

瀉白散에 의한 인체 폐암세포의 G1기 성장억제기전에 관한 연구

강병령 · 오창선 · 이재훈¹ · 최영현¹ · 박동일*

동의대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 1:생화학교실 및 한의학연구소

Cell Cycle Arrest by Sabaek-san is Associated with induction of Cdk Inhibitor p21 in Human Lung Cancer A549 Cells

Byong Ryeung Kang, Chang Sun Oh, Jae Hun Lee¹, Yung Hyun Choi¹, Dong Il Park*

Department of Internal Medicine, 1:Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongeui University and Research Institute of Oriental Medicine

We investigated the effects of Sabaek-san (SBS) water extract on the cell proliferation of human lung carcinoma A549 cells. SBS treatment resulted in the inhibition of cell proliferation in a concentration-dependent manner. This anti-proliferative effect of A549 cells by SBS treatment was associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. DNA flow cytometric histograms showed that population of G1 phase of the cell cycle was increased by SBS treatment in a concentration-dependent manner. SBS treatment induced a marked accumulation of tumor suppressor p53 and a concomitant induction of cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21WAF1/CIP, which appears to be transcriptionally upregulated and is p53 dependent. In addition, SBS treatment resulted in down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) as determined by RT-PCR analysis. The present results indicated that SBS-induced inhibition of lung cancer cell proliferation is associated with the blockage of G1/S progression the induction of apoptosis.

Key words : Sabaek-san(瀉白散), cell cycle, p53, p21, human lung cancer

서 론

폐암은 전 세계적으로 가장 흔한 악성종양의 하나로 산업의 발달에 수반된 대기 오염 및 흡연 등으로 인해 발생률과 사망률도 계속 증가 추세에 있으며, 특히 선진국에서 다발하고 있다¹⁾. 우리나라에서도 폐암에 의한 사망률이 10만 명당 25.0명으로 압중 가장 높은 사망률을 보여주고 있으며 앞으로도 꾸준한 상승이 예상된다²⁾. 폐암의 원인은 흡연이 가장 크며, 그 외 폐석면증, 전리방사선에의 노출, 니켈, 크롬 등의 중금속 오염 및 대기오염 등과 관련이 있고³⁾, 그 증상으로는 기침, 지속적인 흉통(胸痛), 천명(喘鳴), 짧은 호흡, 반복되는 폐렴(肺炎), 기관지염(氣管支炎), 객담(喀痰), 혈담(血痰), 애성(hoarseness) 및 림프선 비대, 뼈의 통증 등이 나타나며, 피로, 식욕부진, 체중감소를 일으킬 수 있다⁴⁾. 본 연구에 사용된 사백산(瀉白散)은 “小兒藥證直訣”에 처음

으로 수록된 것으로 청사폐열(淸瀉肺熱), 평전지해(平喘止咳)의 효능과 폐열로 해수(咳嗽)가 심하여 기급(氣急)하고 피부증열(皮膚蒸熱)하며 오후에 발열이 더욱 심하고 설홍태황(舌紅苔黃), 맥세삭(脈細數)한 증상을 치료하는데 사용되는 처방이다⁵⁾. 사백산에 대한 그동안의 국내 연구로는 이 등⁶⁾이 사백산과 사백산 가려특(瀉白散 訶黎勒)이 호흡기계에 미치는 영향을 조사 보고한 바 있고, 이 등⁷⁾이 폐실증(肺實證)에 응용된 사백산의 문헌적 고찰을 실시한 바 있으며, 김 등⁸⁾은 사백산의 항알러지 작용을 보고한 바 있다. 그러나 폐암을 비롯한 인체 암과 연관된 조사는 아직 이루어진 바 없기 때문에 인체 폐암세포를 model로 사백산 추출물의 처리에 의한 암세포의 성장억제에 관한 연구를 시도하였다. 본 연구의 결과에 의하면 사백산 추출물의 처리 농도 증가에 따른 암세포의 성장억제 효과는 세포주기 G1 arrest와 연관이 있었으며, 이러한 현상은 종양억제 유전자 p53의 발현 증가에 따른 세포주기 조절 억제 유전자 p21WAF1/CIP1의 발현 증가 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 저하와도 연관성이 있었다.

