

Cisplatin과 보정방암탕에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 세포사멸 기전 연구

주성민¹ · 김성훈⁴ · 김영목^{1,3} · 전병훈^{1,3*} · 김원신^{2*}

1: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 2: 원광대학교 자연과학대학 생명과학부,
3: 원광대학교 한의과대학 한국전통의학연구소, 4: 경희대학교 한의과대학 암예방소재개발연구센터

Machanism of Cisplatin-induced Apoptosis and Bojungbangam-tang-mediated Anti-apoptotic Effect on Cell Proliferation in Rat Mesangial Cells

Sung Min Ju¹, Sung Hoon Kim⁴, Yeong Mok Kim^{1,3}, Byung Hun Jeon^{1,3*}, Won Sin Kim^{2*}

1: Department of Pathology, College of Korean Medicine, 2: Department of Biological Science, College of Natural Sciences,
3: Research Center of Traditional Korean Medicine Wonkwang University,
4: Cancer Preventive Material Development Research Center, College of Korean Medicine, Kyunghee University

Cisplatin is a anti-neoplastic agent which is commonly used for the treatment of solid tumor. Cisplatin activates multiple signal transduction pathways involved in the stress-induced apoptosis in a variety of cell types. Previous study reported that cisplatin induces apoptosis through activation of ERK, p38 and JNK in rat mesangial cells, but apoptotic pathway remain known. The present study investigated the apoptotic pathway for cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells. cisplatin-induced apoptosis was associated with activation of caspase-3, caspase-8, caspase-9. Caspase-8 inhibition prevented the activation of both caspase-3 and caspase-9. In addition, cisplatin-induced apoptosis increased the expression of Bax, but not the level of Bcl-2. These change of Bax/bcl-2 ratio caused the release of cytochrome c from mitochondria into cytosol. In previous study, the ethanol extract of Bojungbangam-tang (EBJT) inhibited cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells through inhibition of ERK and JNK activation. However, EBJT did not increase cell proliferation, because it did not prevent cisplatin-induced G2/M phase arrest. These effect of EBJT may be related to p38 activation. Cisplatin-induced G2/M phase arrest are inhibited by treatment with p38 inhibitor and EBJT in rat mesangial cells. Also, p38 inhibition and EBJT treatment on cisplatin-induced G2/M phase arrest are markedly increased the G0/G1 phase and reduced the sub-G1. In conclusion, anti-apoptotic effect of EBJT did not increase cell proliferation, because EBJT did not reduce p38 activation related to cisplatin-induced G2/M phase arrest.

Key words : Cisplatin, Rat mesangial cells, Bojungbangam-tang, G2/M phase arrest

서 론

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum[II])은 세포에서

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
김원신, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 자연과학대학 생명과학부
· E-mail : omdjbh@wku.ac.kr, wskim@wku.ac.kr
· Tel : 063-850-6835, 063-850-6578
· 접수 : 2013/02/13 · 수정 : 2013/02/18 · 채택 : 2012/02/18

성장정지와 세포사멸을 강력하게 유도하는 물질로서 암치료를 위한 화학요법 치료제로 광범위하게 사용되고 있지만, 신장장애를 유발하는 신장독성 때문에 사용이 제한되고 있다¹⁻³). Cisplatin의 세포독성은 1차적으로 DNA의 퓨린계열 염기의 친핵성 N7부위와 상호작용에 기인하며, DNA-protein 또는 DNA-DNA interstrand 또는 intrastrand crosslink를 형성하기 때문이다⁴). DNA와 cisplatin의 상호작용에 의해 형성된 DNA 부가물은 암세포의 세포사멸을 유도하는 mitogen-activated protein kinases

(MAPKs)와 같은 신호전달경로들을 활성화 시킨다⁵⁾.

이전 연구에서 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 세포사멸은 ERK, p38, JNK의 활성화와 관련이 있는 것으로 보고되었다⁶⁾. Cisplatin에 의한 세포사멸 유도단백질인 caspase-3 활성화는 MAPKs억제제인 PD98059 (ERK 억제제), SB203580 (p38 억제제), SP600125 (JNK 억제제)에 의해 감소하였다. 그러나 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 세포사멸의 직접적 기전에 대한 연구는 이루어 지지 않았다.

