대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.18, NO.1 : 169 - 180 (2005)

鷄血藤이 자궁경부암세포의 세포자멸사 유도와 관련 유전자 발현에 미치는 영향

대구한의대학교 한의학과 부인과교실
김병회, 백승희

ABSTRACT

The effect of the stem of *Spatholobus suberectus* Dunn on the proliferation and gene expression related apoptosis in human cervical cancer cells

Byounghoe Kim, Seunghee Baek
Dept. of gynecology, College of Orinental Medicine, Daegu Haany University

Objective : *Spatholobus Suberectus* Dunn stems, Chinese vine plants, have been used for the relief of menstrual disorders and rheumatic arthralgia. In this study, we investigated the antitumor effect of *Spatholobus Suberectus* Dunn on cervical cancer in vitro.

Methods : HeLA cervical cancer cell lines were used as targets. We examined the effect of water extract from *Spatholobus Suberectus* Dunn on cell proliferation, cell cycle regulation and cell cycle-regulating gene expression. Further, we investigated the apoptotic effects of *Spatholobus Suberectus* Dunn on cervical cancer cell lines.

Results : *Spatholobus Suberectus* Dunn significantly inhibited the proliferation of cervical cancer cell lines in a dose-dependent and time dependent manner. Fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis indicated that *Spatholobus Suberectus* Dunn induced G1 cell cycle arrest. *Spatholobus Suberectus* Dunn enhanced the expression of $p21^{waf1}$ and $p27^{kip1}$ with cell cycle arrest. Further, *Spatholobus Suberectus* Dunn stimulated apoptosis via caspase3 pathway.

Conclusions : These findings suggest that *Spatholobus Suberectus* Dunn is a candidate agent for the treatment of cervical cancer. $p21^{waf1}$ and $p27^{kip1}$ may play an important role in *Spatholobus Suberectus* Dunn-induced cell cycle arrest and cell growth inhibition.

Key word : HeLA cell, cervical cancer cell, *Spatholobus Suberectus* Dunn

교신저자(백승희) : 대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대 부속대구한방병원 부인과 교실
전화 : 053-770-2107 이메일 : seunghee@dhu.ac.kr

Ⅰ. 緖 論

자궁경부암은 우리나라 여성에서 유방암, 위암, 대장암에 이어 네 번째로 높은 발생빈도를 보이는 악성종양으로서 2003년 한국 중앙 암등록사업 연례보고서에 의하면 전체 여성암의 약 10.1%에 달하고[1], 2001년도 대한 산부인과학회 부인암 등록사업 결과를 보면 연간 2800명의 신환이 발생하고 있다[2]. 전 세계적으로는 여성에서 발생하는 암 중 2번째로 많이 발생하며 연간 50여만 명의 신환이 발생하는 것으로 추정되고 있고[3], 전체 환자의 약 80% 정도가 아시아, 아프리카 및 남미 등지에서 발생하고 있다.

자궁경부암의 발생은 거의 100%에서 인유두종 바이러스 (human papillomavirus; HPV) 감염과 연관되어 있으며, HPV 감염에 의해 HPV E6, E7 발암 유전자 단백질이 각각 p53, pRb 종양억제인자 산물을 불활성화하여 자궁경부세포를 악성화 변형 (malignant transformation), 불멸화 (immortalization)를 유발하여 전구 암 상태인 상피이형증 (dysplasia)과 상피내암 (carcinoma *in situ*)까지 발생할 수 있다는 것이 과학적으로 증명되었다[4-5]. 특히 80여 종의 HPV 아형 중 HPV-16, 18의 경우 고위험 바이러스로서 이들에 감염된 세포에서 초기 발현하는 E6 단백질은 종양 억제 유전자인 p53 단백질과 결합하여 p53을 분해시키고, E7 단백질은 pRb 단백질을 인산화 시켜 E2F 단백질을 방출시킴으로써 세포주기를 변화시키고 자궁경부암을 일으키게 된다[6].

본 실험에 사용한 鷄血藤은 補血行血, 活血祛瘀의 效能이 있어 貧血, 月經不調, 痛經, 血虛經閉 등의 月經病에 주로 사용되는 藥物로[7-9] 실험적 연구로는 막지질 조성변화[10], HIV-1 protease 활성 억제[11], 항염 활성 효과[12], 조혈 및 면역작용[13], 종양전이 억제효과[14], 활막세포에 대한 면역반응[15], 세포주기 억제효과[16] 등이 보고되어 있으나, 鷄血藤이 자궁경부암에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

이에 著者는 鷄血藤의 자궁경부암 세포에 대한 효과를 실험적으로 규명하기 위하여 HPV-18 양성인 HeLA 세포주에 鷄血藤을 처리 한 후 증식억제 효과 및 세포자멸사를 확인하고 이와 관련된 유전자의 발현에 대하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材料

1) 藥材

콩과(Leguminosae)에 속하는 密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)의 작은 가지인 鷄血藤은 대구한의대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 精選하여 사용하였다.

