

# 인체 폐암세포의 증식 및 prostaglandin E2 생성에 미치는 청조구폐탕의 영향에 관한 연구

임재형 · 김 훈<sup>1</sup> · 변미권 · 감철우 · 박동일\*

동의대학교 한의학과 폐계내과학교실, 1: 의사학교실

## Antiproliferative Effect of Chungjogupae-tang Treatment was Associated with the Inhibition of Prostaglandin E2 Release in Human Lung Carcinoma Cells

Jae Hyung Im, Hoon Kim<sup>1</sup>, Mi Kyeon Byun, Chul Woo Kam, Dong Il Park\*

Department of Internal Medicine, Dongeui University College of Oriental Medicine,  
1: Department of Medical History, Dongeui University College of Oriental Medicine

The effect of water extract of Chungjogupae-tang (CJGPT) was investigated on the growth of human lung carcinoma A549 cells. Methods: MTT assay and fluorescent microscope performed to compare and examine the efficacy of CJGPT treatment on the cytostaticity of lung cancer cells in proportion to time and doses, and DAPI staining and Western blot analysis were used to examine their effect on apoptosis. In addition, the quantitative RT-PCR was used to examine lung cancer cells growth, and Prostaglandin E2 activity were measured. Results: Exposure of A549 cells to CJGPT resulted in the growth inhibition and apoptosis in a dose-dependent manner as measured by MTT assay and fluorescent microscope. The antiproliferative effect by CJGPT treatment in A549 cells was associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. CJGPT treatment resulted in an up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in a p53-independent fashion. We found that CJGPT treatment decreased the levels of cyclooxygenase (COX)-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression without significant changes in the expression of COX-1, which was correlated with a decrease in prostaglandin E2 (PGE2) synthesis. Conclusion: These findings suggested that CJGPT-induced inhibition of human lung carcinoma A549 cell growth was connected with the induction of apoptotic cell death and the results provided important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of CJGPT.

Key words : Chungjogupae-tang(CJGPT), Lung carcinoma, Prostaglandin E2, MTT, DAPI

### 서 론

우리나라에서는 폐암에 의한 사망률이 10만명당 25.0명으로 암 중 가장 높은 사망률을 보여주고 있으며 앞으로도 꾸준한 상승이 예상된다<sup>1)</sup>. 폐암의 原因은 吸煙이 가장 많고 그 외 폐석면증, 전리방사선에의 노출, 니켈, 크롬 등의 중금속 오염 및 대기 오염 등과 관련이 있으며<sup>2)</sup>, 기침, 객담, 가벼운 흉통, 빈혈, 체중 감소, 혈담, 호흡곤란, 견갑골간 견인성동통, 늑간신경통, 호흡음

감소, 쇠약감, 체중감소 등의 증상을 가진다<sup>3)</sup>.

한의학에 폐암이라는 병명은 없지만 폐암과 유사한 내용에 대한 기록은 많이 찾아 볼 수 있다. 『難經』에서는 “肺之積, 名曰息賁, 在右脇下 覆大如杯, 久不已, 令人洒淅寒熱, 喘咳, 發肺壅” 이라 하였다<sup>4)</sup>. 『仲景』에서는 “振寒發熱, 寸脈滑數, 咳嗽膿血, 其人飲食起居如故, 此爲癰腫, 膿在胸中, 爲肺癰, 其脈緊數, 爲膿未成. 緊去但數, 爲膿已成” 이라 하였다<sup>5)</sup>. 이러한 증상들은 폐암의 증상과 매우 유사하다. 金元시대 이동원의 肺積을 치료하는 息賁丸과 兩宋시대 진무택의 肺之積을 치료하는 咳嗽方의 적응증은 모두 폐암의 증상과 유사하다. 폐암은 이와 같이 肺積, 肺壅, 肺膿 등의 범주로 이해되고 있다. 청조구폐탕은 이러한 범주

\* 교신저자 : 박동일, 부산시 진구 양정2동 산45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : dipark@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8650

· 접수 : 2006/05/01 · 수정 : 2006/07/05 · 채택 : 2006/08/01

에 다용되는 처방중 하나로, 淸대에 유가언이 창방한 것으로 咳嗽, 肺壅 등 폐의 宣發肅降機能의 失調로 熱毒이 쌓이고 津液이 마르며, 肺氣가 虛해진 것을 치료하는 처방이다<sup>6)</sup>. 따라서 청조구페탕이 항암 치료에 도움이 될 것이라 사려 된다.

