C6 Glioma 세포에서 Protein Kinase C Alpha 발현 저해를 통한 송절 약침액의 이주 억제 효과

민일국¹ · 이강파¹ · 장해룡¹ · 문진영

동국대학교 한의과대학 경혈학교실, ¹동국대학교 과학기술대학 생명과학과 세포유전학 실험실

Pinus densiflora Gnarl Inhibits Migration through Suppression of Protein Kinase C in C6 Glioma Cells

Ilguk Min¹, Kangpa Lee¹, Haeryong Chang¹, Jinyoung Moon

Department of Acupoint, College of Korean Medicine, Dongguk University,
¹Division of Bio Science, College of Science and Technology, Dongguk University

Objectives : *Pinus densiflora* gnarl, called Song-Jeol in Korean medicine, has been used to cure inflammatory diseases such as arthritis. In the present study, we evaluated inhibitory property of Song-Jeol pharmacopuncture(SJ) on C6 glioma cell migration. **Methods :** To evaluate cell viability on C6 glioma cells of SJ, the viability was assessed by using Ez-cytox assay kit. The cell migration was assessed by wound-healing assay and Boyden chamber assay, respectively. LPS-induced NO productions were determined by using the Griess reagent. The expression of iNOS and protein kinase C(PKC)- α were estimated by western blotting assay. **Results :** In the wound-healing assay and Boyden chamber assay, SJ showed a significant inhibition on serum-induced C6 glioma cell migration. In addition, NO production was decreased by SJ through suppression of iNOS expression in LPS-stimulated C6 glioma cell. Furthermore, LPS-induced protein kinase C(PKC)- α expression was effectively inhibited by SJ. **Conclusions :** These results demonstrated that SJ was useful for the suppression of the C6 glioma cell migration.

Key words : *Pinus densiflora* gnarl, migration, iNOS, protein kinase C, C6 glioma cells

서론

우리나라 10대 사망원인으로는 암, 심장 질환, 뇌혈관 질환, 고의적 자해(자살), 당뇨병, 폐렴, 만성 질환, 간질환, 운수사고, 고혈압성 질환 순으로 우리나라 총 사망자 수의 70% 정도를 차지하고 있다¹⁻³⁾. 그 중 가장 높은 사망원인을 차지하고 있는 것은 암이다⁴⁻⁶⁾.

암은 정상조직을 파괴하며 인체 내에서 급속도로 자라서 주위 조직에 침윤되고⁷⁾, 다른 조직으로 전이되어 수개월내지는 수년 내

에 생명을 빼앗는 무서운 질병으로 전 세계적으로 암에 대한 사망률은 해마다 증가하는 추세이다^{8,9)}.

암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다^{10,11)}. 또한 수술, 방사선치료 및 항암화학요법의 다양한 의학적인 노력에도 불구하고, 그 예후가 불량하며 사망률이 개선되지 않는 질병이라는 점에도 그 중요성이 부각되고 있다¹²⁻¹⁴⁾.

그 중 신경교종(glioma)이란 뇌에 발생하는 악성종양으로서 원

Received May 18, 2015, Revised May 26, 2015, Accepted June 1, 2015

Corresponding author: Jinyoung Moon

Department of Acupoint, College of Korean Medicine, Dongguk University, No. 534, Korean Medicine Building, 814-9, Siksa-dong, Goyang 410-773, Korea
Tel: +82-31-961-5830, Fax: +82-31-961-5823, E-mail: ampmoon@dongguk.ac.kr
This work was supported by the Dongguk University research Fund of 2015.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

발성 뇌종양의 약 50%를 차지하고 있다¹⁵⁾. 악성신경교종에 대해서는 수술, 방사선요법, 화학요법, 방사선수술(감마나이프수술) 등을 조합해서 치료를 하고 있다. 이 종양은 정상적인 뇌에 침윤하는 형태로 자라기 때문에 수술로 전부 적출하는 것은 불가능한 경우가 많다¹⁶⁻¹⁸⁾. 하지만, 이러한 시술방법은 가장 악성정도가 높은 교모세포종도 최대로 가능한 범위에서 종양을 제거한 경우일수록 생존 기간이 길어지기 때문에 가능하다면 수술을 시행한다. 하지만 종양을 전부 적출하면 정상적인 뇌의 기능이 손상될 수도 있다¹⁹⁾. 더욱이, 방사선치료는 원칙적으로 모든 악성신경교종에 대해 실시된다. 예전에는 뇌 전체에 방사선을 조사했지만, 최근에 와서는 방사선치료 후의 장애를 줄이기 위해서 가능한 한 종양에 국한시켜서 조사하고 있으며 경우에 따라서 방사선수술이 사용되기도 한다^{20,21)}.

