

항백당 추출물의 인간 백혈병 세포주 HL-60에서 항백혈병 효과

김용준 · 전병훈¹ · 주성민¹ · 이장천² · 박양구³ · 이상현³ · 전영균³ · 황주민³ · 임대환³ · 윤용갑^{3*}

원광대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 병리학교실,
2: 상지대학교 한의과대학, 3: 원광대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-leukemic Effects of Hwoangbaec-tang in Human Promyelocytic Leukaemia, HL-60 Cells

Young Jun Kim, Byung Hun Jeon¹, Sung Min Ju¹, Jang Chun Lee², Yang Koo Park³, Sang Hyun Lee³,
Young Gyun Chon³, Joo Min Hwang³, Dae Hwan Lim³, Young Gab Yun^{3*}

Department of Microbiology and Immunology, Wonkwang University,
1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2: Department of Prescription, College of Oriental Medicine, Sangji University,
3: Department of Prescription, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The composition of Hwoangbaec-tang has been traditionally used in Korea to treat cancer. Hwoangbaec-tang I is the water extracts prepared from *Angelica dahurica*, *Fritillariae verticillata*, *Ailanthus altissima*, *Viscum coloratum*, *Scutellaria Radix*, *Ginseng Radix*, *Astragalus membranaceus*, and *Glycyrrhizae Radix*. Hwoangbaec-tang II also is the water extracts prepared from *Ginseng Radix*, *Astragalus membranaceus*, and *Glycyrrhizae Radix*. The anti-leukemic effects of human promyelocytic leukaemia (HL-60 cells) by Hwoangbaec-tang I or II was accessed by propidium iodide staining flow cytometric analysis, and apoptosis-inducing activity was further confirmed by a nuclear morphological change, a ladder pattern of DNA fragmentation, and an activation of caspase-3 and 9. Hwoangbaec-tang I was found to induce the apoptosis of HL-60 cells via caspase-3 and 9 pathway. In the other side, Hwoangbaec-tang II was found to inhibit the growth of HL-60 cells by inducing these cells to differentiate toward granulocytes. These results indicate that the different anti-leukemic effects of Hwoangbaec-tang in HL-60 cells can be induce the apoptosis or differnetiation of HL-60 cells in Hwoangbaec-tang composition dependent manner.

Key words : HL-60 cells, Hwoangbaec-tang, Apoptosis, Caspase, Apoptosis, Differentiation

서 론

그 동안 암을 치료하는데 물리요법 및 화학요법을 비롯한 이 많이 사용되어 왔는데, 이들 방법은 유전자를 손상시켜 세포 독성을 유발하는 것으로 알려졌다. 특히 화학 치료제는 세포사멸 (apoptosis) 또는 세포분화(cell differentiation) 과정을 유도한다는 많은 보고가 있다¹⁻⁴⁾. 화학요법이 세포사멸 또는 분화 경로를 통해 종양세포들을 제거할 수 있다는 기전에 대한 논쟁의 여지가 있다고 하더라도, 세포사멸을 유도하여 종양을 제거하는 것은

항암제 동정에 새로운 방법으로 인식되고 있다¹⁻³⁾.

Apoptosis는 세포가 죽을 때 분명한 형태적, 생화학적 특징이 나타나는데, apoptosis가 활발한 세포는 인접한 세포에 해를 끼치거나 염증반응을 일으키지 않고 자기 자신만 파괴된다. 이러한 생리적인 심각한 세포 손상과 팽배(swelling) 및 파손(lysis)을 야기하는 괴사(necrosis)와는 다르다⁴⁻⁶⁾. 대부분의 다세포 유기체가 발달하는 동안 apoptosis는 효과적인 기전을 제공하는 반면 바이러스가 감염된 세포(virus-infected cells)와 종양(tumor)같은 원하지 않는 세포는 제거 한다¹⁻³⁾. Apoptosis를 유도하기 위한 화학요법을 연구하기 위해서 apoptosis에 대한 정확한 정의가 필요하다. 이와 같은 목적에 부합하기 위해서 다음과 같은 전통적인 기준이 제안되어 왔다. 첫째, 일반적으로 염색질 응축과 핵분열

* 교신저자 : 윤용갑, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
· E-mail : youyg@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6834
· 접수 : 2005/03/31 · 수정 : 2005/05/03 · 채택 : 2005/06/04

을 포함한 전형적으로 형태적인 변화가 반드시 광학 현미경으로 관찰할 수 있어야만 하고, 둘째, DNA절편화가 한천 겔(agarose gel) 전기영동에 의해 반드시 증명되어야만 한다. 현재 apoptosis를 확인하기 위한 새로운 방법들은 apoptosis와 관련된 생화학적 결과를 기초로 하여 발달하고 있다⁶⁻⁸⁾.

