

## Human Neuroblastoma Cell Line BE2에 대한 健脾補腎抗癌湯의 세포고사 기전 연구

조영기, 문미현, 이성균, 정현애\*, 이정섭, 남상규, 문구, 신선호, 김동웅\*\*

원광대학교 한의과대학 전주한방병원  
원광대학교 한의과대학 익산한방병원, 서울 광동한방병원\*\*

---

### Study of The Apoptotic Mechanisms of *Gunbibosinhangam-tang* on Human Neuroblastoma Cell Line BE2

Young-Kee Cho, Mi-Hyun Moon, Seong-Kyun Lee, Hyun-Ae Jeong\*,  
Jung-Sub Lee, Sang-Kyu Nam, Goo Moon, Sun-Ho Shin, Dong-Woung Kim\*\*

Wonkwang University Jeonju Oriental Medicine Hospital, Jeonju, Korea,  
Wonkwang University Iksan Oriental Medicine Hospital, Iksan, Korea  
Kwangdong Oriental Medicine Hospital, Seoul, Korea

#### ABSTRACT

**Objective:** In order to investigate cell death mechanisms by *Gunbibosinhangam-Tang*(G.B.H) in cancer cells, the activities of apoptosis signaling pathway were tested in human neuroblastoma cell line BE2.

**Methods:** Viability of BE2 cells was markedly decreased by treatment of the water extract of G.B.H in a dose-dependent manner. G.B.H-induced cell death was confirmed as apoptosis characterized by chromatin condensation. We tested whether the water extract of G.B.H affects the anti-apoptotic proteins such as Bcl-X<sub>L</sub>.

**Results:** Bcl-X<sub>L</sub> was unaffected by the addition of the water extract of G.B.H. in a time-dependent manner. Cleavage of PARP(poly-ADP-ribose polymerase) by activation of caspase-8 protease was also observed in BE2 cells by the treatment of the water extract of G.B.H.

**Conclusion:** These results suggest that the water extract of G.B.H exerts anti-cancer effects on human neuroblastoma BE2 cells by inducing the apoptotic death via activation of intrinsic caspase cascades.

**Key words:** apoptosis, neuroblastoma, *Gunbibosinhangam-Tang*

---

## 1. 서론

종양이란 개체를 구성하는 정상 세포가 여러 자극에 의하여 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형세포의 집단.

---

· 교신저자: 조영기 전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1  
원광대학교 전주한방병원  
Tel:(063) 270-1034  
E-mail : youngkee77@hanmail.net

즉 새로이 생긴 腫塊를 뜻한다. 종양은 이를 구성하는 세포와 형태와 행동양상에 따라 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)으로 구분하며 암(cancer)은 바로 악성종양에 해당한다<sup>1</sup>.

국내의 경우, 2004년 한 해 동안 우리나라 전체 사망자(24만6천명)의 26.3 %인 64,731명(10만명당 死亡率 133.5명)이 암으로 사망하여, 암이 사망원인 순위 1위를 차지하고 있으며<sup>2</sup>, 암의 발생율은 점차 증가하는 실정이지만, 아직까지는 암의 발생요인이나 기전이 명확히 밝혀있지 않다<sup>3-6</sup>.

본 실험에 사용된 健脾補腎抗癌湯은 圓光大學校 全州韓方病院 脾系內科學에서 암치료에 사용하는 처방으로서 黃芪, 人蔘, 白朮, 白茯苓, 枸杞子, 菟絲子, 女貞子, 陳皮, 半夏(製), 龍葵, 蒲公英, 甘草, 白花蛇舌草 등의 약물로 구성되어, 益氣, 健脾, 補腎, 祛痰, 抗炎, 抗癌하는 치료효과를 갖는다.

이에 본 연구자는 韓方에서 직접 응용되고 있

는 健脾補腎抗癌湯에 의한 인간 신경모세포종 세포주 BE2의 생존율 감소가 세포고사에 의한 것임을 확인한 후, 그 세포고사 신호전달기전을 연구하였다. 健脾補腎抗癌湯에 의한 세포고사 과정에서 연관된 caspase계 cysteine protease-8의 활성화와 Bcl-2 단백질군의 발현량 변화를 알아보고, 健脾補腎抗癌湯의 항암기전을 규명하고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 圓光大學校 全州韓方病院에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 健脾補腎抗癌湯은 圓光大學校 脾系內科學教室 處方에 의거하였으며 1貼의 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Gunbibosinhangam-Tang

