

白頭翁湯의 대장암 세포주 HCT-116 항암효과와 세포자멸사에 관한 연구

김종욱****, 문 구*, 박찬희**, 이정환**, 지혜민**

*원광대학교 한의과대학 내과학교실, **원광대학교 의과대학 미생물학교실, ***우석대학교 부속한방병원 침구과

Studies on the Anti-cancer Effect and the Mechanism of Apoptosis by *Baekduong-tang* in Human Colon Cancer Cell Line HCT-116

Jong-uk Kim****, Goo Moon*, Channy Park**, Jeong-han Lee**, Hye-min Ji**

*Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

**Dept. of Microbiology, College of Medicine, Wonkwang University

***Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Woosuk University Hospital of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : To investigate the anti-cancer effect of *Baekduong-tang*(BDOT) against cancer cells, the signaling pathway of apoptosis was explored in human colon cancer cells.

Materials and Methods : Human colon cancer cell lines, including HT-29 and HCT-116 cells, were used. Cell viability was measured by MTT assay. Apoptosis was determined by DAPI nuclei staining and flow cytometry in HCT-116 cells treated with 0.25 mg/ml *Baekduong-tang* for 48 hrs.

Results : *Baekduong-tang* induced the apoptosis of p53 positive HCT-116 cells with G2/M phase arrest. Treatment with *Baekduong-tang* led to increased expression and phosphorylation of p53 and decreased expression of CDK2 and CDK6 in HCT-116 cells. It also activated caspase-3 through caspase-10 and caspase-9 activation. Finally, *Baekduong-tang* induced production H_2O_2 , superoxide anion (O_2^-) and NO and modulated proteins expression including SOD, NOS, Bax and Bel-2.

Conclusions : These results indicate *Baekduong-tang* induces apoptotic death of HCT-116 cells through G2/M phase arrest and disturbance of intracellular redox status in a p53-dependent manner.

Key words : *Baekduong-tang*(BDOT), colon cancer, HCT-116 cells, apoptosis

1. 緒 論

癌은 정상세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성되어 종괴(腫塊) 또는 종양을 형성하는 것으로

국내의 경우 사망 원인 1위를 차지하고 있다¹. 특히 대장암의 경우 식생활의 서구화에 따라 차츰 그 발생빈도가 늘어나고 있으며, 전체 발생 암 중 대장암의 발생률은 2002년 3위(11.2%)에서 2005년 2위(12.4%)로 매년 증가하는 추세에 있다².

대장암은 그 증상으로 암의 일반적인 증상과 함께 복통, 설사 또는 변비, 잔변감, 혈변 등 다양하게 나타날 수 있으며³, 원인은 아직 불분명하지만 유전적 요인보다 식이, 환경적 요인이 크게 작용할

· 교신저자: 김종욱 전북 전주시 완산구 중화산동2가 5번지
우석대학교의료원 전주한방병원
TEL: 063-220-8622 FAX: 063-220-8400
E-mail: ju1110@hanmail.net

것으로 추측되고 있다⁴. 대장암은 전암성 병변인 선종 단계에서 발견하여 제거하면 예방이 가능하고 조기에 진단하면 수술적 치료, 방사선 치료, 항암제 치료, 면역 치료, 내시경적 치료 등을 통해 완치도 가능하다⁵. 하지만 수술적 요법, 항암화학요법 및 방사선요법 등의 진보에도 불구하고 예후의 극적인 진전은 이루지지 않고 있다. 대장암 환자의 생존율은 진단 시의 임상적 및 병리학적 병기와 밀접한 관계를 보이는데 암종이 장관벽내에 국한된 경우 5년 생존율이 90%에 달하나 임파선 전이의 경우에는 35~60%, 원격 전이의 경우는 10% 이하로 급격한 저하를 보여 무엇보다도 조기진단이 중요시 된다⁶.

최근 들어 대장암의 발병률이 증가함에 따라 대장암 관련 한의학 연구들도 활발히 이루어지고 있다. 金 등⁷은 當歸補血湯의 배합비율에 따른 대장암 세포주 HCT-116의 세포사멸 효과에 대해 보고하였으며, 金 등⁸은 二妙散에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 Caspases 활성화를 매개로 한 세포사멸에 대하여 보고하는 등 다양한 연구 결과들이 발표되고 있다. 또한 斑蝥⁹, 肉桂¹⁰, 榆白皮¹¹, 蔓荊子¹² 등 단일 한약재의 대장암에 대한 항암효과도 보고되고 있다.

白頭翁湯은 白頭翁, 黃柏, 秦皮, 黃連으로 구성된 처방으로 구성 약재들은 본초학적 분류상 모두 清熱藥에 해당하며¹³, 각각 항암 및 항산화 효과가 보고되어 있다¹⁴⁻¹⁸.

白頭翁湯에 대해 《傷寒論》¹⁹, 《東醫寶鑑》²⁰에서는 주로 ‘熱利下重’이나 ‘少陰病 下利欲飲水’ 등에 사용하는 처방으로 언급되어 있다. 여러 문헌들에서 白頭翁湯에 관련해 언급된 증상들은 대장암에서도 나타날 수 있으며, 실제 임상에서도 潘²¹, 孫²² 등은 변증에 따라 白頭翁湯加減을 대장암의 치료 처방으로 제시하고 있다. 하지만 현재까지 白頭翁湯의 항암효과에 관한 연구 보고는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 白頭翁湯의 항암효과와 그 기전을 확인하기 위해 사람 대장암 세포주 HCT

-116에 白頭翁湯을 처리하여 세포생존율, 세포주기, caspase 단백질의 활성 변화, 활성산소종(ROS)과 NO의 생성 및 Bcl-2 family 단백질군의 발현 변화 양상 등을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 약재

본 실험에 사용된 藥材는 원광대학교 전주한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였다. 白頭翁湯은 《東醫寶鑑》²⁰에서 언급된 배합비율에 따라 조제하여 사용하였으며 1貼의 분량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Composition and amount of *Baekdulong-tang* (BDOT)

Herbal name	Crude drugs name	Scientific name	Dose (g)
白頭翁	Pulsatillae Radix	<i>Pulsatilla koreana</i> NAKAI.	6
黃柏	Phellodendri Cortex	<i>Phellodendron amurense</i> RUPR.	6
秦皮	Fraxini Cortex	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> HANCE.	6
黃連	Coptidis Rhizoma	<i>Coptis chinensis</i> FRANCH.	6
Total amount			24

2) 세포주

사람 대장암 세포주인 HT-29와 HCT-116은 한국세포주은행(서울대학교)으로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 RPMI1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA) 제품을, 배양용기(24 well plate와 10cm

dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), DAPI, biconchonic acid (BCA), dimethyl sulfoxide (DMSO), PI, DCF-DA 및 DAF-DA는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였으며, HE는 Molecular Probes사(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 p53, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6 및 β -actin 등의 antibodies는 Santa Cruz사(San Joes, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 方法

1) 시료의 조제

실험에 사용된 약제는 물을 용매로 추출하였다. 물 추출물은 陰乾된 白頭翁湯 2貼 분량을 물 1000 ml와 함께 약탕기에서 2시간 끓여 얻은 煎湯液 390 ml를 거즈로 여과하고 3200 rpm으로 20분간 원심 분리 후 농축기(Rotary evaporator)로 농축한 다음 -70°C (Deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조 시켜 4.8 g의 시료를 얻었다.