종양세포를 제거하는 또 다른 방법은 과다하게 분열되는 세포를 억제시켜 특정 세포로 분화시키는 방법이 제시되고 있다. 즉, 암세포를 apoptosis 과정으로만 제거하는 것은 새로운 세포 분화에 영향을 줄 수 없고 체내에 필요한 세포의 분화를 유도할 수 있는 효과가 없기 때문에 암을 치료하는 효과적인 방법이 될 수 없다. 따라서 이러한 세포분화(cell differentiation) 과정을 유도하는 약물의 발굴은 암을 치료하는 대단히 중요한 것으로 알려져 있다⁸⁻¹²⁾.

한편 천연물로부터 분리된 물질들은 백혈병세포를 효과적으로 사멸시킨다는 결과가 최근에 많이 보고되고 있다⁹⁻¹⁸⁾. 특히 백지(*Angelica dahurica*), 패모(*Fritillariae verticillata*), 저근백피(*Ailanthus altissima*), 상기생(*Viscum coloratum*), 황금(*Scutellaria Radix*), 인삼(*Ginseng Radix*), 황기(*Astragalus membranaceus*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 등은 여러 가지 유형의 암을 치료하는데 빈번히 사용된 천연물들이다¹¹⁻¹⁸⁾. 부작용이 없는 소량의 약물을 방제학적 처방 이론인 君臣佐使法에 따라 配合하므로써 보다 큰 시너지 효과를 발휘할 수 있도록 하는 것이 한의학적 방법론이므로 이와 같은 관점에서 항백혈병효과를 연구 관찰하였다.

최근에 저자들은 백혈병 세포주 (HL-60)를 대상으로 백지와 패모의 항백혈병 효과에 대한 결과를 보고한 바 있다¹²⁻¹³⁾. 이러한 약물의 효과를 바탕으로 새로운 항백탕(Hwoangbaec-tang)을 I 과 II로 구분하여 처방을 구성한 후 이를 조제하여 이들의 약의 효과에 대한 검증을 통하여 매우 흥미로운 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Table 1. Prescription of Hwoangbaectang I and II

생약명	Crude drug name	Compositional amount(g)	
		Hwoangbaec-tang I	Hwoangbaec-tang II
백지	<i>Angelica dahurica</i>	50	-
패모	<i>Fritillariae verticillata</i>	50	-
저근백피	<i>Ailanthus altissima</i>	50	-
상기생	<i>Viscum coloratum</i>	50	-
황금	<i>Scutellaria Radix</i>	50	-
인삼	<i>Ginseng Radix</i>	50	50
황기	<i>Astragali Radix</i>	50	50
감초	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	50	50

재료 및 방법

1. 재료

DMEM과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, U.S.A)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-L]-2,5-dephenyltetrazolium bromide(MTT), trypan blue, DAPI와 propidium iodide(PI)은

Sigma Chemical(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Anti-caspase-3와 9, Anti-pro-caspase-3, Anti-actin 등은 R & D(Minneapolis, U.S.A.)사에서 구입하였다. 그 외 사용된 시약은 분석 등급으로 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2. 세포배양

인간 유래 백혈병 세포주인 HL-60은 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되고 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였고, 세포의 생존성은 trypan blue를 이용하여 측정하였다.

3. 한약제

본 연구에서 사용한 항백탕 I 과 II의 구성 약제와 그 양은 Table 1과 같고, 약제는 전북 익산시 소재 한약건재상에서 구입하였으며, 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 증거표본은 원광대학교 한의과대학 방제학 표본실에 보관 중에 있다. 공기에 충분히 건조된 약제는 절단한 후 세절된 항백탕 I 과 II의 약제를 각각 400g 씩 증류수 (1 L)에 넣고 2시간 동안 가온·가압하여 추출한 다음 여과하고 여액을 동결 건조하여 각각의 추출물 80g과 84g을 얻었다. 각 추출물은 냉동고에 보관하면서 항백혈병 효과 실험에 사용하였다.

4. MTT 분석

HL-60 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 측정했다. 요약하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI 1640 배지에서 1×10⁶cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 항백탕을 처리하였다. 4시간동안 배양한 뒤 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH4.7)을 첨가함으로써 용해했다. 그리고 계속해서 20-24시간동안 배양하였다. Formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 량을 측정함으로써 결정했다.

