

瓦松이 만성 골수성 백혈병 세포주(K562)에서 세포사멸에 미치는 영향

윤경수, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effect of *Orostschys japonicus* A. Berger on Apoptosis in K562 Cell Lines

Kyoung-su Yun, Young-chul Kim, Jang-hoon Lee, Hong-jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objectives : This study was performed to determine if *Orostschys japonicus* A. Berger has protective effects against CML in K562 cell lines.

Materials and Methods : MTT assay, cell proliferation assay, Reverse transcription-polymerase reaction chain, RT-PCR, DNA fragmentation assay, Quantitative PCR were studied.

Results : *Orostschys japonicus* A. Berger had no effects on Bax gene in K562 cell lines, but decreased Bcl-2 gene, and increased the Caspases-3 gene. This is indicative of induced apoptosis in K562 cell lines by *Orostschys japonicus* A. Berger.

Conclusion : These results suggest that *Orostschys japonicus* A. Berger has effects on apatosis in K562 cell lines.

Key Words: *Orostschys japonicus* A. Berger, K562 cell lines, apoptosis, Bax, Bcl-2, Caspase

1. 緒 論

만성골수성백혈병은 골수구계 조혈모세포의 악성 클론이 과다생성되어 말초에 백혈구수 증가가 보이는 질환으로¹⁻³ 한국에서는 전백혈병의 12.5%, 만성 백혈병의 95%를, 서구 전 백혈병의 약 15%, 만성 백혈병의 40%를 차지하고 있다⁴. 만성골수성백혈병의 치료에는 화학항암요법, 방사선치료, 인터페론, 동종골수이식 등이 적용되고 있는데 요즘은 유전자 이상이 질병의 원인으로 밝혀지면서 특정 암 유발 유전자의 기능을 차단하는 새로운 방법

들이 연구되고 있다⁵.

K562 세포에 대한 연구로는 Dihydroarteisinin (DHA)가 만성골수성백혈병 세포(CML)에서 증식을 억제하는 효과가 있으며 K562 세포의 apoptosis를 유발하는 것이 보고되었으며⁶, 다른 암세포에서와 마찬가지로 K562 세포에서 다제약성내성이 보고되었고⁷, K562세포가 말초혈액단핵구에서 PGE(prostaglandin of the E series) 합성을 유도하는 것이 보고되었다⁸.

瓦松은 清熱解毒 消腫 止血 利濕의 효능이 있고, 약리작용으로 血管收縮作用 呼吸興奮作用 腸管의 緊張度增強作用이 있으며, 민간에서는 항암치료 목적으로 사용되고 있다. 기와지붕이나 산지의 巖上에서 자생하는 바위솔(*Orostachys japonicus* A. Beger)과 해안의 巖上에서 자생하는 등근 바위솔(*Orostachys*

· 접수 : 2006. 2. 10. · 채택 : 2006. 2. 27.
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118, Fax. 02-958-9120
E-mail : hjwoo@khu.ac.kr)

malacophyllus Fisch)이 있다⁹.

瓦松에 대한 研究로는 黄¹⁰, 田¹¹의 抗癌效果와 免疫反應의 影響, 吳¹²의 癌細胞感受性에 미치는 影響, 梁¹³의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響에 관한 研究가 있었고, 최근에 文¹⁴의 肝癌세포의 증식과 DNA 합성 세포분열 및 유전자 발현에 관한 연구가 있었다. 그런데 瓦松을 만성골수성백혈병세포주(K562)에 처리하여 抗癌效果를 관찰한 研究는 보고된 바 없는 실정이다.

이에 저자는 瓦松이 慢性骨髓性백혈병細胞주(K562)에서 細胞 成長의 抑制와 細胞死滅 및 關聯 遺傳子의 發現에 미치는 影響을 조사하여 有意성 있는 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약제

본 실험에 사용한 瓦松(Orostachi Herba, OH)은 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹⁵에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였다.

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 약제 100g을 3차 증류수 1000ml에 넣고 2시간씩 2회 환류추출한 후 얻은 전탕액을 먼으로 여과하여 감압농축하고, 동결 건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 21.5g의 건조추출물을 얻었다(수율: 21.5%). 얻어진 추출물을 RPMI-1640 배지에 10mg/ml의 농도로 녹여서 100℃에서 1시간동안 끓인 다음 14,000g에서 30분간 원침하여 상청액을 0.2µm의 syringe filter로 여과 멸균하여 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포배양 (Cell culture)

만성골수성백혈병세포주(K562)는 American Type Culture Collection(ATCC Rockville, MD)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL,

Island, NY, USA)과 1% 항생제(100units/ml의 penicillin, 100mg/ml의 streptomycin)가 포함된 RPMI-1640 배양액에 37℃, 5% CO₂ 항온배양기에서 계대배양하였다.

2) 검액의 처리

K562세포(5×10^5 cells)를 10% FBS가 포함된 세포배양액에 부유시켜 100-mm culture dish에 분주하고 100mg/ml의 약제를 첨가한 후 시간별(0, 12, 24, 48, 72시간)로 반응시켰으며, 또한 농도별(0, 25, 50, 100mg/ml)로 24시간 동안 37℃ 항온배양기에서 반응시켰다.

3) Cell proliferation assay

세포증식 능력의 분석은 Cell Titer 96 Aqueous One Solution(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. K562세포를 5×10^4 cells/ml 농도로 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 배양액에 부유시킨 다음 96-well plate에 100µl씩 분주하였다. 약제는 세포 배양액에 0-300mg/ml 농도로 조정하여 각각의 well에 100µl씩 분주하였다. 37℃ 항온배양기에서 24, 48과 72시간 동안 반응시킨 후 각 well에 20ml의 MTS/PMS 용액을 가하여 1~4시간 처리한 후 E max microplate reader (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 삼중배 (triplicate)로 3회 반복 실험을 하였다.