2) 세포주 배양 및 시약처리

HT-29 및 HCT-116 세포는 CO₂ 세포 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI1640 배지로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 白頭翁湯을 처리한 후 세포자멸사 현상과 이에 연관된 생화학 실험을 수행하였다. 白頭翁湯은 200 mg/ml 농도로 DMSO에 녹여서 최고 농도 사용 시 DMSO의 농도가 배양액의 1% 이내에서 자체 독성이나 효과를 확인한 후 사용하였다.

3) 세포생존율 측정

세포의 생존율 측정은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵ 세포수/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정한 후 시료를 각각의 조건에

따라 처리하였다. 각각의 배양세포에 배양액의 1/10로 MTT용액(5 mg/ml in PBS)을 첨가하였다. 4시간 후, 배양액을 제거하고 1 ml DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 다음, 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) 세포주기 분석(Flow cytometry)

세포주기 및 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보기 위해 propidium iodide (PI)로 DNA를 염색한 후에 Flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 세포에 白頭翁湯을 처리하여 48시간 후에 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척한 세포(1×10⁶)의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20 μ g/ml PI, 200 μ g/ml RNase)을 600 μ l로 20분 반응하였다. Flow cytometry의 각 분획 및 sub G0/G1로 얻어진 정보는 CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 세포자멸사 및 세포주기를 분석하였다.

5) DAPI 염색

白頭翁湯을 처리한 세포를 4% formaldehyde 용액에 고정된 후 PBS로 세척하고, 10 μ M DAPI로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS60, Germany)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

6) Western blot analysis

배양된 HT-29 및 HCT-116 세포는 포집하여, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)과 4°C에서 30분 반응하였다. BCA로 단백질 양을 정량한 후 동량의 세포파쇄액(200 μ g)과 2× sample buffer를 혼합하여 100°C에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후에 12.5% 및 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 electrotransfer system (Ellard Inc, Seattle, WA,

USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 nitrocellulose membrane 으로 이동시키고, blocking buffer (5% skim milk) 와 상온에서 2시간 반응하였다. phospho-p53, p53, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, NOS1, NOS2, NOS3 및 β -actin에 대한 항체는 0.05% (v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline (TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응하였으며, 각 항체에 대한 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)와 anti-mouse IgG conjugated HRP는 TBS-T로 희석(1:3,000)하여 상온에서 1시간 반응한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham, England)를 이용하여 현상하였다.

7) 세포내 활성산소종(ROS)과 NO 생성의 측정
白頭翁湯에 의한 세포내 활성산소종(ROS) hydrogen peroxide(H_2O_2), superoxide anion (O_2^-)과 NO 생성을 측정하기 위하여 각각 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma), hydroethidium (HE; Molecular probe)과 2',7'-diaminofluorescein diacetate (DAF-DA; Sigma)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 녹색의 형광으로 변환되고, HE는 세포내 superoxide anion (O_2^-) 존재 시 적색의 형광으로 변환되며, DAF-DA는 세포내 NO 존재 시 형광의 DAF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. 세포에 白頭翁湯을 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 μ M DCF-DA와 5 μ M HE를 처리하여 37°C에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS (pH 7.4)로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하여 Flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하고 CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

8) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과와 통계처리는 Origin 7.5의 one way ANOVA에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치

0.05 ($p < 0.05$) 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 實驗結果

1. 白頭翁湯이 대장암 세포주 HT-29 및 HCT-116의 세포생존율에 미치는 영향

白頭翁湯의 항암효과를 조사하기 위하여 대장암 세포주인 HT-29 및 HCT-116 세포에 白頭翁湯을 각각 처리하여 白頭翁湯에 의한 시간 및 농도 의존적인 세포생존율의 변화를 MTT assay로 측정하였다. 먼저 白頭翁湯을 다양한 농도로 각각의 세포에 48시간 처리하여 배양한 결과 HT-29 세포에서는 0.125 mg/ml의 농도에서 87%, 0.25 mg/ml 농도에서 69%, 0.5 mg/ml에서 28%, 1 mg/ml에서 31%, 그리고 2 mg/ml에서 6%의 세포생존율을 보였으며, HCT-116 세포에서는 0.125 mg/ml의 농도에서 63%, 0.25 mg/ml 농도에서 25%, 0.5 mg/ml에서 23%, 1 mg/ml에서 24%, 그리고 2 mg/ml에서 5%의 세포생존율로 유의한 농도 의존적인 세포독성을 보였다 (Fig. 1A). 白頭翁湯을 0.25 mg/ml 농도로 다양한 시간 동안 HT-29 및 HCT-116 세포에 각각 처리하였을 경우, HT-29 세포에서는 6시간에 99%, 12시간에 94%, 24시간에 70%, 36시간에 55%, 그리고 48시간에 51%의 세포생존율을 보였으며, HCT-116 세포에서는 6시간에 100%, 12시간에 64%, 24시간에 33%, 36시간에 18%, 그리고 48시간에 12%의 세포생존율로 유의한 시간 의존적인 세포독성을 보였다(Fig. 1B).

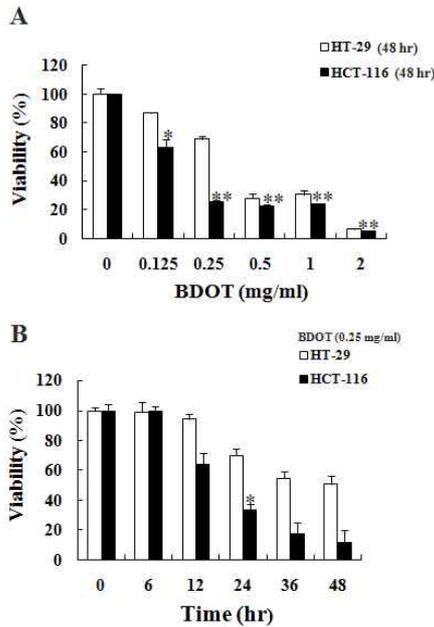


Fig. 1. Dose and time dependent effects of *Baekduong-tang*(BDOT) on viability of human colon cancer cells.

Cells were treated with various concentrations of *Baekduong-tang*(BDOT) for indicated periods. Then cell viability was measured by MTT assay. A. Dose and B. Time dependent manner. The data represent the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

2. 白頭翁湯이 대장암 세포주 HCT-116에서 p53 단백질의 발현 변화에 미치는 영향

白頭翁湯에 의한 세포죽음이 p53 발현 세포주인 HCT-116에서 더 민감하였으므로, p53 단백질의 발현 변화와 인산화를 Western blot 분석법으로 조사하였다. HCT-116 세포에 0.25 mg/ml 농도의 白頭翁湯을 다양한 시간 동안 처리한 결과, p53 단백질의 인산화는 白頭翁湯 처리 6시간부터 시간 의존적으로 증가하여 36시간에 최고의 발현을 보였

으며, p53 단백질도 白頭翁湯 처리 6시간 후부터 시간 의존적으로 증가하여 24시간부터 현저히 발현이 증가되었다. 이때 단백질양은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다(Fig. 2).

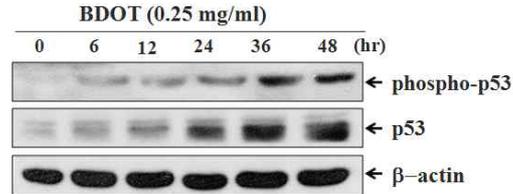


Fig. 2. Expression of p53 and phospholylated p53 protein in BDOT treated HCT-116 cells.

The expression of p53 was measured by Western blotting. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 10% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-p53, anti-phospho-p53 and anti- β -actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit.