폐암은 처음 시작될 때는 대개 증상은 없으므로 때때로 다른 문제로 의사를 찾아왔다가 흉부사진에서 폐암이 진단되기도 하지만 폐암의 진단은 암의 크기가 커지면서 증상이 시작되고 대개 이때 진단된다. 수술요법 이외 화학요법 및 항암요법 등이 있으나, 아직까지 완치방법은 없으며, 폐암환자의 전체적인 5년 생존율은 5~10%이다. 폐암은 진단이 되면 치료가 어려워 환자들은 더 효과적인 치료법과 여러 치료들에 있어서 생기는 부작용을 줄이고 환자들의 삶의 질을 높여주는 방법에 대해서 연구하고 있다. 따라서 한방치료는 폐암치료의 중요한 방법중 하나로 인식되고 있다. 이에 저자는 본 연구에서 청조구페탕에 의한 항암작용 기전을 밝히기 위한 목적으로 인체 폐암 세포주를 대상으로 청조구페탕 열수 추출물에 의한 암세포 증식 억제와 연관된 몇 가지 관련 유전자들의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 세포배양

본 실험에 사용된 청조구페탕(Table 1)은 동의대학교 부속 한방병원에서 제공 받았으며, 100 g을 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 μm의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. 준비된 청조구페탕 수용액 추출물(water extract of Chungjogupae-tang, CJGPT)은 3차 증류수에 용해하여 멸균과 여과 과정을 거쳐 배지에 적정 농도로 희석하여 처리하였다. A549 인체 폐암 세포는 한국생명공학연구원(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양은 선행방법에 준하여 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다<sup>7)</sup>. 배지는 매 48시간마다 교환해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정수의 세포를 분주하여 재배양하였다.

### 2. MTT assay (tetrazolium bromide salt)에 의한 세포 성장억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 인체 폐암세포를 1 x 10<sup>5</sup>개/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 청조구페탕 추출물을 배지에 희석하여 각 well 당 1 ~ 4 mg/ml의 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고

3시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 μl씩 옮겨서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

Table 1. Composition of Chungjogupae-tang used in the present study.

한약명	생약명(Herb name)	용량(단위: g)
소엽	<i>Perilla frutescens Britt</i>	12
맥문동	<i>Liriope platyphylla</i>	6
석고	<i>Gypsum fibrosum</i>	2.8
인삼	<i>Panax ginseng</i>	2.8
호마인	<i>Sesamum indicum L.</i>	2.8
아교	<i>Colla corii asini</i>	2.8
행인	<i>Armeniacae semen</i>	2.8
비파엽	<i>Eriobotryae folium</i>	1
감초	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	4
Total amount		37

### 3. 위상차 현미경을 이용한 세포의 형태 관찰

세포 배양용 100 mm petri dish에 세포를 6 x 10<sup>5</sup> 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 청조구페탕 추출물을 1 ~ 4 mg/ml의 농도로 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 사진을 촬영하였다.

### 4. DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

청조구페탕 추출물 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발 여부 확인을 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 phosphate-buffered saline (PBS)를 1 : 9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 500 μl 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 1,000 rpm으로 5분간 원심 분리 후 상층액을 제거하고 PBS 200 μl 를 넣어서 충분히 섞은 후, slide glass 위에 80 μl 정도 떨어뜨려 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. PBS로 2 ~ 3회 washing하고 PBS가 다 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 washing하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 적당량을 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 상온에서 염색시켰다. 15분 정도 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 인체 폐

암 세포의 핵의 형태 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

5. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 청조구페탕 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 (5분간 3번)정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척(10분간 4번)하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

6. RT-PCR(Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction)에 의한 mRNA 발현의 분석

상기와 동일한 조건에서 준비된 암세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 분석하고자 하는 유전자에 해당되는 각각의 primer (Table 2), DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel은 ethidium bromide (EtBr)을 이용하여 염색한 후 ultra violet(UV) 하에서