2) 檢液의 調製

실험에 사용된 약제는 일체의 가공이나 修治를 加하지 않는 상태에서 사용하였으며 鷄血藤 40g을 1차 증류수 2000㎖로 첨가하여 2시간 30분 동안 전탕하여 검액 300㎖를 추출하였다. 추출한 검액을 100㎖가 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 뒤, -70℃ 이하에서 24시간 이상 defreeze한 후 96시간 동안 완전히 동결 건조시켜 13g의 粉末을 얻어 3차 증류수에 0.1g/㎖ 농도로 용해시킨 후 상층액을 0.2㎛ filter (Nalgene, USA)로 걸러서 실험에 사용하였다.

2. 方法

1) 자궁경부암세포의 배양

HPV-18 양성인 HeLa 세포주를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham

배양액에서 부유시킨 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다.

2) 자궁경부암세포의 생존세포수 산정

자궁경부암 세포주인 HeLA 세포를 60㎜ tissue culture dish 에 2×10^5 cell/dish로 세포를 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 lipofectamine을 이용하여 鷄血藤 검액을 처리한 후 transfection 시켰다. 이렇게 배양시킨 세포를 24~48시간 PBS 용액으로 수세 후, 1×trypsin- EDTA로 재부유시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 수세하여 재부유시킨 후, cell suspension 20㎕와 동량의 trypan blue 용액을 혼합하여 1분간 방치해 두었다. He-macytometer 상에서 3회 반복하여 살아있는 세포수만을 계산하였다.

3) Flow cytometric analysis

자궁경부암세포를 60㎜ tissue culture dish 에 3×10^5 cells/dish로 세포 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 후 대조군과 鷄血藤 검액을 농도별로 처리하였다. 세포를 24~48시간 배양시키고 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1.5㎖ tube에 옮기고 1000rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 재부유시킨 뒤 1000rpm 으로 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1㎖를 넣고 재부유 시킨 후, 4℃에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 PBS용액으로 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma, MO, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, MO, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5㎎/㎖, propidium iodide (Sigma, MO, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4℃에서 염색한 후 유세포분석기(FACS)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

4) DNA fragmentation analysis

자궁경부암 세포주에 鷄血藤 검액을 처리한 후 10mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 5mM EDTA와 0.5% Triton X-100이 든 완충액을 얼음에 30분간 용해시켰다. 용해된 용해질을 충분히 혼합한 후 10,000rpm 으로 20분간 원심분리 하였다. 상층액에 분절된 DNA를 동일한 양의 neutral phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25:24:1)로 추출한 뒤, 0.1㎍/㎖ ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

5) Western blot analysis

鷄血藤 검액을 농도별로 처리한 후 cyclin E 및 cell apoptosis에 관계하는 p27, p53, p21, Rb, p16, pro-caspase 3, PARP 유전자 단백의 발현차이를 확인하고, 세포주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10mM Tris-Cl(pH 7.4), 5mM EDTA(pH 8.0), 130mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2M phenyl- methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories Inc., PA, USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계(Du® 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595㎚에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, Bedford, UK)로 전기이동(electrotransfer)을 시행하였다. 전기이동 된 막을 blocking용액(5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체인 p27, p53, p21, p16, cyclin E, PARP

(Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1×TBS-T 용액(20mㅁ/ℓ Tris, 137mㅁ/ℓ Na Cl, 0.5% Tween 20%)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz, CA, USA)를 1;1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, NJ, USA)로 검출하였다

6) 통계분석

모든 시험은 3회 반복 측정하였으며, 유의값의 판정은 student's t-test, paired t-test를 이용하여 분석하였고, p값이 0.05 이하일 때를 유의값으로 하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 鷄血藤의 자궁경부암세포에 대한 증식억제 효과

鷄血藤에 의한 자궁경부암세포의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 배양된 자궁경부암 세포주인 HeLA 세포에 鷄血藤을 100, 200, 300 ㎍/㎖ 농도별로 처리한 결과, 24시간 후의 세포증식 억제효과는 농도가 높아질수록 증가하였으며, 300㎍/㎖ 에서는 70%의 증식이 억제되어 통계적으로 유의성을 나타내었다(Fig. 1).