9 가지 한약재로 구성된 보정방암탕(Table 1)은 《證治準繩》에 수재되어 보익제로 활용되는 삼출탕을 기본방으로 부분적으로 변형하여 구성되었다. 보정방암탕 처방은 정원음의 6가지 한약재와 항암성분을 가진 아가리쿠스 버섯, 진피, 당귀로 구성되어 있다. 보정방암탕 에탄올 추출물은 백서 사구체 혈관사이세포에서 cisplatin에 의해 유도된 세포사멸을 ERK와 JNK활성억제를 통하여 보호한다고 보고되었고, 항암치료시 cisplatin의 부작용을 완화시키는 가능성을 보여주었다⁶⁾. 그러나 cisplatin의 세포독성에 대한 보정방암탕 보호효과의 결과로서 세포증식을 유도하지 못하였고, 그 원인에 대해 밝혀져 있지 않다.

Cisplatin의 세포증식 억제제는 G2/M기 세포주기 정지와 관련되어 있다^{7,8)}. Cisplatin에 의한 G2/M기 정지는 ERK와 p38 활성화와 관련되어있다^{9,12)}. ERK는 정상적인 세포주기의 G2/M 진행과 DNA 손상에 의해 유도된 G2/M 정지에 필요하고^{9,10)}, p38은 G2/M의 DNA 손상과 관련된 세포주기 검사점에 작용하는 것으로 알려졌다^{11,12)}. 이전 연구에서 보정방암탕은 cisplatin에 의해 유도된 ERK 활성을 억제하였지만, p38 활성화에는 아무런 영향을 미치지 못하였다⁶⁾. 이러한 효과는 보정방암탕의 아포토시스 보호효과가 cisplatin에 의해 유도된 G2/M 세포주기 정지에 영향을 주지 못한 원인으로 보고있다.

본 연구에서는 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 세포사멸의 직접적 기전을 조사하였고, 보정방암탕 에탄올 추출물의 cisplatin에 의한 세포사멸 보호효과의 결과가 세포증식으로 유도되지 못한 원인을 규명하였다.

Table 1. The botanical origins and ration of crude herbs of Bojungbangam-tang

Crude herbs	Botanical origin	Place	Weight (g)	Specimen No.
Agaricus mushroom (아가리쿠스 버섯)	Agaricus blazei Murill	Korea	40	GSM011
Atractylodes Macrocephalae Rhizoma(백출)	Atractylodes macrocephala Koidz	China	12	GSM012
Ginseng Radix(인삼)	Panax ginseng C.A. Meyer	Korea	20	GSM013
Polyporus(저령)	Polyporus umbellatus (PERS.) Fries	China	12	GSM014
Citri Pericarpium(진피)	Citrus unshiu Markovich	Korea	8	GSM015
Astragali Radix(황기)	Astragalus membranaceus Bunge	Korea	8	GSM016
Dioscoreae Rhizoma(산약)	Dioscorea japonica Thunb	Korea	8	GSM017
Angelicae gigantis Radix (당귀)	Angelica gigas Nakai	Korea	8	GSM018
Glycyrrhizae Radix(감초)	Glycyrrhiza uralensis Fisch	China	4	GSM019

재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Cisplatin, digitonin, propidium iodine (PI), Ribonuclease A (RNase A), protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (Ac-DEVD-pNA), N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-pNA (Ac-IETD-pNA), N-Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-pNA (Ac-LEHD-pNA), Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-CH2F (Z-IETD-FMK), Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-CH2F (Z-LEHD-FMK), SB203580은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-Bcl-2와 anti-Bax 항체들은 Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-cytochrome c 항체는 Cell Signaling Technology INC. (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

2. 보정방암탕 제조

보정방암탕은 Table 1과 같이 9가지 한약재로 구성되어 있다. 보정방암탕 에탄올추출물(Extract of Bojungbang-tang; EBJT)는 건조된 9가지 한약재를 분말로 만들어 혼합한 후 360 g 을 에탄올에 1 L로 3회 씩 3 일 동안 상온에서 추출하였다. 추출물은 감압하여 동결건조하였으며, 약 44 g의 분말을 획득하였다 (수율, 12.2%). 동결건조된 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 200 mg/ml의 농도로 용해시켜 -20℃에 보관하였고 실험에 사용하기 전에 희석하여 사용하였다.