* 교신저자 : 박동일, 부산광역시 진구 양정동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학
E-mail : dipark@dongeui.ac.kr, Tel : 051-850-8650

·접수 : 2002/08/30 ·수정 : 2002/09/30 ·채택 : 2002/11/29

재료 및 방법

1. 사백산

실험에 사용한 약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입 (주, 광명제약)하여 정선한 후 사용하였으며, 처방의 내용은 東醫寶鑑에 준하였고⁹⁾ 사백산(Sabaek-san, SBS)의 구성 한약제는 Table 1과 같다. 사백산의 추출물을 만들기 위하여 약재 1 g당 증류수 10 ml을 가하고 환류 냉각장치가 장착된 가열기(180℃)에서 2시간 동안 끓인 다음 가아제로 거른 용액을 3,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 Whatman 필터(No. 2)로 걸러내고 동결 건조하여 고형성분을 얻어내어 마쇄하여 100 mg/ml의 농도로 증류수에 용해시켜 120℃에서 15분 동안 멸균한 후 시료로 사용하였다.

Table 1. Prescription of Sabaek-san

韓藥名	生藥名	重量比
상백피(桑白皮)	Cortex mori	2
지골피(地骨皮)	Cortex Radicis	2
감초(甘草)	Radix glycyrrhizae	1

2. 암세포주, 사백산처리 및 세포 형태 관찰

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, Lee et al.¹⁰⁾의 방법에 준하여 배양하였다. 사백산 추출물의 처리를 위하여 암세포를 24시간동안 안정화시킨 후, 배양 배지에 1.5, 2, 3, 4, 5 mg/ml 농도로 희석하여 처리하였다. 암세포의 형태변화 관찰을 위해서는 사백산 추출물의 처리 48시간 후, 위상차 현미경을 이용하여 400 배의 배율로 각 처리 농도에 따른 형태의 변화를 조사하였다.

3. MTT assay를 이용한 세포 성장률의 측정

암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, 사백산 추출물이 1.5-5 mg/ml의 농도로 희석된 배지로 교체하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되도록 성장배지로 희석하여 3시간 동안 배양한 다음, MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가하여 각 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA, 540 nm)를 이용하여 흡광도를 측정하였다¹¹⁾.

4. DNA flow cytometry에 의한 세포주기분석

세포주기 분포도 변화에 미치는 사백산 추출물의 영향을 조사하기 위하여 정상 및 사백산 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 염색한 후, RNase (Sigma)를 처리하여 4℃ 암하에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 세포를 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 정량적 분석을 실시하였다¹¹⁾.

5. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Choi et al.¹²⁾의 방법에 준하여 준비된 세포를 PBS로 세 번 씻어 내고, 적당량의 lysis buffer (40 mM Tris-Cl pH8.0, 120 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin 및 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가하여 4℃에서 20분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따랐다 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 동량의 단백질을 6~12%의 SDS (sodium dodesyl sulfate) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하여 Coomassie blue 염색 용액 (Sigma)으로 염색하여 단백질 양상을 비교하였다.

6. Western blot analysis

정상 및 사백산 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 4℃에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBST로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체를 적용시킨 다음 Enhanced ChemiLuminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다^{11,12)}. 실험에 사용된 항체들 중, mouse monoclonal antibody인 cyclin A, B1, D1, p21, p27 및 p53은 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입한다. 그리고 rabbit polyclonal antibody인 Cdk2, Cdk4, Cdk6 및 p16은 Santa Cruz Biotechnology Int. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

8. RT-PCR

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNazol B (TEL-TEST, INC., Texas, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi¹¹⁾의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Table 2에 나열된 유전자를 중심으로 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 2). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

