

인체 폐암세포에서 인삼사폐탕에 의한 Cdk inhibitor p27의 발현 증가 및 pRB의 인산화 억제

이민우 · 서창훈 · 박 철^{1,2} · 이원호² · 최영현¹ · 박동일*

동의대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 1: 생화학교실 및 한의학연구소, 2: 부산대학교 자연과학대학 생물학과

Induction of Cdk inhibitor p27 and Inhibition of pRB Phosphorylation by Insamsapye-tang Treatment in Human Lung Cancer A549 Cells

Min Woo Lee, Chang Hun Seo, Cheol Park^{1,2}, Won Ho Lee², Yung Hyun Choi¹, Dong Il Park*

Department of Internal Medicine, 1: Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongeui University and Research Institute of Oriental Medicine, 2: Department of Biology, College of Natural Sciences, Busan National University

We investigated the effects of Insamsapye-tang (ISSPT) water extract on the cell proliferation of human lung carcinoma A549 cells. ISSPT treatment resulted in the inhibition of cell proliferation in a concentration-dependent manner. This anti-proliferative effect of A549 cells by ISSPT 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 ISSPT treatment in a concentration-dependent manner. ISSPT treatment induced the levels of tumor suppressor p53 protein and cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27 without significant alteration of cyclins and Cdk expression. In addition, ISSPT treatment resulted in down-regulation of phosphorylated retinoblastoma protein (pRB). However, the levels of p130, the pRB family protein, and transcription factors, E2F-1 and E2F-4, were remained unchanged. The present results indicated that ISSPT-induced inhibition of lung cancer cell proliferation is associated with the blockage of G1/S progression and the induction of apoptosis, and we suggest that ISSPT will be an effective therapeutic agent on human lung cancer.

Key words : Insamsapye-tang(人蔘瀉肺湯), cell cycle, p27, pRB, human lung cancer

서 론

본 연구에서는 인삼사폐탕(人蔘瀉肺湯, Insamsapye-tang) 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 성장 억제 기전 해석을 세포주기 측면에서 조사하였다. 인삼사폐탕은 "의학입문(醫學入門)에 처음 수록되어 있으며¹⁾, 청열약(淸熱藥)인 연교(連翹), 황금(黃芩), 치자(梔子), 상백피(桑白皮), 사화적열약(沙化積熱藥)인 대황주증(大黃酒蒸), 화담적열약(化痰積熱藥)인 지각(枳殼), 보기조양약(補氣助陽藥)인 인삼(人蔘), 발산풍한약(發散風寒藥)인 박하(薄荷), 선폐윤기약(宣肺潤氣藥)인 길경(桔梗), 행인(杏仁) 및 화중해독약(和中解毒藥)인 감초(甘草)로 구성되어 있는데^{1,2)}, 이는

적열번조(積熱煩躁), 구설생창(口舌生瘡), 목족(目赤), 두혼(頭昏), 장위조삼(腸胃燥澀), 변뇨비결(便尿秘結)에 쓰는 양격산(涼膈散)³⁾에 박초(朴梢)를 빼고 인삼(人蔘), 지각(枳殼), 길경(桔梗), 행인(杏仁), 상백피(桑白皮)를 가하여 폐경실열(肺經實熱), 열수(熱嗽), 상천해수(上喘咳嗽), 인후통(咽喉痛), 흉격창만(胸膈脹滿), 담다(痰多), 대변삽(大便澀)한 증세에 담열(痰熱)과 습담(濕痰)을 없애고 폐기(肺氣)를 잘 통하게 하며 기침을 멈추는 처방이다⁴⁾. 처방 중 개별 약물들은 폐암(肺癌), 비인암(鼻咽癌), 위암(胃癌), 식도암(食道癌), 갑상선암(甲狀腺癌), 유선암(乳腺癌), 간암(肝癌), 췌장암(胰腺癌) 등 거의 모든 인체 종양에 항암(抗癌)작용이 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 따라서 인삼사폐탕이 해수(咳嗽), 지속적인 흉통(胸痛), 천명(喘鳴), 단기(短氣), 반복성 폐염(肺炎), 기관지염(氣管炎), 객담(咯痰), 혈단(血痰), 사성(噎膈) 등의 증상⁶⁾을 가지는 폐암에 대한 치료 가능성이 매우 높을 것으로 사료되며, 이

