

龍膽瀉肝湯에 의해 유도된 MAP kinases 활성화를 통한 간암 세포주 HepG2의 세포사멸

윤현정, 김한성, 허숙경, 황성구, 박원환, 박선동
동국대학교 한의과대학 방제학교실

ABSTRACT

Effect of Yong-dam-sa-gan-tang on apoptosis in human hepatoma HepG2

Hyun-Jeong Yun, Han-Seong Kim, Sook-Kyoung Heo, Seong-Goo Hwang,
Won-Hwan Park, Sun-Dong Park
Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

The purpose of this study was to investigate the effect of Yong-dam-sa-gan-tang (YST) on apoptosis in HepG2 cells. First of all, to study the cytotoxic effect of methanol extract of YST on HepG2 cells, the cells were treated with various concentrations of YST and then cell viability was determined by XTT reduction method and trypan blue exclusion assay. YST reduced proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner. To confirm the induction of apoptosis, HepG2 cells were treated with various concentrations of YST. The cleavage of poly ADP-ribose

-
- 교신저자 : 박선동
 - 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 054-770-2654 E-mail : sundong@dongguk.ac.kr
 - 제1저자 : 윤현정
 - 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 054-770-2654 E-mail : sksms97@hanmail.net
 - 접수 : 2007/ 12/ 6 채택 : 2007/ 12/ 18

polymerase (PARP), a substrate for caspase-3 and a typical sign of apoptosis, and the activation of caspase-3, procaspase-8 and procaspase-9 were examined by western blot analysis. YST decreased procaspase-3, procaspase-8 and procaspase-9 levels in a dose-dependent manner and induced the cleavage of PARP. YST triggered the mitochondrial apoptotic signaling by increasing the release of cytochrome *c* from mitochondria to cytosol. Furthermore, YST also downregulated the anti-apoptotic Bcl-2 and upregulated the pro-apoptotic-Bax. Therefore, this result suggest that YST induced HepG2 cell death through the mitochondrial pathway. Sustained activation of the Ras/Raf/MEK/ERK cascade in cells results in a cell cycle arrest and has been implicated in the differentiation of certain cell types, in many cases acting to promote differentiation. YST decreased the activation of Ras/Raf/MEK/ERK cascade in a dose-dependent manner. These results suggest that YST is potentially useful as a chemo-therapeutic agent in HepG2.

Key word : Imyosan, apoptosis, caspase activity

1. 緒 論

龍膽瀉肝湯은 龍膽草(Gentianae Radix), 柴胡(Bupuleuri Radix), 澤瀉(Alismatis Rhizoma), 車前子(Plantaginis Semen), 木通(Akebiae Caulis), 黃芩(Scutellariae Radix), 梔子(Gardeniae Fructus), 當歸(Angellicae Gigantis Radix), 生地黃(Rehmanniae Radix), 그리고 甘草(Glycyrrhizae Radix)로 구성된 처방으로 한의학적으로 肝火에 有關한 급성 결막염, 급성중이염, 급성 간염 그리고 급성담낭염의 치료와 肝濕熱과 유사한 급성 신우신염, 방광염, 요도염, 급성 골반염, 외음염 그리고 고환염의 치료에 활용되어 왔다¹⁾.

임상적으로나 실험적으로 본 처방은 해열, 진정, 항염증, 이뇨, 항균, 이담작용, 간보호, 지혈 그리

고 혈압강화작용이 확인되었으나 맛이 쓰고 차가운 성질을 가져 장기간 복용은 삼가야 한다²⁾.

최근연구로 Lim³⁾은 龍膽瀉肝湯의 물 추출물이 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 IL-6과 NO생성을 억제함으로써 Gram-negative세균감염의 치료에 역할을 할 수 있을 것이라고 주장하였다. 또한 Chou⁴⁾는 만성간질환에 활용되어온 龍膽湯이 간암 환자에 유효할 것으로 보고 5가지 개별약물로부터 분리한 성분으로 세포독성을 실험한 바, 텍사에서 분리한 alisol B acetate 와 시호에서 분리된 saikosaponin-d가 사람 간암 세포주인 Hep3B의 apoptosis를 유도한다고 하였다.