3. 세포배양

Immortalization된 백서 사구체 혈관사이세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양받았고, 15% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 37℃와 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 세포는 안정된 성장과 형태적 특성을 검증하기 위해 G418이 포함된 배지에 최소 5 회 이상 계대배양 하였고, 그 후의 세포는 15% FBS와 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin 포함된 DMEM배지에서 배양하였다. 세포는 0.25% trypsin-0.03% EDTA용액을 사용하여 계대 배양하였으며, 세포는 cisplatin을 처리하기 24시간 전에 배양접시에 seeding하였다.

4. Caspase 활성화검사

세포는 lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA)를 사용하여 freezing/thawing 방법으로 용해하였고, 세포용해액은 4℃에서 10,000rpm으로 1 분간 원심분리하여 얻었다. Caspase 활성화검사는 제조사가 제시한 protocol에 따라서 수행하였다. 간략하게 설명하면, 10 µl cell lysates (30 µg total protein)+88 µl reaction buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol)와 2 µl fluorogenic

Ac-DEVD-pNA (caspase-3), Ac-IETD-pNA (caspase-8) 또는 Ac-LEHD-pNA (caspase-9) substrate (200 μ M final concentration)를 혼합하였다. 샘플은 37°C에서 3 시간 배양 후 enzyme-catalyzation되어 방출된 p-nitroanilide를 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer로 405 nm에서 측정하였다.

5. 세포내 분획

세포내 분획은 Pae HO et al¹³⁾ 방법에 의해 실행하였다. 세포는 얼음으로 냉장된 PBS (pH 7.4)에 세척하여 1% protease inhibitor cocktail이 첨가된 lysis buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.05% digitonin, 25 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1 mM DTT)로 30초간 가볍게 용해하였다. Lysate는 4°C에서 4분간 11,000 rpm에서 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층액 (미토콘드리아가 없는 세포질분획)과 pellet (미토콘드리아를 포함한 분획)을 획득하였다. 상층액과 pellet은 15% SDS-PAGE에서 전기영동하였고, anti-cytochrome c 항체를 사용하여 western blot 하였다.

6. Western blot analysis

시료처리 후 배양이 끝난 세포는 얼음으로 냉장된 PBS로 세척하였고 1% protease inhibitor cocktail이 포함된 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium vanadate)로 얼음 위에서 30 분간 용해하였다. 세포용해액은 저온원심분리기로 14,000 rpm에서 15 분간 원심분리 하였고, 단백질 농도는 Bradford assay를 이용하여 측정하였다. 총 30 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔로 분리하였고, 분리된 SDS-PAGE 겔 상의 단백질을 trans blot kit를 사용하여 40 V에서 3 시간 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane은 5% milk가 포함된 Tris-buffered saline+Tween-20 (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 차단한 후 1차항체를 결합시켰다. 반응활성도는 피옥시아제가 붙어있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체를 사용하여 SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 탐지하였다.

7. 유세포분석

시료 처리된 세포는 48 시간 동안 배양한 후, 부착되어 있는 또는 부유되어 있는 세포 모두를 수확하여 얼음으로 냉장된 PBS (pH 7.4)로 세척하였다. 세척한 세포는 냉각된 70% 에탄올로 4°C에서 1 시간 동안 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 다시 세척하고 1 ml의 PI (10 μ g/ml)/RNase A(100 μ g/ml)용액으로 재부유시켜 37°C에서 암실조건으로 1 시간 배양하였다. DNA 양은 fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur (BD Biosciences, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

8. 통계처리

모든 데이터의 결과는 마이크로소프트 오피스 엑셀 2010 프로그램을 통하여 통계처리 하여 mean \pm standard deviation(SD)로 기록하였다.