3. 白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포주기의 변화

白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116 세포 사멸에서 세포주기의 변화를 확인하기 위해서 PI 염색을 통한 Flow cytometry 분석을 시행하였다. HCT-116 세포에 0.25 mg/ml의 白頭翁湯을 다양한 시간별로 처리하였다. 그 결과 G1기 분획은 대조군에서 48%, 6시간에는 19%, 12시간에는 14%, 24시간에는 43%, 36시간에는 29%, 48시간에는 11%로 감소하였다(Fig. 3A). 반면 G2/M기는 대조군에서 21%, 6시간에는 47%, 12시간에는 48%, 24시간에는 19%, 36시간에는 34%, 48시간에는 39%로 증가되었다(Fig. 3A). 이때 G1기와 G2/M기 분획을 히스토그램으로 그림 4B와 C에 나타내었다(Fig. 3B and C).

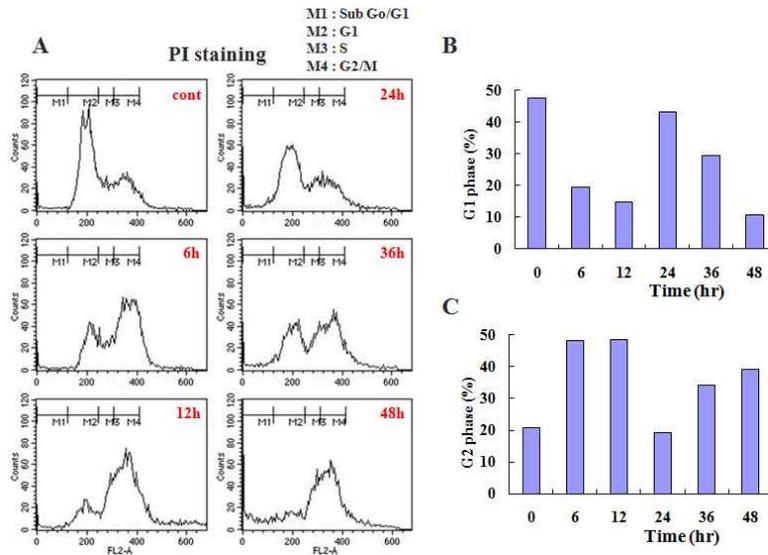


Fig. 3. BDOT induced cell cycle arrest at G2/M phase in HCT-116 cells.

Cells were treated with BDOT (0.25 mg/ml) for indicated periods. After PI staining, the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry.

4. 白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포주기 관련 단백질의 발현 변화

白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포사멸에서 세포주기 분석결과 G2/M 분획의 arrest가 축적되었으므로 관련 단백질의 발현 변화를 조사하기 위하여 Western blot을 수행하였다. CDK2 단백질은 白頭翁湯 처리 6시간부터 증가하다 24시간에 현저히 감소하였으며 白頭翁湯 처리 36시간 후에 다시 증가하여 48시간까지 발현 증가된 상태가 유지되었다. Cyclin E 단백질은 白頭翁湯 처리 6시간 후에 증가하여 12시간까지 유지되다가 24시간 이후 점차 감소하는 양상을 보였다. CDK4 단백질은 白頭翁湯 처리 24시간에 발현이 일시적으로 감소하는 경향을 보였으며, CDK6 단백질은 白頭翁湯 처리 6시간에 증가하다가 시간 의존적으로 감소하였다(Fig. 4). 이때 단백질양은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다.

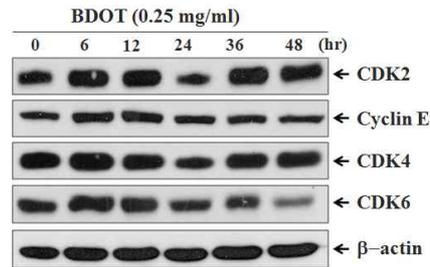


Fig. 4. BDOT modulated the expression of cell cycle regulatory proteins on HCT-116 cells.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for indicated time periods. Cell lysates were separated on 12.5% SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies for CDK2, Cyclin E, CDK4, CDK6 and β -actin. The immunoreactive signals were visualized by ECL detection kit.

5. 白頭翁湯이 대장암 세포주 HCT-116의 세포사멸에서 sub G0/G1 분획 변화에 미치는 영향

白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포사멸에서 PI 염색을 통한 Flow cytometry 분석을 통해 sub G0/G1 분획의 변화를 조사하였다. 세

포핵의 분절을 나타내는 sub G0/G1 분획은 대조군에서 1.0%이었고 0.25 mg/ml 농도의 白頭翁湯 처리 6시간 후에 0.9%, 12시간 후에 1.3%, 24시간 후

에 4.2%, 36시간 후에 3.9% 그리고 48시간 후에 11.5%로 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 5).

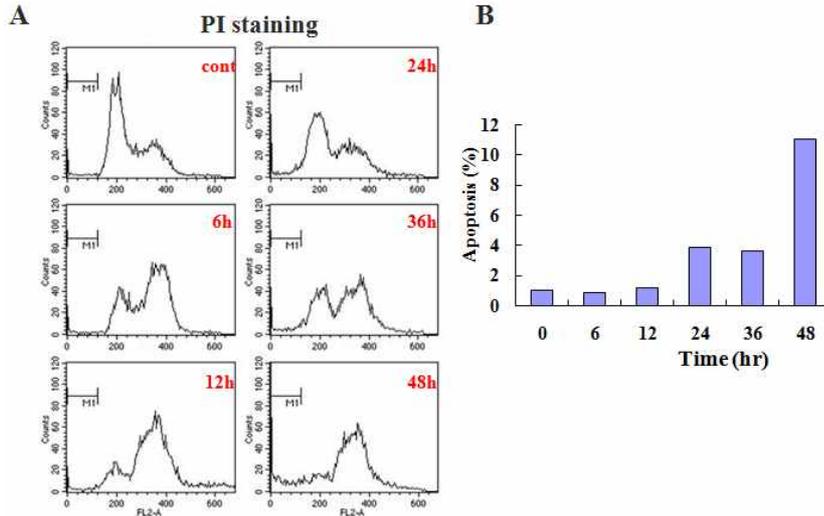


Fig. 5. BDOT induced apoptosis in HT-116 cells in a time-dependent manner.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for indicated periods. After PI staining, the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry.

6. 白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포사멸에서 세포죽음 성격 규명

白頭翁湯에 의한 세포죽음이 세포자멸사 기전에 의하여 매개됨을 확인하고자 세포자멸사 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 핵산의 DAPI 염색을 수행하였다. HCT-116 세포에 白頭翁湯을 각각 0.125, 0.25 및 0.5 mg/ml의 농도로 48시간 처리한 후 DAPI 염색을 시행한 결과, 정상 대조군의 핵은 타원형의 온전한 형태의 균질한 형광 염색을 나타냈으나(Fig. 6A), 白頭翁湯 처리군의 핵은 여러 조각으로 분절된 형광 절편이 농도 의존적으로 증가되어 관찰되었으며 이때 세포 수의 감소와 모양의 변화가 동반되었다(Fig. 6B, C and D).

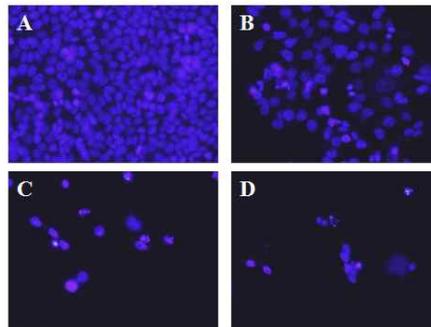


Fig. 6. BDOT induced the morphological change in HCT-116 cells in a dose-dependent manner.