Table 2. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Cyclin A	Sence	5'-TCC-AAG-AGG-ACC-AGG-AGA-ATA-TCA-3'
	Antisence	5'-TCC-TCA-TGG-TAG-TCT-GGT-ACT-TCA-3'
Cyclin E	Sence	5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3'
	Antisence	5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
COX1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

결 과

1. 사백산 추출물 처리에 따른 암세포 형태 변화 및 성장억제

사백산 추출물의 처리에 따른 암세포 형태 변화의 결과는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 추출물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 48시간 동안의 저농도 처리군 (1.5 mg/ml 및 3.0 mg/ml)에서의 경우는 전체적으로 세포질이 응축되면서 짧고 많은 가지를 친 듯한 모양으로 바뀌었으며, 4.0 mg/ml 이상의 고농도 처리군에서 거의 모든 세포들이 부착력을 상실하였다. 이러한 심한 형태적 변형은 Fig. 2에 나타난 MTT assay법에 의한 암세포의 성장억제 효과와 상관성이 매우 깊음을 알 수 있었는데, 특히 4.0 mg/ml 및 5.0 mg/ml 처리군의 경우 대조군에 비하여 각각 50% 및 70% 이상의 암세포 성장억제 효과가 있었다. 즉 암세포의 형태적 변형 및 부착 능력 상실 등의 정도는 사백산 추출물 처리에 따른 생존율 감소와 잘 일치되는 결과였다.

2. 사백산 추출물이 암세포의 세포주기 분포에 미치는 영향

다음은 이상의 사백산 추출물에 의한 암세포 성장억제 효과의 기전 해석을 위하여 세포주기 조절과의 상관성 여부를 조사하였다. 이를 위하여 먼저 사백산 추출물이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양된 암세포를 대상으로 flow cytometry 분석을 실시하였으며 (Fig. 3), 이를 Table 3에서 비교하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 사백산 추출물이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 폐암세포의 경우 G1기가 약 42.7%를 차지하고 있었으며, S기와 G2/M기에 속하는 세포가 각각 45.1% 및 12.2% 정도였다. 그러나 1.5 mg/ml의 사백산 추출물 농도에서 48시간 배양된 세포의 경우 G1기가 50.57%로 증가되었으며, S기와 G2/M기가 약 35.9% 및 13.6%로 나타났다. 또한 3 mg/ml, 4 mg/ml 및 5 mg/ml의 농도에서 자란 암세포의 경우는 G1기에 해당하는 세포의 분포가 52.6%, 65.7% 및 62.0%로 증가되었으며 상대적으로 S기에 해당하는 세포의 빈도는 감소한 반면 G2/M기에 해당하는 세포군에서는 큰 변화가 없었다. 즉 사백산 추출물의 처리 농도가 증가될수록 G1기에서의 세포성장이 억제되는 결과를 보여주었다. 이상의 결과를 종합하여 보면 사백산 추출물의 처리에

의한 암세포의 성장억제 효과는 세포주기의 G1기에서 S기로 전이가 억제되는 G1 arrest 현상과 연관성이 있음을 알 수 있었다.

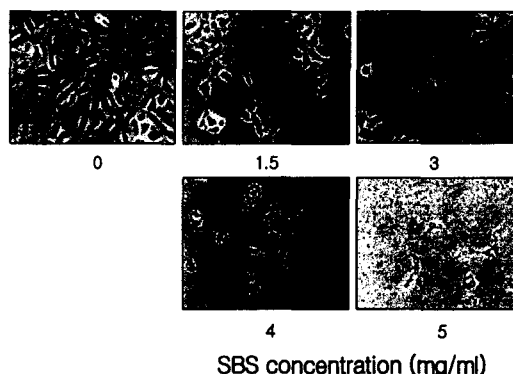


Fig. 1. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with Sabaek-san (SBS) extract. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or SBS for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