5. DAP/PI를 이용한 핵 염색 및 Carboxyl Fluorescein 염색

HL-60 세포(1×10⁶cells/ml)는 200 µg/ml의 항백탕을 주입 또는 주입하지않고 10%의 FBS가 포함된 RPMI 1640배지를 이용하여 6-well dishes에서 배양하였다. 4시간 후에 1 ml의 세포부유액은 3분 동안 1000 rpm으로 원심분리 하여 세포를 침전시켰다. 세포 침전물은 4%의 중성 완충된 포르말린(100µl)을 첨가하여 고정했다. 고정된 세포부유액(50µl)을 슬라이드에 옮겼고 실온에서 건조하였다. 고정된 세포는 PBS로 3번 세척했고, 건조시킨 뒤, DNA-specific fluorochrom DAPI/PI으로 1분간 염색했다. 부

착된 세포는 PBS를 이용해 세척했고, 건조 시킨 후 90% 글리세롤(glycerol)로 마운트(연구용 표본이나 슬라이드를 제작하는 것) 시켰다. 슬라이드는 형광현미경을 이용해 조사했다. 또한 세포분화를 조사하기 위하여 상기와 같이 세포를 수집한 후 carboxyl fluorescein 염색을 하여 형광현미경으로 세포의 형태를 조사하였다.

6. 흐름세포분석

약물이 처리된 후 HL-60세포(1×10^6 cells/well)는 원심침전하고 PBS로 세척한 뒤 수확되었다. 세포는 80% 냉장 에탄올로 30분간 고정시켰고, PBS로 세척한 뒤, 1mg/ml RNase A 가 포함된 0.5% Triton X-100 용액 0.25ml로 37°C로 30분간 처리했다. 마지막으로 50mg/ml PI 0.25ml를 첨가하고 암실에서 30분간 방치했다. 표본으로부터 세포 수는 FACS Vantage(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A)로 계산하였다. 또한 CD11의 발현을 측정하기 위하여 상기와 같이 약물을 처리하고 세포를 수집한 후에 Anti-CD11- FITC로 염색한 후에 FACS으로 분석하였다.

7. DNA 절편화 분석

HL-60 세포(1×10^6 cells/ml)는 6시간 동안 여러 가지 농도의 항백탕을 처리했다. 세포는 3분간 1000 rpm으로 원심 분리 하고 PBS로 세척한 뒤 수확하였다. 세포침전물은 실온에서 30분간 용출 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5 mg/ml proteinase k, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)을 주입하고 용해했다. 그 후 RNase A(25mg/ml)를 주입하고 30분간 37°C로 처리한 뒤 모든 단백질을 침전시키기 위해서 단백질 침전 용액을 첨가했다. 그리고 10분간 4°C에서 1300 rpm으로 원심분리 시켰다. 그 후 표면에 떠오르는 것을 표본으로 만들었고 phenol-chloroform(1:1,v/v)로 추출했으며, 그 다음 aqueous phase가 chloroform/isoamyl alcohol (24:1,v/v)로 추출했다. DNA는 2배의 isopropanol를 주입하고 침전시켰다. 원심침전으로 얻은 DNA침전물은 70% 에탄올로 세척했고 건조시킨 후에 10 mM Tris-HCl(pH8.0)과 1 mM EDTA로 구성된 TE 완충액으로 용해시켰다. DNA (10 µg)을 1.5%의 한천 겔(5v/cm)에서 전기영동 시킨 후 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색한 후에 자외선 아래에서 관찰했다. apoptosis는 대략 다발 180-200 염기쌍(base pairs, multiples) 쯤 되는 올리고뉴클레오사이드 DNA 절편화로 확인했다. 표준 DNA는 1 kbp DNA를 사용하였다.

8. Western blot

항백탕이 처리된 HL-60 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 µg을 10% SDS-PAGE에 로딩(loading)하여 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 T-TBS로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 T-TBS로 3회 세척

하고 anti-caspase-3, anti-caspase-9, anti-pro-caspase-3, 또는 anti-actin antibody (1: 1,000)를 주입하여 3 시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG(1 : 100)을 주입하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 T-TBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL방법으로 발색시켰다.

9. 통계 분석

각각의 실험들은 적어도 3번 이상 실행 되었다. 결과는 평균 값±표준편차로 표현했다. 통계 분석은 Student's t-test를 이용했다. 유의성의 한계는 p 값이 <0.05를 기준으로 정했다.