4) Cell count

배양이 끝난 후 세포를 수거하여 각 세포를 0.05% trypan blue용액에 염색한 다음 hemocytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다. 각각의 실험은 3회 반복 실험하였다.

5) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

(1) RNA 분리

RNA 분리는 RNA-Bee 용액의 분리 방법(Tel-Test, Inc, Friendwood, Texas)에 준하여 시행하였다. 배양된 세포에 100mm dish 당 1ml의 RNA-Bee 용액을 가하여 세포를 용해시켰다. 0.2배 용량의 chloroform을 첨가하여 강하게 흔들어 준 다음 얼음에 5분

간 두었다가 12,000xg, 4℃에서 15분간 원침하였다. 400 μ l의 상청액을 수거하여 동량의 isopropanol을 넣고 실온에 15분간 침전시켰다. 12,000xg, 4℃에서 5분간 원침하여 상청액을 버리고, 침전물에 800 μ l의 75% ethanol을 넣고 7,500g, 4℃에서 5분간 원침한 다음 침전물을 10분간 공기 중에 건조시킨 다음 DEPC(diethylpyrocarbonate) 처리된 증류수에 RNA를 용해시켰다. 분리된 RNA를 spectrophotometer (Ultraspec2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) 이용하여 260nm에서 RNA농도를 측정하였으며, A260/A280의 흡광도 비는 1.5~1.8이었으며 RNA는 -70℃에 실험 전까지 보관하였다.

(2) cDNA의 제작

cDNA(complementary deoxynucleotide acid) 합성은 first-strand cDNA 합성 방법 (Promega, Madison, WI, USA)에 준하여 시행하였다. 1mg의 total RNA를 1ml의 10 x RT-PCR 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500mM KCl, 1% Triton X-100), 2ml의 10mM dNTP(deoxynucleotide triphosphatase), 0.5mg의 random primer, 15units의 RNase inhibitor, 15units의 AMV reverse transcriptase와 혼합하고 D.W.를 가하여 최종용량이 20ml가 되게 하였다. 역전사반응은 25℃에서 10분, 42℃에서 1시간, 95℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

(3) Primer의 제작

House keeping gene으로는 β -Actin을 사용하였고, target genes로는 Bcl-2, Bax, Caspase-3 등을 사용하였다.

(4) Quantitative PCR

PCR 방법은 2ml의 cDNA, 5ml의 10 \times PCR 완충액(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 1.5mM MgCl₂), 4ml의 2.5mM dNTP, 각각 20pmol의 primers, 1unit의 Taq DNA polymerase(Takara, Shiga, Japan)와 혼합하여 최종용량이 50 μ l가 되게 조정하였다. 유전자 증폭 조건은 초기 변성(denaturation)은 95℃에서 4분, 94℃에서 1분, annealing은 55~68℃에서 1분, 연장(extension)은 72℃에서 1분간 25~35 주기를 유전자증폭기(Biometar, Gottingen, Germany)에 의해 증폭시켰다. 10ml의 증폭된 생성물에 2ml의 6 \times gel loading dye(30% sucrose, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)을 혼합하여 2mg/ml의 ethidium bromide 염색액이 포함된 2% agarose 겔을 0.5 \times 전기영동 완충액(45mM Tris-borate, 1mM EDTA)으로 90volt에서 1시간 동안 이동시킨 다음 UV 영상 분석기(Gel Doc 2000 gel document system, Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 띠(band)를 확인하였다.

6) DNA fragmentation assay

약제를 처리한 K562세포(1×10^6 cells)를 수거하여 3500g에 10분간 원침한 후 세포 침전물을 PBS(phosphate buffered saline)로 재부유 시킨 다음 1.5ml 시험관에 옮기고 12,000g에서 10분간 원침하였다. 상청액을 버리고 세포침전물에 500ml의 세포용해액(0.5% Triton X-100)를 넣고 흔들어준 다음 4℃에 20분간 둔다. 12,000g에서 20분간 원침한 다음 상청액을 1.5ml 시험관에 옮기고 5ml의 RNase A(20mg/

Oligonucleotide sequences of PCR primers

Gene	Nucleotide Sequences	TM	PCR Cycle	Size(bp)
Bcl-2	5'-CTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTG-3'	58°C	30	275
	5'-TGACTTCACTTGTGGCCAGATAGG-3'			
Bax	5'-ATGGACGGGTCCGGGGAGCAGC-3'	65°C	30	323
	5'-CCCCAGTTGAAGTTGCCGTCAG-3'			
Caspase 3	5'-CTC GGT CTG GTA CAG ATG TCG ATG-3'	60°C	27	534
	5'-GGT TAA CCC GGG TAA GAA TGT GCA-3'			
β -actin	5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3'	55°C	27	310
	5'-CTTCTCACGCCAAAGCTCACA-3'			

TM: annealing temperature

ml)를 넣고 혼합한 후 37°C 배양기에 1시간 반응시켰다. 5 μ l의 proteinase K(20mg/ml)을 넣고 혼합한 다음 16시간 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후에 500ml의 phenol/chloroform (1:1)를 넣고 15000g에서 DNA를 추출하였다. 상청액을 수거하여 2배 용량의 100% ethanol을 가하여 -20°C에서 동안 침전시켰다. 70% ethanol로 2회 원침 세척한 다음 침전물을 건조시킨 후 10ml의 TE buffer(10mM Tris (pH8.0), 1mM EDTA)로 용해시켰다. Loading dye를 2ml 첨가한 후 1.5% agarose 겔에 90volt에서 1시간 동안 전기영동을 하여 DNA 분절을 확인하였다.

7) 통계 분석

모든 통계 분석은 평균치와 표준편차로 계산하였으며, T-test를 이용하여 약제를 처리하지않은 대조군과 처리한 실험군간에 차이를 비교해서 검증하였다. 유의 수준은 p<0.05는 *로 표기하였다.

