

신경아세포종에 대한 八寶廻春湯의 항암 효과

안정환¹, 조문영², 우 찬², 신용진², 신선호²
¹약천한의원, ²원광대학교 한의과대학 내과학교실

Anti-cancer Effects of *Palbohoichoon-tang* on Neuroblastoma Cells

Jung-hwan An¹, Mun-young Cho², Chan Woo², Yong-jin Shin², Sun-ho Shin²
¹YacCheon Oriental Medical Clinic
²Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University

ABSTRACT

Objectives : To investigate the anti-cancer effect of *Palbohoichoon-tang* (PBHCT) extracts.

Methods : The cell viability was assessed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and cell morphological changes were microscopically analyzed after staining with 10 μ M 2-[4-amidinophenyl]-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI) and TUNEL. We also analyzed expression of Bcl2, Bcl_{xL}, Bax, procaspase-3, procaspase-9, and pro-cyclic acidic repetitive protein (PARP) by western blot method.

Results : Observations showed that PBHCT induced the apoptotic cell death proved by increased sub-G1 phase cell population, apoptotic body formation and chromatin condensation. Western blot analysis of total cell lysates revealed that the PBHCT induced cleavage of caspase-9, caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). In addition, PBHCT dose-dependently increased the activity of caspase-9, caspase-3 and PARP-1. Furthermore, PBHCT reduced anti-apoptotic Bcl2, Bcl_{xL} expression which contributed to the loss of mitochondrial membrane potential and the activations of caspase-9 and caspase-3.

Conclusions : These findings suggest that PBHCT exerts anti-cancer effects on human neuroblastoma SH-SY5Y cells by inducing apoptotic death via down-regulation of anti-apoptotic proteins such as Bcl2 and Bcl_{xL}, up-regulation of pro-apoptotic proteins such as Bax, and activation of caspase cascades and PARP-1.

Key words : SH-SY5Y cell, Anti-cancer effect, *Palbohoichoon-tang* (PBHCT)

1. 서론

우리나라 인구 약 4명 중 1명의 사망 원인인 암은 국민건강에 커다란 위협 요인으로 대두되고 있으며¹, 고령화와 환경변화 등으로 인해 지속적인 증가추세에 있어 암 정복을 위한 예방·진단·치료 기술 개발은 인류공통의 시급한 과제로 부각되고 있다².

서양의학에서 암의 원칙적인 치료 형태는 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 생물학적으로법의 4가지가 있다. 이 4가지 치료법은 암의 전이를 억제하고 생존율을 높이는 등의 장점이 있으나, 방사선요법은 환자에게 급성 독성과 장기간 후유증을 초래하며, 화학요법은 정상세포에 대한 독성으로 인해 골수억제, 오심, 구토, 구내염, 탈모증 등의 부작용이 나타난다³. 한편 근래 대두되고 있는 줄기세포를 이용한 항암치료는 아직 실용화를 위한 개발단계에 있으며 매우 높은 비용으로 인해 아직 효용성이 낮다.

· 교신저자: 신선호 전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1
원광대학교 전주한방병원 침계내과학교실
TEL: 063-270-1013 FAX: 063-270-1594
E-mail: shshin@wonkwang.ac.kr

한의학에서 암의 病機는 氣滯血瘀, 邪毒鬱熱, 痰濕結聚, 臟腑失調, 經絡瘀阻이며, 암의 常用治法에는 扶正培本, 理氣活血, 清熱解毒, 軟堅散結, 化痰祛濕, 以毒功毒, 養陰清熱, 健脾益腎, 對症治療 등이 있다. 암은 병이 복잡하고 종류가 다양하며 여러 조직, 기관에 연관되고 寒熱虛實이 挾雜되어 나타나므로, 상기 치법 중 扶正培本을 기초로 하여 여러 치법을 배합하는 것이 가장 중요하다. 扶正培本은 인체 陰陽, 氣血, 臟腑, 經絡기능을 조절하여 항암작용을 증강시키는 치료법으로서, 많은 임상연구와 실험연구를 통하여 생존율 상승, 방사선요법과 화학요법의 독성 및 부작용 최소화, 면역기능 향상, 골수조혈기능 개선 등의 효과가 있음이 증명되었다³.

八寶廻春湯은 《方藥合編》⁴에 기록되어 있는 처방으로, 陰陽氣血을 보하는 十全大補湯을 기본으로 하고 活血, 補氣, 祛痰, 溫熱, 發表, 理氣劑를 더해 風虛證의 증상을 치료하기 위한 처방으로 사용되어 왔으며⁵, 암에 대한 예방 및 치료효과는 아직까지 밝혀진 바 없다. 다만, 八寶廻春湯의 기본이 되는 十全大補湯은 최⁶, 황⁷, 황⁸ 등의 연구를 통해 면역증강 및 항암작용이 보고되어, 十全大補湯에 扶正祛風하는 효능의 小續命湯을 合方하고, 이 외에 祛痰하고 寒溫을 調和하는 약재를 더한 八寶廻春湯 역시 扶正培本하는 항암효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구를 수행하였다. 암의 常用治法 중 가장 근본이 되는 扶正培本法은 단순히 補益強壯의 방약을 응용할 뿐만 아니라 인체 음양, 기혈, 장부, 경락의 평형과 안정을 조절하는 방법을 모두 포함하는 것으로, 八寶廻春湯의 처방의미와 맥락을 같이 한다고 볼 수 있겠다.

