

溫清飲의 조성 용량변화가 Hep3B 세포의 G1 arrest 기전에 미치는 영향

구인모 · 김길훤 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Change of Ratio of Onchungum Composition Induces Different G1 Arrest Mechanisms in Hep3B Cells

In Moo Goo, Gil When Kim, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Onchungum(OCE), a herbal formula, has been used for treatment of anemia, discharging blood and skin diseases. In the previous study, we investigated the anti-cancer effect of OCE by G1 arrest of the cell cycle in human hepatocarcinoma cells, Hep3B cells. In this study, it was examined that the difference of anti-proliferative mechanisms by change in the ratio of OCE composition (OCE I) in Hep3B cells. Treatment of OCE I exhibited a relatively strong anti-proliferative activity and caused various morphological changes such as membrane shrinkage and cell floating. In addition, OCE-I arrests the cell cycle at G1 phase, which was associated with the down-regulation of cyclin D1 and Cdk6 expressions. The G1 arrest was also associated with the induction of Cdk inhibitors p27 and p21. Moreover, both p21 and p27 were detected by immunoprecipitation with anti-Cdk4 and anti-Cdk2 antibodies in OCE I-treated cells but in case of OCE, p21 did not make any complexes with Cdk4 and Cdk2. These results suggest that the change in the ratio of OCE composition might induce different mechanisms in anti-cancer efficacy of OCE, which may confer characteristic principles in oriental medical formula.

Key words : OCE I, Hep3B cells, G1 arrest, p21, p27, characteristic principles in oriental medical formula

서 론

한의학은 방제의 조성에 있어서 약제나 용량의 가감(加減)의 방면에서 풍부한 경험을 바탕으로 환자의 증상에 따라 몇 가지의 약제를 더하고 제거하며, 용량을 달리하여 질병의 치료에 다양하게 응용한다¹⁾. 이러한 가감의 법칙은 매우 민감하고 약효에서도 큰 차이를 가져올 수 있고, 실험적으로도 동일한 처방의 가감에 의한 조성의 차이에 따라 혈관확장 효능과 기전의 차이가 보고 된 바 있다²⁾. 또한 같은 약물로 구성된 처방이라도 용량을 변화시킴으로서 처방의 효능과 주치에 있어서 차이를 가져올 수 있다.

溫清飲^{3,4)}은 崩漏가 멎지 않고 오색이 섞여 있으며 얼굴이

누렇고 배가 아프며 한열이 왕래하는 것을 치료하는데, 漢方治療大典⁵⁾에서 조성 비율을 달리하여 출혈로 인한 빈혈과 피부병의 치료에 처방하고 있다. 따라서 본 연구실에서 이미 밝힌바 있는 溫清飲의 항 간암효능과 기전⁶⁾을 바탕으로 溫清飲을 구성하는 조성약제의 용량의 변화에 의한 항 간암효능과 그 기전의 차이를 규명하고자 하였다. 이를 위하여 溫清飲의 간암세포 증식 억제 감수성이 뛰어난 Hep3B 세포주를 대상으로 세포주기조절 관련 유전자 및 단백질 발현 차이에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 溫清飲 추출물의 제조

본 실험에 사용된 溫清飲 (溫清飲 I; OCE I)은 漢方治療大典

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학

· E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2372

· 접수 : 2008/08/12 · 수정 : 2008/09/12 · 채택 : 2008/09/23

9)에 기재된 처방으로 그 조성 내용은 Table 1과 같다. 溫清飲 I의 4첩 분량인 130 g을 둥근 flask에 넣고 증류수 1,000 ml을 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조하여 12.91 g의 분말을 얻었다.

Table 1. 溫清飲 I의 조성

	溫清飲 I
當歸(<i>Angelicae gigantis Radix</i>)	6 g
熟地黃(<i>Rehmanniae Radix</i>)	6 g
川芎(<i>Cnidii Rhizoma</i>)	4.5 g
白芍藥(<i>Paeoniae Radix</i>)	4.5 g
黃芩(<i>Scutellariae Radix</i>)	4.5 g
黃連(<i>Coptidis Rhizoma</i>)	2 g
黃柏(<i>Phellodendri Cortex</i>)	2 g
梔子(<i>Gardeniae Fructus</i>)	3 g
합 계	32.5 g

2. 방법

1) 암세포배양 및 시료의 처리

본 연구에 사용된 Hep3B 인체 간암세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 溫清飲 I 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 적정농도로 희석한 후, 주사기용 필터유닛(pore size; 0.22 μm)을 사용하여 불순물을 걸러낸 다음 암세포에 처리하였다.

