

원 저

## 濃度別 山養山蔘 蒸溜藥鍼의 Apoptosis에 關한 實驗的 研究

조희철\* · 이선구\*\* · 권기록\*

\* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

\*\* 상지대학교 한의과대학 병리학교실

### An Experimental Study on Apoptosis of Cultivated Wild Ginseng Distilled Herbal Acupuncture by Concentration Level

Hee-Chul Cho\* · Sun-Gu Lee\*\* · Ki-Rok Kwon\*

\* Department of Acupuncture and Moxibustion, Oriental Medicine, SangJi University

\*\* Department of Pathology, Oriental Medicine, SangJi University

#### Abstract

**Objective :** In order to measure the efficacy of cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture by concentration level, we've treated A549 human lung cancer lines with different concentrations of cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture and examined mRNA and proteins which take parts in apoptosis.

**Methods :** A549 human lung cancer lines were treated with various concentration levels of cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture and cell toxicity was carefully examined. From the analysis of DNA fragmentation, RT-PCR, and Western blot, manifestation of mRNA and proteins which are associated with apoptosis were inspected.

**Results :** The following results were obtained on apoptosis of A549 human lung cancer lines after administering various concentration levels of cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture.

1. Measuring cell toxicity of lung cancer cells, strong cell toxicity was detected at high concentration level(1000ul, 1200ul), but no consistent concentration dependent reliance was detected.
2. Through DNA fragmentation, we were able to confirm cell destruction in all groups.
3. Experiment groups treated with cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture showed inhibition of Bcl-2 and COX-2 at mRNA and Protein level, whileas increase of Bax was shown.
4. Manifestation of p21, p53, Cyclin E, and Cyclin D1 were confirmed in all groups.
5. Extrication of Cytochrome C was detected at all groups, as well as increased activity of the enzyme caspase-3 and caspase-9, and PARP fragmentation were confirmed.

**Conclusion :** According to the results, we can carefully deduce cell destruction of A549 human lung cancer lines were induced by Apoptosis. At the fixed level, cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture showed decrease of Bcl-2 and COX-2, as well as increase of Bax. Since cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture increases manifestation of p21, p53, Cyclin E, and Cyclin D1, it affects cellular cycle and through these phenomena, we can consider extrication of Cytochrome C, increase of caspase, and PARP fragmentation are the results.

**Key words :** Cultivated wild-ginseng, Herbal acupuncture, A549 human lung cancer cell, mRNA. Bcl-2, COX-1, COX-2, Bax. p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>, Cytochrome C, Caspase, PARP fragmentation.

## 1. 緒 論

山蔘은 五加科(주릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 다년생 초목인 人蔘(panax ginseng C. A. Mey.)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 蔘을 일컬으며 山養山蔘(樟腦蔘)은 산삼의 씨앗이나 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 蔘을 말한다<sup>1)</sup>.

예로부터 山蔘은 대표적인 補氣劑로, 靈藥으로 여겨졌으며 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 人蔘으로 표현되어 왔다<sup>2)</sup>. 性은 微寒, 微溫, 溫 등이고 味는 甘, 苦 등으로 표현되고 있으며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年 등의 효능이 있다<sup>3)</sup>. 蔘에 대한 최초의 문헌은 대략 BC 50년경이고<sup>4)</sup>, AD 200년에 저술된 傷寒論에서 최초로 처방에 사용되었다<sup>5)</sup>. 인삼의 재배시기를 14C 전·후라고 추정할 때 그 이전의 인삼은 산삼을 지칭하는 것으로 유추할 수 있다<sup>6)</sup>. 지금까지 보고된 인삼의 효능은 신경의 기능을 조절하고<sup>7)</sup>, 체액과 신진대사기능을 조절하며<sup>8)</sup>, 강심, 항이노 및 성기능 증강효과가 있고<sup>9)</sup>, Stress에 대한 저항력을 높이며<sup>10-11)</sup>, 소화흡수 및 면역항체생산을 촉진시키는 등<sup>12-13)</sup> 많은 연구가 보고되고 있다. 하지만 이러한 연구 결과는 재배되어진 인삼을 재료로 한 결과이며, 희귀성과 고가 등의 여러 가지 문제점으로 인해 산삼에 대한 연구는 거의 찾아볼 수 없는 실정이다. 산삼을 이용한 약침연구는 권 등이 시행한 독성, 안정성 실험과 항암 효과와 관련된 동물실험<sup>14)</sup>, 그리고 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구<sup>15)</sup> 등이 있었다.

본 연구는 농도에 따른 증류추출식 산양산삼약침(이하 산삼약침)의 항암효과와 apoptosis를 비교, 관찰하기 위하여 시험관내에서 A549 human epithelial lung cancer cells에 산삼약침을 처리한 후 세포독성과 DNA fragmentation, RT-PCR을 이용한 Cox-1, Cox-2, Bcl-2, Bax의 mRNA와 단백질의 발현을 관찰하였고, cell cycle에 따른 항산화작용을 관찰하기 위하여 p21, p53, cyclin E, cyclin D<sub>1</sub>의 발현을 관찰한 결과 유의한 결론을 얻어 이에 보고하는 바이다.

## II. 方 法

### 1. 재료의 준비

### 1) 암세포의 준비

본 실험에 사용한 암세포는 A549(KCLB 10185) human Lung carcinoma cell로서 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 5% CO<sub>2</sub>와 95% air의 배양기(존샘, 한국)에서 37°C를 유지하며 배양하였다. 배양된 세포는 매일 위상차 현미경(HUND, Germany)을 통하여 관찰하고 주 1-3회의 계대배양을 하면서 적정하게 성장시켜 사용하였다.

### 2) 배지

기본배지는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 3.7g/l sodium bicarbonate(Shinyopure Chemicals Co, Japan), Penicillin G (100,000Units/ml, Sigma, USA) 1ml, Streptomycin (100mg/ml, Sigma, USA) 1ml, fungizone(Gibco, USA) 4ml을 첨가하여 혼합한 뒤, bottle top filter(Corning, USA)로 멸균하여 사용하였다. FBS(Gibco, USA)는 56°C의 항온수조에서 30분간 inactivation시킨 후 사용하였다. 혼합배지는 RPMI 1640 기본배지에 FBS를 10% 첨가하여 사용하였으며, 암세포 배양 전반에 사용하였다.