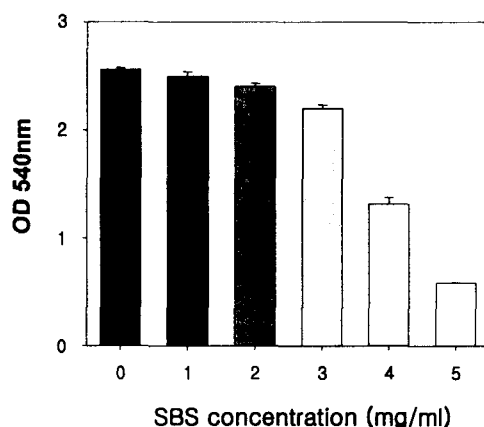


Fig. 2. Effect of SBS treatment on A549 cell growth. A549 human lung carcinoma cells were seeded as described in Materials and Methods, and MTT assay was performed after SBS treatment for 48 h. Results are expressed as percentage of the untreated control +/− SD obtained from three separate experiments.

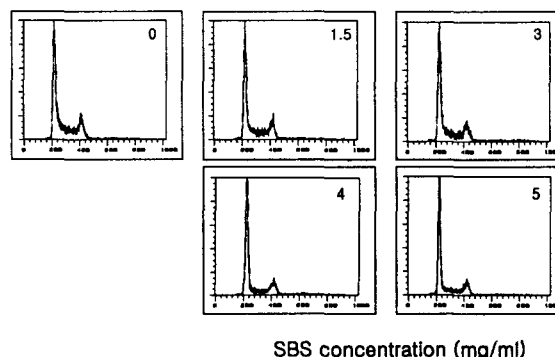


Fig. 3. DNA-fluorescence histogram of A549 cell nuclei after SBS treatment. Exponentially growing cells were treated with various concentrations of SBS for 48 h. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase A, and then cellular DNA was stained with PI. DNA flow cytometric analysis was performed comparing untreated control (0) with cells treated with SBS for 48 h.

Table 3. Fractions of each cell cycle phase of A549 lung carcinoma cells cultured in the presence or absence of various concentration of aqueous extract of Sabaek-san.

Concentration (mg/ml)	% of Cells		
	G1	S	G2/M
0	42.7	45.1	12.2
1.5	50.5	35.9	13.6
3	52.6	33.7	13.7
4	65.7	21.3	13.0
5	62.0	26.0	12.1

3. Cyclins의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향

다음은 사백산 추출물이 함유된 배지에서 배양한 세포들을 대상으로 현재까지 밝혀진 cyclins 중에서 특히 세포주기 checkpoint 관점에서 중요한 cyclin들의 발현 정도를 비교 조사하였다.