韓藥名	生藥名(學名)	用量(g)
黃芪	Radix Astragali( <i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.)	15g
人蔘	Radix Ginseng( <i>Panax ginseng</i> C. A. MEYER.)	6g
白朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae( <i>Atractylodes maceocephala</i> KOIDZ.)	6g
白茯苓	Poria( <i>Poria cocos</i> WOLF.)	6g
枸杞子	Fructus Lycii( <i>Lycium chinense</i> MILL.)	6g
菟絲子	Semen Cuscutae( <i>Cuscuta japonica</i> CHOISY.)	4g
女貞子	Fructus Ligustri Lucidi( <i>Ligustrum lucidum</i> AIT.)	4g
陳皮	Pericarpium citri Reticulatae( <i>Citrus unshiu</i> MARCOR.)	4g
半夏(製)	Rhizoma Pinelliae( <i>Pinellia ternata</i> BREIT.)	4g
龍葵	Herba Solani nigri( <i>Solanum nigrum</i> L.)	6g
蒲公英	Herba Taraxaci( <i>Taraxacum mongolicum</i> H. AND NAZZ.)	6g
甘草	Radix Glycyrrhizae( <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.)	4g
白花蛇舌草	Herba Hedyotis Diffusae( <i>Oldendia diffusa</i> ROXB.)	15g
Total amount		86g

## 2) 검액조제

실험에 사용된 약제는 물 추출물(H<sub>2</sub>O extract)로 음건된 健脾補腎抗癌湯 100 g을 물 1 ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거르기로 濾過하고 3,200 rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70°C(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조 시킨 것을 시료로 사용하였다.

## 3) 시약 및 기기

RPMI 1640, 항생제, 및 trypsin은 Gibco BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)

于胎兒 혈청은 Hyclones 사에서 구입하여 사용하였다. 배양 용기(48-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Bcl-X<sub>L</sub>, caspase-8, PARP(poly-ADP-ribose polymerase) 및 β-actin 등에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, U.S.A.)에서, anti-goat, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. Tetrazolium bromide(MTT) 및 Hoechst 33342은 Sigma사(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

## 4) 세포주

인간 신경모세포종 세포 BE2 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대배양하면서 실험을 실시하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포배양 및 시약처리

인간 신경모세포종 세포인 BE2는 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) 10 % 우태아 혈청이 포함된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 다양한 농도의 한약재를 처

리한 뒤 세포의 죽음을 관찰하고, 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 2) 세포 생존율 측정

세포생존율은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포(1×10<sup>5</sup> cells/ml)는 세포배양판(24-well plate)에 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정시켰다. MTT 용액(5 mg/ml, phosphate buffered saline : PBS, pH7.4)은 실험에 필요한 조건의 시약 등을 처리한 후 배양액 부피의 1/10되게 첨가하여 4시간 반응시켰다. 4시간 후, 배양액을 제거하고 1ml DMSO를 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음, 96-well용 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

### 3) Hoechst 염색

세포핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 BE2 세포에 한약재를 처리한 후 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 2회 세척하였다. 세포는 paraformaldehyde 용액(3.7 %)으로 실온에서 10분간 고정된 후, 10 μM Hoechst 33342 용액으로 실온에서 20분 염색하여 다시 PBS로 세척하였다. 염색된 세포는 형광 현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

### 4) Western blot analysis

배양된 BE2 세포에 약재를 처리한 일정 시간 후에 세포를 채취하여, cold PBS로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 total cell lysate를 얻기 위해 세포용해 완충용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin)을 첨가하여 4 °C에서 30분간 반응시키고, 13,000 rpm에서 20분 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액의 단백질을 BCA법으로 정량하고, 동량의 단백질 (60 μg)은 3× sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후, SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동 후 gel의 단

백질은 electrotransfer system (Ellard Inc, seattle, WA, USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer(5 % skim milk)와 상온에서 2시간 반응하였다. Bcl-X<sub>L</sub>, caspase-8, PARP 및 β-actin 등에 대한 항체는 0.05 % (v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 4시간 반응하였으며, Caspase-8 protease, PARP Bcl-X<sub>L</sub>, Actin 등에 대한 2차 항체 anti-goat, anti-rabbit igG conjugated horse-radish peroxidase(HRP)를 TBS-T로 희석(1:3000)하여 상온에서 2시간 반응한 후, enhanced chemilluminescence(ECL) kit (Amersham, England)를 이용하여 ECL 필름에 감광, 현상하였다.

5) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이

며 실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였다.

### III. 결 과

#### 1. 健脾補腎抗癌湯 추출물이 인간 신경모세포종 세포주 BE2의 세포생존율에 미치는 영향

健脾補腎抗癌湯 추출물이 인간 신경모세포종 세포주 BE2의 생존율에 어떤 영향을 미치는가 알아보기 위해 먼저 健脾補腎抗癌湯의 농도를 변화시키며 생존율을 MTT방법으로 측정하였다. BE2 세포에 100 μg/ml의 한약재를 처리한 후 24시간 뒤 생존율이 20 % 감소하였고, 500 μg/ml 처리 시에는 49 %, 1000 μg/ml 처리 시에는 55 % 이상 생존율이 감소하였다(Fig. 1).