확인하고 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

7. Prostaglandin E2의 측정

Prostaglandin E2(PGE2)의 생성에 미치는 청조구페탕 추출물의 영향을 측정하기 위하여 사용된 enzyme immunoassay (EIA) kit는 Amersham Corp.에서 구입하였다. 먼저 준비된 암세포를 96-well plate에 well 당 160 µl의 배지에 10<sup>4</sup> cell/well 정도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 청조구페탕 추출물을 농도별로 배지에 희석하여 처리하였다. 이때 마지막 배지의 양을 모두 180 µl로 통일시켰다. 48시간 후 배지에 2.5%의 dodecyltrimethylammonium bromide가 함유된 buffer를 20 µl 첨가하여 총 배지의 양이 200 µl 되게 한 후 lysis가 잘 일어나도록 pipetting을 수회 실시하였다. 상온에 약 10분간 incubation 한 후 Trypan blue를 이용하여 암세포의 수를 계수하였다. 약 50 µl의 lysate를 취하여 kit에 준한 protocol에 따라 EIA를 실시한 후 450 nm의 파장에서 얻어진 값을 기준으로 PGE2의 양을 추정하였다.

Table 2. Gene-specific primers for RT-PCR in the present study

Gene name	Sequence
p53	Sence 5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence 5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence 5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence 5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
COX-1	Sence 5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CIT-3'
	Antisence 5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence 5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence 5'-AGA-TCA-TCT-AGA-CTG-CCT-GAG-TAT-CIT-3'
iNOS	Sence 5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
	Antisence 5'-CAC-AGA-GCT-GAG-GGT-ACA-3'
hTERT	Sence 5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CIT-CAA-CC-3'
	Antisence 5'-GTT-CIT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
TEP-1	Sence 5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence 5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CIT-TCT-ACG-C-3'
hTR	Sence 5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence 5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence 5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3'
	Antisence 5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'
Sp-1	Sence 5'-ACA-GGT-GAG-CIT-GAC-CTC-AC-3'
	Antisence 5'-GTT-GGT-TTG-CAC-CTG-GAT-TG-3'
GAPDH	Sence 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence 5'-AGC-CIT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

결 과

1. 암세포의 증식에 미치는 청조구페탕 추출물의 영향

A549 인체 폐암세포의 증식에 미치는 청조구페탕 추출물 (CJGPT)의 영향을 알아보기 위해 이를 48시간동안 농도별로 처리한 후 MTT assay를 이용하여 조사하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 청조구페탕 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 폐암세포의 증식이 강하게 억제됨을 알 수 있었다. 특히 3 mg/ml의 청조구페탕 추출물을 처리하였을 경우 60% 이상의 증식억제 효과가 있었고, 4 mg/ml의 농도에서는 약 80% 정도의 증식 억

제 효과가 나타났다. 이상의 결과들에서 청조구폐탕 추출물 1-5 mg/ml 처리 범위 내에서 배양된 암세포는 청조구폐탕 추출물의 처리농도 의존적으로 정상적인 암세포 증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

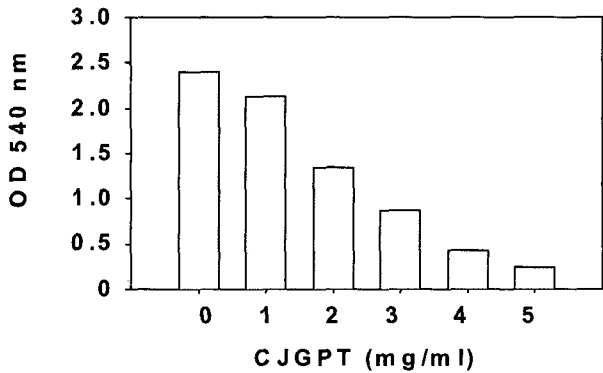


Fig. 1. Growth inhibition of human lung carcinoma A549 cells after treatment with water extract of Chungjogupae-tang (CJGPT). Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells per 60-mm plate, and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of CJGPT for 48 h. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Results are expressed as the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

2. 청조구폐탕 추출물 처리에 의한 암세포의 형태변화

Fig. 1의 조건에서 배양된 암세포의 전체적인 형태변화를 알아보기 위하여 청조구폐탕 추출물을 48시간동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 청조구폐탕 추출물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변화가 관찰되었다. 특히 청조구폐탕 추출물의 농도가 증가할수록 암세포의 밀도가 감소하면서 길고 분지를 형성하는 듯한 dendrite-like한 구조로 바뀌었으며, 부착력을 상실하고 배지 위로 부유되는 경향성이 증가함을 알 수 있었다. 이는 인체 폐암세포에 청조구폐탕 추출물의 처리농도 의존적인 형태적 변화와 밀도의 감소는 청조구폐탕 추출물의 처리에 따른 증식억제와 부합되는 결과였다.