2. 鷄血藤이 세포주기에 미치는 효과

자궁경부암세포에 鷄血藤을 100, 200, 300㎍/㎖의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기를 분석한 결과, 대조군은 subG1기가 19.06%로 나타났으나 鷄血藤은 300㎍/㎖ 농도에서 45.99%의 subG1기의 지연이 확인되어 세포자멸사의 量的 증거를 확인하였고 농도의 증가에 따라 subG1기의 연장이 증가됨을 관찰하였다(Fig. 2).

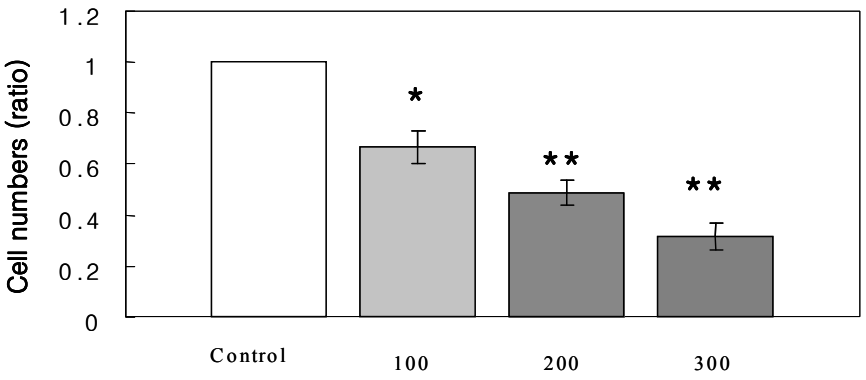
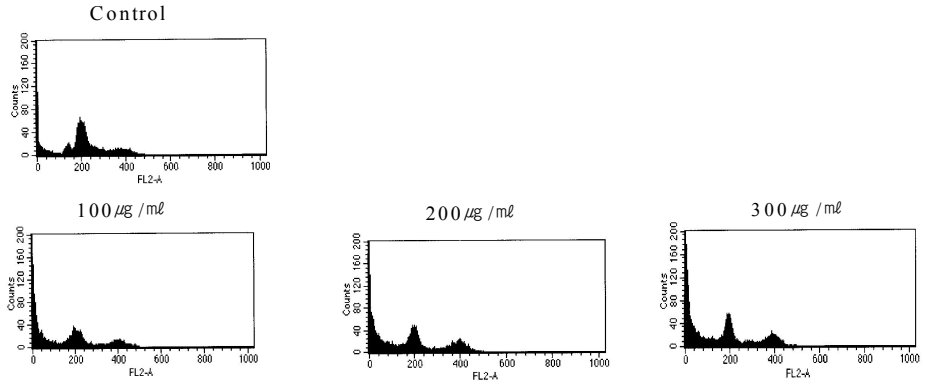


Fig. 1. HeLA cells were treated with indicated concentrations of *Spatholobus Suberectus* Dunn for 24hr. Cell proliferation was determined using the cell count assay(* p< 0.05 ** p< 0.01).



	Control	100㎍/㎖	200㎍/㎖	300㎍/㎖
Sub G1	19.06	43.75	43.57	45.99
G1	52.26	31.56	29.74	30.43
S	17.84	9.48	9.71	8.39
G2/M	10.63	12.06	15.84	14.91

(% gated)

Fig. 2. HeLA cells were treated with indicated concentrations of *Spatholobus Suberectus* Dunn for 24hr. Cell cycle profile were analyzed by FACS analysis. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

3. 鷄血藤의 pro-caspase 3, PARP 및 Rb 유전자에 대한 효과

자궁경부암세포에 鷄血藤을 100, 200, 300㎍/㎖의 농도로 처리하고 24시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3, PARP 및 Rb 유전자의 발현을 측정한 결과, 鷄血藤의 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 PARP는 농도가 증가할수록 발현이 감소하며 PARP cleavage는 농도가 증가할수록 발현이 증가되었고, pRb 유전자의 탈 인산화를 관찰하였다(Fig. 3).

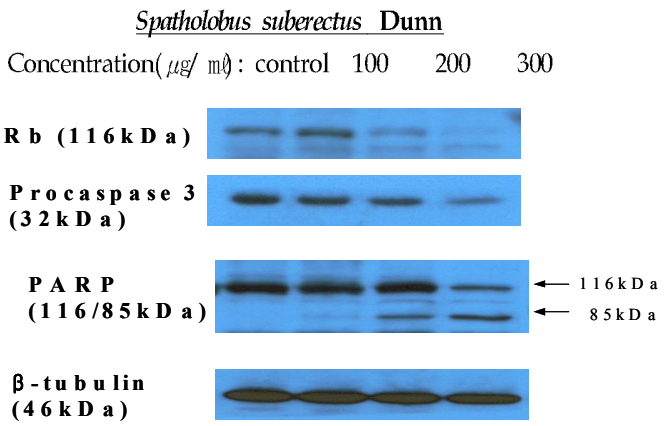


Fig. 3. HeLA cells were treated with indicated concentrations of *Spatholobus Suberectus* Dunn. Effect of Spatholobus Suberectus Dunn on pro-caspase 3, pRb, and PARP protein in HeLA cells. β-tubulin was used as internal control.

