

원 저

定志丸과 시스플라틴의 神經膠芽細胞腫에 對한 細胞枯死 機轉研究

신학수^{1,2)}, 이선우^{1,2)}, 이민구^{1,2)}, 윤종민^{1,2)}, 이인²⁾, 신선호²⁾, 문병순^{1,2)}
원광대학교 한의학전문대학원¹⁾, 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실²⁾

Mechanisms of Apoptosis by Combination with *Jeongjihwan* and Cisplatin in Human Glioblastoma Cells

Hak-Soo Shin^{1,2)}, Sun-Woo Lee^{1,2)}, Min-Goo Lee^{1,2)},
Jong-Min Yun^{1,2)}, In Lee²⁾, Sun-Ho Sin²⁾, Byung-Soon Moon^{1,2)}

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University¹⁾
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University²⁾

Objectives : Malignant gliomas are often treated with cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) and radiation but results remain unsatisfactory. Since malignant glioma displays moderate resistance to conventional therapy, a new treatment modality is needed to improve the outcome of patients with these tumors.

The aim of this study was to investigate the effects of the combined use of *Jeongjihwan* (JJH) and cisplatin (CDDP) on cultured malignant glioma cells, A172.

Methods & Results : The combined use of cisplatin and *Jeongjihwan* had synergistic effects on A172 cells during 24 hr-incubation. This treatment resulted in a decrease of cell viability, which was revealed as apoptosis characterized by activation of caspase-3 protease as well as cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP) with change of mitochondrial membrane potential transition. The expression of members of the Bcl-2 protein family was modulated during co-treatment with *Jeongjihwan* and cisplatin. Activation of caspase-3 and mitochondrial alterations were central to co-treatment with *Jeongjihwan* and cisplatin-induced apoptosis.

Conclusions : We conclude that co-treatment with *Jeongjihwan* and cisplatin-induced activation of the mitochondrial pathway enables cell death. Also, we suggest the combined theory of JJH and cisplatin could be a useful method for glioblastoma.

Key Words: *Jeongjihwan*, apoptosis, human glioblastoma cells

緒 論

神經膠腫은 神經膠細胞의 발육 분화의 모든 단계에 존재하는 세포로 이루어지는 腫瘍으로서 神經膠芽細胞腫, 星狀神經膠腫, 上衣細胞腫, 乏突起神經膠腫, 分極神經膠芽細胞腫 등을 통틀어 부르는 이름이다¹⁾. 이 중 神經膠芽細胞腫은 성인에서 발생하는 頭

· 접수 : 2004년 9월 5일 · 논문심사 : 2005년 11월 14일
· 채택 : 2004년 12월 4일
· 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교
익산한방병원 내과2
(Tel; 063-850-2102, Fax; 063-841-0033, E-mail;
mbs@wonkwang.ac.kr)

Table 1. Composition and Dosage of Jeongjihwan(JJH) per PACK.

Herb	Scientific Name	Dose(g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix(Panax ginseng C.A. Meyer)</i>	5.625
白 茯 苓	<i>Poria(Poria cocos Wolf.)</i>	5.625
遠 志	<i>Radix Polygalae(Polygala tatarinowi Regel)</i>	3.750
石 菖 蒲	<i>Rhizoma Acori Gramineii(Acorus gramineus Soland)</i>	3.750
Total amount		18.750

蓋腔內 腫瘍 중 약 4분의 1을 차지하고 있고, 각종 치료에도 불구하고 평균 생존기간이 1년을 넘지 못하는 惡性도가 높은 腦腫瘍이다²⁾. 최근 여러 종류의 항암치료제가 개발되어 神經膠芽細胞腫 환자의 치료에 이용되고 있으며, 수술이나 방사선 조사를 시행하기 전에 일정기간동안 일차 치료로서 화학요법을 시도하기도 하지만, 뇌조직에서만 관찰되는 뇌혈관장벽의 한계점 때문에 제한적 치료 효과만이 관찰되고 있다³⁾.

시스플라틴(cisplatin)은 癌 치료에 사용되는 항암제 가운데 하나로서 세포 분열을 저해하고 세포고사를 유도하여 항암작용을 나타내는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 현재 항암 치료제의 작용기전이 세포고사 기전에 의존한다는 사실이 밝혀진 후부터 세포고사 신호 전달계의 기능 변화를 통하여 항암 치료의 효능을 높이려는 研究에 관심이 집중되고 있다⁵⁾.

定志丸은 唐代 孫⁶⁾의 《千金要方》에 心氣不足으로 인한 憂愁悲傷不樂, 忽忽善忘, 朝瘥暮劇, 暮瘥朝劇, 狂眩을 치료한다고 처음 수록되어 있으며, 그 후 여러 醫家에서 心氣不足으로 인한 驚悸, 怔忡, 怔忡, 健忘, 失眠, 精神恍惚 등의 病症을 치료하는데 활용되어 왔다.

