

마우스 모델에서 항백탕 투여에 의한 종양 증식의 억제 및 Apoptosis의 유도

윤용갑¹, 김준희², 송은정², 황진기², 남상윤^{2,3}

¹원광대학교 한의과대학 방제학교실, ²전주대학교 대학원 생명과학과,

³전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부

ABSTRACT

Proapoptotic and antitumor effect of Hangbaek-Tang(HBT) in a tumor transplanted mouse model

Young-Gab Yun¹, Jun-Hee Kim², Eun-Jung Song², Jin-Ki Hwang², Sang-Yun Nam^{2,3}

¹Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University, ²Department of Biological Science, Graduate School and ³School of Alternative Medicine and Health Science, Jeonju University

Objective : *In vitro* proapoptotic effect of Hangbaek-Tang (HBT) has been documented by one of us. In the present study, we aimed to demonstrate *in vivo* effect of HBT on tumor growth.

Methods : *In vitro* selective cytotoxicity of HBT was examined by enumeration of viable cell numbers using BC3A mouse leukemic cells and normal spleen cells. *In vivo* effect of HBT (25 and 50 mg/mouse) on tumor growth was assayed using BC3A cells inoculated subcutaneously in the flank. Annexin-V apoptosis assay and PI staining was performed to determine the effective serum factor in HBT-treated mice. Leukocyte recruitment into peritoneum were analyzed by

-
- 교신저자 : 남상윤
 - 전북 전주시 효자동 3-1200 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부
 - Tel : 063-220-2518 Fax : 063-220-2054 E-mail : sangyun@jj.ac.kr
 - 접수 : 2009/ 10/ 14 채택 : 2009/ 12/ 09

microscopy with a stained cytospin of peritoneal lavage fluid.

Results : HBT exhibited *in vitro* selective cytotoxicity to leukemic cells and did not show any toxicity on immune organs. *In vivo* i.p. administration of HBT induced significant reduction in tumor growth but not complete regression. Sera obtained from HBT-treated mice strongly inhibited BC3A cell growth *in vitro* and were revealed to markedly enhance apoptosis and accompanying cell death, when compared to those from PBS-treated mice. Abundant extravasation of leukocytes, especially neutrophils, into peritoneum was observed in HBT-treated mice.

Conclusions : HBT causes leukemic, BC3A cell death *in vivo* via apoptosis as well as *in vitro*, for which functional involvement of leukocytes is suggested.

Key word : Hangbaek-Tang(HBT), BC3A, tumor growth, cytotoxicity, apoptosis

1. 서론

전세계적으로 암환자 수는 최근까지 지속적으로 증가하고 있으며¹⁾ 여전히 가장 중요한 인간의 사망 원인이 되고 있다²⁾. 암의 일종인 백혈병(白血病, leukemia)은 백혈구와 그의 유아세포가 비정상적으로 생산되어 모든 장기에 침윤하고 다시 증식하여 장거나 면역계에 기능을 약화시킴으로써 사망을 초래하는 질환이다³⁾. 최근 우리나라에서도 백혈병 발생빈도가 증가되는 추세로 백혈병에 대한 기초적인 연구와 항암 물질의 개발이 활발히 시도되고 있다. 일반적으로 암을 치료하는데 물리적 요법과 화학요법이 주로 사용되어 왔으나 이러한 방법은 유전자를 손상시켜 세포 독성을 유발하거나 간과 신장 기능의 장애, 약물 축적에 의한 독성 효과, 조혈작용 장애 등의 부작용이 발생하는 문제점이 있다⁴⁾. 특히 전체 백혈병의 약 20% 이상을 차지하고 있는 만성 골수성 백혈병 (chronic myelogenous leukemia) 치료제로 Novartis社에서

개발한 Bcr-Abl tyrosine kinase 저해제인 글리벡 (Gleevec) 이외에 특별한 약물은 없다. 최근에 이 약물에 대한 내성과 부작용이 알려지면서 이를 극복하기 위하여 글리벡 용량을 증량시키는 방법 혹은 타 항암제 약물과 동시 투여하는 방법 등의 여러 시도가 보고되고 있으나 뚜렷한 극복방법은 제시되지 않고 있다. 천연물질을 이용하여 정상세포에는 독성과 암세포에 저항성을 증가시키지 않으며 암세포만을 선택적으로 공격하여 백혈병세포를 사멸시키거나 증식을 억제하는 항암제를 개발하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다⁵⁻⁸⁾.