4. 鷄血藤의 세포자멸사 유도 효과

자궁경부암세포에 鷄血藤을 100, 200, 300㎍/㎖의 농도로 처리하고 24시간 후 DNA fragmentation을 분석한 결과, 대조군에 비하여 鷄血藤의 농도가 증가할수록 DNA의 분절현상이 증가함을 관찰하였다(Fig. 4).

5. 鷄血藤의 p27, p53, p21, 및 cyclin A, D1, E 유전자에 대한 효과

자궁경부암세포에 鷄血藤을 100, 200, 300㎍/㎖의 농도로 처리하고 24시간 후 cell cycle에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p27, p21유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 cyclinA, D1, E는 농도가 증가할수록 발현이 감소하였으며, p53 유전자의 발현은 변화가 없었다(Fig. 4).

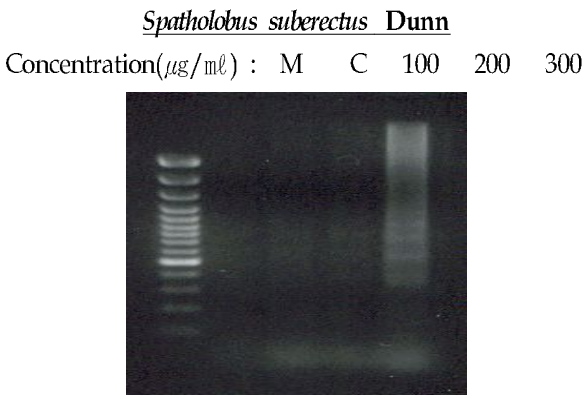


Fig. 4. HeLA cells were treated with indicated concentrations of *Spatholobus Suberectus* Dunn. To analyze fragmentation of genomic DNA, cells were treated for 24hr with control and *Spatholobus Suberectus* Dunn.

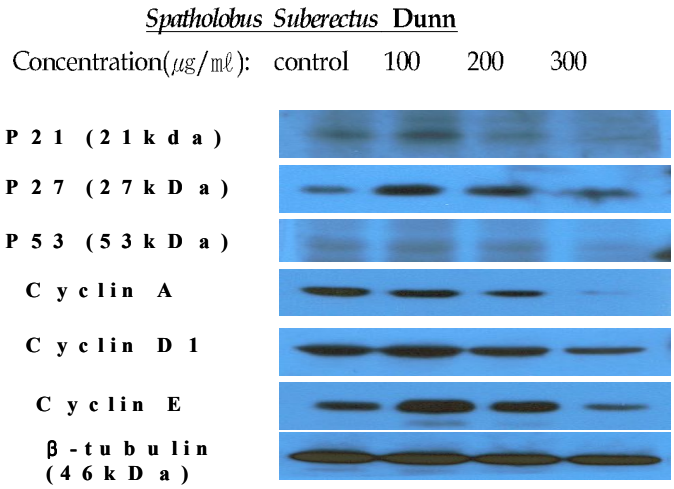


Fig. 5. HeLA cells were treated with indicated concentrations of *Spatholobus Suberectus* Dunn. Effect of *Spatholobus Suberectus* Dunn on p27, p21, p53, cyclinA, cyclin D1 and cyclin E protein in HeLA cells. β-tubulin was used as internal control.

Ⅳ. 考 察

인유두종 바이러스는 자궁경부암 조직에서 발견되며 자궁경부암의 주요인으로 알려져 있다. 그러므로 자궁경부암은 인유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV)의 감염 후 p53, pRb 단백질의 분해로 인해 세포주기의 변화로 암화과정이 발생하는 경우가 대부분을 차지하고 있으며, 일부의 경우 p53 유전자의 돌연변이에 의한 p53 단백질의 불활성화로 인한 세포주기 변화로 발생한다. 특히 80여종의 인유두종 바이러스 아형 중 HPV-16, 18의 경우 고위험 바이러스로서 이들에 감염된 세포에서 초기 발현하는 E6 단백질은 종양 억제 유전자인 p53 단백질과 결합하여 p53을 분해시키고 E7 단백질은 pRb 단백질을 인산화시켜 E2F 단백질을 방출시킴으로써 세포주기를 변화시키고 자궁경부암을 일으키게 된다[6].