최근 定志丸에 대한 실험연구로는 朴⁸⁾의 心血管系에 미치는 影響과 河⁹⁾의 老化에 미치는 影響에 대한 研究가 있었다. 또한, 崔¹⁰⁾는 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞 損傷에 미치는 影響에 대해 報告하였지만, 현재까지 定志丸의 抗腫瘍 效果에 관한 研究는 報告된 바가 없었다.

이에 著者는 定志丸 抽出液을 시스플라틴과 併用하여 神經膠芽細胞腫 A172 세포에 대한 생존을 변

화와 caspase의 활성화 및 관련 단백질의 발현 양상을 실험적으로 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

1) 세포주

神經膠芽細胞腫 A172 세포는 한국세포주은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양받아 계대 배양하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 定志丸의 처방내용은 《千金要方》⁷⁾에 의거하였으며, 약제는 원광대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 구입하여 嚴選한 것을 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음(Table 1)과 같다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시스플라틴(cis-diaminedichloroplatinum (II), CDDP)은 Sigma Chemical 社(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다. RPMI1640, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL 社(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기(24 well plate, 10cm dish)는 Falcon 社(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylte-trazolium bromide(MTT), sodium dodesyl sulfate, dimethylsulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical 社(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였고, JC-1은 Molecular

probes 社(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. Caspase-3 protease 기질인 AMC(7-amino-4-coumarin)-DEVD(aspararicacid-glutamic- acid-valne-aspararicacid)는 Calvicochem 社(San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며, p53, PARP 및 Bcl-2 등에 대한 항체는 Santa Cruz 社(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 方法

1) 검액의 조제

定志丸 20첩 분량인 375g을 증류수 3,000ml와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 취하고, 여과지로 여과한 용액을 감압회전증발기를 이용하여 감압농축하였다. 이것을 동결건조기에서 2시간동안 동결건조하여 건조추출물 58.6g을 제조하였다. 이 동결 추출물을 증류수로 재조정하여 사용하였으며, 검액을 세포에 투여하기 전에는 1.2, 0.8, 0.45, 0.2 μ m pore size의 micro filter (Milipore)를 이용하여 여과감균하였다.

2) 세포배양

A172 세포는 10% 우태아혈청(FBS)이 포함된 RPMI1640 세포 배양액으로 5% CO₂, 95% 대기 공기 및 37 $^{\circ}$ C 세포 배양기에서 10cm 세포 배양판에 배양하였다. 48시간 간격으로 trypsin/EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

3) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay¹¹⁾를 이용하여 측정하였다. A172 세포를 24 well 세포 배양판에 1 \times 10⁵cells/ml씩 분주하여 16시간 CO₂ 배양기에서 안정화시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 시스플라틴을 처리한 다음, MTT 100 μ l/ml를 첨가하여 3시간 반응시켰다. 살아있는 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540nm 파장에서 분광광도계 (spectro photometer; Thermomax, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율로 표시하였다.

4) Hoechst staining

세포를 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 세척하고, Hoechst 3342(Sigma Biosciences, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 20 μ M/ml 가 되도록 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 세척하여 형광현미경 아래에서 DNA의 분절현상을 관찰하였다.

5) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

A172 세포(1 \pm 10⁶ cells)를 4 $^{\circ}$ C에서 15분 lysing buffer (1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tri/HCl, pH 8.0)로 용해하고 20,000rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA (Bicinchonic acid, Sigma Co, St. Louis, MO, USA)法으로 정량하여 assay buffer (100mM Hepes, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% Chaps, 2mM DTT, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)에 각각 100 μ M 농도의 caspase 형광기질액과 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시킨 후 Fluorometer (Molecular Devices Co, USA)로 측정하였다. 먼저 caspase-3 protease의 활성측정은 AMC-DEVD와 50 μ M을 사용하였으며, 이것의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wave length (380nm)와 emission wave length (460nm)를 사용하였다. Caspase-8 protease와 caspase-9 protease는 각각 Z-IETD-AFC와 Ac-LEHD-AFC 50 μ M을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 400nm (excitation wave length)와 505nm (emission wave length)의 파장에서 측정하였다.

6) Western blotting analysis

배양된 A172 세포에 시스플라틴을 처리한 후 세포를 포집한 다음 lysis buffer (1% Triton X-100, 10mM Tris, pH 7.6, 50mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin, 1% aptotinin)를 부가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 용해시키고, 12,000rpm, 15분의 조건으로 원심 분리하여 얻은 추출액을 BCA용액에 30분간 반응시켜 단백질을 정량하였다. 정량한 세포부유액은 2 \times

sample buffer와 혼합하여 100℃에서 3분간 가열하여 단백질을 변성시키고, 12.5% sodium dodesyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4℃, 30V로 16시간 transfer한 후 blocking buffer (10% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켰다. Anti-PARP, anti-p53, anti-p21, anti-caspase-3 등의 항체는 0.05%의 Tween-20이 함유된 Tris-buffered sample saline (TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitro cellulose membrane과 상온에서 2시간 반응한 다음, 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (TBS-T로 1: 3,000으로 희석)와 상온에서 1시간 반응시킨 후 enhanced chemilumine scence kit (Amer sharm, England)을 사용하여 필름에 노출시켰다.