### 3) 산삼약침 및 검액의 조제

#### ① 산삼증류약침의 조제<sup>16)</sup>

산양산삼은 산삼의 종자를 적절한 환경에서 재배한 것으로 數齡은 10-20년으로 추정되며, 무게는 17-26g, 길이는 20-30Cm된 것을 사용하였다<Fig. 1-2>. 먼저 산삼을 흐르는 물에 깨끗이 세척하여 너두를 제거하지 않은 200g의 산삼을 증류수와 배합한 후 2시간 전탕하여 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류



Fig. 1 The shape of cultivated wild ginseng.

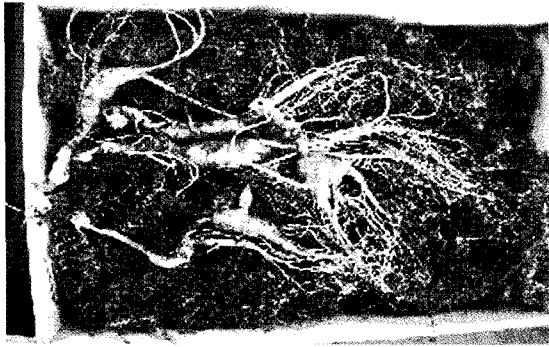


Fig. 2 The various shape of cultivated wild ginseng.

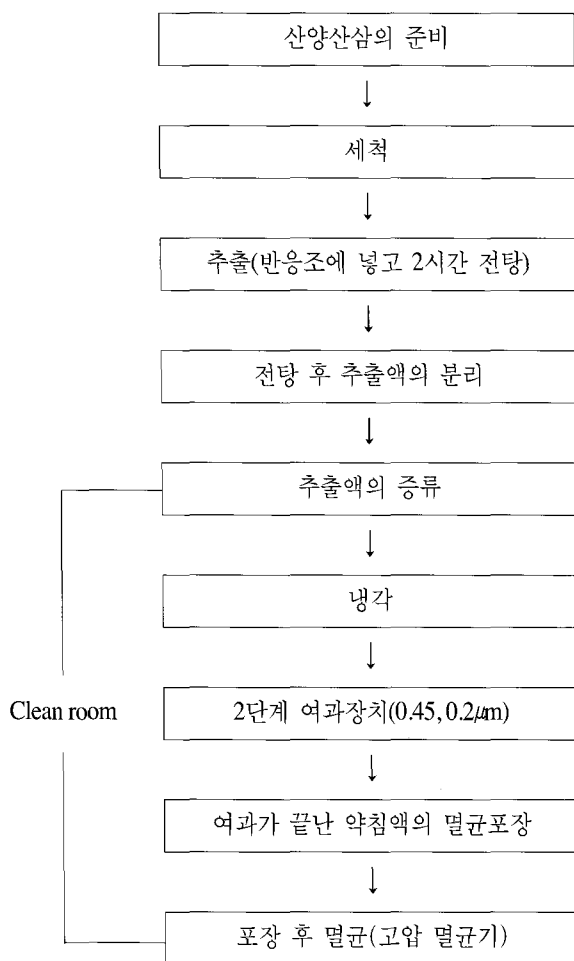


Fig. 3 Manufacturing process of Distilling cultivated wild-ginseng Herbal acupuncture.

추출기에 넣고 전탕하여 1,000cc의 약침을 얻었다. 얻어진 약침을 0.45 $\mu$ m, 0.2 $\mu$ m 여과지로 2회 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다<Fig. 3>.

## ② 검액의 조제

조제된 산삼약침을 농도에 따른 검액으로 조제하기 위하여 증류수를 일정 비율로 배합하여 3가지의 검액을 만들었다.

즉, 조제된 산삼 10cc에 증류수 10cc를 혼합한 1/1약침(standard)을 기준으로 조제된 산삼 10cc에 증류수 30cc를 혼합한  $\times 1/2$  산삼, 그리고 조제된 약침을 실험에 사용한  $\times 2$ 약침의 세군으로 나누어 실험에 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) A549 폐암세포주 배양 및 세포생존율 측정

A549 인체 유래 폐암세포주를 한국 세포주 은행에서 구입한 뒤, RPMI1640(GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 배양하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2 $\times 10^5$ cells를 넣어 배양한 후 각각의 준비된 검액을 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 $\mu$ l씩 처리하여 24시간 더 배양하였다.

24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300 $\mu$ l/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 $\mu$ l 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570nm (reference 450nm)에서 흡광도를 측정하였다.

### 2) DNA fragmentation

처리한 배양세포를 얼음으로 차게 한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700 $\mu$ l의 lysis buffer(20mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 0.5% Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45분간 항온 시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 lysis를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 $\times$ g로 20분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40 $\mu$ l의 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA)로 용해시키고, 200 $\mu$ g/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 항온시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액

을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light 하에서 사진을 찍어 가지 화하였다.

3) RT-PCR

RT-PCR용 primer는 Bioneer(한국)로부터 구입하였다. RNA 실험에 사용되는 모든 완충용액은 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC, Sigma)를 처리하여 사용하였으며, 모든 초자기구는 등은 200°C에서 24시간 가열 처리한 후 사용하였다.

① Total RNA 분리

1×10<sup>7</sup> 세포에 1ml의 RNAzol를 첨가하여 완전히 균질한 후 얼음에 15분간 방치한 후 4°C의 원심분리기로 12,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 분리된 상층액은 새로운 tube에 옮긴 다음, 100% ethyl alcohol를 500μl 첨가한 후 14,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet을 0.1% DEPC로 처리된 70% ethyl alcohol로 3번 세척하였다. 말린 pellet은 50μl의 RNase-free water를 이용하여 pellet을 녹였다.

RNA 정량은 spectrophotometer(U-2000, HITACHI, Japan)를 이용하여 260nm 및 280nm에서 흡광도를 측정하여 추출된 Total RNA의 농도 및 순도를 계산하였다.

② RT(Revers transcription)

RT-PCR을 위하여 배양세포에서 추출한 각각의 1μg의 total RNA를 주형으로 하여 Oligo dt primer(Bioneer,

Korea)를 10pmol씩 첨가한 후 여기에 PCR 완충용액, reverse transcriptase 20U, RNasin 10U 그리고 2mM dNTP를 첨가하였다. 그리고 RNA-free water로 최종부피를 20μl 조정 한 후 57°C에서 10분, 42°C에서 1시간 처리 후 cDNA을 만들었으며 차후 실험에 사용하기 위하여 -20°C 냉동고에 보관하였다.