자궁경부암에 해당하는 한의학적인 개념으로는 증상양상으로 보아 '崩漏', '帶下', '癥瘕', '血蠱', '五色帶下' 등이 있으며[17-18], 이 중 積聚物의 有無와 기타 증상의 유사성에 근거한다면 "癥瘕"가 가장 恰似한 疾患이라고 할 수 있다. 癥瘕의 治法으로는 대체적으로 養正則邪自除의 원칙하에 發病原因에 따라 活血 理氣 消積 破結 消痰의 治法을 使用하였다[19-20].

본 실험에 사용된 鷄血藤은 콩과(Leguminosae)에 속하는 密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)의 작은 가지로 汁液이 마치 닭의 피와 흡사하다고 해서 鷄血藤이라 불린다[21-22]. 鷄血藤은 淸代 《本草綱目拾遺[23]》에 수록된 약물로서 性味는 苦, 微甘, 溫, 無毒하고, 歸經은 肝, 腎經이며 補血行血, 舒筋活絡의 效能이 있어 貧血, 月經不調, 痛經, 血虛經閉, 風濕痺痛, 關節酸痛, 肢體癱瘓 등을 치료하는데 사용되어 왔으며 活血祛瘀하며 行血補血하는 작용이 주된 藥物이다.

위와 같은 鷄血藤의 효능으로 볼 때 자궁경부암에 대한 치료 효과가 있을 것으로 생각되어 자궁경부암세포의 직접적인 증식억제 효과를 조사하고 분자생물학적 기법인 세포주기분석법을 통하여 세포주기와 관련한 유전자들의 발현을 조사하였으며, DNA fragmentation 분석을 통하여 이러한 증식억제 효과가 세포자멸사와 관련된 것임을 확인하고, 또한 세포자멸사를 일으키는 기전에 대하여 관찰하였다.

배양된 자궁경부암 세포에 鷄血藤 검액을 100, 200, 300㎍/㎖의 농도로 처리하고 24시간이 지난 후, 세포를 회수하여 세포수를 측정한 결과, 농도가 높아질수록 증식억제 효과가 증가되는 것이 관찰되었으며, 특히 300㎍/㎖의 농도에서 자궁경부암세포의 증식억제 효과가 70%의 높은 결과를 나타내었다(Fig. 1). 또한 鷄血藤이 cell cycle에 미치는 영향을 조사하기 위하여 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과 대조군은 subG1기가 19.06%로 나타났으나 鷄血藤은 300㎍/㎖ 농도에서 45.99%의 subG1기의 지연이 확인되어 세포자멸사의 量的 증거를 확인하였고, 농도의 증가에 따라 subG1기의 연장이 증가됨을 관찰하였다(Fig. 2). 鷄血藤에 의한 세포자멸사 유도효과를 알아보기 위하여 DNA fragmentation 분석을 시도한 결과, 대조군에 비하여 鷄血藤의 농도가 증가할수록 특징적인 DNA의 분절현상이 증가됨을 관찰한 바 鷄血藤에 의한 증식억제 효과는 세포자멸사에 의한 것임을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

현재까지 수많은 세포자멸사 관련 유전자가 알려져 있는데, 그 중에서도 공통적인 경로는 단백질 분해 효소의 활성과 관련이 깊음이 알려져 있다. 특히 시스테인계 단백분해 효소인 caspase가 발견되면서 세포자멸사 기전의 중심적인 요소로 여겨지고 있다[24].

Caspase들은 항상 세포자멸사를 억제하고

있는 단백질들을 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase 중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있으며, 활성화된 caspase-3는 세포내의 여러 종류의 기질 단백을 절단한다[25].

Caspase에 의하여 선택적으로 절단되는 다양한 죽음기전이 알려져 있으며 그 중 PARP 단백질은 DNA 회복과정에 관계되는 핵 내에 존재하는 효소 중의 하나인데 이는 활성화된 caspase-3에 의하여 DNA 결합 부위로부터 절단되며 이러한 PARP의 특이적인 단백 분해 효소의 절단은 세포자멸사의 생화학적인 특징으로 간주된다[25-26]. 鷄血藤에 의한 세포자멸사의 경로를 밝히고자 caspase-3의 활성과의 관계에 대하여 알아본 결과, 鷄血藤 처리 농도가 증가할 수록 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 이러한 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소는 caspase-3의 활성도가 상대적으로 증가되었음을 의미하는 것이다. 또한, PARP 단백질의 양적인 감소가 관찰되어 활성화된 caspase-3에 의하여 116kDa의 PARP가 85kDa로 절단되는 정도가 증가하였음을 확인함으로써 DNA 회복의 실패로 인한 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). 따라서 자궁경부암 세포에 대한 鷄血藤의 처리는 caspase-3의 활성도를 증가시키며 이는 PARP 단백의 절단을 일으켜 종국에는 caspase 경로를 거쳐 세포자멸사가 일어나는 것으로 생각된다.