7) Mitochondria 막전위 측정

Mitochondria의 막전위 변화를 관찰하고자 JC-1 (2 μM)을 사용하여 세포를 염색하였다. 시스플라틴을 처리한 세포의 배양액을 제거한 후 차가운 PBS로 세척하였으며, A172 세포에 JC-1을 처리하고 세포 배양기에서 20분간 반응시킨 다음, PBS로 3회 세척한 후 역상 형광 현미경 (inverted fluore-scence microscope)의 10×40 배율로 사진을 촬영하였다.

8) 2-D gel electrophoresis

(1) 등전위 전기영동 (Isoelectric focussing, IEF)

배양된 A172 세포는 定志丸과 H2O2를 처리한 일정시간 후에 세포를 포집하여 PBS로 세척한 후 lysis buffer (8M urea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 20mM Tris base, 0.2% ampolyte)를 상온에서 가하여 5초 간격으로 30초간 초음파처리를 하였다. 13,000rpm, 18℃, 20분의 조건으로 원심분리한 후 상층액을 취하여 BCA法으로 정량하였다. 이 상층액과 rehydration buffer (8M urea, 2% CHAPS, 0.2% IPG buffer, bromolphenol blue, 18mM DTT)를 rehydration tray에 분주하고, 상용화된 IPG strip (Bio-rad co.)을 gel면이 sample solution에 닿도록 sliding하였다. mineral oil을 덮어 마르거나 urea가 적출되지 않도록 하고 15시간 동안 방치한 후 strip을 IEF tray에 옮겨 다시 mineral oil을 덮고, IEF를 manual (Bio-rad Co)에 의거하여 수행하였다.

(2) 2-dimensional electrophoresis(2-D)

IPG strip을 SDS buffer system으로 평형화 후 strip에 SDS equilibration buffer I (50mM Tris-Cl(pH 8.8), 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromo phenol blue, 2% DTT, 2.5% idoacetamide, 1% DTT)을 충분히 잠기도록 넣고 20분 반응시킨 후 SDS equilibration

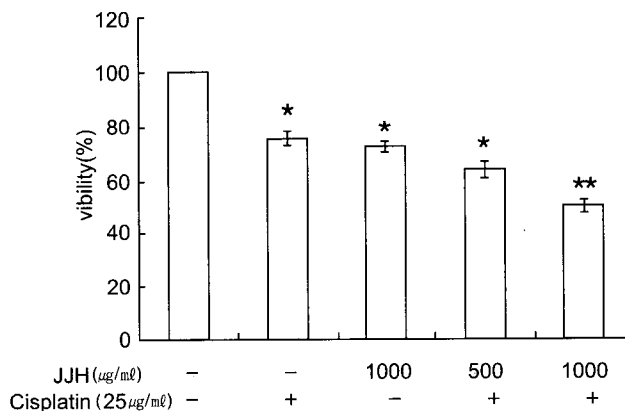


Fig. 1. Co-treatment with JJH and Cisplatin Decreased the Viability of A172 Cell. Cells were co-treated with cisplatin and JJH for 24hr. Viability was determined by MTT assay as described in Materials and Method. Results represent the mean± standard deviation (SD) of quadruplicates. (★ $p<0.01$, ★★ $p<0.001$)

buffer II (buffer I + 2.5% Idoacetamide)를 넣고 20 분 반응시켜 SDS gel 상단에 얹었다. strip을 고정하기 위하여 agarose를 넣어 굳히고 전기영동을 실시하였다. Poly acryamide gel의 silver staining은 Pharmacia Co에서 제공하는 kit을 사용하였으며, fixation 30분, sensitization 20분, silver impregnation 20분, 마지막으로 development를 5분 간 수행하였다. Gel의 분석은 imaging system을 이용하여 gel spot을 digital form으로 얻은 후 이를 analysis software (PDQUEST, Bio-rad Co)를 이용하여 분석하였다.

9) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과로서 통계처리는 student's *t*-test에 준하여 처리하였으며, *p*-value가 최대치 0.05 이하의 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

結果

1. 定志丸과 시스플라틴에 의한 A172 세포의 세포 독성 효과

定志丸과 시스플라틴이 A172 세포에 미치는 세포 독성효과를 알아보기 위하여 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 후 세포 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 定志丸 1000 μ g/ml과 시스플라틴 25 μ g/ml를 각각 처리한 대조군과 시스플라틴 25 μ g/ml과 定志丸 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml를 동시 처리한 실험군을 24시간 배양한 후 세포 생존율을 조사한 결과, 시스플라틴 25 μ g/ml과 定志丸 1000 μ g/ml를 병용 처리한 실험군에서 현저한 세포 생존율의 저하를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 세포 생존율의 저하가 定志丸과 시스플라틴에 의한 A172 세포의 세포고사에 미치는 영향인지를 알아보기 위하여 Hoechst staining 방법으로 DNA 분절현상을 확인하였다(Fig. 2).