③ PCR

Reverse transcripton으로부터 얻은 cDNA 2μl를 dNTP mixture 200μM, gene specific primer 300 nM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl(pH 9.0 at 25°C), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U를 잘 섞어 최종부피가 20μl가 되도록 하여 PCR에 사용하였다. PCR 반응은 thermocycler(Hybaidd, UK)에서 94°C/2min(1회), 94°C/1min(1회), annealing(1회) 그리고 72°C/1min(1회)를 40회 반복하였고 마지막 신장반응을 72°C에서 1회 수행하였다. 사용된 Primer는 <Table 1>과 같다.

④ Gel electrophoresis

PCR products를 확인하기 위하여 ethidium bromide (0.5mg/ml)가 포함된 agarose(2%)를 TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer(pH 8.3)에 녹여 사용하였으며, 시료 5μl와 3μl loading buffer를 gel에 주입하여 100V로 30분간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 UV transilluminator (Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기(Polaroid H-3, USA)을 사용하여 자외선 조명하에서 촬영하였다.

Table 1. Primer for Revers transcription polymerase chain reaction

Target mRNA		Primer Sequence (5' → 3')	Annealing Temperature
Bcl-2	forward	CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C	52°C
	reverse	AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT	
COX-1	forward	TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT	65°C
	reverse	GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC	
COX-2	forward	TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT	52°C
	reverse	AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT	
BAX	forward	GTG CAC CAA GGT GCC GGA AC	54°C
	reverse	TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA	
Cyclophilin	forward	ACC CCA CCG TGT TCT TCG AC	53°C
	reverse	CATTTG CCA TGG ACA AGA TG	

## 4) Western blot 분석

## ① 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여  $1 \times 10^7$ 의 세포당 lysis buffer(10mM Tris · HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, 1% SDS) 100 $\mu$ l로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

## ② 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)를 0, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu$ g/ $\mu$ l에 BCA 용액 100 $\mu$ l를 첨가하여 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 방치한 다음 흡광도 540nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 $\mu$ l와 BCA 용액 100 $\mu$ l을 섞은 뒤 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

## ③ 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100 $\mu$ g를 caspase-3와 cytochrome C를 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween (0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 Bcl-2(Santa Cruz, USA), Bax(Santa Cruz, USA), COX-2(Santa Cruz, USA), p21(Santa Cruz, USA), p53(Santa Cruz, USA), cyclin E(Santa Cruz, USA), cyclin D1(Santa Cruz, USA), caspase-3(PharMingen, USA), caspase-9(PharMingen, USA), PARP(PharMingen, USA), cytochrome C(PharMingen, USA), Actin(Santa Cruz, USA)의 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 4회 세척하여 chemiluminescence(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Fugi X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

## III. 結 果

## 1. A549 human lung cancer cell에 대한 세포독성

각 농도별 산삼약침의 A549세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 0 $\mu$ l에서 1200 $\mu$ l까지 다양하게 각각의 검액을 처리한 결과, 검액의 농도에 따른 일관된 세포독성의 증가를 나타내지는 않음을 알 수 있었다.

농도에 따른 비교에서 산삼 $\times 2$ 군에 비하여 오히려 산삼 $\times 1/2$ 군에서 세포독성이 우수함을 나타내어, 세포사멸은 농도의존적 결과를 나타내지 않았으나 약침의 양이 1,000 $\mu$ l, 1,200 $\mu$ l로 늘면서 전 실험군에서 다른 농도에 비하여 세포사멸이 증가함을 알 수 있었다<Fig. 4>.

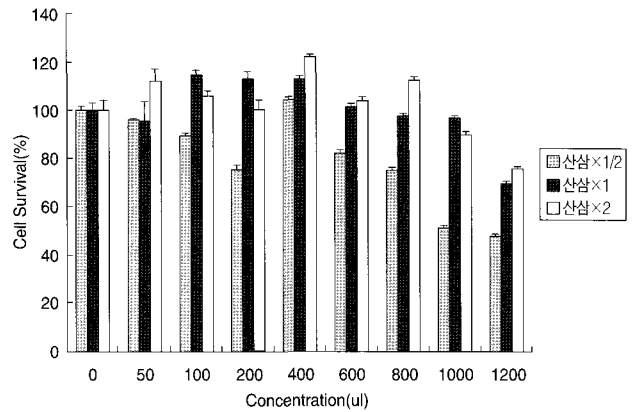


Figure 4. A549 human lung carcinoma cell viability after exposure 24hrs with various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and treated with various concentrations of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture for 24hrs. And then the cells were dyed by cristal violet and it was read on a ELISA reader at wavelength of 570nm and reference of 450nm.

## 2. DNA fragmentation

세포가 사멸하는 양상을 알아보기 위하여 0.8(ml/ml)의 농도로 처리한 후 세포의 DNA fragmentation을 조사한 결과, 처리하지 않은 세포에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았으나 산삼을 처리한 모든 군에서 DNA fragmentation이 일어남을 알 수 있었다<Fig. 5>.

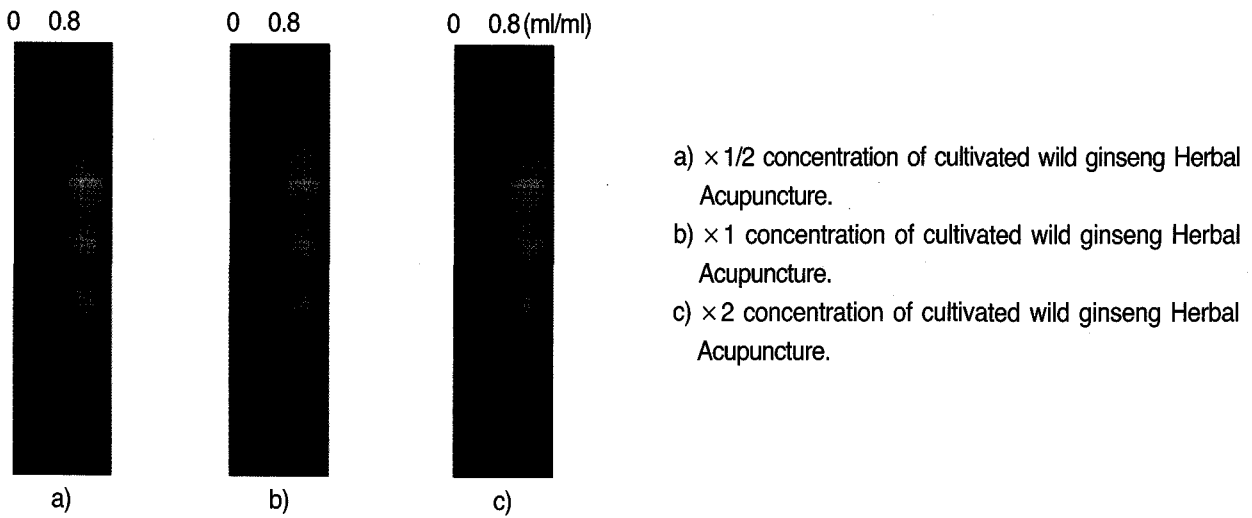


Figure 5. DNA fragmentations of A549 human lung carcinoma cell treated with the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture. Cells were incubated with the oriental medicine drugs. And then DNA solutions acquired in the cell lysis were performed electrophoresis described in Materials and Methods.