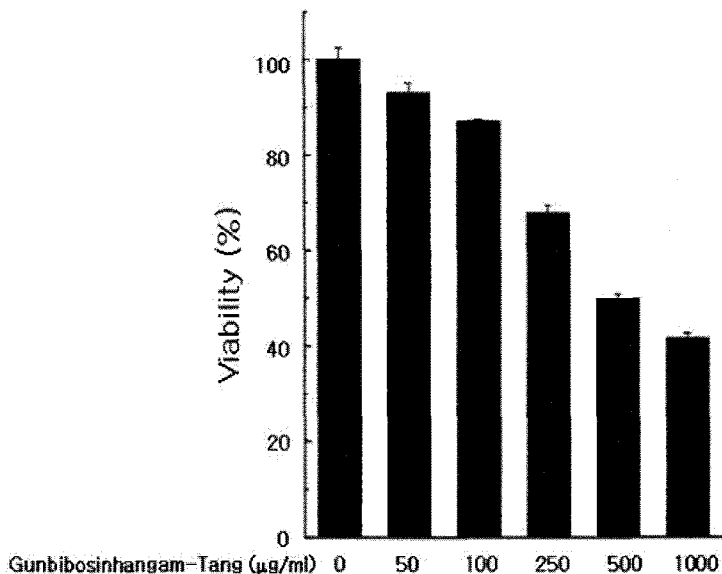


Fig. 1. Gunbibosinhangam-Tang decreased the viability of BE2 cells in a dose-dependent manner.

BE2 cells were treated with various concentrations (from 50 to 1000 μg/ml) of H<sub>2</sub>O extract of *Gunbibosinhangam-Tang* for 24 hr. Cell viability was determined by MTT assay. Results represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiment.

2. 健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 BE2 세포 죽음의 성격 규명

健脾補腎抗癌湯에 의한 BE2의 세포사멸이 세포고사에 의한 것인지 여부를 관찰하고자 Hoechst 33342를 이용하여 BE2 세포를 염색하였다. BE2 세포에 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  健脾補腎抗癌湯을 24시간 처리한

후, Hoechst 33342 시약으로 세포의 핵을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 정상 대조군 BE2의 핵은 둥글고 균질한 형광세기로 관찰되었으나, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  健脾補腎抗癌湯을 처리한 실험군에서는 세포고사 현상의 전형적인 특징인 핵의 분절현상과 염색체 응축현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).



Fig. 2. *Gunbibosinhangam-Tang* induced the nuclear fragmentation of BE2 cells.

Cells were treated with *Gunbibosinhangam-Tang*(500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hr. The nuclei of cells was observed with Hoechst dye under fluorescent microscope.

(A) control cells, (B) cells were treated with *Gunbibosinhangam-Tang*(500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hr.

3. 健脾補腎抗癌湯 추출물이 caspase protease의 활성화에 미치는 영향

健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 BE2 세포의 고사 현상이 세포고사 신호전달의 중요한 분자인 caspase family cysteine protease 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 procaspase-8 단백질 발현 정도를 조사하였다. 健脾補腎抗癌湯 추출물 처리 시 시간이 경과함에 따라 procaspase-8 protease의 분해가 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 initiator caspase인 caspase -8의 pro-form이 절단되어 활성화되고 이는 caspase -8 protease의 활성을 유도했음을 시사하였다.

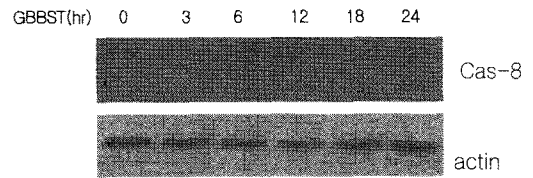


Fig. 3. *Gunbibosinhangam-Tang* cleaved procaspase-8 protease in BE2 cells.

Cells were treated with 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Gunbibosinhangam-Tang* for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.0 % SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-procaspase-8 protease antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

4. 健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 BE2 세포주 고사 시 PARP의 절단에 미치는 영향

健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 세포고사 유도 시 활성화된 caspase-8 protease에 의해 절단되어 미토콘드리아로 이동, 세포고사를 촉진하는 것으로 알려진 PARP 단백질의 변화를 BE2 세포주에서 조사하였다. 健脾補腎抗癌湯 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 후 시간에 따라 BE2 세포를 채취, 분쇄한 세포부유액의 Bid 분자를 anti-PARP 항체를 이용한 Western blot을 시행하였다(Fig. 4). 健脾補腎抗癌湯 추출물 처리 시 시간이 경과함에 따라 PARP의 비활성 전구물질의 절단이 관찰되었다. 이러한 결과는 健脾補腎抗癌湯(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 처리에 의해 활성화된 caspase-8 protease에 의해 세포내 PARP 단백질의 절단이 초래되어 BE2 세포의 세포고사에 기여하였다고 판단되었다.

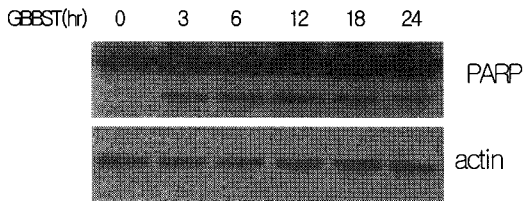


Fig. 4. *Gunbibosinhangam-Tang* cleaved PARP in BE2 cells.

