

자궁경부암 세포주에서 활성산소종의 영향에 의한 Apoptosis를 통하여 세포성장을 억제하는 Cisplatin과 Berberine의 상승효과

조해중*

원광대학교 의과대학 산부인과

Synergistic Effect of Cisplatin and Berberine on Inhibition of Cell Growth and Induction of Apoptosis involving Oxidative Stress in HeLa Cells

Hae Joong Cho*

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Wonkwang University

Cisplatin is a chemotherapeutic drug which is widely used for cancer therapy including cervical cancer. The purpose of this study is to elucidate synergistic effect of Cisplatin and Berberine on the apoptosis of HeLa cells and to determine whether oxidants are formed as part of apoptotic process. Apoptotic death of HeLa cells by cisplatin and berberine was confirmed by chromatin condensation of HeLa cells and flow cytometric analysis of intracellular ROS(reactive oxygen species) production. In MTT assay, Cell viability was decreased and enhanced ROS generation in combination of cisplatin and berberine significantly, as compared with cisplatin only. Synergistic effect of Cisplatin and Berberine on the inhibition of cell growth by apoptosis was clearly observed and ROS may play an important role in apoptosis. This effect suggest the possibility lowering the concentration of chemotherapeutic drugs, which alleviate the side effect of drugs.

Key words : Berberine, Cisplatin, Synergistic effect, Apoptosis, ROS

서 론

항암치료의 가장 중요한 논점 중 하나는 정상세포의 손상 없이 선택적으로 암세포를 사멸할 수 있느냐는 것이고 최근 다양한 방법으로 부분적으로 선택적 세포사멸을 할 수 있게 되었다. 그러나 임상적으로 항암제가 암세포만을 선택적으로 사멸시키기에는 한계가 있어 항암치료 시 정상세포가 손상이 되고 결과적으로 심각한 부작용이 발생되기 때문에 항암제의 임상적 효과가 한계가 있다. 이러한 부작용을 최소화 하면서 암을 치료하기 위해 종양학자들은 항암제의 병합요법을 개발하고 있다.

자궁경부 세포진검사, 자궁경부확대 촬영술등 조기진단검사의 발달과 최근 자궁경부암을 일으키는 바이러스인 유두인종 바이러스의 백신의 개발로 자궁경부암의 발생률이 많이 낮아질 거라 예상되지만 2005년에 발표된 보건복지부의 한국인 암 등록

조사자료 분석보고서에 의하면 1999년에서 2001년 까지 새로이 등록된 자궁경부암이 전체 여성 암의 9.8%를 차지하여 위암, 유방암, 대장암에 이어 4위를 차지하고 있다.¹⁾ 자궁경부암의 치료는 근치적 자궁절제술과 수술 후 항암치료와 방사선치료 등이 있는데, 대표적인 항암치료제로는 Higby 등에 의해 임상적으로 자궁경부암 치료에 효과가 있다고 보고가 있는 후 자궁경부암에 단독 또는 다른 항암제와 병행하여 사용되고 있는 Cisplatin이 있다.

세포고사는 생리적인 세포의 자연사로 세포가 다양한 자극에 대한 반응들로 선택적으로 유발되며 미토콘드리아가 세포 자연사의 중요한 조절자이다.²⁾ 미토콘드리아에서 생성된 활성화 산소종(ROS)이 세포사에 중요한 역할을 하는데 ROS는 정상 세포 산화 과정에서의 부산물로 세포고사의 신호를 시작하는데 관련하여 세포고사의 과정을 조절하는 것으로 생각된다.³⁾

Berberine은 *Hydrastis canadensis*(goldenseal), *Cortex phellodendri*(Huángbái)와 *Rhizoma coptidis*(Huánglian)과 같은 한약제로부터 추출된 alkaloid계 천연약제로서 DNA와 단백질 합성을 저해, 세포주기의 중지 등 많은 약리적인 작용으로

* 교신저자 : 조해중, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : chohj69@hanmail.net, · Tel : 011-650-8192

· 접수 : 2007/07/03 · 채택 : 2007/08/08

antibacterial activity⁴⁾, anti-inflammatory activity⁵⁾, anti-cancer action⁶⁾을 나타내 오랫동안 다양한 질병 치료에 이용되어지고 있다. 최근에는 berberine⁶⁾ topoisomerase I과 II의 독성효과와 double helical DNA에 강하게 결합하여 DNA 복제과정에 영향을 미쳐 항암효과가 있다고 보고되고 있다⁷⁾.

