

원저

pH 및 전해질 조절 山養山蔘 蒸溜藥鍼의 Apoptosis에 關한 實驗的 研究

곡경승* · 이선구** · 권기록*

*상지대학교 한의과대학 침구학교실

**상지대학교 한의과대학 병리학교실

Abstract

An Experimental Study on Apoptosis of Cultivated Wild Ginseng Distilled Herbal Acupuncture by controlled pH and Electrolyte

Chu Ching sheng*, Lee Sun-gu** and Kwon Ki-rok*

*Department of Acupuncture and Moxibustion, Oriental Medicine, Sang-Ji University

**Department of Pathology, Oriental Medicine, Sang-Ji University

Objective : To compare and examine how adjustment of pH and electrolyte can affect the efficacy of cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture, we've administered pure cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture and pH and electrolyte adjusted cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture on A549 human lung cancer lines. Then mRNA and proteins which take parts in apoptosis were examined.

-
- 접수 : 2004년 7월 22일 · 수정 : 2004년 11월 26일 · 채택 : 2004년 11월 27일
 - 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 033-738-7503 E-mail : beevenom@netian.com

Methods : Pure cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture treated group was set as the control group and pH and electrolyte adjusted cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture groups were administered on A549 human lung cancer lines. Cell toxicity was carefully examined and from the analysis of DNA fragmentation, RT-PCR, and Western blot, manifestation of mRNA and proteins which are associated with apoptosis were inspected.

Results : The following results were obtained on apoptosis of A549 human lung cancer lines after administering pH and electrolyte adjusted cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture.

1. Measuring cell toxicity of lung cancer cells, higher cell toxicity was detected at pH and electrolyte adjusted groups and the results were concentration dependent.
2. Through DNA fragmentation, we were able to confirm cell destruction in all groups.
3. Experiment groups treated with cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture showed inhibition of Bcl-2 and COX-2 at mRNA and Protein level, whileas increase of Bax was shown.
4. Manifestation of p21, p53, Cyclin E, and Cyclin D1 were confirmed in all groups.
5. Extrication of Cytochrome C was detected at all groups, as well as increased activity of the enzyme caspase-3 and caspase-9, and PARP fragmentation were confirmed.

Conclusions : From the above results, we can carefully deduce cell destruction of A549 human lung cancer lines were induced by Apoptosis. At the same concentration level, cell destruction efficacy was better with adjusted pH and electrolyte. Cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture also showed decrease of Bcl-2 and COX-2, as well as increase of Bax. Since cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture increases manifestation of p21, p53, Cyclin E, and Cyclin D1, it affects cellular cycle and through these phenomena, we can consider extrication of Cytochrome C, increase of caspase, and PARP fragmentation are the results.

Key words : pH and electrolyte, Cultivated wild-ginseng, Herbal acupuncture, A549 human lung cancer cell, mRNA, Bcl-2, COX-1, COX-2, Bax. p21, p53, Cyclin E, Cyclin D1, Cytochrome C, Caspase, PARP fragmentation

I. 緒 論

인체는 약 60-70%가 물 즉, 체액으로 구성되어 있다¹⁾. 체액은 세포와 조직의 생리작용에 의해 일

정하게 유지되고 있으며 세포내외의 환경을 안정되게 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다.

山蔘은 대표적인 補氣劑로, 靈藥으로 여겨졌으며 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 人蔘으로 표현되어 왔다²⁾. 性은 微寒, 微溫, 溫 등이고 味는 甘, 苦 등으로 표현되고 있으며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延

年 등의 효능이 있다³⁾. 蓼에 대한 최초의 문헌은 대략 BC 50년경이고⁴⁾, AD 200년에 저술된 傷寒論에서 최초로 처방에 사용되었다⁵⁾. 인삼의 재배시기를 14C 전·후라고 추정할 때 그 이전의 인삼은 산삼을 지칭하는 것으로 유추할 수 있다⁶⁾.

최근 산삼을 이용한 정맥주입용 약침에 관한 연구가 시행되어 유의한 결과가 보고되고 있는데 독성, 안정성 실험과 항암효과와 관련된 동물실험⁷⁾, 그리고 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구⁸⁾ 등이 이루어졌다.

본 연구는 인체에 주입되는 증류추출식 산양산삼약침(이하 산삼약침)의 apoptosis가 pH 및 전해질 조절 여부에 따라 어떠한 차이가 있는지를 비교·검토하기 위하여 시도되었다. 이를 위하여 시험관 내에서 A549(human lung carcinoma cells)에 산삼약침을 처리한 후 세포독성, DNA fragmentation, COX-1, COX-2, Bcl-2, Bax의 mRNA와 단백질의 발현을 관찰하였고, cell cycle의 변화를 보고자 p21, p53, cyclin E, cyclin D₁의 발현을 관찰한 결과 유의한 결론을 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 方 法

1. 재료의 준비

1) 암세포의 준비

본 실험에 사용한 암세포는 A549(KCLB 10185) human lung carcinoma cell로서 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 5% CO₂와 95% air의 배양기(존샘, 한국)에서 37°C를 유지하며 배양하였다. 배양된 세포는 매일 위상차 현미경(HUND, Germany)을 통하여 관찰하고 주 1-3회의 계대배양을 하면서 적정하게 성장시켜 사용하였다.