결 과

1. Cisplatin에 의한 caspase-3 활성화기전

Cisplatin은 백서 사구체 혈관사이세포에서 세포사멸 유도단백질인 caspase-3를 활성화시켜 아포토시스를 유도하였다⁶⁾. Caspase-3는 caspase-8에 의해 직접적으로 활성화되거나 caspase-9의 활성을 통해 간접적으로 활성화 된다¹⁴⁻¹⁶⁾. 본 연구에서는 cisplatin에 의한 caspase-3의 활성화기전을 이해하기 위해 caspase-3의 상위 활성인자인 caspase-8과 caspase-9을 억제한 세포에서 cisplatin에 의한 caspase-3의 활성을 조사하였다. 백서 사구체 혈관사이세포는 caspase-8 억제제인 Z-IETD-FMK와 caspase-9 억제제인 Z-LEHD-FMK를 전처리 한 후, cisplatin을 처리하였다. Cisplatin에 의한 caspase-3의 활성은 caspase-8 억제제에 의해 156.3% 감소하였고, caspase-9 억제제에 의해 343.8% 감소하였다(Fig. 1). 또한 caspase-8 억제제는 caspase-9의 활성을 118.75% 감소하였지만, caspase-9 억제제는 caspase-8의 활성에 큰 영향을 미치지 못하였다.

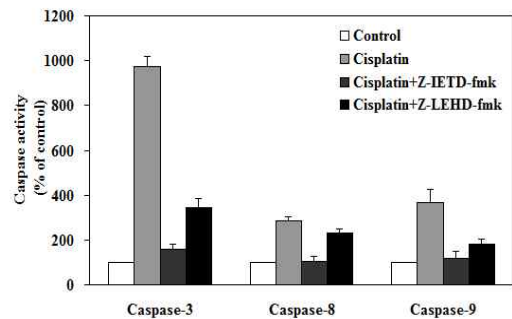


Fig. 1. Effect of caspase-8 and -9 inhibitors on cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells. The cells were incubated with 20 μ M cisplatin for 48 hr after pretreated with the presence or absence of 50 μ M Z-IETD-fmk and Z-LEHD-fmk for 3 hr. The activation was measured as the increase in activity (%) with respect to control cells (100%). Value are means \pm SD, N = 3.

2. Cisplatin에 의한 세포사멸에서 Bcl-2와 Bax 발현 및 cytochrome c 방출 변화

Bcl-2 패밀리는 원아포토시스와 항아포토시스 인자로 구성되어 있으며, 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출과 아포토시스 촉진인자를 조절을 통해 세포사멸을 중재한다¹⁷⁾. Bcl-2 패밀리 중에서 항아포토시스 인자인 Bcl-2와 원아포토시스 인자인 Bax 단백질은 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 수행하고 있다¹⁷⁾. 본 연구에서는 cisplatin을 처리한 백서 사구체 혈관사이세포에서 Bcl-2와 Bax 단백질 발현 수준을 조사하였다. Bax 단백질 발현은 cisplatin의 처리에 의해 시간의존적으로 감소하였지만, Bcl-2 단백질 발현에는 아무런 영향을 주지 못하였다(Fig. 2A).

세포사멸 기전 중 미토콘드리아 경로는 caspase-8에 의해 cytochrome c를 세포질로 방출하여 caspase-9을 활성화 시킨 후, 활성화된 caspase-9에 의해 caspase-3를 활성화 시킨다¹⁴⁻¹⁶⁾. Cisplatin에 의한 세포사멸 기전이 미토콘드리아 경로와 관련되어 있는지를 조사하기 위해 cisplatin 처리 후, 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c의 방출을 조사하였다. Cytochrome c

의 세포질로의 방출은 cisplatin 처리 24 시간 후부터 증가하였고, 그에 반하여 미토콘드리아 내의 cytochrome c는 감소하였다 (Fig. 2B).

고 찰

아폽토시스는 세포사멸 단백질인 caspase의 활성화로 유도된다¹⁸⁾. 그 중 잘 알려진 caspase-3는 아폽토시스를 유도하는 주된 세포사멸 유도단백질이며, caspase-3의 활성화경로는 세포사멸 개시 단백질인 caspase-8 또는 caspase-9에 따라서 두가지 경로로 나누어진다^{19,23)}. Caspase-8은 미토콘드리아 의존적 또는 비의존적 경로를 통하여 아폽토시스 경로를 활성화시킨다. 미토콘드리아 비의존적경로는 caspase-8이 직접적으로 caspase-3를 활성화시키지만^{19,20)}, 미토콘드리아 의존적경로는 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c가 caspase-9의 활성을 자극하고 이것이 다시 caspase-3를 활성화시킨다^{21,23)}. 그러나 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 아폽토시스 유도 경로는 아직 보고되지 않았다. 본 연구에서 cisplatin은 caspase-8과 caspase-9의 활성을 모두 증가시키는 것으로 확인되었다. Caspase-8과 caspase-9 억제제를 처리하였을 경우, 양쪽 억제제에 의해 caspase-3의 활성이 감소하는 것을 확인하였고, caspase-8 억제제는 caspase-9의 활성 또한 감소하였다. 이 결과는 cisplatin에 의한 아폽토시스가 caspase-8 활성을 경유한 caspase-9을 활성화시키는 미토콘드리아 의존적경로를 통하여 이루어졌다는 것을 보여주고 있다.