이에 본 연구에서는 八寶廻春湯의 항암효과 및 그 기전을 알아보기 위하여 인간 신경아세포종인 SH-SY5Y 세포에 八寶廻春湯을 처리하여 세포 생존율의 변화와 세포의 형태학적 변화 및 세포고사 (apoptosis) 관련 단백질 발현의 변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 八寶廻春湯의 처방 내용은 《方藥合編》에 수록된 약재의 구성과 용량을 기준으로 하였다. 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였으며, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Palbohoichoon-tang.

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
白芍藥	<i>Radix Paeoniae Alba</i>	4.8
黃芪	<i>Radix Astragali</i>	3.2
白朮	<i>Rhizoma Atractylodis Macrocephalae</i>	2.4
白茯苓	<i>Pachyma hoelen</i>	2
半夏	<i>Rhizoma Pinellae</i>	2
附子	<i>Radix Aconiti Lateralis Preparata</i>	1.6
人蔘	<i>Radix Ginseng</i>	1.6
麻黃	<i>Herba Ephedrae</i>	1.6
黃芩	<i>Radix Scutellariae</i>	1.6
防己	<i>Radix Cocculi Seu Stephaniae Tetrandrae</i>	1.6
杏仁	<i>Semen Armeniacae Amarum</i>	1.6
川芎	<i>Rizoma Chuanxiong</i>	1.6
當歸	<i>Radix Angelicae Sinens</i>	1.6
陳皮	<i>Pericarpium Citri Reticulatae</i>	1.6
防風	<i>Radix Saposhnikoviae</i>	1.6
肉桂	<i>Cortex Cinnamomi</i>	1.6
乾薑	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	1.6
香附子	<i>Rhizoma Cyperi</i>	1.6
熟地黃	<i>Radix Rehmanniae Preparata</i>	1.6
生乾地黃	<i>Radix Rehmanniae</i>	1.6
甘草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	1.6
枕香	<i>Lignum Aquilariae Resinatum</i>	1.2
烏藥	<i>Radix Linderae</i>	1.2
川烏	<i>Radix Aconiti</i>	1.2
生薑	<i>Rhizoma Zingiberis Recens</i>	4
大棗	<i>Radix Codonopsis Pilosulae</i>	4
Total amount		50

2) 시약 및 기기

세포생존율을 측정하기 위한 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)와 bicinchoninic acid(BCA), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다. 분광광도계(ELISA reader)는 THERMO max(Thermo Fisher Scientific Inc., CA, USA)를 사용하였고, Bcl2, Bcl_{XL}, Bax, procaspase-3, procaspase-9, PARP 및 actin에 대한 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham 사(Amersham, England)에서 구입하여 사용하였다.

3) 세포주

세포 배양에 필요한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCOBRL사(Grand Island, NY, USA) 제품을, 배양용기(24-well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

八寶廻春湯 2貼 분량(100 g)을 증류수 1,500 ml와 함께 3,000 ml 환저 플라스크에 넣은 다음, 2시간 30분 동안 가열하여 얻은 전탕액 723.4 ml를 여과지로 여과한 후 5,000 rpm으로 30분 원심분리하고, 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 시료 27.8 g을 얻었다. 튜브에 건조한 시료 27.8 g을 100 mg/ml 농도로 증류수에 녹여서 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 다음, 원심분리한 시료의 상층액을 0.2 µm filter에 통과시켜 멸균한 후 냉장 보관하고, 사용 시에는 세포 배양액인 DMEM에 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

SH-SY5Y 세포와 PC-12 세포는 ATCC(American Type Cell Culture, VA, USA)에서 구입하여 세포

배양기(37 °C, 5% CO₂)에서 10% FBS가 포함된 DMEM(GIBCO BRL, NY, USA)으로 배양하였으며, 2-3일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포를 이용하였다.

3) 세포 생존율 측정

세포생존율은 MTT 분석방법을 이용하여 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵ cells/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후 시료를 각각의 조건에 따라 처리하였다. 각각의 배양세포에 배양액의 1/10로 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 첨가하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고, 1 ml DMSO를 첨가하여 세포를 용해한 다음, 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) DAPI 염색

세포는 4% formaldehyde 용액에 고정된 후 인산 완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)으로 세척하고, 10 µM 2-[4-Amidinophenyl]-6-indolecarbamidine dihydrochloride(DAPI)로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경 Leica MPS60(Leitz, Wetzlar, Germany)로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

5) TUNEL 염색

세포를 슬라이드에 부착하고 4% formaldehyde 용액에 고정된 후 TUNEL 염색을 실시하였다. TUNEL 염색을 위해 Roche 사에서 출시된 *In Situ* Cell Death Detection Kit(TUNEL POD kit, Cat No. 11 684 817 910, Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 고정과정을 마친 세포는 PBS로 세척한 후 pepsin으로 30분간 37 °C에서 반응시킨 후 label solution과 enzyme solution(TUNEL reaction mixture)을 혼합하여 세포에 반응시켰다. Negative control은 terminal transferase가 포함되지 않은 label solution을 처리하고, positive control은 DNase I recombinant와 10분간 37 °C에서 반응시켰다. 그 후

TUNEL reaction mixture를 37 °C에서 60분간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고, 형광현미경 Leica MPS60(Leitz, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다.

6) Western blot 분석

배양된 SH-SY5Y 세포는 포집하여, 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과 4 °C에서 30분 반응시켰다.

