H1299 인체폐암세포주에서 황기와 사삼의 항암 시너지 효과

이지민 · 김홍재[1] · 최영현[1,2] · 지규용 · 박신형*

동의대학교 한의과대학 병리학교실 & 동의대학교 한의학연구소, 1 : 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 2 : 동의대학교 항노화연구소

Synergistic Anticancer Effect of *Astragalus Membranaceus* and *Adenophora Triphylla Var. Japonica* in H1299 Human Lung Carcinoma Cells

Ji Min Lee, Hong Jae Kim[1], Yung Hyun Choi[1,2], Gyoo Yong Chi, Shin Hyung Park*

Department of Pathology & Research Institute of Korean Medicine, 1 : Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, 2 : Anti-Aging Research Center, Dong-eui University

The anti-cancer effects of *Astragalus membranaceus* (AM) and *Adenophora triphylla var. japonica* (AT) have been described. Each of their effects mainly focused on the immunopotentiating and apoptosis inducing-ability in several cancer cell lines. Although the combination of AM and AT is occasionally used in Chinese medicine to treat lung cancers, their synergistic effect has not been proved yet. This study was designed to verify whether AM combined with AT exhibits a synergistic anti-cancer effect in H1299 human lung carcinoma cells. The ethanol extracts of AM (EAM) and AT (EAT) showed only slight cytotoxicity in H1299 cells when treated alone. However, the combination of EAM and EAT markedly suppressed the cell growth measured by MTT assay and trypan blue counting assay. In addition, co-treatment of EAM with EAT significantly reduced the colony-forming ability compared with single treatment of EAM or EAT in H1299 cells. We demonstrated that the synergistic effect of AM and AT was related with apoptosis induction proved by an accumulation of chromatin condensation, annexin V-positive cells, sub-G1 phase population, and cleaved-PARP expression, which were not observed by single treatment of EAM or EAT. In conclusion, the combination of EAM and EAT exhibited superior anti-cancer activity in H1299 cells than single treatment of EAM or EAT. We suggest that EAM combined with EAT might be a novel therapeutic option for lung cancer patients, and provide a reference for the development of more effective combination of Chinese herbs to treat lung cancer.

keywords : *Astragalus membranaceus*, *Adenophora triphylla var. japonica*, Lung cancer, Apoptosis, Combination therapy

서 론

폐암은 미국에서 남녀 각각 전립선암과 유방암에 이어 발생률 2위를 차지하고 있으며, 현재까지 미국의 암으로 인한 사망 중 1위에 해당한다[1]. 폐암은 우리나라에서도 사망률이 가장 높은 암종으로서 2014년 우리나라에서만 17,000여명이 폐암으로 사망하여 전체 암으로 인한 사망 중 28%에 달했다[2]. 미국과 우리나라의 폐암의 5년 생존율은 20% 수준으로 췌장암 다음으로 가장 낮으며, 30년 동안 폐암의 5년 생존율은 불과 6% 증가하여 다른 암종에 비해 현저히 낮은 수준이다[1,2]. 위암이나 대장암과 달리 폐암은 효과적인 조기진단방법이 개발되지 않아 중·말기에 발견되는 경우가 많고, 기존치료제는 다양한 인체독성과 부작용 및 내성출현 등이 보고되어 향후 치료율을 높이기 위한 새로운 치료대책이 절실히 요구되는 실정이다.

한의학적으로 폐는 氣를 운행시키는 주요 장기로서(肺主氣) 건조함을 싫어하는 장기(肺惡燥)이므로 폐를 건강하게 하려면 氣와 陰液을 함께 길러줘야 한다. 일반적으로 폐암의 한의학적 원인은 전신적인 正氣와 陰液 부족 등 虛證이 근본이고, 이로 인해 폐에 痰飮과 瘀血이 생겨 실질적인 종양을 형성하는 것으로 알려져 있다[3]. Geng 등[4]이 폐암말기환자의 치료에 益氣養陰法이 효과적임을 보고한 이후 Ma 등[5]은 氣陰兩虛를 폐암의 가장 주요 病機로 꼽고 益氣養陰法을 폐암 치료에 적극적으로 활용해야 함을 주장하였다. 이에 폐암에 대한 중의임상연구 역시 益氣養陰法을 주요 치료법으로 운용하였으며, 益氣養陰法을 바탕으로 한 처방들을 분석했을 때 가장 빈용되는 약재가 바로 황기와 사삼임을 알 수 있다[6,7]. 특히 황기와 사삼은 다른 암종과 비교하여 폐암에 특이적으로 빈용되었으며, 두 약물 모두 폐로 歸經하여 폐암에 특이적인 효과를 가질 것으로 예상된다.