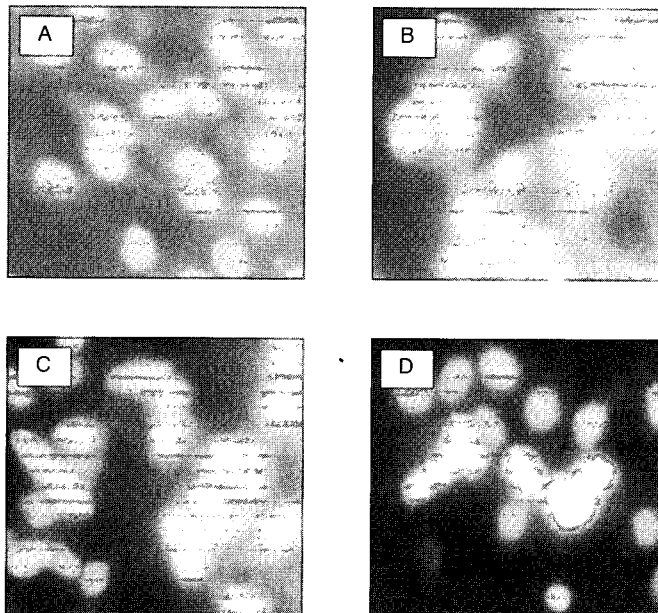


Fig. 2. The Combination with *JJH* and Cisplatin Induced Chromatin Condensation of the Nucleus in A172 Cells. Cell were incubated with medium alone (A), cisplatin alone (B), *JJH* alone (C), the combination with *JJH* and cisplatin (D) for 12 hr. Then, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde and stained with Hoechst 3342 and visualized under fluorescent microscope.

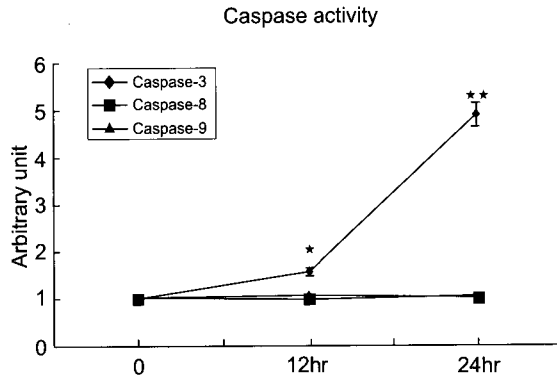


Fig. 3. The Combination with *JJH* and Cisplatin Induced the Catalytic Activation of Caspase-3 Protease. Cells were co-treated with *JJH* and cisplatin for the different time periods. Activation fold of caspase-3 and caspase-8, -9 proteases was calculated by ratio of AMC release from treated cells vs control cells. Results represent the mean \pm SD of quadruplicates. ($\star p < 0.01$, $\star\star p < 0.001$)

定志丸 1000 μ g/ml과 시스플라틴 25 μ g/ml을 각각, 그리고 병용 처리한 후 12시간 경과한 다음, 세포의 DNA 분절현상을 관찰하였다. 각각 단독 처리한 실험군에서는 유의한 변화를 관찰할 수 없었지만 병용 처리한 실험군에서는 DNA 분절이 나타 하였다.(Fig. 2D)

2. 定志丸과 시스플라틴이 caspase protease 활성화에 미치는 영향

세포고사기전의 전형적인 특징의 하나인 caspase family cysteine proteases 의 관련 여부^{12,13)}를 알아보고

자 caspase 효소의 활성을 조사하였다. 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 실험군에서 caspase-3 protease는 12시간 후에 활성이 증가하기 시작하여 24시간 후에는 대조군에 비하여 약 5배의 증가를 보였으나 caspase-8와 caspase-9 protease는 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 또한 세포내 caspase-3 protease 기질의 하나인 PARP도 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 후에 12시간 후부터 116 kDa의 온전한 형태의 단백질이 86kDa로 분절되어 24시간까지 지속적으로 분절이 증가함을 확인하였다(Fig. 4).

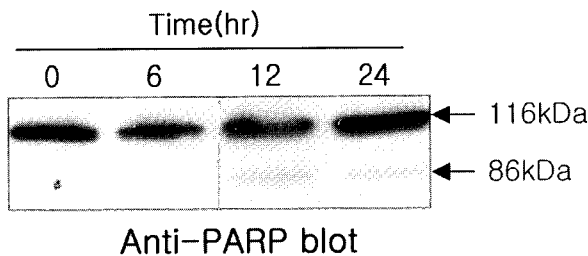


Fig. 4. The Combination with *JJH* and Cisplatin Cleaved the PARP, an Intercellular Biosubstrate of Caspase-3 Protease, in A172 Cells. Cells were co-treated with *JJH* and cisplatin for various time periods. The cleavage of PARP was detected by Western blot analysis with anti-PARP antibody.