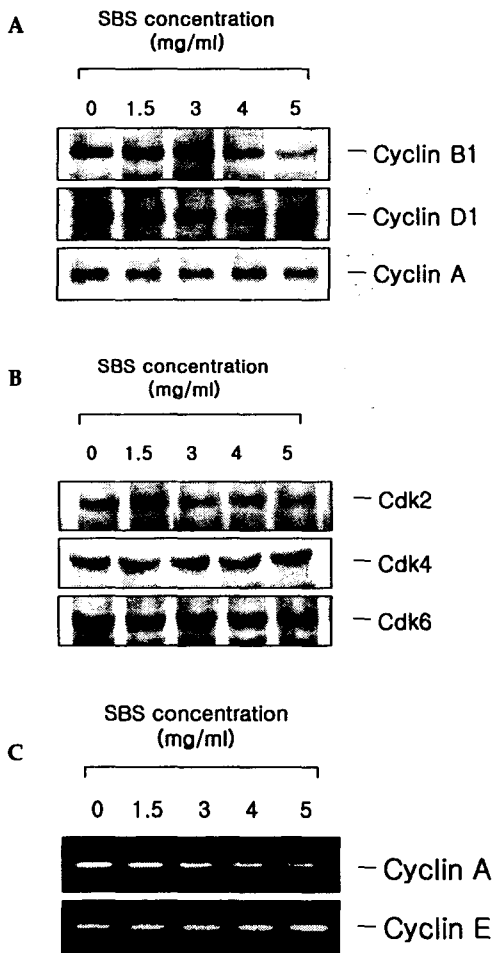


Fig. 4. Effect of SBS on the levels of cell cycle regulatory gene products in A549 human lung carcinoma cells. (A and B) Cells were incubated with various concentrations of SBS for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-cyclin B1, cyclin D1 and cyclin A (A), and anti-Cdk2, Cdk4 and Cdk6 (B) antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (C) Cells were incubated with SBS for 48 h, and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using cyclin A and cyclin E primers described in Materials and Methods.

Fig. 4A에 나타난 바와 같이 cyclin B1 단백질의 발현은 최고 농도의 사백산 추출물 처리군에서만 다소 감소하였으며, cyclin D1 단백질의 발현에는 큰 영향이 없었다. Cyclin A의 경우 전사수준에서의 발현은 농도 의존적으로 다소 감소하였으나 단백질 수준에서는 큰 변화가 없었으며, cyclin E의 경우 전사 수준이 다소 증가하였으나 큰 변화는 없었다 (Fig. 4 A 및 C). 즉 사백산 추출물의 처리에 의하여 세포주기 양성 조절인자에 해당되는 cyclins의 발현 변화에는 전체적으로 큰 변화를 주지는 않았다. 또한 Coomassie blue 염색에 의한 총 단백질 발현 비교에서도 대조군 및 사백산 추출물 처리군 사이에서의 유의적인 차이는 없었다(data not shown).

4. Cdks의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향

세포주기 양성인자 조절인자와의 결합을 통해 세포의 증식을 활성화할 수 있으면서 그의 inhibitor에 의해 활성화가 억제되는 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4B와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 사백산 추출물의 처리에 의하여 조사된 3가지 Cdks인 Cdk2, Cdk4 및 Cdk6의 모든 단백질의 발현은 대조군에 비하여 유의적인 변화가 없었다.

5. Cdk inhibitors의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향

이상의 결과에서 사백산 추출물의 처리에 의하여 암세포의 G1 arrest와 연관된 성장억제 효과에도 불구하고 세포주기 조절의 중요한 인자들인 cyclin 및 Cdk의 발현에 유의적인 변화가 없었다는 점은 이들 조절인자 외 다른 유전자 산물에 의한 조절 가능성이 매우 크기 때문에 사백산 추출물의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 p21, p27 및 p16의 발현을 Western blotting 및 RT-PCR법으로 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 조사된 3가지의 Cdk inhibitor 중에서 p21의 발현만이 특이적으로 사백산 추출물 농도 의존적으로 발현이 증가되었다. 또한 종양억제 유전자인 p53의 발현 역시 증가되었으며 이들은 전사 수준에서도 모두 발현이 증가되었다. 따라서 사백산 추출물 처리에 의한 세포 증식의 억제에는 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 역할을 하는 p21의 p53 의존적 발현증가와 연관성이 있으며, 이로 인하여 Cdks의 단백질 발현 변화보다는 활성 자체를 감소시켰을 것으로 생각되어진다.

6. COXs의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향

다음은 사백산 추출물 처리에 의한 암세포의 증식억제 효과와 prostaglandin 합성 억제와의 상관성 여부를 조사하기 위하여 두 가지 종류의 COX 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향을 비교하였다. RT-PCR의 결과인 Fig. 6에서 볼 수 있듯이 사백산 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포의 COX-1의 전사수준에서의 발현 변화에는 아무런 변화가 없었다. 그러나 COX-2의 경우

에는 사백산 추출물 함유 농도의 증가에 따라 전사수준에서 다소 감소 효과가 있었다.