* Corresponding author

Shin Hyung Park, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dong-eui University, 47227, YangJeong-ro, Busanjin-gu, Busan, Republic of Korea

·E-mail : omdpark@deu.ac.kr ·Tel : +82-51-850-8646

·Received : 2017/03/02 ·Revised : 2017/04/12 ·Accepted : 2017/04/21

ⓒ The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.04.31.2.111

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

황기(*Astragali membranaceus*)는 콩과에 속한 다년생초본인 *Atragalus membranceus Bunge*의 周皮를 벗긴 뿌리를 건조한 것이다. <神農本草經>에서 上品의 약으로 분류되어 있으며, 性味가 甘溫하고 脾肺經에 작용하여 生用하면 益氣固表, 利水消腫하는 효능이 있고, 炙用하면 補脾益氣하는 효능이 있다[8]. 황기의 생리활성 작용으로서 항산화효과, 항바이러스효과, 면역증강효과, 간기능보호효과, 세포성장효과 등 다양한 효능이 알려져 있다[9,10]. 특히 황기의 항암작용에 대해 <東醫寶鑑>에서는 황기가 一切癌과 癰疽 및 肺癰 등을 치료한다고 하였으며[11], 홍 등[12-14]은 황기약침이 면역작용을 증강시키며 발암과정을 억제함을 보고하였다. 또한 황기주사액이 chemothepary의 효과를 높이고 부작용을 경감시키며[15,16], 황기의 saponin과 다당류 성분이 면역조절활성과 신생혈관억제를 통해 항암작용을 한다는 보고 등[17-21]이 있다.

사삼(*Adenophora triphilla var. japonica*)은 초롱꽃과에 속한 다년생초본인 *Adenophora triphilla var. japonica Hara* 및 동속근연식물의 뿌리를 건조한 것이다. 성미가 苦微寒하고 肺胃經에 작용하여 肺胃陰不足으로 인한 乾咳, 口渴에 養陰淸肺, 祛痰止咳하는 효능이 있다[8]. 그 동안 사삼의 생리활성 작용으로서 면역조절효과, 천식억제효과, 항염증효과, 항산화효과 등이 보고되어 왔다[22-25]. 특히 사삼의 항암작용에 대한 기존 연구를 살펴보면 crude 한 추출물이나 saponin 등의 성분이 암세포의 세포사멸을 유도하며, 비장세포 증식유도 및 혈관신생억제 등을 통해 항암활성을 가지는 것으로 알려져 있다[26-30].

본 연구는 황기와 사삼의 항암활성을 밝힌 기존의 임상 혹은 전임상 데이터와 폐암치료에 황기와 사삼을 필두로 한 益氣養陰法을 적극적으로 응용해온 기존의 중의임상연구를 바탕으로 디자인되었다. 황기와 사삼의 항암 시너지효과를 조사하기 위해 구체적으로 H1299 인체폐암세포주에 황기와 사삼을 단독 혹은 병합처리한 후 세포사멸효과를 in vitro 상에서 비교 검증하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 황기와 사삼은 주식회사 누리허브에서 구입한 것으로 화순한약재유통에서 대한민국약전을 기준으로 표준품 확인 및 순도 시험을 거친 것이다. 황기 에탄올 추출물(ethanol extract of *Astragali membranaceus*, EAM) 및 사삼 에탄올 추출물 (ethanol extract of *Adenophora triphilla var. japonica*, EAT)을 얻기 위해 황기와 사삼의 건조된 분말 100 g에 80% 에탄올을 각각 1.5 L씩 첨가한 후 초음파분쇄기에 30분씩 5회 추출하여 필터를 통해 상층액만 분리하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻어진 상층액을 감압농축 및 동결건조하여 얻은 분말을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 200 ㎎/㎖ 농도로 용해시켜 사용하였다. 세포 배양에 사용된 RPMI 1640, fatal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (PS), phosphate-buffered saline (PBS), Trypsin-EDTA는 WelGENE (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 단백질 분석을 위한 모든 1차 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 별도 표기 하지 않은 모든 시약은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

본 연구에 사용된 H1299 인체 폐암세포주는 서울대학교 약학대학 이호영교수님으로부터 제공받았다. 세포의 배양을 위해 90%의 RPMI 1640에 10% FBS와 1% PS를 첨가하여 사용하였으며, 세포는 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다.

3. MTT assay

H1299 세포를 2.5×10^3 cells/well 농도로 96 well plate에 seeding한 후 EAM과 EAT를 각각 제시된 농도로 처리하였다. 72 h 배양 후 tetrazolium bromide salt (MTT)를 0.5 ㎍/㎖ 농도가 되도록 분주하고 2 h 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 모두 제거하고 DMSO 100 ㎕를 넣어 각 well의 formazin을 녹인 후 multiplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 540 nm로 흡광도를 측정하였다.

4. Trypan blue exclusion assay

H1299 세포를 3×10^4 cells/well 농도로 12 well plate에 seeding한 후 EAM (500 ㎍/㎖)과 EAT (500 ㎍/㎖)를 각각 제시된 시간동안 처리하였다. 그 후 세포를 모아 0.1% trypan blue 용액으로 suspension한 후 세포 숫자를 counting하였다. 푸른색으로 염색된 세포는 죽은 세포로 판단하여 counting에서 제외하였고, 염색되지 않은 세포만 live cell로 판단하여 counting 하였다.

