

황련해독탕이 수종의 인간 암세포 증식에 미치는 영향

성현경 · 민상연 · 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effect of Hwangryunhaedoktang on Proliferations of Various Human Cancer Cells

Sung Hyun Kyung · Min Sang Yeon · Kim Jang Hyun

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives

The aim of this study is to investigate whether hwang-ryun-haedok-tang (HDT) affect proliferations of androgen-dependent LNCaP prostate cancer cells, androgen-independent PC-3, DU-145 prostate cancer cells, MCF-7 human breast cancer cells, A549, NCI-H292 human pulmonary cancer cells and K-562 human chronic myelogenous leukemia cells.

Materials and Methods

Effects of HDT on proliferations of each cancer cell line were investigated. 20,000 cells/well were plated in each well of 96-well culture plate. After 24 hrs, 0.01-10% of HDT in culture medium was added to cancer cells. The number of cells was counted by using SRB assay or direct cell counting method after 72 hours from drug treatment. Effect of baicalein or berberine on proliferation was assessed according to the same method.

Results

(1) HDT inhibited proliferations of LNCaP, PC-3 and DU-145 prostate cancer cells. (2) HDT inhibited proliferation of MCF-7 breast cancer cells. (3) HDT also inhibited proliferations of A549, NCI-H292 pulmonary cancer cells and K-562 chronic myelogenous leukemia cells. (4) Baicalein and berberine also showed inhibitory effects on proliferations of prostate and breast cancer cells.

Conclusion : HDT inhibited proliferations of human prostate, breast, pulmonary and blood cancer cells. These results suggest us the potential use of HDT as a chemopreventive or chemotherapeutic agent. Effect of HDT on human cancer should be further investigated using in vivo experimental models that can reflect pathophysiology of human cancer through another studies.

Key words : *Hwangryunhaedoktang (HDT), Human cancer cells, In vitro cytotoxicity*

I. Introduction

癌이란 惡性腫瘍을 지칭하며, 생체조직의 일부가 끊임없이 비정상적이고 지속적으로 과도하게 발육하는 것으로, 진행속도가 빠르고 침윤성의 성장을 하며 체내 각 부위로 擴散과 轉移되어 생명에 위협을 초래하는 질환이나 아직까지도 확실한 원인과 치료법을 알지 못하여 현대의학의 커다란 연구과제로 남아있는 질환이다.^{1,2)}

소아의 惡性腫瘍은 성인에 비하여 발생빈도가 낮고, 의학의 발달로 75~80%가 완치되는 만성질환 형태로 전환되었으나 아직까지 전체 소아 사망원인의 10% 이상을 차지하고 있으며³⁾, 오랜 시간의 처치와 투병으로 인해 정상발달에 지장을 초래하여 질병자체의 문제 외에도 여러 가지 문제점을 발생시키게 된다.⁴⁾

역대 韓醫學 古典에는 비록 '腫瘍'이라는 표현은 없지만 많은 韓醫學 문헌에서 腫瘍에 관한 內容을 찾아볼 수 있으며 《黃帝內經》에서 '厥疝, 石瘕, 息賁, 伏梁 및 腸覃' 등을 언급한 이래, 여러 문헌속의 병명들이 현대의학의 癌腫의 증상을 묘사한 것과 일치하는 것을 볼 수 있다.⁵⁾

腫瘍의 원인은 인체의 正氣虧虛 후 外邪가 虛를 틈타 侵入하여 氣滯, 血瘀, 痰飲등의 일련의 병리변화를 일으킨 결과로 인식하였으며, 臟腑陰陽氣血의 虛實에 따라 扶正培本法, 功邪法, 扶正祛邪法으로 치료하는 것을 원칙으로 하였다.⁶⁾

최근 인체 惡性腫瘍의 발병기전에 관한 연구는 다양한 관점에서 활발히 진행되고 있으며, 그 중에서도 인체의 염증발생 및 진행과정과 惡性腫瘍의 발생 및 진행과정 간에 세포수준에서의 상호작용이 있음을 시사하는 다수의 연구결과가 발표되었다. 이와 관련하여 aspirin, rofecoxib, celecoxib 등 비스테로이드성 항염증약물이 癌의 발생 및 진행과정에 개입하여 일정한 약리학적인 역할을 할 가능성이 제기되어 암의 예방 혹은 치료약물로 이용하기 위한 연구가 시도되어 왔다.⁷⁻¹⁰⁾

黃連解毒湯은 葛洪의 《肘後備急方》에 처음으로 수록되었으며 黃芩, 黃連, 黃柏 및 梔子로 구성되고 藥性은 苦寒하여 清熱解毒, 健胃平肝 등의 효능이 있어 일체의 實熱火毒이 三焦에 가득차서 나타나는 大熱煩燥, 口燥咽乾, 錯語不眠등의 증상과 熱病으로 인한 吐血, 衄血 심한 熱로 인한 發狂, 身熱下痢, 濕熱黃疸, 小便黃赤, 舌紅苔黃, 脈數有力 등의 증상에 사용되며¹¹⁾ 黃連解毒湯의 효능에 대한 연구로는 항산화작용¹²⁾,

급성간질환에 대한 보호효과¹³⁾, 소염작용¹⁴⁾, 혈관이완 작용¹⁵⁾ 등이 보고되고 있다.