고대부터 식물을 이용하여 암을 치료하려는 시도는 계속되어 왔으나 암에 대한 실체를 명확히 파악하지 못했던 시기에 사용되었던 점을 고려할 때 전통 약물의 효능을 전적으로 기대하기는 쉽지 않다^{9,10)}. 그러나 국내에서는 최근 많은 한약재가 항암효과를 가지고 있음이 보고되고 있으며, 이들 한약재로부터 항암 효과가 있는 생리활성물질을 분리하여 약리효능을 보고한 바도 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

여러 유형의 암을 치료하는데 자주 사용되는 한약재로는 백지 (*Angelica dahurica*), 폐모 (*Fritillariae verticillata*), 저근백피 (*Ailanthus atissima*), 인삼 (*Ginseng Radix*), 황기 (*Astragalus membranaceus*), 상기생 (*Viscum coloratum*), 황금 (*Scutellaria Radix*), 그리고 감초 (*Glycyrrhizae Radix*) 등이 알려져 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 한편, 한의학에서는 부작용이 적으면서도 효능을 증대시키고 정확한 질병부위에만 약효가 작용하도록 하는 방제학적 배합방법인 군신좌사법(君臣佐使法)¹⁶⁾이 매우 광범위하고 다양하게 임상에 직접 활용되어 오고 있다. 항백탕(抗白湯)은 방제학적 처방 이론에 근거한 군신좌사법(君臣佐使法)에 따라 한약재를 배합한 처방으로서, 세포사멸과 세포분화를 촉진시키는 약제를 중심으로 원광대학교 한의과대학 방제학교실에서 만든 처방이며, 실험적으로는 사람 백혈병 세포주인 HL-60 세포에 대하여 증식 억제효과를 나타내었으며, apoptosis를 유도하였다¹⁷⁾.

in vitro에서 확인된 항백탕의 암세포 독성 실험 결과에 의하면 항백탕이 암의 치료에 유효하게 응용할 수 있을 것으로 기대되며, 임상 실험에 앞서 동물실험을 통하여 항백탕의 효능을 확인하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 마우스 모델을 사용하여 in vivo에서 항백탕의 증양세포 증식에 대한 억제 효능을 확인하였다.

II. 실험방법

1. 실험동물

본 실험에서 사용한 실험동물은 생후 3-5주된 Balb/c 마우스를 샘타코 (경기도, 오산)에서 구입하였으며, 항온 항습장치 (대중기기산업, 서울) 내에서 사육하면서 7주된 생쥐를 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양액 및 암세포 배양

본 실험에서 마우스 백혈구의 배양을 위해서는 IMDM (Hyclone, Logan, Ut, USA)을 기본배양액으로 하여 10%의 열처리된 비 활성화시킨 우태혈청 (fetal bovine serum: FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B, Sigma Chemical, MO, USA)을 첨가한 완전 배양액을 사용하였다.

Balb/c 유래의 백혈병세포인 BC3A 암세포는 미국 American Type Culture Collection (ATCC: Catalog Number, TIB 60) (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 10% FBS 및 항생제가 첨가된 RPMI1640 (Invitrogen)을 사용하여 배양하였다.

3. 항백탕(HBT) 제조 방법

본 연구에서 사용한 약제는 전북 익산시 소재 한약건재상에서 구입하였으며, 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 증거표본은 원광대학교 한의과대학 방제학 표본실에 보관 중에 있다. 공기에 충분히 건조된 약제는 절단한 후 세절된 황금(*Scutellaria Radix*), 목단피(*Cortex Moutan Radicis*), 상기생(*Viscum coloratum*), 저근백피(*Ailanthus atissima*), 백지(*Angelica dahurica*), 황기(*Astragalus membranaceus*), 인삼(*Ginseng Radix*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 폐모(*Fritillariae verticillata*) 각 50 g, 총 450 g을 증류수 (3.5 L)에 넣고 2시간 30분 동안 가온·가압하여 추출하였다. 이를 여과하고 동결건조기(LABCONCO freeze dryer 3, Kansas City, MO, USA)를 사용하여 여액을 건조한 후 추출물 138.8 g을 얻었다. 각 추출물은 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. in vitro에서 HBT에 노출된 암세포 증식 측정

BC3A 암세포를 2×10^5 농도로 48-well plate에 분주한 후 약제를 각각 62, 125, 250, 500 µg/ml의

농도로 가한 후 1일 간격으로 4일 동안 암세포를 수거하여, trypan blue 염색 방법을 이용하여 생존 세포의 수를 측정하였다.

5. in vitro에서 HBT에 노출된 비장세포 생존 수 측정

마우스의 비장세포를 주사침을 사용하여 유리 시키고 9초 동안 멸균 증류수에 노출시키는 저장액 충격(hypotonic shock) 방법으로 적혈구를 파괴시킨 후 인산염 완충액 (PBS)으로 세척한 다음 trypan blue 염색 방법을 이용하여 생존 세포의 수를 측정하였다. 얻어진 세포의 농도를 1×10^6 /ml로 조정하여 배양하였다. 이를 48-well plate에 분주한 후 약제를 각각 62, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가한 후 1일 간격으로 3일 동안 세포를 수거하여, trypan blue 염색 방법을 이용하여 생존 세포의 수를 측정하였다.

6. 암 이식 마우스에서 항백탕(HBT) 투여 후 면역장기 검사 및 암세포 증식 측정

마우스에 Avertin을 투여하여 마취시킨 후 옆구리의 털을 제거하고, 1×10^5 개의 BC3A 세포를 마우스의 옆구리에 피하로 주입하였다. 2시간 후 약제 투여군에는 항백탕(HBT) (250, 500 mg/ml)를 1회 0.1 ml씩 복강으로 투여하고 대조군에는 동량의 PBS를 투여하였다. 매일 12일째까지 동량을 투여하고 매일 암세포 크기를 측정하되, 장축 및 장축과 직각이 되는 단축의 평균치로 비교하였다. 13일째에는 모든 마우스의 흉선, 비장 및 좌우 슬와림프절을 적출하여 무게와 총 세포수를 측정하고, 경추 탈골 방법으로 안락사시켰다.