Cells were treated with 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Gunbibosinhangam-Tang* for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.0 % SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane an immunoblotted with anti-PARP antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

5. 健脾補腎抗癌湯 추출물이 BE2 세포주에서 미토콘드리아 단백질인 Bax 및 Bcl-XL 단백질 발현에 미치는 영향

세포고사를 조절하는 관여하는 중요한 유전자 산물이 Bcl-2 단백질군이다. 본 실험에서는 健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 BE2 세포고사에 있어 Bcl-2 단백질군 중 anti-apoptotic 기능을 하는

Bcl-X<sub>L</sub> 단백질의 발현 변화를 조사하였다. BE2세포는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  健脾補腎抗癌湯을 시간별로 처리한 후, 세포를 포집하여 파쇄액을 얻어 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질에 대한 항체를 사용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 세포사멸 과정에서 健脾補腎抗癌湯 추출물은 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질 발현에 영향을 주지 못하였음을 확인하였다(Fig. 5).

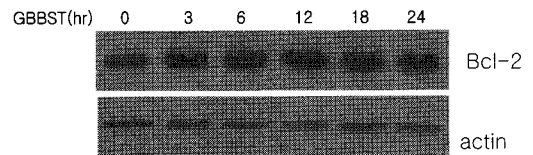


Fig. 5. *Gunbibosinhangam-Tang* has not effects of Bcl-2 expression in BE2 cells.

Cells were treated with 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Gunbibosinhangam-Tang* for various periods. The equal amounts of protein from lysates were subjected on 12.0 % SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with Bcl-2 antibody. The immunoreactive bands were visualized by ECL kit.

IV. 고찰

동양의학의 종양에 대한 기록은 오래전부터 전해져 내려왔다.殷墟의 甲骨文에 '瘤'라고 하는 병명이 나타나고, 2천여 년 전의 『周禮』에는 종양만을 전문적으로 치료하는 '瘍醫'라는 명칭이 등장하는 것으로 보아, 동양의학에서는 일찍이 종양의 진단과 치료에 대하여 기술하여 왔으며, 이를 토대로 각종 종양의 발병 원인, 병기, 변증논치 및 예후에 대하여 풍부한 임상적인 내용을 갖추게 되었다. 반면 서양의학에서는 19세기에 현미경이 발명되면서 종양학의 기초를 세웠으며, 20세기 중반부터 암에 대한 화학요법, 방사선요법 등이 개발되어 치유효율의 점진적인 향상을 가져왔다. 최근 들어서는 종양역학, 종양면역학, 바이러스종양학, 세포생물학, 분자생물학 등의 눈부신 발전에 힘입어 암에 대한 이해 및 치료에 획기적인 진보를 이루고 있다<sup>3-6</sup>.

그러나 실제 임상에서는 여전히 근본적인 대책보다는 결과를 수습하는 수준의 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 주가 되고 있다. 이러한 치료법은 치료효과는 있지만, 인체의 정상조직과 기관에 대한 독성이 강하여 환자에게 소화기 장애, 간장장애, 탈모, 혈액학적 변화, 골수조혈장애, 생식기장애, 유전인자장애, 면역기능저하, 염증반응, 신체쇠약 등의 부작용을 과생시킨다는 것이 현대 의학의 맹점이다. 따라서 인체내의 방어기능을 강화시켜 부작용을 줄이고, 항암능력을 증강시키는 관점이 설득력을 얻게 되었으며, 한의학적인 사고를 바탕으로 한 東·西의 결합치료가 관심의 대상이 되고 있다<sup>3,7</sup>.

그러므로 한의학적인 종양치료에 접근하기 위해서는, 과거에 종양이 어떻게 인식되어 왔는지를 살펴볼 필요가 있을 것이다. 역대문헌 중 종양과 관련된 병명을 살펴보면, 噎膈, 反胃(胃反, 翻胃), 積·聚, 脾積(痞氣), 肝積(肥氣, 癥黃, 肝着), 肺積(息賁), 心積(伏梁), 失榮, 上石疽, 乳癰(乳石癰), 妬乳, 石癭, 腎癰, 繭腎, 舌菌, 喉百葉, 五色帶下, 骨疽, 石癭, 緩疽(肉色疽), 石疔, 黑疔, 清疔, 翻花瘡, 腸覃, 肉瘤 등은 악성종양의 범주에 속하며, 痰包, 痰核, 脂瘤, 血瘤, 氣瘤, 筋瘤, 耳菌, 骨瘤, 肉瘤, 疣, 痣, 息肉, 贅生物 등은 양성종양의 범주에 속한다<sup>4,5</sup>.