결과 및 고찰

최근 한약제를 이용한 항암 효과에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다¹⁰⁻¹⁸⁾. 본 연구는 항암 효과가 우수하다고 알려진 전통 및 최근 자료를 바탕으로 한방의 방제학적 특성을 고려하여 새로운 2가지의 항백탕을 구성하고 만들어서 인간 백혈병 세포주인 HL-60에서 항백혈병 효과를 조사하였다. 즉, 항백탕 I은 백지(*Angelica dahurica*), 패모(*Fritillariae verticillata*), 저근백피(*Ailanthus altissima*), 삼기생(*Viscum coloratum*), 황금(*Scutellaria Radix*), 인삼(*Ginseng Radix*), 황기(*Astragalus membranaceus*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 등 8가지 한약제를 이용하여 구성하였고, 항백탕 II는 인삼(*Ginseng Radix*), 황기(*Astragalus membranaceus*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 등 3가지 한약제로 구성하여 물을 첨가하고 가운·가압한 후 유효성분을 추출하고 동결 건조하여 항백혈병 효과를 조사하였다. 즉, 항백탕 I은 세포의 고사(apoptosis)에 초점을 맞춘 처방이고, 항백탕II는 세포분화(cell differentiation)에 초점을 맞춘 처방이므로 두가지 처방의 작용에 따라 항백혈병 효과검증에 여러 가지 시사점을 제공할 수 있는 점을 고려하여 처방을 구성한 것이다. 항백탕 I과 II의 약물을 여러 가지 농도(50-500 µg/ml)로 HL-60에 처리하고 apoptosis 검증은 DAPI/PI 염색, propidium iodide(PI) 염색, DNA fragmentation 및 caspase 발현 등을 조사하였고, 세포분화(cell differentiation)은 CD 11의 발현과 세포의 형태를 형광 현미경으로 조사하여 약물의 효과를 검증하였다.

항백탕 I과 II가 HL-60 세포에 독성을 나타내는지 알아보기 위해서 MTT 분석을 하였다. 그 결과 흥미롭게도 항백탕 I은 농도가 높을수록 세포독성이 현저하게 증가하여 백혈병세포를 사멸시키는데 우수한 효과를 보인 반면, 항백탕 II는 사용된 모든 농도에서 유의한 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 그러므로 항백탕 I은 apoptosis 진행 기전에 대해서 조사하였고, 항백탕 II는 세포분화에 대해 연구하였다.

악성 질병 치료에 세포독성 치료제의 하나의 문제는 심각한 부작용이다. 괴사와 apoptosis는 서로 다른 apoptosis 기전을 가지지만 모든 세포의 세포가 죽어갈 때는 이들 중 하나의 과정을 반드시 거치게 된다^{19,20)}. Apoptosis의 생화학적인 특징은 180-200 base pair의 이중 나선 DNA 절편속에 internucleosomal

region을 자르는 내인성(endogenous) DNA에 의해 DNA를 절편시킨다²¹⁻²⁴). 본 연구에서도 이러한 apoptosis의 생화학적 특징을 규명하기 위해서 50-500 µg/ml의 항백탕 I를 처리하여 24시간 후에 DNA의 절편화를 분석한 결과 Fig. 2A와 B에서 나타낸 바와 같이 농도가 증가할 수록 DNA 절편화가 가속화됨을 알 수 있었다. 특히 항백탕 I의 농도에 따른 세포사멸의 정도를 결정하기 위해서 세포를 PI로 염색한 후 flow cytometry로 분석하였다. 즉 apoptosis가 증가되면 세포주기 상 sub-G1 peak(apoptotic peak)가 증가된다^{5,19}). 따라서 sub-G1시기의 양을 측정함으로써 apoptosis율을 계산할 수 있다. 본 연구 결과 Fig. 2B와 같이 항백탕 I의 농도가 증가됨에 따라 apoptotic peak도 증가하였다.

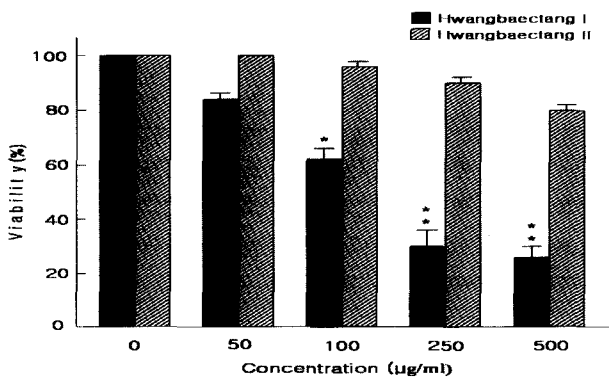


Fig. 1. Dose-dependent cell viability in Hwoangbaec-tang-treated HL-60 cells. HL-60 cells (1×10^5 /well plate) were treated with or without Hwoangbaec-tang I or II for 24 h at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means \pm SD of three independent experiments. *P<0.05 indicates significant differences from the control.