7. 항백탕(HBT)의 투여 후 마우스 혈청 내 세포독성 인자의 확인

항백탕(HBT) 투여 후 면역장기 적출 직전에 심장 채혈을 통하여 말초혈을 채취한 후 실온에서

응고시키고, 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이를 56°C 에서 30분간 비동화시켜 실험시까지 -30°C 에 냉동보관하였다. 세포독성 인자를 확인하기 위해서는 혈청을 해동한 후 BC3A 암세포를 배양할 때, 세포배양액에 채혈 혈청을 5, 10 및 20%를 가하여 배양하였으며, 세포배양액에 10% FBS를 가한 배양액을 대조군으로 하여 비교하였다.

8. Apoptosis 측정

Apoptosis는 Annexin-V 염색방법으로 측정하였다. 암세포를 혈청에 6, 12 및 24시간 노출시킨 후 원심분리 후 Annexin-V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 사용하여 Annexin-V-FITC 및 propidium iodide (PI)로 염색한 후 유식세포기 (FACSort; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

9. 복강 세척액 (peritoneal lavage fluid ; PLF) 검사

마우스 복강의 세척을 위해서 5ml 주사기를 이용하여 PBS 3 ml을 넣어 세척하여 수거한 후 Cytospin (LSI Co. UK)을 사용 1,000 RPM에서 슬라이드 글라스에 5×10^4 세포를 도말한 후 Diff-Quick (Baxter Healthcare, Miami, FL, USA)을 사용하여 염색한 다음 현미경 하에서 호산구, 대식세포, 호중구, 림프구 등의 세포 수를 측정하되 총 500개 이상의 세포수를 측정하여 비교하였다.

III. 결 과

1. 항백탕(HBT)의 암세포 특이적 세포 독성의 확인

in vitro에서 항백탕(HBT)의 백혈병 세포 증식 억제 효능은 저자들에 의해 확인된 바 있다¹⁷⁾. in vivo 투여 효능을 확인하기 위한 목적으로 본 연구에서는 약제의 in vivo 투여가 독성을 나타내는

지 확인해 보고자 하였다. 본 연구에서는 정상 마우스에서 *in vivo* 증식이 확인된 Balb/c 유래의 암세포인 BC3A를 선정하고, 이를 이용하여 우선 *in vitro*에서 항백탕(HBT)의 암세포 특이적 증식 억제 작용을 나타내는지 확인하였다.

*in vitro*에서 BC3A에 항백탕(HBT)을 농도별로 처리하여 tumor cell의 증식을 시간별로 확인한 결과를 Fig. 1에 요약하였다. 약제 처리 1일 후 항백탕(HBT)의 농도에 의존적으로 암세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였으며, 2일 이후에는 저농도 (62, 125 µg/ml)에 항백탕(HBT)에 노출된 경우 암세포는 계속 증식하나 대조군에 비해 현저히 증식이 억제되었다. 고농도 (250, 500 µg/ml)의 항백탕(HBT)에 노출된 경우 세포독성이 더욱 현저하여 저농도에 비해서도 억제 효능이 크게 증가하였다.

이와 같은 항백탕(HBT)의 세포독성이 정상 백혈구에도 나타나는지를 확인하기 위해 *in vitro*에서 마우스의 정상 백혈구에 동일한 조건으로 증식에 미치는 영향을 확인하였다. 실험 결과 항백탕(HBT)은 고농도에서도 정상 백혈구의 생존에 전혀 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Fig. 2).

정상 백혈구에 대한 항백탕(HBT)의 무독성은 *in vivo*에서 항백탕(HBT)의 경구 투여에 의해서도 확인되었다. 항백탕(HBT)(20 mg)을 2주간 경구 투여한 후 마우스의 면역장기의 무게와 면역기관의 세포수를 측정하여 항백탕(HBT)의 독성 여부를 조사한 결과, PBS를 투여한 대조군과 실험군 간에 차이를 보이지 않았다(Table 1). 이러한 결과는 항백탕(HBT)의 세포 독성이 암세포에

대해 매우 특이적으로 작용함을 시사한다.

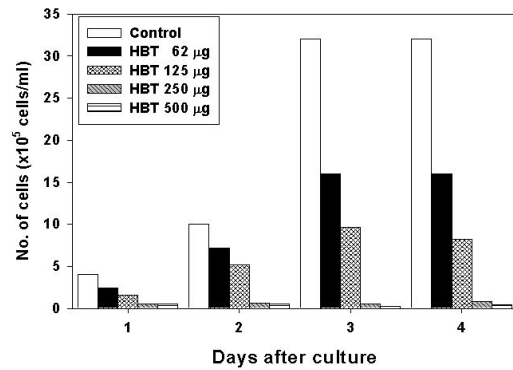


Fig. 1. Effect of HBT treatment on proliferation of BC3A cells.