2) 배지

기본배지는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 3.7 g/l sodium bicarbonate (Shinyopure Chemicals Co., Japan), Penicillin G (100,000 Units/ml, Sigma, USA) 1ml, Streptomycin (100 mg/ml, Sigma, USA) 1ml, fungizone (Gibco, USA) 4 ml을 첨가하여 혼합한 뒤, bottle top filter (Coming, USA)로 멸균하여 사용하였다.

FBS(Gibco, USA)는 56°C의 항온수조에서 30분간 inactivation시킨 후 사용하였다. 혼합배지는 RPMI 1640 기본배지에 FBS를 10% 첨가하여 사용하였으며, 암세포 배양 전반에 사용하였다.

3) 산삼약침 및 검액의 조제

① 산삼증류약침의 조제⁹⁾

산양산삼은 산삼의 종자를 적절한 환경에서 재배한 것으로 數齡은 10-20년으로 추정되며, 무게는 17-26g, 길이는 20-30cm된 것을 사용하였다(Fig. 1, 2).

먼저 산삼을 흐르는 물에 깨끗이 세척하여 뇌두를 제거하지 않은 100g의 산삼을 증류수와 배합한 후 2시간 전탕하여 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전탕하여 1.000cc의 약침을 얻었다.

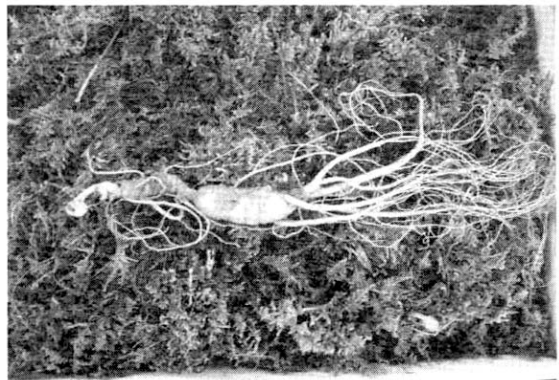


Fig. 1. The shape of cultivated wild ginseng

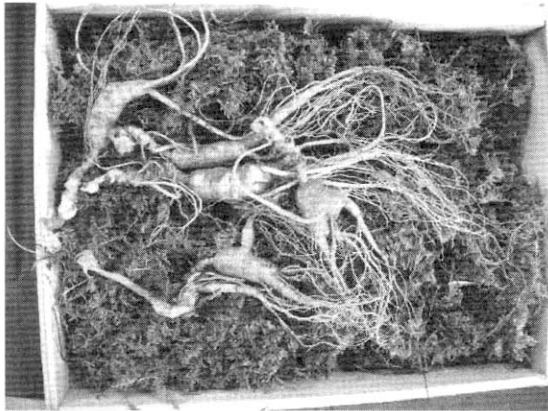


Fig. 2. The various shape of cultivated wild ginseng

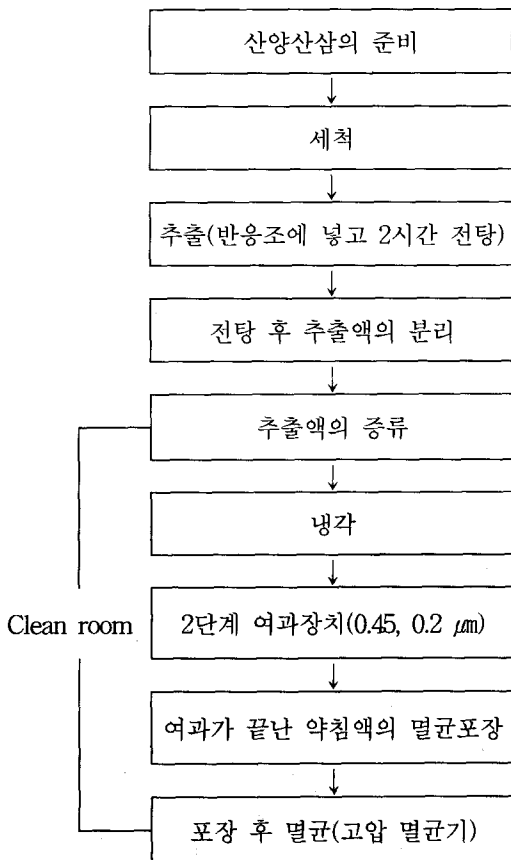


Fig. 3. Manufacturing process of Distilling cultivated wild-ginseng Herbal acupuncture

얼어진 약침을 0.45 μ m, 0.2 μ m 여과지로 2회 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다(Fig. 3).

② 검액의 조제

조제된 산삼약침을 비교군으로 하고 조제 후 NaCl과 NaOH를 이용하여 인체의 체액과 유사하게 pH를 7.0으로 조절하고 전해질 농도를 0.9%로 조절한 검액을 실험군으로 하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) A549 폐암세포주 배양 및 세포생존을 측정

A549 인체 유래 폐암세포주를 한국 세포주 은행에서 구입한 뒤, RPMI1640 (GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포생존을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2 \times 10⁵ cells를 넣어 배양한 후 각각의 준비된 검액을 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 μ l씩 처리하여 24시간 더 배양하였다.

24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300 μ l/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 μ l 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

2) DNA fragmentation

처리한 배양세포를 얼음으로 차게 한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700 μ l의 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45분간 항온 시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포

의 lysis를 용이하게 하였다.