Cisplatin은 난소암, 폐암, 방광암, 자궁경부암에 효과적인 항암치료제로 알려져 있는데, 작용기전은^{8,9)} DNA와 결합하여 cisplatin-DNA의 결합물을 형성하여 G1, S, 혹은 G2/M에 작용하여 세포주기를 억제하거나 ROS 생성을 촉진하여 세포독성을 나타낸다. 그러나 정상세포의 성장도 동시에 억제하기 때문에 고용량을 사용할 경우 호중구 감소, 신독성, 오심과 구토등의 부작용으로 암환자들의 순응도가 떨어진다. 따라서 부작용을 감소하기위해 저용량으로도 항암치료 효과를 얻기 위해 많은 연구가 진행되어왔다. 특히 두 종류 이상의 항암제를 저용량으로 함께 투여함으로서 부작용을 줄이고 서로 다른 기전에 의해 항암효과를 갖는 연구들이 진행 중에 있다¹⁰⁾.

이번 연구의 목적은 berberine과 cisplatin의 병합요법이 자궁경부암세포의 고사에 대한 화학감수성의 증가에 미치는 영향을 연구하였다. 또한 병합요법시 화학감수성의 증가에 관여하는 기전을 규명하기위해 mitochondrial membrane potential 변화와 ROS 생성을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

cisplatin은 sigma제품을 사용하였고, 세포배양에 필요한 RPMI1640, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS)은 Gibco, BRL사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 세포 배양용기(48-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 제품을 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), NAC(N-acetyl-L-cysteine), GSH(Glutathione, Berberine, L-NAME, 는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA), DCF-DA, Hydroethidium(HE), 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide DiQC6(3)은 Molecular Probes (Eugene, OR)로부터 구입하였다.

2) 사람의 자궁경부암 세포인 HeLa 세포주 배양

사람의 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포를 한국 세포주 은행에서 분양받아 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI1640(Gibco BRL, England) 배양액으로 배양하였으며, 2~3일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 여러 농도의 cisplatin과 berberine 등을 처리한 후 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다.

2. 방법

1) 세포 생존율을 측정

세포 생존율의 측정은 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양판(48-well plate)에 세포(1×10^5 세포 수/ml)를 분주하여 16시간

이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시켰으며, 이후 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 50 μl씩 첨가하였다. 4시간 후 상층액을 제거한 다음 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시킨 후 여기에 500 μl의 DMSO 용액으로 충분히 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 545nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시 하였다.

2) DAPI staining

세포의 핵산 분절현상을 확인하기 위해 DAPI(4,6-diamidine-2, phenylindole dihydrochloride) staining을 이용하여 핵산을 염색하였다. 먼저 4% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 세척하고 1μg/ml DAPI로 5분 염색한 후에 다시 PBS로 세척하여 330-380 nm 파장에서 형광현미경으로 관찰하였다.

3) 세포주기 분석

세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 propidium iodide (PI)로 DNA를 염색한 후에 flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. HeLa 세포에 cisplatin 혹은 berberine을 각기 처리한 후 24 시간 후에 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척된 세포는 PBS를 300 ul를 넣고, 세포의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20 ug/ml PI, 200 ug/ml RNase)을 600 ul를 넣어 20분간 반응 시킨 후 1×10^6 세포를 flow cytometry로 sub-G0/G1으로 나타나는 세포고사를 분석하였다. 얻어진 정보의 분석은 Cell Quest software(Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

4) 미토콘드리아 막전위 측정

Cisplatin과 berberine에 의해서 각기 처리된 실험군에 40 nM DiQC6(3)을 처리하여 37°C에서 30분간 배양한 후 세포를 PBS(pH 7.4)로 세척하고 1% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 세포를 수확, 다시 PBS로 세척하여 즉각적으로 Flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences)를 이용하여 형광을 측정하였다.