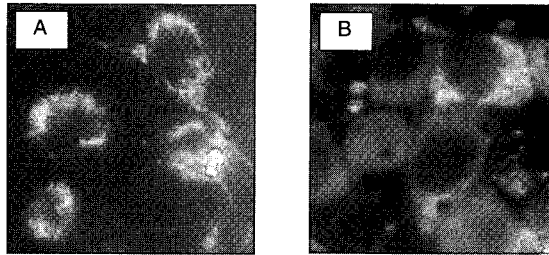


Fig. 5. The Combination with *JJH* and Cisplatin Induced the Changes of the Mitochondria Membrane Potential Transition(MPT). Cells were treated with (B) or without the combination (A), for 12 hr. Then, cells were stained with JC-1 for 30 min and visualized under inverted fluorescent microscope.

3. 定志丸과 시스플라틴이 mitochondria의 막전위 변화에 미치는 영향

定志丸과 시스플라틴에 의해 유도된 A172 세포의 세포고사에서 mitochondria의 막전위 변화를 조사하기 위하여 JC-1으로 세포를 염색한 후 형광현미경으로 mitochondria의 membrane permeability transition (MPT)를 측정하였다.

정상 세포의 경우 mitochondria는 세포질에 주로 분포되어 있으며, JC-1의 형광이 주황색을 띄고 있지만(Fig. 5A), 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 12시간 후 실험군 세포의 mitochondria가 핵과 세포질에 균일하게 분포하며 녹색의 형광으로 변화하였다(Fig. 5B). 이상의 결과는 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리에 의해 mitochondria의 기능 이상이 초래됨을 의미한다.

4. 定志丸과 시스플라틴이 p53, p21 및 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향

定志丸과 시스플라틴에 의한 A172 세포의 세포고사에서 세포고사와 관련된 p53, p21 및 Bcl-2 단백질의 발현 변화를 알아보기 위하여 western blotting을 실시하였다(Fig. 6). 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 후 다양한 시간 간격으로 p53의 활성을 조사한 결과, 6시간 후부터 시간 의존적으로 증가하는 것을 관찰하였으며, p53의 기질 중 하나이고 세포주기와 관련이 있는 p21 단백질의 발현은 12시간 후부터 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 6A). 또한 세포고사

억제 기능을 하는 Bcl-2 단백질은 시간 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B).

5. 定志丸과 시스플라틴에 의한 A172 세포내 단백질 발현 변화

定志丸과 시스플라틴에 의한 A172 세포의 세포고사에서 신호전달 단백질에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2-D electrophoresis 실험을 통하여 단백질 발현의 변화를 관찰하였다. 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군을 포집, 파쇄하여 그 추출물로 2-D electrophoresis를 시행하였다. 단백질 spot은 silver staining으로 가시화 하였다. 세포에서 추출한 단백질 200 μ g을 2-D gel을 통해 분리하여 나타난 spot을 대조군(Fig. 7A)과 비교한 결과, 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 실험군에서 18개 부분의 유의한 변화를 나타내었다(Fig. 7B).

考 察

癌이란 惡性腫瘍을 총칭하며, 정상적인 성장과는 달리 독립적으로 자라서 주위 조직을 침윤하고 다른 조직으로 전이되는 조직의 과잉적 성장으로서 아직 그 발생원인과 기전이 명확히 밝혀져 있지 않았다⁶⁾. 神經膠芽細胞腫은 大腦에서 자주 발생하는 癌 중의 하나로 60% 정도가 악성으로 알려져 있고, 수술이나 수술 후 방사선 치료를 주로 하고 있지만, 재발되면 외과적 수술이나 화학적 치료, 생물학적 처치 등

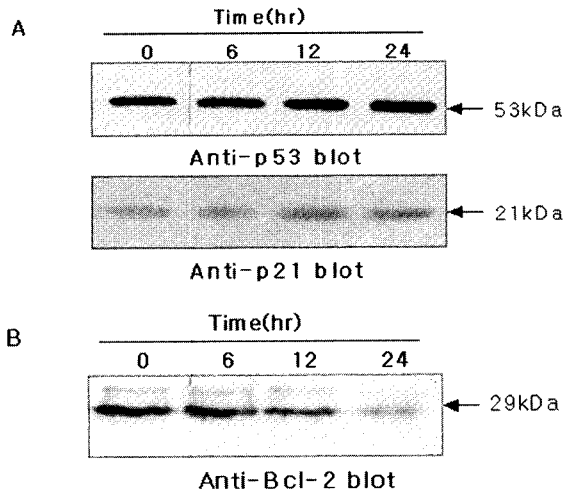


Fig. 6. Treatment of the combination with JJH and cisplatin increased the accumulation of p53, p21 whereas decreased the Bcl-2 expression. Cells were co-treated with JJH and cisplatin for different time periods. Lysates from cells were used to measure the expression of p53, p21 and Bcl-2 by Western blot analysis.

으로 치료 방법이 한정되어 있어서 재발되는 경우 거의 치명적이다¹⁵⁾.