파쇄된 세포를 4°C에서 13,000 × g로 20분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol로 침전시켰다.

침전된 핵산을 40 μl의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)로 용해시키고, 200 μg/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37°C에서 1시간 항응시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light 하에서 사진을 찍어 가시화하였다.

3) RT-PCR

RT-PCR용 primer는 Bioneer(한국)로부터 구입하였다. RNA 실험에 사용되는 모든 완충용액은 0.1% diethyl pyrocabonate(DEPC, Sigma)를 처리하여 사용하였으며, 모든 초자기구는 등은 200°C에서 24시간 가열 처리한 후 사용하였다.

① Total RNA 분리

1×10⁷ 세포에 1 ml의 RNAzol를 첨가하여 완전히 균질한 후 얼음에 15분간 방치한 후 4°C의 원심분리기로 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 분리된 상층액은 새로운 tube에 옮긴 다음, 100% ethyl alcohol를 500 μl 첨가한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet을 0.1% DEPC로 처리된 70% ethyl alcohol로 3번 세척하였다. 말린 pellet은 50 μl의 RNase-free water를 이용하여 pellet을 녹였다.

RNA 정량은 spectrophotometer(U-2000, HITACHI, Japan)를 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 추출된 Total RNA의 농도 및 순도를 계산하였다.

② RT(Revers transcription)

RT-PCR을 위하여 배양세포에서 추출한 각각의 1 μg의 total RNA를 주형으로 하여 Oligo dt primer(Bioneer, Korea)를 10 pmol씩 첨가한 후 여기에 PCR 완충용액, reverse transcriptase 20U, RNasin 10U 그리고 2 mM dNTP를 첨가하였다. 그리고 RNA-free water로 최종부피를 20 μl 조정 한 후 57°C에서 10분, 42°C에서 1시간 처리 후 cDNA를 만들었으며 차후 실험에 사용하기 위하여 -20°C냉동고에 보관하였다.

③ PCR

Reverse transcripton으로부터 얻은 cDNA 2 μl를 dNTP mixture 200 μM, gene specific primer 300 nM, MgCl₂ 2 mM, reaction buffer(10 mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25 °C], 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), Taq polymerase 2U를 잘 섞어 최종부피가 20 μl가 되도록 하여 PCR에 사용하였다. PCR 반응은 thermocycler(Hybaidd, UK)에서 94°C/2min(1회), 94°C/1min(1회), annealing(1회) 그리고 72°C/1min(1회)를 40회 반복하였고 마지막 신장반응을 72°C에서 1회 수행하였다. 사용된 Primer는 Table 1과 같다.

④ Gel electrophoresis

PCR products를 확인하기 위하여 ethidium bromide(0.5mg/ml)가 포함된 agarose(2%)를 TAE (Tris-Acetate-EDTA) buffer(pH 8.3)에 녹여 사용하였으며, 시료 5 μl와 3 μl loading buffer를 gel에 주입하여 100 V로 30분간 전기영동하였다.

전기영동이 끝난 gel을 UV transilluminator (Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기(Polaroid H-3, USA)을 사용하여 자외선 조명하에서 촬영하였다.

Table 1. Primer for Revers transcription polymerase chain reaction

Target mRNA		Primer Sequence (5'→3')	Annealing Temperature
Bcl-2	forward	CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C	52°C
	reverse	AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT	
COX-1	forward	TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT	65°C
	reverse	GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC	
COX-2	forward	TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT	52°C
	reverse	AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT	
BAX	forward	GTG CAC CAA GGT GCC GGA AC	54°C
	reverse	TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA	
Cyclophilin	forward	ACC CCA CCG TGT TCT TCG AC	53°C
	reverse	CAT TTG CCA TGG ACA AGA TG	

4) Western blot 분석

① 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10⁷의 세포 당 lysis buffer(10 mM Tris·HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100 μl로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

② 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, USA)을 표준곡선으로 산출하여 측정하였다.

96-well plate에 BSA(1 μg/μl)를 0, 1, 2, 4, 8, 16 μg/μl에 BCA 용액 100 μl를 첨가하여 20분간 37°C에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하

여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μl와 BCA 용액 100 μl을 섞은 뒤 20분간 37°C에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

③ 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100μg를 caspase-3와 cytochrome C를 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween 20 (0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다.

이 membrane을 Bcl-2 (Santa Cruz, USA), Bax(Santa Cruz, USA), COX-2(Santa Cruz, USA), p21(Santa Cruz, USA), p53(Santa Cruz, USA), Cyclin E(Santa Cruz, USA),

Cyclin D1 (Santa Cruz, USA), caspase-3 (PharMingen, USA), caspase-9(PharMingen, USA), PARP(PharMingen, USA), cytochrome c(PharMingen, USA), Actin (Santa Cruz, USA)의 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하였다.

membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization 하였다.

Membrane을 PBS-Tween 20으로 4회 세척하고, chemiluminescence (DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Fuji X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

III. 結 果

1. A549에 대한 세포독성

농도별 산삼약침의 A549세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 0 μ l에서 1200 μ l까지 다양하게 검액을 처리한 결과, pH와 전해질 조절군에서는 검액의 농도에 따른 일관된 세포독성의 증가를 나타내었으나 순수 증류 추출군에서는 세포독성이 용량에 비례하지 않았다.