Cells were treated with BDOT for 48 hrs. Then, cells stained with DAPI and observed under fluorescence microscopy. A. control, B. 0.125 mg/ml, C. 0.25 mg/ml and D. 0.5 mg/ml of BDOT.

7. 白頭翁湯이 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 caspase 단백질의 활성 변화에 미치는 영향

세포자멸사의 특징적인 현상을 초래하는 세포내 신호전달 기전에서 caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있다. 白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사 현상이 caspase 단백질의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 Western blot 분석법을 통해 조사하였다. HCT-116 세포에 0.25 mg/ml 농도의 白頭翁湯을 다양한 시간 처리한 후 각각의 세포를 포집, 파쇄하여 세포 부유액으로부터 procaspase-3 단백질의 발현을 조사하였다. 그 결과 procaspase-3 단백질은 白頭翁湯 처리 12시간부터 감소하기 시작하여 시간 의존적인 분해가 관찰되었다(Fig. 7). 또한, caspase-3의 상방 단백질인 caspase-8 단백질 발현은 白頭翁湯 처리 시간에 따른 변화는 관찰되지 않았으나, 활성화된 caspase-10, caspase-9 단백질 발현은 白頭翁湯 처리 6시간 후에 현저히 증가하여 48시간까지 발현 증가가 유지되었다(Fig. 7). 이때 단백질양은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다.

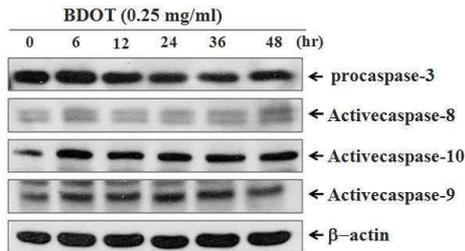


Fig. 7. Expression of Procaspase-3 proteins in

BDOT-treated HCT-116 cells.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for indicated time periods. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 10% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-procaspase-3, anti-activecaspase-8, -10, -9 and anti- β -actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit.

8. 白頭翁湯이 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 세포내 활성산소종(ROS) 생성에 미치는 영향

白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 세포내 활성산소종(ROS)의 생성을 형광염색을 통해 조사하였다. 먼저 세포내 H_2O_2 의 생성은 DCF-DA로 염색하여 Flow cytometry를 통하여 조사하고 M1 값으로 표시하였다. 그 결과, 0.25 mg/ml 농도의 白頭翁湯 처리 시 대조군에 비하여 6시간 처리군에서는 15%, 12시간 처리군에서는 19%, 24시간 처리군에서는 7%, 36시간 처리군에서는 21%, 그리고 48시간 처리군에서는 36%가 증가된 양상을 보였다(Fig. 8A). 이때 대조군에 비해 증가된 H_2O_2 의 양은 히스토그램으로 표현하였다(Fig. 8B). 또한 세포내 superoxide anion (O_2^-)을 HE로 염색하였을 경우, 대조군을 기준으로 6시간 처리군에서는 22%, 12시간 처리군에서는 25%, 24시간 처리군에서는 2%, 36시간 처리군에서는 17%, 그리고 48시간 처리군에서는 33%가 증가된 양상을 보였다(Fig. 9A). 이때 대조군에 비해 증가된 superoxide anion (O_2^-)의 양은 히스토그램으로 표현하였다(Fig. 9B).

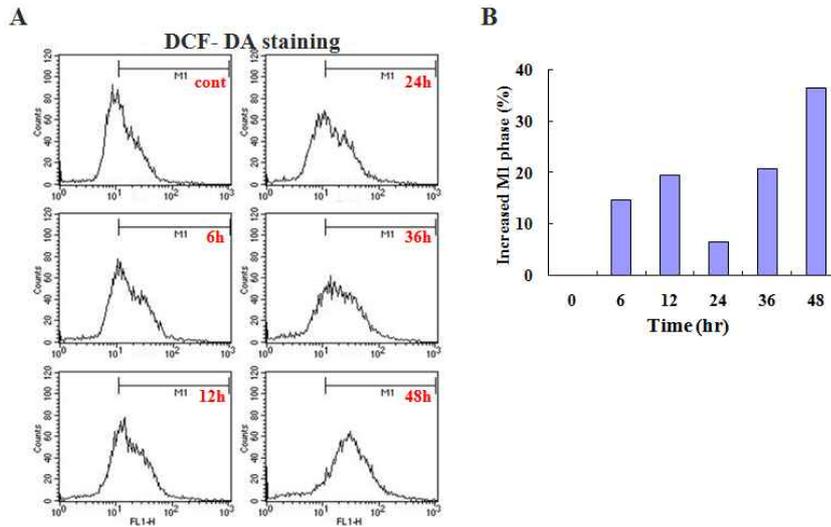


Fig. 8. Production of H_2O_2 in BDOT treated HCT-116 cells.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for various periods. Then, cells were incubated with the dye DCF-DA (5 μ M) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry.

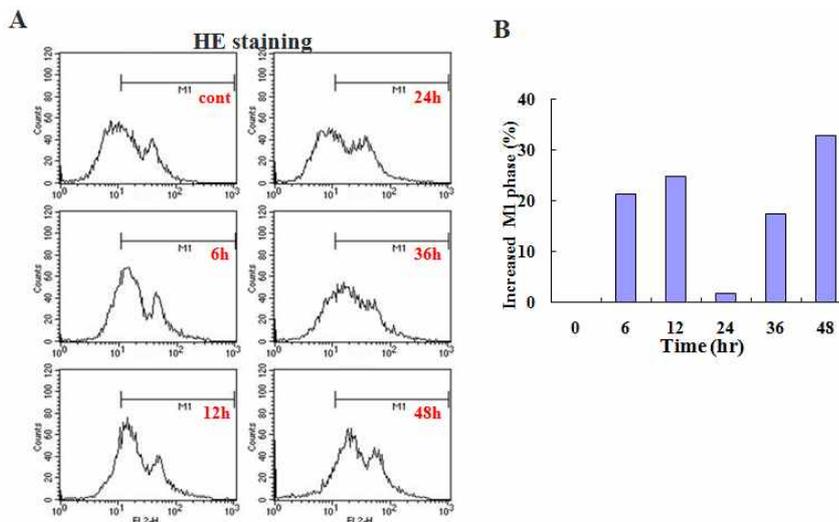


Fig. 9. Production of superoxide anion (O_2^-) in BDOT treated HCT-116 cells.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for various periods. Then, cells were incubated with the dye HE (5 μ M) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry.

9. 白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 항산화 단백질의 발현 변화에 미치는 영향

白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 활성산소를 제거하는 세포내 단백질들의 연관성을 조사하고자 항산화단백질들의 발현

변화를 Western blot 분석법으로 확인하였다. 0.25 mg/ml 농도의 白頭翁湯을 HCT-116 세포에 다양한 시간 처리하였을 경우, SOD1 단백질은 白頭翁湯 처리 6시간에 대조군보다 발현이 감소하였으며 점차 시간 의존적으로 증가하기 시작하여 白頭翁湯 처리 48시간에 대조군 수준으로 회복되었다. SOD2 단백질은 白頭翁湯 처리 6시간부터 발현이 시간 의존적으로 증가하였고, GSS 단백질은 白頭翁湯 처리 24시간부터 시간 의존적으로 발현이 증가하는 양상을 보였다. 또한 catalase 단백질은 白頭翁湯 처리 12시간부터 시간 의존적으로 증가하기 시작하여 36시간에 최대의 발현양을 보이다가 48시간에 감소하였다. 그러나 HO-1 단백질은 정확한 발현 변화를 관찰하기가 어려웠다(Fig. 10). 이때 단백질양은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다.