이에 저자는 實熱火毒에 의한 질환, 즉 각종 염증성 질환 치료에 응용되고 있는 黃連解毒湯이 인간 암세포의 증식에 미치는 영향을 검증하기 위하여 LNCaP, PC-3, DU-145, MCF-7, A549, NCI-H292 K-562세포 등에 黃連解毒湯과 黃連과 黃柏의 주요 성분인 berberine과 黃芩의 주요 성분인 baicalein등의 처리를 한 후 약물인 암세포 증식에 미치는 영향을 sulforhodamine B assay 방법과 direct cell counting 방법으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 암세포주

남성 호르몬 의존성 전립선암 세포주인 LNCaP 세포, 호르몬 비의존성 전립선암 세포주인 PC-3 및 DU-145 세포, 유방암 세포주인 MCF-7 세포, 폐암 세포주인 A549 세포, NCI-H292 세포, 만성 골수성 백혈병 세포주인 K-562 세포 등은 모두 American Type Culture Collection사 (Manassas, VA, U.S.A.)에서 구입하였다.

2) 약제

黃連解毒湯의 약제는 동국대학교 부속 한방병원에서 공급받았으며, 각 방제 한 첩 분량에 800 ml의 탈이온 2차 증류수를 가하고 100 °C로 가온된 상태에서 3시간 동안 전탕하여, 최종 80 ml의 탕액을 수거하였다. 탕액을 실온 정도로 냉각시킨 후, 멸균 청정 후드 내에서 0.22 μm filter를 이용, 가압 여과하고 멸균용기에 저장하여, 냉장 보관 (4 °C)하였다. 黃連解毒湯 처방의 구성은 《東醫寶鑑》¹⁶⁾에 의거하였으나 각 用量을 6 g으로 증량하였다.

3) 검액의 제조

1첩 분량의 구성약물은 다음과 같다 (Table.1).

4) 시약

Sulforhodamine B (SRB), trypsin-EDTA, trizma base, trichloroacetic acid (TCA), baicalein, berberine hydrochloride, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma사 (St.

Table 1. Prescription of Hwang-ryun-haedok-tang (HDT)

Herb	Pharmaceutical Name	Dose
黃芩	Radix Scutellariae	6 g
黃連	Rhizoma Coptidis	6 g
黃柏	Cortex Phellodendri	6 g
梔子	Frutus Gardeniae	6 g
Total Dose		24 g

Louis, Mo., U.S.A.)에서, Penicillin-G, Streptomycin, Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), L-glutamine, RPMI 1640은 GIBCO-BRL사 (Grand Island, New York, USA.)에서, 기타 시약들은 일 급시약 등급 이상의 것들을 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 2차 증류수였다.

2. 方法

1) 전립선암 세포의 배양

LNCaP, PC-3 세포는 습도가 충분히 유지되고 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37 °C 조건의 배양기 내에서 L-glutamine (2mM), sodium bicarbonate (44mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100µg/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액을, DU-145 세포는 동일한 조건에서 동일한 첨가물을 함유한 DMEM 배양액을 이용하여 배양되었으며, 1주에 2회 빈도로 subculture하였다.

2) 폐암 세포의 배양

A549, NCI-H292 세포는 습도가 충분히 유지되고 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37 °C 조건의 배양기 내에서 HEPES (25mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100µg/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 배양되었으며, 1주에 2회 빈도로 subculture하였다.

3) 유방암 세포의 배양

MCF-7 세포는 습도가 충분히 유지되고 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37 °C 조건의 배양기 내에서 L-glutamine (2mM), sodium bicarbonate (44mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100µg/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 DMEM 배양액을 이용하여 배양되었으며, 1주에 2회 빈도로 subculture하였다.

4) 만성 골수성 백혈병 세포의 배양

K-562 세포는 습도가 충분히 유지되고 95% 공기,

5% CO₂를 함유하는 37 °C 조건의 배양기 내에서 L-glutamine (2mM), sodium bicarbonate (44 mM), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 배양되었으며, 1주에 2회 빈도로 subculture하였다.

5) 각 인간 암세포의 증식에 미치는 약물의 영향 검증

K-562 세포를 제외한, 각 인간 암세포를 대상으로 96 well plate의 각 well에 2×10⁴개의 cell을 함유하는 배양액 100µl를 가하여 37 °C, 5% CO₂ 존재 하에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 HDT 추출물을 100 µl의 배양액에 0.01%, 0.1%, 1%, 10%의 최종 농도로 각각 희석한 후 배양세포의 well마다 100 µl씩 가하고 72시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 냉각된 50% trichloroacetic acid (TCA) 50 µl를 각 well에 서서히 가해 주었다. 10분 후에 4 °C 조건의 냉장고에 옮겨 1시간 동안 충분히 세포들을 고정 (fixation)시키고, 고정이 완료된 후 각 well에 존재하는 액체 성분들을 전량 흡인배출한 후에 well 당 250 µl의 증류수를 이용, 5회 이상 세척하였다. 이렇게 준비된 세포에, acetic acid에 용해된 0.4% SRB 용액 50 µl/well을 가하고 실온에서 30분 동안 염색하였고, 재차 흡인배출 후 100 µl의 1% acetic acid를 이용, 5회 이상 세척한 후 세포들을 건조시켰다. 각 well 당 100 µl의 10 mM unbuffered Tris용액으로 SRB를 잘 녹여낸 후, 흡광분석 측정장치 (microplate reader)로 540 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. K-562 세포의 경우에는 여타 암세포들과는 달리 세포 배양용기에 부착된 상태에서 증식하지 않으므로, 상기의 방법을 사용하지 않고 direct cell counting 방법을 적용하였다. 즉, 6 well plate의 각 well에 5×10⁴개의 cell을 함유하는 배양액 1 ml를 가하여 37 °C, 5% CO₂ 존재 하에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 HDT 추출물을 1ml의 배양액에 0.01%, 0.1%, 1%, 10%의 최종 농도로 각각 희석한 후 배양세포의 well마다 1ml씩 가하고 72시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 각 well에 존재하는 세포의 수를 hemacytometer를 이용하여 직접 계수하였다.