2) 세포의 형태 관찰

세포 배양용 6 well plate에 well 당 4 x 10⁴개/ml의 Hep3B 간암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 溫清飲 I 추출물을 적정 농도로 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도별 형태의 변화를 관찰하였다.

3) MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 well 당 4 x 10⁴개/ml의 Hep3B 간암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 溫清飲 추출물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 μl씩 분주하고 3시간동안 처리하였다. 3시간 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 100 μl씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

溫清飲이 세포주기에 미치는 영향은 Cycle TEST PLUS kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

정상 및 溫清飲 I 추출물이 함유된 배지에서 48시간 배양된 암세포들을 buffer solution을 이용하여 두세 번 씻어내고, Cycle TEST PLUS solution A 및 B를 상온에서 각각 10분씩 처리한 후

Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4°C에서 30분 동안 염색하였다. 이를 nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

5) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR 분석은 상기에서와 동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 TRIzol B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, ONE-STEP RT-PCR PreMix (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)를 이용하여 2 μg의 RNA에서 sscDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자 (Table 2)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 구조유전자 (housekeeping genes)인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 ultra violet (UV) 하에서 확인하였다.

Table 2. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
Cyclin D1	Sence	5'-TGG-ATG-CTG-GAG-GTC-TGC-GAG-GAA-3'
	Antisence	5'-GGC-TTC-GAT-CTG-CTC-CTG-GCA-GGC-3'
Cyclin E	Sence	5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3'
	Antisence	5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3'
Cdk2	Sence	5'-GCT-TTC-TGC-CAT-TCT-CAT-CG-3'
	Antisence	5'-GTC-CCC-AGA-GTC-CGA-AAG-AT-3'
Cdk4	Sence	5'-ACG-GGT-GTA-AGT-GCC-ATC-TG-3'
	Antisence	5'-TGG-TGT-CGG-TGC-CTA-TGG-GA-3'
Cdk6	Sence	5'-CGA-ATG-CGT-GGC-GGA-GAT-C-3'
	Antisence	5'-CCA-CTG-AGG-TTA-GAG-CCA-TC-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
p27	Sence	5'-AAG-CAC-TGC-CGG-GAT-ATG-GA-3'
	Antisence	5'-AAC-CCA-GCC-TGA-TTG-TCT-GAC-3'
PCNA	Sence	5'-GCT-GAC-ATG-GGA-CAC-TTA-3'
	Antisence	5'-CTC-AGG-TAC-AAA-CTT-GGT-G-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

6) Western blotting

SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시키고 10% skin milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4°C에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다.

특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 또한 특정 단백질들 사이의 결합 유무를 확인하기 위하여 정상 및 溫清飲 I 추출물이 처리된 배지에서 배양된 세포에서 각각 500 μg의 단백질을 준비하여 대상 항체를 이용하여 면

역침강 (immunoprecipitation)을 실시하였다. 1시간 이상 반응 후 형성된 immune-complex에 protein A-Sepharose beads (Sigma)를 다시 1시간 이상 반응시켜 침전시키고, 3회 이상 수세 하였으며 동량의 2X SDS sample buffer를 처리 후 가열하였다.

면역침강 된 단백질을 전기영동으로 분리하여 Western blot 분석을 실시하였다.

Table 3. Antibodies used in the present study

Antibody	Origin	Company
cyclin D1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
cyclin E	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk2	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk4	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk6	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
p21	mouse monoclonal	Calbiochem
p27	rabbit polyclonal	Calbiochem
PCNA	rabbit polyclonal	Calbiochem
Actin	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology

성 적

1. 溫淸飲 I이 세포증식에 미치는 영향

MTT assay 결과, 溫淸飲 I 처리는 농도 의존적으로 Hep3B 세포의 생존율을 감소시켜 200 µg/ml 처리군에서 40% 전후의 생존율을 보여주었다. 이는 이미 발표한 溫淸飲의 Hep3B 간암세포에서의 높은 감수성과 일치하는 결과이다.