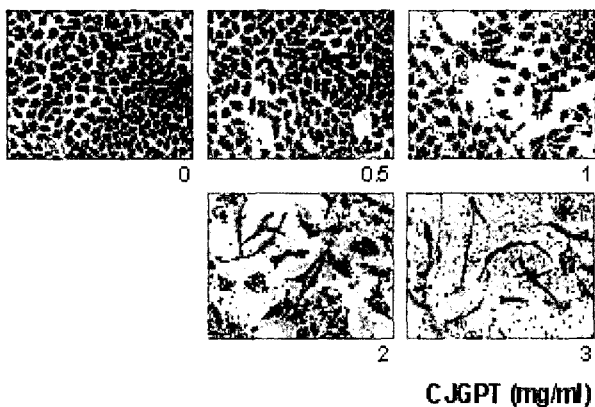


Fig. 2. Morphological changes of human lung carcinoma A549 cells after treatment with CJGPT. Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells per 60-mm plate, and incubated for 24 h. The cells were incubated with variable concentrations of CJGPT. After 48 h incubation cells were sampled and examined under light microscopy. Magnification, X200.

3. 청조구폐탕 추출물에 의한 암세포의 apoptosis 유발

A549 폐암세포에서 청조구폐탕 추출물의 처리에 의한 증식을 감소가 apoptosis의 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 청조구폐탕 추출물 처리 후 암세포 핵의 형태변화를 DAPI 염색을 통하여 비교 조사하였다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포의 경우 핵의 전체가 완전한 형태로 염색되는 양상을 보였으나 청조구폐탕 추출물의 농도가 증가할수록 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 염색질의 응축된 형태인 apoptotic body의 형성 정도가 증가되었다. 이는 청조구폐탕 추출물의 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 보여주는 결과이다.

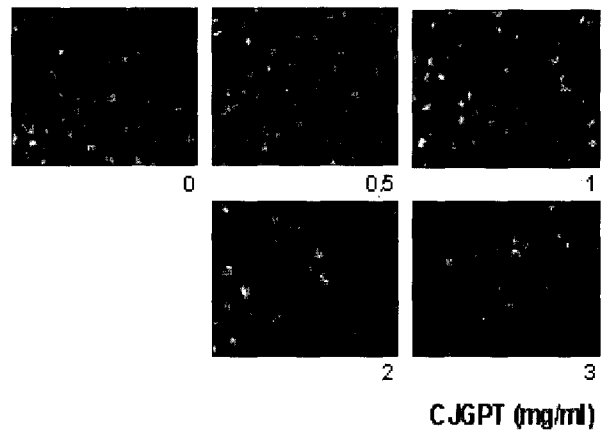


Fig. 3. Induction of apoptotic bodies of human lung carcinoma A549 cells after treatment with CJGPT. Cells were treated with CJGPT for 48 h, fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

4. p53 및 p21(WAF1/CIP1)의 발현에 미치는 청조구폐탕 추출물의 영향

다음은 청조구폐탕 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식 억제 현상이 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 전체적인 세포주기 진행 조절에 중요한 역할을 하는 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21(WAF1/CIP1)의 발현에 미치는 청조구폐탕 추출물의 영향을 조사하였다. Fig. 4A 및 B의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 유전자의 경우는 전사 수준에서는 큰 변화 없었으나, 번역 수준에서는 빠른 단백질 분해 현상을 관찰할 수 있었다. p21의 경우 저농도 청조구폐탕 추출물 처리군에서 이미 다량의 단백질 축적이 관찰되었으나, 처리 농도가 증가될수록 다소 감소되는 경향을 보여주었다. p21의 발현은 p53의 발현 증가에 의하여 조절될 수 있고 또한 p53 비의존적으로 발현이 조절될 수도 있으며, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절 인자란 점에서 청조구폐탕 추출물의 처리에 의하여 p53의 발현과 상관없이 p21 단백질의 축적 현상은 매우 흥미로운 결과라고 사료된다.