* 교신저자 : 박동일, 부산광역시 부산진구 양정동, 동의대학교 한의과대학 E-mail : dipark@dongeui.ac.kr Tel : 051-850-8650 · 접수 : 2002/12/07 · 수정 : 2003/01/06 · 채택 : 2003/02/05

에 관한 기초적인 자료의 축적이 필요할 것으로 사료되어 본 연구를 실시하게 되었다. 그 동안 본 연구실에서는 항암효과가 있을 것으로 예상되는 입상에서 사용되는 여러 가지 처방을 대상으로 이러한 기초적인 자료 축적을 위하여 다양한 함양기전 해석을 위한 시도를 실시한 바 있으나^{6,9)}, 본 연구에서 사용된 인삼 사폐탕 수용액 추출물의 경우는 기존에 실시한 처방들에 비하여 저농도에서도 매우 강력한 암세포 증식 억제효과가 있었다. 본 연구의 결과에 의하면 인삼사폐탕 추출물의 처리 농도 증가에 따른 인체 폐암세포의 성장억제 효과는 세포주기 G1 arrest와 다소 연관성이 있었으며, 이러한 현상은 종양억제 유전자 p53 및 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27의 발현 증가와 종양억제 유전자 *retinoblastoma* (RB) 단백질의 인산화 억제와도 연관성이 있었다.

재료 및 방법

1. 인삼사폐탕 시료 준비

실험에 사용한 약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입 (주, 광명제약)하여 정선한 후 사용하였으며, 처방의 내용은 동의 보감(東醫寶鑑)에 준하였고³⁾ 인삼사폐탕(Insamsapye-tang, ISSPT)의 구성 한약재는 Table 1과 같다. 인삼사폐탕의 수용액 추출물은 Kang et al.⁶⁾의 방법에 준하여 약재 1 g당 증류수 10 ml을 가하고 환류 냉각장치가 장착된 가열기(180°C)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°C에서 15분 동안 멸균한 후 시료로 사용하였다.

Table 1. Prescription of Insamsapye-tang (ISSPT)

經藥名	生藥名	重量比
황금(黃芩)	Radix scutellariae	1
치자(梔子)	Fructus gardeniae	1
인삼(人蔘)	Radix Ginseng	1
지각(枳殼)	Fructus aurantii	1
박하(薄荷)	Herba menthae	1
연교(連翹)	Fructus forsythiae	1
팽인(杏仁)	Semen armeniacae	1
상백피(桑白皮)	Cortex mori	1
대황(大黃)	Radix et rhizoma rhei	1
길경(桔梗)	Radix platycodonis	1
감초(甘草)	Radix glycyrrhizae	1

2. 암세포주 및 세포 형태 관찰

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 생명공학연구소 (KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, Lee et al.¹⁰⁾의 방법에 준하여 배양하였다. 인삼사폐탕 추출물의 처리를 위하여 암세포를 24시간동안 안정화시킨 후, 배양 배지에 적정 농도로 희석하여 처리하였다. 형태관찰을 위해서는 인삼사폐탕 추출물이 희석된 배지에 암세포를 48시간 배양 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, 인삼사폐탕

추출물이 0.1-0.5 mg/ml의 농도로 희석된 배지로 교체하였다. 48 시간 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 인삼사폐탕 추출물의 영향을 조사하기 위하여 정상 및 인삼사폐탕 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°C 암하에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 세포를 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 정량적 분석을 실시하였다^{11,12)}.

5. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Choi et al.¹³⁾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°C에서 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 인삼사폐탕 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후¹³⁾, 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°C에서 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 발현변화 유무를 분석하였다^{11,13)}. 실험에 사용된 항체들은 Table 2에 나타낸 바와 같으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled

donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

Table 2. Antibodies used present study

Antibody	Origin	Company
Cyclin A	mouse monoclonal	Calbiochem
Cyclin B1	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cyclin D1	mouse monoclonal	Calbiochem
Cyclin E	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk2	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk4	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk6	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
p53	mouse monoclonal	Calbiochem
p21	mouse monoclonal	Calbiochem
p27	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
p16	mouse monoclonal	Calbiochem
Rb	mouse monoclonal	Calbiochem
p130	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
E2F-1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
E2F-4	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology

결 과

1. 인삼사폐탕 추출물 처리에 따른 암세포의 성장억제 및 형태변형

인삼사폐탕 수용액 추출물의 처리에 따른 인간 폐암세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 영향을 MTT assay로 조사하였다. Fig. 1에 나타난 것과 같이 인삼사폐탕 추출물의 처리농도의 증가에 따라 암세포의 성장은 처리된 인삼사폐탕의 농도에 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 즉 정상배지에서 배양된 대조군의 Optical density (OD at 540 nm)의 수치는 평균 1.466인데 반해 0.1 mg/ml 농도의 인삼사폐탕 추출물 처리 후는 1.319였으며, 0.2 mg/ml 처리군의 경우는 1.182로 나타났다. 0.3 mg/ml 처리군의 경우는 0.921 정도였으며, 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군(0.432 및 0.161)에서는 대조군에 비하여 각각 70% 이상 감소하였다. 따라서 인삼사폐탕 추출물의 처리농도가 증가될수록 폐암세포의 성장이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

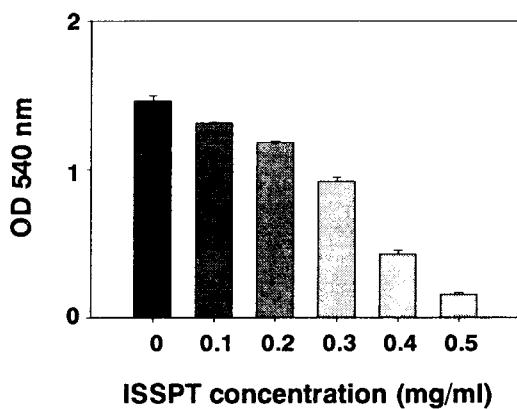
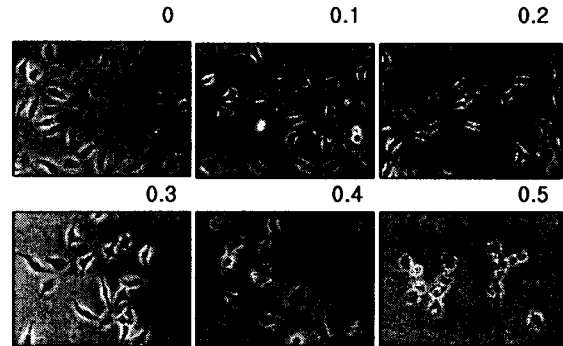


Fig. 1. Effect of Insamsapye-tang (ISSPT) water extract on human lung carcinoma A549 cell growth. A549 cells were seeded as described in Materials and Methods, and MTT assay was performed after ISSPT treatment for 48 h. Results are expressed as the mean numerical value of the untreated control \pm SD obtained from four separate experiments.

이러한 성장억제에 따른 암세포의 전체적인 형태변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 인삼사폐탕 추출물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 48시간 동안의 저농도 처리군 (0.1 - 0.3 mg/ml)에서의 경우는 전체적으로 세포질이 응축되면서 짧고 많은 가지를 친 듯한 모양으로 바뀌었으며, 0.4 mg/ml 이상의 고농도 처리군에서 처리 농도 증가에 따라 암세포들의 심한 부착력 상실현상이 관찰되었다.



ISSPT concentration (mg/ml)

Fig. 2. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with ISSPT. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or ISSPT (0.1 - 0.5 mg/ml) for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

2. 인삼사폐탕 추출물이 암세포의 세포주기 분포에 미치는 영향

이상의 인삼사폐탕 추출물에 의한 암세포 성장억제 효과의 기전 해석을 위하여 세포주기 조절과의 상관성 여부를 조사하였다. 이를 위하여 먼저 인삼사폐탕 추출물이 함유된 배지에서 48 시간 동안 배양된 암세포를 대상으로 DNA flow cytometry 분석을 실시하였으며(Fig. 3), 이를 Table 3에서 비교하였다.