임상연구로 Jin⁵⁾은 36명의 만성 골반염 환자에게 침, 뜸 그리고 龍膽瀉肝湯을 함께 투여하여 치료효과가 있음을 밝혔다. 그러나 龍膽瀉肝湯이 간암세포에서 어떤 분자적 작용기작을 통해 작용하

는지에 대한 연구는 미흡하였다. 따라서 본 연구에서는 龍膽瀉肝湯이 사람의 간암 세포주인 HepG2의 세포사멸 유도에 어떠한 영향을 주는지를 검토한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 본초학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 龍膽瀉肝湯의 구성 및 한 貼의 비율 및 총량은 Table. 1과 같다. 약재 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 여과하여 농축한 것을 동결 건조하여 분말을 얻어 실험에 사용하였다. 이 분말은 세포배양액인 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM)에 녹여 사용하였다.

Table 1. Composition and contents of Yong-dam-sa-gan-tang (YST)

약재	학명	사용량
용담초	Gentianae Radix	30 g
황금	Scutellariae Radix	45 g
치자	Gardeniae Fructus	45 g
택사	Alismatis Rhizoma	45 g
목통	Akebiae Caulis	45 g
차전자	Plantaginis Semen	45 g
생지황	Rehmanniae Radix	45 g
당귀	Angelicae Gigantis Radix	15 g
시호	Bupleuri Radix	30 g
감초	Glycyrrhizae Radix	30 g
총량		375 g
수율		17.6 %

2) 시 약

XTT assay용 kit는 Amersham Pharmacia Biotechnology사 (Arlington Heights, USA)에서 구

입하였고, Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서, 배양조는 Corning사 (Rochester, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고 NP-40, CAPS, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-Bax, anti-Bak, anti-JNK/SAPK, anti-p38은 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서, anti-Bcl-2와 anti-cytochrome c는 BD PharMingen사 (San Jose, USA)에서, anti-PARP, anti-P-MEK1/2, anti-P-Raf, anti-P-ERK1/2, anti-P-JNK/SAPK, anti-P-p38, anti-beta-actin은 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이 상으로 사용하였다.

2. 방 법

1) 세포배양

HepG2 (human liver cancer cell line, KCLB)는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다.

2) XTT assay

龍膽瀉肝湯이 HepG2에 대한 세포독성을 갖는지 알아보기 위해 XTT assay 방법을 이용하였다. Well당 1×10⁵개의 cell을 96 well plate에 분주하고 serum free media로 16시간 starvation 시킨 후, 龍

膽瀉肝湯을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Well당 100 μ l의 XTT labeling mixture (5 ml XTT labeling reagent + 0.1 ml electron coupling reagent)를 처리하여 4시간 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 썬 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) Trypan Blue Exclusion Assay

60 mm 배양조에 1×10^6 cells/ml로 세포를 심고 serum free media로 16시간동안 starvation 시킨 후, 龍膽瀉肝湯을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리한 후 원심 분리하여 세포들을 모아서 trypan blue dye (0.4%)로 염색하여 hemacytometer를 사용해서 생존한 세포의 수를 counting하였다.

4) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS : 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 수세한 후 lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간동안 반응시킨 후 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 수세

한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 검증하였다. 각 시료의 단백질 정량은 bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

3. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 편차로 표시하고 유의성 검증은 Sigma Plot (Window용 version 7.0)을 이용하여 student's *t*-test를 실시하였다.

III. 實驗結果

1. 龍膽瀉肝湯이 HepG2와 Chang 세포의 증식에 미치는 영향

龍膽瀉肝湯이 간암 세포주인 HepG2와 정상 간 세포주인 Chang의 증식에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보기 위하여 다양한 농도 (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml)로 24시간 처리하여 XTT assay 와 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. XTT assay 결과, HepG2 세포의 경우에는 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml의 농도에서 각각 88.7%, 62.4%, 55.7%, 32.1%까지 증식이 억제되었고, Chang 세포는 0.7, 1 mg/ml의 농도에서 각각 89.2%, 75.3%까지 증식이 저해되었으나 낮은 농도의 龍膽瀉肝湯을 처리했을 때에는 세포의 증식에 큰 영향을 받지 않았다 (Fig. 1(A)). Chang 세포의 증식에는 거의 영향이 없고 HepG2 세포의 증식을 거의 50%까지 억제하는 농도 (IC₅₀)인 0.7 mg/ml을 처리하여 시간별로 세포의 증식에 어떠한 변화가 있는지 조사하였다. 그 결과, Fig. 1(B)에서 보듯이 12시간, 24시간 처리했을 때 HepG2 세포의 증식이 각각 77.2%, 53.9%까지 억제되었다. Trypan blue 염색을 통해 세포 생존율을 측정해 본 결과, 龍膽瀉肝湯의 농도에 의존적인 세포 생존율의 감소가 관찰되었다 (Fig. 2).