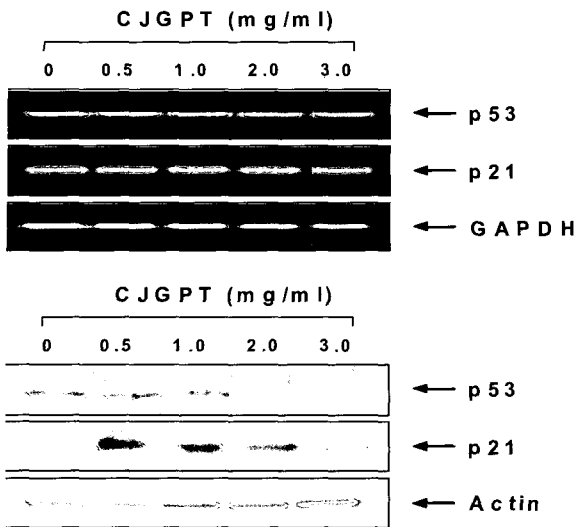


Fig. 4. Induction of Cdk inhibitor p21 expression by CJGPT in human lung carcinoma A549 cells. (A) After 48 h incubation with CJGPT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with p53 and p21 primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

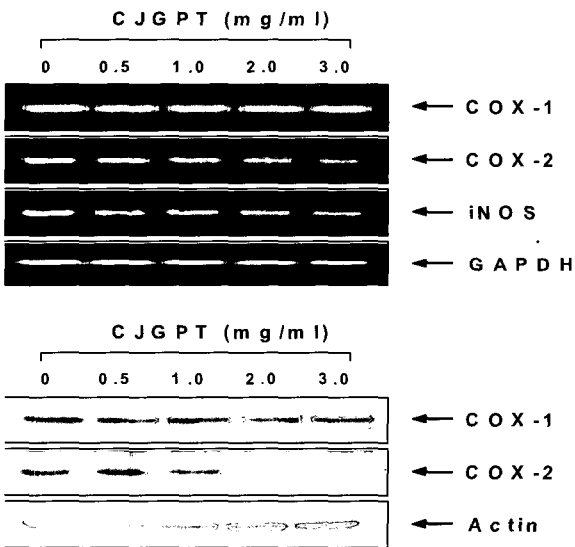


Fig. 5. Inhibition of COX-2 and iNOS expression by CJGPT in human lung carcinoma A549 cells. (A) After 48 h incubation with CJGPT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with COX-1, COX-2 and iNOS primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

5. COXs(cyclooxygenases)의 발현 및 PGE2의 생성에 미치는 청조구페탕 추출물의 영향

다음은 청조구페탕 추출물 처리에 의한 암세포의 증식 조절과, 염증성 질환이나 암화 개시 단계에서 중요한 역할을 하는

cyclooxygenases (COXs)의 발현 및 그들 산물에 해당되는 prostaglandin (PG) 생성 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현과의 상관성을 조사하였다. Fig. 5A의 결과에서 볼 수 있듯이 전사수준에서 COX-1의 발현에는 거의 변화가 없었으나, iNOS 및 COX-2의 경우 청조구페탕 추출물 처리 농도 의존적으로 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 번역수준에서도 Fig. 5B에서 보는 바와 같이 COX-1의 발현은 변화가 없었지만 COX-2의 발현은 청조구페탕 추출물의 처리 농도 증가에 따라 매우 유의적으로 감소되었다. 또한 COX-2에 의해 생성이 조절되는 prostaglandin E2 (PGE2)의 경우도 Fig. 6의 결과에서 나타난 바와 같이 청조구페탕 추출물 처리농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 청조구페탕 추출물 처리에 의한 암세포의 증식 억제에는 iNOS 및 COX-2의 선택적 발현 억제와 이로 인한 PGE2의 생성 저해 작용이 있는 것으로 생각된다.

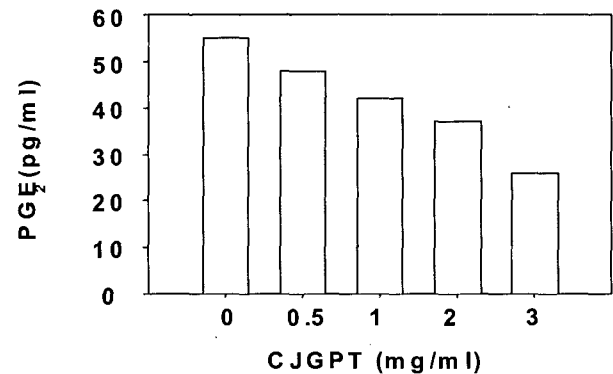


Fig. 6. Inhibition of PGE2 production in human lung carcinoma A549 cells after exposure to CJGPT. Cells were treated with the indicated concentrations of CJGPT for 48 h and collected. The PGE2 accumulation in the medium was determined by an EIA kit as described in materials and methods. Data represent the mean values of two independent experiments.