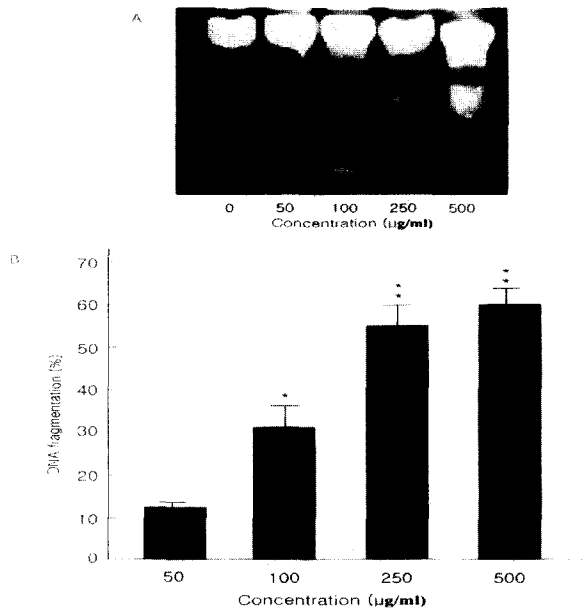


Fig. 2. Apoptotic effects of Hwoangbaec-tang I on the HL-60 cells. A) Electrophoresis results of DNA fragmentations. B) Flow cytometric analysis for DNA fragmentation. Cells were treated with or without Hwoangbaec-tang I or II for 24 h at indicated doses. Data are means \pm SD of three independent experiments. *P<0.05 indicates significant differences from the control.

또한 항백탕 I이 세포핵의 변화를 유도하는지 알아보기 위하여, 1×10^6 cells/ml에 250 µg/ml의 약물을 처리한 후 6시간 동안 배양한 후 세포를 수거하여 원심침전하고 PBS로 세척하여 DNA-specific fluorochrom DAPI/PI로 염색한 후 형광현미경을 이용해 조사했다. 그 결과 Fig. 3과 같이 대조군은 정상적인 핵의 형태를 유지하였지만, 약물이 처리된 실험군에서는 시간이 증가할수록 nuclear chromatin의 응축, nuclear fragmentation 및 apoptotic bodies와 같은 apoptosis의 형태적인 특징들이 명확히 관찰되었다. 이러한 결과는 HL-60 세포에서 항백탕 I이 apoptosis를 뚜렷이 유도했음을 제시해주었다.

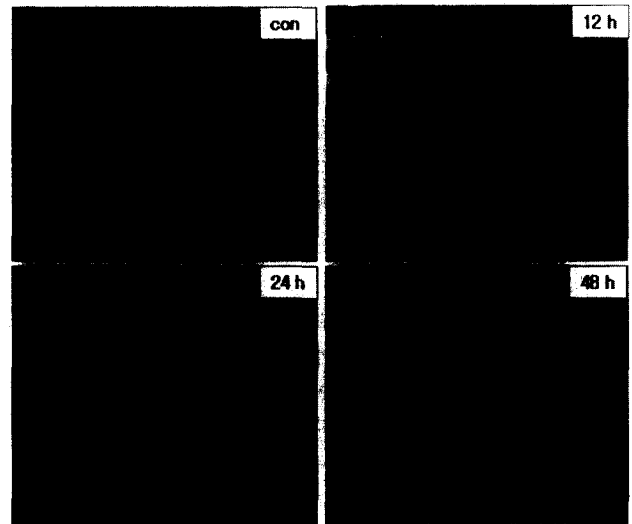


Fig. 3. Nuclear staining confirmation on the HL-60 cells treated with Hwoangbaec-tang I. Cells were treated with or without Hwoangbaec-tang I or II for 0-48 h. Cell fragmented nuclei was measured by fluorescent microscope as described in materials and methods. Asterisks represent fragmented nuclei.

세포는 안팎으로부터 수많은 자극에 반응하여 세포가 죽을 것인지 살 수 있는지에 caspase family가 중요한 역할을 한다는 여러 보고가 있다²¹⁻²⁴). 그러므로 apoptosis는 caspase family의 활성으로 이루어질 수 있으며 그 중 중요한 인자중의 하나가 caspase-3와 9로 알려졌다²³⁻²⁴). 본 연구에서는 항백탕 I이 유도하는 apoptosis의 기전을 알아보기 위하여, caspase-3, 및 9의 발현을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 항백탕 I의 농도가 증가될수록 pro-caspase-3의 발현은 시간이 지날수록 크게 감소한 반면, caspase-3와 9는 시간이 지날수록 발현이 크게 증가되었다. 그러나 caspase-8의 발현은 전혀 되지 않았다(변화가 없기 때문에 결과를 제시하지 않았음). 따라서 항백탕 I이 유도하는 세포 사멸기전은 caspase-3과 9를 경유하는 것을 알 수 있었다.

