

## 半枝蓮이 HeLa Cell의 増殖抑制와 死滅에 미치는 影響

경희대학교 한의과대학 부인과학교실

하지연, 조정훈, 장준복, 이경섭

### ABSTRACT

#### Inhibitory Effects of *Scutellaria barbata* D. Don on the Cell Proliferation of HeLa cells

Jee-Yeun Ha, Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee  
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee  
University, Seoul, Korea

**Purpose** : This study was conducted to investigate the inhibitory effects of *Scutellaria barbata* D. Don on the cell proliferation of HeLa Cells.

**Methods** : Human uterine cervical carcinoma HeLa cells were cultured in the 1%, 5% and 10% concentration of *Scutellaria barbata* D. Don solution for 24, 48 and 72 hours for the direct inhibitory effects of *Scutellaria barbata* D. Don. Then we examined the effect of *Scutellaria barbata* D. Don solution on the cell proliferation inhibition by XTT assay, DNA fragmentation, MAP kinase activity and caspase activity by FACS analysis in HeLa cells.

**Results** : We found that the proliferation of HeLa cells was significantly decreased in *Scutellaria barbata* D. Don solution containing groups comparing with a control group in a concentration-dependant manner. When HeLa cells were cultivated for 24 hours with 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution containing group, the percentage of HeLa cells with activated caspase was the highest. *Scutellaria barbata* D. Don solution reduced the MAP kinase activity of HeLa cells comparing with the control group. By the XTT assay, the cell's activity was decreased in 5% and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution containing groups in 24 and 72 hours cultivation and 10% group in 48 hours. DNA fragmentation and caspase-3 activity of HeLa cells, however, were changed insignificantly.

**Conclusion** : From this study we could suggest that *Scutellaria barbata* D. Don is available to the inhibition and apoptosis of human cervical carcinoma cell line, HeLa cells *in vitro*.

**Key words** : *Scutellaria barbata* D. Don, HeLa cell, FACS, caspase-3, DNA fragmentaion, XTT, MAP kinase

## I. 緒 論

子宮頸部癌은 여성에게서 가장 많이 발생하는 악성 종양 중의 하나로 조기 진단과 적절한 치료로 사망률을 감소시킬 수 있으나, 세계적으로 골반 암종을 가진 여성들 중에서 가장 흔한 사망 원인이 되고 있다<sup>1-3)</sup>. 浸潤性 子宮頸部癌은 30세 이후부터 증가하기 시작하며, 上皮內癌 (carcinoma in situ)의 평균 연령은 이보다 10년 정도 낮고, 연령이 증가됨에 따라 증가하는데 50세에 정점을 이루고 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다<sup>2,4)</sup>. 子宮頸部癌의 발생은 연령, 初交年齡, 배우자의 수, 배우자 음경의 포경상태와 위생상태, 인유두종 바이러스 (human papilloma virus, HPV) 감염, 기타 인종이나 사회 경제적 여건 등에 영향을 받으며, 이 중 HPV가 가장 유력한 원인 인자로 알려져 있다<sup>1-4)</sup>.

韓藥材를 이용한 子宮頸部癌에 대한 연구로는 複合處方으로 歸朮破癥湯과 加味歸朮破癥湯<sup>5)</sup>, 斑玄丸<sup>6)</sup>, 加味礬石丸<sup>7)</sup>, 荊蓬煎丸料<sup>8)</sup>, 濟川煎<sup>9)</sup>, 六合湯<sup>10)</sup>, 香稜丸<sup>11)</sup> 등과, 單味材로 人蔘 抽出物<sup>12)</sup>, 半枝蓮<sup>13)</sup>, 鬼箭羽<sup>14)</sup>, 枹고버섯<sup>15)</sup>, 烏梅<sup>16)</sup> 등의 연구가 이루어져 왔다.