6) 통계처리

모든 측정 결과는 Mean ± S.E.M.으로 환산된 후, 약물 처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's *t*-test로 하였으며, *p*<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. Results

1. 黃連解毒湯이 인간 전립선암 세포의 증식에 미치는 영향

黃連解毒湯은 최종 추출물 1%, 10%의 투여 농도에서 남성 호르몬 의존성 전립선암 세포인 LNCaP 및 호

르몬 비의존성 전립선암 세포인 PC-3, DU-145 세포의 증식을 유의하게 억제하였다 (Fig. 1).

2. 黃連解毒湯이 인간 폐암 세포의 증식에 미치는 영향

黃連解毒湯은 최종 추출물 1%, 10%의 투여 농도에서 폐암 세포인 A549 및 NCI-H292 세포의 증식을 유의하게 억제하였다 (Fig. 2).

3. 黃連解毒湯이 인간 유방암 세포의 증식에 미치는 영향

黃連解毒湯은 최종 추출물 10%의 투여 농도에서 유방암 세포인 MCF-7 세포의 증식을 유의하게 억제하였다 (Fig. 3).

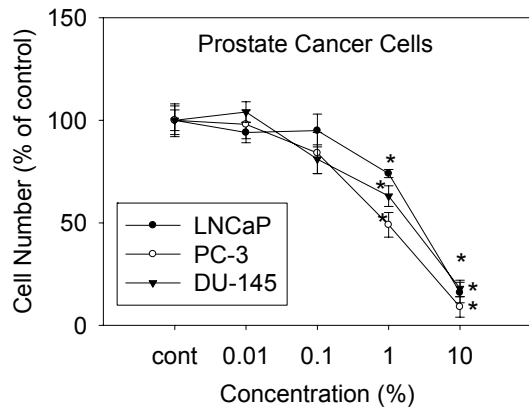


Fig. 1. Effect of HDT on proliferation of human prostate cancer cells

LNCaP, PC-3 and DU-145 cells were treated with 0.01 - 10% HDT extract in culture media for 72 hrs, respectively.
* : significantly different from control (*p*<0.05).

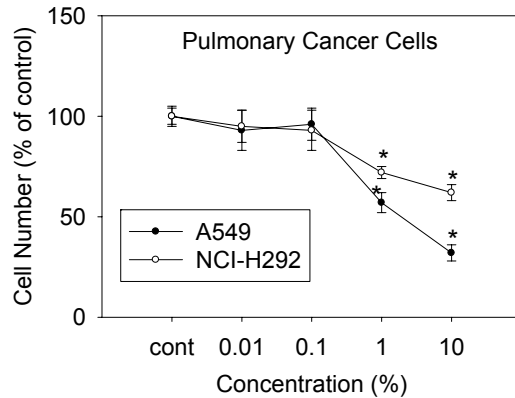


Fig. 2. Effect of HDT on proliferation of human pulmonary cancer cells

A549 and NCI-H292 cells were treated with 0.01 - 10% HDT extract in culture media for 72 hrs, respectively.
* : significantly different from control (*p*<0.05).

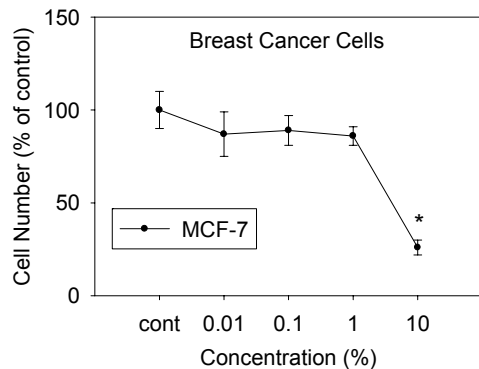


Fig. 3. Effect of HDT on proliferation of human breast cancer cells

MCF-7 cells were treated with 0.01 - 10% HDT extract in culture media for 72 hrs.
* : significantly different from control (*p*<0.05).

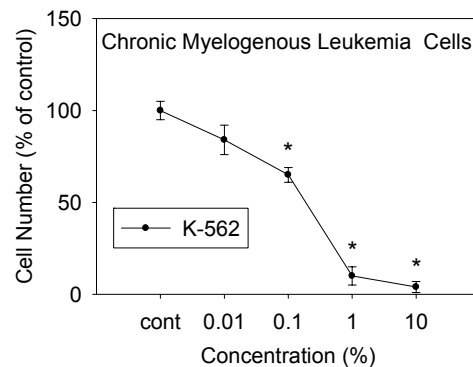


Fig. 4. Effect of HDT on proliferation of human chronic myelogenous leukemia cells

K-562 cells were treated with 0.01 - 10% HDT extract in culture media for 72 hrs, respectively.
* : significantly different from control (*p*<0.05).

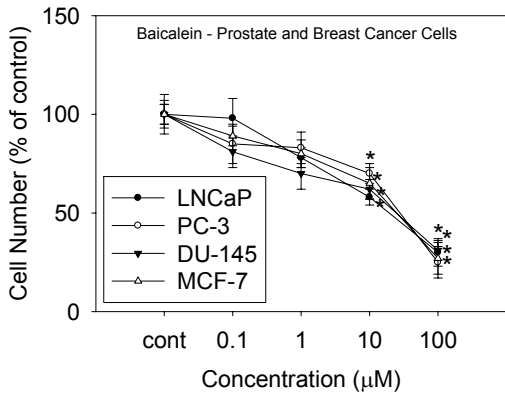


Fig. 5. Effect of baicalein on proliferations of human prostate and breast cancer cells

LNCaP, PC-3, DU-145 and MCF-7 cells were treated with 0.1 - 100µM baicalein in culture media for 72 hrs, respectively.
 * : significantly different from control (p<0.05).