또한, 항암제 투여는 조기암을 비롯한 암치료의 전과정에 대부분 투여되고 있으며 이는 항암제가 전신적으로 작용하기 때문에 치료 및 전이를 예방하기 위하여 선호되고 있다고 볼 수 있다. 그러나 항암제가 암세포에 대한 항암효과 이외의 정상세포에 대해서도 강한 독성과 약제내성과 같은 부작용을 나타내고 있기 때문에 부작용이 적은 천연물질을 대상으로 개발 연구에 노력하고 있다. 따라서 신경 교종의 악성을 진행을 막기 위해서는 세포사멸의 유도 보다는 암세포의 이주를 저해하는 치료 방법을 선택하는 것이 효과적이라고 할 수 있다²²⁾. 한편 소나무의 효능과 관련한 연구보고에서 소나무의 잎과 꽃가루에서 항산화, 항암 및 항염증 효과가 있다고 다수 보고되어지고 있다²³⁻²⁵⁾. 그러나, 소나무의 마디인 松節과 관련한 연구, 특히 본 약물이 신경교종 세포에 미치는 연구는 미흡한 실정이다.

한편 Protein kinase C(PKC)는 세포의 이동, 성장, 분화 및 증식 등의 작용을 매개하고 특히 암세포의 이주에 관여하는 결정적 인자로 알려져 있다²⁶⁾. 또한 PKC의 활성 증가는 우태아 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 이주의 중간매개체로 알려져 있으며²⁷⁾, lipopolysaccharide(LPS) 자극으로 신경교종 세포의 NO 생성과 iNOS의 발현도 유도 하는 것으로 보고되었다²⁸⁾. 그러므로, 신경교종 세포에서 PKC 단백질 발현을 효과적으로 저해할 수 있는 약물은 iNOS의 과발현 및 NO의 과다 생성을 조절하여 신경교종가 정상세포로의 침윤을 차단해 결국 종양의 진행과 악화를 방지할 수 있으며, 이는 신경교종 질환의 효과적인 치료에 대한 새로운 접근 방법이 될 수 있을 것이다.

이에 본 연구에서는 松節 약침액이 신경교종 질환에 대한 항암제로서의 개발 가능성을 알아보기 위한 선행 연구로 C6 glioma cell을 대상으로 세포의 이주에 대한 저해 활성을 확인하고, LPS로 유도된 NO의 과잉 생성과 iNOS 및 PKC 단백질의 발현에 대한

효과를 관찰하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), phosphate buffered saline(PBS)은 HyClone사(Logan, UT, USA), fetal bovine serum(FBS)은 WelGENE사(Seoul, Korea), penicillin-streptomycin은 Gibco사(Carlsbad, California, USA)에서 구입하였다. Ez-cytox assay kit는 Daeil Lab Service(Seoul, Korea)에서, Pierce BCA protein assay kit는 Thermo Scientific(Rockford, IL, USA)에서, LPS와 Diff Quick stain은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Primary antibody와 secondary antibody는 Cell signaling Technology(Beverly, MA, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 약제와 추출

松節은 동국대학교 한방병원(경북, 경주시)에서 구입하였다. 松節 약침액(Song-Jeol pharmacopuncture: SJ)의 제조는 水劑-알콜 沈法에 따랐다. 즉, 먼저 작은 크기로 자른 600 g의 松節에 500 ml의 증류수를 가하여 3시간 동안 열수 추출한 다음, 침전물을 여과한 후, 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 농축액에 99.9% 에탄올을 가하여 75%, 85% 및 95% 에탄올 용액으로 만들면서, 각각의 농도에서 생성된 침전물을 여과 하였다. 최종 여액을 다시 감압농축하여 에탄올을 완전히 제거하였고, 동결건조 과정을 거쳐 최종 8.8 g(회수율 1.5%)의 분말을 수득하였다. 한편, 회수된 분말은 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였으며, voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경혈학교실(경기도, 고양시)에 보관되어 있다.