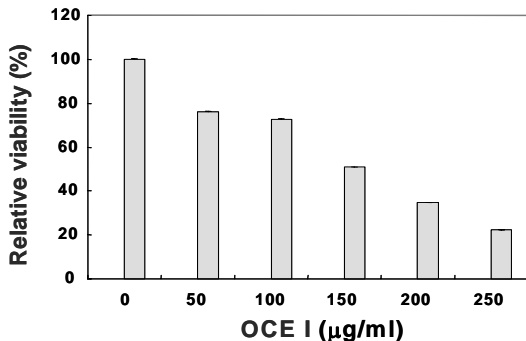


Fig. 1. Growth inhibition of human hepatoma Hep3B cells after treatment with Onchungeum I (OCE I). Cells were plated at 4×10^4 cells/ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of OCE I for 48 h. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Results are expressed as the means \pm S.E. of three independent experiments.

2. 溫淸飲 I의 세포형태에 미치는 영향

溫淸飲 I의 처리는 농도 의존적으로 Hep3B의 세포질을 응축시켰다. 또 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였다. 100 µg/ml 이상의 농도 처리군에서 많은 암세포들이 막 위축(membrane shrinking) 및 부착력의 상실에 의한 부유 현상이 관찰되었으며, 배양 dish에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다(Fig. 2).

3. 溫淸飲 I의 세포주기 분포에 미치는 영향

溫淸飲 I에 의한 Hep3B 간암세포의 세포주기 분포에 미치는 영향을 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 정상 배지에서 자란 Hep3B 세포의 G1, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 약 58%, 21% 및 20%로 나타났다(Table 4).

溫淸飲 I 처리는 농도 의존적으로 G1기에 속하는 세포의 빈도를 증가시켜 150 µg/ml 및 250 µg/ml 처리군에서 각각 66.92% 및 85.74%로 나타났다. 그러나 S 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 상대적으로 감소시켰다(Fig. 3, Table 4).

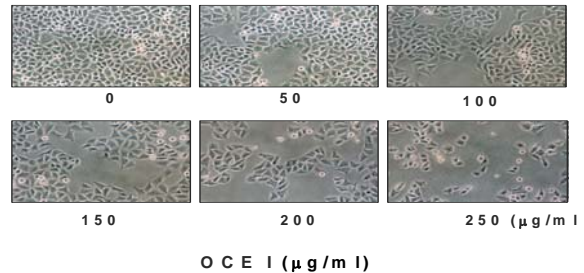


Fig. 2. Morphological changes in Hep3B human hepatoma cells following incubation with OCE I. Cells were plated at 4×10^4 cells/ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of OCE I. After 48 h incubation with OCE I, cell morphology was visualized by inverted microscopy (Magnification, $\times 200$).

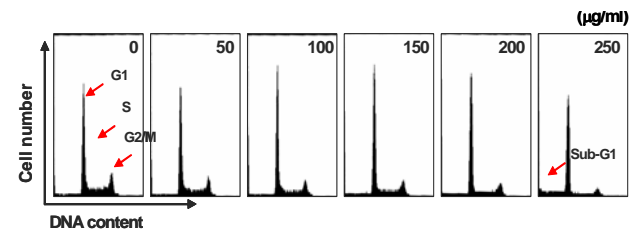


Fig. 3. DNA-fluorescence histogram of Hep3B cell nuclei after treatment with OCE I. Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of OCE I. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry.

Table 4. Fractions of each cell cycle phase of Hep3B human hepatoma cells cultured in the presence or absence of various concentration of OCE I for 48 h.