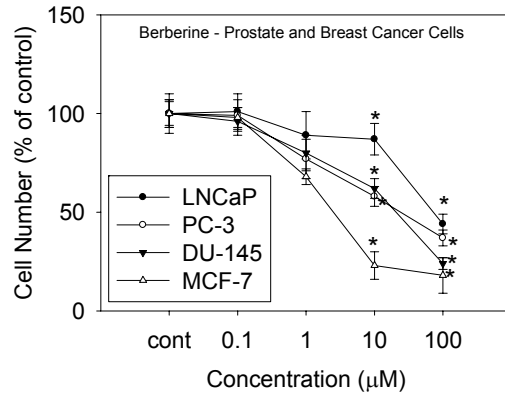


Fig. 6. Effect of berberine on proliferations of human prostate and breast cancer cells

LNCaP, PC-3, DU-145 and MCF-7 cells were treated with 0.1 - 100µM berberine in culture media for 72 hrs, respectively.
 * : significantly different from control (p<0.05).

4. 黃連解毒湯이 인간 만성 골수성 백혈병 세포의 증식에 미치는 영향

黃連解毒湯은 최종 추출물 0.1%, 1%, 10%의 투여 농도에서 인간의 만성 골수성 백혈병 세포인 K-562 세포의 증식을 유의하게 억제하였다 (Fig. 4).

5. 黃連解毒湯의 구성 본초 중 황금에 함유된 주요 성분인 baicalein이 인간 전립선암 및 유방암 세포의 증식에 미치는 영향

Baicalein은 10 µM, 100 µM의 투여 농도에서 전립선암 세포인 LNCaP, PC-3, DU-145 및 유방암 세포인 MCF-7 세포의 증식을 공히 유의하게 억제하였다 (Fig. 5).

6. 黃連解毒湯의 구성 본초 중 황련 및 황백에 함유된 주요 성분인 berberine이 인간 전립선암 및 유방암 세포의 증식에 미치는 영향

Berberine 역시 10 µM, 100 µM의 투여 농도에서 전립선암 세포인 LNCaP, PC-3, DU-145 및 유방암 세포인 MCF-7 세포의 증식을 공히 유의하게 억제하였다 (Fig. 6).

IV. Discussion

癌이란 인체 정상세포가 여러 인자의 장기간의 작용 하에서 과도한 증식이나 이상분화로 형성되는 신생물을 말하며, 불규칙적으로 신속하게 주위의 기관조직

으로 擴散, 轉移되어 정상조직에 대하여 파괴적이며 인간의 건강과 생명에 위해를 주는 위중한 질환을 뜻한다¹⁷⁾. 의학기술의 발달과 더불어 癌의 생존율은 점차 증가하였으나 여전히 주요한 사망원인이며 전체 암환자수도 지속적인 증가추세를 보여, 癌의 예방과 치료는 인류가 안고 있는 가장 큰 과제로 등장하였다¹⁸⁾. 소아암 환자의 생존율은 최근 75% 이상까지 향상되어 이제는 불치병이 아닌 만성질환으로 간주되나, 여전히 많은 환자들이 癌 자체와 합병증, 오랜 투병생활로 인한 발달장애로 인해 신체적, 사회적, 정서적으로 여러 가지 문제를 겪고 있다^{4,19)}.

癌의 발병원인은 매우 다양하며, 치료는 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법 등을 활용하나, 정상조직의 손상과 장기의 기능적 손실을 초래하는 등의 부작용과 합병증이 나타나게 되어 치료법의 발전에도 불구하고 대부분의 치료효과는 아직 기대할 만한 수준에 이르지 못하고 있는 실정이다⁵⁾.

서양의학의 항암요법은 광범위한 세포파괴로 인한 많은 부작용이 발생하므로²⁰⁾ 최근 이를 줄이고 癌의 치료효과를 극대화하기 위한 韓藥에 대한 연구가 증대되었으며, 癌의 한방치료는 東西醫學의 결합에 의한 암치료의 발전에 기여하여 암세포의 성장과 전이억제, 부작용의 경감, 재발방지 및 말기환자의 동통완화와 연명 등에 상당한 효과를 보이고 있다¹⁸⁾.

韓醫學에서 癌에 대한 인식은 《衛濟寶書》에서 최초로 '癌' 字를 사용하였고, '腫瘍'이라는 표현이 직접 사용되지는 않았으나 여러 文獻에서 腫瘍의 병증과 그에 따른 치료방법에 대해 論하였다^{5,18)}. 癌이 발생되는

원인은 精神的, 外感性, 內傷性因자를 원발성, 痰飲과 瘀血등을 속발성의 요인으로 인식하였고, 치료는 臟腑陰陽氣血의 機能失調를 조절하는 것으로 크게 扶正法, 祛邪法, 扶正祛邪法으로 나누고 初期에는 先功後調法, 中期에는 功補兼重法을, 末期에는 先補後功法을 活用하였다^{21,22}.

癌의 여러 치료법 중 祛邪法에 속하는 清熱解毒法은 瀉火解毒과 清熱保津하여 火와 熱毒으로 인해 일어나는 營衛不和, 經絡阻隔 및 氣血瘀滯의 증상들을 치료하며²³ 이를 통해 중앙주위의 염증, 증식과 전이를 억제하여 중앙의 확산을 방지하는 효과를 나타낸다.