3. 세포배양

본 실험에 사용된 세포인 C6 glioma cell은 흰쥐 신경교종 세포주로서 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 세포는 10% FBS, 1% antibiotics(penicillin-streptomycin)가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였고, 세포의 성장주기를 고려하여 2~3일 마다 100 mm dish에서 sub-culture하여 실험에 사용하였다.

4. 세포생존율 측정

C6 glioma 세포를 96 well-plate(5×10^3 cells/well)에 분주한 다음, 24시간 배양하였다. 그 후, 농도별 SJ(0, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$)를 처리한 후, 18 시간 동안 추가 배양하였다. 세포의 생존율을 측정하기 위하여 10 μl 의 Ez-cytox Assay reagent를 가하고 30분간 반응시킨 다음, microplate reader(Molecular Devices, Synnyvale, CA, USA)를 이용해 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. Scratch wound healing assay

C6 glioma 세포(1×10^5 cells/well)를 6-well plate에 분주한 다음, 혈청이 함유된 배양액으로 24시간 배양한 다음, 세포가 약 70% confluence로 자랐을 때, 배양액을 다시 무혈청 배지로 교환한 후, 24시간 동안 배양한 다음, PBS로 3회 세척하였다. 세척 후, 다시 혈청이 첨가된 배양액으로 교환한 다음, 농도별 SJ(0, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. 균일하게 자란 단일 세포층 위에 200 μl 멸균 피펫팁을 사용하여 scratch를 가한 시점을 시작으로 하여, 이후 24시간 동안 세포가 제거된 영역으로 이주되어 들어온 정도를 관찰하였다.

6. Boyden chamber assay

Boyden chamber(Neuro-Probe, Gaithersburg, Maryland, USA)는 2개의 chamber로 구성되며, C6 glioma 세포에 대한 SJ의 이주 억제 효능을 관찰하기 위하여, 먼저 상단 chamber에 C6 glioma 세포(1×10^5 cells/ml in serum free medium)를 well당 50 μl 주입하고, 하단 chamber에는 농도별 SJ(0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$)와 혈청을 가하였다. 한편 상단 및 하단 chamber의 사이에는 type I collagen으로 코팅된 polycarbonate filter membrane(8 μm pores, Neuro-Probe)을 부착시켰다. 그 후, Boyden chamber를 37°C에서 3시간 배양한 다음, membrane을 통과하여 이주되어 온 세포를 Diff Quick을 이용해 염색하였다.

7. Nitrite assay

C6 glioma 세포(5×10^5 cells/well)를 24-well plate에 분주하고, 12 시간 배양한 다음, 다시 무혈청 배지에서 24 시간 배양한 후, 농도별 SJ(0, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)와 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고, 다시 24시간 추가 배양하였다. 원심분리한 세포배양액에 동일 용량의 Griess 시약(0.1% naphthylethylene diamine/water, 1% sulfanilamide/5% phosphoric acid)을 가한 다음, 실온에서 10분간 반응시키고, ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정

하였다. 실험결과는 sodium nitrate 표준액을 이용한 standard curve로 NO의 생성량을 환산하였다.

8. Western blotting

세포를 PRO-PREPTM Protein Extraction Solution(iNtRON Biotechnology, Gyeonggi, Korea)을 이용하여 용해한 후, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 분리하였으며, BCA Protein assay kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)으로 분리된 단백질을 정량하였다. 20 μg 의 단백질을 100°C에서 5분간 변성을 유도한 뒤, 변성이 완료된 단백질은 12% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 이후 Polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(Pall Corp., Port Washington, NY, USA)으로 이동시킨 다음, 비특이적 단백질이 반응하는 것을 방지하기 위하여 5% BAS가 포함된 TBST(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 1시간 동안 blocking하고 1차 antibody(iNOS, PKC- α)를 3% BSA가 포함된 TBST에 희석하여 4°C에서 overnight하였다. 실온에서 15분씩 총 4회 TBST로 washing한 다음 2차 antibody를 2% skim milk가 포함된 TBST에 희석하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 실온에서 10분씩 총 3회 TBST로 washing하고 ECL용액에 반응시켜 단백질의 발현정도를 분석하였다.