5. Soft agar assay

4% low-melting agarose (Lonza, Rockland, ME)를 미리 PBS에 녹여 준비한 후, 따뜻한 배지를 첨가하여 1% bottom agar를 만들고, 1 ㎖씩 24 well plate에 분주하여 상온에서 굳혔다. 그 후 H1299 세포를 5×10^2 cells/0.5 ㎖ 농도로 0.4% top agar에 suspension하여 각 well당 0.5 ㎖씩 분주한 후 상온에서 굳혔다. Agar가 다 굳은 후 배지 500 ㎕에 EAM과 EAT를 각각 처리하여 top agar 위에 분주하였다. 상층액은 3일에 한번씩 교체하였으며, seeding 후 2주간 배양하였다. 그 후 상층액에 MTT solution을 0.5 ㎎/㎖로 처리하여 2 h incubation 시킨 후 염색된 colony를 디지털카메라(EOS750D, Canon, Japan)로 촬영하였다. Colony 숫자는 Image J software를 통해 counting 하였다.

6. DAPI staining

EAM (500 ㎍/㎖)과 EAT (500 ㎍/㎖)를 72 h 처리한 H1299 세포들을 모아서 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 30분 동안 고정하였다. 그 후 cold PBS로 2회 wash 후 cytospin으로 세포를 slide glass 위에 부착시키고, PBS와 DW에 번갈아 세척하여 건조시켰다. 건조된 세포를 2.5 ㎎/㎖로 희석된 DAPI solution으로 약 30분간 암실에서 염색시키고, PBS와 DW에 번갈아 세척 및 건조시킨 후 mounting하여 형광현미경(Carl Zeiss, Germany)을 통해 400배의 배율로 핵의 형태를 관찰하였다.

7. Flow cytometry를 통한 cell cycle 분석

EAM (500 ㎍/㎖)과 EAT (500 ㎍/㎖)를 72 h 처리한 H1299 세포들을 모아 80% 에탄올로 4 ℃에서 1 h 고정한 후 원심분리시켜 500 ㎕의 propidium iodide solution (450 ㎕ PBS, 50 ㎕ 0.5 ㎎/㎖ propidium iodide, 1.5 ㎕ 10 ㎎/㎖ RNase A)에 suspension하여 30분간 핵을 염색하였다. 그 후 원심분리시켜 상층액을 제거한 후 500 ㎕ PBS에 suspenstion하여 DNA flow cytometer (BD FACSCalibur)와 CellQuest software를 사용하여 cell cycle을 histogram으로 분석하였다.

8. Annexin V/PI double staining assay

EAM (500 ㎍/㎖)과 EAT (500 ㎍/㎖)를 72 h 처리한 H1299 세포들을 모아 Annexin V-FITC apoptosis detection kit (PharMingen, San Diego, California)의 사용설명서에 따라 염색하였다. 15분간 암실에서 세포를 염색한 후 DNA flow cytometer와 CellQuest software를 사용하여 Annexin V-positive apoptotic cell을 분석하였다.

9. Western blotting

EAM (500 ㎍/㎖)과 EAT (500 ㎍/㎖)를 72 h 처리한 H1299 세포들을 모아 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, a complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche diagnostics, Mannheim, Germany), phosphatase inhibitors (1 mM Na_3VO_4, 100 mM NaF, and 10 mM NaPP)) 에 1 h lysis시킨 후 Bio-rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따라 정량하였다. 그 후 20 ㎍의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동시키고, electroblotting을 통해 2 h 동안 PVDF membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA)에 옮긴 후 3% bovine serum albumin (BSA, MP Biomedicals Europe, Illkirch, France)로 1 h blocking하고 1차 항체를 붙여 4℃에서 overnight incubation하였다. 그 후 TBST로 세척하고 상온에서 1 h 동안 2차 항체를 붙인 후 다시 세척하고 Enhanced Chemilunimoecence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Height, IL, USA)을 뿌려 암실에서 X-ray film (Agfa-Gevaert, Melbourne, Australia)에 감광시켰다.

10. 통계적 분석

모든 실험 결과는 mean±SD으로 표시하였으며, 통계적 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 $P < 0.05$인 것을 유의성 있다고 판단하였다.