최근 清熱解毒法의 항암효과에 대한 연구는 단미제로는 金銀花 및 魚腥草²⁴, 半枝蓮²⁵, 苦參²⁶, 白花蛇雪草²⁷ 등의 연구가 있으며 복합처방으로는 內疎黃連湯²⁸, 仙方活命飲²⁹, 竹葉石膏湯加減方³⁰, 加味夏枯草散³¹ 등의 항암효과에 대한 연구 등이 보고되었다. 이처럼 清熱藥은 항종양효과가 우수하며, 암세포의 분열억제와 고사시키는 효과가 보고되어 왔으나, 清熱解毒法의 대표적 처방인 黃連解毒湯의 항암효과에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

黃連解毒湯 (HDT)은 葛洪의 《肘後備急方》³¹에 처음으로 수록되었으며 諸熱毒을 瀉火解毒하여 實熱火毒에 의한 질환에 응용되는 처방으로 최근의 연구결과로는 항궤양³², 이뇨 및 혈압강하³³, 항균³⁴, 항산화작용¹², 급성간질환에 대한 보호효과¹³, 소염작용¹⁴, 혈관이완작용¹⁵ 등이 보고되었다.

구성약물을 살펴보면, 黃芩은 苦, 寒, 無毒하고 肺, 膽, 胃, 大腸經에 작용하며³⁵ 肺熱을 清하며 上焦之火를 瀉하는 臣藥으로 清熱燥濕, 瀉火解毒 및 止血安胎 등의 효능이 있으며 항산화, 혈압강하, 고지혈증개선 및 진경작용 등의 작용이 연구되었고³⁶, 黃連은 苦, 寒, 無毒하고 心, 肝, 胃, 大腸經에 작용하며³⁵ 心火 및 中焦火를 瀉하는 君藥으로 清熱燥濕, 清心除煩 및 瀉火解毒 등의 효능이 있으며 강심, 항부정맥, 혈압강하, 혈소판응집억제 및 혈당강하작용 등이 연구되었다³⁶. 梔子是 苦, 寒, 無毒하고 心, 肺, 胃, 三焦經에 작용하며³⁵ 三焦火를 瀉하며 導熱下行시키는 使藥으로 清熱瀉火, 涼血하는 효능이 있으며 혈압강하, glutamate저해 및 항부정맥작용 등이 연구되었다³⁶. 마지막으로 黃柏은 苦, 寒, 無毒하고 腎, 膀胱, 大腸經에 작용하며³⁵ 下焦之火를 瀉하는 使藥으로 清熱燥濕, 瀉火解毒 및 清退虛熱등의 효능이 있으며 혈압강하와 항부정맥작용 등이 연구되었다³⁶. 이처럼 黃連解毒湯은 방제를 구성하고 있는 黃

芩, 黃連, 黃柏, 梔子 등의 構成本草가 항염증, 항균, 항산화작용을 발현함으로써, 방제수준에서 현저한 항염증작용을 경유한 발암의 예방이나 암에 대한 치료효능을 나타낼 가능성을 발견할 수 있는 처방이나 아직까지 항암작용에 관해서는 연구된 바가 없었다.

현재 韓藥處方들을 대상으로 세포독성, 세포분화, 항암약물 간 상승작용, 세포자멸사, 유전자요법, 혈관신생 및 신호전달체계의 기전과 연관하여 한약처방의 항암기전을 밝힌 연구들이 진행되고 있으나³⁷ 항염작용을 통한 항암기전에 관해서는 언급된 바가 없었다. 하지만 최근 여러 연구에 의해 NSAIDs (비스테로이드성 항염증제)가 COX (cyclooxygenase)의 활성을 억제하여 암세포의 성장억제, 세포자멸사유도를 일으키는 기전^{7-10,38-40}이 주목을 받고 있으며, 또 다른 실험에서 黃連解毒湯이 COX-2를 억제하여 항염작용을 보인다는 연구결과¹⁴를 토대로 黃連解毒湯이 암세포 성장을 억제할 수 있는 능력이 있을 것이라고 유추해볼 수 있다.

이제 저자는 黃連解毒湯이 전립선암, 유방암, 폐암, 백혈병의 세포주등 數種의 인간 암세포의 증식에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지를 검증해 보고자, 세포들에 배양액을 가하여 24시간 배양 후 HDT 추출물을 100 μ l의 배양액에 0.01%, 0.1%, 1%, 10%의 최종 농도로 각각 희석하여 100 μ l씩 가하고 72시간 동안 배양하였다. 이후 세포들을 고정, 염색시켜 흡광도를 측정하였으며 K-562 세포는 세포 배양용기에 부착된 상태에서 증식하지 않으므로, 배양종료 후 hemacytometer를 이용하여 세포 수를 직접 계수하여 암세포의 증식억제정도를 측정하였다.

전립선암 세포 중 호르몬 의존성인 LNCaP 세포에 대한 한의학적 연구로는 木香과 石雄黃, 敗醬등이 세포를 보호하는 Bcl-2 단백질의 감소, 세포자멸사에 관련된 caspase 등의 증가를 통해 세포를 고사시키고^{41,42} 敗醬이 남성호르몬 수용체를 통한 항원 감소로 세포고사를 유도한다는 연구결과⁴³ 등이 발표되었으며, 호르몬 비의존성인 PC-3 세포는 鬱金の 유전자조절⁴⁴과 厚朴의 염증억제과정⁴⁵ 등을 통해, DU-145 세포는 白芍藥과 敗醬의 유전자와 단백질 조절로 세포 고사를 유도한다는 연구^{46,47}가 보고되었다. LNCaP, PC-3, DU-145 세포에 농도별로 HDT를 투여한 결과 1%, 10% 투여 시 LNCaP, PC-3, DU-145 세포들의 증식이 유의하게 억제된 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 1), 이는 전립선암의 치료에 있어 HDT의 활용이 의미가 있을 뿐 아니라, 호르몬 의존성 전립선암 세포인 LNCaP

세포보다 호르몬 비의존성인 PC-3와 DU-145세포의 성장이 근소하게 더 억제된 것으로 보아 (Fig. 1) HDT는 호르몬 비의존성 전립선암에 더 효과적임을 유추해볼 수 있다.