각각의 비교에서는 pH와 전해질 조절군이 증류 추출군에 비해 세포사멸 효과가 매우 우수함을 알 수 있었다(Fig. 4).

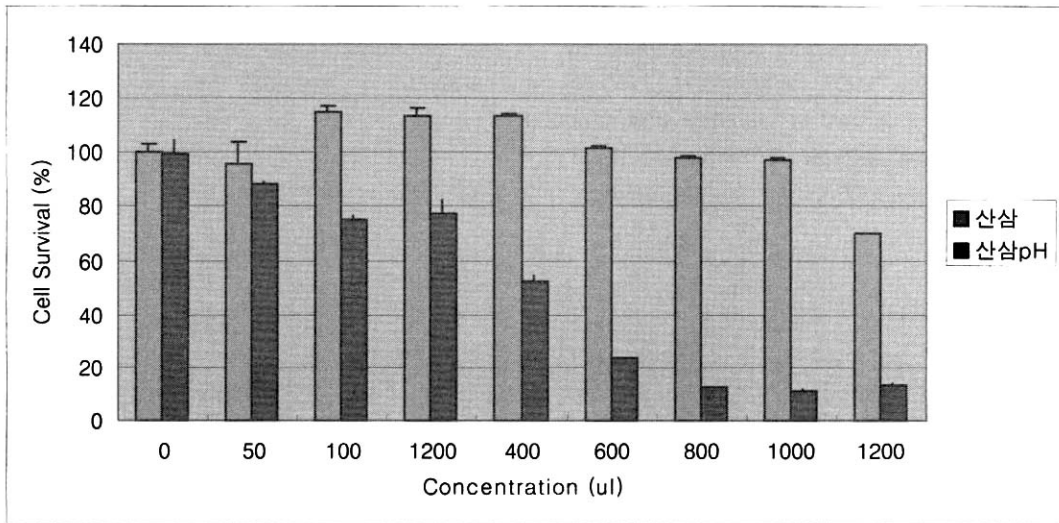


Fig. 4. A549 human lung carcinoma cell viability after exposure 24hrs with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture and cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture controlled pH and electrolyte. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and treated with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture and cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture controlled pH and electrolyte. for 24hrs. And then the cells were dyed by cristal violet and it was read on a ELISA reader at wavelength of 570nm and reference of 450nm

2. DNA fragmentation

세포가 사멸하는 양상을 알아보기 위하여 0.8(ml/ml)의 농도로 처리한 후 세포의 DNA fragmentation을 조사한 결과, 처리하지 않

은 세포에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았으나 산삼을 처리한 모든 군에서 DNA fragmentation이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 5).

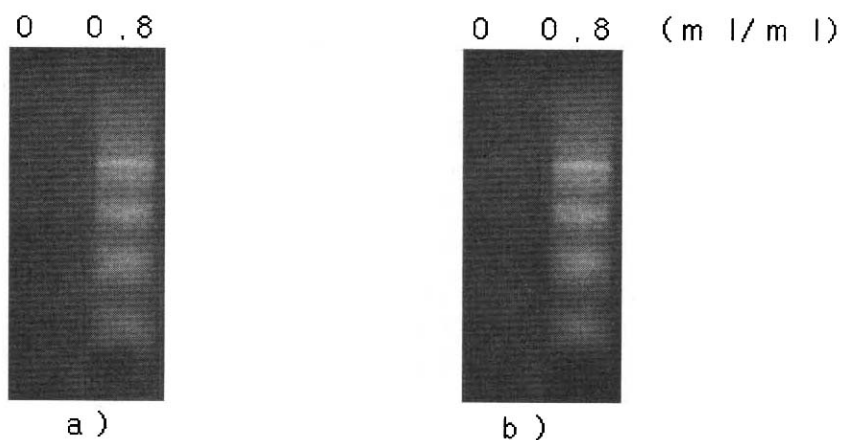


Fig. 5. DNA fragmentations of A549 human lung carcinoma cell treated with the cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture and controlled by pH and electrolyte. Cells were incubated with the oriental medicine drugs. And then DNA solutions acquired in the cell lysis were performed electrophoresis described in Materials and Methods

- a) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture.
- b) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture controlled pH and electrolyte.

3. COX-1, COX-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현에 미치는 영향

산삼약침에 의한 세포사멸이 apoptosis와 관계있는지 확인하기 위하여 COX-1, COX-2, Bcl-2, Bax에 대하여 RT-PCR을 하였다. 그 결

과 COX-2유전자는 검액 모두 감소되는 경향을 보였다.

Bcl-2와 Bax의 경우는 모든 경우에서 Bcl-2는 억제되고, Bax는 발현이 증가되는 경향을 보였다(Fig. 6).