결 과

1. EAM과 EAT 병용처리가 H1299 세포의 증식 및 형태에 미치는 영향

먼저 EAM 및 EAT 단독처리가 H1299 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 EAM과 EAT를 각각 0, 50, 100, 250, 500, 1000 ㎍/㎖ 농도로 72 h 처리한 후 MTT assay를 시행하였다. 그 결과 EAM과 EAT 모두 500 ㎍/㎖ 처리군까지 H1299 세포의 생존율이 80% 내외로 나타나 생존율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1A and 1B). 그러나 EAM과 EAT의 병용처리에 의해서 H1299 세포의 생존율이 큰 폭으로 감소하는 것을 볼 수 있는데, 250 ㎍/㎖ 단독처리군에서는 EAM과 EAT 처리군 모두 80% 이상의 생존율을 보였으나 병용처리군에서 생존율이 60%까지 감소하였으며, 500 ㎍/㎖ 단독처리군에서는 EAM과 EAT 처리군 각각 80%와 60% 이상의 생존율을 보였으나 병용처리군에서 생존율이 20% 미만으로 현저히 감소하여 농도의존적인 synergy 증대 효과를 보여주었다(Fig. 2A). 또한 약물의 최종 처리농도를 1000 ㎍/㎖으로 동일하게 맞춘 조건에서 세포생존율을 비교해보면 Fig. 1에서 보여지듯이 EAT 1000 ㎍/㎖ 단독처리군은 약 80%, EAT 1000 ㎍/㎖ 단독처리군은 약 60%의 세포생존율을 보인 반면 Fig. 2A에 제시된 결과와 같이 EAM 500 ㎍/㎖과 EAT 500 ㎍/㎖을 병용처리한 군은 20% 미만의 세포생존율을 보여 최종 약물농도가 동일한 조건에서도 synergy 효과가 나타남을 알 수 있었다.

이러한 경향은 trypan blue exclusion assay를 통해서 동일하게 나타났는데, EAM과 EAT을 36 h 동안 단독처리하였을 때 각각 93%와 85% 이상의 생존율을 보인 반면 병용처리에 의해서 생존율이 50% 내외로 감소하였으며, 72 h 단독처리 시 각각 90%와 70% 내외의 생존율을 보인 반면 병용 처리에 의해 세포생존율이 10% 미만으로 현저하게 감소하였다(Fig. 2B).

다음으로 EAM과 EAT 병용처리가 H1299 세포의 밀집도와 형태에 미치는 영향을 조사하기 위해 EAM (500 ㎍/㎖)과 EAT (500 ㎍/㎖)를 단독 혹은 병용처리한 후 현미경 상에서 cell density와 morphology를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2C에 나타나듯이 EAM과 EAT 단독처리군에 비해 병용처리군에서 현저하게 세포의 밀집도가 감소하였고, 배지 상에 부유하는 세포의 비율이 증가하였으며, 세포의 형태 역시 정상적으로 가지를 뻗은 상태가 아닌 부유 직전의 둥근 형태의 세포가 증가하였다 (Fig. 2C). 이들 결과를 바탕으로 EAM과 EAT 병용처리가 H1299 세포의 생존율 감소에 있어 synergy 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

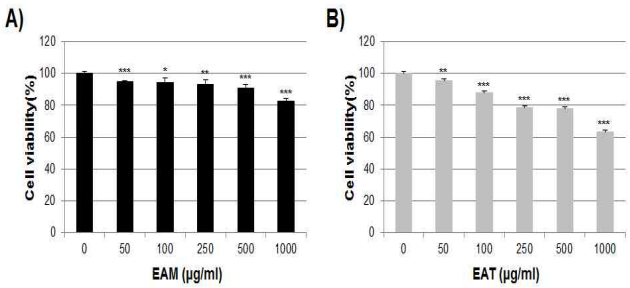

Fig. 1. Effects of EAM and EAT on cell viability in H1299 cells. Cells were seeded onto 96 well plates and treated with the indicated concentrations of (A) EAM and (B) EAT for 72 h. The cell viability was evaluated by MTT assay. Data are expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments. Significance was determined by the Student's t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. untreated control).

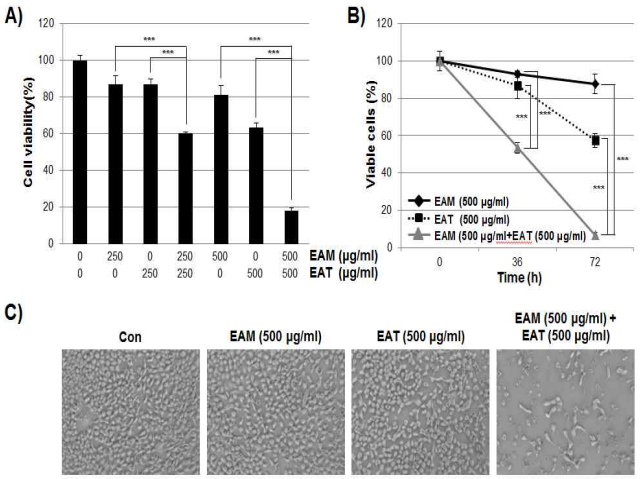

Fig. 2. Effects of combined treatment of EAM and EAT on cell viability in H1299 cells. (A) Cells were seeded onto 96 well plates and treated with the indicated concentrations of EAM and EAT for 72 h. The cell viability was evaluated by MTT assay. (B) Cells were seeded onto 12 well plates and treated with EAM (500 ㎍/㎖) and EAT (500 ㎍/㎖) for indicated time periods. The viable cell was evaluated by trypan blue exclusion assay. Data are expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments. Significance was determined by the Student's t-test (*** P < 0.001 vs. respective control). (C) Cells were treated with EAM (500 ㎍/㎖) and EAT (500 ㎍/㎖) for 72 h. Cell density and morphology were visualized by microscope (original magnification, 50X).