MCF-7 세포는 유방암세포로 楡根皮, 薑黃, 橘葉散 變方 등이 세포독성이나 전달물질 조절과정을 통해 세포의 성장을 억제하는 유효한 효과를 나타낸 연구결과⁴⁸⁻⁵⁰⁾들이 발표되었다. 하지만 HDT의 투여에서는 0.1%와 1%에서는 유의한 효과를 나타내지 않고, 10%의 농도에서만 유의한 성장억제 효과를 나타내었다 (Fig. 2). 이를 통해 유방암의 치료에 있어 HDT는 다른 암종 보다는 효과가 적은 경향성을 나타내었다.

폐암의 연구에 다용되는 A-549세포에 대한 연구로는 桑白皮의 투여를 통해 세포 내 Bcl-2, Bax 조절과 caspase의 활성화가 이루어져 세포가 자멸되고⁵¹⁾, 葶藶大棗瀉肺湯과 葶藶湯의 투여로 p53, p21, Bax발현과 caspase의 활성화, Bcl-2의 억제로 인한 세포자멸사가 이루어지며⁵²⁾ 蘇木은 caspase, ATP 감소 등을 통해 한 세포자멸사 촉진으로 항암효과를 발휘한 연구결과가 있었다⁵³⁾. NCI-H292 세포도 폐암세포주으로써 인간 기관지 상피에서 유래하여 뮤신분비에 관여하며 仙方敗毒湯의 투여가 세포의 유전자 발현과 뮤신생성을 억제하는 연구가 보고되었다⁵⁴⁾. 이러한 두 종류의 폐암세포주에 대한 HDT의 투여에서는 1%, 10% 농도의 투여에서 유의한 성장억제 효과를 나타내었고, 두 폐암세포 중에서는 A-549세포에서 NCI-H292보다 뚜렷한 세포성장 억제를 나타내었다 (Fig. 3). 그러므로 HDT의 투여가 폐암세포의 성장을 유효하게 억제하나 암종의 종류에 따라 반응도는 다르게 나타날 수 있음을 알 수 있다.

만성 골수성 백혈병세포인 K-562 세포는 방사선 및 다양한 항암제에 대한 apoptosis에 저항성을 가지는 세포로⁵⁵⁾, K-562에 대한 연구로는 瓦松이 Bcl-2를 감소시키고 Caspase를 증가시켜 세포 자멸사를 일으키며⁵⁶⁾, 人蔘의 saponin이 대식세포를 통하여 K-562 세포의 치사활성을 증가시키는 것이 보고⁵⁷⁾되었으며, 이러한 K-562 세포에 대한 HDT의 투여에서는 0.1%, 1%, 10%의 농도 투여에서 세포성장억제가 억제되어 다른 암종에서보다 더 민감한 반응성을 보였으며 1%, 10% 농도투여에서는 생존 세포수가 다른 암종보다 확연히 적은 것으로 보아 HDT가 투여된 癌腫 중 가장 효과적으로 항암효과를 보였다고 할 수 있다 (Fig. 4). 따라서 HDT는 모든 암종에 효과를 보이거나 특히 만성 골수성 백혈병 세포의 성장억제에 효과가 좋은 경향성을 나타내었다.

또한 동시에 전립선암 세포주 및 유방암 세포주에 대해 黃芩에 함유된 주요 성분인 baicalein 및 黃連 및 黃柏에 함유된 주요 성분인 berberine을 처리한 결과, 두 물질 각각에 의해 黃連解毒湯의 방제수준에서와 유사한 암세포 증식억제작용이 발현되었다 (Fig. 5, 6). 이는 黃芩, 黃連, 黃柏의 주요 성분에 해당하는 baicalein, berberine의 단일 本草나 성분수준에서 뿐만 아니라 黃連解毒湯 자체, 즉 방제수준에서도 단일 성분들이 나타내는 항염증작용을 경유한 항암작용이 나타날 가능성을 시사함으로써, 黃連解毒湯이 기존의 임상적 응용 대상질환인 급만성 염증성질환의 치료 뿐만 아니라 인체의 악성종양치료 및 예방목적으로도 응용될 가능성을 제시하고 있다.

따라서 이러한 연구결과를 바탕으로 향후 癌의 예방 및 치료와 관련된 다양한 in vivo수준의 연구가 이뤄지고, 黃連解毒湯 자체의 투여용량 및 투여기간의 조절 등을 통해 黃連解毒湯의 항암 혹은 발암예방작용을 객관적으로 증명하기 위한 심층적 후속연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. Conclusion

인간 암세포의 증식에 黃連解毒湯과 黃連 및 黃柏의 주요 성분인 berberine 및 黃芩의 주요 성분인 baicalein등이 어떠한 영향을 미치는 지 검증하기 위하여 전립선암 (LNCaP, PC-3, DU-145), 유방암 (MCF-7), 폐암 (A549, NCI-H292) 만성 골수성 백혈병 (K-562) 등의 세포주에 약물처리를 한 후 약물이 암세포 증식에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃連解毒湯은 전립선암 (LNCaP, PC-3, DU-145), 유방암 (MCF-7), 폐암 (A549, NCI-H292) 만성 골수성 백혈병 (K-562) 등의 세포주에서 농도 의존적으로 유의성 있는 세포증식억제작용을 나타내었다.
2. 전립선암 및 유방암 세포주에 대한 baicalein 및 berberine 처리 결과, 두 물질 각각에 의해 黃連解毒湯 방제수준의 암세포 증식억제작용이 나타났다.