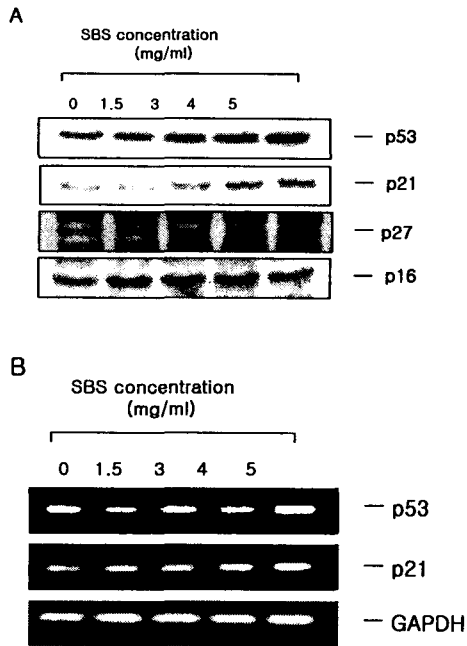


Fig. 5. Effect of SBS on the mRNA and protein levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitors in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with various concentrations of SBS for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% or 13% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53, Cdk inhibitor p21, p27 and p16 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with SBS for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and Cdk inhibitor p21 primers described in Materials and Methods.

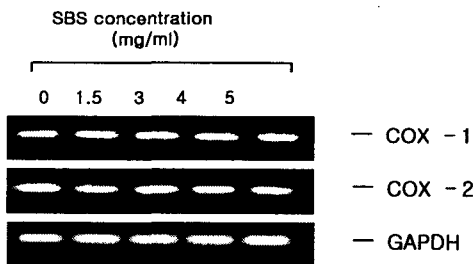


Fig. 6. Effect of SBS on the mRNA levels of cyclooxygenases (COXs) in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with SBS for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using COX-1 and COX-2 primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. SBS inhibited the transcriptional level of COX-2 mRNA, however that of COX-2 remained unchanged.

고찰

본 연구에 사용된 사백산은 지골피(地骨皮), 상백피(桑白皮) 및 감초(甘草)로 구성되어 있으며, 폐열해수(肺熱咳嗽)로 인한 호흡이 빨라지고 체온의 상승 및 맥이 세박한 병증을 치료하는 처방으로¹³⁾ 사백산을 구성하는 각 약제의 성미(性味)와 약효(藥效)

를 살펴보면 다음과 같다¹⁴⁾. 먼저 지골피는 미감담한(味甘淡寒) 무독(無毒)하며, 청열량혈(淸熱涼血), 청폐열(淸肺熱) 및 퇴골증로열(退骨蒸勞熱)의 치료에 효능이 있어 해수(咳嗽), 천식(喘息), 토혈(吐血), 번열구갈(煩熱口渴)이나 허열골증(虛熱骨蒸)으로 인한 결핵(結核) 및 당뇨(糖尿) 치료에 사용되어진다. 상백피는 미감한(味甘寒) 무독(無毒)으로 청폐평천(淸肺平喘), 행수소종(行水消腫)에 효능이 있어 폐열해수(肺熱咳嗽), 면목부종(面目浮腫) 및 소변불리(小便不利) 등과 같은 수종실증(水腫實證) 치료에 사용된다. 그리고 감초는 미감평(味甘平) 무독(無毒)하고 보비익기(補裨益氣), 청열해독(淸熱解毒), 윤폐지해(潤肺止咳), 조화제약(調和諸藥)의 효능이 있어 비허(脾虛), 위약(胃弱), 혈허(血虛) 등과 해수(咳嗽), 천식(喘息) 등의 치료에 사용되어지고 있다^{5,9,15)}. 그러므로 이러한 약물배합에 의한 사백산으로 해수(咳嗽), 지속적인 흉통(胸痛), 천명(喘鳴), 단기(短氣), 반복성 폐염(反復性肺炎), 기관지염(氣管支炎), 객담(咯痰), 혈담(血痰) 및 사성(噎膈) 등의 증상을 가지는 폐암에 대한 치료 가능성을 제시할 수 있을 것으로 보고 본 실험에 응용하였다. 세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의한 세포 주기가 끝없이 이어져 증식에 계속되는 것이 암세포라고 할 수 있다. 따라서 세포주기 조절과 연관된 특정인자들의 발현 조절을 통한 암세포의 증식억제 기구해석은 암을 포함한 특정 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다. 본 연구에서는 사백산 추출물이 인체 폐암 세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, 세포주기의 G1 arrest와 연관성이 있음을 알 수 있었으며, 그 후 apoptosis에 의한 세포의 사멸이 일어날 것으로 생각되어진다.