2. EAM과 EAT 병용처리가 H1299 세포의 colony formation에 미치는 영향

Soft agar assay는 암세포와 같이 유전적으로 변이를 일으킨 세포가 anchorage-independent하게 colony를 형성하며 자라는 특징을 바탕으로 고안된 실험으로서 세포를 in vivo와 가까운 3D 상태로 자라게 함으로써 tumorigenicity를 평가할 수 있는 주요한 도구가 된다[31]. EAM과 EAT 병용처리가 H1299 세포의 colony formation에 미치는 영향을 확인하기 위해 soft agar assay를 시행한 결과 EAM (500 ㎍/㎖)과 EAT (500 ㎍/㎖) 단독처리군이 각각 대조군에 비해 80%와 60% 이상의 colony formation을 보인 반면 병용처리군은 20% 내외로 colony formation이 현저하게 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3A and 3B). 이를 통해 EAM과 EAT 병용처리가 각각의 단독처리에 비해 H1299의 tumorigenicity 억제에 있어 synergy 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

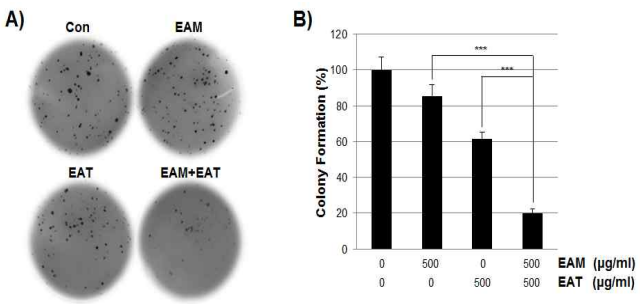

Fig. 3. Effects of combined treatment of EAM and EAT on colony formation in H1299 cells. Cells were seeded in soft agar and the colony formation ability was examined in the presence of EAM (500 ㎍/㎖) and EAT (500 ㎍/㎖) for 14 days. (A) The colonies were visualized by digital camera. (B) The relative colony formation was assessed by counting individual colonies using Image J. Data are expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments. Significance was determined by the Student's t-test (*** P < 0.001 vs. respective control).

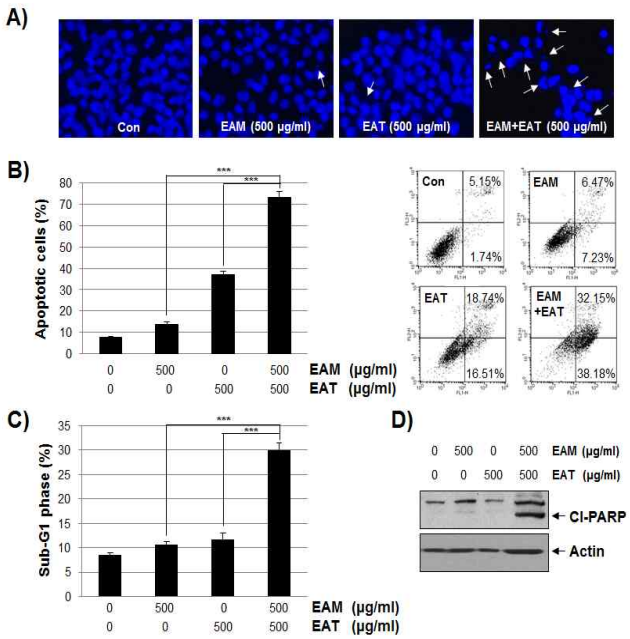

Fig. 4. Effects of combined treatment of EAM and EAT on apoptosis induction in H1299 cells. Cells were seeded and treated with EAM (500 ㎍/㎖) and EAT (500 ㎍/㎖) for 72 h. (A) To observe the changes of nuclear morphology, cells were stained with DAPI solution. The stained nuclei were observed under fluorescent microscope using blue filter (original magnification, 400X). The apoptotic nuclei were indicated as white arrow. (B) Annexin V/PI double staining was conducted using a flow cytometer. Annexin V-positive population was determined as apoptotic cells. (C) Cells were stained with PI solution and sub-G1 DNA content was evaluated using a flow cytometer. Data are expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments. Significance was determined by the Student's t-test (*** P < 0.001 vs. respective control). (D) Cells were lysed and the cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels, transferred onto PVDF membrane. The membrane was probed by the indicated antibodies, and the proteins were visualized by an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

3. EAM과 EAT 병용처리가 H1299 세포의 apoptosis에 미치는 영향

다음으로 EAM과 EAT 병용처리가 H1299 세포에 유발하는 죽음의 형태가 apoptosis인지를 확인하기 위하여 먼저 DAPI staining을 통해 핵을 염색하였다. 일반적으로 apoptosis가 일어날 때 염색질 응축과 DNA 단편화로 인해 핵이 작은 조각으로 나눠지게 되는데, DAPI staining 결과 EAM과 EAT 단독처리군에 비해 병용처리군에서 핵의 단편화가 현저히 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A).

