가 없었음을 알 수 있었다.

그러나 분자량의 차이를 기준으로 한 1차원적인 단백질의

분리에 의한 결과로는 유사한 분자량을 가지는 단백질들의 분리가 불가능하기 때문에 2차원적 전기영동을 통한 보다 광범위한 단백질 spot의 양적 발현 관계 분석을 통한 단백질체학적 접근이 필요할 것으로 생각된다.

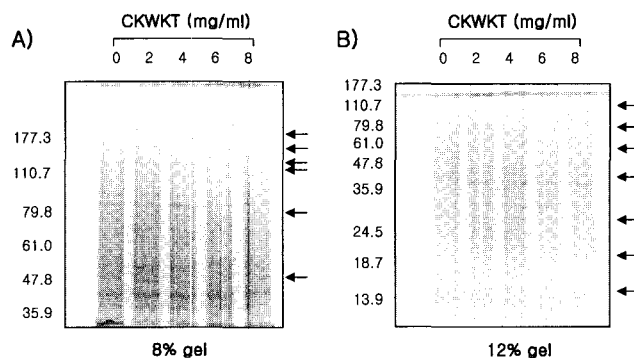


Fig. 3. Total protein pattern of A549 human lung carcinoma cells after CKWKKT treatment. Cells were treated with various concentrations of CKWKKT and the whole-cell lysates were prepared after 48 h. Proteins were separated on 8% (A) and 12% (B) SDS-polyacrylamide gels and visualized by coomassie blue staining.

4. PARP, β -catenin 및 PLC- γ 1의 발현에 미치는千金葦莖湯 추출물의 영향

이상의 결과들에서千金葦莖湯 추출물에 의한 인체 폐암세포의 증식억제는 apoptosis의 유발과 관련이 있음이 확인되었기에千金葦莖湯 추출물 처리에 의한 apoptosis의 유발에 관여하는 생화학적 기전 해석을 위하여 apoptosis 유발 시 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는千金葦莖湯 추출물의 영향을 Western blot analysis 방법으로 조사하였다.

1) PARP의 발현에 미치는千金葦莖湯 추출물의 영향

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며¹⁴, apoptosis 유발과정 중 활성화된 protease인 caspase에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다¹⁴⁻¹⁵. 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다¹⁶⁻¹⁷. 따라서千金葦莖湯 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서도 이러한 현상이 관찰되는지의 여부를 조사하기 위하여 다양한 농도의千金葦莖湯 추출물이 함유된 배지에서 48시간 배양된 A549 세포들을 모아 동량의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동으로 분리시킨 후 nitrocellulose membrane으로 전이시켜 PARP 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였다.

Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에서 강한 주 band를 볼 수 있었다. 그러나千金葦莖湯 추출물이 처리된 세포에서는 점차 85 kDa의 단편화된 band의 관찰이 가능하였으며, 최고 농도인 8 mg/ml 처리군에서는 116 kDa의 band가 완전히 분해되어 관찰이 불가능하였다. 따라서千金葦莖湯 추출물의 처리에 의한 apoptosis 과정에는 PARP 단백질의 분해가 수반됨을 알 수 있었다.

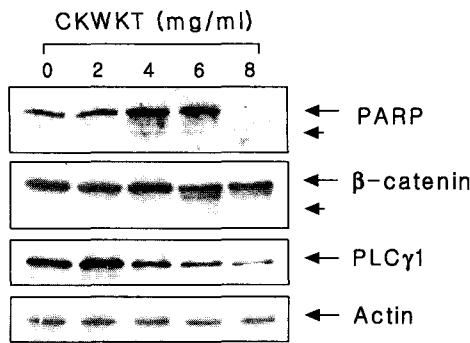


Fig. 4. Degradation of PARP, β -catenin and PLC- γ 1 by CKWKT treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with CKWKT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by SDS polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

2) β -catenin의 발현에 미치는千金葦蓐湯 추출물의 영향

Catenin family에 속하는 단백질들(α , β 및 γ)은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin이라는 단백질과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다¹⁸⁻¹⁹. 그 중 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다^{18,20-21}. 정상 세포의 경우 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다²¹⁻²³. 따라서千金葦蓐湯 추출물의 처리에 의한 A549 세포의 apoptosis 유발에 이러한 세포 유착과 밀접한 관계를 지니는지의 여부를 조사하기 위해서 정상 및千金葦蓐湯 추출물이 함유된 배지에서 48시간 동안 자란 세포들의 β -catenin 발현을 조사하였다. Fig. 4의 Western blot analysis 결과에서 보는 바와 같이 92 kDa 단백질의 발현 변화는 크게 낮아지지 않았지만千金葦蓐湯 추출물의 처리 농도가 증가될수록 단편화된 단백질의 발현이 증가되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서千金葦蓐湯 추출물이 처리된 세포들의 형태 관찰에서千金葦蓐湯 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들의 부착 능력을 상실은 아마도 이러한 β -catenin 단백질 발현의 변화와 연관성을 가지는 것으로 추정되어진다.