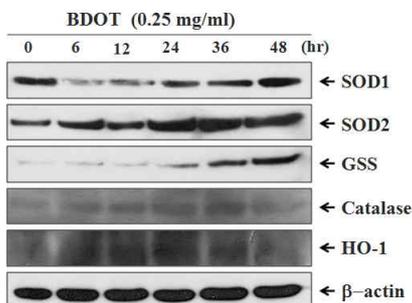


Fig. 10. Expression of antioxidant enzymes in BDOT-treated HCT-116 cells.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for indicated time periods. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 12% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-SOD1, -2, anti-GSS, anti-catalase, anti-HO-1 and anti- β -actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit.

10. 白頭翁湯이 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 Bcl-2, Bcl-xL 및 Bax의 발현 변화에 미치는 영향

白頭翁湯의 처리에 의하여 p53 발현 세포주인 HCT-116 세포에서 유도된 세포자멸사 현상의 과정에서 세포자멸사 신호전달계의 중요 신호전달 분자인 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bcl-2, Bcl-xL 및 Bax의 발현을 단백질 수준에서 조사하였다. 먼저, 0.25 mg/ml 농도의 白頭翁湯을 다양한 시간 처리 후 각각의 세포를 포집, 파쇄하여 세포 부유액으로부터 Bcl-2, Bcl-xL 및 Bax 단백질의 발현을 Western blot 분석법으로 조사하였다. 그 결과 白頭翁湯 처리 시 세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2 단백질의 발현이 白頭翁湯 처리 6시간 후에 증가하였다가 감소하여 白頭翁湯 처리 24시간에 대조군에 비하여 발현이 현저하게 감소하였으며, 36시간에 대조군 수준으로 회복되었다. 또 다른 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-xL도 Bcl-2와 동일한 양상을 보였다. 반대로 세포사멸을 촉진하는 Bax 단백질의 발현은 白頭翁湯 처리 6시간부터 현저하게 증가되었으며 점차 발현이 감소하였으나 대조군에 비하여 증가된 양상이었다(Fig. 11). 이때 단백질양은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다.

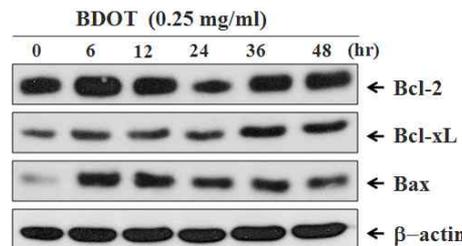


Fig. 11. Expression of Bcl-2 family proteins in BDOT-treated HCT-116 cells.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for indicated time periods. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 12% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-Bcl-2 anti-Bcl-xL, anti-Bax and anti- β -actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit.

11. 白頭翁湯이 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 세포내 NO 생성 및 NOS 단백질 발현 변화에 미치는 영향

白頭翁湯에 의한 대장암 세포주 HCT-116의 세포자멸사에서 세포내 NO의 생성을 형광염색을 통해 조사하였다. 먼저 세포내 NO의 생성은 DAF-DA로 염색하여 Flow cytometry를 통하여 조사하고 M1 값으로 표시하였다. 그 결과 0.25 mg/ml 농도의 白頭翁湯 처리 시 대조군에 비하여, 6시간 처리군에서는 57%, 12시간 처리군에서는 57%, 24시간 처리군에서는 54%, 36시간 처리군에서는 56%,

그리고 48시간 처리군에서는 57%가 증가된 양상을 보였다(Fig. 12A). 이때 대조군에 비해 증가된 NO의 양은 히스토그램으로 표현하였다(Fig. 12B). 또한 세포내 NO 합성 효소인 NOS의 발현을 Western blot 분석법으로 조사하였다. 그 결과 NOS1 및 NOS2는 白頭翁湯 처리 12시간부터 감소하여 시간 의존적인 발현 감소를 보였으나 NOS3는 白頭翁湯 처리 6시간부터 현저하게 발현이 증가하여 48시간까지 유지되었다(Fig. 12C). 이때 단백질의 양은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다.

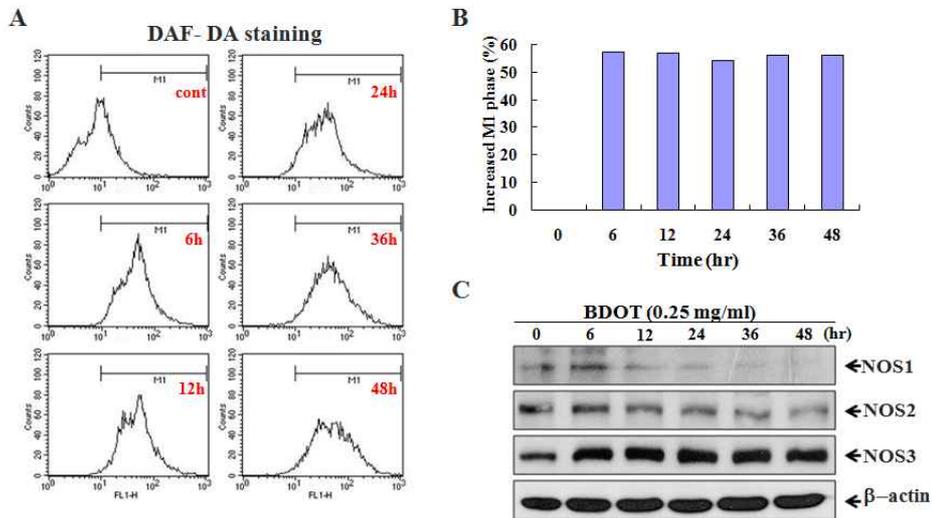


Fig. 12. Production of NO and expression of NOS proteins in BDOT treated HCT-116 cells.

Cells were treated with 0.25 mg/ml BDOT for various periods. A, B. Then, cells were incubated with the dye DAF-DA (5 μ M) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry. C. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 10% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-NOS1, anti-NOS2, anti-NOS3 and anti- β -actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit.

IV. 考 察

‘암(cancer)’이란 좁은 의미로는 악성 상피성 종양(malignant epithelial tumor)을 지칭하는 말이나, 일반적으로는 비상피성 종양(육종; sarcoma)을 포

함한 모든 악성 신생물(malignant neoplasm)을 일컫는다²³. 암은 세포의 증식을 조절하는 기전이 파괴되어 무분별한 세포 증식에 의해 세포 덩어리가 형성되고 결국 주변의 조직을 침범하거나 혈관을 통해 몸의 다른 부위로 전이하는 특징이 있는데

신체의 모든 기관에서 발생할 수 있으며, 뚜렷한 자극이 없는데도 불구하고 세포가 무제한 증식하여 마침내 개체를 죽음에 이르게 한다²³.

대장암은 육식을 주식으로 하는 서양인에게서 발생빈도가 높으며 중년기에 많이 발생하는 암이다²⁴. 우리나라에서도 식생활의 서구화에 따라 차츰 그 발생빈도가 증가하고 있어서 주목을 끌고 있다. 대장암의 발병은 유전적 요인보다 식이, 환경적 요인이 크게 작용할 것으로 추측되고 있는데 식이 습관의 차이에 따라 발병률이 다르며 육체적 활동량이 많은 직업에서 대장암 발병률이 낮아진다는 보고도 있다⁴. 대장암의 증상은 암의 일반적인 증상인 체중감소, 식욕감퇴, 피로감, 빈혈 등을 포함하여 해부학적 위치에 따라 우측(상행) 결장암의 경우 빈혈, 복부의 덩어리, 좌측(하행, S자) 결장암의 경우 혈변, 배변습관의 변화, 장폐쇄가 나타날 수 있고 직장암의 경우 혈변, 잔변감, 대변이 가늘어짐 등의 증상이 동반될 수 있다³. 대장암의 진단 방법은 직장수지검사, 대장 X-선 조영술, 바륨관장 검사, S-결장경검사, 대장내시경검사, 직장초음파 검사, 분변잠혈검사 및 CEA 수치검사 등이 있는데 전암성 병변인 선종 단계에서 발견하여 제거하면 예방이 가능하고 조기에 진단하면 완치도 가능하다^{5,6}. 대장암에 대한 양의학적 치료방법은 수술적 치료, 방사선 치료, 항암제 치료, 면역치료, 내시경적 치료 등이 있으며 암의 크기와 진행 정도에 따라 치료방법이 달라질 수 있다³.