한편 백혈병은 조절되지 않은 세포성장 즉, 지속적인 세포분열로 인한 정상 기능을 가지지 못한 수많은 백혈구가 주변 조직 및 전신으로 침투되는 질환을 말하며, 절제되지 않은 과도한 분열능력을 가진 비정상적인 백혈구는 내피 모세혈관(endothelial capillaries), 혈관(blood vessels)과 림프관(lymphatic vessels) 등으로 침투하여 결국 숙주를 죽이는 결과를 초래한다²⁷). 백혈병은 인구 10만명당 5-8명 정도 발생하는 혈액암으로 만성 및 급성의

로 구분되나, 결국 면역체계를 교란시켜 숙주를 사멸시키는 결과를 초래한다. 백혈병을 치료하는데 있어 골수 이식방법이 효과적이거나, 약제의 투여가 병행되어야 좋은 예후를 나타낼 수 있다. 따라서 화학 합성제 뿐만 아니라 한약제 중에서 백혈병을 치료할 수 있는 소재의 발굴은 대단히 중요한 것으로 알려지고 있다²⁷⁾.

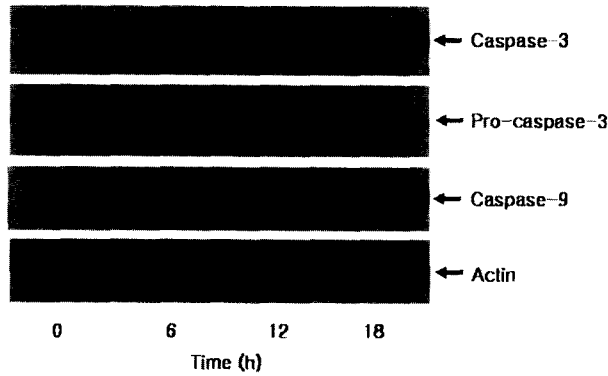


Fig. 4. Immunoblot analysis for caspase-3, pro-caspase-3, and caspase-9 expression on the HL-60 cells treated with Hwoangbaec-tang I. Cells were treated with or without Hwoangbaec-tang I (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 0-18 h. Caspase-3, pro-caspase-3 or caspase-9 was visualized by western blot analysis as described in materials and methods.

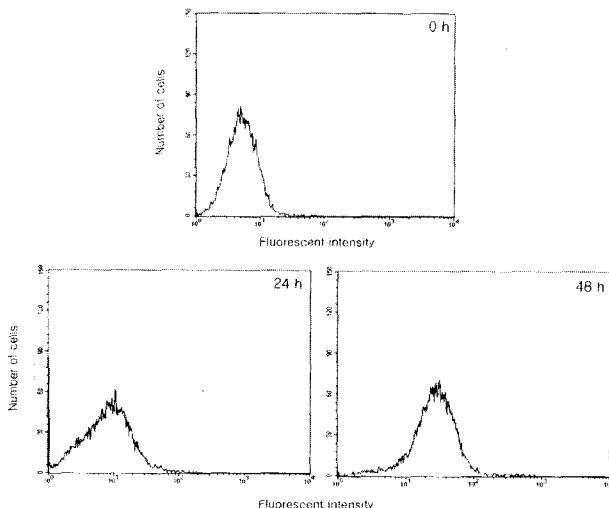


Fig. 5. Flow cytometric analysis for CD11 expression on the HL-60 cells treated with Hwoangbaec-tang I. Cells were treated with or without Hwoangbaec-tang I (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 0-48 h. CD11 expression was measured by flow cytometry as described in materials and methods.

본 연구에서 항백탕 II는 Fig. 1에서 제시한 바와 같이 세포 독성에 영향이 없기 때문에 항백혈병 효과에 대한 검증을 하기 위해서 HL-60 세포를 이용하여 세포분화에 미치는 효과를 조사하였다. HL-60 세포는 인간 유래 세포주의 일종으로 CD11과 같은 표면항원이 발현되지 않기 때문에 항암효과에 대한 약물 검증에 많이 이용되고 있다²⁷⁾. 본 연구에서도 HL-60세포를 이용하여 항백탕II가 HL-60세포의 분화에 미치는 효과를 실험한 결과, 약물(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리 후 24시간 경과시 CD11 표면 분자가 발현되었고, 48시간에는 대부분 CD11이 발현되었다. 이러한 결과는 항백탕 II가 HL-60 세포에서 과립백혈구의 기능을 수행할 수 있

도록 분화하는 효과가 있는 것으로 조사되었다. 또한 세포의 분화 정도를 알아보기 위하여 carboxyl fluorescein을 이용하여 형광 현미경으로 관찰한바 Fig. 6과 같이 세포의 모양이 분화되는 현상을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 항백탕 II가 HL-60 세포에서 세포분화를 유도할 수 있다는 뚜렷한 증거를 제시해 주었다.