Table 3. Fractions of each cell cycle phase of human lung carcinoma A549 cells cultured in the presence or absence of various concentrations of aqueous extract of Insamsapye-tang (ISSPT) for 48 h

ISSPT concentration (mg/ml)	% of cell		
	G1	S	G2/M
0	45.8	39.9	14.4
0.1	44.1	41.2	14.7
0.2	49.6	37.2	13.1
0.3	47.2	40.8	12.0
0.4	51.9	35.7	12.4
0.5	53.8	32.2	13.9

Table 3에 나타난 바와 같이 인삼사폐탕 추출물이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 폐암세포의 경우 G1기가 약 45.8%를 차지하고 있었으며, S기와 G2/M기에 속하는 세포가 각각 39.9% 및 14.4% 정도였다. 0.2 mg/ml 농도에서 자란 세포의 경우는 G1기에 해당하는 세포의 분포가 49.6%로 나타났으며, S기와 G2/M기가 약 37.2% 및 13.1%로 나타났다. 또한 0.4 와 0.5 mg/ml 농도에서는 G1기에 해당하는 세포의 빈도가 각각 51.9 및 53.8%를

차지하였으며, S기 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 다소 감소되었다. 비록 0.1 mg/ml의 농도 처리군에서 G1기에 속하는 세포의 빈도가 약간 감소되기도 하였으나 전반적인 결과에서 인삼사포탕 추출물의 농도가 증가될 수록 G1기에 속하는 세포의 수가 증가되는, 즉 G1기에서 세포의 성장이 멈춰지는 결과를 보여주었다. 이상의 결과를 종합해 보면 인삼사포탕의 처리에 의한 암세포의 성장 억제는 세포주기상 G1기에서 S기로의 전이가 억제되는 G1 arrest 현상과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

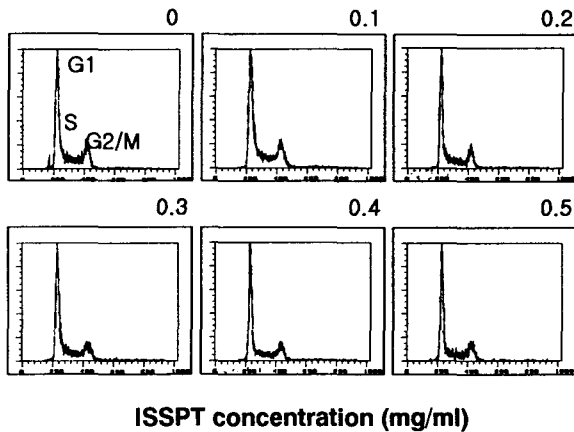


Fig. 3. DNA-fluorescence histogram of A549 cell nuclei after ISSPT treatment. Exponentially growing cells were treated with various concentrations of ISSPT for 48 h. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase A, and then cellular DNA was stained with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

3. Cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 인삼사포탕 추출물의 영향

인삼사포탕 추출물이 함유된 배지에서 배양한 세포들을 대상으로 세포주기 checkpoint 관점에서 중요한 cyclin들의 발현 정도를 비교 조사하였다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이 cyclin B1 나 cyclin E의 발현에는 정상 및 인삼사포탕 추출물이 처리된 배지에서 자란 모든 세포들에서 큰 차이가 없었다. 그러나 cyclin A는 인삼사포탕 처리 농도의 증가에 따라 점진적인 발현의 감소를 관찰할 수 있었으며, cyclin D1의 경우 고농도 처리군에서 발현의 정도가 매우 감소됨을 알 수 있었다. Cdk2 및 Cdk6의 경우 고농도 처리군에서 다소 감소의 경향이 있었으며, Cdk4의 경우 인삼사포탕의 처리 농도 증가에 따른 발현의 감소가 더욱 뚜렷하였다(Fig. 4B). 그러나 Coomassie blue 염색에 의한 총 단백질 발현 비교에서도 대조군 및 인삼사포탕 추출물 처리군 사이에서의 유의적인 차이는 없었다(Fig. 4C).