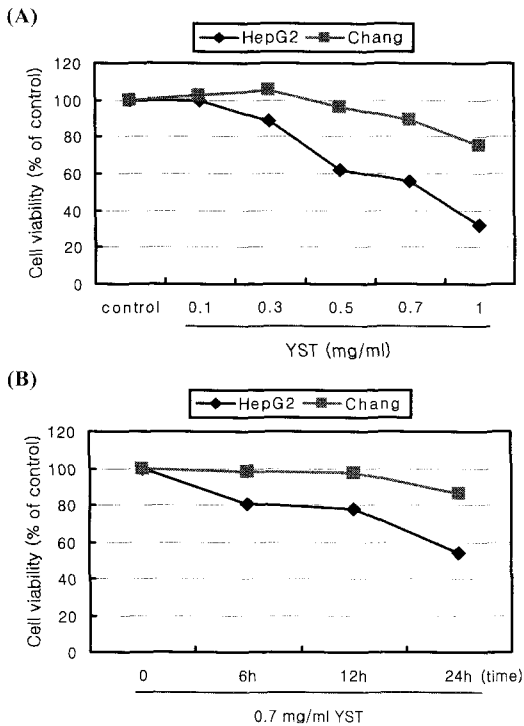


Fig. 1. Effect of Yong-dam-sa-gan-tang (YST) on the cell proliferation of the HepG2 cells.

HepG2 cells (1×10^5 cells/plate) were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of YST for 6 h, 12 h and 24 h. Cell viability was measured by XTT assay as described in materials and methods. Data were chosen from six independent triplicate experiments.

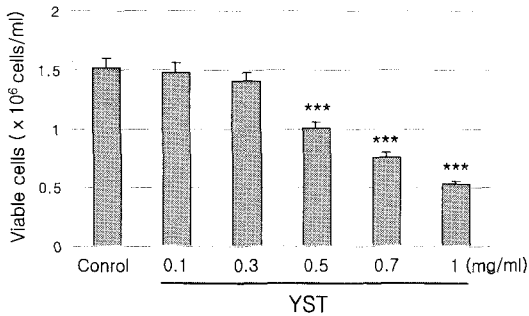


Fig. 2. Effect of YST on the cell viability of the HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of YST for 24 h. After

24 h, the cells were stained with trypan blue (0.4%, w/v) for 5 min at room temperature before the cells were examined under the microscope. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion, and the results were expressed as the % of control. Data were chosen from six independent triplicate experiments. Values are mean \pm S.D. *** : P value < 0.001

2. 龍膽瀉肝湯에 의한 HepG2의 세포사멸

龍膽瀉肝湯에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 HepG2 세포에 농도별로 처리하여 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. Apoptosis 과정의 지표가 되는 PARP (poly(ADP-ribose) polymerase)와 caspases의 발현 양상을 각각의 항체를 사용하여 western blotting을 수행하였다. 그 결과, Fig. 3에서 보듯이 처리한 龍膽瀉肝湯의 농도가 증가함에 따라 procaspase-3, -8, -9의 발현이 점차 감소하는 것으로 나타났고, 또한 0.3 mg/ml의 농도에서 PARP의 cleavage가 관찰되기 시작하였으며 그 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 cleavage가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

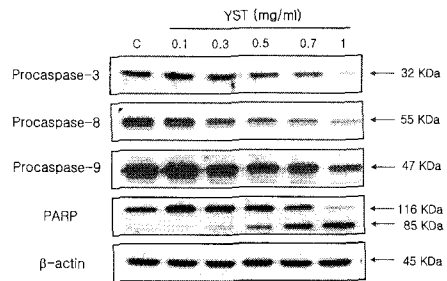


Fig. 3. Apoptotic effect YST in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of YST for 24 h. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 10% SDS-PAGE. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase-3, -8 and -9 were detected using anti-procaspase-3, -8 and -9 by Western blot. β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

3. Mitochondrial pathway를 통한 세포사멸

龍膽瀉肝湯에 의해 유도되는 세포사멸이 세포

내 어떠한 신호전달을 통해 일어나는지 알아보기 위하여 세포사멸의 경로 중 하나인 mitochondrial apoptosis에 관여하는 Bcl-2 family의 발현양상과 mitochondria로부터 세포질로 cytochrome c가 방출되는 정도를 각각의 항체를 사용한 western blotting을 통해 알아보았다. 그 결과, 농도가 증가할수록 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출량이 점차 증가하였다. 또한 Bcl-2의 감소와 Bax의 증가가 관찰되었으며 Bak의 발현에는 거의 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 이러한 결과로 보아, 龍膽瀉肝湯에 의한 세포사멸은 mitochondrial pathway를 경유하는 것으로 볼 수 있다.