3. COX-1, COX-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현에 미치는 영향

농도별 산삼약침액에 의한 세포사멸이 apoptosis와 관계있는지 확인하기 위하여 COX-1, COX-2, Bcl-2, Bax에 대하여 RT-PCR을 하였다. 그 결과 COX-2유전자에서  $\times 1/2$ 에서는 0.4(ml/ml),  $\times 1$ 에서는 0.4(ml/ml), 0.8(ml/ml),  $\times 2$ 에서는 0.4(ml/ml), 0.8(ml/ml)에서 발현이 억제되었다. Bcl-2와 Bax의 경우는 모든 경우에서 Bcl-2는 억제되

고, Bax는 발현이 증가되는 경향을 나타내었다<Fig. 6>.

4. Bcl-2, Bax, COX-2의 단백질 발현에 미치는 영향

Apoptosis가 전사수준에서 억제됨을 확인한 후 단백질 수준에서도 억제됨을 확인하기 위하여 western blot을 시행한 결과, 모든 군에서 Bcl-2, COX-2는 감소하고, Bax는 증가함을 확인할 수 있었다<Fig. 7>.

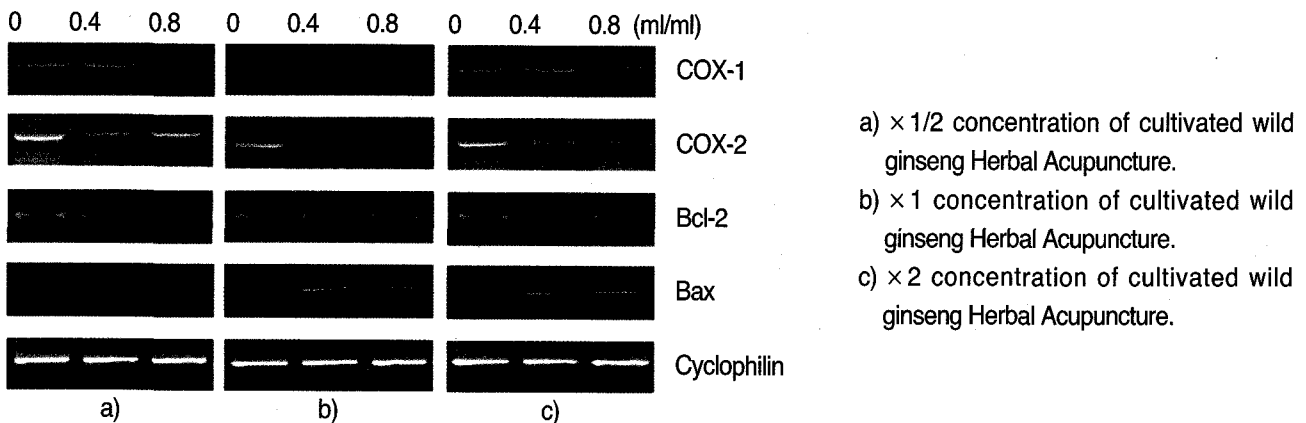


Figure 6. Inhibition of Bcl-2 and COX-2 mRNA expression by the in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture and total RNAs were isolated. And RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods. Cyclophilin was used as a house-keeping control gene.

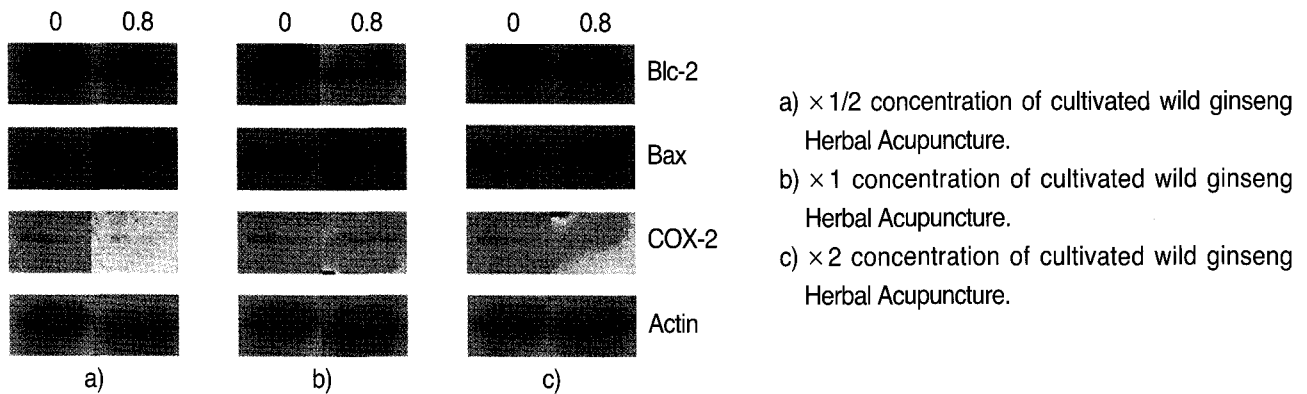


Figure 6. Expression of Bcl-2, Bax and COX-2 proteins by the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture in A549 human lung carcinoma cells.

Cells were incubated with the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in Materials and Methods. The Action was used as a house-keeping control gene.