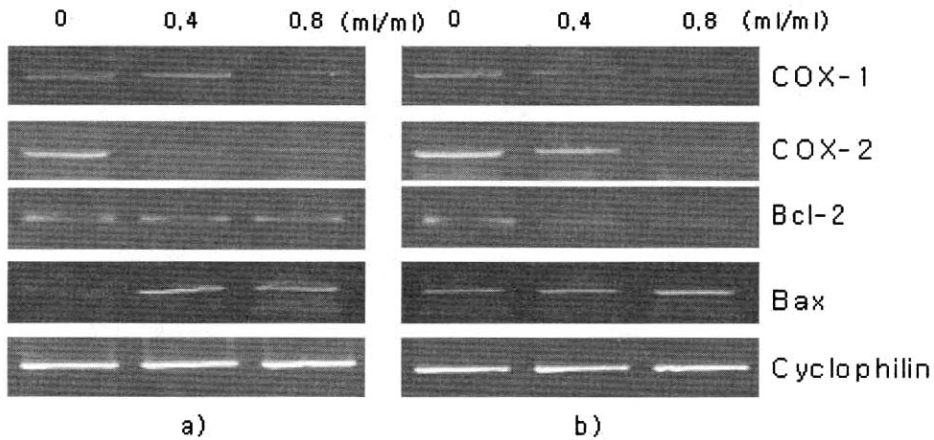


Fig. 6. Inhibition of Bcl-2 and COX-2 mRNA expression by the in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture and total RNAs were isolated. And RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods. Cyclophilin was used as a house-keeping control gene

- a) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture.
- b) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture controlled pH and electrolyte.

4. Bcl-2, Bax, COX-2의 단백질 발현에 미치는 영향
 Apoptosis가 전사수준에서 억제됨을 확인한 후 단백질 수준에서도 억제됨을 확인하기 위하여 western blot을 시행한 결과, 모든 군에서 Bcl-2, COX-2는 감소하고, Bax는 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

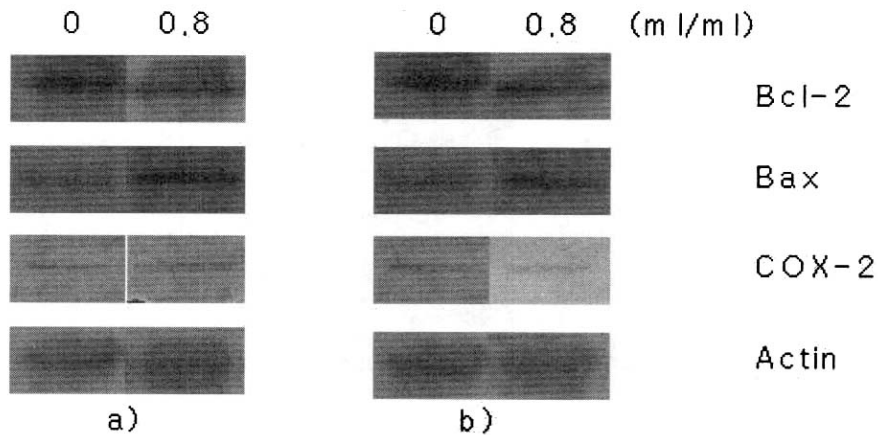


Fig. 7. Expression of Bcl-2, Bax and COX-2 proteins by cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in Materials and Methods. The Actin was used as a house-keeping control gene

- a) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture.
- b) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture controlled pH and electrolyte.

5. p21, p53, Cyclin E, Cyclin D1의 단백질 발현에 미치는 영향

산삼약침이 A549 폐암세포의 성장을 억제함을 확인한 후, 세포주기에 작용하는지를 알아보기 위

해 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D1의 단백질 발현을 western blot을 시행한 결과 실험군 모두에서 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D1 발현이 증가 됨을 알 수 있었다(Fig. 8).

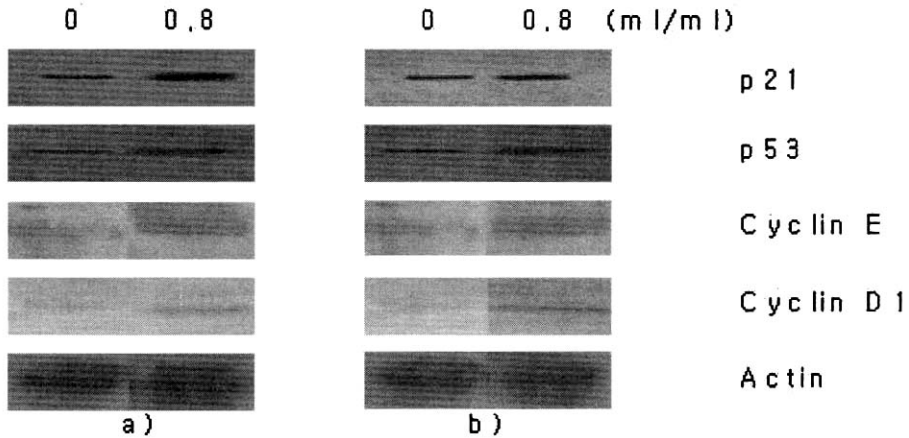


Fig. 8. Expression of p21, p53, cyclin E, and cyclin D1 proteins by the cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in Materials and Methods. The Actin was used as a house-keeping control gene

- a) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture.
- b) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture controlled pH and electrolyte.