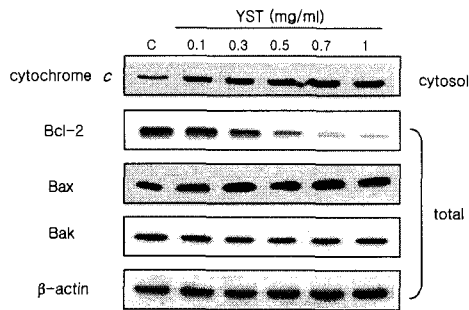


Fig. 4. Effect of YST on cytochrome c release from mitochondria to cytosol and the expression of Bcl-2, Bax and Bak in HepG2 cells.

Cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of YST for 24 h. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions. Cytosolic fractions were isolated and analyzed by Western blot using an anti-cytochrome c antibody. b-actin levels were used as internal markers for loading variation.

4. 龍膽瀉肝湯이 AKT 활성화와 Ras/Raf/MEK/ERK pathway에 미치는 영향

AKT는 serine/threonine kinase로서 세포의 생존, 분화, 증식, 성장, glycogen 대사과정 등 많은 생물학적 반응에 관여하는 효소로서 insulin이나 여러 성장인자들에 의해 활성화된다. 또한

Ras/Raf/MEK/ERK pathway는 여러 성장인자 수용체들의 downstream으로 세포의 생존과 성장, 분화, 형질전환 등을 조절하는데 필수적인 신호전달체계이다. 龍膽瀉肝湯을 처리한 경우 AKT 활성화와 Ras/Raf/MEK/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 그 결과, 龍膽瀉肝湯의 농도에 의존적으로 P-AKT, P-Raf, P-MEK1/2, P-ERK1/2의 발현이 감소하였다 (Fig. 5(A))

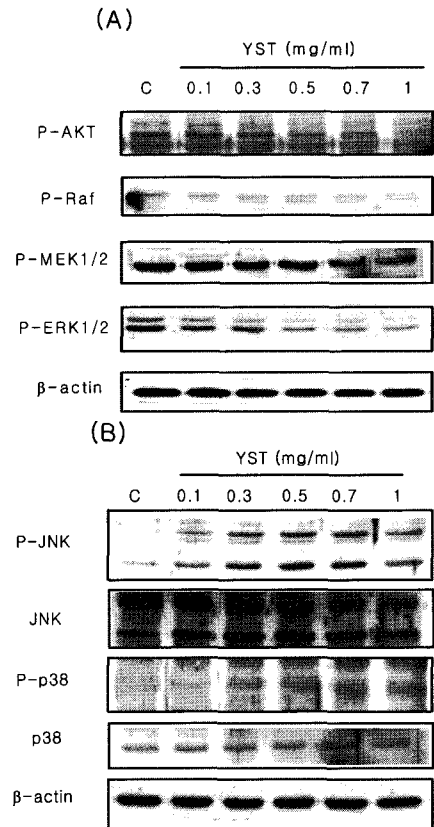


Fig. 5. Effect of YST on AKT, Ras/Raf/MEK/ERK pathway, and MAP kinases expression in HepG2 cells.

Cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of YST for 24 h. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 10% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions. b-actin levels were used as internal markers for loading variations.

5. 龍膽瀉肝湯이 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성화에 미치는 영향

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. 龍膽瀉肝湯 처리시, MAP kinase의 활성화에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위해 anti-P-ERK1/2, anti-P-JNK1/2, anti-P-p38을 이용하여 western blot을 수행하였다. 그 결과, P-ERK1/2가 농도 의존적으로 감소 (Fig. 5(A))하였고, P-JNK1/2와 P-p38 MAP kinase는 점차 증가였다 (Fig. 5(B)). 龍膽瀉肝湯은 MAP kinases의 발현 자체에는 변화 없이 activity의 감소를 유도하는 것으로 나타났다.