한의학에서 腫瘍에 관한 기술로는 殷墟甲骨文的 '瘤'라는 병명이 최초이며²⁵, 한의학 문헌 중의 癌 혹은 岩은 그 腫塊가 岩石과 같이 단단하고 형상이 불규칙적이어서 붙은 이름이다^{26,27}. 한의학 문헌에 나타나는 腫瘍의 범주에 관하여 鬱 등^{25,28,29}은 噎膈, 反胃, 崩漏帶下, 乳岩(乳癌, 乳疔, 乳石癰), 腎岩, 失榮(石疽, 惡核), 積聚, 癥瘕, 痰癖, 癭瘤, 癰疽, 骨疽, 癩瘡, 舌菌 등은 惡性腫瘍에 속하고, 痰包, 痰核, 脂瘤, 血瘤, 氣瘤, 筋瘤, 骨瘤, 肉瘤, 耳菌, 疣, 痣, 息肉 등은 良性腫瘍에 속한다고 하였으며, 주

로 正氣虛로 인한 氣血阻滯, 血瘀, 痰飲, 濕熱蓄毒 등에 의해서 발생하는 것으로 보았다.

한의학 문헌에서 '大腸癌'이라는 명칭은 없으나, 대장암의 대표적인 임상증상 및 특징인 便血, 粘液便, 疼痛, 便通異常 등에 근거하면 《內經》, 《外科正宗》 등의 下焦濕熱, 腸風, 鎖肛痔, 腸覃, 腸癰(腸澼), 積聚, 臟毒, 便血, 下痢, 腸癰疽 등을 대장암의 범주로 볼 수 있다²⁵⁻²⁷. 한의학에서 대장암의 원인은 주로 臟腑陰陽氣血의 失調로 正氣虛의 상태에서 憂思鬱結, 七情內傷, 飲食不節, 久瀉久痢, 外感六淫²⁷ 혹은 醉飽無時, 恣食肥膩, 虫疾 등으로 인해 濕熱, 痰濕, 氣血瘀滯 등이 나타나 발생한다고 하였다^{22,26}. 한의학에서의 대장암 치료는 濕熱壅結型, 瘀毒內結型, 脾胃虛寒型, 脾虛下陷型, 氣血雙虧型, 脾腎陽虛型, 肝腎陰虛型 등으로 辨證施治하며^{21,25,30}, 한약을 이용한 약침요법이나 훈증·관장요법도 시행되고 있다²⁴.

白頭翁湯에 대해 《傷寒論》¹⁹에서는 "熱利下重者, 白頭翁湯主之.", "下利欲飲水者, 以有熱故也, 白頭翁湯主之"라 언급하였으며, 《東醫寶鑑》²⁰에서는 "治少陰病, 下利欲飲水, 以有熱故也. 宜用此. 白頭翁·黃柏·秦皮·黃連各一錢半. 右剉, 作一貼. 水煎服. 且治挾熱下利, 後重而渴."이라 하여, 주로 熱痢를 치료하며 나아가 腸風下血, 痢疾, 結腸炎 등에 응용할 수 있다고 보았다¹⁹. 한의학 문헌들에서 白頭翁湯에 관련해 언급된 증상들은 대장암에서도 나타날 수 있는 증상들로 실제 潘 등²¹은 대장암의 辨證論治에서 濕熱壅結型의 경우 白頭翁湯加減을, 孫²²은 濕熱蘊毒型의 경우 白頭翁湯合槐花地榆湯加減을 치료 처방으로 제시하였으며, 이는 辨證에 따라 대장암에서도 白頭翁湯을 응용해 볼 수 있다는 점을 시사하고 있다.

본 실험에 사용된 白頭翁湯은 白頭翁, 黃柏, 秦皮, 黃連으로 구성되며, 구성 약제는 본초학적 분류상 모두 清熱藥에 해당한다¹³. 白頭翁(Pulsatillae Radix)은 性味는 苦寒·無毒하고, 歸經은 胃, 大腸經이며, 清熱解毒, 涼血止瀉의 效能이 있다¹³. 黃柏

(Phellodendri Cortex)은 性味는 苦寒·無毒하고, 歸經은 腎, 膀胱, 大腸經이며, 清熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱의 效能이 있다¹³. 秦皮(Fraxini Cortex)는 性味는 苦澀寒·無毒하고, 歸經은 肝, 膽, 大腸經이며, 清熱燥濕, 收澀, 明目的 效能이 있다¹³. 黃連(Coptidis Rhizoma)은 性味는 苦寒·無毒하고, 歸經은 心, 肝, 胃, 大腸經이며, 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒의 效能이 있다¹³.

세포자멸사(apoptosis : programmed cell death)는 외부자극에 대해서 세포내부에 이미 존재하는 일련의 프로그램에 의해 세포가 사멸하는 과정을 의미한다. 세포자멸사 기전의 이상은 암 발생, 암 치료에 대한 내성발현, 자가면역 질환의 발생, 퇴행성 질환 및 HIV에 의한 병리현상에 중요하다고 보고되었으며^{31,32}, 최근 다양한 종양세포에서 세포자멸사를 유도하는 항암제에 관한 연구들이 많이 보고되었다³³.

대장암 환자의 1/3이상에서 진단 당시 이미 림프절 전이가 존재하며 이들 중 절반이상이 처음에 근치적 절제술을 받았으나 재발하여 사망한다. 보조항암약물 요법은 이런 환자들에게 수술 후 완치의 기회를 증가시키기 위해 시행하는 치료이다. 현재 5-FU와 leucovorin 병용 치료 이외에 oxaliplatin, irinotecan, capecitabine 등의 항암제가 진행성 대장암의 고식적 또는 근치적 목적으로 상용되고 있다. 그러나 심각한 부작용들에 의해 사용에 한계가 있어 부작용을 줄이거나 기존 약물을 대체할 수 있는 새로운 약물에 관한 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 대장암 세포에 대한 白頭翁湯의 항암효과를 확인하고 白頭翁湯의 세포자멸사 유도 현상과 신호전달기전을 조사하고자 하였다. 그 결과 白頭翁湯은 사람 대장암 세포주 HT-29와 HCT-116에서 현저하게 시간 및 농도 의존적으로 세포생존율의 감소를 유도하였다. 특히 p53 정상발현 대장암 세포주인 HCT-116에서 p53 단백질의 발현 증가와 인산화가 시간 의존적으로 증가되어 p53 돌연변이 세포주인 HT-29에 비해 더 민감한 세포독