이러한 핵의 변화는 apoptosis의 후기 단계에 일어나는 변화로서 EAM과 EAT의 병용처리가 초기 apoptosis에 미치는 영향을 조사하기 위해 annexin V/PI double staining을 시행하였다. Apoptosis 초기에 나타나는 변화로서 세포막 내부에 위치하는 phosphatidylserine (PS)이 세포막 외부로 이동하여 annexin V와 결합할 수 있게 되고, apoptosis 후기 단계로 가면 세포막에 pore가 형성되면서 PI에 의해 핵이 염색된다[32]. Annexin V/PI 염색 후

annexin V+/PI- 세포와 annexin V+/PI+ 세포를 각각 apoptosis 초기세포와 후기세포로 분류하여 합산한 결과 EAM과 EAT 단독처리군에 비해 병용처리군에서 apoptosis 초기세포와 후기세포가 모두 현저하게 상승하여 전체적인 apoptosis 비율이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 이와 함께 Flow cytometry로 apoptosis 여부를 확인할 수 있는 또다른 방법인 cell cycle 분석을 시행한 결과 apoptosis를 일으킨 세포를 의미하는 sub-G1기 세포 비율이 EAM과 EAT 단독처리군에서는 10% 내외로 control 세포 대비 크게 증가하지 않았으나, 병용처리군에서는 30%에 달하여 현저한 증가를 보였다 (Fig. 4C).

마지막으로 apoptosis의 핵심적인 marker 단백질에 해당하는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 단편화를 웨스턴블롯으로 확인하였다. Caspase-3의 기질 단백질로 알려져 있는 PARP는 apoptosis 유발 시 활성화된 caspase-3에 의해 분해되어 본래의 기능인 DNA 수복기능을 상실하게 되는데[31], Fig. 4D에 나타나듯이 EAM과 EAT 단독처리군에서는 PARP의 cleavage가 관찰되지 않으나, 병용처리군에서는 cleaved PARP의 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4D). 상기한 결과들은 EAM과 EAT에 의해 유발되는 H1299 세포의 사멸이 apoptosis 유발에 의한 것임을 명백히 보여준다.

고 찰

본 연구에서는 폐암에 대한 황기와 사삼의 항암시너지 효과를 검증하였다. 한의학적으로 폐는 氣를 운행시키고, 습기를 머금고 있어야 건강하며, 건조함을 싫어하는 장기로서 중의학의 다양한 임상연구에 따르면 폐암의 발병원인 역시 氣와 陰液이 虛해져 나타나는 것이므로 폐암치료에 益氣養陰法을 적극적으로 응용해왔다[6,7]. 흥미롭게도 益氣養陰法을 기반으로 한 폐암 치료처방들을 분석해보면 공통적으로 가장 빈용되는 약재로서 황기와 사삼을 들 수 있는데[6,7], <동의보감>에 따르면 황기는 대표적 補氣劑로서 癰疽, 瘡이 오래된 것을 치료하고, 고름을 빼내며, 통증을 멎게 한다고 하였고, 사삼은 肺氣와 폐 속의 陰氣를 補하고 腫毒을 삭인다고 하였으므로 두 약재 모두 癰腫을 치료하는 효능이 있어 肺癰의 범주에 속하는 폐암 치료에 효과적으로 운용할 수 있을 것으로 사료된다[11]. 현대의 약리학적인 연구 역시 황기와 사삼이 암세포에 대한 직접적인 사멸효과 뿐만 아니라 면역세포나 혈관내피세포와 같은 종양미세환경을 조절하여 항암활성을 가짐을 보여주고 있다[12-21,26-30]. 즉, 황기와 사삼을 폐암치료에 적용할 수 있는 근거가 충분하나, 이들의 combination effect에 대해서는 전혀 알려진 바가 없었다.

그 동안 폐암에 대한 국내 한의학 논문의 연구방향을 살펴보면 전임상연구 대부분이 단일한약재나 복합처방을 대상으로 하고 있는데, 단일한약재는 君臣佐使論에 근거하여 여러 한약재의 배합을 중시하는 한약처방의 고유한 장점과 한의학 임상현실을 반영하지 못하는 문제가 있고, 복합처방의 경우 지나치게 많은 한약재가 들어가 있어 신약개발의 측면에서 작용기전과 유효성분을 규명하기 어려운 문제가 있다. 따라서 임상에서 공통적으로 빈용하는 한약재의 가장 단순한 combination에서부터 그 효능과 기전을 규명할 필요가 있을 것으로 사료된다. 최근 전세계적으로 한약재 간의 combination effect와 그 기전을 밝히는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 예를 들어 Wang 등[34]은 중국에서 개발된 한방 백혈병 치료제의 세 가지 구성약물의 combination effect를 조사한 결과 항암효과는 계관석의 주요성분에 의해 나타났으며, 청대와 단삼은 계관석의 주요성분이 암세포 내로 잘 수송되도록 돕는 역할을 함을 증명하였다. Ma 등[35]은 서양고추나물에 포함된 두 가지 성분을 combination으로 처리하여 혈액암세포에 대한 항암시너지효과를 입증하였으며, 김 등[36]은 synergy effect가 있다고 밝혀진 한약재 성분들의 combination을 분석해본 결과 주요효능을 가진 major compound, 약효를 보조적으로 돕는 complementary compound, 다른 성분의 독성을 줄여주는 neutralizing compound, 다른 성분이 타겟 세포로 잘 들어가게 하는 delivery compound가 서로 상호작용하면서 synergy를 일으킴을 보고하였고, 이는 곧 한의학의 君臣佐使論과 일맥상통한다고 주장하였다. 이러한 연구들은 다양한 성분의 combination이 단일성분보다 더욱 우수한 효과를 가짐을 입증한 연구로서 targeted therapy의 한계가 드러나는 현 시점에서 한의학 古書나 임상연구를 통해 각 질병단위에 효과 있는 것으로 알려진 한약재들의 다양한 combination을 연구하는 것이 매우 유망한 치료전략이 될 것임을 시사한다. 본 논문에서 연구대상으로 삼은 황기 역시 다른 한약재와의 배합 연구가 몇 가지 진행되었는데, 김[37]은 황기와 당귀로 구성된 당귀보혈탕의 배합비율에 따라 대장암세포주에 대한 항암활성이 달라진다고 보고하였으며, 손 등[38]은 황기 및 단삼을 유효성분으로 하는 항암제 부작용 완화용, 항전이 및 항피로 조성물을 개발한 바 있다.