6. MAP kinases의 활성화에 따른 세포사멸의 변화

龍膽瀉肝湯 처리시 MAP kinases의 활성화에 변화를 나타내는 것으로 보아 이러한 활성화의 변화가 세포의 사멸유도와 관련이 있을 것으로 생각되었다. 이에 각각의 MAP kinase의 activator 또는 inhibitor를 처리한 후 龍膽瀉肝湯에 의해 유도되는 HepG2 세포의 증식변화와 세포사멸에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. 5 μ M SOV (sodium orthovanadate : Na_3VO_4)와 龍膽瀉肝湯을 함께 처리하여 龍膽瀉肝湯에 의한 ERK1/2 활성화의 감소를 저해시켰을 경우, PARP cleavage가 감소하였고 세포증식의 저해가 억제되었다. p38 MAP kinase의 특이적 저해제인 SB203580과 JNK의 특이적 저해제인 SP600125를 각각 龍膽瀉肝湯과 함께 처리하여 龍膽瀉肝湯에 의해 증가되는 p38과 JNK의 활성을 감소시킨 경우에도 PARP cleavage가 감소하였고 세포증식의 저해가 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 이러한 결과들로 보아, 龍膽瀉肝湯에 의해 유도되는 MAP kinase 활성화의 변화가 HepG2 세포의 apoptosis에 직접적으로 영향을 주는 것으로 볼 수 있다.

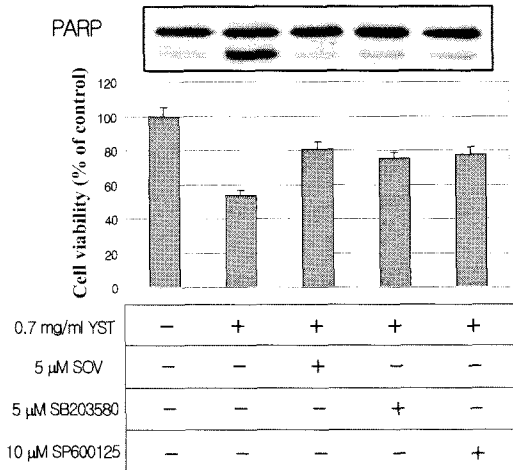


Fig. 6. Effect of activator or inhibitors of MAP kinases on YST-induced apoptosis and cell proliferation of HepG2.

HepG2 cells were cotreated with YST and 5 μ M SOV (ERK activator), 5 μ M SB203580 (specific inhibitor of p38), and 10 μ M SP600125 (specific inhibitor of JNK) for 24 h. The cleavages of PARP were analyzed by Western blot. Cell viability was measured by XTT assay.

IV. 考 察

龍膽瀉肝湯은 『太平惠民和劑局方』에서 인용되어 『醫方集解』에 자세히 언급된 처방으로, 肝膽의 實火를 瀉하고 下焦濕熱을 清하는 효능이 있다. 구성약물 중 龍膽草가 主藥의 효능을 가지고 있으며, 黃芩, 梔子是 苦寒燥濕하는 작용으로 主藥을 보조하며, 澤瀉와 木通 그리고 車前子是 병리적인 火熱을 인도하여 소변으로 배출시킨다. 한편, 肝은 藏血하는 곳이므로 肝熱이 있으면 陰血이 상하기 쉬우므로 當歸尾와 生地黃으로 活血하고 養血益陰시켜야 한다. 그리고 肝氣가 舒展되게 疏肝理氣약물인 柴胡를 가하고, 甘草로서 모든 약물을 조화시키는 것이 본 처방이 제기한 한의학적인 약리기전이다^{6,7)}. 따라서 본 처방은 분명하게 肝에서 발생한 병리적 현상을 제거하는 것을 목표로 만들

어진 처방임을 알 수 있다. 임상에서는 급성황달 형간염, 급성담낭염, 급성신우신염, 급성방광염, 뇨도염, 외음염, 비염, 그리고 고혈압 등에 肝膽實火와 濕熱을 폭넓게 해석하여 다양한 현대질병에 응용되고 있다⁸⁾.

한의학에서의 간암에 대한 변증은 크게 2가지로 나눌 수 있는데, 하나는 氣血瘀滯型이며, 다른 하나는 熱毒內盛型이다⁹⁾. 치료는 疏肝理氣, 活血化瘀, 清熱利濕 등의 攻法이 주를 이루고, 益氣健脾, 疏肝健脾 등 脾와 肝을 補하는 補法이 병용되는 경우가 가장 많다¹⁰⁾. 龍膽瀉肝湯은 이러한 병증치료에 모두 적용될 수 있는 처방중의 하나이다. 따라서 간암치료에 활용될 수 있는 처방을 우선 세포수준에서 분자적 작용기작을 실험적으로 규명하는 것은 중요한 의미가 있다고 판단된다.