9. 통계 처리

실험결과는 mean $\pm$ standard deviation(SD)으로 표기하였으며, Graphpad Prism software(version 4.00 for Windows, San Diego, CA, USA) 프로그램을 이용한 student's *t*-test 방법을 통해 유의성 여부를 분석하였고, 그 결과 $p < 0.05$ 일 경우에 한하여 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 세포 생존율에 대한 영향

SJ가 신경교종 세포의 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 계산하였을 때, SJ를 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 대조군과 유사한 수준의 생존율을 나타내었으나, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 현저하게 감소하였다. 따라서 300 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 고농도로 처리할 경우, 세포괴사 혹은 세포사멸이 야기될 가능성이 있으므로, 본 연구에서 목표로 하는 세포의 이주 억제 활성을 검토하기에는 부적합한 농도임을 알 수 있

었다(Fig. 1).

2. Wound-healing assay에서 SJ의 세포이주 억제 활성

SJ가 C6 신경교종 세포의 이주에 미치는 영향을 규명하기 위하여 본 실험에서는 wound-healing assay를 통해 관찰하였다. 단층으로 균일하게 자란 신경교종 세포에 멸균 피펫 팁으로 scratch를 가하여 점선안의 세포를 모두 제거하였다. 그 후, 24시간 동안 배양하여 세포가 제거된 점선안의 영역으로 세포가 이주되는 정도를 실험군 별로 비교 관찰하였다. 그 결과, 세포의 이주를 유도하기 위하여 혈청을 단독 처리한 대조군에서 이주된 세포의 정도를 100%로 계산하였을 때, SJ를 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과, C6 신경교종 세포의 이주가 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2).

Fig. 1. Effect of SJ on C6 glioma cell viability.

To estimate cell viability on C6 glioma cells of SJ, the cell viability was determined by using Ez-cytox assay kit. C6 glioma cells were incubated with 0, 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of SJ for 18 h. Each value of results represents the mean $\pm$ SD of independent experiments. * $p < 0.05$ compared with the control group.

3. Boyden chamber assay에서 SJ의 세포이주 억제 활성

Wound-healing assay를 통하여 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 이주를 효과적으로 억제함을 확인하였으므로, 본 실험에서는 이러한 효능을 보다 심도 있게 규명하기 위하여 Boyden chamber assay를 통해 이주 억제능을 재확인하였다. 먼저 하단 chamber에 혈청을 처리함으로써 상단 chamber에 주입된 신경교종 세포가 filter membrane을 통과하여 이주 하도록 유도한 다음, 이주된 세포를 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 혈청을 처리하지 않은 정상군의 세포 이주율을 100%로 계산하였을 때, 혈청을 단독 처리한 실험군에서 세포의 이주가 현저하게 증가하였다. 반면, SJ를 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 혈청으로 유도된 신경교종 세포의 이주가 혈청을 처리하지 않은 정상군의 수준으로 감소하였다(Fig. 3).

4. NO 생성과 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

C6 신경교종 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성량에 미치는 SJ의 영향을 nitrite assay로 관찰하였다. C6 신경교종 세포에 농도별로 SJ를 전처리하고, NO의 생성을 유도하기 위해 LPS를 처리하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비해 LPS 단독 처리군에서 NO의 생성이 현저하게 증가하였다. 반면, LPS 단독 처리군에 비해 SJ를 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서 NO 생성량이 현저하게 감소하였다(Fig. 4A). 특히, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 SJ를 처리한 실험군에서 LPS의 자극을 받은 C6 신경교종 세포로부터 생성된 NO를 가장 현저하게 억제하였으므로, 이러한 결과가 iNOS의 발현을 저해함에 기인했을 것으로 판단되어 이를 단백질 수준에서 확인하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비해 LPS 단독 처리군에서 iNOS의 발현이 강하게 증가하였다. 반

Fig. 2. The effect of SJ on serum-induced migration of C6 glioma cells by wound-healing assay.