OCE I (µg/ml)	% of cell		
	G1	S	G2/M
OCE I			
0	57.92	21.04	20.68
50	61.59	20.20	18.21
100	65.71	17.26	17.03
150	66.92	16.30	16.78
200	72.80	11.90	15.30
250	85.74	5.43	8.83

4. 溫淸飲 I의 Cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 영향

溫淸飲 I의 처리에 의한 Hep3B 간암세포의 증식 억제효과가 세포주기 G1 arrest에 관여하므로 G1기 조절에 관계하는 cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 溫淸飲 I은 농도 의존적으로 cyclin D1의 발현을 전사 및 번역 수준에서 현저히 감소시켰다. 또 cyclin E의 발현을 증가시켰으며, 단백질 수준에서 Cdk6의 발현을 감소시키는 경향을 보여 주었으나 Cdk2와

Cdk4의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

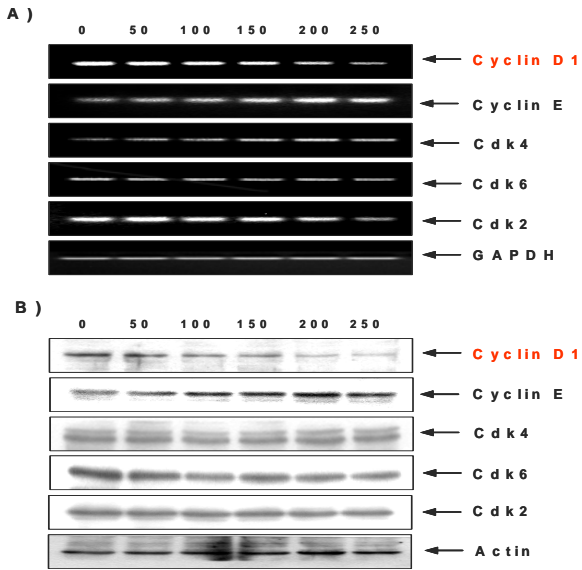


Fig. 4. Effects of OCE I treatment on the levels of cyclins and Cdk in Hep3B human hepatoma cells. (A) Cells were incubated with OCE I for 48 h and total RNAs were isolated. RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with OCE I for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

5. 溫清飲 I의 Cdk inhibitors 및 PCNA의 발현에 미치는 영향

溫清飲 I의 인체 간암세포의 G1 arrest 유발에 Cdk inhibitor 인 PCNA와 p21 및 p27의 관련 여부를 조사하였다. 溫清飲 I은 전서와 번역 수준에서 농도 의존적으로 p21 및 p27의 발현을 증가시켰으며, PCNA는 번역수준에서 다소 증가를 나타내었다. 특히 번역수준에서 p21의 발현이 크게 증가하였다.

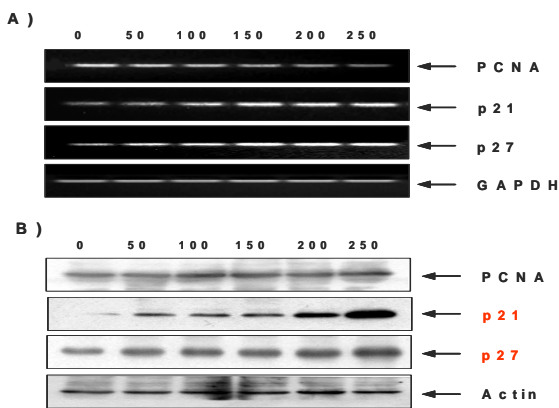


Fig. 5. Effects of OCE I on the levels of PCNA and Cdk inhibitors in Hep3B human hepatoma cells. (A) Cells were incubated with OCE I for 48 h and total RNAs were isolated. RT-PCR was performed using PCNA, p21 and p27 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with OCE I for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-PCNA, anti-p21 and anti-p27 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

6. 溫清飲 I의 Cdk 및 Cdk inhibitors와의 complex 형성에 미치는 영향

溫清飲 처리에 의해 발현이 증가된 p27 및 p21 단백질의 binding partner 단백질들과의 상호 작용을 조사하였다. 먼저 Hep3B 세포에서 분리된 동량의 단백질을 대상으로 PCNA, Cdk4 및 Cdk2 항체를 이용하여 면역침강(immunoprecipitation)을 실시한 후, p21 및 p27 항체를 이용한 Western blot 분석을 실시하였다. 溫清飲 I 추출물 처리에 의하여 증가된 p21은 Cdk4와 Cdk2 뿐만 아니라 PCNA와 complex를 형성하였다(Fig. 6). 또 p27도 Cdk4 및 Cdk2와의 complex 형성에 관여함을 알 수 있었다.