BC3A (2×10^5 cells/ml) were treated with various doses of HBT for 4 days and viable cells were counted everyday by trypan blue dye-exclusion assay.

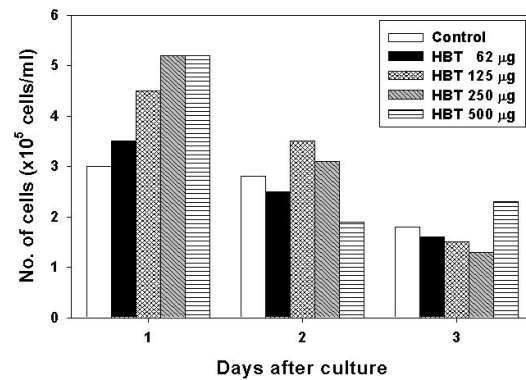


Fig. 2. Effect of HBT treatment on proliferation of mouse normal leukocytes.

Spleen cells (5×10^5 cells/ml) were treated with various doses of HBT for 3 days and viable cells were counted everyday by trypan blue dye-exclusion assay.

Table 1. Changes in weight and cell numbers of immune organs following *in vivo* HBT treatment.

Treatment	Spleen (mg)	Thymus (mg)	Spleen ($\times 10^7$)	Thymus ($\times 10^7$)	LNC ($\times 10^6$)
Control	91.0 ± 4.7	16.3 ± 3.2	7.4 ± 0.4	3.5 ± 1.6	8.0 ± 1.8
HBT*	108.7 ± 3.9	17.7 ± 1.5	7.9 ± 0.9	3.6 ± 0.3	8.3 ± 2.6

*HBT (50 mg/mouse) was intraperitoneally given for 13 days.

2. in vivo에서 항백탕(HBT)의 투여가 암세포의 증식의 미치는 영향

항백탕(HBT)에 의한 암세포의 성장억제를 in vivo에서 확인하기 위해서 마우스의 옆구리 피하에 2×10^5 개의 BC3A를 주입하고 마우스의 복강으로 25 mg, 50 mg의 항백탕(HBT)을 주입하여 암세포의 성장을 관찰하였다. 대조군과 25 mg을 투여한 마우스의 암세포가 5일 후부터 자라기 시작하여 13일이 되면 대조군의 마우스 일부가 죽는 것을 확인하였다. 50 mg을 투여한 마우스에서는 비슷한 시점부터 암세포가 자라기 시작하였으나 성장 초기 (7일 - 8일째)에 그 성장이 대조군에 비해 유의하게 억제되며, 12일까지 그 효과가 지속되는 것을 확인할 수 있었다.

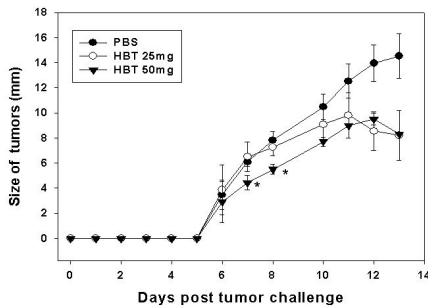


Fig. 3. Effect of HBT treatment on growth of BC3A cells.

2×10^5 BC3A cells were subcutaneously injected to Balb/c mice and HBT was administered i.p. from day 0 for 13 days.

3. 항백탕(HBT)의 in vivo 투여 후 마우스 혈청 내 세포독성 인자의 확인

항백탕(HBT)의 암세포 증식 억제 효능이 in vivo에서도 확인되었으므로 항백탕(HBT) 투여 후 마우스의 혈청 내에는 항백탕 유래의 세포독성 인자가 존재할 것으로 추측하여 이를 직접적으로 확인하고자 하였다. 13일간 항백탕(HBT)을 투여한 마우스의 혈청을 분리하여 in vitro에서 암세포의 증식에 미치는 영향을 실험하였다. 통상적으로

암세포 배양에 사용되는 우태혈청 (FBS)을 가한 배양액과 5-20%의 대조군 및 HBT 투여 마우스에서 분리한 혈청을 가한 배양액을 사용하여 BC3A세포를 배양하면서 6, 12 및 24시간 후에 세포의 수를 측정하였다.

그 결과 HBT 투여 마우스에서 분리한 혈청은 20%를 가한 경우 배양 6시간 후부터 유의한 세포독성을 나타내었으며, 배양 12시간 후에는 5% 이상을 가한 전 실험군에서 세포 증식이 대조군의 52 - 40% 수준으로 억제되었다. 특히 HBT 투여 마우스 혈청 20%를 가하였을 때 24시간 후에는 세포의 증식이 대조군의 3% 수준을 나타내었다(Fig. 4).