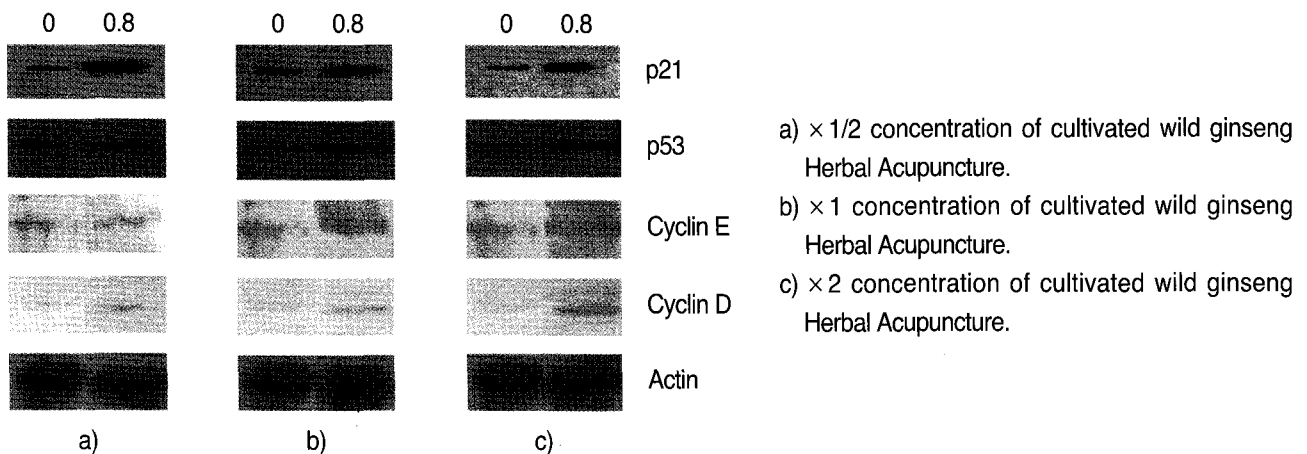


Figure 8. Expression of p21, p53, cyclin E, and cyclin D1 proteins by the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture in A549 human lung carcinoma cells.

Cells were incubated with the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in Materials and Methods. The Action was used as a house-keeping control gene.

#### 5. p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>의 단백질발현에 미치는 영향

산삼약침이 A549 폐암세포의 성장을 억제함을 확인한 후, 세포주기에 작용하는지를 알아보기 위해 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>의 단백질 발현을 western blot을 통하여 알아보았다.

그 결과 실험군 모두에서 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>

의 발현이 증가 됨을 알 수 있었다<Fig. 8>.

#### 6. Caspase-3, Caspase-9, Cytochrome C 및 PARP 발현에 미치는 영향

Apoptosis에 의한 세포사멸을 규명하기 위하여 농도별 산삼약침을 처리한 후 caspase-3, caspase-9, Cytochrome C, PARP를 western blot을 시행하여 발현을 관찰하였다. 그

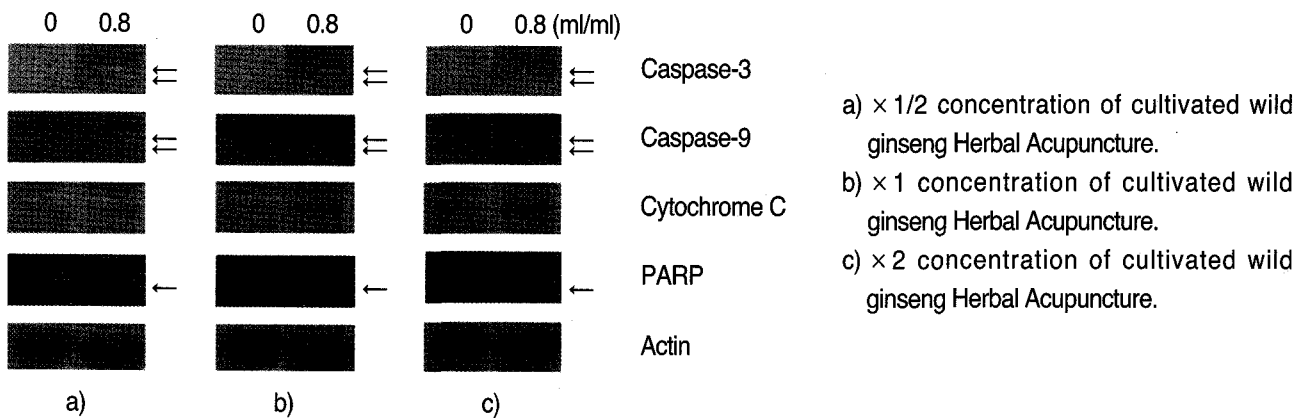


Figure 9. Expression of caspase-3, 9, and cytochrome C proteins by the the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture in A549 human lung carcinoma cells.

Cells were incubated with the various concentration of cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in Materials and Methods. The Action was used as a house-keeping control gene.

결과 Cytochrome C의 방출을 확인하였고, Caspase-3, Caspase-9의 발현과 PARP fragmentation을 확인할 수 있었다<Fig. 9>.

#### IV. 考 察

山蓼은 대표적인 補氣劑이고 예로부터 가장 귀한 약재 중의 하나로 靈藥으로 여겨졌으며, 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 人蓼으로 표현되어 왔다<sup>2)</sup>. 性은 微寒, 微溫, 溫 등이고 味는 甘, 苦 등이며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年 등의 효능이 있다<sup>23)</sup>. 산삼은 한국이나 중국, 소련 일본, 미국 및 캐나다의 일부지역에서만 자생하며 북반구권 중에서도 북위 30-48도에 이르는 지역에서만 자라는 것으로 보고되고 있다<sup>24)</sup>. 산삼은 인삼에 비해 뇌두가 작고, 몸통도 가늘며, 모양도 인삼에 비해 다양한 편이다<sup>1)</sup>. 산삼은 수량도 희박하고, 진위여부에 대해서도 객관적 기준이 확립되어 있지 않으며 워낙 고가여서 이와 관련된 자료는 거의 찾아보기 힘들다. 인삼의 효능과 관련하여서는 신경의 기능을 조절하고<sup>7-9)</sup>, 체액과 신진대사 기능을 조절하며<sup>9)</sup>, 강심, 향이뇨 및 성기능 증강효과가 있고<sup>10-11)</sup>, Stress에 대한 저항력을 높이며<sup>12)</sup>, 소화흡수 및 면역항체생산을 촉진시키는 등<sup>13)</sup> 많은 연구결과가 보고되고 있다. 하지만 이러한 연구 결과는 재배되어진 인

삼을 재료로 한 결과이며, 희귀성과 고가 등의 여러 가지 문제점으로 인해 산삼에 대한 연구는 거의 찾아볼 수 없는 실정이다.