동량의 세포파쇄액(200 µg)과 2×sample buffer를 혼합하여 100 °C에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후 12.5% 및 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 electrotransfer system(Ellard Inc, Seattle, WA, USA)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응시켰다.

Bcl2, Bcl_{xL}, Bax, procaspase-3, procaspase-9, PARP 및 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 반응시켰으며, 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 각각 1시간 반응시킨 후 ECL kit(Amersham, England)를 이용하여 현상하였다.

7) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, Madison, Wisconsin, USA)을 이용하여 추출하였다. 먼저 조건에 따라 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 다음, RNase를 37 °C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고, isopropanol 침전에 의해 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여

기에 TE 완충용액을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 spectrophotometer(Beckman Coulter Inc., CA, USA)로 optical density(OD)값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 µg을 2.0% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide(EtBr)로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

8) Caspase family cysteine protease 활성도 측정

배양된 SH-SY5Y 세포는 포집하여, 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과 4 °C에서 30분 반응시켰다.

동량의 세포파쇄액(100 µg)은 caspase assay buffer(100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 2mM DTT)로 희석한 형광 기질(caspase-3: AMC-DEVD, caspase-9: Ac-LEHD-AFC)과 37 °C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 형광세기를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다.

9) 통계처리

표시된 결과는 3회 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. 결 과

1. 八寶廻春湯 농도에 따른 SH-SY5Y 및 P12 세포의 생존율 변화

八寶廻春湯의 세포독성을 확인하기 위하여 신경아세포종인 SH-SY5Y 세포와 정상신경세포인 PC-12 세포에 八寶廻春湯을 농도별로 처리한 다음, 24시간 후에 MTT 방법으로 세포생존율을 조사하였다.

그 결과, 八寶廻春湯 50 µg/ml의 농도에서부터

SH-SY5Y 세포의 세포사멸을 유도함을 확인하였으며, 八寶廻春湯 처리농도에 의존적으로 세포생존율이 유의하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었고, 200 µg/ml의 八寶廻春湯 처리 시 약 50%의 세포생존율을 나타내었다(Fig. 1A). 반면 PC-12 세포에서는 200 µg/ml의 농도까지는 유의한 세포 독성이 없었으며, 400 µg/ml의 농도에서는 약간의 세포독성이 관찰되었다(Fig. 1B).

이를 통해 八寶廻春湯은 200 µg/ml의 농도 범위에서는 신경세포에 손상을 주지 않으면서 신경아세포종에만 선택적으로 세포사멸을 유도함을 확인할 수 있었으며, 이하 모든 실험에서는 암세포의 세포사멸에만 영향을 미치는 200 µg/ml의 농도까지 八寶廻春湯을 처리하여 SH-SY5Y 세포의 세포사멸 기전들을 조사하였다.

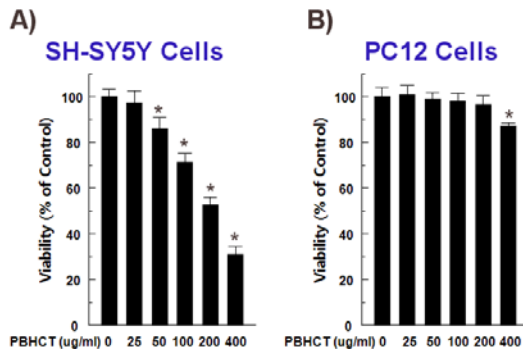


Fig. 1. Effect of PBHCT on SH-SY5Y cell death.

Cells were treated with the indicated doses of PBHCT for 24 hr. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean \pm S.E.M. of three individual experiments. * $p < 0.05$

2. 八寶廻春湯이 SH-SY5Y 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

八寶廻春湯에 의한 SH-SY5Y 세포의 세포사멸이 세포고사를 통한 것인지를 확인하기 위하여 먼저 핵산 염색 시약인 DAPI를 이용하여 세포핵의 형태를 조사하였다. 정상 대조군 세포의 핵은 타원 형태의 핵이 균질하게 염색되어 관찰되었으나, 八寶廻春湯(200 µg/ml)을 처리한 세포의 핵은 세포고사 현상의 형태학적 특징으로 알려진 염색사 응축현상(chromatin condensation)이 관찰되었다(Fig. 2A).

또한, 세포 내 DNA를 추출하여 전기영동을 통해 세포고사의 또 다른 전형적인 특징인 DNA ladder 현상을 확인해 본 결과, 정상 대조군 세포에서는 DNA ladder 현상이 관찰되지 않았지만 八寶廻春湯(200 µg/ml)을 처리한 세포에서는 명확한 DNA ladder 현상이 관찰되었다(Fig. 2C).

八寶廻春湯에 의해 SH-SY5Y 세포의 세포고사가 일어남을 좀 더 명확히 구명하기 위하여 Annexin V와 TUNEL 염색을 이용하여 八寶廻春湯에 의해 세포고사가 일어난 세포들을 조사하였다.

먼저 유식세포 분석기를 통하여 세포고사가 일어난 세포수를 확인해 본 결과 정상 대조군 세포에서는 PI와 Annexin V가 동시에 염색되어 보이는 세포고사가 일어난 세포수가 거의 관찰되지 않은 반면, 八寶廻春湯(200 µg/ml)을 처리한 세포에서는 대조군에 비해 세포고사가 일어난 세포수가 현저히 증가됨을 확인하였다(Fig. 2B). 이와 비슷하게 TUNEL 양성 세포도 정상 대조군 세포에서는 관찰되지 않았지만 八寶廻春湯(200 µg/ml)을 처리한 세포에서는 TUNEL 양성 세포수가 현저히 증가됨을 관찰하였다(Fig. 2D).