3) PLC- γ 1의 발현에 미치는千金葦蓐湯 추출물의 영향

최근 연구에 의하면 epidermal growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor-1 및 cytokine 등과 같은 세포 성장을 촉진하는 인자들이 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 보고 되어지고 있다. 이들 성장인자의 수용체들은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), G-protein 및 phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) 등과 같은 주요 신호전달 분자들을 활성화시킬 수 있다. 특히 PLC- γ 1은 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 hydrolyze시켜 protein kinase C (PKC) activator인 diacylglycerol 및 세포 내 Ca^{2+} 조절에 중요한 역할을 하는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)를 생산한다²⁴. 따라서 PI3K나 Ras와 같은 세포성장 신호분자와 같이 PLC- γ 1 역시 세포의 증식에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁵. 그러나 apoptosis가 유발될 경우 활성화된 caspase 효소에 의하여 PLC- γ 1 단백질은 분해될 수 있기 때문에 상기 두 종류의 단백질과 함

께 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 가능하다²⁶⁻²⁷. 따라서千金葦蓐湯 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서 PLC- γ 1 단백질의 분해가 관여하는지의 여부를 조사하였다. Fig. 4에 나타내었듯이千金葦蓐湯 추출물의 처리 농도가 증가될수록 단편화된 단백질의 발현은 관찰할 수 없었지만 PLC- γ 1의 발현은 처리 농도 의존적으로 점차 감소되었음을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과들에서 apoptosis가 유발되었을 때 전형적으로 활성화된 caspase에 의하여 분해될 수 있는 3 가지 단백질 모두의 발현이千金葦蓐湯 추출물의 처리에 의하여 저하되거나 단편화를 초래하였음을 알 수 있었다. 이러한 결과는千金葦蓐湯 추출물 처리에 의한 A549 세포의 apoptosis 유발 과정에는 caspase 활성화 조절과 연관된 인자들의 발현 변화가 관여할 것으로 추정되어진다.

5. p53 및 p21의 발현에 미치는千金葦蓐湯 추출물의 영향

다음은千金葦蓐湯 추출물의 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식억제가 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, 세포주기 진행 중 G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 전사 및 번역수준에서의 발현을 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사하였다. Fig. 5 A) 및 B)의 결과에서 볼 수 있듯이 RT-PCR의 결과에 의한 종양 억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21 mRNA의 발현은 큰 변화가 없었으며, p53의 단백질 발현 및 p53 단백질의 인산화 정도에도千金葦蓐湯 추출물은 큰 영향이 없었다. 그러나 p21의 단백질 발현은千金葦蓐湯 처리 농도가 증가할수록 발현의 정도가 매우 증가하였음을 알 수 있었다. 특히 Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며^{15,28-30}, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점³⁰⁻³³에서千金葦蓐湯 추출물의 처리에 의한 발현의 증가는 매우 의미 있는 결과라고 사료된다.

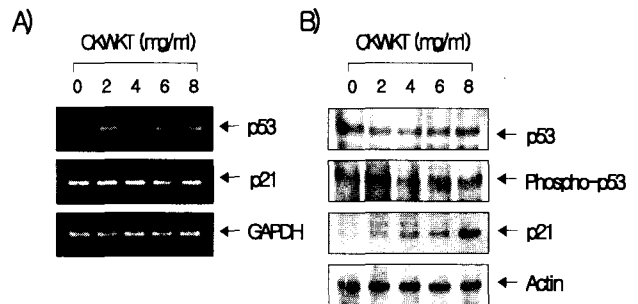


Fig. 5. Effects of CKWKT treatment on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 mRNA and protein in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with CKWKT for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers described in materials and methods. Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with CKWKT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

그러나千金葶藶湯 추출물의 처리에 의하여 p21의 전사 수준의 활성화 없이 단백질 발현 수준이 증가된 것에 관한 부분은 추가적인 연구가 필요한 부분이며, 본 연구의 결과만으로千金葶藶湯 추출물에 의한 A549 폐암세포의 세포주기 교란에 관한 명확한 증거는 제시할 수 없다. 따라서 세포주기 분석과 관련 유전자들의 kinase 활성도 검사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

千金葶藶湯 추출물이 인체 폐암세포주 A549 세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같다.