최근 龍膽瀉肝湯 관련실험으로는 한편 Lee¹¹⁾은 생쥐대식세포에서 rIFN- γ 와 龍膽瀉肝湯에 의한 NO생성의 상승효과는 龍膽瀉肝湯으로 유도된 TNF- α 의 분비 의존적으로 나타난다고 하여 바이러스로 인한 질환과 각종 종양 및 염증의 초기단계인 I, II기의 치료에도 응용할 수 있을 것으로 주장하였다. 서¹²⁾는 龍膽瀉肝湯은 항알레르기 효과가 별로 없는 것으로 보고, 금은화 연교를 가한 龍膽瀉肝湯 가미방은 제 1형 알레르기반응에 효과가 있어 기관지천식, 알레르기성 비염 그리고 두드러기 등에 응용될 수 있음을 시사하였다. 손¹³⁾은 단순포진바이러스로 유발한 베체트병 마우스 모델에서 가미청혈보혈탕과 가미龍膽瀉肝湯을 colchicine과 함께 투여한 바 단독투여보다 증상이 호전되었으며 이때 interleukin-4의 발현이 증가하였다고 보고하였다. 한편 강¹⁴⁾은 본 처방이 슬관절염 환자의 통증, 열감, 부종 등을 감소시킴을 보고하였다. 그리고 김¹⁵⁾은 龍膽瀉肝湯가미가 자발성고혈압흰쥐의 혈압을 감소시킨다고 하였다. 박¹⁶⁾은 茵陳이 비교적 PLC와 Hep3B에 대하여 항종양효과가 있고, 柴胡는 HepG2에 대해 보다 효과적이고, 항암제 중 MMC와의 상승적 작용이 뚜렷하여 한약과

항암제와의 병용투여 가능성을 제시하였다. Siu¹⁷⁾는 전통적으로 동양의학에서 만성 골수성 백혈병에 이용되어온 비소화합물인 arsenic trioxide가 인간간암세포주인 HepG2의 증식을 억제하고 caspase-3 활성을 통한 apoptosis를 유도한다고 하였다.

이에 본 연구에서는 龍膽瀉肝湯이 사람의 간암세포주인 HepG2의 세포사멸 유도에 어떠한 영향을 주는지를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

먼저, 龍膽瀉肝湯이 HepG2와 Chang 세포에 대해 세포독성을 갖는지 알아보기 위하여 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. 그 결과, Chang 세포에서는 크게 영향을 주지 않았으나, 간암 세포주인 HepG2에서는 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소되었다 (IC50=0.7 mg/ml). 또한 0.7 mg/ml의 농도를 처리한 경우 시간에 의존적으로 HepG2 세포의 생존율의 감소가 관찰되었다. 龍膽瀉肝湯에 의한 세포사가 apoptosis에 의해 유도되는 것인지 알아보았다. Apoptosis란, 능동적이고 자발적인 반응으로 programmed cell death라고 표현하기도 한다. 1972년 Kerr 등이 쥐 유방암 세포가 죽는 것을 관찰한 후 이를 shrinkage necrosis라고 표현하였는데, 그 후 그리스어인 apo (off)와 ptosis (falling)의 합성어로서 apoptosis라고 처음 명명하게 되었다. 정상적인 조직에서 apoptosis의 조절에 이상이 생기게 되면 세포의 증식과 사멸의 균형이 깨어지게 됨으로써 악성 종양으로 변형된다¹⁸⁻²⁰⁾. 따라서 암세포의 apoptosis를 인위적으로 유도함으로써 세포의 증식을 조절할 수 있다. 이에 龍膽瀉肝湯에 의해 apoptosis가 유도되는 지 알아보기 위하여 관련 단백질들의 발현양상을 조사하였다. 그 결과, 농도가 증가함에 따라 procaspase-3, -8, -9의 발현이 점차 감소하였고, PARP의 cleavage가 점차 증가하는 것을 볼 수 있었다. Apoptosis가 일어나는 세포의 경우 mitochondrial membrane depolarization이 생

기고, mitochondria내의 cytochrome *c*가 세포질로 방출된다^{21,22}. 龍膽瀉肝湯의 농도가 증가할수록 mitochondria로부터 방출되는 cytochrome *c*의 양이 점차 증가하였고, anti-apoptotic Bcl-2의 감소와 anti-apoptotic Bax의 증가가 관찰되는 것으로 보아 mitochondrial pathway를 통해 apoptosis가 유도된다는 것을 알 수 있었다.