인삼약침과 관련된 연구는 인삼약침의 제제별 및 종류별 연구와 진통<sup>17)</sup>, 면역<sup>18)</sup>, 당뇨<sup>19)</sup>, 혈압강하<sup>20)</sup>, 갑상선 장애<sup>21)</sup>, 항 Allergy<sup>22)</sup>, 간 및 위기능 회복과 혈전 등<sup>23-24)</sup>에 유의한 효과가 있음 등이 보고되었다. 산양산삼 증류약침에 대한 연구로는 권 등이 정맥주입용으로 조제하여 급성·아급성 독성 및 항암효과를 관찰한 결과, mouse와 rat를 이용한 독성실험에서 산양산삼 증류약침은 아무런 독성 반응을 나타내지 않았고, Sarcoma-180 복강암에서는 생존률을 115%이상 증가시키는 결론을 얻은 바 있었다<sup>14)</sup>.

또한 무작위 대조 임상실험을 시행하여 산삼약침의 정맥주입이 인체에 심각하게 유해한 반응을 일으키지는 않으나 자각적인 임상증후를 유도할 수 있음을 보고한 바 있다<sup>5)</sup>.

본 연구는 이러한 연구결과를 바탕으로 실험관 내에서 산삼약침이 농도의 정도에 따라 어떠한 차이를 나타내고, 항암능에 관여하며 그 기전이 apoptosis에 의한 것이라면 어떠한 기전에서 작용하는지를 관찰하고자 시도되었다. 세포가 사멸하는 기작에는 크게 두 가지로 분류할 수 있는데, 커다란 외부 충격에 의해서 세포가 피동적으로 사멸하는 necrosis와 외부자극에 능동적으로 대처하는 사멸 기작인 apoptosis가 그것이다. <Fig.



10>에서 보는 바와 같이, necrosis가 일어나면 세포가 팽창하고 파괴되어 세포 내부에 있던 물질들이 밖으로 유출된다. 반면에 apoptosis가 일어나면 세포가 수축되고 apoptotic body가 생성된다. 이때 세포내부의 물질들은 apoptotic body내에 존재하므로 외부로 유출되지 않는다. 생성된 apoptotic body는 주위의 세포에 의해 흡수 처리된다. Apoptosis는 고등세포가 외부의 자극에 대해서 능동적으로 대처하는 프로그램된 세포 사멸기작이며<sup>26)</sup>, 대부분의 동물조직에서 손상되거나 감염된 불필요한 세포와 과잉 생산된 세포를 제거하는 과정으로 배 발생과 종양의 퇴화 및 면역시스템에서 중요한 역할을 한다<sup>26)</sup>. 따라서 apoptosis의 잘못된 조절이 인간의 질병의 직접적인 원인이 되는 것은 당연한 일이다. Apoptosis와 관련이 있는 주요 질병들이 밝혀진 이래, apoptosis에 관련된 연구가 집중적으로 진행되었고 그 결과, 많은 사실들이 밝혀지게 되었다. 포유동물세포의 apoptosis에 있어서 미토콘드리아가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 사멸 자극에 의해 미토콘드리아 기공이 열리면서 apoptosis-inducing factor(AIF)와 cytochrome C가 밖으로 유출된다. <Fig. 10>에서 보듯이 Apaf-1은 dATP와 cytochrome C의 존재 하에 procaspase-9와 결합하고, 이것은 활성이 있는 caspase-9를 생성시키고, caspase-9는 caspase-3과 caspase-7을 활성화시킨다. 이와는 다른 경로로서, 세포 표면의 수용체(CD95/APO-1/Fas)로부터 유

발되는 apoptosis는 가장 많이 연구된 apoptosis 유발 경로이다. Fas에 의해 유도되는 apoptosis는 death domain과 death effector domain의 작용을 통해 caspase-8을 활성화 시킴으로써 진행된다.

간단히 살펴보면 apoptosis는 TNF(Tumor necrosis factor), Fas와 같은 death receptor에 의해서 일어날 수 있으며 또한 방사선(radiation)이나 여러 가지 화학물질 및 열 충격 등으로 인한 DNA 손상이나 단백질 변성이 원인이 될 수도 있고, 활성산소(ROS, reactive oxygen species)로 인하여 유발될 수도 있다<sup>27)</sup>. 이렇게 유발된 apoptosis는 여러 신호전달 체계를 통해서 최종적으로 caspase를 활성화시킨다<sup>28)</sup>. 이 caspase들은 apoptosis가 유발되면서 나타나는 세포내 기질들의 절단, DNA 단편화(fragmentation)등의 apoptosis가 진행 중인 세포의 형태적 특성을 담당하게 된다<sup>29)</sup>.

이를 위하여 다양한 농도에 따라 A549 human lung cancer cell에 대한 세포독성을 관찰하고 세포가 사멸하는 양상을 알아보기 위하여 DNA fragmentation을 조사하였으며, 암의 성장과 분화 및 항상성에 중요한 역할을 하는 COX-1, COX-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현 및 단백질의 변화, 그리고 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>과 Caspase-3, Caspase-9, Cytochrome C 및 PARP 발현을 관찰하였다.

A549 human lung cancer cell에 대한 세포독성 관찰에

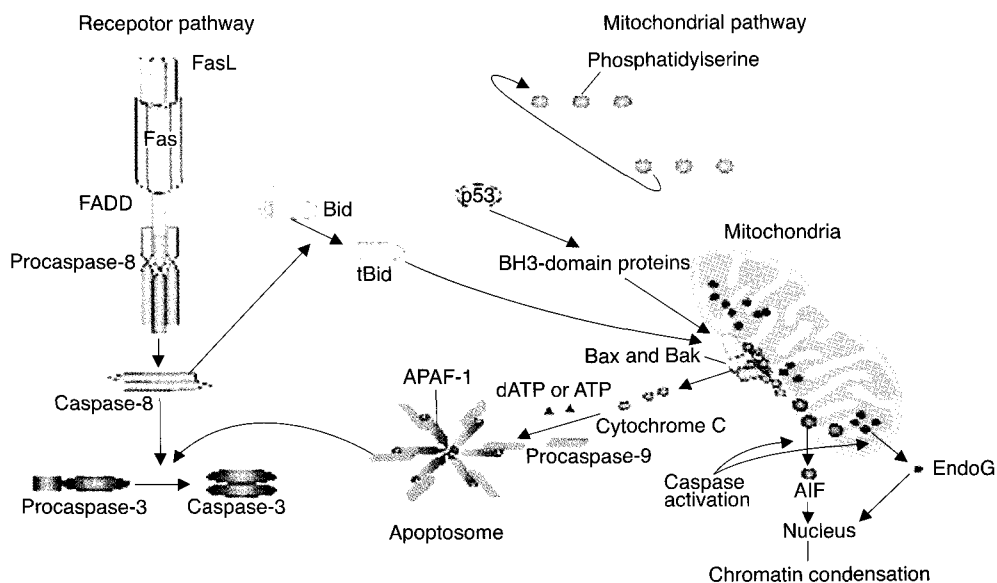


Figure 10. Mechanisms and functions of cell death and executioners of apoptosis

서는 농도에 따라 세포독성이 증가되지 않았고, 양의 증량에 의해 오히려 세포사멸이 증가함을 알 수 있었다<Fig. 4>.