6. Caspase-3, Caspase-9, Cytochrome C 및 PARP 발현에 미치는 영향

Apoptosis에 의한 세포사멸을 규명하기 위하여 농도별 산삼약침을 처리한 후 caspase-3, caspase-9,

Cytochrome C, PARP를 western blot을 시행하여 발현을 관찰하였다. 그 결과 Cytochrome C의 방출을 확인하였고, Caspase-3, Caspase-9의 발현과 PARP fragmentation을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

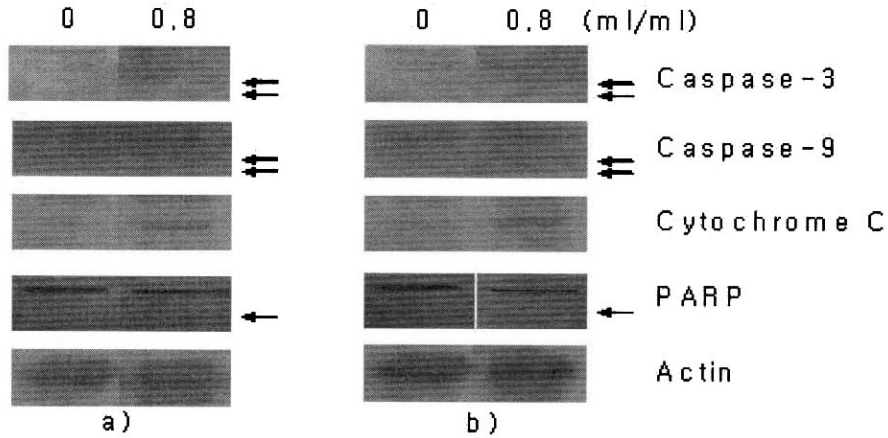


Fig. 9. Expression of caspase-3, 9, and cytochrome C proteins by the the cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in Materials and Methods. The Action was used as a house-keeping control gene

- a) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture.
- b) cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture controlled pH and electrolyte.

IV. 考 察

인체는 60-70%가 체액으로 구성되어 있다. 총 체액량은 성인남자는 체중의 60%, 성인 여자는 51%, 소아는 72% 정도이다¹⁾. 체액 조성의 주성분은 전해질과 비전해질로 구성되어 있으며 전해질은 양이온과 음이온으로 구성된다. 체액은 세포내액과 세포외액으로 구성되는데 세포내액이 체중의 약 40%를, 세포외액이 약 20%를 차지한다.

다. 세포내액과 세포외액의 전해질 농도는 상당한 차이가 있고, 이로 인해 세포막의 투과성 차이가 발생하고 능동수송이 이루어진다. pH는 용액중에 존재하는 수소이온의 농도를 말한다. 인체의 체액은 중성에 가깝게 구성되어 있고, 각각의 부위에 따라 산도가 다양하게 분포되어 있다.

산삼은 한국이나 중국, 소련 일본, 미국 및 캐나다의 일부지역에서만 자생하며 북반구권 중에서도 북위 30-48도에 이르는 지역에서만 자라는 것으로 보고되고 있다²⁾. 산삼은 수량도 희박하고, 진위여부에 대해서도 객관적 기준이 확립되어

있지 않으며 워낙 고가여서 이와 관련된 자료는 거의 찾아보기 힘들며 희귀성과 고가 등의 여러 가지 문제점으로 인해 산삼에 대한 연구 또한 거의 찾아볼 수 없는 실정이다.

산양산삼 증류약침에 대한 연구로는 권⁷⁾ 등이 정맥주입용으로 조제하여 급성·아급성 독성 및 항암효과를 관찰한 결과, mouse와 rat를 이용한 독성실험에서 산양산삼 증류약침은 아무런 독성 반응을 나타내지 않았고, Sarcoma-180 복강암에서는 생존율을 115% 이상 증가시키는 결론을 얻은 바 있었다.

또한 무작위 대조 임상실험을 시행하여 산삼약침의 정맥주입이 인체에 심각하게 유해한 반응을 일으키지는 않으나 자각적인 임상증후를 유도할 수 있음을 보고한 바 있다⁸⁾.

본 연구는 이러한 연구결과를 바탕으로 산삼약침을 인체의 체액과 유사하게 pH와 전해질을 조절하면 어떠한 효능차이를 나타내고, 항암능에 관여하며 그 기전이 apoptosis에 의한 것이라면 어떠한 기전에서 작용하는지를 관찰하고자 시도되었다.

또한 산삼약침의 보다 적합한 환경을 추적하고자 실험관 내에서 A549 human lung cancer cell에 대한 세포독성을 관찰하고 세포가 사멸하는 양상을 알아보기 위하여 DNA fragmentation을 조사하였으며, 암의 성장과 분화 및 항상성에 중요한 역할을 하는 COX-1, COX-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현 및 단백질의 변화, 그리고 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D₁과 Caspase-3, Caspase-9, Cytochrome C 및 PARP 발현을 관찰하였다.

세포가 사멸하는 기전은 커다란 외부 충격에 의해서 세포가 피동적으로 사멸하는 necrosis와 외부 자극에 능동적으로 대처하는 사멸 기작인 apoptosis가 있다. necrosis가 일어나면 세포가 팽창하고 파괴되어 세포 내부에 있던 물질들이 밖으로 유출된다. 그러나 apoptosis의 경우는 세포가 수축되고 apoptotic body가 생성된다. 이때 세포내부의 물질들은 apoptotic body내에 존재하므로 외부로 유출

되지 않으며, 생성된 apoptotic body는 주위의 세포에 의해 흡수 처리된다.