5) 세포내 ROS 생성의 측정

Cisplatin과 berberine에 의한 세포내 활성화 산소의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA;sigma)와 hydroethidium(HE ; Molecular probe)로 반응시킨 후 측정하였다. 비형광물질인 DCFH-DA는 세포내 hydrogen peroxide 와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. 또한 파랑색의 hydroethidium은 supeorixde 존재 시 산화되어 붉은 색의 형광을 발하게 된다. 두 형광의 정도는 생성되는 세포내 활성화 산소 양에 비례하여 증가한다. 각 시약의 처리 후 세포를 수확하기 전에 5 uM DCF-DA 혹은 5uM hydroethidium을 처리하여 37°C에서 30분간 배양한 후 PBS(pH 7.4)로 세척하고 1% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 세포를 수확, 다시 PBS로 세척하여 Flow cytometry(FACSCalibur, BD Biosciences) 형광을 측정하였다.

6) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이고, 실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며, P-value

가 최대치 0.05($P<0.05$)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. Berberine과 cisplatin을 병합 투여 시 자궁경부암 세포주의 증식을 뚜렷하게 억제시켰다.

자궁경부암세포인 HeLa 세포에 대한 cisplatin과 berberine 처리에 의한 세포독성을 조사하였다. Cisplatin과 berberine을 다양한 농도로 24시간 처리한 후 HeLa 세포의 생존율을 MTT방법으로 측정하였다(Fig. 1a). Cisplatin과 berberine 모두 HeLa 세포에서 대조군과 비교하여 현저하게 농도의존적인 세포독성을 나타낸다. 세포의 생존율은 Cisplatin과 berberine을 각각 50 uM, 100 ug/ml 농도로 24시간 단독 처리 시 각각 60%, 48% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 또한 본 연구에서는 항암제의 독성을 줄이기 위해서 저 농도의 cisplatin과 berberine을 병합처리하여 HeLa 세포주의 사멸에 대한 감수성의 효과를 확인하고자 cisplatin 5 uM과 berberine 50 ug/ml를 병합처리하여 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 1b). 이러한 병합처리의 세포 사멸효과 상승은 단독 처리 군에 비하여 뚜렷한 사멸효과를 보였다.

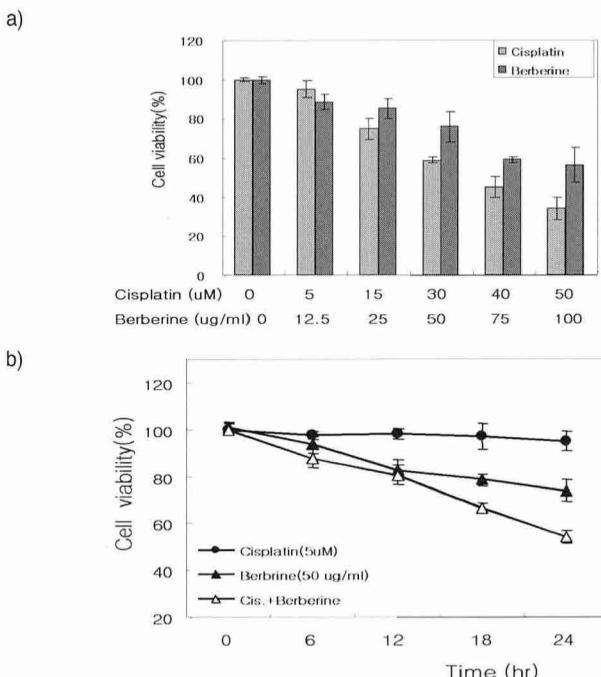


Fig. 1. Antiproliferative effect of cisplatin in combination with berberine on HeLa cells. a) cell were treated with various concentrations of cisplatin and berberine and incubated for 24 hr. b) cell were treated with cisplatin(5 uM) or berberine (50 ug/ml) alone, or the combination of two agents for the indicated periods, then, the cell viability was determined by MTT assay. results represented as mean \pm S.D. of three independent experiments.

2. 병합요법시 자궁경부암 세포주의 Apoptosis가 유도되었다.

Cisplatin과 berberine에 의한 HeLa 세포의 세포사멸이 세포고사(apoptosis) 혹은 세포괴사(necrosis)의 기전에 의한 것인지 를 확인하기 위하여 DAPI staining을 이용하여 핵산을 염색하였다(Fig. 2a). 대조군이나 단독 처리군에 비해서 cisplatin과

berberine의 병용처리 시 선명한 HeLa 세포내 염색체 응축현상을 관찰할 수 있었다.