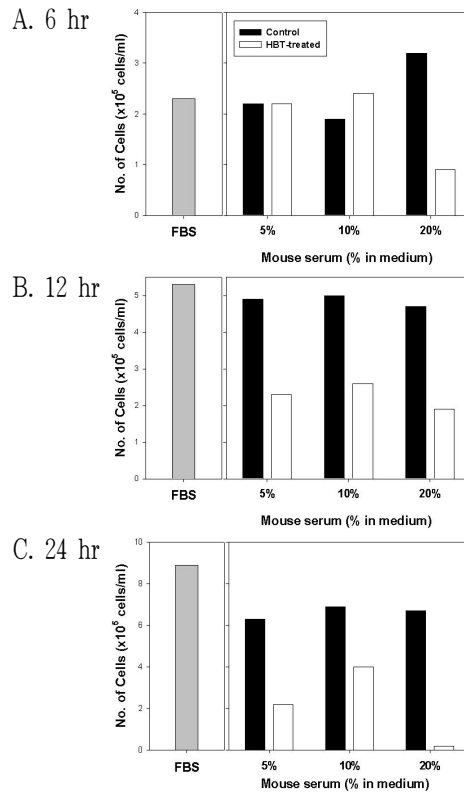


Fig. 4. Effect of sera from HBT-treated mice on growth of BC3A cells.

BC3A cells (2×10^5 cells/ml) were exposed to mouse sera (5-20%) or FBS (10%) for 6, 12 or 24 hrs and viable cells were counted by trypan blue dye-exclusion assay.

4. 마우스 혈청 내 세포독성 인자의 Apoptosis 유도

상기 실험에서 혈청 내 세포독성 인자의 존재가 확인되었다. 저자들은 이와 같은 세포독성 인자가 암세포의 Apoptosis를 유도할 수 있을 것으로 생각하여 이를 확인하고자 하였다. 세포독성 인자의 작용이 뚜렷하게 나타나도록 암세포를 24시간 동안 혈청에 노출시킨 후 FITC-Annexin-V 및 PI 염색을 통하여 apoptosis를 측정하였다. 그 결과 Fig. 5에 제시된 바와 같이, HBT투여 마우스의 혈

청 5%를 가Fi경우, PBS를 투여Fi마우스의 혈청과 비교하여, apoptosis가 2.8%에서 9.2%로 증여,고, 막손상에 의해 이미 사멸및 PI의 비율이 2.8%에서 14.8%로 증여,였 apo20%의 혈청을 가한 경우에는, apoptosis가 3.8%에서 20.2%로 증가하고, 사멸한 세포의 비율이 3.6%에서 71.6%로 크게 증가하였다. 따라서 HBT 투여 마우스 혈청내 독성 인자가 암세포의 apoptosis를 매우 현저하게 유도함을 확인할 수 있었다.

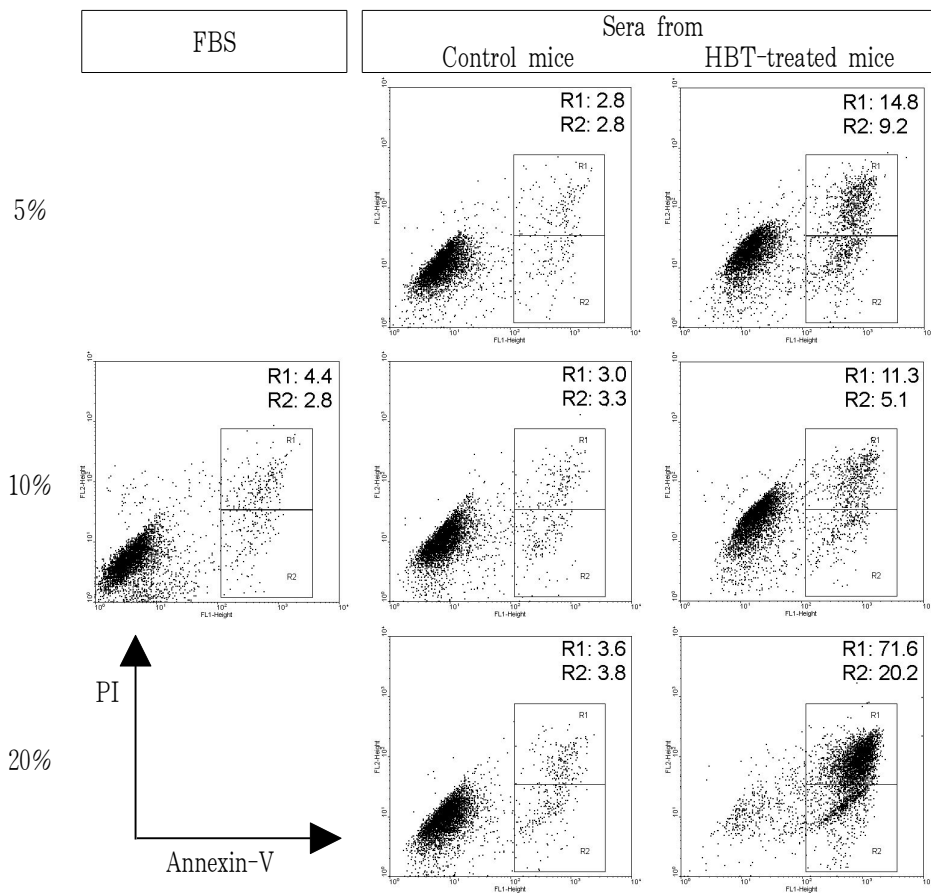


Fig. 5. Induction of apoptosis by sera from HBT-treated mice.