III. 結果

1. MTT assay를 이용한 cell viability 분석

瓦松의 K562(human chronic myeloid leukemia 세포)에 대한 분석에 앞서 약물의 과잉투여에 의하여 유발될 수 있는 세포독성과 실험을 위한 적정 투여농도범위의 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다.

1) 약제투여농도 및 시간별 세포활성

瓦松의 농도를 0에서 300 μ g/ml까지 다양하게 하

고, 또 시간을 24시간, 48시간, 72시간을 각각의 농도로 처리한 다음에 MTT assay로 세포활성을 살펴 보았다. 瓦松은 0~25 μ g/ml 농도로 처리한 경우 뚜렷한 세포 활성의 감소가 관찰되지 않은 반면, 50 μ g/ml에서는 중간 정도의 감소가 나타나며 100 μ g/ml의 농도 이후로는 세포활성이 떨어진 정도가 같이 나타나기 때문에 100 μ g/ml 정도의 농도가 적절하다고 판단되었다.

2) 약제 농도별 세포활성

이전 실험에서 세포활성의 정도를 약제처리 농도에 비례하여 감소되는 고농도를 100 μ g/ml로 설정하고, 瓦松의 농도를 각각 0, 25, 50, 100 μ g/ml로

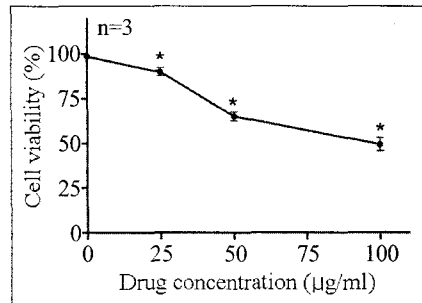


Fig. 2. Concentration-dependent effects of OH on K562 cell lines. Cells(5×10⁴cells/ml) were cultured in presence of various concentrations of OH for 24h. Viable cells were counted by the trypan blue exclusion method using hemocytometer. Values are the mean ± SD in three individual experiments. *P< 0.05 when compared with control cells.

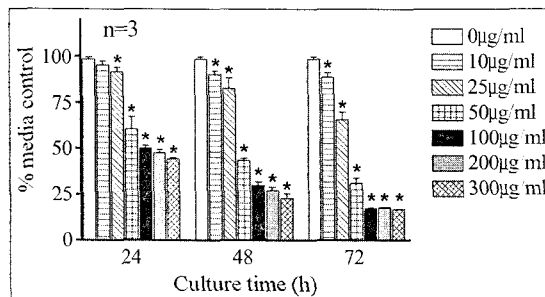


Fig. 1. Effects of OH on cell proliferation in K562 cell lines. Cells(5×10³cells/ml) were cultured in presence of various concentrations of OH for 24, 48, and 72h, followed by MTT assay. Values are the mean±SD for three individual experiments, each with triplicate samples. * P < 0.05 when compared with control cells.

24시간동안 처리한 다음 MTT assay로 세포활성을 살펴보았다. 관찰한 결과 瓦松의 농도에 따라 세포활성의 저하됨이 다시 확인되었다.

3) 세포농도별 세포활성

적절한 세포수를 정하기 위하여 24시간 동안 瓦松을 처리하였는데, 세포의 초기배양농도를 각각 달리 하였을 때에 효과가 관찰되는 적절한 세포수를 확인하기 위한 실험을 하였다. 세포현탁액을 ml당 0.1×10^5 , 0.5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^5 개의 세포가 포함되도록 농도로 정하고 96well plate에 100 μ l씩 분주한 후 약재를 처리 해 보았다. 실험결과 0.1×10^5 에서는 너무 급격한 감소를 보였고, 0.5×10^5 에서 가장 적절한 감소 경향을 보였다. 2.0×10^5 에서는 거의 감소가 되지

않았다. 따라서 이후로는 모두 세포의 개수는 5×10^4 개의 세포수로 정하여 실험을 진행하였다.

4) 처리시간별 세포활성

처리시간에 따른 세포활성의 변화를 관찰하기 위하여 瓦松을 100 μ g/ml의 농도로 6, 12, 24, 72시간 동안 처리한 후 MTT assay를 시행하여 세포의 활성의 저하를 관찰하였다. 약재 처리 48시간까지는 시간에 비례하여 감소하다가 72시간에는 거의 변화가 없었다.

2. Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향

1) 처리시간별 유전자발현 양상

약재처리 시간에 따른 Bcl-2 유전자 발현에 미치는

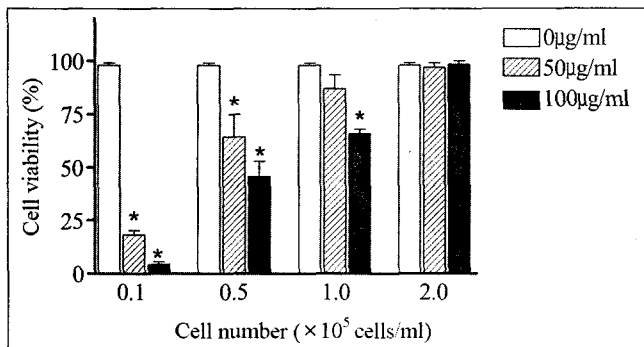


Fig. 3. Effects of OH on cell number in K562 cell lines. Cells were cultured in presence of various cell concentrations of OH for 24h. Viable cells were counted by the trypan blue exclusion method using hemocytometer. Values are the mean \pm SD in three individual experiments. *P < 0.05 when compared with control cells.