이러한 종양의 원인을 한의학에서는 外感六淫, 氣滯鬱結, 情志失調, 飲食不節, 過勞 등으로 보았으며, 그 병기를 주로 氣滯血瘀, 邪毒鬱熱, 痰濕結聚, 臟腑失調(氣血虧虛), 經絡瘀阻 등의 5가지 방면으로 귀납하였다<sup>4,5</sup>. 반면, 서양의학에서는 그 원인을 지리학적 및 인종적 요인들, 환경적·문화적 영향, 나이, 유전, 후천적 전종양성 질환 등으로 인한 내적인 요인과, 흡연, 음주, 식이, 직업적 요인 등으로 인한 생활양식(life-style)과 관련된 요인, 화학적 발암원, 바이러스, 이온화 방사선과 자외선, 약물(medical agents) 등으로 인한 외적인 요인으로 구분하였다<sup>1,3,4,6</sup>.

한의학은 종양에 대한 이러한 인식을 바탕으로, 종양에 대한 치료법을 扶正固本法과 祛邪法 및 扶正과 祛邪를 兼治하는 扶正祛邪法의 3가지로 분류하였으며, 본 연구에 사용된 健脾補腎抗癌湯은 扶正祛邪法에 준하여 先天之本인 腎과 後天之本인 脾를 補하여 면역기능을 증진시키면서 益氣, 健脾, 補腎, 祛痰, 抗炎, 抗癌하는 치료효과를 갖는 약물로 구성되어 있다.

각각의 약물들에 대해서 알아보면 다음과 같다. 黃芪는 補氣升陽 固表止汗 托毒排膿 利水退腫하는 효능이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 자당, 글루크론산, 점액질, 수종의 아미노산, 苦味質, choline, betaine, 엽산 등이다<sup>9</sup>. 또한 腫瘍患者의 手術後 放射線治療와 化學治療 期間中이나 恢復期에 사용하며, 體虛氣虧한 환자의 扶正培本 健脾益氣의 主藥이 된다<sup>10</sup>.

人蔘은 大補元氣 補脾益氣 生津 寧神益智하는 효능이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 휘발성 정유, panaxide 나 ginsenoside로 알려진 saponin, 항산화물, peptide 등이다<sup>9,11</sup>. 各種 腫瘍手術後 恢復期나 放射線治療와 化學治療 期間 동안에 正氣虧虛할 때 사용한다<sup>10</sup>.

白朮은 補脾益氣 燥濕利水 固表止汗 安胎하는 효능이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 정유, atractyolol, atractylon, Vitamin A 등이다<sup>9,10</sup>. 종양환자의 수술 후에 氣虛 脾胃虛弱에 사용되거나 放射線治療와 化學藥物治療로 인한 消化器 不作用에 사용한다<sup>10</sup>.

白茯苓은 利水滲濕 健脾補中 寧心安神의 효능이 있으며<sup>8,10</sup> 주성분은  $\beta$ -Pachyman, Pachymic-acid, Tumulolic-acid 등이다. 食管癌, 肝癌, 舌癌, 乳腺癌 등에 사용되며, 水腫을 치료한다<sup>10</sup>.

枸杞子는 滋補肝腎 益精明目하는 효능이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 betaine, zeaxanthin, physalein, carotene, nicotinic-acid 등이다<sup>9,11</sup>. 血癌, 腸癌, 骨癌, 胃癌 등에 사용된다<sup>10</sup>.

菟絲子는 補肝腎 益精髓하는 효능이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 amylase와 비타민 등이다<sup>9,11</sup>. 주로 胃癌, 骨癌, 肺癌, 鼻咽癌 등에 사용하며, 白血病에도 이

용한다<sup>10</sup>.

女貞子は 滋陰 補肝腎 明目하는 效能이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 nuzhenide, oleanolic-acid, ursolic-acid 등이다<sup>9-11</sup>. 放射線治療와 化學藥物治療로 인한 白血球減少症에 사용되며 腎癌 骨癌 腦腫瘍 白血病 등에 사용된다<sup>10</sup>.

陳皮는 理氣健脾 燥濕化痰하는 效能이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 정유, limonene, hesperidin이다<sup>9-11</sup>. 各種 腫瘍에 대하여 일정한 緩解作用이 있어서 胃癌 原發性肝癌 骨肉腫 子宮頸部癌 등에 사용된다<sup>10</sup>.

半夏는 降逆止嘔 燥濕祛痰 消痞散結하는 效能이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 정유, *l*-ephedrine, choline과 수종의 아미노산이다<sup>9-11</sup>. 子宮頸部癌과 그 前病變에 效果가 있으며 食道癌 胃癌 鼻咽癌 皮膚癌 등에 사용된다<sup>10</sup>.

龍葵는 清熱解毒 散結消腫 利尿하는 效能이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 solanine, solasonine solamargine 등의 alkaloid와 saponin이다<sup>9-11</sup>. 肺癌 胃癌 肝癌 膀胱癌 그리고 絨毛腺上皮癌 등의 各種 癌腫에 사용되며 癌性 胸水나 腹水에도 效果가 있다<sup>10</sup>.