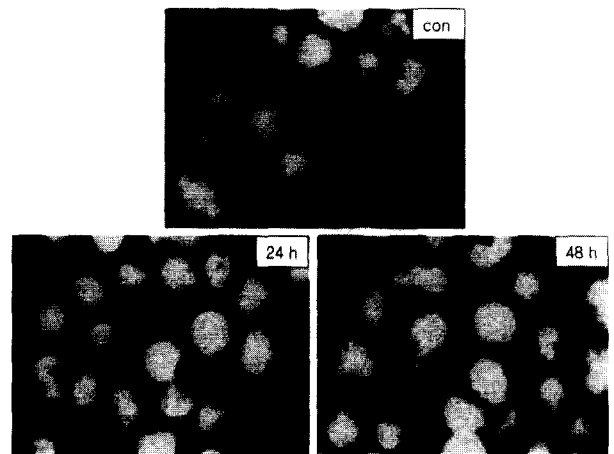


Fig. 6. Morphological change on the HL-60 cells treated with Hwoangbaec-tang II. Cells were treated with or without Hwoangbaec-tang II (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 0-48 h. Morphological change was measured by fluorescent microscope as described in materials and methods.

이상의 결과를 요약하면, 인간의 백혈병 세포주인 HL-60에서 항백탕 I은 apoptosis를 유도하는 효과가 우수하였고, 그 기전은 caspase-3와 9의 발현과 관계가 있음을 규명하였고, 항백탕 II는 세포분화를 유도함으로써 세포성장을 억제할 수 있는 가능성을 관찰하였다. 이러한 결과들은 한의학적 처방구성 원리를 이용한 약물의 배합을 통하여 항 백혈병 효능에 대한 일정한 결과를 얻을수 있음을 시사하고 있으며 이와같은 방법을 통하여 보다 유용한 백혈병 치료제를 개발할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

결 론

본 연구에서는 방제학적 관점인 君臣佐使法에 따라 암을 치료하는데 도움이 되는 한약제를 이용하여 항백탕을 조제하였다. 항백탕 I은 백지(*Angelica dahurica*), 패모(*Fritillariae verticillata*), 저근백괴(*Ailanthus altissima*), 상기생(*Viscum coloratum*), 황금(*Scutellaria Radix*), 인삼(*Ginseng Radix*), 황기(*Astragalus membranaceus*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 등 8가지 한약제로 구성하였으며, 항백탕 II는 인삼(*Ginseng Radix*), 황기(*Astragalus membranaceus*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 등 3가지 한약제로 구성된 다음 물을 첨가하여 가온·가압한 후 유효성분을 추출하고 동결 건조하여 항백혈병 효과를 조사하였다. 이 약물의 항백혈병 효과를 조사하기 위해서, apoptosis 검증은 DAPI/PI 염색, propidium iodide(PI) 염색, DNA fragmentation 및 caspase 발현 등을 조사하였고, 세포분화(cell differentiation)은 CD 11의 발현과 세포의 형태를 형광 현미경으로 조사하여 약물의 효과를 검증하였다.

그 결과 항백탕 I 은 caspase-3와 9을 경유한 apoptosis을 유도한 반면, 항백탕 II는 CD11 표면 항원 분자가 발현되어 과립 백혈구로 분화함으로써 세포성장을 억제시키는 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 항백탕을 구성하고 있는 약물의 방제학적 배합에 따라 apoptosis 또는 cell differentiation을 유도 할 수 있으며, 처방 구성 약물들에 상호배합 작용을 연구하는 좋은 모델이 될 수 있으며, 보다 유용한 백혈병 치료제 개발에 도움이 될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 한방치료기술 연구개발사업 (02-PJ9-PG1-CO05-0003)에 의한 것임.