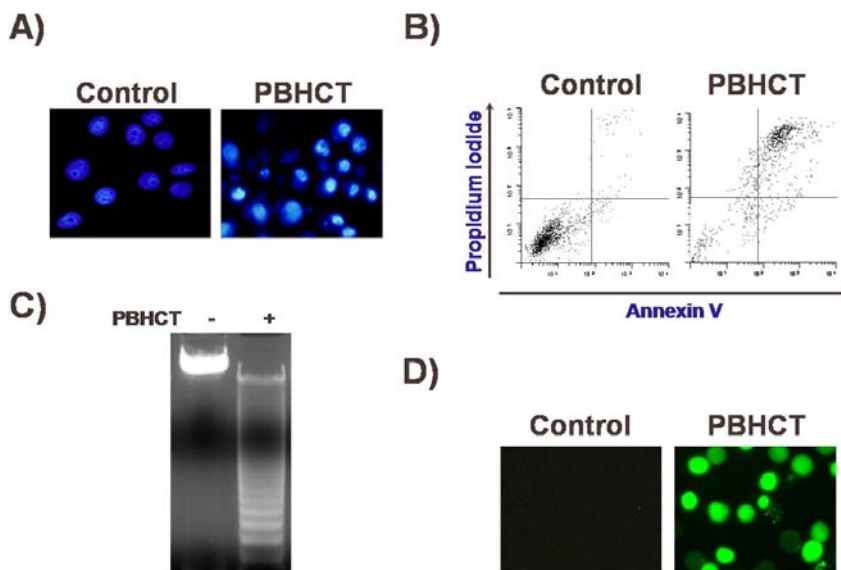


Fig. 2. PBHCT induced apoptosis in SH-SY5Y cells. Cells were incubated with PBHCT (200 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr.

(A) After washing the cells with PBS, cells were fixed with 4% formaldehyde and stained with DAPI. Morphology of nuclei from the cells were observed under fluorescent microscope. (B) Cells were stained with PI and Annexin V, and then apoptotic cells were measured by flow cytometry. (C) Genomic DNA was isolated, and separated on 2% agarose gels, then stained with EtBr and visualized under UV light. (D) Cells were stained with TUNEL and then observed under fluorescence microscope.

4. 八寶廻春湯이 Caspase-9 protease와 Caspase-3 protease의 활성화에 미치는 영향

Caspase family cysteine protease들의 활성화가 직접적으로 세포고사를 유발한다고 알려져 있으며 이들은 평상시 procaspase의 형태로 존재하다가 자극 시 활성화되면 active caspase의 형태로 분절된다. 따라서 caspase family cysteine protease들의 활성화는 이들의 pro-form의 발현감소로 판단할 수 있다^{9,10}.

SH-SY5Y 세포에서 八寶廻春湯에 의한 세포고사에 Caspase-9 protease와 Caspase-3 protease가 관여

하는지를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 八寶廻春湯을 농도별로 처리한 다음, Caspase-9 protease와 Caspase-3 protease들의 발현 변화를 조사하였다. 그 결과, procaspase-9와 procaspase-3 protease의 발현이 八寶廻春湯 처리농도에 따라 감소하는 현상을 관찰하였다(Fig. 3A, C). 이러한 procaspase-9와 procaspase-3 protease의 발현 감소가 직접적으로 caspase-9와 caspase-3 protease의 활성화 증가를 유발하는지를 확인해 본 결과, 八寶廻春湯 처리농도에 따라 caspase-9와 caspase-3 protease의 활성화가 유의하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 3B, D).

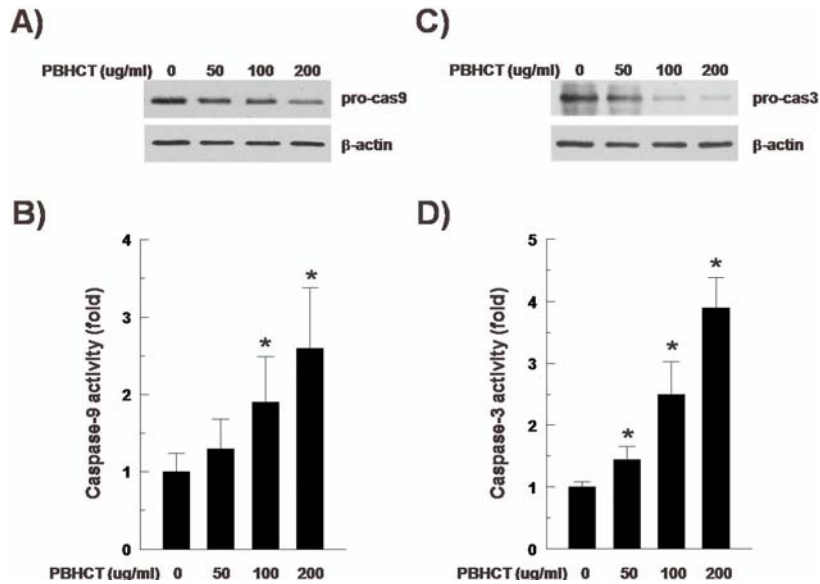


Fig. 3. PBHCT increased caspase-9 and caspase-3 protease activities in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were treated with the indicated doses of PBHCT for 24 hr. The immunoreactive signals were visualized by ECL (A, C). Caspase-9 and caspase-3 activity assays were performed with cell homogenates using a caspase-9 and caspase-3 activity assay kit (B, D). Data represent the mean \pm S.E.M. of three individual experiments (* p <0.05).