본 연구는 H1299 대장암세포에서 황기와 사삼의 항암 시너지 효과를 조사한 결과 황기와 사삼 단독처리에 비해 병용처리 시 H1299 세포의 생존율과 tumorigenicity가 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2 and 3). 이는 또한 핵의 단편화, annexin V-positive 세포 및 sub-G1기 세포의 증가, PARP의 cleavage 등을 통해 apoptosis 유발과 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 이들 결과는 황기와 사삼을 단독으로 투여했을 때보다 병용투여했을 때 폐암 치료에 보다 효과적일 것임을 시사하며, 실제 중의학에서 폐암 치료 시 益氣養陰法을 바탕으로 황기와 사삼을 주요한 약재로 병용투여하고 있는 데에 전임상적 근거를 제시하고 있다고 하겠다. 그러나 본 연구는 황기와 사삼의 항암 시너지 효과가 어떤 분자적 기전을 통해 일어나는 것인지 명확히 밝히지 못했으므로 향후 그 기전에 대한 연구가 심도 깊게 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

H1299 인체폐암세포에서 황기와 사삼 병용처리의 항암시너지 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 황기와 사삼 단독처리에 비해 병용처리 시 H1299 세포의 생존율과 colony 형성이 현저히 감소하였고, 이러한 결과는 황기와 사삼의 병용처리 시 H1299 세포의 apoptosis 유발이 현저히 증가하였기 때문으로 판

단된다.

이상의 결과는 황기와 사삼의 병용처리에 의해 폐암에 대한 항암효과를 높일 수 있으며, 향후 새로운 폐암 치료제 개발에 있어서 한약재의 combination effect와 그 기전을 연구해야 할 필요성이 있음을 시사하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 일반연구자지원사업(신진연구지원사업)의 지원에 의해 수행되었음(과제번호 NRF-2016R1C1B2015076).

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2016;66(1):7-30.
2. National Cancer Information Center. Available from: http://www.cancer.go.kr/mbs/cancer.
3. Liu LK, Li YF, Wang XX. Exploraion of the Pathogenesis and Therapeutic Methods of Lung Cancer. China Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine. 2004;10(5):75.
4. Geng G, Sun FY. Efficacy of Yiqi Yangyin in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine. 1991;4:4-5.
5. Ma CY, Tang YJ. Application of Yiqi Yangyin in lung cancer. Journal of Shandong college of traditional chinese medicine. 1996;20(3):178-9.
6. Zhang T, Wang B. Clinical study on integrated Chinese and western medicine combined with radiotherapy in treatment of patients with advanced lung cancer. Journal of Clinical and Experimental Medicine. 2013;12(2):108-10.
7. Liang F, Zhang Y, Li CH, Cao HT. Effect of Yiqi Yangyin Jiedu Formula on T-Cell Subsets and Shifting of Th1/Th2 Balance in NSCLC Patients. Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine. 2011;25(5):8-10.
8. The Jointly Published Textbook Compilation Committee of Oriental College of Medicine Nationwide Department. Herbology. Seoul: Younglim press; 2004.
9. Xie ZF. Classified dictionary of traditional Chinese medicine. Beijing: New World Press; 1994. p. 374.
10. Rios JL, Waterman PG. A review of the pharmacology and toxicology of Astragalus. Phytotheraphy Research. 1997;11:411-8.
11. Huh J. Donguibogam. Seoul: Daeseong Culture & Cultural Company; 1981.
12. Hong MY, Park WH, Shin SS, Choi DY, Lee TG. Effects of Acupuncture and Radix Astragali aqua-acupuncture at Synsu(BL23) on transcriptional expression of mouse cytokine IL-1α. Journal of Pathology in Korean medicine. 1999;13(2):33-40.
13. Bae WY. The effect of Astragali Radix Aqua-acupuncture on immune responce induced by methotrexate in mice. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. 1994;15(1):49-66.
14. Ryu JS, Cho KH, Son YH, Nam KS, Lim JK. Effect of Astragali Radix Aqua-acupuncture Solution on the Initiation Carcinogenesis. Korean Journal of Acupuncture. 2001;18(2):1-6.
15. Duan P, Wang ZM. Clinical study on effect of Astragalus in efficacy enhancing and toxicity reducing of chemotherapy in patients of malignant tumor. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2002;22:515-7.
16. Zou YH, Liu XM. Effect of Astragalus injection combined with chemotherapy on quality of life in patients with advanced non-small cell lung cancer. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2003;23:733-5.
17. Chu DT, Wong WL, Mavligit GM. Immunotherapy with Chinese medicinal herbs I. Immune restoration of local xenogeneic graft-versus-host reaction in cancer patients by fractionated Astragalus membranaceus in vitro. J Clin Lab Immunol. 1988;25:119-23.
18. Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of Astragalus membranaceus, a Chinese medicinal herb. Biochem Biophys Res Commun. 2004;320(4):1103-11.
19. Li Q, Bao JM, Li XL, Zhang T, Shen XH. Inhibiting effect of Astragalus polysaccharides on the functions of CD4+CD25 highTreg cells in the tumor microenvironment of human hepatocellular carcinoma. Chin Med J. 2012;125(5):786-93.
20. Shao P, Zhao LH, Zhi C, Pan JP. Regulation on maturation and function of dendritic cells by Astragalus mongholicus polysaccharides. Int Immunopharmacol. 2006;6:1161-6.
21. Auyeung KK, Woo PK, Law PC, Ko JK. Astragalus saponins modulate cell invasiveness and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma cells. J Ethnopharmacol. 2012;141(2):635-41.
22. Shin DS, Seo YB. The Experimental Studies on the Immunomodulational Effects of Adenophorae Radix. The Korea Journal of Herbology. 2000;15(1):31-43.