(A) Photographs of scratch-wound assay showed that serum-induced C6 glioma cell migration could be inhibited by treatment with SJ. (B) The graph indicated the relative migration ratio, it was obtained by analyzing scratch-wound healing distance. Data represented are means $\pm$ SD. * $p < 0.05$ compared with FBS-treated alone.

Fig. 3. The effect of SJ on serum-induced migration of C6 glioma cells by Boyden chamber assay.

(A) Representative photographs of Boyden chamber assay showed that SJ inhibited serum-induced migration of C6 cells. (B) The graph showed that relative migration ratio could be inhibited by treatment with SJ. Data represented are means ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ compared with FBS-treated alone.

Fig. 4. Inhibition effects of SJ on NO production and iNOS protein expression in LPS-stimulated C6 glioma cells.

C6 glioma cells were incubated with 0, 50, 100, 200 μg/ml SJ with LPS for 24 h and their NO production levels were assessed by nitrite assay (A). C6 glioma cells were stimulated by LPS, and each condition (control, LPS alone, LPS with SJ) were incubated for 24 h. Western blot analysis showed that the protein expression of iNOS (B). The values are means ± SD. * $p < 0.05$ compared with LPS-treated alone.

Fig. 5. Effects of SJ on LPS-induced PKC protein expression.

C6 glioma cells were stimulated with LPS, and each conditions were incubated for 24 h. Western blot analysis showed that the protein expression of PKC. * $p < 0.05$ compared with LPS-treated alone.

면, SJ를 200 μg/ml의 농도로 처리한 실험군에서는 LPS로 유도된 iNOS의 발현 정도가 현저하게 감소하였다(Fig. 4B). 이 결과를 종합해 볼 때, LPS의 자극을 받은 C6 신경교종 세포는 NO를 과다 생성하였으며, SJ의 처리로 인해 LPS로 유도된 NO의 과다 생성이 억제되었으며, 이 결과는 iNOS의 발현을 저해함에 기인했을 것으로 판단되어진다.

5. C6 신경교종 세포에서 PKC 단백질 발현에 미치는 영향

SJ는 LPS로 유도된 iNOS의 발현 정도를 저해 시켰다. 이 결과로부터 SJ가 PKC 경로를 통해 iNOS를 저해하는지를 확인하기 위하여, LPS로 C6 신경교종 세포를 자극한 다음, 단백질을 회수하여 발현분석을 하였다. 그 결과, LPS의 처리로 인해 PKC의 발현이 증가하였으나, SJ를 200 μg/ml의 농도로 처리할 경우, PKC 발현

이 강하게 저해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

신경교종(glioma)은 여타 악성 종양과 달리 다른 장기로의 전이(metastasis)는 거의 일어나지 않으면서 정상조직으로의 이주(migration)와 침윤(invasion), 신속한 성장(growth)이 특징적이며, 수술, 방사선 및 화학 요법에 대해 내성을 가져 재발률이 높고, 아직까지 뚜렷한 치료법이 없는 실정이다. 또한 악성 신경교종 세포는 고형암(solid tumor)과는 달리 이동과 분산을 잘 일으키므로, 세포사멸 자극(apoptotic stimulation)을 유도하는 기존의 암치료법에 대해 저항성을 나타내는 특징이 있다. 따라서 신경교종의 악성진행을 막기 위해서는 세포사멸의 유도 보다는 암세포의 이주를 저해하는 방향으로 접근하는 것이 보다 효과적인 전략이라고 할 수 있을 것이다.