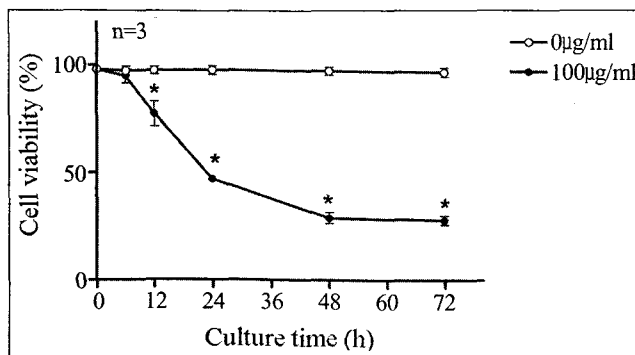


Fig. 4. Time-dependent effects of OH on K562 cell lines. Cells(5×10^4 cells/ml) were cultured with 100 μ g/ml of OH for several times. Viable cells were counted by the trypan blue exclusion method using hemocytometer. Values are the mean \pm SD in three individual experiments. *P < 0.05 when compared with control cells.

영향을 보기 위하여, K562 cell을 6well plate에 5×10^4 /ml의 세포수로 분주하고 瓦松을 100 μ g/ml의 농도로 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 처리하여 유전자의 발현을 보았다. 12시간까지는 유전자 발현에 거의 변화가 없었으나 24시간이 지난 후부터 유전자의 발현이 감소됨을 알 수 있었다.

2) 약제농도별 유전자발현 양상

약제처리 농도에 따른 Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여, K562 cell을 6well plate에 5×10^4 /ml의 세포수로 분주하고 瓦松을 각각 0, 25,

50, 100 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간이 지난 후 유전자의 발현을 관찰하였다. 저농도에서는 유전자 발현에 변화가 관찰되지 않았으나 약물의 농도를 50 μ g/ml 이상으로 처리하였을 때 발현이 감소되었다.

3. Bax 유전자 발현에 미치는 영향

瓦松의 처리시간에 따른 K562 cell line의 Bax 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위해서 瓦松을 6well plate에 5×10^4 /ml의 세포수로 분주하고 배지에

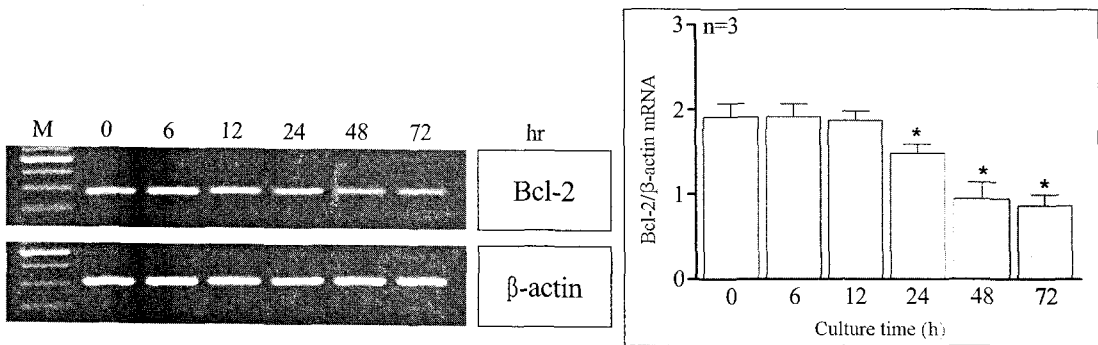


Fig. 5. Effects of OH on the Bcl-2 mRNA expression in K562 cell lines. Cells (5×10^4 cells/ml) were cultured with 100 μ g/ml of OH for 6, 12, 24, 48, and 72h. The mRNA levels of Bcl-2 were measured by RT-PCR. PCR-products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The intensities of PCR bands were measured by densitometry and expressed as intensities relative to β -actin. Values are the mean \pm SD in three individual experiments. *P < 0.05 when compared with control cells.

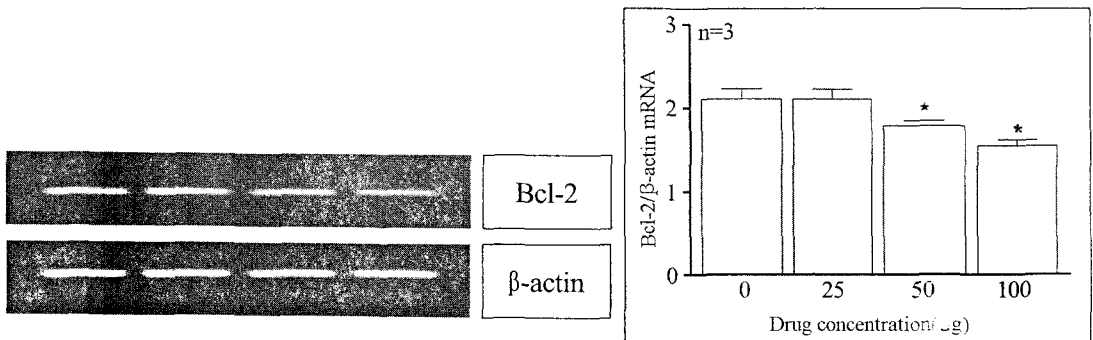


Fig. 6. Effects of OH on the Bcl-2 mRNA expression in K562 cell lines. Cells (5×10^4 cells/ml) were cultured with 0 to 100 μ g/ml of OH for 24h. The mRNA levels of Bcl-2 were measured by RT-PCR. PCR-products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The intensities of PCR bands were measured by densitometry and expressed as intensities relative to β -actin. Values are the mean \pm SD in three individual experiments. *P < 0.05 when compared with control cells.

100 μ g/ml의 농도로 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 처리한 후 유전자의 발현을 관찰하였다. 약제 처리 후 24시간까지는 거의 변화가 없었고, 48시간 72시간에는 증가한 것이 관찰되었다.

瓦松의 처리농도에 따른 K562 cell line의 Bax 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 동일 조건에서 24시간 동안 배지의 농도를 0, 25, 50, 100 μ g/ml로 달리하여 관찰하였다. 실험결과 瓦松이 Bax 유전자 발현에는 거의 영향을 주지 못함을 알 수 있다.