蒲公英은 清熱解毒 消腫散結의 效能이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 taraxasterol, taraxerol, taraxacerin, taraxacin 및 Vitamin A, B, D 등이다<sup>9-11</sup>. 消炎, 催乳, 乳腺炎에 좋고, 주로 乳房癌의 治療에 多用되고 있다<sup>10</sup>.

甘草는 補脾益氣 清熱解毒 潤肺止咳 調和諸藥하는 效能이 있으며<sup>8-10</sup> 주성분은 glycyrrhizin과 liquiritin, isoliquiritin, neoliquiritin이다<sup>9-11</sup>. 최근 胃癌의 豫防과 治療에 사용되고 있다<sup>10</sup>.

白花蛇舌草는 消腫解毒 清熱利濕 抗癌의 效能이 있으며<sup>8,10</sup> 주성분은 asperuloside, palderoside, desacetylasperuloside, oldenlandoside이다<sup>10,11</sup>. 胃癌, 肺癌, 肝癌, 大腸癌 및 直腸癌, 食道癌, 乳房癌, 子宮頸部癌 등의 惡性腫瘍의 活用되고 있으며, 망상내피계를 자극한다<sup>10,11</sup>.

최근 타 방제의 항종양 효과에 대한 실험적 보고로, 裴<sup>12</sup>는 八珍抗癌丹의 抗腫瘍效果 및 機轉研

究, 金<sup>13</sup>은 扶正抗癌湯의 抗腫瘍效果에 關한 實驗的 研究를, 許<sup>14</sup>는 인간 肺癌細胞株 H-460세포에서 加減十全大補湯과 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 병용처리에 의한 抗腫瘍 增進效果를, 여 등<sup>15</sup>은 分心氣飲의 抗癌作用 및 免疫機能에 關한 研究를, 신 등<sup>16</sup>은 消癆去痰益氣湯의 抗癌效果에 對한 研究를, 김 등<sup>17</sup>은 消癆散의 抗癌 效果 및 血管新生抑制에 미치는 影響을 보고하였다. 그러나 본 實驗에 사용된 健脾補腎抗癌湯에 대하여서는 高<sup>18</sup>의 健脾補腎抗癌湯에 의한 유도성 산화질소합성효소의 활성화 및 그 기작에 관한 연구 1례가 있었을 뿐, 방제의 세포고사 유도기전에 대해서는 밝혀진 바가 없었다.

반면, 洋方에서는 최근 연구에 의해 흔히 사용되는 많은 항암제들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀져 있고 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide경로, 즉 발현 초기 유전자 (early immediate gene)발현, 단백질 분해효소 caspase family cysteine protease 및 DNA 분해를 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 이유로 항암치료의 효율성은 세포고사 기전의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 종양 치유의 관점에서 종양세포의 세포고사와 관련된 세포고사 유도인자, 신호전달경로 그리고 관련 유전자들과 단백질들을 연구하여 항암기전을 연구하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>19,20</sup>. 그러므로 한방에서도 세포고사와 관련된 항암기전에 대해 많은 연구가 필요한 실정이며, 본 연구에 사용된 健脾補腎抗癌湯의 항암기전은 중요한 자료가 될 수 있을 것이다.

세포고사 신호전달기전으로는 크게 Fas/Fas ligand를 경유하는 기전과 미토콘드리아를 경유하는 기전이 있다. Fas와 Fas ligand와 같은 TNF family에 속하는 세포 표면의 수용체를 경유하는



세포고사의 신호전달은 죽음 수용체 death receptor와 ligand의 발현을 증가시킴으로써 세포고사를 유도한다. Fas ligand의 발현은 autocrine 또는 paracrine 형태로 death receptor 기능을 갖는 Fas에 결합하여<sup>19</sup>, death receptor pathway를 활성화시킨다<sup>20</sup>. 세포고사를 유도하는 다른 경로로 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출을 조절하는 Bcl-2 단백질군이 관여하는 경로가 있다. Bcl-2 단백질군은 크게 두 가지로 구분 할 수 있는데, 세포고사를 억제하는 작용을 갖는 Bcl-2는 voltage dependent ion channel의 열림(opening)을 촉진하는 Bax, Bak과 같은 pro-apoptotic family의 기능을 조절하여 cytochrome c의 방출을 저해한다<sup>21,22</sup>. Bcl-X<sub>L</sub>은 미토콘드리아의 내막 공간에 수소이온(hydrogen ion)의 축적을 조절하는 구멍(pore)를 형성하여 미토콘드리아의 전자적 항상성(electrical homeostasis)을 조절한다는 보고가 있으며<sup>23,24</sup>. Bax와 같은 미토콘드리아에 손상을 줄 수 있는 단백질의 기능을 저해함으로써 세포고사를 억제하는 기능을 갖고 있다. 그러나 Bax, Bak, Bad 그리고 Bcl-Xs같은 세포고사 촉진 단백질은 미토콘드리아로 이동되어 cytochrome c를 방출 할 수 있는 pore를 형성하기도 한다. 특히 PARP 단백질은 활성화된 caspase-8에 의해 절단되어 미토콘드리아로 이동, 세포고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>25,26</sup>.