포유동물의 세포주기 조절에 대한 기전 연구는 최근 아주 활발하게 이루어지고 있으며, 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절된다. 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성조절인자에 해당하는 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다^{16,17)}. Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 이루는 D-type cyclin은 G1기의 조절에 중요하며^{18,19)}, cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다^{20,21)}. 특히 D-type cyclins는 retinoblastoma protein (pRb)의 인산화 조절과 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 조절에 중요한 전사인자 E2Fs의 활성을 조절한다^{16,17)}. Cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성을 위한 양성 조절자로서 중요한 역할을 한다²²⁻²⁴⁾. 한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데, 크게 두 가지의 family로 분류 (INK4 및 CIP/KIP family)되어지고 있다^{25,26)}. 이들 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21 및 p27은 DNA 손상에 의한 종양 억제인자 p53에 의해 조절을 받으며^{27,28)}, 이는 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다^{29,31)}. 본 연구의 결과에서는 사백산 추출물에 의한 암세포의 성장억제와 연관된 G1 arrest 유도(Fig. 2 및 Table 3)에서 cyclins 및 Cdk의 발

현변화에는 대조군 및 사백산 추출물 처리군 사이에 유의적인 큰 차이점을 발견할 수는 없었다(Fig. 4). 그러나 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor 중 p21의 발현이 전사 및 번역 수준에서 사백산 추출물 처리군에서 모두 특이적으로 증가되었다(Fig. 5). 특히 저농도 사백산 추출물의 처리군에서 p21의 발현의 증가 없이 p53의 발현이 증가되었으며, 점차 고농도 처리군으로 갈수록 p53 및 p21의 발현이 계속적으로 증가하는 것으로 보아 p21의 발현 증가는 p53 의존적인 것으로 사료된다. 본 실험에 사용된 A549 세포는 wild type p53 유전자를 가지는 세포주이기 때문에 이에 관한 연구는 추가적으로 p53 null 또는 mutant 세포주를 사용한 검증이 필요할 것으로 생각되어진다.

한편 염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다^{32,33}. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다^{34,35}. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다^{36,37}. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 specific inhibitor에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등³⁸의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다^{36,39}. 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자발현을 유도하는 nuclear factor-kappaB (NF- κ B)에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들이 있다^{36,40}. 따라서 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사 활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다. 본 연구에서 조사된 사백산 추출물의 처리에 의한 암세포의 COX-1 발현에는 아무런 영향이 없었으나, COX-2의 경우 처리 농도 의존적으로 다소 감소되었음을 알 수 있었으며, 이에 관한 추가적인 연구의 가능성이 제시되어졌다. 또한 사백산 추출물의 처리에 의한 암세포의 성장억제에는 암세포의 apoptosis 유발과 매우 밀접한 관계를 지닐 것으로 예상되는 바 이에 관한 기전 해석과, 사백산 및 사백산 구성 한약제의 개별 약제에 관한 암세포 증식억제 효과의 차이점 해석 등의 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

인체 폐암 세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 사백산 추출물의 영향을 조사한 결과, 사백산 추출물의 처리 농도가 증가