참고논문

1. Panchal, R.G. Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 55, 247-252, 1998.
2. Smets, L.A. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs* 5, 3-9, 1994.
3. Watson, A.J. Review article: manipulation of cell death—the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 9, 215-226, 1995.
4. Nicotera, P., Leist, M., Ferrando-May, E. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp.* 66, 69-73, 1999.
5. Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 243, 167-190, 2000.
6. Loo, D.T., Rillema, J.R. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol.* 57, 251-264, 1998.
7. Allen, R.T., Hunter, W.J. 3rd., Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 37, 215-228, 1997.
8. Matsuda, S., Minowa, A., Suzuki, S., Koyasu, S. Differential activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 pathways during FTY720-induced apoptosis of T lymphocytes that is suppressed by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Immunol.* 162, 3321-3326, 1999.
9. Zheng, S., Yang, H., Zhang, S., Wang, X., Yu, L., Lu, J., Li, J. Erratum. *J Cell Biochem.* 77, 125, 2000.
10. Oh, G.S., Hong, K.H., Oh, H., Pae, H.O., Kim, I.K., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., and Chung, H.T. 4-Acetyl-12,13-epoxy-9-trichothecene-3,15-diol isolated from the fruiting bodies of *Isaria japonica* Yasuda induces apoptosis of human leukemia cells (HL-60). *Biol Pharm Bull.* 24, 785-789, 2001.
11. 배현옥, 임창경, 장선일, 한동민, 안원근, 윤유식, 전병훈, 김

원신, 윤용갑. 항 백혈병 작용에 관련된 천연물의 자료 조사. *동의생리병리학회지*, 17, 605-610, 2003.

12. Pae, H.O., Oh, H., Choi, B.M., Oh, G.S., Paik, S.G., Jeong, S., Hwang, K.M., Yun, Y.G., Chung, H.T. Differentiation-inducing effects of verticinone, an isosteroidal alkaloid isolated from the bulb of *Fritillaria ussuriensis*, on human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull.* 25, 1409-411, 2002.
13. Pae, H.O., Oh, H., Yun, Y.G., Oh, G.S., Jang, S.I., Hwang, K.M., Kwon, T.O., Lee, H.S., Chung, H.T. mperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 Cells. *Pharmacol Toxicol.* 91, 40-48, 2002.
14. Wang, J., Yu, Y., Hashimoto, F., Sakata, Y., Fujii, M., Hou, D.X. Baicalein induces apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in HL-60 cells. *Int J Mol Med.* 14, 627-632, 2004.
15. Kim, Y.S., Jin, S.H. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis via activation of caspase-1 and -3 and up-regulation of Bax in human neuroblastoma. *Arch Pharm Res.* 27, 834-839, 2004.
16. Mori, H., Niwa, K., Zheng, Q., Yamada, Y., Sakata, K., Yoshimi, N. Cell proliferation in cancer prevention; effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an in vitro model in human colorectal cells. *Mutat Res.* 480-481, 201-207, 2001.
17. Lian, Z., Niwa, K., Gao, J., Tagami, K., Mori, H., Tamaya, T. Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line. *Cancer Detect Prev*, 27, 147-154, 2003.
18. Yang, J.H., Chou, C.C., Cheng, Y.W., Sheen, L.Y., Chou, M.C., Yu, H.S., Wei, Y.H., Chung, J.G. Effects of glycolic acid on the induction of apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia cell line (HL-60). *Food Chem Toxicol.* 42, 1777-1784, 2004.
19. Roush, W.R., Hagadorn, S.M. Synthesis of mycarose and epi-axenose from non-carbohydrate precursors. *Carbohydr Res.* 136, 187-193, 1985.
20. Shimizu, C., Li, X., Kimura, M., Hashimoto, K., Sugaya, K., Kubo, M., Suzuki, S., Nakayama, T. A novel immunosuppressant, FTY720, increases the efficiency of a superantigen-induced peripheral T-cell deletion whilst inhibiting negative selection in the thymus. *Immunology* 94, 503-512, 1998.
21. Blagosklonny, M.V. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* 14, 1502-1508, 2000.
22. Counis, M.F., Torriglia, A. DNases and apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 78, 405-414, 2000.

23. Mak, T.W., Yeh, W.C. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res. Suppl* 3, S243-252, 2002.
24. Truong-Tran, A.Q., Carter, J., Ruffin, R.E., Zalewski, P.D. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals*. 14, 315-330, 2001.
25. Claridge, C.A., Schmitz, H., Bradner, W.T. Antitumor activity of some microbial and chemical transformation products of anguidine (4,15-diacetoxyscirpene-3-ol). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2, 181-182, 1979.
26. Shifrin, V.I., Anderson, P. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 274, 13985-13992, 1999.
27. Tsiftoglou, A.S., Pappas, I.S., Vizirianakis, I.S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther*. 100, 257-290, 2003.