5. 八寶廻春湯이 세포고사 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Bcl2 계열 단백질들은 대표적으로 항세포고사 단백질인 Bcl2와 Bcl_{XL}, 그리고 세포고사 단백질인 Bax 등이 있으며, 이들의 균형이 caspase들의 활성을 조절함으로써 세포고사와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹³.

따라서, 八寶廻春湯에 의한 Bcl2 계열 단백질의 발현 변화를 조사한 결과, 八寶廻春湯을 처리한 농도에 의존적으로 항세포고사 단백질인 Bcl2와 Bcl_{XL}의 발현이 정상 대조군에 비해 감소되었으며, 세포고사 단백질인 Bax의 발현은 정상 대조군에 비해 현저히 증가되었다(Fig. 4).

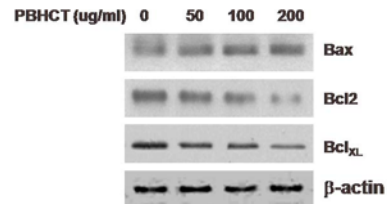


Fig. 4. Pro-apoptotic and anti-apoptotic protein expressions by PBHCT in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were treated with the indicated doses of PBHCT for 24 hr. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with Bax, Bcl2 and Bcl_{XL} antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

6. 八寶廻春湯이 PARP-1의 활성화에 미치는 영향

PARP-1(poly ADP-ribose polymerase-1) 단백질은 세포고사의 marker로서 핵에 존재하면서 caspase-3의 작용으로 분절되어 활성화되는 것으로 알려져

있다^{14,15}.

SH-SY5Y 세포에서 八寶廻春湯에 의한 세포고사에 PARP-1이 관여하는지를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 八寶廻春湯를 농도별로 처리한 다음, PARP-1의 발현 변화를 조사하였다. 그 결과, PARP-1 단백질의 분절이 八寶廻春湯 처리농도에 따라 증가하는 현상을 관찰하였다(Fig. 5A). 다음으로 八寶廻春湯에 의한 PARP-1 단백질의 분절이 PARP-1 단백질의 활성 증가를 직접적으로 유발하는지를 확인해 본 결과, 八寶廻春湯 처리농도에 따라 PARP-1 단백질의 활성이 유의하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 5B).

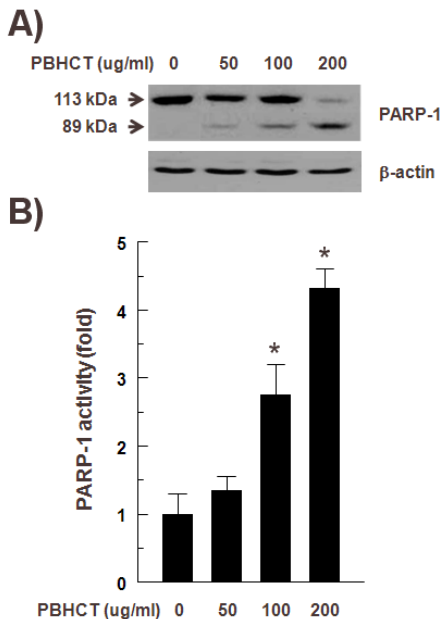


Fig. 5. PBHCT increased PARP-1 activity in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were treated with the indicated doses of PBHCT for 24 hr. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-PARP-1 antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL (A). PARP-1 activity assays were performed with cell homogenates using a PARP-1 activity assay kit (B). * $p < 0.05$

IV. 고찰

세포는 성장(growth), 분화(differentiation), 프로그램된 죽음(apoptosis)의 과정을 밟거나 성장이 정지된 상태를 유지하고 있으며, 이러한 과정은 인체 내에서 엄격히 조절되는 과정이다^{16,17}. 암세포는 세포 유전자 중 일부에 이상이 발생하여 이들 유전자의 산물인 단백질의 특성이 바뀌게 되고, 그 결과로 세포성장 조절에 이상이 발생한다. 이러한 세포성장 조절의 이상은 유전자의 변이를 동반하므로 암은 유전자의 이상에 의한 유전자 질환으로 생각되어지고 있으며, 정확한 암의 발생원인은 아직 밝혀지지 않았으나 내적 요인으로는 유전인자, 면역학적 요인 등이, 외적 요인으로는 화학물질(담배, 대기오염, 약물, 식이, 직업적으로 노출되는 발암물질), 방사선, 바이러스 등이 발암의 원인으로 알려져 있다. 암 발생률은 더욱 증가할 것으로 전망되고 있으며, 2010년 우리나라 사망원인 분석 결과를 보면, 악성신생물(암)로 인한 사망이 1위를 차지하고 있고, 2009년 발표된 국가암 등록 통계에 따르면 14세 이하의 소아암 중에서 뇌 및 중추신경계에 발생하는 암의 발병률은 백혈병 다음으로 가장 높으며, 5년 이상 생존율이 가장 낮은 치명적 암으로 분석되고 있다¹⁸.