또한 Cisplatin 5uM 혹은 Berberine 50 ug/ml, 그리고 두 약제의 병합처리에 의한 세포주기에 미치는 영향을 PI로 염색하여 flow cytometry로 측정하였다.(Fig. 2b) Cisplatin 5 uM이나 Berberine 50 ug/ml의 단독처리는 세포주기의 G2 혹은 S 단계에서 억제되어 있음을 보였으며, 병합처리 시는 세포 고사에 의한 sub G1 군이 증가되었음을 확인 할 수 있었다. Cisplatin 5uM과 Berberine 50 ug/ml를 병용처리 하였을 때 HeLa 세포는 sub G1 군을 나타내는 M1의 비율이 단독처리군(cisplatin : 1.73 %, berberine; 8.23%)에 비하여 월등하게 증가(31.41%)하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 Fig. 1b에서 보인 HeLa 세포의 병용처리에 의한 세포 생존율 감소는 세포고사현상에 의한 것으로 사료된다.

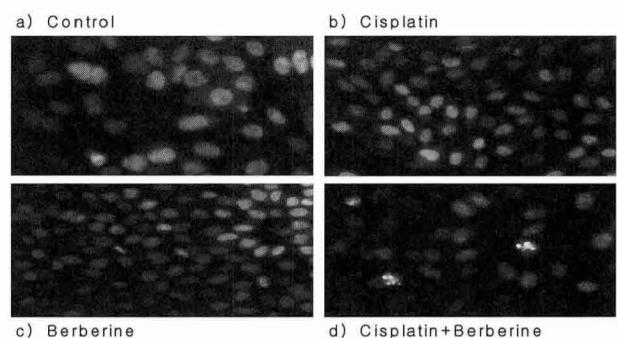


Fig. 2a. The combination of cisplatin and berberine induced the chromatin condensation of HeLa cells. HeLa cells were treat with cisplatin 5 μ M or berberine 50 μ g/ml alone, the combination of cisplatin 5 μ M and berberine 50 μ g/ml for 24hrs, the nuclear morphology was analyzed by DAPI dye staining under fluorescence microscopy.

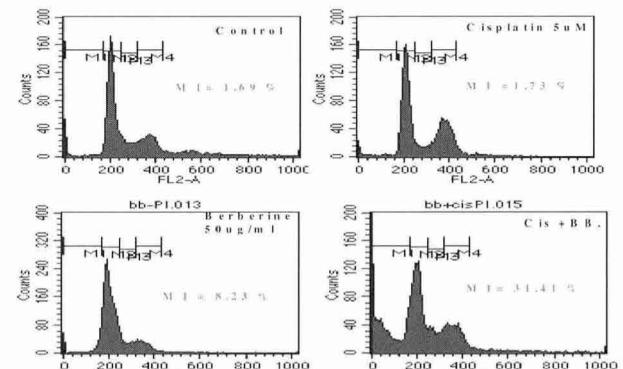


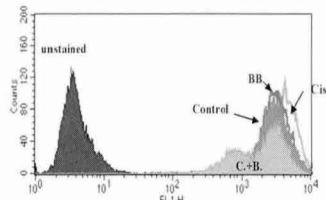
Fig. 2b. Flow cytometric analysis of apoptotic cell death in HeLa cells treated with the combination of cisplatin and berberine. The cells were treated with cisplatin or berberine alone, or combination of cisplatin and berberine were harvested, washed with PBS, and then stained with 50 mg/ml PI inf 0.1% Nonidet P-40. after washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate DNA fragmentation rate were collected and analyzed by consort 3.0 program of becton dickinson.

3. Berberine과 cisplatin의 병합 처리에 의한 세포고사는 미토콘드리아 막전위의 변화와 관련이 있다.

미토콘드리아 막전위(MMPT)의 변화는 세포고사 유도에 중요한 단계이다. cisplatin과 berberine의 병합처리가 MMPT의 변화에 대한 영향을 cation probe인 DiQC6(3)의 유지 상태로 측정하였다. DiQC6(3)은 MMPT가 변화함에 따라 유지가 감소되어

형광의 강도가 감소하게 되며 이는 FACS의 FL1을 이용하여 측정할 수 있다. Fig. 3a에서 나타난바와 같이 cisplatin과 berberine의 병합처리는 단독 처리 시보다 MMPT의 변화를 가져와 감소된 형광을 인지할 수 있었다. 또한 DiQC6(3) 염색에 의한 MMPT의 변화 양상을 형광 현미경 시하에서도 DiQC6(3) 형광 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 3b).