Bcl-2 패밀리를 중 원아폽토시스 인자인 Bax 단백질은 세포질에 존재하지만, 아폽토시스가 유도되면 미토콘드리아로 전위된다^{24,26)}. Bax는 세포사멸과정에서 요구되는 미토콘드리아의 기능 장애를 일으키는 기본적인 관문 역할을 하며^{27,28)}, cytochrome c의 방출과 caspase 활성을 유도한다^{25,29)}. 대조적으로 항아폽토시스 인자인 Bcl-2 단백질은 Bax 단백질과 이형이합체를 형성하여 cytochrome c의 방출을 차단한다^{29,31)}. 이전 연구에서 Bcl-2 패밀리의 원아폽토시스 인자와 항아폽토시스 인자 사이의 발현 비율의 차이가 아폽토시스 자극에 대한 세포의 민감성에 중요한 역할을 수행한다고 보고되었다³²⁾. 본 연구에서 cisplatin은 백서 사구체 혈관사이세포에서 Bcl-2 단백질 발현 수준은 변화가 없었지만, Bax 단백질 발현 수준은 크게 증가하였고, 결과적으로 Bax/Bcl-2 비율을 증가시켰다. 이 결과는 Bax/Bcl-2 비율 증가가 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 아폽토시스 증가와 관련되어 있다는 것을 보여주고 있다.

아폽토시스 유도과정에서 caspase-8 활성을 통한 caspase-9 활성화와 Bax/Bcl-2 비율 증가는 세포질로의 cytochrome c 방출시키는 미토콘드리아 의존적경로와 관련되어 있다^{21,23,32)}. 본 연구에서는 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 아폽토시스 유도과정에서 세포질로의 cytochrome c의 방출증가와 미토콘드리아 내의 cytochrome c의 감소를 확인하였다. 이 결과는 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 아폽토시스 유도가 미토콘드리아 의존적경로를 통하여 이루어졌다는 것을 재확인해 주고 있다.

보정방암당은 항암치료에 의한 부작용을 줄이고 전이와 신생혈관생성을 억제하는 방향으로 개량되었다. 이전 연구에서 보정방암당은 cisplatin에 의한 백서 사구체 혈관사이세포의 아폽토시스에 대한 보호효과를 보여주었다⁶⁾. 그러나 보정방암당의

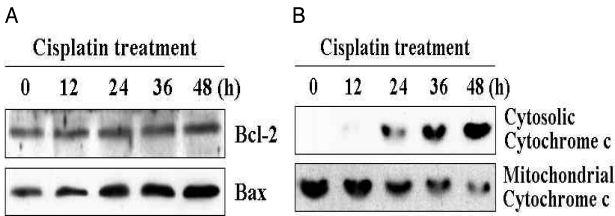


Fig. 2. Effect of cisplatin on expression of Bcl-2 and Bax and release of cytochrome c in rat mesangial cells. The cells were treated with cisplatin (20 μ M) for 12, 24, 36 and 48 hr. Bcl-2 and Bax expression (A) and cytochrome c release (B) were determined by Western blot analysis using anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-cytochrome c antibodies.