세포가 사멸하는 양상을 알아보기 위하여 DNA fragmentation을 조사한 결과, 처리하지 않은 세포에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았으나 산삼을 처리한 모든 군에서 DNA fragmentation이 일어남을 알 수 있었다<Fig. 5>.

농도별 산삼약침에 의한 세포사멸이 apoptosis와 관계있는지 확인하기 위하여 COX-1, COX-2, Bcl-2, Bax에 대하여 RT-PCR을 하였다. COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 관계되며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다. COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 specific inhibitor에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제가 보고된 바 있다.

Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면 Bax는 과발현 되었을 경우 apoptosis를 유도하며<sup>30</sup>, 이 기전은 mitochondria에서 cytochrome c를 유리시켜 caspases 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 효소활성을 조절하여 apoptosis 유발에 관여하는 것으로 보고되고 있다<sup>30</sup>.

농도별로 산삼약침을 처리한 결과 모든 농도에서 COX-2유전자의 발현을 억제함을 알 수 있었다.

Bcl-2와 Bax의 경우는 모든 경우에서 Bcl-2는 억제되고, Bax는 발현이 증가되는 경향을 나타내었다<Fig. 6>.

Apoptosis가 전사수준에서 억제됨을 확인한 후 단백질 수준에서도 억제됨을 확인하기 위하여 western blot을 시행한 결과, 모든 군에서 Bcl-2, COX-2는 감소하고, Bax는 증가함을 확인할 수 있었다<Fig. 7>.

산삼약침이 세포주기에 작용하는지를 알아보기 위해 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>의 단백질 발현을 western blot을 통하여 알아보았다.

DNA 손상에 의한 p53의 발현 증가는 p21과 연관되어 세포 주기상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로 알려지고 있다<sup>32-34</sup>.

Apoptosis 과정이 cell cycle에 의존적인지를 판단하기 위하여 cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>를 검사하였다.

Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 이루는 D-type cyclin은 G1기의 조절에 중요하며 cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>35-36</sup>.

한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데 Cdk2와 결합하면서 그들이 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21 및 p27은 DNA손상에 의한 종양 억제인자 p53에 의해 조절을 받으며<sup>37,38</sup> 이는 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다<sup>39</sup>. 아울러 p53에 의한 p21의 전사조절과는 관계없이 암세포의 세포성장 억제나 분화유도에 p53 비의존적인 p21 유도 조절 기전이 하나씩 밝혀지고 있으며 p21 전사조절에 관여하는 coactivator와 suppressor에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다<sup>40-43</sup>.

세포주기의 조절은 세포질에 있는 사이클린(cyclin) 단백질에 의해 조절되는데 G1 사이클린(cyclin D1), S기 사이클린(cyclin E), G2기 사이클린(cyclin A), M기 사이클린(cyclin B)이 존재한다<Fig. 11>.

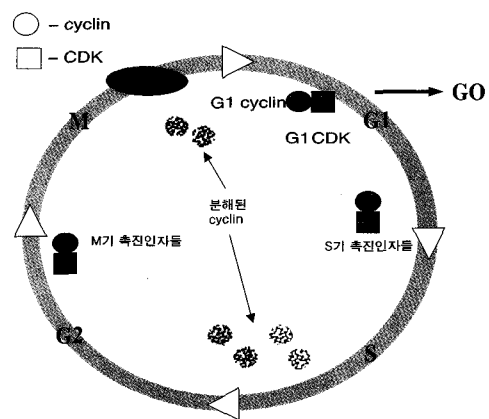


Figure 11. Multiple pathways to apoptosis and the cell cycle

세포내부에서의 이들의 농도는 각 단계에서 증감을 보이게 된다. 또한 사이클린 의존성 키나제(cyclin dependent kinase : CDK)가 존재하는데, G1 CDK(Cdk4와 Cdk6), S기 CDK(Cdk2), M기 CDK가 있다. 이들은 매우 안정된 농도로 세포내에 존재한다. 그러나 이들은 적절한 사이클린과 결합하여 활성화 시키는 일을 해준다. Apoptosis 과정에서 사이클린의 농도가 증가할 경우 그 세포주기에 멈추게 된다. 그러므로 산삼약침의 효과가 어떤 세포주기에 의존적인지를 판단하기 위하여 cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>으로 Western blot 분석을 실시하였다.

그 결과 실험군 모두에서 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>

의 발현이 증가 됨을 알 수 있었다<Fig. 8>.

Apoptosis에 의한 세포사멸을 규명하기 위하여 농도별 산삼약침을 처리한 후 caspase-3, caspase-9, Cytochrome C, PARP를 western blot을 시행하여 발현을 관찰하였다. caspase도 apoptosis 유발에 중요한 역할을 수행하는데 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cystein-related protease로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다<sup>44,45</sup>. 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성화가 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>46</sup>. 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 caspase-3 (CPP32)는 높은 활성도를 가진다<sup>47</sup>.

그 결과 Cytochrome C의 방출을 확인하였고, Caspase-3, Caspase-9의 발현과 PARP fragmentation을 확인할 수 있었다<Fig. 9>.

이상의 결과를 종합해 볼 때 산삼약침은 농도의존적으로 암세포의 사멸을 유도하지는 않지만 mRNA와 단백질 수준에서 대사과정에 영향을 미쳐 apoptosis를 유도함을 알 수 있었다.