References

1. SNU medical university. Oncology. Seoul:SNU publish. 2001:2-3, 91.
2. Lee SH, Jo JG. A Literature study on malignant tumor focusing on intractable and incurable disease. Korean J Orient Int Med. 1995;16(2):17-29.
3. Ahn HS. Pediatrics 9th edition. Seoul:Daehangyogwaseo. 2007:813-5.
4. Koo WM. The Case study of the Medical Art Therapy for the hospitalized children with cancer. J Korean Assoc Child Phys Edu. 2009;10(1):68-80.
5. Koak GH, Lim LC, Kim SH. Bibliographic study on treating method of antitumor and prescription for the side effect by chemotherapy and radiotherapy. 1995; 10(1):45-87.
6. Lee JS, Lee YW, Cho JH, Son CK, Yoo HS, Cho CK. The Effects of immune activating herbs on the Anti-tumor activity. J Kor Orient Oncol. 2003;9(1):65-73.
7. Yan M, Myung SJ, Fink SP, Lawrence E, Lutterbaugh J, Yang P, Zhou X, Liu D, Rerko RM, Willis J, Dawson D, Tai HH, Barnholtz-Sloan JS, Newman RA, Bertagnoli MM, Markowitz SD. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase inactivation as a mechanism of resistance to celecoxib chemoprevention of colon tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(23):9409-13.
8. Shadman M, Newcomb PA, Hampton JM, Wernli KJ, Trentham-Dietz A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and statins in relation to colorectal cancer risk. World J Gastroenterol. 2009;15(19):2336-9.
9. Chen B, Su B, Chen S. A COX-2 inhibitor nimesulide analog selectively induces apoptosis in Her2 over-expressing breast cancer cells via cytochrome c dependent mechanisms. Biochem Pharmacol. 2009;77(12):1787-94.
10. Wu KK, Liou JY. Cyclooxygenase inhibitors induce colon cancer cell apoptosis via PPARdelta and 14-3-3 epsilon pathway. Methods Mol Biol. 2009;512: 295-307.
11. Kim DC, No SH, Lee SI, Lee YJ, Joo YS. Bangjehak. Seoul:YoungRimsa. 1990:111-3, 263-4.
12. Fushinati S, Tsuchiya K, Minakuchi K, Takasugi M, Murakami K. Studies on attenuation of post-ischemic brain injury by Kampo medicines inhibitory effects of free radical production. J Pharm Soc Japan. 1994;114(6):388-94.
13. Ohta Y, Sasaki E, Nishida K, Hayashi T, Nagata M, Ishiguro I. Preventive effect of Oren-gedoku-to (Huang-lian-jie-do-tang) extract on progression of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. American J Chinese Med. 1997;25(1):57-68.
14. Mizukawa H, Yosshida K, Honmura A, Uchiyama Y, Kaku H, Nakajima S, Haruki E. The effect of Oren-gedoku-to on experimentally-inflamed rats. American J Chinese Med. 1993;21(1):71-8.
15. Higasa K, Hatake K, Higasa M, Hishida S. Vasorelaxant effects of Oren-gedoku-to and its four constituent herbs. J Medical Pharm Soc WAKAN-YAKU. 1992;9:169-74.
16. Huh-Joon. Donguibogam. Seoul: Donguibogamchulpansa. 2005:1196-7.
17. Jeon BW, Ryu BH, Park DW, Ryu KW. A Literature study in etiology and pathology of tumor. Korean J Oncol. 1995;1(1):83-101.
18. Choi SH. Epistemology and pathology of tumor in Oriental medicine. Korean J Oncol. 1995;1(1):11-28.
19. Cho HR, Park SY, Han IY. Children with cancer: Adjustment to disease and body image. J Korean Soc Child Welfare. 2008;26:7-30.
20. Dodd MJ, Miaskowski C, Paul SM. Symptom clusters and these effect on the functional status of patients with cancer. Oncol Nurs Forum. 2001;28(3): 465-70.
21. Park RJ, Park YK. A Literatural study on medicinal herbs used in cancer therapy. Dongguk J Inst Orient Med. 2000;9:139-54.
22. Choi JH. Study on the carcinogenic and immunologic effects of aqua-acupuncture with fructus lycii and lycii radicis cortex extract. Daejeon Univ Doct Thesis. 1996;5(1):55-6.
23. Jeon SH, Gu Moon, Jeon BH, Effects od Jukyeopseokgotanggagambang on anti-tumor chemotherapeutic cytotoxicity and lysosomal enzymes of tumor cell. Korean J Orient Int Med. 1997;18(1):191-206.
24. Jeong HW, Choi JH, Jin CS. Effects of Water Extract of Flos Lonicerae and Herba Houuttuynie on the proliferation of human cancer cell-lines. Korean J Orient Med Pathol. 1996;10(1):126-32.
25. Yoon JW, Lee TK, Kim DI. A study of anti-cancer activity of the Scutellaria barbata D. Don. Water-