A)



B)

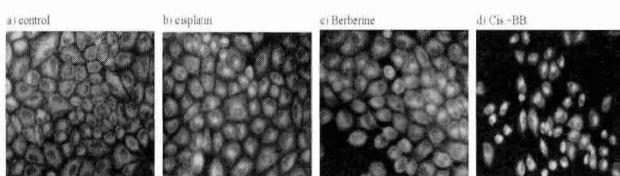


Fig. 3. The combined treatment of cisplatin and berberine promotes MMPT in HeLa cells. a) the cells were treated with 5 μ M of cisplatin, plus 50 μ g/ml berberine, or both 18hr, then, the cells were incubated with 40nM DiQC6(3) for 30min at 37°C, the cells were analyzed with a flow cytometry(FACSCalibur, BD Biosciences), the horizontal axis shows the relative fluorescence intensity, and the vertical axis shows the cell number; cis. : cisplatin., BB. : berberine, b) the cells were visualized under fluorescent microscope.

4. Berberine과 cisplatin의 병합 처리시 활성화 산소종의 생성을 증가시킨다.

Cisplatin과 berberine의 병합처리에 의한 HeLa 세포고사시 ROS 생성이 유도되는지 알아보기 위하여 hydrogen peroxide와 그 연관된 peroxides 생성을 인지하는 DCF-DA 염색과 superoxide anion생성을 인지하는 hydroethidium(HE)염색을 실시하여 병용처리 시 ROS생성 여부를 FACS를 이용하여 분석하였다. DCF-DA나 HE 형광염색은 생성되는 형광의 정도는 ROS 생성 정도에 비례하여 증가하게 된다. Fig. 4a에서 나타난 바와 같이 cisplatin과 berberine의 병합처리는 hydrogen peroxide계 활성화 산소종의 생성을 증가시킴을 알 수 있었다. 또한 HE염색에 의한 superoxide anion 생성도 병합처리 시 뚜렷하게 증가는 양상을 나타내고 있다(Fig. 4b). 이런 결과는 cisplatin은 DCF-DA에 berberine은 HE염색에 의해 증가된 양상의 차이를 보여주며, 이는 cisplatin과 berberine에 의한 활성화 산소종에 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다.

5. 항산화제인 NAC, GSH가 Cisplatin과 Berberine의 병용처리 시 HeLa 세포의 고사에 미치는 영향.

Cisplatin과 berberine의 병용처리에 의한 HeLa 세포의 세포고사에 활성화 산소의 관련 여부를 알아보고자 NAC, GSH와 같은 항산화제를 선 처리한 후 세포의 생존율을 측정하였다(Fig. 5). Cisplatin과 berberine을 병용처리 시 50%정도의 세포 생존률

을 보였으나, 항산화제인 NAC, GSH 전 처리 시 대조군 수준으로 세포생존율이 회복 되는 것을 확인하였다.

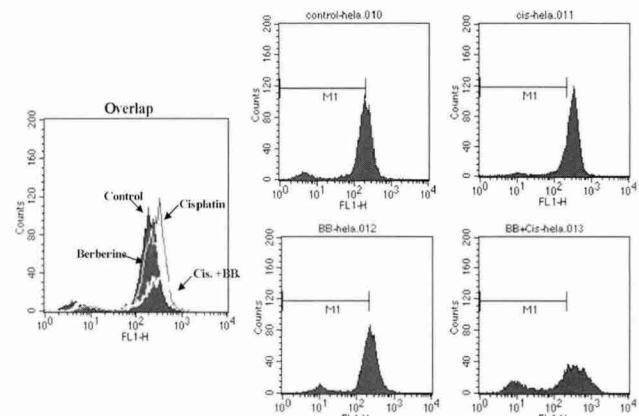


Fig. 4a. Cisplatin plus berberine-induced increase in detection of ROS in HeLa cells. Cells were treated with 5 μ M cisplatin or 50 μ g/ml berberine and combined for 18hr, cell were harvested after treatment, and then cells were stained with DCFH-DA dye, after washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular ROS levels.