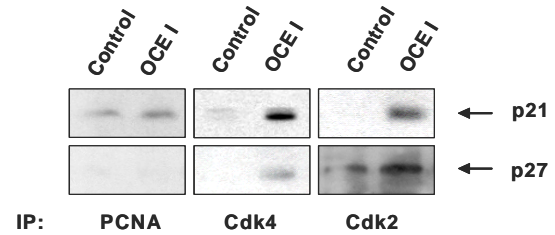


Fig. 6. Induction of association between Cdk inhibitors and Cdk or PCNA by OCE I treatment in Hep3B human hepatoma cells. After treatment with 200 μg/ml OCE I for 48 h, total cell lysates (500 μg) were immunoprecipitated with anti-PCNA, anti-Cdk2 or anti-Cdc2 antibody. The immunocomplexes were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose. p21 and p27 levels were detected with anti-p21 and anti-p27 antibodies and ECL detection.

고찰

溫清飲은 부녀자의崩漏가 멎지 않고 面色萎黃, 臍腹刺痛, 寒熱往來를 치료한다. 그러나 漢方治療大典⁵⁾에서는 東醫寶鑑에서의 약물용량과 다른 조성 비율로 출혈로 인한 빈혈과 피부병에 처방하는 등 치료 목표도 상이하게 기술되어 있다. 한의학은 처방의 조성 약제는 물론 약물 용량의 가감(加減)의 방면에서 풍부한 경험을 바탕으로 환자의 증상에 따라 몇 가지의 약제를 더하거나 제거하며, 용량을 달리하여 질병의 치료에 다양하게 응용한다¹⁾. 이러한 가감의 법칙은 매우 민감하고 약효에서도 큰 차이를 가져올 수 있으니 이에 대한 개관적이고 과학적 근거의 제시는 미약한 실정이다.

본 연구는 溫清飲의 清熱解毒하고 補血養肝하는 작용이 인체 간암세포에 대한 항암효능이 있음을 밝힌 연구결과⁶⁾에 기초하여 동일한 처방의 약물용량의 변화가 항암효과와 신호전달 기전에 어떤 영향을 미치는지를 검증하고자 하였다.

溫清飲 I은 Hep3B 세포에 대하여 높은 세포독성을 보였으며, 이는 구 등⁶⁾의 연구와 일치하는 세포 생존율 감소와 심한 형태적 변형을 나타내었다. Hep3B 세포는 hepatitis B virus (HBV)가 감염된 hepatocellular carcinoma (HCC)로 HCC 환자의 경우 특히 화학요법에 대한 치료율이나 생존율이 낮기 때문에 이에 관한 새로운 치료법이 요구되고 있는 상황에서^{7,8)} 溫清飲 I의 Hep3B 세포에서의 높은 감수성은 의미 있는 결과로 생각된다.

세포증식과 연관된 세포주기의 조절은 각 주기별 관여하는

다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 확인점 (checkpoint)의 각 시기에 요구되는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 Cdks의 연속적인 활성화와 불활성이 결정 된다^{9,10}. 세포주기 조절의 관점에서 암 세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의 될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과 발현에 의한 것으로 요약될 수 있다^{10,11}

溫清飲 I 추출물의 처리에 의한 Hep3B 세포에 대한 항암효능의 세포주기 특정 시기의 진행억제와의 연관성을 관찰한 결과, 溫清飲 I의 처리에 의한 Hep3B의 증식 억제는 세포주기 G1 arrest와 관련이 있음을 알 수 있었다. 이는 본 연구진이 이미 밝힌 溫清飲의 항암기전과 일치하였다⁶. 따라서 溫清飲 조성의 용량 가감이 세포주기 G1 arrest 기전에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰함으로써 한의학의 처방원리인 君臣佐使의 이론적 근거가 과학적으로 의의가 있는지를 확인하고자 하였다.