3. Cisplatin의 세포독성에 대한 보정방암당의 보호효과가 세포 증식에 미치는 효과

이전 연구에서 cisplatin에 의해 유도된 백서 사구체 혈관사이세포의 아폽토시스에 대한 보정방암당의 보호효과는 ERK와 JNK 활성화와 관련이 있는 것으로 보고되었다⁶⁾. 그러나 세포 증식 회복에는 아무런 영향을 미치지 못하였다. 그 원인은 보정방암당이 cisplatin에 의해 유도된 아폽토시스를 억제하지만, cisplatin에 의해 유도된 G2/M 세포주기 정지에는 아무런 효과를 나타내지 못하였고, 이러한 효과는 p38 활성화와 관련되어 있는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 cisplatin에 의해 유도된 백서 사구체 혈관사이세포의 G2/M 세포주기 정지에서 p38 활성화는 효과를 조사하였다. Cisplatin+EBJT 처리군은 Cisplatin 처리군과 비교하여 아폽토시스 세포인 Sub-G1기가 42.7%에서 29.6%로 감소하였지만, 감소된 Sub-G1기만큼 G2/M기 41.9%에서 52.2% 증가하여 보정방암당에 의해 보호된 세포가 G2/M기에 정지해 있는 것으로 관찰되었지만, p38 억제제를 처리한 Cisplatin+EBJT+SB203580 처리군에서 G2/M기는 Cisplatin-EBJT 처리군과 비교하여 42.8% 감소하였고, Sub-G1기는 23.2% 감소하였다(Table 2). p38 억제제에 의한 Sub-G1기와 G2/M기 감소는 G0/G1기를 22.6% (versus 6.0% in Cisplatin+EBJT group) 증가시켰다. 그러나 p38 억제제와 cisplatin만 처리하였을 경우, Sub-G1기만 감소하였을 뿐, Cisplatin+EBJT 처리군과 비교하여 모든 세포주기에 변화가 없었다.

Table 2. Effect of p38 inhibitor on cell proliferation of rat mesangial cells treated with cisplatin and EBJT.

Groups	Cell cycle	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Control		9.4±2.0	32.7±1.4	13.3±3.6	45.0±2.2
20 μ M Cisplatin		42.7±4.6	5.5±2.3	10.0±3.3	41.2±2.1
200 μ g/ml EBJT		29.6±2.3	6.0±2.0	12.2±3.4	52.2±2.3
20 μ M Cisplatin + 200 μ g EBJT		10.8±2.1	36.4±4.4	10.0±3.1	42.8±2.2
20 μ M Cisplatin + 10 μ M SB203580		28.7±1.6	9.4±2.5	7.1±3.6	54.7±2.4
20 μ M Cisplatin + 200 μ g/ml EBJT + 10 μ M SB203580		23.2±2.8	22.6±3.8	11.4±3.5	42.8±2.5

* The cells were preincubated with 200 μ g/ml EBJT and 10 μ M SB203580 for 3 hr, and then treated with 20 μ M cisplatin for 48 hr. The cells were fixed and stained with PI and the DNA content was analyzed by flow cytometry.

아폽토시스 보호효과는 세포증식 회복에는 아무런 영향을 주지 못하였다. ERK와 p38은 세포주기에서 G2/M 전이를 조절하는데 관여한다^{9,12}. ERK는 정상적인 세포주기의 G2/M 진행과 DNA 손상에 의해 유도된 G2/M 정지에 필요하다^{9,10}. p38은 G2/M의 DNA 손상과 관련된 세포주기 검사점에만 작용하는 것으로 알려졌다^{11,12}. 보정방암탕은 이전 연구에서 cisplatin에 의해 증가된 ERK 활성을 감소시켰지만, p38 활성은 감소시키지 못하였다⁶. 이러한 효과는 보정방암탕이 cisplatin에 의해 유도된 G2/M 세포주기 정지를 저해하지 못한 원인으로 보고있다. 본 연구에서는 cisplatin과 보정방암탕을 처리한 백서 사구체 혈관사이세포에 p38 활성을 억제하였을 경우 Sub-G1와 G2/M기 감소 및 G0/G1기 증가를 확인 하였다. 이 결과는 보정방암탕의 보호효과가 cisplatin에 의해 감소된 백서 사구체 혈관사이세포의 증식 회복에 영향을 미치지 못한 원인이 p38 활성과 관련되어 있다는 것을 보여주고 있다.