AKT는 serine/threonine kinase로서 세포의 생존, 분화, 증식, 성장, glycogen 대사과정 등 많은 생물학적 반응에 관여하는 효소로서 insulin이나 여러 성장인자들에 의해 활성화된다. 또한 Ras/Raf/MEK/ERK pathway는 여러 성장인자 수용체들의 downstream으로 세포의 생존과 성장, 분화, 형질전환 등을 조절하는데 필수적인 신호전달체계이다²³. 龍膽瀉肝湯을 처리한 경우 AKT 활성 및 Ras/Raf/MEK/ERK pathway와 MAP kinase에 어떠한 영향을 주는 지 알아 본 결과, 龍膽瀉肝湯의 농도에 의존적으로 P-AKT, P-Raf, P-MEK1/2, P-ERK1/2의 발현이 감소하였고, P-JNK1/2와 P-p38 MAP kinase는 점차 증가하였다. MAP kinases의 활성화에 변화가 세포사멸유도와 관련이 있을 것으로 생각되었다. 이에 각각의 MAP kinase의 activator 또는 inhibitor를 처리한 후 龍膽瀉肝湯에 의해 유도되는 HepG2 세포의 증식변화와 세포사멸에 미치는 영향을 알아보았다. ERK1/2의 activator와 p38과 JNK의 inhibitor를 처리하였을 때 龍膽瀉肝湯에 의해 유도되는 apoptosis가 감소하였고 세포의 증식률의 감소도 저해되는 것으로 나타났다.

이 같은 결과들로 보아, 龍膽瀉肝湯은 사람 간암 세포주인 HepG2의 증식을 저해하고 mitochondrial pathway를 통한 apoptosis를 유도할 수 있으며, AKT의 활성화와 Raf/MEK/ERK의 활성을 저해함으로써 apoptosis에 영향을 줄 것으로 생각된다. 또한 MAP kinases 활성의 변화가 龍膽瀉肝湯에 의한 apoptosis 유도와 연관되어 있을 것으로 보인다.

이러한 龍膽瀉肝湯의 항암활성으로 보아 간암

의 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로 龍膽瀉肝湯의 작용기전에 대한 심도 있는 연구와 *in vivo*상의 연구도 함께 수행되어야 할 것이다.

V. 結 論

龍膽瀉肝湯에 의한 사람 간암 세포주 HepG2의 세포사멸 유도와 그 mechanism에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 龍膽瀉肝湯에 의한 세포의 증식 억제 효과를 확인하기 위해 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 간암 세포주인 HepG2는 龍膽瀉肝湯의 농도에 의존적으로 증식이 저해되었고, 정상 간세포주인 Chang은 증식률에 거의 변화가 없었다. 0.7 mg/ml (IC₅₀)의 龍膽瀉肝湯을 HepG2 세포에 처리하여 시간에 따른 증식의 변화를 관찰한 결과, 12시간, 24시간째에 각각 77.2%, 53.9%까지 억제되었다. Trypan blue 염색을 통해 세포 생존율을 측정해 본 결과에서도 처리한 龍膽瀉肝湯의 농도에 의존적인 세포 생존률의 감소가 관찰되었다.
2. 龍膽瀉肝湯에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 처리한 龍膽瀉肝湯의 농도에 의존적으로 procaspase-3, -8, -9의 발현이 감소하였고 PARP의 cleavage가 관찰되었다.
3. Mitochondrial pathway에 관여하는 Bcl-2 family의 발현양상과 mitochondria로부터 세포질로 방출되는 cytochrome *c*의 양을 조사한 결과, 龍膽瀉肝湯의 농도가 증가함에 따라 세포질내의 cytochrome *c*의 양이 증가하였고, anti-apoptotic Bcl-2의 발현이 감소하였고 pro-apoptotic Bax의 발현이 증가하였다. 반면, Bak의 발현은 변화가 없었다.

4. 龍膽瀉肝湯이 AKT 활성과 Ras/Raf/MEK/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 추출물의 농도에 의존적으로 AKT와 Raf/MEK/ERK 활성이 감소했다.
5. 龍膽瀉肝湯이 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성에 미치는 영향을 알아본 결과, 龍膽瀉肝湯의 농도에 의존적으로 ERK1/2의 활성이 감소하였고 p38과 JNK의 활성이 증가하였다.
6. 龍膽瀉肝湯 처리시 나타나는 MAP kinases의 활성에 변화가 세포사멸유도와 관련이 있을 것으로 생각되었다. 이에 각각의 MAP kinase의 activator 또는 inhibitor를 처리한 후 龍膽瀉肝湯에 의해 유도되는 HepG2 세포의 증식변화와 세포사멸에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. ERK1/2의 activator와 p38과 JNK의 inhibitor를 처리하였을 때 龍膽瀉肝湯에 의해 유도되는 apoptosis가 감소하였고 세포의 증식률의 감소도 저해되었다.