고찰

본 연구에서는 인체 폐암세포주 A549를 대상으로 청조구페탕의 항암작용 기전의 해석을 시도하였다. 본 연구에서 설정된 조건에서 청조구페탕 열수 추출물은 처리 농도 의존적으로 심한 형태적 변형과 핵 내 apoptotic body의 형성이 동반된 A549 세포의 증식을 억제하였다(Fig. 1 & 2). 암세포의 형태적 변형은 부착력 상실에 의한 배지 내로의 부유 및 신경세포로의 분화 가능성을 제시하여 주었으나 이에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 그러나 전형적인 apoptosis가 유발되었을 경우 endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 절단 현상에 수반된 염색질 응축 및 apoptotic body의 형성(Fig. 3)은 청조구페탕 추출물 처리에 의한 A549 암세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 직접적인 연관성이 있음을 의미하여 주는 결과이다.

암세포를 포함한 세포의 증식에서 세포주기 조절의 음성 조절자로 작용하는 Cdk inhibitors는 Cdk complex와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데<sup>8)</sup>, 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21(WAF1/CIP1)은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 세포주기 G1기뿐만 아니라 G2/M기의 진행을 억제하기

도 한다<sup>9,10</sup>. p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포주에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화된다고도 알려져 있으며<sup>8,11-13</sup>, 대부분의 DNA damaging agent에 의한 세포증식 억제에는 p21과 관련이 있음이 증명되어져왔다<sup>14,17</sup>. 따라서 본 실험에서는 청조구페탕 추출물 처리에 의한 인체 폐암 세포의 증식 억제 및 apoptosis 유발과정에서 종양 억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 4A의 결과에서와 같이 종양 억제 유전자인 p53의 경우 mRNA 발현은 청조구페탕 추출물 처리에 따라 큰 변화가 없었으나, 단백질 수준은 오히려 감소되는 경향성을 보여 주었다. 이는 청조구페탕 추출물 처리에 의하여 p53 단백질의 half-life의 단축이나 번역 수준에서의 modification에 의한 것으로 추정되어진다(Fig. 4B). 그러나 Cdk inhibitor인 p21의 경우는 mRNA 수준과는 관계없이 단백질의 발현 증가가 저농도 처리군에서부터 관찰되었다(Fig. 4). 이는 p21의 발현증가가 p53 비의존적인 경로를 통하고 있을 가능성과 전사 후 단계에서 더 조절 받을 수 있음을 의미하며, 이러한 p21의 발현 변화가 어느 정도 청조구페탕 추출물 처리에 의한 폐암 세포의 증식억제에 관여할 것으로 추정된다.

한편 염증성 질환을 포함한 다양한 생체 반응에서 PG은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다<sup>18-19</sup>. PG의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하고 있다. 그러나 COX-2는 다양한 성장인자, cytokines, 종양 촉진인자들 등에 의해 자극에 의한 유도성 isoform으로서 세포성장을 촉진하고 apoptosis를 억제하며 세포의 이동성 및 부착성을 강화시킴으로서 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다<sup>20,21</sup>. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 iNOS가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다<sup>22</sup>. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2의 선택적 억제제에 의한 angiogenesis와 종양형성 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다<sup>22,24</sup>. 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자 발현을 유도하는 nuclear factor kappa B (NF-κB)에 의하여 COX-2의 발현이 조절된다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다<sup>22,24</sup>. 또한 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다. 따라서 청조구페탕 추출물이 처리된 A549 폐암 세포의 증식 억제 및 apoptosis 유발에 이러한 유전자들이 관여하는지를 조사하여 보았다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 COX-1의 발현에 청조구페탕 추출물은 아무런 영향을 주지 못하였으나, COX-2의 발

현은 특히 단백질 수준에서 매우 유의적으로 감소함을 알 수 있었다. 그리고 iNOS의 전사 수준 역시 다소 감소되었음을 알 수 있었다. 청조구페탕 추출물에 의한 COX-2의 선택적 발현 억제 현상이 PGE2 생성 저하와 직접적인 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, Fig. 6에 나타난 바와 같이 청조구페탕 추출물 처리 농도의 증가에 따라 PGE2의 생성이 매우 유의적으로 감소하였음을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 청조구페탕 추출물 처리에 의한 A549 폐암 세포의 증식억제는 종양억제 유전자 p53 비의존적인 Cdk inhibitor p21 및 COX-2가 중요한 역할을 할 것으로 추정되어지며, 청조구페탕 추출물 처리에 의한 A549 인체 폐암 세포의 증식 억제는 apoptosis 유도와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 청조구페탕 추출물의 암세포 증식억제 기전을 이해할 수 있는 매우 중요한 결과로서 활용될 것이다.