성을 보였다. 이는 p53 단백질이 白頭翁湯에 의한 대장암 세포의 사멸과 관계가 있는 것으로 판단된다. 세포의 증식과 고사는 세포주기에 의해 결정된다. 세포주기는 Cyclins, Cyclin Dependent Kinases (CDK) 그리고 Cyclin Dependent Kinase inhibitor 같은 세포주기 조절인자에 의해 조절되는데 어떤 원인에 의하여 정상세포의 DNA가 손상 받으면 세포주기는 G1기에서 멈추고 DNA를 복구한 후 S기로 진행된다. 만일 손상이 심하여 복구가 불가능하면 세포자멸사 기전이 작동하여 비정상적인 세포의 증식을 막는데, 이 시기를 R point 또는 G1 check point라고 명명하고 여기에 관여하는 Cyclin은 Cyclin D1이며³⁴, DNA 합성 후 G2기를 거쳐 M기로 가는데 관여하는 Cyclin은 Cyclin B1으로 알려져 있다³⁵. 이때 Cyclin B1은 CDK2와 복합체를 형성하여 역할을 수행한다. 본 실험에서는 白頭翁湯 처리 시 24시간을 주기로 시간 의존적인 G1기 분획의 감소와 G2/M기 분획의 증가가 관찰되었다. 또한 白頭翁湯 처리 24시간 후부터는 G1기의 감소, G2/M기 분획의 증가와 함께 sub G0/G1 분획이 증가하였고, DNA의 분절을 보이는 전형적인 세포자멸사 기전을 초래하였다. 이는 G2/M기 이행단계를 조절하는 CDK2와 CDK6의 발현이 白頭翁湯 처리 24시간 후에 급격히 감소한 것과 깊은 관련이 있을 것으로 판단된다. 특히 白頭翁湯 처리 24시간 후부터 시간 의존적으로 급격하게 발현이 감소된 CDK6 단백질이 세포생존의 운명 결정에 밀접하게 연관되어 있을 것으로 사료된다.

많은 항암제들이 다양한 암세포주에서 세포자멸사를 유도한다³³. 그 작용기전으로는 Fas/FasL system, sphingomyelin/ceramide 경로, 초기발현유전자(early immediate gene)의 활성화, Bcl-2 family proteins, caspase family cysteine protease, 그리고 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되었다^{36,37}. 본 실험에서도 p53 발현 대장암 세포주인 HCT-116에서 白頭翁湯에 의해서 DNA의 분절과 sub G0/G1 분획이 증가하는 세포자멸사의 특징을 보였으므로 신호전달

계인 caspase family cysteine protease의 발현변화를 조사하였다. 먼저 caspase-3의 활성을 procaspase-3의 분해와 DNA 분절현상을 통해 확인 할 수 있었다. 상방 신호전달계인 caspase-8과 caspase-10은 세포에 따라 다르게 발현되나 같은 기능을 하는 것으로 세포막 수용체인 Fas/FasL 하방에 존재한다³⁸. 본 실험에서도 白頭翁湯에 의해 HCT-116 세포에서 caspase-10의 활성화가 확인되었으며 하방 단백질인 caspase-9의 활성도 증가하였다.

활성산소종(Reactive oxygen species ; ROS)은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사 과정을 통해서 생성된다³⁹. 비록 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 효소 등이 세포내에서 생성된 활성산소종을 제거하기 위한 생리적 방어기전으로 작용하지만, 과도한 활성산소종은 이들 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래한다⁴⁰. 白頭翁湯 처리 시 세포내 유의한 H₂O₂와 superoxide anion (O₂⁻)의 생성이 증가하였으며, SOD1 단백질이 白頭翁湯 처리 6시간에 현저히 감소하였고, SOD2는 시간 의존적으로 증가하였다. 또한 세포내 glutathione peroxidase 효소의 구성 단백질인 GSS 단백질의 발현도 시간 의존적으로 증가하였다. 그러나 catalase나 hemeoxygenase-1 (HO-1) 단백질의 발현 변화는 없었다. 따라서 白頭翁湯에 의한 세포내 항산화 단백질의 발현 변화와 이에 따른 활성산소종의 생성변화에 의해 대장암 세포주 HCT-116 세포사멸이 초래되었다고 판단된다.

한편 세포자멸사는 항종양인자인 p53 단백질 또는 Bcl-2 oncogene의 발현과도 밀접한 관계가 있다. p53과 Bcl-2는 세포자멸사를 조절하는 대표적인 유전인자들 중 일부이며, p53은 세포자멸사를 유발하는 인자이고⁴¹, Bcl-2는 세포자멸사를 억제하는 유전자이다⁴². p53 유전자에 돌연변이가 일어나면 비정상적인 p53 단백질의 생산이 세포내에서 증가되어 세포의 이상변형이 일어나게 된다. 이 결과 돌연변이에 의한 비정상적인 p53 단백질이 세

포내에서 과다하게 생성됨에 따라 비정상적인 세포의 증식이 억제되는 것을 막음으로써 변이세포가 만들어지게 된다. p53은 G1/S기에서 cell-cycle을 중단시킴으로써 손상된 DNA의 회복을 가능하게 한다. 그리고 손상정도가 심각한 DNA의 경우 Bax 유전자를 활성화시킴으로써 세포자멸사를 유발한다. 반면 Bcl-2 단백질은 세포자멸사를 억제한다. Bcl-2 단백질이 없는 곳에서는 세포자멸사가 일어나며 Bcl-2 단백질이 발현된 곳에서는 세포자멸사가 거의 일어나지 않는다. 또한 p53에 의하여 유도된 세포자멸사는 Bcl-2에 의해 억제 될 수 있다⁴³. 본 실험에서도 白頭翁湯은 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소를 유도하였다. 따라서 白頭翁湯에 의한 p53의 조절이 HCT-116 세포의 cell cycle arrest 및 세포자멸사 기전을 매개하였다고 사료된다. 단, 白頭翁湯 처리 24시간에 Bcl-2 발현이 일시 감소 후 증가를 보이는 현상에 대해서는 cell cycle의 변화와 관계가 깊은 것으로 예상되나 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

일산화질소(Nitric oxide, NO)는 자유 유리기로서 생체막을 투과하여 내피세포에서의 이완작용, 신경계에서의 조절작용, 면역계에서의 면역매개물질 등 생체에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 세포에 대한 NO의 효과는 세포의 종류에 따라 세포의 증식을 유발하거나 반대로 세포의 사멸을 유발하는 경우도 있다⁴⁴. 본 실험에서는 白頭翁湯 처리 시 HCT-116 세포에서 NO는 처리 6시간부터 48시간까지 생성 증가된 상태가 유지되었다. 이때 NO의 합성효소인 NOS1과 NOS2 단백질은 白頭翁湯 처리 후 시간 의존적으로 발현이 감소하였으나, NOS3 단백질은 발현이 증가하였다. 따라서 白頭翁湯을 처리한 HCT-116 세포에서 NOS3의 발현 증가에 따른 NO의 생성이 세포자멸사를 매개하였다고 판단된다.

이상의 결과를 종합하면 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에 선택적으로 시간 및 농도 의존적인 세포독성을 보였으며 CDK2와 CDK6의 발현

조절을 통해 G2/M기 분획의 arrest를 통한 세포자멸사 현상을 유도하였다. 또한 세포내 항산화 단백질의 발현 변화에 따른 활성산소 증가, NO 생성 증가와 Bax와 같은 Bcl-2 family 단백질의 발현 조절에 p53 단백질이 기여하였으리라 추정된다. 이는 항암제에 대한 대장암 세포의 민감도를 증가시키기 위한 전략으로 p53 신호전달 기전 활성화를 통해 보조 항암치료요법제 및 대체 약물로 사용될 수 있는 가능성을 시사하는 바이다.