韓醫學에서 癌의 發生原因에 대해 《內經》¹⁶⁾에서는 虛邪, 憂怒, 飲食不節, 起居不常, 用力過度, 邪氣, 寒熱相搏 등으로 보았고, 《諸病源候論》에서는 臟腑의 氣가 虛弱하거나 循環이 不利하여 發生한다고 설명하였으며, 《景岳全書》¹⁸⁾에서는 風寒 등의 外感之邪가 人體를 侵襲하여 鬱結되면 積이 發生한다고 하였다.

醫家들의 說을 종합해보면 癌의 發生 原因으로 外感六淫, 內傷七情, 飲食不節 및 邪氣 등으로 정리할 수 있으며, 이들이 人體의 正氣虛와 복합적으로 작용한다고 볼 수 있다. 이 중에서 특히 正氣의 虛弱은 疾病 發生의 關鍵이 되는 것으로 外在環境의 各種 發病因子가 人體를 侵犯하는 것은 단지 發病의 조건이며, 人體의 體質狀態와 臟腑組織機能의 虛弱 程度 및 疾病에 대한 防禦, 鬭爭, 恢復力의 強弱은 疾病 發生의 關鍵이 되는데 《內經》¹⁶⁾에서는 이를 “正氣在內 邪不可干”, “邪氣在湊 其氣必虛”라고 하여 그 중요성을 강조하였다. 그러므로 韓醫學에서 癌이란 外感六淫, 七情內傷, 飲食不節, 過勞 및 邪氣 등에 의해 個體의 臟腑機能과 氣血이 失調되어 氣滯血瘀,

痰結濕聚, 熱毒蘊結, 正氣虛弱, 經絡瘀阻 등의 病理 變化가 나타나고 이런 變化가 單獨 혹은 相互 錯雜하는 만성적인 질환으로 이해할 수 있다¹⁹⁾.

定志丸은 孫²¹⁾의 《千金要方》에 定志丸에 대해 “心氣不足 五臟不足 甚者 憂愁悲傷不樂 忽忽善忘 朝瘥暮劇 暮瘥朝劇 狂眩者方”이라고 처음 수록되어 있다. 定志丸은 人蔘, 茯苓, 石菖蒲, 遠志의 네 가지 藥物로 구성되어 있으며, 人蔘은 甘微苦, 微溫無毒하여 大補元氣, 安神益智, 補脾益肺, 生津止渴의 效能이 있고, 茯苓은 甘淡, 平無毒하여 寧心安神, 利水滲濕, 健脾補中시킨다. 遠志는 苦辛, 溫無毒하여 安神益智, 祛痰利竅, 消散癰腫하는 效能이 있으며, 石菖蒲는 辛, 溫하여 化濕開胃, 開竅豁痰, 寧神益智의 效能이 있다²⁰⁾. 따라서 本方은 補益心氣, 安神定志의 效能으로 心氣虛로 인한 忽忽善忘, 神昏不安, 驚悸恐怯, 夢寐不善 등의 病症에 活用되고 있다.

定志丸에 대한 崔¹⁰⁾의 研究에서는 老化 白鼠의 腦組織中 hippocampus와 hypothalamus에서 noradrenaline을 증가시키고, cerebellum에서 serotonin을 유의성 있게 증가시키며, 산소 자유기와 methylmercury에 노출된 신경세포의 생존율을 유의

성있게 증가시킨다고 보고함으로써 정상 腦組織 및 神經細胞에 대해 定志丸이 미치는 영향을 밝혀 놓았다. 그러나, 定志丸의 腦腫瘍과 같은 비정상 뇌세포에 대한 研究는 찾아볼 수 없었다.

세포고사(apoptosis)는 세포괴사(nercrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특징을 동반하는 생리과정으로서 세포 내부의 정교한 신호전달 과정을 거쳐서 세포질 응축, chromatin의 변연부 응축, mitochondria의 막전위 변화 및 DNA의 분절 등이 수반된다^{21,22)}. 이것은 細胞나 臟器의 항상성을 유지하는데 중요한 機轉²³⁾으로 인식되고 있으며, 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다²⁴⁾. 또한, 세포고사 기전의 異常은 癌, 自家免疫疾患, 退行性 疾患 및 HIV 등의 病理에 중요한 역할을 수행한다고 보고 되었다²⁵⁾.

시스플라틴은 광범위하게 사용되는 항암제로 고환 종양, 난소암 등에 사용되고 있으며²⁶⁾, 식이요법 등 다른 치료법과 병행하여 다양한 癌의 치료에 사용되고 있다²⁷⁾. 시스플라틴은 일반적으로 세포고사 기전에 의해 세포주기의 G2 단계를 억제하는 것으로 알려져 있다. 분자생물학적인 접근에서 시스플라틴의 抗癌 效果는 일반적으로 DNA와 단백질, 체내 효소들과 결합하여 반응함으로써 나타난다고 보고되고 있으며, 細胞毒性은 바로 단백질과 결합하여 일어난다고 알려져 있다^{28,29)}.