## 결론

본 연구에서는 청조구페탕 추출물의 항암작용을 조사하기 위하여 인체 폐암세포 A549의 증식에 미치는 청조구페탕 열수 추출물의 영향을 조사하였다. 청조구페탕 추출물이 처리된 A549 세포는 청조구페탕 추출물 처리 농도 의존적으로 세포의 증식의 억제 및 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 알 수 있었으며, 이는 종양억제 유전자 p53 비의존적인 cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1)의 발현 증가와 연관성이 있었다. 청조구페탕 추출물은 COX-1의 발현에는 변화를 주지 않았으나, cyclooxygenase (COX)-2 발현의 경우 전사 및 번역 수준에서 청조구페탕 추출물의 처리 농도가 증가할수록 매우 유의적으로 감소되었다. 따라서 청조구페탕 추출물 처리에 따른 prostaglandin E2 (PGE2)의 생성 저하는 COX-2의 선택적 발현 억제에 의한 것임을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 청조구페탕 추출물은 세포 증식 및 apoptosis 조절에 관여하여 A549 인체 폐암세포의 증식을 억제하였음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. 통계청, 2001년 사망원인통계결과, p 11, 2002.
2. 박재갑, 인간생명과학, 서울대학교출판부, 서울, p 392, 394, 1994.
3. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室, 東醫肺系內科學 12版, 훈민회사, 서울, p 392, 2002.
4. 윤창열, 김용진, 신경연구집성, 주민출판사, 서울, pp 768-769, 2002.
5. 許 俊, 東醫寶鑑, 법민문화사, 서울, p 1433, 1996.
6. 吳 謙, 醫宗金鑑, 중국중의학출판사, 북경, p 500, 1995.
7. Park, D.I, Lee, J.H., Moon, S.K., Kim, C.H., Lee, Y.T., Cheong, J., Choi, B.T. and Choi, Y.H. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by aqueous extract from Platycodon grandiflorum in human lung carcinoma cells, Pharmacol. Res, 51:437-443, 2005.
8. Harper, J.W. Cyclin dependent kinase inhibitors, Cancer

- Surv. 29:91-107, 1997.
9. Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A. and Xiong, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, *Oncogene* 9:2261-2268, 1994.
  10. Taylor, W.R. and G.R. Stark, 2001 Regulation of the G2/M transition by p53, *Oncogene* 20:1803-1815, 2001.
  11. Datto, M.B., Yu, Y. and Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor  $\beta$  responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter, *J. Biol. Chem.* 270:28623-28628, 1995.
  12. Zeng, Y.X. and El-Deiry, W.S. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways, *Oncogene* 12:1557-1564, 1996.
  13. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y. and 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.
  14. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature* 366:701-704, 1993.
  15. Tchou, W.W., Rom, W.N. and Tchou-Wong, K.M. Novel form of p21 (WAF1/CIP1/SDI1) protein in phorbol ester-induced G2/M arrest, *J. Biol. Chem.* 271:29556-29560, 1996.
  16. Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F. and Reed, S.I. Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition, *Mol. Cell Biol.* 18:546-557, 1998.
  17. Musgrove, E.A., Davison, E.A. and Ormandy, C.J. Role of the CDK Inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: Insights from knockout mice, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 9:55-66, 2004.
  18. Giercksky, K.E. COX-2 inhibition and prevention of cancer, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 15:821-833, 2001.
  19. Thun, M.J., Henley, S.J. and Patrono, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues, *J. Natl. Cancer Inst.* 94:252-266, 2002.
  20. Vainio, H. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention?, *Int. J. Cancer* 94:613-614, 2001.
  21. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A. and Schmolli, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127:411-417, 2001.
  22. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K. and Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation, *Mutat. Res.* 480-481:243-268, 2001.
  23. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S. and Hori, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo, *Lab. Invest.* 79:1469-1477, 1999.
  24. Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer, *J. Clin. Invest.* 107:135-142, 2001.