23. Song MS. Experimental Study on the Suppression Effect of Asthma and Immune Response Improvement of Adenophorae Radix Herbal-Acupuncture. Daejeon University. 2014.
24. Lim NY, Lim JR, Kwon KJ, Kim YS, Baek SK, et al. Inhibitory Effect of Methanolic Extract from Adenophorae Radix on Melanogenesis. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2004;18(3):747-53.
25. Min SH. A comparative Study on the Anti-oxidant Effect of Adenophorae Radix, Codonopsis lanceolatae Radix and Glehniae Radix cum Rhizoma. Kyunwon University. 2006.
26. Yu X, Li L, Han CJ, Zhang QZ. Effects of Codonopsis lanceolata total sanponin on apoptosis in HepG2 cells. J Jilin Univ (Medicine Edition). 2011;6:41.
27. Lee KW, Jung HJ, Park HJ, Kim DG, Lee JY, Lee KT. Beta-Dxylopyranosyl-(1→3)-beta-D-glucuronopyranosyl echinocystic acid isolated from the roots of Codonopsis lanceolata induces caspase-dependent apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. Biol Pharm Bull. 2005;28:854-9.
28. Wang L, Xu ML, Hu JH, Rasmussen SK, Wang MH. Codonopsis lanceolata extract induces G0/G1 arrest and apoptosis in human colon tumor HT-29 cells involvement of ROS generation and polyamine depletion. Food Chem Toxicol. 2011;49:149-54.
29. Byeon SE, Lee YG, Cho JY. Regulatory effects of Codonopsis lanceolata on gene expression of GM-CSF in macrophage-like cells. J Ethnopharmacol. 2009;123:185-9.
30. So JN, Kim JH. Effects of Codonopsis lanceolata Extracts on bFGF-induced Angiogenesis in vitro. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 2003;18(1):25-9.
31. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, et al. The soft agar colony formation assay. J Vis Exp. 2014;27(92):e51998.
32. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry. 1998;31(1):1-9.
33. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. Embo J. 1995;14(22):5579-88.
34. Wang L, Zhou GB, Liu P, Song JH, Liang Y, Yan XJ, Xu F, Wang BS, Mao JH, Shen ZX, Chen SJ, Chen Z. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(12):4826-31.
35. Ma XH, Zheng CJ, Han LY, Xie B, Jia J, Cao ZW, Li YX, Chen YZ. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. Drug Discov Today. 2009;14(11-12):579-88.
36. Kim HU, Ryu JY, Lee JO, Lee SY. A systems approach to traditional oriental medicine. Nat Biotechnol. 2015;33(3):264-68.
37. Kim BW, Yoon HJ, Jeon HS, Yoon HJ, Kim CH, Park SD. Effect of Dangguibohyultang and its combinations on apoptosis in human colorectal adenocarcinoma HCT116 cells. The Korea Journal of Herbology. 2006;21(2):37-46.
38. Son CK, Cho JK, Shin JW, Han SH. 1020100041431 (2010.04.22.) Composition consisted of Astragalus membranaceus and Salvia miltiorrhiza for reduction of side effects of anticancer drug, anti-metastasis and anti-fatigue.