Apoptosis는 고등세포가 외부의 자극에 대해서 능동적으로 대처하는 프로그램된 세포 사멸기작이며¹⁰⁾, 대부분의 동물조직에서 손상되거나 감염된 불필요한 세포와 과잉 생산된 세포를 제거하는 과정으로 배 발생과 종양의 퇴화 및 면역시스템에서 중요한 역할을 한다¹¹⁾.

Apoptosis와 관련이 있는 주요 질병들이 밝혀진 이래, apoptosis에 관련된 연구가 집중적으로 진행되었고 그 결과, 많은 사실들이 밝혀지게 되었다. 포유동물세포의 apoptosis에 있어서 미토콘드리아가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 사멸 자극에 의해 미토콘드리아 기공이 열리면서 apoptosis-inducing factor(AIF)와 cytochrome C가 밖으로 유출되며, 이때 caspase-9, caspase-3, caspase-7 등이 활성화 된다.

이와는 다른 경로로서, 세포 표면의 수용체(CD95/APO-1/Fas)로부터 유발되는 apoptosis는 가장 많이 연구된 apoptosis 유발 경로이다.

apoptosis는 TNF(Tumor necrosis factor), Fas와 같은 death receptor에 의해서 일어날 수 있으며 또한 방사선(radiation)이나 여러 가지 화학물질 및 열 충격 등으로 인한 DNA 손상이나 단백질 변성이 원인이 될 수도 있고, 활성산소(ROS, reactive oxygen species)로 인하여 유발될 수도 있다¹²⁾. 이렇게 유발된 apoptosis는 여러 신호전달 체계를 통해서 최종적으로 caspase를 활성화시킨다¹³⁾. 이 caspase들은 apoptosis가 유발되면서 나타나는 세포내 기질들의 절단, DNA 단편화(fragmentation)등의 apoptosis가 진행 중인 세포의 형태적 특성을 담당하게 된다¹⁴⁾.

A549 human lung cancer cell에 대한 세포독성 관찰에서는 순수증류약침에 비하여 pH와 전해질을 조절한 약침에서 세포사멸이 월등히 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4).

세포가 사멸하는 양상을 알아보기 위하여 DNA

fragmentation을 조사한 결과, 처리하지 않은 세포에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았으나 산삼을 처리한 모든 군에서 DNA fragmentation이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 5).

산삼약침액에 의한 세포사멸이 apoptosis와 관계있는지 확인하기 위하여 COX-1, COX-2, Bcl-2, Bax에 대하여 RT-PCR을 하였다. COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 관계되며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다. COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 specific inhibitor에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제가 보고된 바 있다.

Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면 Bax는 과발현 되었을 경우 apoptosis를 유도하며¹⁵⁾, 이 기전은 mitochondria에서 cytochrome c를 유리시켜 caspases 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 효소활성을 조절하여 apoptosis 유발에 관여하는 것으로 보고되고 있다¹⁶⁾. 산삼약침을 처리한 결과 검액 모두에서 COX-2유전자의 발현을 억제함을 알 수 있었다.

Bcl-2와 Bax의 경우는 모든 경우에서 Bcl-2는 억제되고, Bax는 발현이 증가되는 경향을 나타내었다(Fig. 6).

Apoptosis가 전사수준에서 억제됨을 확인한 후 단백질 수준에서도 억제됨을 확인하기 위하여 western blot을 시행한 결과, 모든 군에서 Bcl-2, COX-2는 감소하고, Bax는 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

산삼약침이 세포주기에 작용하는지를 알아보기 위해 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D₁의 단백질 발현을 western blot을 통하여 알아보았다.

DNA 손상에 의한 p53의 발현 증가는 p21과 연관되어 세포 주기상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로

알려지고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾.

Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 이루는 D-type cyclin은 G1기의 조절에 중요하며 cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다²⁰⁻²¹⁾. 한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되는데 Cdk2와 결합하면서 그들이 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21 및 p27은 DNA손상에 의한 종양 억제인자 p53에 의해 조절을 받으며²²⁻²³⁾, 이는 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다²⁴⁾.

아울러 p53에 의한 p21의 전사조절과는 관계없이 암세포의 세포성장 억제나 분화유도에 p53 비의존적인 p21유도 조절 기전이 하나씩 밝혀지고 있으며 p21 전사조절에 관여하는 coactivator와 suppressor에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다²⁴⁻²⁷⁾.

세포주기의 조절은 세포질에 있는 사이클린(cyclin) 단백질에 의해 조절되는데 G1 사이클린(cyclin D1), S기 사이클린(cyclin E), G2기 사이클린(cyclin A), M기 사이클린(cyclin B)이 존재한다. 세포내부에서의 이들의 농도는 각 단계에서 증감을 보이게 된다. 또한 사이클린 의존성 키나제(cyclin dependent kinase: CDK)가 존재하는데, G1 CDK(Cdk4와 Cdk6), S기 CDK(Cdk2), M기 CDK가 있다. 이들은 매우 안정된 농도로 세포내에 존재한다. 그러나 이들은 적절한 사이클린과 결합하여 활성화 시키는 일을 해준다.

Apoptosis 과정에서 사이클린의 농도가 증가할 경우 그 세포주기에 멈추게 된다. 그러므로 산삼약침의 효과가 어떤 세포주기에 의존적인지를 판단하기 위하여 cyclin E, Cyclin D₁으로 Western blot 분석을 실시하였다.