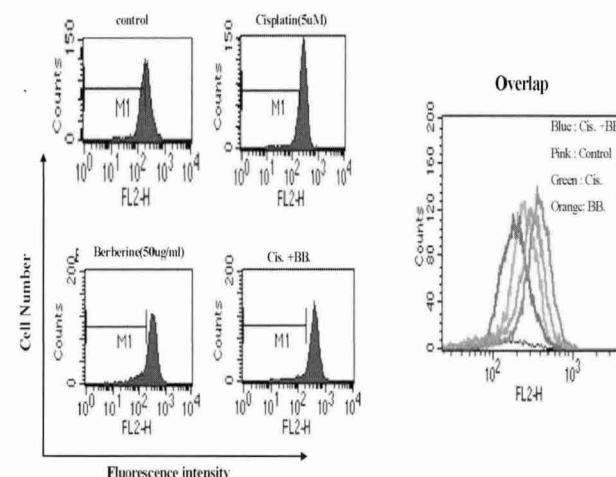


Fig. 4b. Cisplatin plus berberine-induced increase in detection of ROS in HeLa cells. Cells were treated with 5 μ M cisplatin or 50 μ g/ml berberine and combined for 18hr. Cell were harvested after treatment, and then cells were stained with Hydroethidium(HE) dye. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular ROS levels.

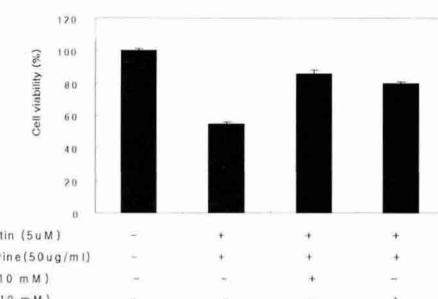


Fig. 5. Effect of NAC, GSH on combination of cisplatin and berberine-induced cell death. Cells were pre-incubated with NAC, GSH for 60min and then treated with combination of cisplatin 5 μ M and Berberine 50 μ g/ml. Cell viability was determined by MTT assay. Results represented as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

고 찰

최근 분자생물학의 발달로 인해 암의 발생기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 결과 세포 성장 촉진 및 억제 신호 전달체계와 그 상호작용에 대한 많은 지식이 밝혀지고 있다. 세포고사(Apoptosis)는 gene-mediated programmed cell death의 과정으로 여러 생리적 과정에서 원하지 않는 세포를 제거시키는데 필수적이고 항암치료제의 기전에 핵심적 요소이다.¹¹⁾

Cisplatin은 자궁경부암에 널리 쓰이고 있는 항암제이나 부작용 때문에 자궁경부암 환자가 항암치료에 순응도가 떨어진다. 이런 부작용을 줄이고 암세포에 세포 독성을 효과적으로 나타낼 수 있는 방법들이 연구되어지고 있는데, 그 중 한 가지 방법은 세포 독성을 일으키는데 있어 서로 다른 기전을 지닌 여러 항암제들의 용량을 낮추어 이들을 함께 투여함으로써 부작용 감소와 암세포 사멸의 효과를 증가시키는 방법이 병합요법이다. 강 등¹⁰⁾은 theophylline과 cisplatin을 난소암 세포에 병합 처리할 시 단독처리에 비하여 세포고사를 증가하였으며, 이 때 bcl-2유전자의 발현 변화가 뚜렷하게 인지됨을 보고하였고, 허 등¹²⁾은 topotecan, cisplatin, taxol의 난소암 세포주에 대한 화학민감도를 단독 혹은 병합처리에 의한 세포고사에 대한 보고는 암의 치료적 접근에 논리적 근거를 제공하였다.

본 연구에서는 자궁경부암에서 항암치료제로 사용되는 cisplatin과 topoisomerase I, II 억제제로 알려져 있는 berberine를 함께 사용한 경우에 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰한 결과, 이들 화학요법제들의 병합처리시 apoptosis가 뚜렷하게 증가되는 효과를 관찰하였다. Berberine은 camptothecin과 유사한 천연추출물로서 topoisomerase I, II에 대한 이중 저해기능을 갖고 있으며, DNA에 높은 친화력으로 결합하여 DNA분절을 초래하고 활성화 산소의 생성을 유발하여 세포사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있으나, 보다 명확한 세포사멸 기전은 아직 밝혀져 있지 않다. 최근 berberine이 다양한 세포주에서 세포성장저해와 apoptosis를 유발한다는 연구가 보고 되었다.¹³⁻¹⁵⁾