할수록 세포의 성장이 억제되었으며, apoptosis 과정에서 볼 수 있는 암세포의 심한 형태적 변형을 관찰할 수 있었다. DNA flow cytometry 분석 결과, 사백산 추출물의 암세포 증식 억제효과는 세포주기의 G1 arrest 유발과 연관성이 있었다. 사백산 추출물의 처리에 의하여 cyclin 및 Cdk의 발현에는 유의적인 차이 없이 종양억제 유전자 p53의 발현이 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 처리 농도 의존적으로 증가되었으며, Cdk inhibitors 중에서 p21 특이적인 발현의 증가 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 사백산 추출물의 처리에 의하여 COX-1의 발현에는 변화가 없었으나, COX-2는 처리 농도가 증가할수록 발현이 다소 억제되었다. 이러한 결과는 사백산 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제가 세포주기 G1/S기의 진행 억제와 연관된 apoptosis 유발과 연관이 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 최승훈, 東醫腫瘍學, p.207-218, 랭림출판사, 서울, 1995.
2. 통계청, 2001년 사망원인통계결과, p11, 2002.
3. 박재갑, 인간생명과학, p.392, 394, 서울대학교출판부, 1994.
4. 한용철, 임상호흡기학, p.137, 일조각, 서울, 1995.
5. 北京中醫學院 編, 中醫學 臨床病理, p.572, 成輔社, 서울, 1983.
6. 이순호, 한상환, 瀉白散과 瀉白散詞黎勒이 呼吸器系에 미치는 影響. 내과학회지 16, 104-129, 1995.
7. 이순호, 한상환, 肺實證에 응용된 瀉白散의 文獻的 考察. 내과학회지, 16, 274-280, 1995.
8. 김민호, 한상환, 전병득, 瀉白散이 Compound 48/80에 의하여 유도된 Anaphylatic Shock와 피하반응에 미치는 影響. 내과학회지, 11, 22-42, 1990.
9. 許浚, 東醫寶鑑, p 470, 南山堂, 서울, 1994.
10. Lee, J.H., Kang, G.H., Kim, K.C., Kim, K.M., Park, D.I., Choi, B.T., Kang, H.S., Lee, Y.T., Choi, Y.H. Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. Int. J. Oncol. 21, 1239-1244, 2002
11. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study, Exp. Mol. Med. 33, S15-36, 2001.
12. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J. Biol. Chem. 272, 28479-28484, 1997.
13. 李尙仁, 漢藥臨床應用, p. 63-66, 225-227, 308-313, 成輔社, 서울, 1978.
14. 李時珍, 本草綱目, p. 426-427, 456-457, 691-710, 人民衛生出版社, 北京, 1982.
15. 辛民教, 臨床本草學, p. 302-303, 599-600, 175-177, 永林出版社, 서울, 1988.
16. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Res. 60, 3689-3695, 2000.
17. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle

- control. *Cell* 81, 323-330, 1995.
18. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2066-2076, 1994.
 19. Meyerson, M., Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2077-2086, 1994.
 20. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257, 1689-1694, 1992.
 21. Ohtsubo, M., Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-1912, 1993.
 22. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179, 1991.
 23. Walker, D.H., Maller, J.L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 354, 314-317, 1991.
 24. Brandeis, M., Hunt, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.* 15, 5280-5289, 1996.
 25. Elledge, S.J., Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 847-852, 1994.
 26. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134, 1995.
 27. Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-710, 1993.
 28. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816, 1993.
 29. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E.W., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825, 1993.
 30. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704, 1993.
 31. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174, 1994.
 32. Turini, M.E., DuBois, R.N. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 53, 35-57, 2002.
 33. Giercksky, K.E. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 15, 821-833, 2001.
 34. Vainio, H. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer* 94, 613-614, 2001.
 35. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 411-417, 2001.
 36. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* 480-481, 243-268, 2001.
 37. Chiarugi, V., Magnelli, L., Gallo, O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int. J. Mol. Med.* 2, 715-719, 1998.
 38. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest.* 79, 1469-1477, 1999.
 39. Thun, M.J., Henley, S.J., Patrono, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 252-266, 2002.
 40. Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107, 135-142, 2001.