4. Caspase-3 유전자 발현에 미치는 영향

1) 처리시간별 유전자발현 양상

약제처리 시간에 따른 Caspase-3 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여, K562 cell을 6well plate에 5×10^4 /ml의 세포수로 분주하고 瓦松을 100 μ g/ml의 농도로 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 처리하여 유전자의 발현을 보았다.

약제 처리 후 6시간까지는 유전자 발현에 거의 변화가 없었고, 12시간부터는 유의성 있게 증가하는 것이 관찰되었으며, 72시간에는 48시간 처리군에

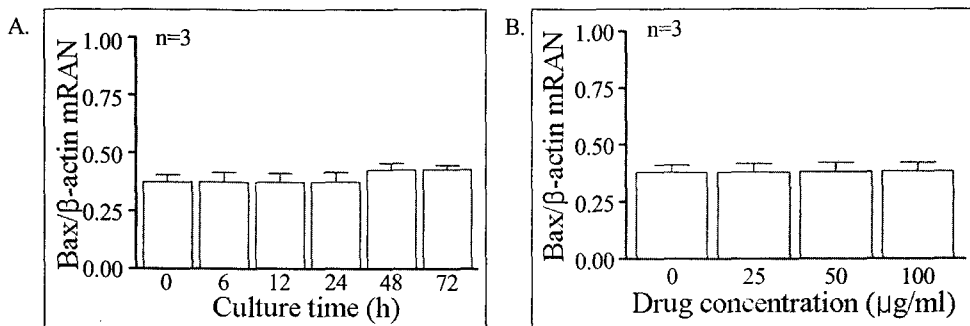


Fig. 7. Effects of OH on the Bax mRNA expression in K562 cell lines. A) Cells (5×10^4 cells/ml) were cultured with 100 μ g/ml of OH for 24, 48, and 72h. B) Cells (5×10^4 cells/ml) were cultured with 0 to 100 μ g/ml of OH for 24h. The mRNA levels of Bax were measured by RT-PCR. PCR products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The intensities of PCR bands were measured by densitometry and expressed as intensities relative to β -actin. Values are the mean \pm SD in three individual experiments. *P < 0.05 when compared with control cells.

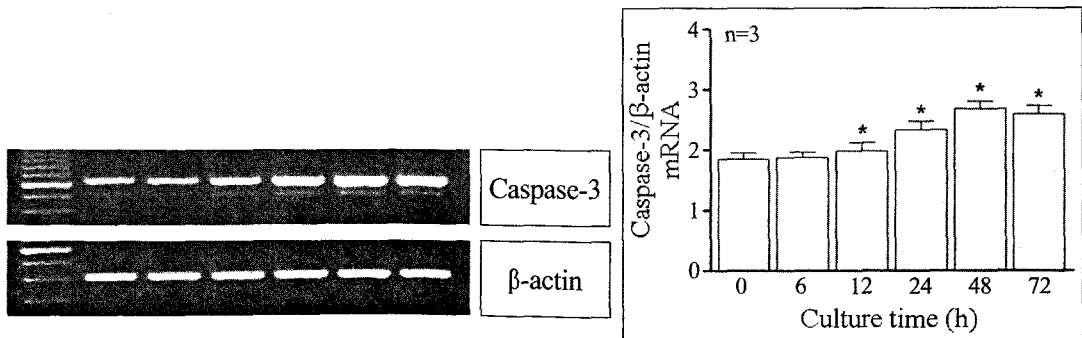


Fig. 8. Effects of OH on the Caspase-3 mRNA expression in K562 cell lines. Cells (5×10^4 cells/ml) were cultured with 100 μ g/ml of OH for 6, 12, 24, 48, and 72h. The mRNA levels of Caspase-3 were measured by RT-PCR. PCR products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The intensities of PCR bands were measured by densitometry and expressed as intensities relative to β -actin. Values are the mean \pm SD in three individual experiments. *P < 0.05 when compared with control cells.

비하여 오히려 감소된 것이 관찰되었다.

2) 약제 농도별 유전자발현 양상

약제처리 농도에 따른 Caspase-3 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여, K562 cell을 6well plate에 5×10^4 /ml의 세포수로 분주하고 瓦松을 0, 25, 50, 100 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하여 유전자의 관찰하였다.

실험결과 50 μ g/ml의 농도에서는 유전자 발현이 약간 증가하였고, 100 μ g/ml의 농도로 처리한 군에

서는 유전자 발현이 뚜렷하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

5. DNA fragmentation에 미치는 영향

瓦松의 K562 cell에 대한 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 瓦松을 100 μ g/ml의 농도로 각각 0, 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 처리한 후 DNA를 수거하고 전기영동하여 DNA 분절을 확인하였다.

실험결과 24시간 이상 처리한 군에서 DNA 분절

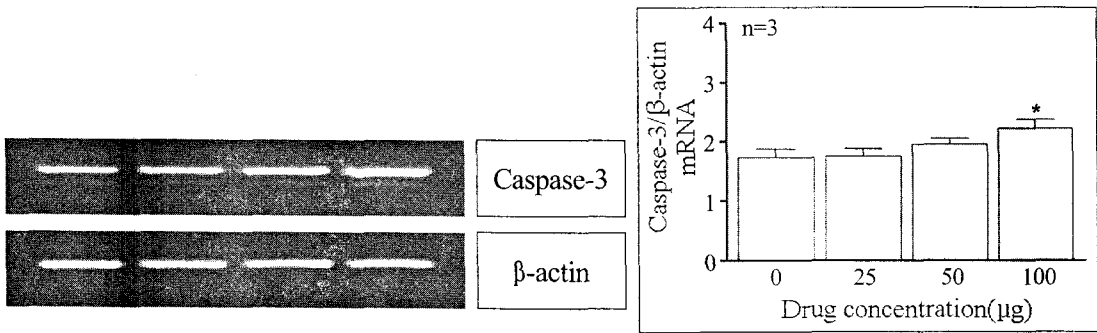


Fig. 9. Effects of OH on the Caspase-3 mRNA expression in K562 cell lines. Cells(5×10^4 cells/ml) were cultured with 0, 25, 50, 100 μ g/ml of OH for 24h. The mRNA levels of Caspase-3 were measured by RT-PCR. PCR products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The intensities of PCR bands were measured by densitometry and expressed as intensities relative to β -actin. Values are the mean \pm SD in three individual experiments. *P < 0.05 when compared with control cells