## V. 結 論

본 실험에서 다양한 농도의 산삼약침이 A549 human lung cancer cell의 Apoptosis 유도에 미치는 영향을 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폐암 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과 높은 농도(1000 $\mu$ l, 1200 $\mu$ l)에서 세포독성이 강하게 나타났으나 일관된 농도 의존적 반응을 보이지는 않았다.
2. 모든 군에서 세포사멸 양상을 DNA fragmentation을 통하여 확인할 수 있었다.
3. 모든 산삼약침처리군은 mRNA와 Protein 수준에서 Bcl-2와 COX-2의 발현은 억제하고, Bax는 증가됨을 알 수 있었다.
4. 모든 군에서 p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>의 발현을 확인하였다.

5. 모든 군에서 Cytochrom C의 유리를 확인하였고, caspase-3, caspase-9 효소의 활성화와 PARP fragmentation을 확인하였다.

이상의 결과로 보아 산삼약침의 A549 human lung cancer cell에 대한 세포사멸은 Apoptosis 유도에 의한 것으로 추정된다. 산삼약침은 일정농도에서 Bcl-2, COX-2의 감소와 Bax의 증가를 나타내었고, p21, p53, Cyclin E, Cyclin D<sub>1</sub>의 발현을 증가시키는 것으로 보아 세포주기에 영향을 주며, 이를 통하여 Cytochrome C의 유리, caspase의 증가, PARP fragmentation이 일어나는 것으로 사료된다.

## 參考文獻

1. 신순식 외, 산삼 감정 기준의 객관성, 한의학연구소 등의 한의연 제5집, pp. 107-114, 2001. 12.
2. 전국한의과대학 본초학교수공편저, 본초학, 서울, 영림사, p. 531, 1994.
3. 중약대사전편찬위원회, 완역중약대사전 권7, 서울, 정담, pp. 3473-3479, 1997.
4. 朝鮮總督府專賣局, 人蔘史, 서울, 法人文化社, pp. 3-4, 5, 1990.
5. 張仲景, 仲景全書, 대성문화사, pp. 130, 150, 153, 155, 166, 167, 176, 199, 201, 205, 208, 209, 214, 217, 1984.
6. 권기록 외, 山蔘에 대한 文獻的 考察, 대한약침학회지, Vol.6, No.2, p. 75, 2003.
7. 이상인 외, 한약임상응용, 정보사, pp. 345-350, 1982.
8. 하대유, 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구, 대한 면역학회지, Vol. 1, No. 1, pp. 45-52, 1979.
9. 山田昌之, 朝鮮人蔘의 研究, 日本藥理學會誌, 51 : 390, 1955.
10. Brekhman, I.I, Panax ginseng, Gosudarst Isdat et Med, Lit. Leningard, p. 1 1957.
11. Garriques. S, Panax Quinquifolia, Am Chem Pharm, 90 : 331, 1954.
12. 최진호, 인삼의 신비, 서울, 교문사, pp. 13-14, 1984.
13. Takagi, K, Proceedings International Ginseng Symposium, The Central Research Institute, Office of Monopoly, Seoul, Korea, p. 119, 1974.
14. 권기록 외, 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급

- 성·아급성 독성 실험 및 Sarcoma-180 항암 효과에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 6, No. 2, pp. 7-27, 2003.
15. 권기록, 정맥주입용 산삼약침이 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구, 대한약침학회지, Vol. 7, No. 1, pp. 15-26, 2004.
  16. 대한약침학회, 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, pp. 13-14, 112-118, 138-203, 1999.
  17. 강성길 외, 인삼수침이 진통 및 혈압에 미치는 영향, 동양의학회지, Vol. 11, No. 2, pp. 66-75, 1985.
  18. 김태운 외, 인삼수침전처리가 발암예방에 미치는 영향, 대한한의학회지, Vol. 9, No. 2, pp. 33-44, 1988.
  19. 황경애 외, 인삼 및 녹용수침의 시간경과에 따른 면역효과연구, 경희의학, Vol. 4, No. 2, pp. 150-157, 1988.
  20. 이혜정 외, 강혈당작용에 의거한 종류별 인삼수침 엑기스 제법연구, 대한한의학회지, Vol. 13, No. 1, pp. 23-40, 1992.
  21. 김용석 외, 인삼수침이 흰쥐의 갑상선 기능저하에 미치는 영향, 경희의학, Vol. 6, No. 2, pp. 202-210, 1990.
  22. 임하변 외, 인삼수침이 항 알레르기에 미치는 영향, 경희의학, Vol. 7, No. 1, pp. 63-72, 1991.
  23. 김창일 외, 농도별 인삼수침이 hydrocortisone acetate를 투여한 흰쥐의 체내대사에 미치는 영향, 대한한의학회지, Vol. 9, No. 2, pp. 33-44, 1988.
  24. 김웅시 외, 수삼, 백삼 및 홍삼수침이 Alloxan 당뇨병 흰쥐에 미치는 영향, 대한 침구학회지, Vol. 6, No. 1, pp. 1-5, 1989.
  25. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Patterns of cell death. *Methods Archive Exp Pathol* 13 : 18-54, 1988.
  26. Ellis RE, Yuan J. Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7 : 663-98, 1991.
  27. Jattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Res* 248 : 30-43, 1999.
  28. Cohen GM. Caspases : the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 : 1-16, 1997.
  29. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death : PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 25 : 259-64, 2004.
  30. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsuji, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest.* 79. pp. 1469-1477, 1999.
  31. Roose, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. : Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature.* 391, pp. 496-499, 1998.
  32. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, Basi, G. : Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, pp. 603-612, 1994.
  33. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietsenpol, 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., Vogelstain, B. : WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 54, pp. 1169-1174, 1994.
  34. Miyashita, T., Reed, J.C. : Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, pp. 293-299, 1995.
  35. 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, pp. 1689-1694, 1992.
  36. Ohtsubo, M., Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, pp. 1908-1912. 1993.
  37. Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory submit. *Nature* 366. pp. 707-710, 1993.
  38. 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. pp. 805-816, 1993.
  39. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietsenpol, 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., Vogelstain, B. WAF1/CIP1 is induced in

- p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54. pp. 1169-1174, 1994.
40. 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.
41. Datto, M.B., Yu, Y., Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor  $\beta$  responsive elements in the WAF/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* 270 : 28623-28628, 1995.
42. Zeng, Y.X., El-Deiry, W.S. Regulation of p21 WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12 : 1557-1564, 1996.
43. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang, L. p53-independent induction of p21(WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 91 : 164-173, 2000.
44. Evans, V.G. : Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, pp. 461-476, 1993.
45. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, G., Basi, G. : Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, pp. 603-612, 1994.
46. Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. : The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, pp. 1132-1136, 1997.
47. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol.* 5 : 27-36, 2004.