5. Cdk inhibitors의 발현에 미치는 인삼사포탕 추출물의 영향

다음은 인삼사포탕 추출물 처리에 의하여 세포주기의 G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53과 세포주기의 음성 조절인자인 Cdk inhibitor에 속하는 p21, p27 및 p16의 단백질 발현을 Western blotting 법으로 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 p53의 발현이 인삼사포탕 추출

물의 처리에 따라서 다소 증가되었으며, p53에 의하여 조절 받을 수 있는 p21의 발현은 0.3 mg/ml 농도까지는 증가 현상을 보였으나 그 이상의 고농도 처리군에서는 다시 다소 발현이 감소되었다. p16의 경우도 처리 농도의 증가에 따른 증가 현상은 없었으나, p27은 인삼사포탕 추출물 처리 농도 의존적으로 발현이 매우 강하게 증가되었다.

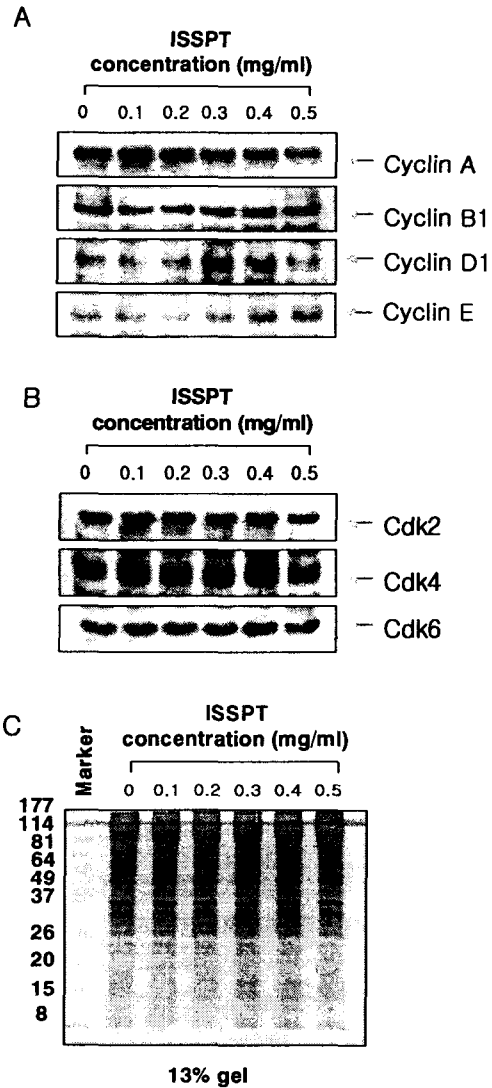


Fig. 4. Effect of ISSPT treatment on the levels of cell cycle regulatory gene products in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with various concentrations of ISSPT for 48 h, lysed and total cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-cyclin A, cyclin B1, cyclin D1 and cyclin E (A), and anti-Cdk2, Cdk4 and Cdk6 (B) antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (C). Total protein patterns of A549 cells after ISSPT treatment. Cells were treated with various concentrations of ISSPT and the whole-cell lysates were prepared after 48 h. Proteins were separated on 13% SDS-polyacrylamide gel and visualized by coomassie blue staining.

6. pRB family 및 전사조절 인자 E2F의 발현에 미치는 인삼사포탕의 영향

논 의

인삼사포탕에 의한 암세포 성장억제 기전 해석을 위한 다음 실험으로 종양 억제 유전자 pRB 및 p130 단백질의 발현과 이들이 의하여 전사활성이 조절되는 E2F-1 및 E2F-4의 발현에 미치는 인삼사포탕 추출물의 영향을 조사하였다. 일반적으로 Western blotting에서 pRB 및 p130 단백질은 저농도 gel을 사용하여 전기영동을 실시할 경우 이동도의 차이로서 인산화 여부를 관찰할 수 있는데¹¹⁾, Fig. 6에서 볼 수 있는 바와 같이 인삼사포탕 추출물의 처리에 의하여 pRB 단백질의 전체적인 band가 처리 농도 증가에 따라 보다 빠른 이동도를 보여 인삼사포탕의 추출물 처리에 의하여 pRB 단백질의 인산화가 억제되었음을 알 수 있었다. 그러나 동일 family에 속하는 p130 단백질의 인산화 정도 차이의 여부는 뚜렷하게 관찰할 수 없었으며, E2F-1 및 E2F-4의 단백질 발현 역시 인삼사포탕 추출물의 처리에 의하여 대조군에 비하여 유의적인 발현의 차이를 관찰할 수 없었다.