일반적으로 진핵세포에서 세포주기의 진행을 위해서는 세포주기 특이적인 cyclin의 발현 증가가 우선적으로 이루어져야 한다. 즉 mid G1에서 D-type cyclin (cyclin D1, D2 및 D3)의 발현을 필요로 하며, late G1에서 S기로의 진입을 위해서는 cyclin E의 발현이 증가되어야 한다^{12,13}. 그리고 이들 cyclin은 특정 Cdks와 특이적인 결합에 의하여 cyclin/Cdk complex를 형성하여 세포주기 진행을 조절한다. Hep3B 간암세포에서 溫清飲 I 처리에 의해 세포주기 G1기 조절에 중요한 cyclin D1의 발현 감소가 관찰되었다. 이는 이미 본 연구진이 발표한 기전과 공통적으로 관찰되는 결과로 溫清飲의 세포주기 G1 arrest에 cyclin D1의 발현이 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 그러나 溫清飲의 처리에 의하여 Cdk6 및 Cdk2의 발현은 감소되었으나⁶, 溫清飲 I은 Cdk2의 발현에는 영향을 미치지 않았으며 cyclin E의 발현을 유의하게 증가시켰다. 이는 약제 조성의 용량 가감이 동일한 효능을 나타내나 그 기전의 차이를 나타낼 수 있음을 시사한다.

Cdk inhibitors는 cyclin/Cdk complex의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있는데^{11,14} 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G1기뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 전체 세포주기의 진행을 억제하는 주요한 조절인자이다^{15,16}. p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포주나 항암제 및 후보물질의 종류에 따라서 p53 비의존적인 경로도 알려져 있다¹⁷⁻¹⁹. 또 p27 역시 G1기 arrest에 중요하지만 부분적으로 G2/M기 arrest에도 관여할 수 있는 것으로 보고되고 있으며^{11,14} proliferating cell nuclear antigen (PCNA)은 DNA 복제를 포함한 세포 증식 전반에 걸친 다양한 조절인자로서 작용하는 것으로 알려져 있다^{20,21}. 따라서 溫清飲 I의 G1 arrest 유발에 PCNA와 p21 및 p27과 같은 Cdk inhibitor가 관여하는지를 조사하였다. 溫清飲이 p27의 발현만을 유의하게 증가 시키는데 반하여⁶ 溫清飲 I은 p21 및 p27의 발현을 유의하게 증가시켜 이들이 G1 arrest에 관여하는 것으로 나타났다. 특히 p21의 발현 증가는 Hep3B가 종양억제 유전자 p53 null 세포주인 점을 고려할 때 p53 비의존적인 경로를 통하여 조절되었을 가능성을 시사하는데 이에 대한 보다 자세한 기전 연구가 요구된다. 이러한 결과는 그

조성 약제의 용량을 가감한 溫清飲 I이 Cdk inhibitors 발현에 溫清飲 보다 효과적으로 작용함을 보여주는 것이라 할 수 있다.

Cdk inhibitor 단백질은 Cdks와의 선택적 결합 부위를 보유하고 있으며^{11,14}, 특히 p21의 경우 PCNA와의 결합을 통하여 그들의 세포 내 활동도 저해할 수 있는 것으로 알려져 있다^{22,23}.

溫清飲 I 추출물 처리에 의한 세포주기 G1 arrest에 p21과 p27의 발현 증가가 세포주기 진행 조절에서 어떠한 역할을 하는지 조사하기 위하여 그들의 binding partner 단백질들과의 상호작용을 조사하였다.

溫清飲 I 추출물 처리에 의하여 증가된 p21 및 p27은 PCNA, Cdk4 및 Cdk2 등과의 결합을 유도하였으며, 이는 해당 cyclin/Cdk의 활성을 저해하였을 것으로 예상된다. 특히 p21의 단백질 증가가 PCNA와의 결합함으로써 DNA 복제 등 세포증식의 기능을 억제하였을 것으로 생각된다. 이는 溫清飲의 경우 p27이 Cdk4 및 Cdk2와 complex를 형성한 데 반하여⁶ 溫清飲 I은 p21 및 p27의 발현 증가가 G1기에서 S기로의 진행에 중요한 조절인자인 cyclin/Cdk kinase 활성 저하를 야기하여 G1 arrest에 관여할 것으로 추정된다.