半枝蓮은 敗毒抗癌, 祛瘀止痛, 消腫散結 등의 작용이 있어서 熱毒症狀과 간암, 소화기암, 자궁암 등의 각종 암치료에 사용되었다<sup>17-20)</sup>. 半枝蓮에 대한 연구는 난소암<sup>21)</sup>, 유방암<sup>22)</sup>, 폐암 세포 성장 억제 효과<sup>23)</sup>와 자궁근종 세포 억제 효과<sup>24-26)</sup>, 항균 작용<sup>27,28)</sup>, 암세포의 apoptosis<sup>29)</sup>에 관한 보고가 있었다. 또한 子宮頸部癌에 대해서는 HeLa 22918 cell에 대하여 농도별 세포 독성과 형태학적

변화에 대한 연구<sup>13)</sup>가 보고된 바 있었으나 농도별 처치에 따른 시간별 세포 활성의 관찰, 세포사멸의 신호전달효소인 caspase 유전자 발현에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 著者は 半枝蓮이 子宮頸部癌 세포인 HeLa cell에 미치는 영향을 알아보고자 상이한 농도의 半枝蓮 檢液을 HeLa cell에 처리한 후 細胞增殖과 流細胞 分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 배양된 細胞株에 대한 MAP kinase 발현 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材 料

#### 1) 藥 材

半枝蓮은 唇形科 (꿀풀과; Labiatae)에 속하는 半枝蓮 (*Scutellaria barbata* D. Don)의 全草로 慶熙醫院 韓方病院 藥劑科에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 細胞培養

子宮頸部癌 細胞株인 HeLa cell line을 ATCC社 (USA)로부터 구입하였다. RPMI 1640 media (Sigma, USA)를 기본 배지로 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA; 이하 FBS)와 1% penicilin/streptomycin 용액 (Sigma, USA)을 첨가하여 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 배양기 (Forma, USA)에서 HeLa cell을 배양하였다. Phosphate buffered saline (Gibco, USA; 이하 PBS)로 세포를 세척하고 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, USA)를 처리하여 분리한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이렇게 분

리한 세포를 1:10의 비율로 繼代培養하였다.

## 2. 方法

### 1) 檢液의 製造

半枝蓮 100 g에 1.5 l의 증류수를 가한 후 1시간 30분 동안 증탕분리한 추출액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 0.45  $\mu$ m filter (Gelma, Germany)로 여과하여 半枝蓮 檢液을 製造한 후 실험에 사용하였다.

### 2) 實驗群 設定

대조군은 2% FBS만이 첨가된 배양액을 사용하였고, 실험군은 2% FBS와 1%, 5% 및 10% 半枝蓮 檢液을 첨가한 배양액을 사용하였다.

### 3) 細胞增殖 測定

24-well plate dish (Nunc, Denmark)에 HeLa cell  $1 \times 10^3$ 개를 접종하여 24시간 동안 배양한 후, 농도별 半枝蓮 檢液을 처리하여 24, 48, 72시간 배양한 후에 trypan blue (Sigma, USA)로 염색하여 細胞增殖를 측정하였다.

### 4) 流細胞 分析

농도별 半枝蓮 檢液을 처리한 HeLa cell을 trypsin으로 처리, 분리한 후 이를 원심분리하여 1 ml PBS 용액에 resuspension하였다. 여기에 intracellular caspase detection kit인 ApoStat antibody를 10  $\mu$ l 가하여 30분간 37  $^{\circ}$ C 배양기에서 배양한 후 PBS로 세척하였다. 이를 0.5 ml PBS 용액에 녹인 후 BD FACS vantage (Becton & Dickinson, USA)로 분석하였다.