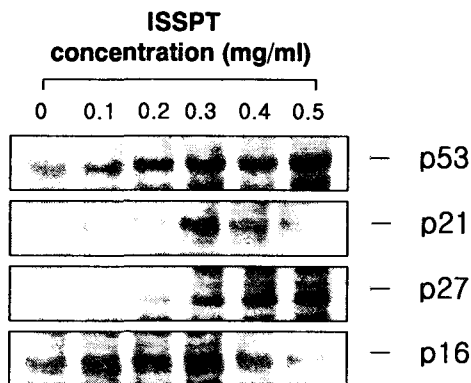


Fig. 5. Effect of ISSPT on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitors in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with ISSPT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53, Cdk inhibitor p21, p27 and p16 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection.

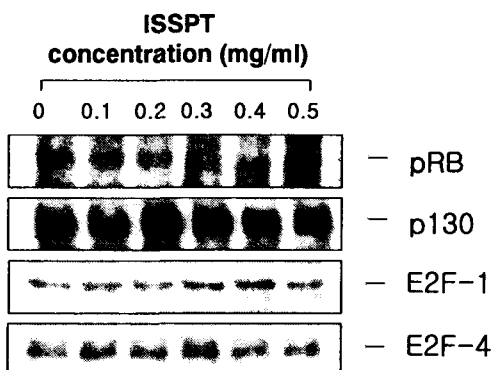


Fig. 6. Effect of ISSPT on the levels of pRB family protein and transcription factor E2F family protein in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with ISSPT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 6 or 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-pRB, p130, E2F-1 and E2F-4 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection.

암의 발병기전에 대한 분자생물학적 연구가 활발히 진척되면서 암을 일으키는 원인으로 알려진 다양한 종양유전자에 이어 최근에 암의 발생을 억제하는 것으로 생각되는 여러 종류의 암 억제 유전자가 밝혀지면서 암의 발병기전에 대한 이해가 넓어졌으며 이를 이용한 암 치료의 새로운 장이 열리고 있다고 할 수 있다. 세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의한 세포 주기가 끝없이 이어져 증식에 계속되는 것이 암세포라고 할 수 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 따라서 세포주기 조절과 연관된 특정 유전인자들의 발현 조절을 통한 암세포의 증식억제 기구해석은 암을 포함한 질병 관련 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다¹⁷⁾. 본 연구에서 인삼사포탕 수용액 추출물이 인체 폐암 세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, 증식억제와 연관된 몇 가지 세포주기 조절에 관여하는 주요 유전자 발현의 변화를 관찰할 수 있었다. 먼저 MTT assay에 의한 인삼사포탕 추출물처리에 의한 A549 폐암세포의 생존율 분석에서 Fig. 1의 결과에 나타내었듯이 고농도 처리군인 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 암세포의 성장이 70% 이상 감소되었다. 이는 hemacytometer를 이용한 세포 생존률의 비교에서도 이와 유사한 농도 의존적인 암세포의 증식 억제 현상을 관찰할 수 있었다(data not shown). 그러나 동일조건에서 본 연구실에서 이미 수행한 바 있는 윤폐산(潤肺散)⁶⁾ 및 사백산(瀉白散)^{7,8)} 등의 수용액 추출물에 비하여 암세포의 성장억제에 최소한 10 배 이상의 효과가 있었다. 또한 인삼사포탕 추출물에 의한 성장억제와 연관된 암세포의 심한 형태적 변이에서 관찰되는 membrane shrinking이나 부착력 상실 등은 apoptosis 유발로 연결될 것으로 사료되며, 이에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 이러한 암세포의 증식억제는 세포주기 진행의 특정시기 교란과 연관성이 있을 가능성이 매우 높기 때문에 flow cytometry 분석을 실시한 결과 윤폐산 및 사백산 추출물 처리에서와 같은⁶⁻⁸⁾ 세포주기 G1 arrest 현상을 관찰할 수 있었으며(Table 3), 세포주기 조절에서 양성 조절인자에 해당하는 몇 가지 cyclin을 조사한 결과 인삼사포탕 추출물 처리에 의하여 cyclin D1의 발현만이 특이적으로 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 4). 조사된 나머지 cyclin들 중에서 cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2 동안 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성을 위한 양성 조절자로서 작용을 한다¹⁸⁻²⁰⁾. Cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 그러나 이들의 발현에 인삼사포탕 추출물이 큰 영향을 주지는 않았다. D-type cyclin은 Cdk4 및 Cdk6와의 결합을 통하여 종양억제 유전자 pRB의 인산화 조절과 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 기전을 조절하는 전사인자 E2Fs의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다^{15,16)}. Fig. 6의 결과에서 알 수 있듯이 인삼사포탕 추출물의 처리 농도 증가에 따라서 pRB의 인산화 억제 현상은 이러한 결과들을 잘 뒷받침하여 주는 결과이다. 즉 전사인자 E2Fs의 발현 자체가 아무리 변화가 없어도 pRB의 인산화 억제로