서양의학에서 암 치료로 사용되는 항암제는 암세포의 전이와 치료에 도움을 주지만 반대로 항암제의 독성에 의해 인체의 면역력에 손상을 준다^{19,20}. 그러나 한의학에서의 암 치료는 암세포를 직접 공격하기 보다는 健脾益氣, 養陰生津, 滋陰補血, 溫補脾腎 등의 扶正培本의 방법을 통해 환자 본인의 면역력을 올려 이겨낼 수 있도록 하는 것이 그 치료방향이 된다³.

八寶廻春湯은清代《沈氏尊生書》에 처음으로 수록된 처방으로, 이후 우리나라 기록으로는 許浚의《東醫寶鑑·風門》과《方藥合編》등에 인용되어 있다²¹.《東醫寶鑑》에 따르면 八寶廻春湯은 “治一切風虛諸證去風和氣活血大有神效夫氣血和平

榮衛調順則風證自去”하는 처방으로, 임상에서는 中風으로 인한 수족마비, 언어장애, 두통, 현훈, 치매 등의 증상에 있어, 虛弱이 바탕이 되어 있으면서 증상이 어느 정도 고착화 되었을 때 주로 사용한다. 八寶廻春湯의 처방 구성을 살펴보면, 十全大補湯으로 氣血을 補하며 小續命湯으로 風證을 치료하고 半夏 陳皮로 祛痰하며, 乾薑, 生地黃, 沈香, 烏藥, 川烏로 寒溫을 조화하고 理氣祛風한다. 특히 十全大補湯은 앞선 연구를 통해 면역증강 및 항암 작용이 보고되어, 十全大補湯을 기본으로 한 八寶廻春湯 역시 항암효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구를 수행하였다⁵⁻⁷.

따라서 본 연구에서는 八寶廻春湯이 인간 신경아세포종인 SH-SY5Y 세포의 세포생존율에 미치는 영향, 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향, 세포고사 현상에 관여하는 단백질의 변화 등을 관찰하였다.

八寶廻春湯에 의한 SH-SY5Y 세포생존율을 관찰한 결과, 八寶廻春湯 농도에 의존적으로 세포생존율이 감소되었으며, 200 µg/ml의 八寶廻春湯 처리 시 약 50%의 세포생존율을 나타낸 반면, 정상 신경세포인 PC-12 세포에서는 200 µg/ml의 농도까지 유의한 세포 독성이 없었다(Fig. 1). 이는 八寶廻春湯이 서양의학에서 사용되는 항암제들과 달리 정상세포에 손상을 주지 않으며 암세포에만 선택적으로 세포사멸을 유도하는 효과를 가지고 있음을 의미한다.

세포고사(apoptosis)는 세포괴사에 대비되는 세포사의 한 형태로 개체의 발달과정 및 기능유지에 중요한 역할을 하며, 이 과정의 조절이상은 암, 퇴행성질환 및 자가면역질환의 발생에 관여한다. 세포고사는 괴사에 의한 세포사와 달리 세포용적의 감소와 염색질의 농축 및 분절(fragmentation)이 일어나고 염색반응의 유발없이 세포가 사멸된다^{22,23}. 이러한 세포고사 과정에 다양한 기전들이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 크게 세포외부 apoptosis 관련 신호들이 death receptor(FasL and TNF receptor)

를 자극하여 일어나는 extrinsic apoptosis pathway와 세포 내 요인에 의해 주로 미토콘드리아에서 Bax, Apaf-1, caspase-9 및 cytochrome c 등이 관여하는 Intrinsic apoptosis pathway로 구분되어지고 있다²⁴⁻²⁶.

八寶廻春湯 처리에 의한 SH-SY5Y 세포의 사멸이 세포고사현상과 관련있는지를 확인해 본 결과, 八寶廻春湯을 처리한 SH-SY5Y 세포에서 전형적인 세포고사의 형태학적 특징인 염색사의 응축과 핵분절이 관찰되었으며, Annexin V와 TUNEL 염색을 통해 분석한 결과, 八寶廻春湯에 의해 세포고사 양성세포의 수가 증가함을 확인하였다(Fig. 2). 이상의 결과는 八寶廻春湯에 의한 SH-SY5Y 세포의 사멸이 세포고사의 과정에 의한 것임을 시사한다. 세포고사 관련 유전자는 예쁜 꼬마선충(*C. elegans*)의 유전학적인 연구를 통해 세포고사의 조절과 실행, 그리고 사멸체를 제거하는 일련의 유전자들이 밝혀지기 시작했으며, 특히 이중에서 'Ced-3, Ced-4, Ced-9'의 3가지 유전자는 그 중요성으로 인하여 특별히 관심을 모으고 있다²⁷⁻²⁹. Ced-3는 인간에서 caspase라는 단백질 분해효소군에 상응한다. Caspase는 그 이름에서 나타나 있듯이 단백질 분해효소(protease)로 세포 내 기질이 알려지기 시작하였고 이에 대한 연구가 진행되면서 caspase가 기질에서 aspartic acid 다음을 끊는 기질 특이성이 있음이 밝혀졌다. 현재까지 알려진 caspase는 13 종류가 존재하며 모든 알려진 caspase들은 세포 내에서 전구(pro) 부위를 갖는 전구체 zymogen 형태의 비활성 효소로 합성된다. 이들이 apoptosis 신호에 의해 활성화되면 단백질 분해에 의해 단백질의 N-말단에 위치하는 앞 부위가 전구체의 구조에서 제거된다. 이때 일어나는 caspase 내부의 절단은 aspartic acid 위치에서 이루어지며, 또 한번의 단백질 절단이 C-말단에서 일어나 하나의 큰 단위체와 작은 단위체로 분리된 후 재결합하여 이질 결합체(hetero dimer)를 구성하여 활성을 갖게 된다. 이와 같이 전구체의 caspase에서 aspartic acid의 다음 위치가 절단

되어 분리가 일어날 때 한 종류의 caspase가 다른 caspase를 활성화시키며, 이러한 기전을 통해 caspase 효소들의 상호활성화가 일어난다. 따라서 caspase family cysteine protease들의 활성화는 이들의 pro-form의 발현 감소로 판단할 수 있다^{9,30-32}.