HBT (50 mg) was administered for 12 days and obtained serum (5-20%) or FBS (10%) was added in culture medium for B3CA. After 24 hrs of culture, cells were harvested and apoptosis was determined with FITC-Annexin-V and PI staining followed by flow cytometry.

5. 항백탕(HBT)의 투여에 의한 복강 내 백혈구 분포의 변화

위의 실험 결과에 의하면, 복강으로 투여한 항백탕(HBT)이 암세포의 성장을 억제하는 흡수된 유효 성분이 전신적으로 작용하여, 직접적인 Apoptosis를 유도하기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 항백탕(HBT)의 투여가 암세포에 대한 면역반응을 증가시켜 암세포의 성장을 억제할 가능성도 배제할 수 없다. 이에 항백탕(HBT) 투여 3일 후 복강을 PBS로 세척하여 Diff-Quick 염색 시약을 이용하여 림프구의 분포를 조사하여 항백탕(HBT)에 의한 복강 백혈구의 분포 변화를 실험하였다. 그 결과 대조군에 비해 항백탕(HBT) 50 mg 투여군에서는 1일 후 3배 정도 ($4.2 \times 10^6 \rightarrow 1.2 \times 10^7$), 3일 후에는 9배 정도 복강내 백혈구 수가 증가하였다 ($4.5 \times 10^6 \rightarrow 4.2 \times 10^7$) (Fig 6A). 또한 3일째에 조사한 결과, 대조군은 림프구가 80% 이상이었으나, 항백탕(HBT) 50 mg 투여군에서는 90% 이상이 호중구로서 (Fig 6B), 증가한 세포 대부분이 호중구임을 확인하였다. 이와 같은 결과는 항백탕(HBT)이 백혈구의 활성을 조절할 수 있음을 시사하는 것으로서 이와 같은 기전이 항종양 효과에 기여하는지 확인하기 위해서는 추가의 실험이 필요할 것으로 생각된다.

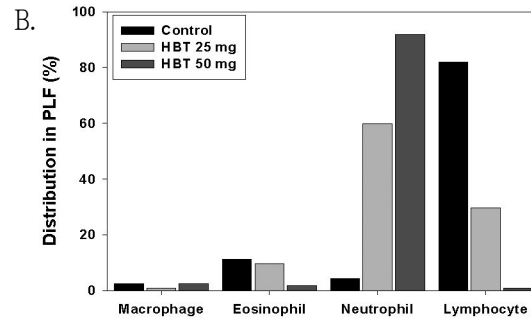
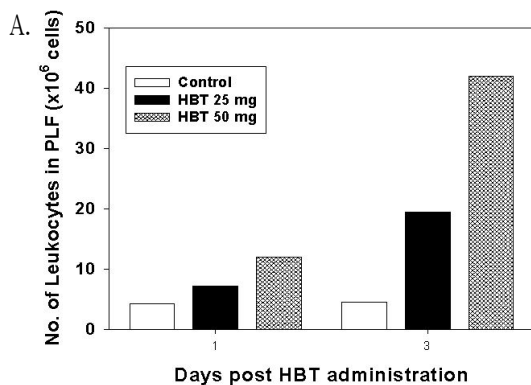


Fig. 6. Changes in total leukocyte numbers (A) and proportions of leukocyte subpopulations (B) in peritoneal lavage fluid (PLF) by HBT treatment.

HBT (50 mg) was administered for 3 days and total counts and differential counts in PLF were determined using hemocytometer and by microscopy with Diff-Quik-stained cytospins, respectively.

IV. 고찰

물리적 또는 화학적 암 치료 방법이 많은 부작용을 초래함으로써 새로운 치료법 개발을 위해 수많은 연구가 전세계적으로 진행되고 있으며 그 중 천연물로부터의 항암제 개발이 중요한 부분이 되고 있다¹⁾. 우리나라에서는 특히 전통 한약재의 항암 성분을 확인하려는 연구가 근래에 활발히 수행되고 있으며, 본 연구에 사용된 항백탕의 성분 약재인 백지 (*Angelica dahurica*), 패모 (*Fritillariae verticillata*), 저근백피 (*Ailanthus atissima*), 인삼 (*Ginseng Radix*), 황기 (*Astragalus membranaceus*), 상기생 (*Viscum coloratum*), 황금 (*Scutellaria Radix*), 그리고 감초 (*Glycyrrhizae Radix*) 등도 이미 항암 성분이 국내의 연구자들에 의해 확인된 바 있으며¹¹⁻¹⁵⁾, 국외에서도 HL-60 암세포를 이용한 연구 결과가 보고된 바 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

본 연구진에 의해 수립된 항백탕은 in vitro에서 HL-60 세포의 DNA 절편화와 caspase-3 및 -9의 활성화를 유도함으로써 아포토시스를 유발시켰다¹⁷⁾. 이를 토대로 본 연구에서는 암이식 마우스 모

델을 사용하여 처방을 사용하여 백혈병 치료를 위해 개발된 항백탕의 in vivo 투여 효능을 확인하고자 하였다.