V. 結 論

본 연구에서는 p53을 발현하고 있는 HCT-116 세포에서 유의한 세포생존율의 차이를 보이는 白頭翁湯에 의하여 유도되는 세포주기 arrest 및 세포자멸사의 신호 전달 기전을 밝히고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 농도 및 시간 의존적으로 세포생존율의 감소를 초래하였다.
2. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 시간 의존적으로 p53 단백질의 인산화 및 발현 증가를 유도하였다.
3. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 24시간을 주기로 시간 의존적인 G1기의 감소와 G2/M기 분획의 축적을 유도하였다.
4. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 세포주기 조절 단백질인 CDK2와 CDK4의 일시적 발현 감소와 CDK6의 시간 의존적인 발현 감소를 유도하였다.
5. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 caspase-10, caspase-9 및 caspase-3의 활성화에 따른 DNA의 분절과 sub G0/G1 분획증가를 보이는 세포자멸사 기전을 초래하였다.
6. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 세포내 활성산소인 H₂O₂와 superoxide anion (O₂⁻)

의 생성을 유도하였고, SOD1, SOD2, GSS 같은 항산화단백질의 발현 증가를 초래하였다.

7. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 Bax의 발현 증가, Bcl-2의 발현 감소를 초래하였다.
8. 白頭翁湯은 대장암 세포주인 HCT-116에서 NO의 생성 증가와 NOS1, NOS2 단백질의 발현 감소 및 NOS3 단백질의 발현 증가를 초래하였다.

따라서 白頭翁湯은 사람 대장암 세포주에서 세포내 활성산소 생성 및 세포주기 조절 단백질의 발현 조절을 통해 세포자멸사 기전을 활성화하였으며, 앞으로 白頭翁湯의 유효성분 분석과 임상적인 치료 적용을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음

參考文獻

1. 통계청. 2007년 사망 및 사망원인 통계결과. 서울: 통계청; 2008, p. 8-14.
2. http://www.kosis.kr/OLAP/Analysis/stat_OLAP.jsp?tbl_id=DT_117N_A00001&org_id=117&vwd=MT_CTITLE&path=명칭별 통계 > 아 > 암 등록 통계
3. 김원호, 천재희. 대장암 가이드북. 서울: 국일미디어; 2007, p. 34-6, 88.
4. 김미숙, 전점이, 손경희. 대장암 환자의 생활양상에 관한 연구. 성인간호학회지. 2002;14(3):390-400.
5. 정승용. 대장암 조기검진을 위한 권고안. 대한소화기내시경학회지. 2002;24:317-20.
6. 의학교육연수원 편. 가정의학. 서울: 서울대학교출판부; 2003, p. 1097-102.

7. 김병완, 윤현정, 전현숙, 윤형중, 김창현, 박선동. 當歸補血湯의 배합비율에 따른 대장암 세포주 HCT116의 세포사멸 효과. 대한본초학회지. 2006 ;12(2):37-46.
8. 김선모, 윤현정, 이현우, 김판준, 이창현, 박원환 등. 二妙散에 의한 대장암 세포주 HCT116의 Caspases 활성화를 매개로 한 세포사멸. 대한한의학 방제학회지. 2006;14(2):21-32.
9. 김현일, 김진성, 윤상협, 류봉하, 류기원. 斑蝥가 대장암세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(2):214-23.
10. 이승연, 김희석, 김정옥, 황성완, 황성연. 肉桂 에탄올 추출물이 HT-29 대장암 세포주의 성장 및 COX-2 기전에 미치는 영향. 한국식품영양 과학회지. 2006;35(9):1115-20.
11. 박용기, 정선주, 장태정, 이제현. 榆白皮가 HT-29 대장암세포의 활성 및 세포사멸에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2006;21(4):51-8.
12. 조경진, 윤미영, 이미라, 차미란, 박해룡. 대장암 세포주에 대한 蔓荊子(*Vitex rotundifolia*) 추출물의 항암 효과. 한국응용생명화학회지. 2007; 50(3):228-32.
13. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울: 永林社; 1995, p. 180-3, 218-20.
14. 백영훈. 각종 암세포주에 대한 백두옹 추출물 (SB-31)의 항암효과 및 항암작용. 충남대 대학원. 박사학위논문. 1995.
15. 김의근, 김동일, 이태균. 黃柏의 腫瘍抑制 및 免疫活性에 관한 研究. 대한한방부인과학회지. 2002 ;15(1):19-30.
16. 김대구, 이병근, 김현용. 물푸레나무 수피의 항산화 효과. 한국임산에너지학회지. 2003;22(2) :69-77.
17. 유태모, 김병수, 유병철, 유희승. 황련 열수추출물을 처치한 인간 대장암 세포 SNU-81에서의 단백질 발현 변화. 대한약침학회지. 2009;12(1) :5-12.
18. Kim Jun-Lae, Yoo Hwa-Seung, Oh Se-Mi, Shin Jang-Woo, Son Jin-Young, Cho Jung-Hyo 등. Anti-proliferative Effect of *Coptis Chinensis* Extract in Hep G2 Cells. 대한한의학회지. 2006 ;27(4):48-56.
19. 문준진, 안규석, 김성훈, 엄현섭, 지규용, 김정범. 傷寒論精解. 서울: 경희대학교 출판국; 1998, p. 697-8, 700-1.
20. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 2002, p. 454, 1011, 1014.
21. 潘敏求. 中華腫瘤治療大成. 河北: 河北科學技術出版社; 1996, p. 489-91.
22. 孫桂芝. 常見腫瘤診治指南. 北京: 中國科學技術出版社; 1990, p. 52-64.
23. 新太陽社 編輯局 百科事典部. 原色最新醫療大百科事典. 서울: 圖書出版 新太陽社; 1996, 第5券 p. 135-6, 第12券 p. 155-64.
24. 조종관. 플리스암치료법. 서울: 국일미디어; 1999, p. 212-22.
25. 鬱仁存. 中醫腫瘤學 上冊. 北京: 科學出版社; 1988, p. 1-11.
26. 賈堃. 癌癥防治研究. 서울: 정보사; 1984, p. 193-207.
27. 顧伯康. 中醫外科學. 北京: 人民衛生出版社; 1987, p. 378-82.
28. 金潞經, 金東集, 金炳洙, 金錫煥, 金禮會, 金楨鎮 등. 암 百科. 서울: 瑞音出版社; 1992, p. 26-7, 56-7, 118-9, 193, 233-4.
29. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료 1. 익산: 원광대학교출판국; 1999, p. 14-23.
30. 張代釗. 中西醫結合治療癌症. 山西省: 山西人民出版社; 1984, p. 1, 38-9.
31. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. Science. 1993;262 :695-700.
32. Williams GT. Apoptosis in the immune system. J. Patho. 1994;173:1-4.

33. Barry M. A, Behnke C. A. and Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 1990;40:2353-62.
34. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 1989;246(4930):603-8.
35. Pines J, Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature.* 1990;346(6286):760-3.
36. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell.* 1995;82:405-14.
37. Budijardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999;15:269-90.
38. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia.* 1999 ;13:1854-8.
39. Gao Z, Huang K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Pharmacol. Res.* 2001 ;43(2):173-8.
40. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: *Free radicals in biology and medicine.* 2nd Ed. Oxford: Clarendon Press; 1999, p. 86-9.
41. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-9.
42. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74(4):609-19.
43. Wang Y, Szekely L, Okan I, Klein G, Wiman KG. Wild-type p53-triggered apoptosis is inhibited by bcl-2 in a v-myc-induced T-cell lymphoma line. *Oncogene.* 1993;8(12):3427-31.
44. Bredt DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron.* 1994;13:301-13.