결 론

Cisplatin의해 유도된 백서 사구체 혈관사이세포의 아폽토시스 기전은 caspase-8 활성과 Bax 단백질 발현을 증가시켜 미토콘드리아 내의 cytochrome c를 세포질로 방출시켰고, 방출된 cytochrome c에 의해 활성화된 caspase-9이 caspase-3를 활성화시켜서 이루어졌다. Cisplatin에 의한 세포사멸은 보정방암탕에 의해 억제되었지만, 세포증식을 유도하지 못하는 결과를 보였다. 그 원인은 cisplatin에 의해 유도된 p38의 활성화로 세포주기가 G2/M 기에 정지되는 되는 기작을 보정방암탕이 억제하지 못하는 결과에 기인한 것으로 확인되었다. 따라서 보정방암탕에 p38 활성을 억제할 수 있는 약제를 가감하여 보정방암탕을 보완하면 항암치료 부작용을 억제하는 처방으로서 기능을 할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Timmer-Bosscha, H., Mulder, N.H., de Vries, E.G. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance: a review. *Br. J. Cancer* 66: 227-238, 1992.
2. Goldstein, R.S., Mayor, G.H. Minireview. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci.* 32: 685-690, 1983.
3. Safirstein, R., Winston, J., Goldstein, M., Moel, D., Dikman, S., Guttenplan, J. Cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* 8: 356-367, 1986.
4. Eastman, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther.* 34: 155-166, 1987.
5. Siddik, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265-7279, 2003.
6. Kim, N.S., Ju, S.M., Kwon, Y.D., Shin, B.C., Ahn, K.S., Kim, S.H., Song, Y.S., Jeon, B.H. Anti-apoptotic Effect of

- Bojungbangam-tang Ethanol Extract on Cisplatin-Induced Apoptosis in Rat Mesangial Cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 20: 1664-1671, 2006.
7. Céraline, J., Deplanque, G., Duclos, B., Limacher, J.M., Hajri, A., Noel, F., Orvain, C., Frébourg, T., Klein-Soyer, C., Bergerat, J.P. Inactivation of p53 in normal human cells increases G2/M arrest and sensitivity to DNA-damaging agents. *Int. J. Cancer.* 75: 432-438, 1998.
8. Zhou, H., Kato, A., Yasuda, H., Miyaji, T., Fujigaki, Y., Yamamoto, T., Yonemura, K., Hishida, A. The induction of cell cycle regulatory and DNA repair proteins in cisplatin-induced acute renal failure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200: 111-120, 2004.
9. Guadagno, T.M., Ferrell, J.E. Jr. Requirement for MAPK activation for normal mitotic progression in *Xenopus* egg extracts. *Science* 282: 1312-1315, 1998.
10. Wright, J.H., Munar, E., Jameson, D.R., Andreassen, P.R., Margolis, R.L., Seger, R., Krebs, E.G. Mitogen-activated protein kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11335-11340, 1999.
11. Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., Fornace, A.J. Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411: 102-107, 2001.
12. Wang, X., McGowan, C.H., Zhao, M., He, L., Downey, J.S., Fearn, C., Wang, Y., Huang, S., Han, J. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell Biol.* 20: 4543-4552, 2000.
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. Imperatorin, 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. Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18: 44-51, 1997.
15. Mignotte, B., Vayssiere, J.L. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 252: 1-15, 1998.
16. Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274: 11549-11558, 1999.
17. Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell. Biol.* 11: 526-534, 2001.
18. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 2000.
19. Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D.

- Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815, 1996.
20. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588, 1995.
 21. Chandra, D., Liu, J.W., Tang, D.G. Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277: 50842-50854, 2002.
 22. Green, D.R., Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998.
 23. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413, 1997.
 24. Hsu, Y.T., Youle, R.J. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* 273: 10777-10783, 1998.
 25. Murphy, K.M., Streips, U.N., Lock, R.B. Bax membrane insertion during Fas(CD95)-induced apoptosis precedes cytochrome c release and is inhibited by Bcl-2. *Oncogene* 18: 5991-5999, 1999.
 26. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13: 1899-1911, 1999.
 27. Pastorino, J.G., Chen, S.T., Tafani, M., Snyder, J.W., Farber, J.L. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 273: 7770-7775, 1998.
 28. Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., Mac Gregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730, 2001.
 29. Finucane, D.M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N.J., Cotter, T.G., Green, D.R. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 274: 2225-2233, 1999.
 30. Johnson, B.W., Cepero, E., Boise, L.H. Bcl-xL inhibits cytochrome c release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 275: 31546-31553, 2000.
 31. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, 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: 1081-1082, 1997.
 32. Kim, H.J., Mun, J.Y., Chun, Y.J., Choi, K.H., Kim, M.Y. Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. *FEBS Lett.* 505: 264-268, 2001.