먼저 본 연구에서는 in vitro에서 나타난 백혈병 세포의 증식 억제 작용이 정상 백혈구에도 나타날 수 있는지를 확인할 필요가 있다고 생각되어 in vitro에서 항백탕에 노출시킨 후 세포독성을 비교하였다. 실험 결과, 항백탕은 저농도 (62, 125 μ g/ml)에 의해서도 암세포 증식을 억제하였고, 고농도 (250, 500 μ g/ml)로 처리한 경우 1일 후에 생존세포가 대조군의 12.5%에 불과할 정도로 강한 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). 그러나 이와같은 고농도에서도 배양 3일 후까지 정상 백혈구에는 전혀 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 항백탕의 세포 증식 억제 작용이 암세포 특이적으로 나타난다는 것을 보여 주며, 또한 이와 같은 결과로 보아 항백탕은 in vivo 투여시 독성에 의한 부작용이 거의 없거나 적어도 높지 않을 것으로 기대할 수 있을 것이다. 왜냐하면 증식이 빠른 조혈계세포가 일반적인 체세포에 비해 방사선 조사나 독성물질에 보다 민감한 것으로 알려져 있기 때문이다.^{21,22)}

In vivo에서 복강 내로 투여한 항백탕은 피하에 이식한 백혈병세포주의 증식을 유의하게 억제하였고(Fig. 3), 증식 억제 인자가 체내에 유지되고 있음을 혈청을 이용하여 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 in vitro에서와 같이 암세포의 아포토시스를 유도함이 확인되었다(Fig. 5). 세포가 독성 약물이거나 부적절한 외부 환경에 의하여 사멸되는 과정은 크게 아포토시스와 괴사(necrosis)의 두 가지 기전을 통하여 일어나며 대부분의 암세포도 이들 중 하나의 과정을 반드시 거쳐 사멸된다^{15,16)}. 전자의 경우에는 염색체의 응축과 apoptotic body를 형성함으로써 염증반응을 유발하지 않는 생리적 세포사멸이며, 후자의 경우는 세포막의 파괴로 인한 세포내 활성 물질 유출이 다양한 면역 세포의 유입과 활성화 및 염증을 유발하여 주변 세포의 기능

을 억제하는 병리적 세포괴사로 알려져 있다. 전 보고에 의하면¹⁷⁾ 항백탕은 caspase-8과 -3의 활성화율을 증가시키고 이로 인하여 백혈병 종양세포인 U-937세포의 사멸을 유도시켰다. 본 연구에서는 in vivo에서 아포토시스를 유도하는 것을 확인하였고(Fig. 5) 그 기전은 조사하지 않았으나 in vitro에서와 유사한 기전을 통해 나타날 것으로 예상된다.

본 연구 결과를 종합하면, 항백탕이 in vivo에서도 암세포의 증식을 억제하며, 특히 성장 초기에 효능이 뚜렷하게 나타난다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 항백탕은 복강에 투여하였고, 흡수된 유효 성분은 옆구리에 이식한 암세포의 성장을 억제하였다. 이러한 결과는 국소부위에 주입된 항백탕의 유효 성분이 전신적으로 암세포의 증식을 억제할 수 있음을 시사하며 이는 임상 응용시 신체의 어느 부위든 용이한 부위에 투여할 수 있다는 장점이 될 수 있을 것이다. 그러나 완전한 암의 성장 억제는 보이지 못하였으며 이에 대해서는 다양한 암세포와 투여 조건 등에 대하여 추가 실험을 통해 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 관찰한 결과 중 또 하나의 흥미로운 것은 항백탕 투여 부위에 많은 수의 호중구가 이동하여 축적된다는 것이었다(Fig. 6). 호중구는 세포독성을 나타내는 등,²³⁻²⁵⁾ 항종양 작용을 나타낼 수 있으며, 이때 반응성 산소(reactive oxygen species),²³⁾ 차아염소산(hypochlorous acid: HOCl),²⁴⁾ 등의 세포독성 매개물 또는 항체의존성 세포파괴능(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC)²⁵⁾ 등의 기작이 작용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 특히 호중구는 암세포에 대해 24시간 이내에 세포독성을 나타내나 이때 생존한 암세포들은 증식능력을 회복하여 결국 암세포 성장이 대조군 수준과 차이가 없게 된다는 이전 보고가²⁶⁾ 본 연구에서 관찰된 바와 유사하다는 점에 주목된다. 따라서 본 연구 결과는 항백탕이 면역세포 기

능의 조절을 통하여 암세포의 성장을 억제할 가능성을 제시하였으며, 항백당의 임상 응용을 위해서는 추가 연구를 통하여 자세히 확인해야 할 과제인 것으로 생각된다.

V. 결 론

항백당(HBT)은 저농도 (62, 125 $\mu\text{g/ml}$)에 의해서도 암세포 증식을 억제하였고, 고농도 (250, 500 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 경우 1일 후에 생존세포가 대조군의 12.5%에 불과할 정도로 강한 세포독성을 나타내었다. 그러나 이와 같은 고농도에서도 배양 3일 후까지 정상 백혈구에는 전혀 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

In vivo에서 복강 내로 투여한 항백당(HBT)은 피하에 이식한 백혈병세포주의 증식을 유의하게 억제하였고, 증식 억제 인자가 체내에 유지되고 있음을 혈청을 이용하여 확인할 수 있었다. 또한 in vitro에서와 같이 암세포의 Apoptosis를 유도함이 확인되었으며, 또한 항백당(HBT) 투여 부위에 많은 수의 호중구가 이동하여 축적되었다.