이에 著者는 定志丸 抽出液과 시스플라틴을 병용 처리하여 抗癌治療의 上升效果에 대한 研究를 실시하였으며, 神經膠芽細胞腫 A172 세포에 대한 생존율 변화와 caspase의 활성화 및 관련 단백질의 발현 양상을 실험적으로 관찰함으로써 癌細胞에 대한 細胞毒性의 作用機轉을 밝히고자 하였다.

먼저 본 研究에서 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리에 의한 세포독성의 상승효과를 알아보기 위하여 神經膠芽細胞腫 A172 세포에서 定志丸과 시스플라틴을 병용 처리한 후 세포 생존율을 MTT 방법으로 측정한 결과, 농도 의존적으로 세포 생존율의 저하를 나타내었다(Fig. 1). 이러한 세포독성이 세포고사 현상에서 기인한 것인지를 Hoechst staining 방법으로

확인한 결과, DNA 분절 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

定志丸과 시스플라틴에 의한 細胞毒性이 세포고사 현상임을 확인하였기에 세포고사 作用機轉에 대한 研究를 실시하였다. 먼저 caspase family cysteine protease의 활성화 여부를 조사한 결과 caspase-3 protease만이 활성이 증가됨을 확인하였다. Caspase는 protease로서 지금까지 14종류가 알려져 있으며, 이 중 caspase-3 protease의 역할에 대하여 많은 研究가 진행되고 있다. caspase-3 protease가 활성화되면 poly ADP-ribose polymerase(PARP), lamin 및 다른 caspases 등 여러 표적 단백질에 작용하여 기능적 활성화나 불활성화를 유도함으로써 細胞内の 여러 신호전달을 조절하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 본 실험에서 caspase-3 protease의 initiator caspase인 caspase-8, -9 protease 효소 활성의 증가를 확인할 수 없었는데 이러한 결과는 기존에 알려진 caspase protease 이외의 다른 上位 活性 調節因子가 존재할 가능성을 시사하고 있다. Caspase-8, -9 protease의 활성은 확인하지 못하였으나 caspase-3 protease의 활성화로 인한 PARP의 분절이 증가됨을 확인할 수 있었고(Fig. 4), 세포고사를 촉진하고 세포주기에 관여하는 p53과 p21 단백질의 발현이 증가하는 것을 觀察하였다(Fig. 6A). 또한 다른 癌細胞와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여한다고 알려진 Bcl-2의 발현이 감소하는 것을 觀察할 수 있었다(Fig. 6B).

定志丸과 시스플라틴이 A172 세포의 mitochondria의 기능에 미치는 影響을 알아보기 위하여 JC-1 染色法으로 觀察한 결과, 정상 세포의 오렌지색 형광(Fig. 5A)이 녹색 형광(Fig. 5B)으로 바뀌는 것을 확인하였으며, 이는 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리가 세포의 mitochondria 기능장애를 일으키는 것을 의미한다.

定志丸과 시스플라틴에 의해 발현되는 세포내 단백질을 분리, 확인하기 위하여 2-D gel electrophoresis를 실시하였다. 定志丸과 시스플라틴을 처리한 실험군에서 대조군에 비해 약 18개 부분

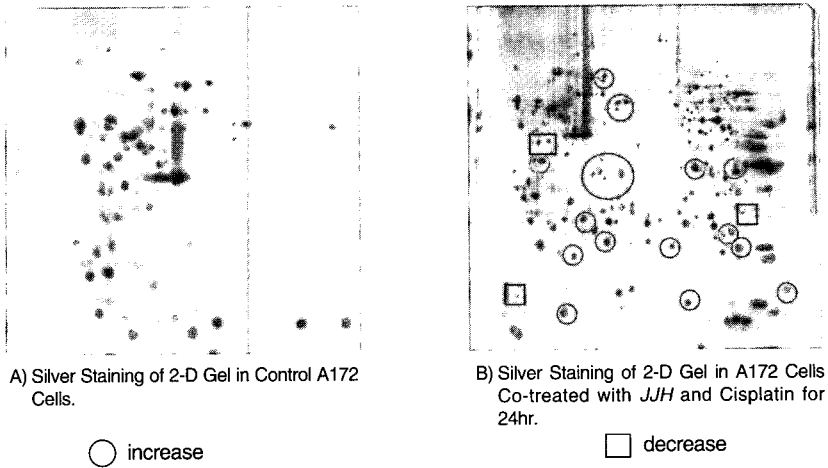


Fig. 7. JJH and Cisplatin Changed the Protein Expression in A172 Cells.

의 유의한 발현변화를 나타내었다(Fig. 7). 발현의 변화가 있는 각각의 spot은 MALD-TOF 등을 통한 아미노산 서열의 분석이 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리에 의해 유도된 神經膠芽細胞腫 A172 세포의 세포독성 상승효과는 DNA의 분절, caspase family cysteine protease의 활성화, mitochondria의 기능장애, p53과 p21 단백질의 발현증가, Bcl-2의 발현감소 등 전형적인 세포고사 기전에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한, 2-D를 통해 확인한 세포내 단백질의 변화는 추후 아미노산 서열 분석을 통해 그 機能에 대한 研究가 진행된다면 疾病의 診斷, 豫防 및 治療에 기여할 것으로 사료된다.