이 같은 결과로 보아, 龍膽瀉肝湯은 사람 간암 세포주인 HepG2의 증식을 저해하고 mitochondrial pathway를 통한 apoptosis를 유도할 수 있으며, AKT의 활성과 Raf/MEK/ERK의 활성을 저해함으로써 apoptosis에 영향을 줄 것으로 생각된다. 또한 MAP kinases의 활성이 龍膽瀉肝湯에 의한 apoptosis 유도와 연관되어 있을 것으로 보인다

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호:R13-2005-013-01000-0).

참고 문헌

1. Yang Yuzhou.(2001) Chines Medical Formulae. pp.142-143, People' medical publishing house, Beking.
2. Hu X, Wang L, Yan S et. al. (1999) Prescriptions of Traditional Chinese Medicine. pp. 126-127, Publishing House of Shanghai College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai.
3. Lim JH et al. Inhibitory effect of Yongdamsagantang water extract on IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide- activated RAW 264.7 cells. *Oriental Pharmacy and Experimental medicine* 2007;7:321-329.
4. Chou CC et al. Pharmacological evaluation of several major ingredients of Chinese herbal medicines in human hepatoma Hep3B cells. *European Journal of Pharmaceutical Science* 19(2003) 403-412.
5. Jin Y. A combined use of acupuncture, moxibustion and long dan xie gan tang for treatment of 36 cases of chronic pelvic inflammation. *J Tradit Chin Med.* 2004;24(4):256-8.
6. 김상찬 외, 방제학, 영림사, 서울, pp.193-194, 1999.
7. 이상인 박선동, 한방임상처방학, 서울, 영림사, p.169, 1998.
8. 김상찬 외, 방제학, 영림사, 서울, pp.193-194, 1999.
9. 전국한의과대학 간계내과학교수공저. 간계내과학. 동양의학연구원, pp.274-280, 1989.
10. 구자권, 김성훈, 간암의 동서의학적 비교연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집 제5권 제1호, pp.1-25, 1996.
11. Lee EH et al. Activation of inducible nitric oxide synthase by Yongdam-Sagan-Tang in mouse peritoneal macrophages. *Journal of*

- Ethnopharmacology 60 (1998) pp.61-69.
12. 서만선 외. 龍膽瀉肝湯 및 龍膽瀉肝湯가미방의 항 알레르기에 관한 실험적 효과. 대한한방소아학회지 제5권 제1호. 1991. pp.15-27.
 13. 손성향 외. 베체트병 마우스 모델에서 증상의 호전에 대한 쿨키친과 한약(가미청혈보혈탕 또는 가미龍膽瀉肝湯)의 복합투여효과. 대한한의학회지 22(2) 2001 pp.102-108.
 14. 강대희 외. 龍膽瀉肝湯을 투여한 화농성 슬관절염 환자의 치험 1례. 동의생리병리학회지 17(6) 2003 pp.1547-1551.
 15. 김의태 외. 龍膽瀉肝湯 및 조구등, 하고초, 차전자 가미방이 고혈압에 미치는 영향. 동의병리학회지 제5권 1990 pp.15-23.
 16. 박경식 외. 생약의 간암세포에 대한 항종양효과와 항암제와의 상승작용. 대전대학교한의학연구소논문집 제4권 제1호. 1995. pp.211-223.
 17. Siu KP, Chan JY, Fung KP. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis. Life Sci. Jun;71(3): 275-85, 2002.
 18. Guseva NV, Taghiyev AF, Rokhilin OW, Cohen MB. Death receptor-induced cell death in prostate cancer. J Cell Biochem. Jan;91(1):70-99, 2004.
 19. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. Adv Cancer Res. Aug;94(1):143-196, 2005.
 20. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. Int J Low Extrem Wounds. Sep;4(3):138-144, 2005.
 21. Xi L, Chen G, Zhou J, Xu G, Wang S, Wu P, Zhu T, Zhang A, Ma D. Inhibition of telomerase enhances apoptosis induced by sodium butylate via mitochondrial pathway. Apoptosis. 11(5):789-798, 2006.
 22. Tamura S, Hanada M, Ohnishi M, Katsura K, Sasaki M, Kobayashi T. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. Eur J Biochem. 269(4):1060-1066, 2002.
 23. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochim Biophys Acta. Aug;1773 (8):1263-1284, 2007.