이와 같은 연구 결과로 보아 항백당(HBT)이 면역세포 기능의 조절을 통하여 암세포의 성장을 억제할 가능성을 제시하였으며, 항백당(HBT)의 임상 응용을 위해서는 추가 연구를 통하여 자세히 확인해야 할 과제인 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2009년도 원광대학교의 교비지원에 의하여 수행됨

참고문헌

- Schwartzmann G., Ratain MJ, Cragg GM, Wong JE, Saijo N, Parkinson DR, Fujiwara Y, Pazdur R, Newman DJ, Dagher R, Di Leone L. Anticancer Drug Discovery and Development Throughout the World. *J Clin Oncol.* 2002;20:47s-59.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer Statistics 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006;56:106-30.
- 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료, 원광대학교 출판국. 1999:742-93.
- Ruddon, RW. Chemical carcinogenesis. In principles of drug action (3rd.). Churchill Livingstone. 1990:735.
- Ito N, Shimura, K. Studies on antitumor activity of traditional Chinese medicines. *Jpn J Cancer Chemother.* 1985;12:2149.
- Panchal RG. Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 1998;55:247-2.
- Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs.* 1994;5:3-9.
- Watson AJ. Manipulation of cell death-the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1995;9:215-6.
- Cragg GM, Newman DJ: Medicinals for the millennia: The historical record. *Ann NY Acad Sci.* 2001;953:3-25.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM: The influence of natural products on drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2000;17:215-34.
- 배현욱, 임창경, 장선일, 한동민, 안원근, 윤유식, 전병훈, 김원신, 윤용갑. 항 백혈병 작용에 관련된 천연물 자료 조사. *동의생리병리학회지.* 2003;17:605-10.
- Pae HO, Oh H, Choi BM, Oh GS, Paik SG, Jeong S, Hwang KM, Yun YG, Chung HT.

- Differentiation-inducing effects of verticinone, and isosteroidal alkaloid isolated from the bulbous of *Fritillaria ussuriensis*, on human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:1409-11.
13. Pae HO, Oh H, Yun YG, Oh GS, Jang SI, Hwang KM, Kwon TO, Lee HS, Chung HT. Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome *c*-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol.* 2002;91:40-8.
 14. Kim YS., Jin SH. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis via activation of caspase-1 and -3 and up-regulation of Bax in human neuroblastoma. *Arch Pharm Res.* 2004;27:824-9.
 15. 이기욱, 栲根白皮 추출물에 의한 급성림프성백혈병 jurkat Lymphocytes의 세포고사 유도 및 신호기전 연구, 원광대학교 대학원 한의학과. 2002.
 16. 윤용갑, 동의방제와 처방해설, 서울:의성당. 2002:25.
 17. 김용준, 전병훈, 주성민, 이장천, 박양구, 이상현, 전영균, 황주민, 임대환, 윤용갑. 항백탕 추출물의 인간 백혈병 세포주 HL-60에서 항백혈병 효과. *동의생리병리학회지.* 2005;19(3):633-9.
 18. Mori H, Niwa K, Zheng Q, Yamada Y, Sakata K, Yoshimi N. Cell proliferation in cancer prevention: effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an in vitro model in human colorectal cells. *Mutat Res.* 480-481:201-207, 2001.
 19. Lian Z, Niwa K, Gao J, Tagami K, Mori H, Tamaya T. Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line. *Cancer Detect Prev.* 2003;27:147-54.
 20. Yang JH, Chou CC, Cheng YW, Sheen LY, Chou MC, Yu HS, Wei YH, Chung JG. Effects of glycolic acid on the induction of apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia cell line (HL-60). *Food Chem Toxicol.* 2004;42:1777-84.
 21. Tannock IF. Tumor growth and cell kinetics. In *The basic Science of Oncology*, Ed. Tannock IF, Hill RP. New York:Pergamon Press. 1987 :150-1.
 22. Anderson RE, Warner NL. Ionizing radiation and the immune response. *Adv Immunol.* 1976 :24:215-335.
 23. Dallegri F, Ottonello L, Ballestrero A, Dapino P, Ferrando F, Patronel F, Sacchetti C. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation.* 1991;15:15-30.
 24. Vedder NB, Fonty BW, Winn RK, Harlan JM, Rice CL. Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery.* 1989;106:509-16.
 25. Kindzelskii AL, Petty HR. Early membrane rupture events during neutrophil-mediated antibody-dependent tumor cell cytolysis. *J Immunol.* 1999;162:3188-92.
 26. Ackermann MF, Lamm KR, Wiegand GW, Luster MI. Antitumor activity of murine neutrophils demonstrated by cytometric analysis. *Cancer Res.* 1989;49:528-32.