結 論

본 연구에서는 定志丸 抽出液과 항암제로 널리 사용되는 시스플라틴을 神經膠芽細胞腫 A172 세포에 병용 처리하여 세포생존율, DNA 분절, caspase family cysteine protease의 효소 활성화, mitochondria의 막전위 변화, p53, p21 및 Bcl-2 단백질의 발현, 2-D를 통한 세포내 단백질의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리는 神經膠芽細胞腫 A172 세포에서 세포독성의 상승 효과를 나타내었다.

2. 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리에 의한 세포독성은 DNA 분절현상을 나타내었다.

3. 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리는 caspase-3 protease의 활성을 현저히 증가시켰으며, 표적인자인 PARP를 분해시켰다.

4. 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리는 세포내 mitochondria의 막전위 변화를 유발하였다.

5. 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리는 Bcl-2 단백질의 발현을 감소시켰으며, p53과 p21 단백질의 발현을 증가시켰다.

6. 定志丸과 시스플라틴의 병용 처리에 의한 세포내 단백질은 18개 부분에서 유의한 변화를 나타내었다. 이상의 結果로 보아 定志丸은 시스플라틴의 병용 처리에 의해 세포고사 신호전달계와 단백질의 발현 및 mitochondria의 기능에 영향을 미쳐 癌細胞의 세포고사를 증가시키는 효과가 있으므로, 향후 定志丸이 神經膠芽細胞腫의 化學的 抗癌療法에 활용될 수 있도록 많은 연구와 임상 적용이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Burton EC, Prados MD. Malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol.* 2000 Dec;1(5):459~468.
2. Reichert M, Steinbach JP, Supra P, Weller M. Modulation of growth and radiochemosensitivity of human malignant glioma cells by acidosis. *Cancer.* 2002 Sep;95(5):1113~1119.
3. Bredel M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res Rev.* 2001 Apr;35(2):161~204.
4. Warmann S, Hunger M, Teichmann B, Flemming P, Gratz KF, Fuchs J. The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma. *Cancer.* 2002 Oct;95(8):1795~1801.
5. Duan L, Aoyagi M, Tamaki M, Nakagawa K, Nagashima G, Nagasaka Y, Ohno K, Yamamoto K, Hirakawa K. Sensitization of human malignant glioma cell lines to tumor necrosis factor-induced apoptosis by cisplatin. *J Neurooncol.* 2001 Mar;52(1):23~36.
6. Shimura T, Teramoto A, Yoshida D, Adachi K. Apoptosis in malignant brain tumor and application of chemotherapy. *J Nippon Med Sch.* 2001 Feb;68(1):74~77.
7. 孫思邈. 千金要方. 서울:杏林出版社. 1976:549~550.
8. 朴晉永. 定志丸煎湯液이 實驗動物의 心血管系에 미치는 影響. 익산:圓光大學校 大學院. 1994.
9. 河在原. 定志丸이 老化에 미치는 影響. 대전:大田大學校 大學院. 1996.
10. 崔龍坡. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究. 익산:圓光大學校 大學院. 1996.
11. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 1997 Dec;272(49):31138~31148.
12. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996 Oct;87(2):171.
13. Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature.* 1996 Apr;380(6576):723~726.
14. 서울大學校 醫科大學. 腫瘍學. 서울:서울大學校出版部. 1989:1, 95~96, 126.
15. Gaya A, Rees J, Greenstein A, Stebbing J. The use of temozolomide in recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat Rev.* 2002 Apr;28(2):115~120.
16. 王冰. 黃帝內經. 서울:高文社. 1977:(素問)91, 166, 229, 326, (靈樞)76, 88.
17. 巢元方. 諸病源候論. 北京:人民衛生出版社. 1982:105~109.
18. 張介賓. 景岳全書. 서울:大星文化社. 1988:479.
19. 文濬典 등. 東醫病理學. 서울:高文社. 1990:78~90.
20. 康秉秀 등. 本草學. 서울:永林社. 1999:302~304, 496~497, 523~524, 531~533.
21. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251~306.
22. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982;17(2):229~259.
23. Fadeel B, Henter JI, Orrenius S. Apoptosis required for maintenance of homeostasis: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by too little cell death. *Lakartidningen.* 2000 Mar;97(12):1395~1400, 1402.
24. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS,

- Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994 Aug;345(1313):265~268.
25. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell.* 1991;65:1097~1098.
26. Sandler A. Irinotecan plus cisplatin in small-cell lung cancer. *Oncology(Huntingt).* 2002 Sep;16:39~43.
27. Dunton CJ. Management of treatment-related toxicity in advanced ovarian cancer. *Oncologist.* 2002, July;5:11~19.
28. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs.* 2000;59:9~17.
29. Bose RN. Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. *Mini Rev Med Chem.* 2002 Apr;2(2):103~111.
30. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci.* 1998 May;54(5):427~445.