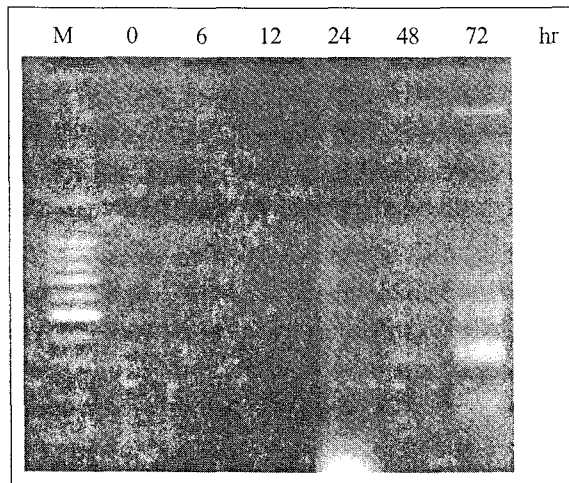


Fig. 10. Effects of OH on the DNA fragmentation in K562 cell lines. Cells(5×10^4 cells/ml) were cultured with 100 μ g/ml of OH for 0, 6, 12, 24, 48, 72h. Obtained DNA samples were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

이 확인되었으며, 약제의 농도가 높을수록 명확한 분절양상을 관찰할 수 있었다.

IV. 考 察

만성골수성백혈병은 전체 백혈병의 약 15%를 차지하며 주로 중년기(진단시 중앙연령 45세)에 많이 발생한다. 조혈모세포의 악성 클론이 말초혈액으로 넘치게 되며, 95% 이상에서 필라델피아 염색체를 보유한다¹². 환자들은 보통 피로감, 야간 발한과 백혈구의 과잉생산에 의한 과대사 상태와 관련이 있는 정도의 발열 증상을 나타낸다. 비종대에 의한 복부 팽만감을 호소하기도 하고 백혈구수 증가가 우연히 발견되기도 한다³.

만성골수성백혈병의 치료에는 골수증식억제를 목적으로 하는 busulfan, hydroxyurea 등의 화학요법, 방사선치료, 비장적출술, 동종골수이식, 인터페론 등이 있다. 인터페론은 주로 혈액세포 등의 증식을 억제하는 성질과 기타 다양한 생체효과를 갖고 있어 만성골수성백혈병의 치료에 널리 사용되는데 항암요법보다는 생존율이 높다¹⁶. 골수이식은 완치를 위한 유일한 방법이지만 적합한 골수 공여자가 있어야 가능하며 이식자체가 갖고 있는 합병증 때문에 사망률이 높다는 단점이 있다.

1980년대에 들어서는 만성 골수성 백혈병에서 bcl-abl 융합 유전자가 생기며 이러한 유전자 이상이 만성골수성백혈병의 발병에 결정적인 역할을 함이 밝혀졌다. 최근에 bcl-abl 융합 유전자의 표현 정도에 따른 질환의 진행정도를 평가하고 이를 예후 평가에 이용하고자 하는 새로운 노력들이 연구되고 있다¹⁷⁻⁹. 치료에 있어서도 비약적인 발전이 이루어져서 조혈모세포이식이외에 1980년대 중반부터 인터페론이 효과적임이 밝혀졌으며, 1999년 tyrosine kinase inhibitor인 STI571(GlivecTM)이 소개되면서 특정 암 유발 유전자의 기능을 차단함으로써 혈액암을 치료할 수 있는 새로운 지평을 열고 있으나 여전히 치료법에 대한 연구가 진행되고 있다⁵.

瓦松은 味酸苦하고 性は 涼無毒하며, 清熱解毒, 止

血, 利濕, 消腫하는 效能을 갖고 있으며, 민간에서는 抗癌효과가 있음이 알려져 많이 사용되고 있다⁹. 기존 보고에서 瓦松藥針液이 神經細胞에서 H₂O₂로 인한 apoptosis를 豫防하였고²⁰, oxidant에 의해 처리된 opossum kidney(OK) 세포에서 細胞死亡과 DNA 損傷을 豫防하였다²¹. 또한 瓦松이 HepG2 cell 增殖 抑制作用이 있어 肝癌細胞에서 抗癌作用이 있었고¹⁴, 瓦松藥針은 抗癌作用 및 免疫強化에 效果가 있었고²², 十全大補湯加瓦松¹⁰, 소음인 補中益氣湯加瓦松¹¹이 복강암생쥐의 생존기간연장과 면역기능저하 유발 생쥐의 지연형과민반응, 자연살해세포활성도 측정에서 유의성이 있었다.

瓦松은 복강에 이식한 LI210(mouse leukemia cell line) 세포의 apoptosis를 현저하게(약 2.5배) 촉진시켰으며 계대배양한 LI210 세포와 U937(human monocyte like, histiocytic cell line) 세포 등의 백혈병 세포의 apoptosis를 농도의존적으로 촉진시켰고, apoptosis 관련 유전자인 ICE, c-myc, p53의 mRNA 발현을 증가시켜서 瓦松의 면역조절능력과 항암능력이 보고되었다²³.