이에 본 실험에서 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주에 대한 cisplatin과 berberine의 세포독성을 알아보기 위하여 농도별 세포 생존율을 측정하였다. MTT방법에 의하여 분석한 결과 cisplatin 5 uM 혹은 berberine 50 ug/ml의 경우는 생존율이 각기 97%, 80% 정도로 나타나, 각기 농도에서는 세포생존율에 많은 영향을 미치지 않았다. 본 실험에서 얻어진 cisplatin 농도에 대한 결과는 30 uM cisplatin에서 50%정도의 생존율을 보이고 있다. 하지만 두 농도의 화학 요법제를 병합 처리하여 시간에 따른 세포 생존율을 분석한 결과, 병합처리군에서의 암세포 사멸 효과가 단독처리군에 비하여 훨씬 높은 세포 사멸 효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 1b). 이러한 양제의 병합 처리는 cisplatin의 단독 사용할 때보다 적은 용량을 사용해도 세포사멸에 대한 상승효과를 기대할 수 있기 때문에 임상에서 화학 요법제를 사용할 때에 부작용을 크게 줄일 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

또한 두 화학요법제의 병합처리로 인한 암세포사멸의 기전을 알아보기 위하여 세포고사현상을 특징으로 보는 염색사 응축

을 확인하여 보았다. Fig. 2a에서 보는 바와 같이 염색사의 응축 현상을 확인할 수 있었으며, FACS를 이용한 세포주기 분석으로 세포고사를 나타내는 sub-G1 단계의 비율이 병합처리군의 분석 결과 31%정도로 대조군이나 단독 처리군에 비하여 증가되는 양상을 확인할 수 있었다. 이 결과로 berberine과 cisplatin의 병합 처리시 암세포사멸의 기전은 세포고사(apoptosis)임을 확인할 수 있었다.

세포사멸 유도하는 기전은 크게 두 방향의 경로를 통한다고 알려져 있다. 즉, 미토콘드리아를 경위하는 경로와 death receptor를 경위하여 세포사멸이 유도된다. 본 연구에서는 먼저 미토콘드리아를 경위하는 경로의 관여를 알아보기 위하여, 미토콘드리아 막전위의 변화를 분석하였다(Fig. 3). 미토콘드리아 내막의 전위가 변하면 형광의 강도가 감소하는 DiQC6(3) 형광 염색을 FACS로 분석한 결과, 병합처리 시 확연하게 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로부터 병합처리 시 미토콘드리아 막 전위에 영향을 미쳐 세포사멸 유도에 관련된 여러 가지 신호전달을 유도하리라 사료된다.

현재까지 알려진 cisplatin의 세포독성은 활성화 산소의 생성증가로 인한 세포고사 유도에 관련이 있다고 보고되었다.⁸⁾ 세포사멸을 유도하는 활성화 산소는 hydrogen peroxide, superoxide anion, nitrite oxide등 다양한 종류가 알려져 있다. 이러한 활성화 산소종은 세포에 따라 혹은 화합물의 종류에 따라 다른 활성화 산소를 발생하여 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 본 실험에서도 cisplatin과 berberine 그리고 병합처리시 발생되는 활성화 산소를 측정하여 보았다. 일반적으로 DCF-DA에 의해 hydrogen peroxide 종류, Hydroeithdium(HE)에 의해 superoxide anion의 생성을 FACS를 이용하여 분석한 결과(Fig. 4b) 단독 처리에 의한 활성화 산소 양에 비하여 훨씬 증가하는 결과를 얻었다. 특히, berberine의 경우는 현재까지 보고된 세포사멸 유도 기전과 더불어 활성화 산소 생성 유도에 의한 세포사멸 유도의 가능성을 시사한다. 본 결과로부터 Hydrogen peroxide계통의 ROS는 cisplatin의 경우 더 많은 생성을 보였으나, superoxide anion의 경우는 berberine의 처리 시 cisplatin 처리 보다 많은 생성을 보였다. 이는 병합처리 시 나타나는 세포사멸에 대한 감수성 증가 기전으로, 두 양제의 각기 다른 활성화 산소 생성의 증가의 상승효과를 나타내어 세포사멸을 증가시킬 수 있는 가능성을 제시할 수 있다. 따라서 본 연구 결과는 암세포 사멸에 있어 활성화 산소의 역할에 대한 자료로 사용할 수 있으리라 사료된다.