### 5) Caspase-3 活性 測定

세포사멸의 핵심적인 역할을 하는 caspase-3의 활성을 측정하기 위해

caspase-3 ELISA kit (R&D system, USA)를 이용하였다. 농도별 半枝蓮 檢液을 처리한 HeLa cell을 1,000 rpm에서 4분간 원심분리한 후, 100  $\mu$ l의 lysis buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 2~4 mg/ml의 농도로 50  $\mu$ l가 되게 하여 96-well flat plate에 분주하고, 50  $\mu$ l의 2X running buffer와 1% DTT solution을 가했다. 5  $\mu$ l의 caspase-3 colorimetric substrate를 넣은 후 37  $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켜 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 6) DNA fragmentation 測定

농도별 半枝蓮 檢液을 처리한 HeLa cell을 수거하여 triton-X 100 (Sigma, USA)을 첨가한 lysis buffer 1 ml로 분쇄하였다. 이를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 취한 후 10  $\mu$ l의 5 M NaCl과 2-propanol을 첨가하여 DNA를 응축한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 추출하였다. 추출 DNA를 2% agarose gel에 70 V로 1시간 30분 동안 전기영동하여 세포사멸에 의하여 유도되는 DNA fragmentation을 관찰하였다.

### 7) 細胞活性 測定

96-well plate에 HeLa cell  $5 \times 10^3$ 개를 접종하고 24시간 동안 배양한 후 농도별 半枝蓮 檢液을 처리하여 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 이후 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H tetrazolium-carboxanilide inner salt (JBI, Korea, 이하 XTT)와 phenazine methosulfate (JBI, Korea: 이하 PMS)를 배양액의 20%가 되게 하여 4시간 동안 HeLa cell에 처리하였다. XTT와 PMS 처리 후 450 nm 파장의 spectropho

tometer (Beckman, Germany)를 사용하여 XTT tetrazolium ring의 분해 산물인 formazan crystal의 흡광도로 細胞活性을 측정하였다.

8) MAP kinase 活性 測定

농도별 半枝蓮 檢液을 처리한 HeLa cell을 trypsin/EDTA로 분리하였다. 이를 PBS로 세척하고 TRIZOL 1 ml를 처리하여 세포를 분쇄 후, chloroform (Sigma, USA) 200  $\mu$ l를 첨가하여 ice에서 10분간 배양하였다. 이를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 취한 후 2-propanol 500  $\mu$ l를 첨가하고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA를 응축하였다. 응축된 RNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시켜 20  $\mu$ l의 DEPC-DW에 녹였다.

추출한 RNA 1  $\mu$ g을 이용하여 SUPSCRIPT II cDNA synthesis kit로 cDNA를 합성하였다. cDNA template 1  $\mu$ l, internal marker인 GAPDH의 forward와 reverse primer 각각 10 pmol 및 Taq polimerase 1 unit을 가한 후 93  $^{\circ}$ C 30초, 55  $^{\circ}$ C 30초, 72  $^{\circ}$ C 1분으로 PCR을 30 cycle 수행하였다. 세포 성장 인자 marker인 MAP kinase도 동일한 방법으로 수행하였으며 annealing 온도를 58  $^{\circ}$ C로 하였다.

PCR product를 1% agarose gel에 100 V로 30분간 전기영동하여 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다. MAP kinase cDNA 분석을 위한 sequence는 GAPDH 5' primer (5'-accacagtccatgccatcac-3')와 GAPDH 3' primer (5'-tcaccaccctgttgctgta-3')를 사용하여 PCR 정량을 실시하였다.

9) 統計處理

통계는 SPSS ver 11.5를 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고, 유의한 ( $p < 0.05$ ) 것으로 판단될 경우 Tukey's B법으로 multiple comparison test를 실시하였다.

III. 結果

1. 細胞增殖에 미치는 影響

半枝蓮 檢液群의 경우 24시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 1.67배, 5% 檢液群이 0.83배, 10% 檢液群이 0.53배로 대조군의 2.00배에 비하여 유의한 增殖抑制 ( $p < 0.05$ )를 나타내었다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 1.33배, 5% 檢液群이 0.33배, 10% 檢液群이 0.10배로 대조군의 4.67배에 비하여 유의한 增殖抑制 ( $p < 0.05$ )를 나타내었다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 2.00배, 5% 檢液群이 0.17배, 10% 檢液群이 0.05배로 대조군의 10.33배에 비하여 유의한 增殖抑制 ( $p < 0.05$ )를 나타내었다 (Table I, Fig. 1).