- extracts. *J Orient Obstetr Gynecol.* 2005;18(2):26-39.
26. Ryu SY. In vitro antitumor activity of flavonoids from *Sophora flavescens*. Thesis Collect Daejeon Univ Inst Korean Med. 1997;5(2): 503-7.
 27. Kim G, Kim DH, Choi BG, Kim SH. Study on antitumor effect of Kamicheungyeolhaedogtang. Thesis Collect of Daejeon Univ Inst Korean Med. 2000;8(2):93-106
 28. An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Park TS, Park JM,, Bae HJ, Pyeon JR. Antioxidant, anticancer and anti-bacterial activities of Naesohwangryntang and its ingredients. *Korean J Herbol.* 2005;20(4):17-26.
 29. Choi IW, Chae BY. Effect of Sunbangwhalmyeongum on antitumor and immune response. *Kyung Hee Univ Orient Med J.* 1992;15:341-59.
 30. KIM GT, Jeon BH. Influence of Gamihagochosan on the antitumor effect of anticancer drug and the proliferation of tumor cell lines. *Korean J Orient Int Med.* 1997;18(1):175-90.
 31. Doo HK, Park HJ. A Pharmacological study of Whangryonhaedoktang. *Kyung Hee Univ Orient Med J.* 1982;5(1):103-14.
 32. Ahn JH, Choi EY, Lee SH, Park IS, Lim SW. Effects of Hwangryunhaedoktang on DSS-induced colitis. *Korean J Orient Med Soc.* 2006;27(2):182-95.
 33. Kook YB. Effect of Hwangryunhaedok-tang on blood pressure and renal functions in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Orient Med Prescription.* 2002; 10(1):113-29.
 34. Seo HS. The experimental study on anti-bacterial potency of Soyum Herbal acupuncture, Hwangryunhaedoktang & Coptidis rhizoma on *Staphylococcus aureus*. *J Pharmacopuncture.* 2006;9(2):87-92.
 35. Shin MK (compilation). *Imsangbonchohak.* Seoul: Younggrimsa. 1997:372, 400, 402, 405.
 36. Yoon GY. *Donguibangjehak.* Seoul:Koomonsa. 1989:81.
 37. Kim SH. Study on trends of cancer study in TKM and its research strategy in future. *Korean J Orient Medical Soc.* 1998;19(1):470-99.
 38. Norrish AE, Jackson RT, Mcrae CU. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and prostate cancer progression. *Inte J Cancer.* 1998;77(4):511-5.
 39. Harris RE, Nambodiri KK, Farrar WB. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiol.* 1996;7(2):203-5.
 40. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, Dubois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Investig.* 2000;105(11):1589-94.
 41. Park SY, Kim EJ, Lim DY, Kim JS, Lim SS, Shin HK, Yoon JH. Inhibitory Effect of the Hexane Extract of *Saussurea lappa* on the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *Korean J Soc Food Sci Nutr.* 2008;37(1):8-15.
 42. Kim SR, Ryu BH, Yoon SW. Anti-tumor effects of Realgar on Stomach Cancer Cells(AGS), Glioma Cells (T98G, A172, SNU-489) and Prostate Cancer Cells (LNCaP). *Korean J Orient Int Med.* 2007;28(3):409-20.
 43. Moon, HC.. Apoptosis inducing effect of Herba Patriniae extract in the prostate cancer LNCaP cells. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2004;18(3):863-7.
 44. Park SH, Ryu BH, Kim JS, Yoon SH. Induction of Apoptosis by *Curcuma aromatica* on Lung Cancer Cells (A549), Cervical Cancer Cells (HeLa), Glioma Cancer Cells (A172) and Prostate Cancer Cells (PC3). *Korean J Orient Int Med.* 2006;27(2):379-93.
 45. Kim GJ, Song HS. Obovatol extracted from *Magnolia Obovata* Inhibits Inflammation Mediator Generation and Prostate Carcinoma PC-3, LnCaP cell growth through induction of apoptotic cell death via Inactivation of NF-kB. *Korean J Korean Acupunct Moxibustion Soc.* 2007;24(2):15-21.
 46. Kwon KB, Kim EK, Kim KJ, Kang GS, Kim YS, Kim IK, Kim IS, Lee SK, Seo EA, Ryu DK. Study on Apoptosis inducing effects and Mechanism of *Radix Paeoniae Alba* extract in DU145 Human Prostate Cancer cell. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2004;18(6): 1617-21.
 47. Kwon KB, Kim EK, Ryu CI, Park HK, Seong KH, Song JM, Lee KY, Kwon YD, Seo EA, Ryu DG. Apoptosis inducing effect of Herba Patriniae extract in Androgen independent Prostate Cancer DU145 cells. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2004;18(6):1661-5.
 48. Yang SJ, Cho SH, Cho SI, Na WM. Anti-proliferative effect of *Ulmi Pumilac Cortex* extracts on MCF-7 cells. *Korean J Orient Obstetr Gynecol.* 2007;20(3):35-44.
 49. Cho SI, Jung S, Kim HW, Park JE, Kim YG. Inhibition of cellular proliferation by *Curcumae Longae Rhizoma* extracts on MCF-7. *Korean J Herbol.* 2006;21(1):71-7.

50. Jo HJ, Yang SJ, Cho SH, Cho SI. Anti-proliferation effect of Gyulyupsanbyonbang extracts on MCF-7 cells. *Korean J Orient Obstetr Gynecol.* 2007;20(1):50-60.
51. Bae OS, Yoo YM, Lee SG. Pro-apoptotic effect of Mori Cortex Radicis in A549 Lung cancer cells. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2005;19(6):1563-7.
52. Yu BG, Kim MD, Hwang TJ, Yoo YM, Lee SS. Apoptotic effects of Junglyeokdaejosape-tang and Junglyeok-tang on A549 lung cancer cells. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2005;19(5):1204-12.
53. Mun YJ, Nam YJ, Lee KG, Choi DH, Lee SW, Ahn SH, Choi MK, Woo WH. The water extract of caesalpinia sappan induces apoptosis on human lung cancer cell line A549 cells. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2002; 16(3):521-7.
54. Nam TH, Park YC. Effects of Seonbangpaedok-tang and Sigyeongcheongpye-tang on PMA-induced Production of Airway Mucin and Expression of MUC5AC. *Korean J Orient Med Soc.* 2008;29(4):123-32.
55. Rumjanek VM, Trindada GS, Wangner-Souza K. Multidrug resistance in tumor cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An Acad Bras Ci.* 2001;73(1):57-69.
56. Yoon KS, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. Effect of *Orostschys japonicus* A. Berger on Apoptosis in K562 Cell Lines. *Korean J Orient Int Med.* 2006;27(1):166-77.
57. Kim W, Jung NP. Effects of a Ginseng Saponin Fraction on the Tumoricidal Activity of Murine Macrophage Against K562 Cells. *Korean J. Ginseng Soc.* 1989; 13(1):24-9.