cisplatin이나 다양한 화학요법제의 활성화산소 생성에 의한 세포고사를 유도하고, 이는 항산화제에 의해 방어된다고 보고되고 있다.^{8,9)} HeLa 세포에 대한 화학요법제의 세포독성이 항산화제의 전처리로 보호될 수 있는지 항산화제로 알려진 NAC, GSH를 전 처리한 후 두 화학 요법제를 처리하여 세포 생존율을 관찰한 결과 다른 보고자들의 결과와 같이 HeLa 세포에서의 병합처리에 의한 세포독성이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과로 두 화학요법제의 세포독성은 산화적 자극에 의한 활성산소의 생성에 기인함을 확인할 수 있었다.

이번 연구로 기존의 항암제와 항암치료에 효과적인 것으로 알려진 한약제의 병합요법이 암세포 사멸에 효과적이라는 실험적 결과를 제시하였다. 앞으로 이와 같은 많은 연구로 임상에서 양한방의 협진체계로 많은 암환자들의 치료의 진전이 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. 1999-2001 한국인 암 발생 통계. 보건복지부 암 발생 통계집. 2005.
2. Green, D.R., Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312, 1998.
3. Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br J Cancer*, 76: 206-210, 1997.
4. Amin, A.H., Subbaiah, T.V., Abbasi, K.M. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can J Microbiol.* 15: 1067-1076, 1969.
5. Akirhter, M.H., Sab, M., Bhide, N.K. Anti-inflammatory effect of berberine in rats injected locally with cholera toxin. *Indian J Med Res*, 65: 133-141, 1977.
6. Hwang, J.M., Kuo, H.C., Tseng, T.H., Liu, J.Y. Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cells. *Arch Toxicol.* 28: 1-12, 2005.
7. Kobayashi, Y., Yamashita, Y., Fujii, N., Takaboshi, K., Kawakami, T., Kawamura, M., Mizukami, T., Nakano, H. Inhibitors of DNA topoisomerase I and II from the Coptis Rhizomes. *Planta Med.* 61: 414-418, 1995.
8. 고경희, 김신호, 조해중, 오성환, 김홍곤, 박래길. Involvement of Oxidative Stress in Cisplatin-Induced Apoptosis in HeLa Cells. *대한 산부회지* 46(12):2410-2416, 2003.
9. 최정호, 조현, 이선영, 오성환, 김홍곤, 박래길. The Study of the Cytotoxic Mechanism of Cisplatin in HeLa Cells. *대한 산부회지* 46(10):1989-1998, 2003.
10. 강경화, 허주엽, 서병선. 난소암세포주에서 Apoptosis를 통하여 세포성장을 억제하는 Theophylline과 Cisplatin의 상승효과. *대한 산부회지* 47(10):1905-1914, 2004.
11. Wang, D., Lippard, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 307-320, 2005.
12. 허주엽, 임명철, 서병선. 난소암 세포주에서 Topotecan, Cisplatin, Taxol에 대한 화학민감도의 측정과 p53, bcl-2 및 세포고사에 관한 연구. *대한산부회지* 46(7):1368-1377, 2003.
13. Kobayashi, Y., Yamashita, Y., Fujii, N. et al, Inhibitors of DNA topoisomerase I and II from the Coptis Rhizomes. *Planta Med.* 61: 414-418, 1995.
14. Marta, C., Daniela, K., Viktor, K., Miriam, P., Jaroslav, T., Ján D. Potential antimutagenic activity of berberine, a constituent of *Mahonia aquifolium*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2: 2-6, 2002.
15. Sona, J., Lubos, C., Marta C., Daniela, K. Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in Hela and L1210 cells. *J. Pharmacy and Pharmacology*, 55: 1143-1149, 2003.
16. Baumgartner, M., Sturlan, S., Roth, E., Wessner, B., Bachleitner Hofmann, T. Enhancement of arsenic trioxide-mediated apoptosis using Docosahexaenoic acid in arsenic trioxide-resistant solid tumor cells. *Int. J. Cancer*, 112: 707-712, 2004.
17. Oikawa, S.T., Hiraku, Y., Kawanishi, M., Kawanish, S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Science* 73: 3277-3288, 2003.
18. Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell physiol Biochem*. 11(4):173-186, 2001.