千金葶藶湯 추출물에 의하여 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 생존율 및 성장률은 현저하게 감소되었으며, 이러한 암세포 성장 증식억제 효과는 암세포의 심한 형태적 손상에 의한 부착력 상실과 연관이 있었다.千金葶藶湯 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들이 정상배지에서 자란 세포들에 비하여 증식이 억제되었고 apoptosis가 유발되었으나, 총 단백질의 함량 면에서는 큰 변화가 없었음을 알 수 있었다.千金葶藶湯 추출물에 의한 폐암세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 연관이 있었으며, 전형적인 apoptosis에 의한 세포사에서 관찰되는 PARP, β -catenin 및 PLC- γ 1 단백질의 발현저하 및 분해 현상도 관찰할 수 있었다.千金葶藶湯 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제 효과는 세포주기 조절인자 중 Cdk inhibitor p21 단백질의 발현 증가와 상관성이 있었다.

참고문헌

1. 조종관, 한방임상중양학, 주민출판사, 서울, p.725., 2001
2. 통계청, 2001년 사망원인통계결과, p.11, 2002.
3. 김정석, 박재용, 채상철, 신무철, 배문섭, 손지웅, 김관영, 강태경, 박기수, 김창호, 감신, 정태훈, 폐암의 임상양상의 변화, 대한암학회지, 31(1):112-119.
4. 김성훈, 배기체, 폐암의 변증과 치방에 대한 문헌적 고찰, 대전대학교한의학논문집, 5(2):243-265, 1997.
5. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室, 東醫肺系內科學, 훈문회사, 서울, p.79-87, 525, 2002.
6. 王焘, 外臺秘要, 成輔社, 서울, pp.267-274, 1975.
7. 孫思邈, 備急千金要方, 서울, 大星文化社, p.316, 1984.
8. 강순수, 臨床配合本草學, 永林社, 서울, p.500, 1994.
9. 신민교, 臨床本草學, 永林社, 서울, 1994, p.282, 578, 464
10. 박경식, 박정휘, 김동희, 김성훈, 葶藶湯·加味葶藶湯의 A549에 대한 세포독성과 S-180에 대한 항암효과, 동의병리학회지, 9(2):217-245, 1995.
11. Kim, Y.A., Lee, W.H., Choi, T.H., Lee, S.H., Park, K.Y. and Choi, Y.H., Involvement of p21, pRB, Bax and NF- κ B in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int. J. Oncol.*, 23:1143-1149, 2003.
12. Choi, Y.H., Research technics for the cell cycle study. *Exp. Mol. Med.* 33:15-36, 2001.
13. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A. and Trepel, J.B., Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.*, 272:28479-28484, 1997.
14. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. and 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.
15. Miyashita, T., Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80:293-299, 1995.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Johnson, J.P., Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis. Rev.*, 18:345-357, 1999.
20. Debruyne, P., Vermeulen, S. and Mareel, M., The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta. Gastroenterol. Belg.*, 62:393-402, 1999.
21. Choi, Y.H., Bae, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, N.D. and 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.
22. Fukuda, K., Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 31:519-529, 1999.
23. Steinhilber, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dorken, B., Bommert, K., Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.*, 275:16345-16353, 2000.
24. Rhee, S.G., Suh, P.-G., Ryu, S.H. and Lee, S.Y., Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*,

- 244:546-550, 1989.
25. Chang, J.S., Noh, D.Y., Park, I.A., Kim, M.J., Song, H., Ryu, S.H. and Suh, P.-G., Overexpression of phospholipase C-1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res.*, 57:5465-5468, 1997.
26. Bae, S.S., Perry, D.K., Oh, Y.S., Choi, J.H., Galadari, S.H., Ghayur, T., Ryu, S.H., Hannun, Y.A. and Suh, P.G., Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.*, 14:1083-1092, 2000.
27. Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T. and Smeland, E.B., Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.*, 30, pp.990-1000, 2002.
28. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J., The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75:805-816, 1993.
29. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculesco, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E.W., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75:817-825, 1993.
30. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D., p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366:701-704, 1993.
31. Morgan, D.O., Principles of CDK regulation. *Nature*, 374:131-134, 1995.
32. Elledge, S.J. and Harper, J.W., Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:847-852, 1994.
33. Sherr, C.J., The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 60:3689-3695, 2000.