E2Fs는 pRB와 강한 결합으로 인하여 불활성의 상태로 남아 있을 것으로 추측되어지며 이로 인하여 G1 arrest가 유발된 것으로 사료된다. 따라서 인삼사폐탕 추출물의 처리에 의하여 다소 발현 변화의 정도가 크게 낮아지지 않았던 Cdk6도 단백질 자체의 kinase 활성은 처리 농도 의존적으로 감소되었을 것으로 추측된다. 그러나 pRB family에 속하는 p130의 인산화에는 큰 영향이 없었다. 한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데^{21,22}, 이들 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21은 DNA 손상에 의한 종양 억제인자 p53에 의해 조절을 받으며²³, 이는 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다. p27 및 p16의 발현 증가에 의하여서도 cyclin/Cdk 복합체의 활성 저하에 의한 세포주기 G1기에서 S기로의 이행을 강하게 억제할 수 있으며, p21과 함께 apoptosis 유발, 노화 및 분화과정 등에서 중요한 역할을 한다^{21,22,24}. 특히 종양억제 유전자 p53은 p21의 전사조절 외 pro-apoptotic 인자인 Bax 단백질의 발현 증대에 의한 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시킴으로서 cysteine-related protease인 caspase 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하는 기능도 가진다²⁵⁻²⁷. Cdk inhibitor 단백질에는 모두 공통적으로 Cdk와의 직접적인 결합을 하는 domain을 가지는데, cyclin/Cdk 복합체 형성을 선택적으로 차단함으로써 그들의 kinase 활성을 억제시켜 정상적인 세포주기의 조절을 교란시킨다^{21,24}. 따라서 인삼사폐탕 추출물의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 이들 inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어진 p21, p27 및 p16의 발현을 Western blotting으로 조사한 결과, 다소 서로 다른 발현 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 즉 p21의 경우 인삼사폐탕 추출물 0.3 mg/ml 처리 농도까지는 발현이 증가되었으나, 그 이상의 고농도 처리군에서는 오히려 감소되었다. 그러나 p27의 경우 0.3 mg/ml 이상의 처리군에서 처리 농도가 증가될수록 발현의 정도가 매우 증가되었으며, p16의 경우는 0.3 mg/ml 처리군 이상에서는 대조군보다 오히려 발현이 감소되는 p27과는 반대되는 현상을 보여주었다. 한편 p53의 경우 p21의 발현이 증가되는 인삼사폐탕 추출물 0.3 mg/ml 처리군까지는 발현이 다소 증가되었으나 그 이상의 농도에서는 더 이상의 증가 현상은 관찰되지 않았다. 따라서 인삼사폐탕에 의해 조절되는 주 Cdk inhibitor는 p27로 사료되며, 이러한 특정 농도를 기준으로 서로 유사한 작용을 일으키는 유전자 산물들의 발현변화가 유전자마다 차이가나는 것은 매우 특이한 경우이며 이에 관한 연구는 더욱 진행이 되어야 할 것으로 사료된다. 그리고 본 연구실의 선행연구에서 조사된 바 있는 다른 처방과 비교해 볼 때 저농도 처리군에서 매우 강력한 암세포의 증식 억제 효과가 있었던 점으로 미루어 다양한 방법들에 의한 인삼사폐탕 효능의 정확한 조사와 함께 개별 약재에 대한 배합의 조절로 효과적인 인체 폐암 예방 및 치료에 대한 가능성을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