松節은 소나무(*Pinus densiflora*) 가지에 생긴 결절(마디)로苦溫한 性味를 지니며 祛風, 燥濕, 止痛 등의 효능이 있어 風寒濕으로 인한 하지관절의 마비동통, 굴신불리와 타박상으로 인한 어혈 및 역절풍의 치료에 사용되어 왔으며, 특히 임상에서 松節 약침 제제가 풍습성 관절염에 대한 치료 효과가 높은 것으로 알려져 있다^{29,30}. 松節과 관련한 연구로 저자 등은 이전의 연구에서 松節 약침액의 효능을 검토하여 활성산소종 및 활성질소종에 대한 소거능, 지질과산화 억제효과 및 금속 이온으로 유도된 human LDL의 산화적 손상에 대한 방어효과를 보고하였다³¹. 또한 RAW 264.7 세포를 이용한 본 약물의 항염증 효능과 관련한 연구에서 LPS로 유도된 활성산소종에 대한 소거효과, IL-6, IL-1 β 및 COX-2의 mRNA 발현 억제효과, HO-1 발현 유도작용 및 Ref-1 발현 저해작용을 통한 iNOS/NO에 대한 억제효과를 관찰하여 보고한 바 있다³².

본 연구에서는 전통적으로 염증 관련 질환의 치료에 사용되어 온 松節을 재료로 약침액을 조제하여 신경교종 세포에서의 효능을 검토하였고, 염증 매개물질의 조절을 통하여 본 약물이 신경교종 세포의 이주에 대한 억제 효능을 나타내는지 검토하였다.

먼저 신경교종 세포의 이주에 미치는 SJ의 영향을 검토하고자 본 연구에서는 wound-healing assay와 Boyden chamber assay를 통해 각각 신경교종 세포의 이주에 대한 저해능을 관찰하였다. 그 결과, 혈청을 첨가하였을 때 C6 신경교종 세포는 현저한 이주 현상을 보였으며, SJ의 처리로 인해 주변으로의 이주를 강하게 저해하는 결과를 보였다.

생체내의 NO 생성은 중요한 역할을 수반하는데 eNOS의 경우,

내피세포의 NO를 생성하는 효소이며, 혈관내피에서 감소된 NO는 동맥경화 등 혈관질환의 원인이 된다. 또한 신경교세포의 nNOS의 경우, 신경세포의 활성화자로 알려져 있다. 한편, iNOS는 LPS나 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 등의 cytokine 같은 염증 전(pro-inflammatory) 매개체들에 의해서 활성화되며, 정상세포를 변형시키고 종양세포의 신생혈관형성 유도를 통하여 각종 악성 종양으로의 이행을 일으킨다고 알려져 있다³³. 특히, protein kinase C(PKC) family는 conventional PKCs(α , β and γ), novel PKCs(δ , ϵ , η , and θ), atypical PKCs(μ , ξ and ι)로 나누어지는 것으로 보고되어 졌다³⁴. PKC- α 의 경우 생리적 반응을 매개하는 핵심 인자로 C6 신경교종 세포에서 세포이주에 핵심역할을 수행한다고 알려져 있으며³⁵, LPS에 의해 유도된 iNOS 발현증가 및 NO 생성증가는 PKC- α 의 발현을 통해 일어난다고 알려져 있다.

본 연구에서 SJ의 항염증 효능을 확인한 바, 흰쥐 C6 신경교종 세포에서 LPS로 유도된 NO의 과잉 생성과 iNOS의 발현을 효과적으로 감소시켜 본 약물이 우수한 항염증 효능을 지녔음을 알 수 있었으며, 이 결과는 SJ가 신경교종 세포의 염증 반응을 제어할 수 있음을 시사하고 있다. 이러한 결과를 보다 심도있게 확인하기 위해, 본 연구에서는 C6 신경교종 세포에 LPS를 처리한 다음, PKC- α 단백질 발현 양상을 관찰한 결과, SJ가 PKC- α 활성을 현저하게 억제함을 알 수 있었다.

결 론

이상의 연구결과는 松節 약침액은 신경교종 세포에서 iNOS의 발현과 더불어 NO의 생성을 억제하였고, PKC- α 의 활성 또한 억제하였다. 본 약물의 신경교종 세포의 이주 억제 효능은 PKC- α 와 iNOS의 발현의 억제에 기인할 것으로 추론된다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 松節 약침액은 신경교종 환자의 염증반응 제어와 암세포 이주 억제를 통하여 항암 활성을 나타낼 가능성이 시사되며, 향후 본 약물이 신경교종에 대한 효과적인 치료제로 개발될 수 있는 기초적 연구 결과를 얻었으므로, 이에 대한 보다 다각적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

This work was supported by the Dongguk University research Fund of 2015.