Caspase계 cysteine protease는 Fas를 경유하는 신호전달과정과 미토콘드리아를 경유하는 신호전달의 하방에 위치하여 세포고사에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. caspase는 정상적으로 세포 내에 불활성화소 형태로 존재하다가 세포고사 자극에 의해 활성화되며, 다른 caspases 등 여러 표적 단백질의 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달활성을 조절한다<sup>28,29</sup>.

따라서 본 연구에서는 사람의 신경모세포종 세포주인 BE2 를 사용하여, 健脾補腎抗癌湯 추출물에 의해 BE2 세포주의 세포고사 여부를 밝히고,

그 신호전달과정에 관여하는 단백질들의 발현 변화를 조사함으로써 健脾補腎抗癌湯의 항암 효과에 대한 분자생물학적 기전의 이해를 유추하고자 하였다. 먼저 健脾補腎抗癌湯 추출물을 BE2 세포에 농도별로 처리한 결과, 농도 의존적으로 세포독성 효과를 나타냈으며(Fig. 1), 그 기전이 세포고사 기전에 의해서 매개됨이 핵의 분절 현상으로 확인되었다(Fig. 2).

健脾補腎抗癌湯에 의한 BE2 세포주의 세포죽음이 세포고사 신호전달계를 활성화시키는지를 확인하기 위하여 여러 실험을 수행하였다. 먼저 세포고사의 주요 작용기전의 하나인 caspase family cysteine protease 의 활성화 여부를 조사하였다. 1986년 Ellis 및 Horvitz에 의하여 nematoid *C. elegans*에서 ced-3 및 ced-4의 mutation이 세포고사를 억제한다는 보고 이래로 ced-3의 mammalian homologue인 ICE가 clone되었으며 이는 후에 caspase-3 protease로 명명되었고<sup>29</sup>. 이후에 약 14종의 caspase family cysteine protease의 subfamily가 밝혀져 있으며 이들 유전자는 cysteine기만을 선택적으로 절단하는 단백질분해효소(protease)를 coding하고 있다<sup>30</sup>. Caspase-3 protease는 세포질 내에서 proenzyme 형태로 존재하고 있다가 caspase-8 및 9 같은 initiator caspase 에 의하여 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환된다.

본 연구에서는 健脾補腎抗癌湯 처리시 세포고사가 유도되는 BE2 세포주에서 initiator caspase인 caspase-8 protease의 활성화 여부와 이에 의한 PARP의 절단 여부를 조사하였다. 본 연구에서도 caspase -8의 pro-form이 절단되어 활성화되는 것으로부터(Fig. 3) 세포고사가 caspase-8 활성화와 관련이 있음을 유추할 수 있었다. 또한 健脾補腎抗癌湯 처리 후 시간이 경과함에 따라 caspase-8 protease에 의한 PARP 단백질의 절단이 나타났는데(Fig. 4), 절단된 PARP는 미토콘드리아로 이동, 세포고사를 촉진하는 데 기여했으리라 추정된다.

Bcl-2 단백질군은 다양한 세포고사 유도체에

의한 세포의 죽음을 억제할 뿐만 아니라 세포의 생존을 촉진하는 단백질이다. 본 연구에서도 Bcl-2 단백질군의 발현양의 변화를 조사하였다(Fig. 5). 健脾補腎抗癌湯 추출물은 BE2 세포주의 세포고사 유도에 있어 anti-apoptotic 기능을 하는 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질 발현에는 아무런 영향을 미치지 못하는 것을 보아 健脾補腎抗癌湯이 BE2 세포주에서 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질의 발현 조절에는 무관함을 시사하였다. 이러한 결과로부터 健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 BE2 세포주의 사멸은 전형적인 세포고사 기전에 의함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 인간 신경모세포종 세포주 BE2의 사멸 시 세포고사 기전을 조사한 바 caspase 계의 활성화와 PARP의 분절에 기인함을 시사하고 있다. 이러한 결과를 in vivo 실험동물 모델에 적용하여 효능 점검 실험을 실시한다면, 보다 나은 항종양 치료제의 개발에 기여하는 바가 크리라 사료된다.

## V. 결 론

한방에서 널리 사용되는 健脾補腎抗癌湯의 암세포에 대한 세포독성 상승효과와 그 세포 고사 기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 健脾補腎抗癌湯 추출물을 인간 신경모세포종 세포주인 BE2에 처리하여 생존율, 핵 분절 현상, caspase family cysteine protease의 발현, PARP 단백질의 절단, 그리고 세포고사 조절에 관여하는 Bcl-2 단백질군 중 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질의 발현 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 健脾補腎抗癌湯 추출물(500 ug/ml)을 신경모세포종 세포주 BE2에 처리 시 세포독성의 효과를 나타내었다.
2. 健脾補腎抗癌湯 추출물 처리시 나타나는 세포

독성은 핵 분절이 관찰되어 세포고사(apoptosis)에 의한 세포독성을 확인하였다.