사람 만성골수성백혈병세포주인 K562는 tyrosine kinase의 활성을 가진 p210 융합 단백질질을 가진 세포이며, K562세포의 성장을 유지하는데 Ras/MAP kinase계의 활성이 중요한 역할을 한다²⁴.

만성골수성백혈병세포인 K562 세포주는 방사선 및 다양한 항암제에 대한 apoptosis에 저항성을 가진다. K562 세포는 방사선에 대하여 내성반응을 보이며, 세포내 PTK의 작용을 억제하고자 방사선 조사와 함께 투여한 herbimycin(HMA)에 의하여 방사선에 대한 apoptosis와 같은 감수성 반응이 유도되는 반면, genistein에 의하여 방사선에 대한 apoptosis 반응이 저해됨이 확인되었다²⁵.

瓦松의 K562(human chronic myeloogenous leukemia 세포)에 대한 분석에 앞서 약물의 과잉투여에 의하여 유발될 수 있는 세포독성과 실험을 위한 적정 투여농도범위의 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다. 瓦松의 농도를 0에서 300µg/ml까지 다양하게 해 보고, 또 시간을 24시간, 48시간, 72시간을

각각의 농도로 처리해 본 다음에 MTT assay로 세포활성을 살펴보았다. 瓦松은 0-25 μ g/ml 농도로 처리한 경우 뚜렷한 세포 활성의 감소가 관찰되지 않은 반면, 50 μ g/ml에서는 중간 정도의 감소가 나타나며 100 μ g/ml의 농도 이후로는 세포활성이 떨어진 정도가 같이 나타나기 때문에 100 μ g/ml 정도의 농도가 적절하다고 판단되었다. 다시 瓦松의 농도에 따른 세포활성의 저하를 보기 위해 24시간 瓦松을 처리하여 관찰한 결과는 瓦松의 농도에 따라 세포활성의 저하됨이 관찰되었다

적절한 세포수를 정하기 위하여 24시간 동안 瓦松을 처리하였는데, 세포의 초기배양농도를 각각 달리 하였을 때 효과가 관찰되는 적절한 세포수를 확인하기 위한 실험을 하였는데 ml당 0.1 $\times 10^5$, 0.5 $\times 10^5$, 1 $\times 10^5$, 2 $\times 10^5$ 개의 세포를 깔고 약제를 처리 해 보았다. 0.1 $\times 10^5$ 에서는 너무 급격한 감소를 보였고, 0.5 $\times 10^5$ 에서 가장 적절한 감소 경향을 보였다. 2.0 $\times 10^5$ 에서는 거의 감소가 되지 않았다. 따라서 이후로는 모두 세포의 개수는 5 $\times 10^4$ 개의 세포수로 정하여 실험을 진행하였다.

약제처리 시간에 따른 효과를 관찰하기 위해 瓦松의 농도를 100 μ g/ml로 약제를 처리한 후 시간을 6시간에서 72시간까지 차이를 두고 세포의 활성의 저하를 관찰하였는데 48시간까지 시간에 비례하여 감소하다가 72시간에는 거의 변화가 없었다.

瓦松이 Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위해서 瓦松을 5 $\times 10^4$ 개의 세포수의 배지에 100 μ g/ml의 농도로 6, 12, 24, 48, 72시간을 두고 유전자의 발현을 보았다. 12시간까지 거의 변화가 없으나 24시간이 지난 후 유전자의 발현이 감소됨을 알 수 있다. 다시 5 $\times 10^4$ 개의 세포수의 배지에 농도를 다양하게 하여 24시간이 지난 후 유전자의 발현을 관찰하였는데 약물의 농도를 50 μ g/ml 이상으로 처리하였을 때에 줄어들었다.

瓦松이 Bax 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위해서 瓦松을 5 $\times 10^4$ 개의 세포수의 배지에 100 μ g/ml의 농도로 6시간부터 72시간을 두고 유전자의 발현을 관찰하였는데 24시간까지 거의 변화가 없었고,

48시간 72시간에는 증가한 것이 관찰되었다. 다시 5 $\times 10^4$ 개의 세포수의 배지에 농도를 다양하게 하여 24시간을 두고 관찰하였는데 농도에 따라서 거의 변화가 없었다. 瓦松이 Bax 유전자 발현에는 거의 영향을 주지 못함을 알 수 있었다.

瓦松이 Caspase-3 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위해서 瓦松을 5 $\times 10^4$ 개의 세포수의 배지에 100 μ g/ml의 농도로 6시간부터 72시간을 두고 유전자의 발현을 관찰하였는데 6시간까지 거의 변화가 없었고, 12시간부터 증가하여 72시간에는 오히려 감소된 것이 관찰되었다. 다시 5 $\times 10^4$ 개의 세포수의 배지에 농도를 다양하게 하여 24시간을 두고 관찰하였는데 50 μ g/ml에서 약간 증가하였고 100 μ g/ml에서는 뚜렷하게 증가하였다. 瓦松이 Caspase-3 유전자 발현에는 12시간에서 48시간까지, 농도가 50~100 μ g/ml까지에서 영향을 주었음을 알 수 있었다.

瓦松의 K562 cell에 대한 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 瓦松을 100 μ g/ml의 농도로 각각 0, 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 처리한 후 DNA를 수거하고 전기영동하여 DNA 분절을 확인하였다. 실험결과 24시간 이상 처리한 군에서 DNA 분절이 확인되었으며, 약제의 농도가 높을수록 명확한 분절 양상을 관찰할 수 있었다.