八寶廻春湯이 세포고사 관련 단백질인 caspase들의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, 八寶廻春湯 처리농도에 따라 procaspase-9과 procaspase-3 protease의 발현이 감소함과 동시에 caspase-9과 caspase-3 protease의 활성화가 증가됨을 확인하였다 (Fig. 3). 이는 八寶廻春湯이 caspase-9과 caspase-3 protease의 활성화 증가를 통해 SH-SY5Y 세포의 세포고사를 유도하였음을 시사한다.

Bcl2 계열 단백질은 cytochrome-c의 유출을 조절하는데 관여하는 중요한 단백질로서, 미토콘드리아 외막에 존재하여 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome-c나 세포고사 유발인자의 이동을 조절한다^{33,34}. Bcl2 계열 단백질은 기능적으로 cytochrome-c의 배출을 억제시키는 Bcl2와 Bcl_{XL} 같은 항세포고사 단백질과 Bax, Bad와 같은 전세포고사 단백질군으로 분류되며, 이들의 상호작용을 통해 세포의 운명을 결정한다^{35,36}. 유출된 cytochrome-c는 apoptotic protease activating factor-1(Apaf-1) 및 procaspase-9와 결합하여 apoptosome을 형성함으로써 caspase-9을 활성화시켜 마지막으로 caspase-3를 활성화시킨다. 활성화된 caspase-3는 단백질 분해효소로서 세포고사 신호를 세포 밖에서 세포 내로 매개하는 역할과 세포 내 핵심적 단백질이나 구성 분자를 분해하는 등 다양한 기능을 통해 세포고사를 유도한다^{15,37}. 실제 암세포 내에는 항세포고사 단백질인 Bcl2의 과발현과 세포고사 전구 단백질인 Bax의 저발현이 관찰되는 등 세포고사를 저해하는 기전이 다양하게 존재한다^{13,38}.

본 연구에서도 八寶廻春湯을 처리한 SH-SY5Y 세포에서 八寶廻春湯 처리농도에 의존적으로 항세포고사 단백질인 Bcl2와 Bcl_{XL}의 발현이 정상 대조군에 비해 감소되었으며, 세포고사 단백질인 Bax

의 발현은 정상 대조군에 비해 현저히 증가되었다 (Fig. 4). 이러한 결과는 八寶廻春湯이 Bcl2 계열 단백질 중 세포고사 단백질인 Bax 단백질의 기능을 활성화시키고, 항세포고사 단백질인 Bcl2와 Bcl_{XL} 단백질의 발현을 감소시켜 caspase들을 활성화시킴으로써 SH-SY5Y 세포의 세포고사를 유도하였으리라 생각된다.

핵 단백질인 PARP-1은 DNA가 손상받을 경우 PARP-1 자신뿐만 아니라 DNA 복구에 관련된 단백질에 poly(ADP-ribose)ylation시키고 DNA 손상 부위로 이들 단백질들을 도입함으로써 DNA 손상을 복구하는 순기능을 한다. 그러나 세포가 과도한 DNA 손상을 받아 복구가 불가능한 경우 PARP-1은 DNA repair를 포기하고 PARP-1 의존적 세포고사를 유발한다³⁹. 본 연구에서도 八寶廻春湯이 caspase-3 protease의 활성화 증가를 유발함을 확인하였으므로 PARP-1의 분절과 활성화가 八寶廻春湯을 처리한 SH-SY5Y 세포에서 유도되는 지를 확인해 본 결과, PARP-1 단백질의 분절과 활성화가 八寶廻春湯 처리농도에 따라 유의하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 5).

이상의 결과로부터 八寶廻春湯은 항세포고사 관련 단백질인 Bcl2, Bcl_{XL}의 발현 감소 및 세포고사 관련 단백질인 Bax의 발현 증가와 함께 caspase-9과 caspase-3의 활성을 통한 PARP-1의 활성을 통해 신경아세포종인 SH-SY5Y 세포에만 특이적으로 세포고사를 유도한다는 결론을 내릴 수 있으며, 八寶廻春湯을 뇌 및 중추신경계 암의 예방이나 치료에 활용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

V. 결론

신경아세포종에 대한 八寶廻春湯의 항암 효과를 연구하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 八寶廻春湯을 처리하여, SH-SY5Y의 세포 사멸 및 사멸 과정에 관련된 단백질들의 활성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 八寶廻春湯은 농도 의존적으로 유의하게 SH-SY5Y 세포 사멸을 유도하였다.
2. 八寶廻春湯은 세포고사의 형태학적 특성인 핵 응축 및 DNA 분절을 통해 SH-SY5Y 세포의 사멸을 유도하였다.
3. 八寶廻春湯은 SH-SY5Y 세포의 Bcl2, Bcl_{XL} 단백질의 발현 감소 및 Bax 단백질의 발현 증가를 유도하였다.
4. 八寶廻春湯은 SH-SY5Y 세포의 caspase-9와 caspase-3의 활성을 유의하게 증가시켰다.
5. 八寶廻春湯은 SH-SY5Y 세포의 caspase-3 protease의 활성 증가를 통해 PARP-1의 분절 증가 및 활성 증가를 유의하게 유도하였다.