References

1. Zhou F, Liu H, Zhang X, Shen Y, Zheng D, Zhang A, Lai Y, Li H. Proline-rich protein 11 regulates epithelial-to-mesenchymal transition to promote breast cancer cell invasion. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 ; 7(12) : 8692-9.
2. De Vita F, Di Martino N, Fabozzi A, Laterza MM, Ventriglia J, Savastano B, Petrillo A, Gambardella V, Sforza V, Marano L, Auricchio A, Galizia G, Ciardiello F, Orditura M. Clinical management of advanced gastric cancer: the role of new molecular drugs. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(40) : 14537-58.
3. Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(29) : 9716-31.
4. Kibler JL, Tursich M, Ma M, Malcolm L, Greenbarg R. Metabolic, autonomic and immune markers for cardiovascular disease in posttraumatic stress disorder. *World J Cardiol*. 2014 ; 6(6) : 455-61.
5. Brink E. Considering both health-promoting and illness-related factors in assessment of health-related quality of life after myocardial infarction. *Open Nurs J*. 2012 ; 6 : 90-4.
6. Antognelli C, Del Buono C, Ludovini V, Gori S, Talesa VN, Crinò L, Barberini F, Rulli A. CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. *BMC Cancer*. 2009 ; 9 : 115.
7. Ge Y, Meng X, Zhou Y, Zhang J, Ding Y. Positive MACC1 expression correlates with invasive behaviors and postoperative liver metastasis in colon cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015 ; 8(1) : 1094-100.
8. Aroner SA, Rosner BA, Tamimi RM, Tworoger SS, Baur N, Joos TO, Hankinson SE. Plasma matrix metalloproteinase 2 levels and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol*. 2015 pii : S1877-7821(15)00046-6.
9. Hertrampf K, Wiltfang J, Katalinic A, Timm O, Wenz HJ. Recent trends in incidence and mortality of oral and pharyngeal cancer in Schleswig-Holstein in Northern Germany. *Community Dent Health*. 2012 ; 29(4) : 268-73.
10. Budanov AV. The role of tumor suppressor p53 in the anti-oxidant defense and metabolism. *Subcell Biochem*. 2014 ; 85 : 337-58.
11. Qi C, Lan H, Ye J, Li W, Wei P, Yang Y, Guo S, Lan T, Li J, Zhang Q, He X, Wang L. Slit2 promotes tumor growth and invasion in chemically induced skin carcinogenesis. *Lab Invest*. 2014 ; 94(7) : 766-76.
12. Biswas B, Rastogi S, Khan SA, Mohanti BK, Sharma DN, Sharma MC, Mridha AR, Bakhshi S. Outcomes and prognostic factors for Ewing-family tumors of the extremities. *J Bone Joint Surg Am*. 2014 ; 96(10) : 841-9.
13. Gartrell BA, Sonpavde G. Emerging drugs for urothelial carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2013 ; 18(4) : 477-94.
14. Dickey ID, Rose PS, Fuchs B, Wold LE, Okuno SH, Sim FH, Scully SP. Dedifferentiated chondrosarcoma: the role of chemotherapy with updated outcomes. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 ; 86-A(11) : 2412-8.
15. Anan'eva II, Malkarov MS, Korsakova NA, Balkanov AS, Dorofeev AE, Kachkov IA, Suchkov SV. Glial tumors of the brain: current aspects of their classification and bases for genetic predisposition. *Arkh Patol*. 2007 ; 69(1) : 54-60.
16. Rusthoven CG, Carlson JA, Waxweiler TV, Dally MJ, Barón AE, Yeh N, Gaspar LE, Liu AK, Ney DE, Damek DM, Lillehei KO, Kavanagh BD. The impact of adjuvant radiation therapy for high-grade gliomas by histology in the United States population. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014 ; 90(4) : 894-902.
17. Strowd RE 3rd, Holdhoff M, Grossman SA. Chemotherapy for treatment of grade II gliomas. *Oncology(Williston Park)*. 2014 ; 28(12) : 1036-43.
18. Kim JK, Jin X, Sohn YW, Jin X, Jeon HY, Kim EJ, Ham SW, Jeon HM, Chang SY, Oh SY, Yin J, Kim SH, Park JB, Nakano I, Kim H. Tumoral RANKL activates astrocytes that promote glioma cell invasion through cytokine signaling. *Cancer Lett*. 2014 ; 353(2) : 194-200.
19. Zhang W, Yamada H, Sakai N, Niikawa S, Nozawa Y. Enhancement of radiosensitivity by tamoxifen in C6 glioma cells. *Neurosurgery*. 1992 ; 31(4) : 725-9.
20. Lamfers M, Idema S, van Milligen F, Schouten T, van der Valk P, Vandertop P, Dirven C, Noske D. Homing properties of adipose-derived stem cells to intracerebral glioma and the effects of adenovirus infection. *Cancer Lett*. 2009 ; 274(1) : 78-87.
21. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett*. 2015 ; pii :