그 결과 검액 모두에서 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D₁의 발현이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 8).

Apoptosis에 의한 세포사멸을 규명하기 위하여 검액을 처리한 후 caspase-3, caspase-9, Cytochrome C, PARP를 western blot을 시행하여 발현을 관찰하였다. Caspase도 apoptosis 유발에 중요한 역할을 수행하는데 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cystein-related protease로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다²⁸⁻²⁹⁾. 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성도가 조절되는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 caspase-3(CPP32)는 높은 활성도를 가진다³¹⁾.

그 결과 Cytochrome C의 방출을 확인하였고, Caspase-3, Caspase-9의 발현과 PARP fragmentation을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

이상의 결과를 종합해 볼 때 산삼약침은 pH와 전해질을 조절하면 암세포의 사멸효과가 더욱 우수해지고, mRNA와 단백질 수준에서 대사과정에 영향을 미쳐 apoptosis를 유도함을 알 수 있었다.

2. DNA fragmentation을 실시한 결과 모든 군에서 세포사멸을 관찰 할 수 있었다.
3. 모든 산삼약침처리군은 mRNA와 Protein 수준에서 Bcl-2와 COX-2의 발현은 억제하고, Bax는 증가됨을 알 수 있었다.
4. 모든 군에서 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D1의 발현을 확인하였다.
5. 모든 군에서 Cytochrom C의 유리를 확인하였고, caspase-3, caspase-9 효소의 활성과 PARP fragmentation을 확인하였다.

이상의 결과로 보아 산삼약침의 A549 human lung cancer cell에 대한 세포사멸은 apoptosis 유도에 의한 것으로 추정되며 특히 동일한 농도에서 pH와 전해질을 조절한 경우에서 세포사멸효과가 우수하였다. 또한 산삼약침은 Bcl-2, COX-2의 감소와 Bax의 증가를 나타내었고, p21, p53, Cyclin E, Cyclin D1의 발현을 증가시키는 것으로 보아 세포주기에 영향을 주며, 이를 통하여 Cytochrome C의 유리, caspase의 증가, PARP fragmentation이 일어나는 것으로 사료된다.

V. 結 論

본 실험에서 pH와 전해질조절을 시행한 산삼약침이 A549 human lung cancer cell의 Apoptosis 유도에 미치는 영향을 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폐암 세포에 대한 세포독성능을 측정한 결과 pH와 전해질 조절군이 증류추출군에 비해 세포사멸 효과가 농도 의존적으로 나타났다.

VI. 參 考 文 獻

1. 이정수. 인체 생리학. 도서출판 정담. 1994 : 46-49.
2. 전국한의과대학 본초학교수공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1994 : 531.
3. 중약대사전편찬위원회. 완역중약대사전 권7. 서울 : 정담. 1997 : 3473-3479.
4. 朝鮮總督府專賣局. 人蔘史. 서울 : 法人文化社. 1990 : 3-5.
5. 張仲景. 仲景全書. 대성문화사. 1984 : 130.

- 150, 153, 155, 166-167, 176, 199, 201, 205, 208-209, 214, 217.
6. 권기록 외. 山蔘에 대한 文獻的 考察. 대한약침학회지. Vol. 6, No. 2. 2003 : 75.
 7. 권기록 외. 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성·아급성 독성 실험 및 Sarcoma-180 항암 효과에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. Vol. 6, No. 2. 2003 : 7-27.
 8. 권기록. 정맥주입용 산삼약침이 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구. 대한약침학회지. Vol. 7, No. 1. 2004 : 15-26.
 9. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 서울 : 대한약침학회. 1999 : 13-14, 112-118, 138-203.
 10. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Patterns of cell death. *Methods Archive Exp Pathol* 13. 1988 : 18-54.
 11. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7. 1991 : 663-698.
 12. Jattela M.. Escaping cell death : survival proteins in cancer. *Exp Res* 248. 1999 : 30-43.
 13. Cohen GM. Caspases : the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326. 1997 : 1-16.
 14. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death. PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 25. 2004 : 259-264.
 15. Sawaoka, H, Tsuji, S., Tsuji, M, Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest* 79. 1999 : 1469-1477.
 16. Roose, 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. 1998 : 496-499.
 17. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli., Basi, G.. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40. 1994 : 603-612.
 18. 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., Vogelstain, B.. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54. 1994 : 1169-1174.
 19. Miyashita, T., Reed, J.C.. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80. 1995 : 293-299.
 20. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., Roberts, J.M.. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257. 1992 : 1689-1694.
 21. Ohtsubo, M., Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259. 1993 : 1908-1912.
 22. Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O.. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory submit. *Nature* 366. 1993 : 707-710.
 23. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J.. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75. 1993 : 805-816.
 24. 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. 1994 : 1169-1174.
25. Datto, M.B., Yu, Y., Wang, X.F.. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* 270. 1995 : 28623-28628.
26. Zeng, Y.X., El-Deiry, W.S.. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12. 1996 : 1557-1564.
27. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang, L. p53-independent induction of p21(WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 91. 2000 : 164-173.
28. Evans, V.G.. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17. 1993 : 461-476.
29. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, G., Basi, G.. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40. 1994 : 603-612.
30. Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, 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. 1997 : 1132-1136.
31. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol.* 5. 2004 : 27-36.