이러한 세포자멸사가 일어나는 기전을 관찰하기 위해 세포주기관련 유전자인 p27, p53, p21, cyclin A, cyclin D1, cyclin E에 대하여 western blot 분석을 실시하였다. 먼저 cell cycle에 관계하는 유전자 분석을 위하여 鷄血藤을 100㎍/㎖, 200㎍/㎖, 300㎍/㎖의 농도로 조정하면서 24시간 후 세포로부터 단백질을 추출한 후 western blot analysis를 통하여 G1 checkpoint에 관계하는 p27과 p21의 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 p27과 p21의 증가는 cyclin E-CDK2 복합체와 결합함으로써 CDK의 활성화를 저해하여 G1 phase arrest를 유발하여 결과적으로 세포자멸사를 일으키는 것으로 생각되며 이는 鷄血藤의 처리 농도가 증가할수록 발현도가 증가하는 것으로 보아 농도에 비례하여 세포증식을 억제하는 것으로 생각된다.

세포주기는 G1/S기에서 CDK 인자(cdk2, cyclin A, cyclin D1, cyclin E 등)에 의해, G2/M기에서는 cdc2, cyclin B 등에 의해 각각 엄격히 제어된다[27-28]. 이러한 세포주기에 관련하는 각 제어인자들의 활성화 또는 비활성화는 단백질의 인산화 작용에 의해 이루어진다. 이러한 인산화의 경로는 tyrosine kinase, GRB2, SOS, p21, ras, c-raf-1, MAP kinase, protein kimase A, protein kinase C 등이 관련하는 정보 전달경로를 통하여 일어난다[29]. 세포내 종양 억제 인자 p53 단백질 발현은 세포주기 중 G1기에서 S기로의 전환을 제어하며, 이 때 cyclin B1, cdc 2, cyclin E, cyclin D1의 단백질 발현이 증가한다[30]. Cyclin- dependent kinase(Cdk) inhibitor인 p21은 p53 단백질에 의해 전사단계에서 활성화되어, S기 진입에 필요한 Cdk2, Cdk4, Cdk6, cyclin B등을 저해, 세포주기를 G1기 혹은 G2 기에서 제어한다[31-32]. 그러나 본 실험에서는 p53의 변화는 없으며, p21의 활성의 증가만을 보여주었다.

포유동물세포들은 cyclin-CDK complex에 결합하여 그 활성을 억제하는 단백질 군을 발현하는데 이들은 cyclin-dependent Kinase inhibitiors (CKIs)라고 한다. CKI는 크게 p21/p27 군과 p16군의 두 가지 단백질 군으로 나누어진다. p16군들은 cyclinD-CDK complex에 특이적인 억제인자로 작용하여 궁극적으로 pRb의 인산화만을 조절하는 반면 p21/p27군들은 G1, S, G2, M phase에 관련된 모든 cyclin-CDK complex에 대한 억제인자로 작용한다. CKI의

발현은 일반적으로 세포증식을 negative 하게 조절하는 요소들에 의해서 또는 정상적인 세포 성장 억제상태 (quiescent나 terminal differentiation)에서 유도되어 지는 것으로 알려져 있다.

언급한 바와 같이 CKI들의 발현은 세포주기의 진행을 자극하거나 억제하는 signal들에 의한 세포주기 조절 기전과 밀접하게 관련되어 있다. p27은 mitogenic factor에 의해 발현이 억제되고 TGF-b와 같은 anti-mitogenic factor에 의해 발현이 유도된다. p21은 mitogen factor뿐만 아니라 다른 종류의 signal에 의해서도 조절되는데, 예를 들어 p21은 DNA-damaging agent에 의해서 그 발현이 증가한다. DNA-damaging agent에 의한 p21의 발현 증가는 p53이라는 종양 억제 인자의 활성에 의존적이므로 p53과 관련된 DNA repair를 위한 세포주기 조절 기전에 있어 p21의 발현은 필수적인 요소라고 생각된다. p21은 CDK의 기능만을 억제하는 것이 아니라 DNA의 leading strand 복제에 관여하는 polymerase의 활성 진행인자인 PCNA의 복제활성 (replicative activity)도 억제한다. 그러나 p21은 PCNA의 gap filling repair/synthesis 기능은 억제하지 못하는 것으로 밝혀졌는데, 이 결과는 p21이 DNA 합성의 조절에는 관여하는 것으로 생각되지만 DNA damage에 반응하여 일어나는 DNA repair에서의 PCNA의 기능은 억제하지 않음으로써 DNA repair는 허용하는 것을 의미한다.