3. 健脾補腎抗癌湯 추출물 처리시 BE2 세포주에서 procaspase-8 protease를 활성화 형태로 분해하였다.
4. 健脾補腎抗癌湯 추출물 처리시 BE2 세포주에서 caspase-8 protease 활성화에 의한 세포내 표적자인 PARP의 절단이 나타났다.
5. 健脾補腎抗癌湯 추출물 처리시 BE2 세포주에서 anti-apoptotic protein인 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질의 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

이상의 결과를 종합하면, 健脾補腎抗癌湯 추출물에 의한 인간 신경모세포종 세포주 BE2의 사멸 시 세포고사 기전을 조사한 바 caspase 계의 활성화와 PARP의 분절에 기인함을 시사하고 있다. 그러므로 처방 중의 중요성분 규명 및 생체내 대사과정 규명 등을 통한 효율적인 임상활용법이 계속 연구되어야 할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학(I) 제2판. 서울: 고문사; 1994. p.213, 231-52.
2. 통계청, 2006.
3. 해리슨 번역 편찬위원회 역. HARRISON's principle of internal medicine (II). 서울: 도서출판 정담; 1997. p.1963-77, 1977-93.
4. 문 구, 정병학, 김병주. 암-동서의 결합치료 제1권. 익산: 圓光大學校 出版局; 1999. p.14-23, 55-67, 68-92, 93-8, 256-7, 383-460, 461-501.
5. 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울: 杏林書院; 1995. p.19-31, 32-42, 72-100, 142-65.
6. 전국의과대학교수 역. 임상의학 오늘의 진단 및 치료(I) 37판. 서울: 도서출판 한우리; 1999. p.69-107.
7. 김동희. 抗癌劑 및 放射線 副作用에 대한 韓方

- 療法. 東醫病理學會誌. 1994;9:239-64.
8. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 도서출판 永林社: 1997. p.194-6, 188-91, 179-80, 649-52, 260-3, 226-7, 279-80, 469-70, 819-21, 576-7, 445-7, 172-5, 569-70.
  9. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 역. 완역 中藥大辭典. 서울: 도서출판 정담: 1998. p.6460-71, 4477-98, 2215-28, 536-43, 5710-3, 3783-6, 686-91, 1960-71, 4101-5, 5867-72, 88-103.
  10. 劉春安, 彭明. 抗癌中草藥大辭典. 湖北洪湖: 湖北科學技術出版社: 1994. p.903-9, 14-23, 340-4, 710-4, 686-90, 896-9, 115-9, 579-82, 392-8, 294-7, 1066-70, 260-5, 367-71.
  11. 김형균, 김형민, 송봉근, 이언정, 정헌택. 韓藥의 藥理. 서울: 고려의학: 2000. p.21-48, 242-3, 241, 300, 204, 225, 357-8, 337-8, 315-8, 412.
  12. 배남규. 八珍抗癌丹의 抗腫瘍效果 및 機轉研究. 圓光大博士學位論文. 2002.
  13. 김병주. 扶正抗癌湯의 抗腫瘍效果에 關한 實驗的 研究. 圓光大碩士學位論文. 1997.
  14. 허종찬. 人간 肺癌細胞株 H-460세포에서 加減十全大補湯과  $As_2O_3$ 의 병용처리에 의한 抗腫瘍增進效果. 圓光大碩士學位論文. 2004.
  15. 여대원. 分心氣飲의 항암작용 및 면역기능에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2004;24(2): 315-28.
  16. 신병철. 消癌去痰益氣湯의 抗癌效果에 對한 研究. 대한한방내과학회지. 2002;23(4):587-95.
  17. 김용수. 消癌散의 항암효과 및 血管新生抑制에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(1): 77-84.
  18. 고수미. 健脾補腎抗癌湯에 의한 유도성 산화질소합성효소의 활성화 및 그 기작에 관한 연구. 圓光大博士學位論文. 1999.
  19. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*. 2000;256:42-9.
  20. Freisen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in Leukemia cells. *Nature Med*. 1996;2:574-7.
  21. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-12.
  22. Yang J, Lui X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997;275: 1129-32.
  23. Kim CN, Wang X, Huang Z, Ibrado AM, Liu L, Fang G et al. Overexpression of Bcl-xL inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res*. 1997;57:3115-20.
  24. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida Ket al. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome c accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:6939-42.
  25. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y.. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999;399:483-7.
  26. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-6.
  27. Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J*. 1997;16:4639-49.

28. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D et al. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem.* 1997;272:9677-82.
29. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:427-45.
30. Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273(12):7141-7.