인체 폐암 세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 인삼사폐탕 수용액 추출물의 영향을 조사한 결과, 인삼사폐탕 추출물의 처리 농도가 증가할수록 세포의 성장이 억제되었으며, apoptosis 과정에서 볼 수 있는 암세포의 심한 형태적 변형을 관찰할 수 있었다. DNA flow cytometry 분석 결과, 인삼사폐탕 추출물의 암세포 증식 억제효과는 세포주기의 G1 arrest 유발과 연관성이 있었다. 인삼사폐탕 추출물의 처리에 의하여 cyclin D1 외 다른 cyclins 및 Cdk의 발현에는 유의적인 큰 차이 없이 종양억제 유전자 p53의 단백질 수준이 처리 농도 의존적으로 증가되었으며, Cdk inhibitors 중에서 p27 특이적인 발현의 증가 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 인삼사폐탕 추출물의 처리에 의하여 전사 조절인자 E2Fs의 발현에는 변화가 없었으나, pRB 단백질은 인삼사폐탕 추출물 처리 농도가 증가할수록 인산화의 정도가 억제되었다. 이러한 인삼사폐탕 추출물의 처리에 의한 특정 유전자의 발현 변화 조절을 통하여 폐암세포의 증식이 세포주기 진행상 G1기에서 억제되었으며 apoptosis를 유발할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 安秉國 譯, 國譯編註 醫學入門, 4권 p.424, 崇文社, 서울, 1974.
2. 李軍德, 抗癌中草藥彩色圖譜, p. 2-184. 中國中醫藥出版社, 湖北, 中國, 1996.
3. 許浚, 東醫寶鑑, p. 324, 1108, 법인문화사, 서울, 1999.
4. 任健, 中國歷代名醫名方全集, p. 614, 學苑出版社, 北京, 中國, 1996.
5. 김영환, 분자생물학적 측면에서의 폐암의 발생. 녹십자 의보, 27, 152-157, 1999.
6. Kang, Y.K., Park, D.I., Lee, J.H., Choi, Y.H. The effects of Yunpyesan on cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human lung cancer A549 cells. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol. 16, 745-755, 2002.
7. Lee, J.H., Kang, B.R., Kam, C.W., Park, D.I., Choi, Y.H. Induction of apoptotic cell death by Sabaeksan extract in human lung cancer A549 cells. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol. 17, (submitted).
8. Kang, B.R., Oh, C.S., Lee, J.H., Choi, Y.H., Park, D.I. Cell cycle arrest by Sabaeksan is associated with induction of Cdk inhibitor p21 in human lung cancer A549 cells. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol. 16, 1123-1127. 2002.
9. Park, C., Lee, M.W., Kim, W.I., Lee, W.H., Park, D.I., Choi, Y.H. Induction of apoptotic cell death by Insamsapye-tang extract in human lung cancer A549 cells. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol. 17, (submitted).
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. Molecular biomethods for understanding of anti-cancer mechanism through cell cycle control. *J. Dongeui Ori. Med.* 5, 93-105, 2001.
 12. Ormerod, M.G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 1, 73-80, 2002.
 13. 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.
 14. Choi, Y.H., Choi, H.J. Significance of cell cycle and checkpoint control. *Kor. J. Life Sci.* 11, 362-370, 2001.
 15. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60, 3689-3695, 2000.
 16. Lundberg, A.S., Weinberg, R.A. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer* 35, 1886-1894, 1999.
 17. Sausville, E.A. Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol. Med.* 8, S32-37, 2002.
 18. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J.C. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179, 1991.
 19. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., Assoian, R.K. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262, 1572-1575, 1993.
 20. Clute, P., Pines, J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.* 1, 82-87, 1999.
 21. Elledge, S.J., Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 847-852, 1994.
 22. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134, 1995.
 23. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculesco, 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.
 24. 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.
 25. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
 26. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967, 1993.
 27. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849, 1993.