p53 종양억제 유전자의 돌연변이 형질의 유전은 다양한 종류의 암에 걸릴 확률이 높아져 있는 Li-Fraumeni syndrome의 발병 원인이다. 또한, p53 기능의 불활성화는 종양 발생과 관련이 있다[33-35]. p53의 종양 억제 활성은 세포분열시 세포주기 저해와 세포사의 촉진에 관련된 기능 모두에서 기인한다. DNA damage나 발암유전자의 활성화에 반응하여, p53 단백질은 post-translational modification을 통하여 안정화되고 세포주기를 G1/S기 또는 G2/M기에서 정지시킨다. p53에 의한 G1/S기에서 세포주기의 정지는 $p21^{Waf1}$의 유전자의 transcription을 활성화 시킴으로 일어난다. 그 결과, 증가된 $p21^{Waf1}$의 발현은 G1기의 활성을 저해하고 G1기 말기에서의 세포주기 정지를 초래한다. p53에 의한 G1/M기에서의 세포주기 정지와 p53 활성화에 대한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다.

이러한 결과로 보아 p27, p21의 증가는 鷄血藤의 처리로 인하여 DNA에 심각한 손상을 당하였을 것으로 생각되는 자궁경부암세포가 회복되지 못한 상태에서 세포자멸사가 유도된 것으로 생각되며 이는 p21과 p27의 생성을 유도한 결과 CDK와 결합하여 G1 phase arrest를 유도하게 되어 결국 자궁경부암 세포는 세포자멸사를 일으켜 증식이 억제되고 사멸되는 효과를 나타내게 되며 이는 鷄血藤의 처리 농도에 비례하여 증가되는 것으로 관찰되었다. Cyclin E, cyclin A, cyclin D1은 p27과 p21의 down stream에 있는 것으로 농도 의존적으로 감소하는 것을 보여 주었다(Fig. 5).

면역세포 선별과정의 분자적인 기전이 세포능동 사망인 것으로 밝혀지면서 염색질의 농축이 일어날 때 DNA가 180-200개의 염기로 분할되어 나타나고 이것은 내인성의 nuclease의 활성화 때문인 것으로 알려지게 되면서 전기영동상에서 necrosis는 무작위적인 DNA 분절화로 인해 전기영동 후 도마 양상을 보이기 때문에 세포자멸사에서 일어나는 DNA의 사다리꼴 분절화 현상은 세포괴사와 세포자멸사를 구별하는 정통적인 방법으로 사용되고 있으며[36-38], 본 실험에서도 세포자멸사의 명백한 증거를 보이고 있었다.

이러한 결과는 鷄血藤은 자궁경부암 세포의 증식억제 효과가 있으며 이는 세포자멸사에 이르게하고, 세포주기상에서 subG1 phase arrest

를 일으켜서 일어나며 여기에는 p27, p21, pRb 등의 세포주기 관련 유전자가 관계되어 있음을 알 수 있었다. 이에 鷄血藤이 세포주기와 세포자멸사에 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 향후 자궁경부암의 치료에 있어서 효과적인 대체 치료 약물의 가능성이 있다고 사료된다.

Ⅴ. 結 論

鷄血藤이 자궁경부암 세포의 증식억제와 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 鷄血藤을 100, 200, 300㎍/㎖의 농도로 처리한 후 증식억제 효과, 세포자멸사와 관련한 세포주기 분석 및 유전자 분석을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 鷄血藤을 처리하여 300㎍/㎖의 농도에서 70%의 증식억제 효과를 보였다.
2. 鷄血藤 처리 후 세포주기 분석을 시도한 결과 300㎍/㎖의 농도에서 45.99%의 subG1기의 지연이 관찰되었다.
3. 鷄血藤 처리 후 세포자멸사의 특징인 DNA fragmentation이 처리 농도가 증가할수록 더욱 현저하게 관찰되었다.
4. 鷄血藤 처리 후 pro-caspase 3 및 PARP의 발현은 농도에 비례하여 감소하였으며, Rb 유전자는 농도에 비례하여 탈인산화 되었다.
5. 鷄血藤 처리 후 세포주기관련 유전자 분석을 시도한 결과 p27, p21 유전자 발현은 농도에 비례하여 증가하였으며 cyclin E, A, D1은 농도에 비례하여 발현이 감소하였으며, p53 유전자의 변화는 없었다.