이상의 결과로부터 溫清飲을 조성하는 약제 용량의 가감은 변화는 Hep3B의 G1 arrest에 관여하는 주요 Cdk inhibitor인 p21 및 p27의 발현과 Cdk와의 complex 형성의 차이를 유도함을 알 수 있었다. 즉 溫清飲의 조성 약제의 용량 변화에 의한 Hep3B 간암세포에서의 G1 arrest 기전의 차이를 확인할 수 있었다. 이는 한의학의 方劑 조성에 있어서 환자의 증상에 따라 몇 가지의 약제를 더하고 제거하며, 용량을 달리하여 질병의 치료에 다양하게 응용하는 가감(加減) 변화의 과학적 의의를 제시하는 것이라 하겠다. 나아가 향후 추가적인 연구를 통하여 보다 구체적인 암세포 증식억제 기전의 차이를 이해할 수 있는 매우 중요한 결과로서 활용될 수 있을 것이다.

결 론

본 연구에서는 溫清飲을 조성하는 약물의 용량 변화가 Hep3B 인체 간암세포의 세포증식 억제효능에 미치는 영향을 관찰한 바 다음의 결론을 얻었다.

溫清飲 I 추출물의 처리에 의한 증식억제 효능은 Hep3B 세포주에서 감수성이 높게 나타났으며, Hep3B 세포의 증식억제는 세포주기 G1 arrest 유발과 밀접한 연관성이 있음을 확인하였다. 溫清飲 I 추출물에 의한 G1기 arrest는 cyclin D1의 발현 저하와 p21 및 p27의 증가가 관련되어 있었다. 溫清飲 I 추출물에 의하여 증가된 p21은 PCNA, Cdk4 및 Cdk2와의 complex 형성을 촉진하였다. 이상의 결과로부터 溫清飲의 조성 약제의 용량 변화는 인체 간암세포에 대한 항암작용의 기전의 차이를 유도함을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 학술지원사업비의 지원으로 수행

되었음.

참고문헌

1. 焦樹德. 方劑心得十講. 北京, 人民衛生出版社, pp 5-7, 2005.
2. 이헌제, 성유진, 김상대, 문국진, 김종봉, 김길원, 신흥목. 半夏白朮天麻湯의 조성에 따른 혈관이완활성과 기전. 동 의 생 리 병 리 학 회 지 19(5):1311-1316, 2005.
3. 龔廷賢. 萬病回春. 北京, 人民衛生出版社, p 338, 1995.
4. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 동의보감출판사, p 307, 314, 2005.
5. 朴南錯. 漢方治療大全. 서울, 南山堂, p 444, 1989.
6. 구인모, 신흥목. 溫清飲이 인체 간암세포의 세포주기에 미치는 영향. 동 의 생 리 병 리 학 회 지 22(4):821-828, 2008.
7. Hussain, S.P., Harris, C.C. Molecular epidemiology of human cancer. *Recent Results Cancer Res.* 154: 22-36, 1998.
8. Dbouk, N., McGuire, B.M. Hepatic encephalopathy: a review of its pathophysiology and treatment. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 9: 464-474, 2006.
9. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330, 1995.
10. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60: 3689-3695, 2000.
11. Elledge, S.J., Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 847-852, 1994.
12. He, X.S., Chen, H.S., Chu, K., Rivkina, M., Robinson, W.S. Costimulatory protein B7-1 enhances the cytotoxic T cell response and antibody response to hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 7274-7278, 1996.
13. Harris, M., Gibbs, P., Cebon, J., Jones, R., Sewell, R., Schelleman, T., Angus, P. Hepatocellular carcinoma and chemoembolization. *Intern Med J.* 31(9):517-522, 2001.
14. Harper, J.W. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv.* 29: 91-107, 1997.
15. Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., Xiong, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9: 2261-2268, 1994.
16. Taylor, W.R., Stark, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20: 1803-1815, 2001.
17. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704, 1993.
18. Jiang, H., Lin, J., Su, Z.Z., Collart, F.R., Huberman, E., Fisher, P.B. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 9: 3397-3406, 1994.
19. Zeng, Y.X., El-Deiry, W.S. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12: 1557-1564, 1996.
20. Maga, G., Hubscher, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 116(Pt15): 3051-3060, 2003.
21. Warbrick, E. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 22: 997-1006, 2000.
22. Fotedar, R., Bendjennat, M., Fotedar, A. Role of p21WAF1 in the cellular response to UV. *Cell Cycle* 3: 134-137, 2004.
23. Boulaire, J., Fotedar, A., Fotedar, R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol. Biol. (Paris)* 48: 190-202, 2000.