- S0304-3835(15)00195-0.
22. Bordonaro S, Romano F, Lanteri E, Cappuccio F, Indorato R, Butera A, D'Angelo A, Ferrà F, Tralongo P. Effect of a structured, active, home-based cancer-treatment program for the management of patients on oral chemotherapy. Patient Preference Adherence. 2014 ; 8 : 917-23.
23. Jiang Y, Han W, Shen T, Wang MH. Antioxidant activity and protection from dna damage by water extract from pine(*Pinus densiflora*) bark. Prev Nutr Food Sci. 2012 ; 17(2) : 116-21.
24. Jo JR, Park JS, Park YK, Chae YZ, Lee GH, Park GY, Jang BC. Pinus densiflora leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. Int J Oncol. 2012 ; 40(4) : 1238-45.
25. Kwon JH, Kim JH, Choi SE, Park KH, Lee MW. Inhibitory effects of phenolic compounds from needles of Pinus densiflora on nitric oxide and PGE2 production. Arch Pharm Res. 2010 ; 33(12) : 2011-6.
26. Kim GY, Oh YH, Park YM. Acidic polysaccharide isolated from Phellinus linteus induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. Biochem Biophys Res Commun. 2003 ; 309(2) : 399-407.
27. Hu JG, Wang XF, Zhou JS, Wang FC, Li XW, Lü HZ. Activation of PKC- α is required for migration of C6 glioma cells. Acta Neurobiol Exp(Wars). 2010 ; 70(3) : 239-45.
28. Paul A, Pendreigh RH, Plevin R. Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. Br J Pharmacol. 1995 ; 114(2) : 482-8.
29. Hur J. Dong-eui-bo-gam. Seoul : Bupin Publishing Co., Ltd. 2007 : 832, 860, 2004.
30. Ahn DK. Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. 331. Seoul : Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. 2006 : 346.
31. Leem SH, Lee KP, Moon JY. The effect of *Pinus Densiflora* gnarl extract for pharmacopuncture on human LDL oxidation induced by free radical and metal Ion. Korean Journal of Acupuncture. 2011 ; 28(2) : 23-36.
32. Lee KP, Moon JY. *Pinus Densiflora* gnarl extract for pharmacopuncture inhibits inflammatory responses through heme oxygenase-1 induction in lipopolysaccharide -stimulated RAW 264.7 macrophages. Korean Journal of Acupuncture. 2012 ; 29(1) : 37-46.
33. Xu X, Malave A. P38 MAPK, but not p42/p44 MAPK mediated inducible nitric oxide synthase expression in C6 glioma cells. Life Sci. 2000 ; 67(26) : 3221-30.
34. Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. Biochem J. 1998 ; 9 : 56-65.
35. do Carmo A, Patricio I, Cruz MT, Carvalheiro H, Oliveira CR, Lopes MC. CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells. Cancer Biol Ther. 2010 ; 9 : 56-65.