이상의 결과로 보아 鷄血藤의 처리에 의해서 세포증식 억제가 일어나며 이러한 현상은 세포자멸사에 의한 것이며 그 기전은 p27, p21의 발현 증가로 인한 세포주기 회로에서 G1 phase arrest와 관련한 세포자멸사가 일어나는 것과 PARP 및 pro-caspase 3의 발현이 감소하는 것으로 보아 caspase 경로를 거쳐 세포자멸사를 유도하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

□ 투 고 일 : 2005년 01월 26일
□ 심 사 일 : 2005년 01월 28일
□ 심사완료일 : 2005년 02월 03일

參考文獻

1. 한국 중앙 암 등록 본부, 보건 복지부. 한국중앙암등록사업 연례 보고서(2001.1-2001.12). 보건 복지부. 2003.
2. 대한산부인과학회 종양분과위원회 : 한국부인암등록사업 조사보고서(1998.1.1-1998.12.31). 대한산부인과학지. 2001;44:426-459.
3. Parkin DM, Pisani P and Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer.* 1999;15:80(6):827-841
4. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* 1989;1:49(17):4677-4681.
5. Munger K et al. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv.* 1992;12:197-217.
6. Lee JS et al. Expression of vascular endothelial growth factor in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and p53 and c-erbB-2 protein expression. *Gynecol Oncol.* 2002;85(3): 469-475.
7. 李尙仁. 韓藥臨床應用. 서울:成輔社, 1990:271.
8. 康秉秀. 本草學. 서울:永林社. 1991:445-446.
9. 安德均. 原色韓國本草圖鑑. 서울:敎學社. 1999:670.

10. Wang W et al. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dunn, Euonymus alatus (Thunb) Sieb and Eupolyphaga sinensis Walker on regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1991;16(5):299-301, 320.
11. Lam TL et al. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci*. 2000;27:67 (23):2889-2896.
12. 이진훈. 계혈등의 항활성효과. 강원대학교 대학원. 1999.
13. 오형숙. 계혈등 추출물이 생쥐의 조혈 및 면역작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2000.
14. 이현철 외. 계혈등 EtOAc subfrac tion-2가 종양전이 억제효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):525-528.
15. 서해경, 오민석, 김동희. 류마토이드 關節炎 患者 滑膜細胞에 대한 鷄血藤의 免疫反應. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):780-786.
16. 趙南守. 鷄血藤 추출물이 Jurkat T 임파구의 세포고사 및 세포주기 억제에 미치는 효과. 원광대학교 대학원. 2002.
17. 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울:杏林出版. 1995:229-234.
18. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:杏林出版社. 1978:248-262.
19. 박경미 외. 제천전이 자궁경부암세포(HeLa cell)에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):161-176
20. 姜孝信. 東醫婦人科學. 서울:醫文社. 1966:203-204,
21. 황상구 외. p53-결핍 Jurkat T 임파구의 세포사멸에 대한 계혈등 추출물의 세포주기 억제효과. 동의생리병리학회지. 2001;15(6):887-888.
22. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典 (1). 上海:上海科學技術出版社. 1979.
23. 趙學敏. 本草綱目拾遺. 香港:商務印書館香港分館. 1986:260-2.
24. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol*. 1998;68(1):29-43.
25. 정용근. 아폽토시스의 실행자:caspase를 통하여. 유전 제 2권. 1998:106-128.
26. 진선두 외. 綠茶의 주성분인 Epigallocatechin gallate의 항암활성과 Apoptosis 기전에 관한 분자생물학적 연구. 동의생리병리학회지. 2001;15(4):611-20.
27. Ahn WS et al. Differential Suppression of Human cervical cancer cell growth by adenovirus delivery of p53 in vitro:arrest phase of cell cycle Is dependent on cell line. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93(9):1012-1019.
28. Kagawa S et al. p53 expression overcomes $p21^{WAF1}$/CIPI -mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene*. 1997;16:15(16):1903-1909.
29. Brenna SM et al. p53 expression as a predictor of recurrence in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12(3):299-303.
30. Mastsushime H et al. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1994;14(3):2066-2076.
31. El-Deiry WS et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 1994;54(5):1169-1174.
32. Huang TGlp SM, Yeung WS, Ngan HY. Changes in $p21^{WAF1}$, pRb, Mdm-2, Bax and Bcl-2 expression in cervical cancer cell lines transfected with a p53 expressing adenovirus. *Eur J Cancer*. 2000;36(2):249-256.
33. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 1996;10(9):1054-1072.
34. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*. 1998;112(19):2973-2983.
35. Wux, Levine AJ. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(9):3602-3606.

36. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대학술지 . 1996;15(4):381-393.
37. Peters G. Stifled by inhibitions. *Nature*. 1994;371:204-205.
38. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. 1993;73:1059-1065.