이상 瓦松은 K562 세포주에서 Bax 유전자 발현에 아무 영향을 끼치지 않았지만, Bcl-2 유전자를 감소시키고, Caspases-3 유전자를 증가시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 관찰되었다. 이것은 瓦松의 만성 골수성 백혈병 치료 효과와 관련해서 이에 대한 심화연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

瓦松이 K562 cell line에 미치는 영향을 규명하기 위해 cell proliferation assay(MTT assay), Cell count, Quantitative Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), DNA fragmentation assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 瓦松은 농도와 시간에 비례하여 세포 활성을 감소시켰는데 100 μ g/ml의 농도와 24시간 처리한 것에서 가장 적합한 세포활성의 감소가 나타났다.
2. 세포활성은 6시간에서 48시간까지 시간에 비례하여 감소하고 72시간에는 거의 변화가 없었다.
3. 瓦松은 Bcl-2 유전자 발현에서 24시간이후, 농도가 50 μ g/ml 이상 처리하였을 때 유의하게 감소시켰다.
4. 瓦松은 Bax 유전자 발현에는 전혀 영향을 끼치지 않았다.
5. 瓦松은 Caspase-3 유전자 발현에서 12시간부터 48시간에서, 농도는 100 μ g/ml에서 유의하게 증가시켰다.
6. 瓦松은 24시간이상 처리했을 때, DNA fragmentation 현상이 나타나는 apoptosis가 유발되었다.

이상에서 瓦松이 Bax 유전자 발현에는 영향을 미치지 못하였으나, Bcl-2 유전자를 감소시키고, Caspase-3 유전자를 증가시키며, DNA fragmentation을 일으켜 K562 cell line에서 apoptosis를 일으키는 것이 확인되었다. 각종 암치료에 효과적인 것으로 보고된 瓦松은 만성골수성백혈병의 치료에 있어서도 효과적인 것으로 사료되며 향후 Caspase 유전자 조절 기전을 통한 치료효과 검증 및 기존 치료법과의 병용치료 효과 등 심화연구가 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 전국의과대학 임상교수편. Color Atlas 임상의학. 서울: 한우리; 1998, p.447-52.
2. 김병국. 이진학, 박선양, 이제환, 양성현, 서철원 외. 동종 골수 이식에 의한 만성 골수성 백혈병의 치료. 대한내과학회지. 1994;47(2):233-45.
3. 역/전국의과대학교수. 오늘의 진단 및 치료. 서울: 한우리; 1999, p.566-9.
4. 全國韓醫科大學 肝係內科學教室 共著. 肝係內科學. 서울: 동양의학연구원. 2001; p.568.

5. 김동욱. 임상강좌 : 혈액종양에서의 새로운 치료법 ; 만성골수성백혈병에서 BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitor(STI571; Glivec(TM); Imatinib)의 이용. 추계학술대회 초록집. 2001;61(2):504-7.
6. Jun Lee, Hui-Jun, Zhou.Xiu-Hua Wu. Dihydroartemisinin downregulates vascular endothelial growth factor expression and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells. Cancer Chemother Pharmacol. 2006;57(2):213-20.
7. Rumjanek VM, Trindada GS, Wangner-Souza K. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Ci. 2001;73(1):57-69.
8. KAM H. LEUNG, DINA G. FISHER, HILLEL S. KOREN. ERYTHROMYELOID TUMOR CELLS (K562) INDUCE PGE SYNTHESIS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES. The Journal of immunology. 1983;131(1):445-9.
9. 안덕균. 原色韓國本草圖鑑. 서울: 교학사; 1998, p.69.
10. 黃奎東. 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯加 瓦松이 抗癌效果와 免疫反應에 관한 研究. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1996;2(1):1-23.
11. 田炳旭. 少陰人 補中益氣湯과 瓦松이 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響. 慶熙大大學院論文. 1995.
12. 吳千植. 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 癌細胞感受성에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1987; 10:99-116.
13. 梁緒賢. 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 卷柏, 瓦松이 肝癌의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1989;10(2):103-14.
14. 문영훈, 김영철, 이창훈, 우홍정. 외송이 HepG2 cell의 세포분열 및 관련유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):48-59.
15. 지형준. 大韓藥典 및 大韓藥典外 韓藥規格註解. 서울: 한국메디칼인덱스사;1998.
16. 박종원, 양진모, 한치화, 김춘추, 안성홍, 민우성 등. 만성 골수성 백혈병에서 감마인터페론과 화학

- 요법의 병용. 대한내과학회지. 1990;38(1):106-13.
17. Gaiger A, Henn T, Horth E, Geissler K, Mitterbauer G. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood*. 1995;86(6):2371-8.
 18. Majlis A, Smith TL, Talpaz M, O'Brien S, Rios MB, Kantarjian HM. Significance of cytogenetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):196-203.
 19. 김원일, 박종원, 이종욱, 한치화, 양일호, 김춘추. 만성 골수성 백혈병에 있어서 병기에 따른 bcr-abl mRNA 유형별 출현 빈도와 Polymerase Chain Reaction을 이용한 미세 잔류 백혈병의 증명. *대한내과학회지*, 1992;42(2):199-209.
 20. Yoon YS, Kim KS, Hong SG, Kang BJ, Lee MY, Cho DW. Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger(Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. *J Ethnopharmacology*. 2000; 69:73-8.
 21. 박상원, 송춘호. 외송약침액이 신장세포에서 H₂O₂에 의한 세포사망 및 DNA 손상에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2001;18(1):88-99.
 22. 이정화. 외송약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구. *대한침구학회지*. 1999;16(4):175-219.
 23. 권진, 한광수. 외송 추출물이 면역체계에 미치는 영향. *한약잡지*. 2004;12(4):315-20.
 24. 강치덕, 김광운, 안병권, 전병학, 유미애. K562 세포의 적혈구성 분화유도 기전. 부산대학교 의과대학 생화학교실. 부산대학교 암연구소. 일반연제19.
 25. 양광모, 윤선민, 정수진, 장지연, 조월순, 조창호 등. K562 세포의 방사선 감수성 변화에 영향을 미치는 신호전달인자. *대한방사선종양학회지*. 2003; 21(3):227-37.