이상의 결과에서 八寶廻春湯은 신경아세포종인 SH-SY5Y에서 항세포고사 단백질의 발현 감소와 세포고사 단백질의 발현 증가를 통해 세포고사를 유도함으로써 항암효과를 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 원광대학교 교내 학술연구비 지원을 받아 수행하였음.

참고문헌

1. 한국 통계청 사회통계국 인구동향과. 2010년 사망원인통계결과. 대전: 통계청; 2011.
2. 주요 질환별 신약개발 동향. 생명공학정책연구센터. 2007.
3. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료 1. 익산: 원광대학교출판국; 1999, p. 93-8, 258-82, 385-460.
4. 황도연. 新增 方藥合編. 서울: 永林社; 2002, p. 123-4.
5. 이종대. 새로보는 方藥合編. 서울: 청홍(지상사); 2012, p. 80-5.
6. 최승훈, 오민석, 송태원, 남기열. 十全大補湯의 免疫增強 및 抗癌 효과. 대전대학교 한의학연구소 논문집 2002;11(1):257-83.
7. 황규동. 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯加瓦松의 抗癌效果和 免疫反應에 關한 研究. 대한암한의학회지 1996;2:1-23.
8. 황충연. 十全大補湯加味 鹿茸이 마우스의 免疫 反應에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1989.
9. Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol* 2012;34(3):165-75.
10. Franke TF, Kaplan DR, Cantley L. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88:435-7.
11. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2000;13:1899-911.
12. Lovat PE, Corazzari M, Goranov B, Piacentini M, Redfern CP. Molecular mechanisms of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1028:81-9.
13. Stegh AH, DePinho RA. Beyond effector caspase inhibition: Bcl2L12 neutralizes p53 signaling in glioblastoma. *Cell Cycle* 2011;10(1):33-8.
14. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly (ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* 2009; 218(2):193-202.
15. Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2012; 45(3):217-24.
16. Muşat M, Vax VV, Borboli N, Gueorguiev M, Bonner S, Korbonits M. Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Front Horm Res* 2004;

- 32:34-62.
17. Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B, Oberhammer F, Wagner A, Jirtle R. Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci. *Environ Health Perspect* 1993; 101 Suppl 5:87-90.
 18. 2009년 국가암등록통계 참고자료. 보건복지부. 2010.
 19. Jaggi AS, Singh N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology* 2012;291(1-3):1-9.
 20. Pabla N, Dong Z. Curtailing side effects in chemotherapy: a tale of PKC δ in cisplatin treatment. *Oncotarget* 2012;3(1):107-11.
 21. 허준. 東醫寶鑑. 하동: 동의보감출판사; 2005, p. 1012-3.
 22. Bozkurt E, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Effects of Thymus serpyllum Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells. *Nutr Cancer* 2012;64(8):1245-50.
 23. Murray P, D Edgar. Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development. *J Cell Biol* 2000;150(5):1215-21.
 24. Meier P, A Finch, and G Evan. Apoptosis in development. *Nature* 2000;407(6805):796-801.
 25. Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(7):439-52.
 26. Webster KA. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiol* 2012;8(6):863-84.
 27. Bauer MK, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The Caenorhabditis elegans death protein Ced-4 contains a motif with similarity to the mammalian 'death effector domain'. *FEBS Lett* 1997;402(2-3):256-8.
 28. Conradt B, Horvitz HR. The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998;93(4):519-29.
 29. Schwartz LM, Osborne BA. Ced-3/ICE: evolutionarily conserved regulation of cell death. *Bioessays* 1994;16(6):387-9.
 30. MacKenzie SH, Clark AC. Death by caspase dimerization. *Adv Exp Med Biol* 2012;747:55-73.
 31. Monian P, Jiang X. Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: regulation post cytochrome C release. *Exp Oncol* 2012;34(3):185-91.
 32. Solá S, Morgado AL, Rodrigues CM. Death receptors and mitochondria: Two prime triggers of neural apoptosis and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(1):2160-6.
 33. Paoluzzi L, O'Connor OA. Targeting survival pathways in lymphoma. *Adv Exp Med Biol* 2010;687:79-96.
 34. Willimott S, Wagner SD. Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochem Soc Trans* 2010;38(6):1571-5.
 35. Barillé-Nion S, Bah N, Véquaud E, Juin P. Regulation of Cancer Cell Survival by BCL2 Family Members upon Prolonged Mitotic Arrest: Opportunities for Anticancer Therapy. *Anticancer Res* 2012;32(10):4225-33.
 36. Boumela I, Assou S, Aouacheria A, Haouzi D, Dechaud H, De Vos J. Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond. *Reproduction* 2011;141(5):549-61.
 37. Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R.

- Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Curr Med Chem* 2009; 16(31):4058-65.
38. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2011;18(9): 1414-24.
39. Heeres JT, Hergenrother PJ. Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11(6):644-53.