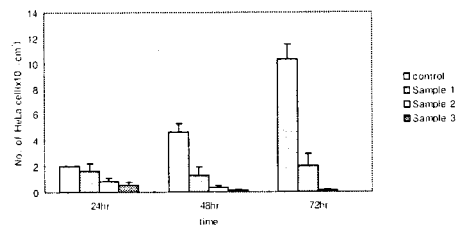


Fig. 1. Inhibitory effect on cell proliferation in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa cells *in vitro*

Control: Group with 2% FBS  
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Table I. Inhibitory Effect on Cell Proliferation in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa Cells *In Vitro*

Subjects	Initial concentration of HeLa cells ( $\times 10^5$ cell/cm <sup>2</sup> )	No ( $\times 10^5$ cell/cm <sup>2</sup> ). of HeLa cells after culturing for		
		24 hr	48 hr	72 hr
Control (n=3)	1	2.00 $\pm$ 0.00 <sup>1)a2)</sup>	4.67 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	10.33 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>
Sample 1 (n=3)	1	1.67 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	2.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>
Sample 2 (n=3)	1	0.83 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.33 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	0.17 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
Sample 3 (n=3)	1	0.53 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	0.05 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
p-value <sup>3)</sup>		p<0.05	p<0.05	p<0.05

1: Mean $\pm$ standard deviation

2: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey's B multiple comparison.

3: Statistical significances were tested by ANOVA.

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

## 2. 流細胞 分析 結果

24시간 배양 후 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 22.44%로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 1%, 5%, 10% 檢液群 모두 각각 25.05%, 48.78%, 37.34%로 측정되어 대조군에 비하여 증가하였다.

48시간 배양 후 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 9.46%로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 5% 檢液群에서 18.43%으로 대조군에 비하여 증가하였다.

72시간 배양 후 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 8.31%로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 5%, 10% 檢液群에서 각각 15.99%, 12.28%로 측정되어 대조군에 비

하여 증가하였다 (Table II, Fig. 2).

Table II. Activated Caspase Expression in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa Cells by FACS Analysis

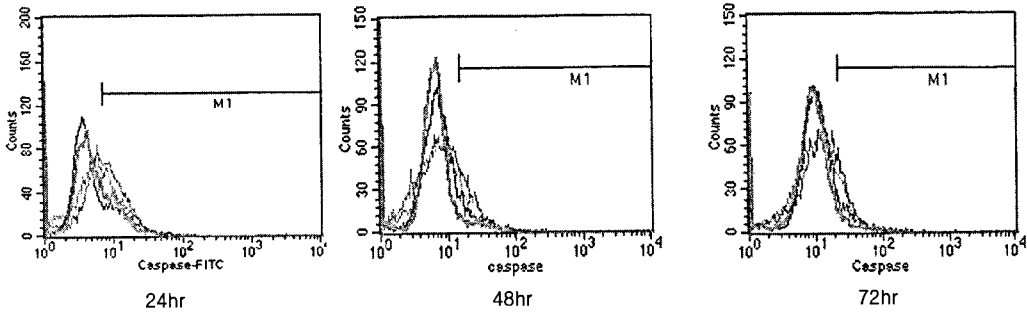
Subjects	% of HeLa cells with activated caspase expression after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control	22.44	9.46	8.31
Sample 1	25.05	5.17	4.49
Sample 2	48.78	18.43	15.99
Sample 3	37.34	9.44	12.28

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution



Black: Control, Green: Sample 1, Red: Sample 2, Blue: Sample 3

Fig. 2. FACS analysis in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa cells

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

### 3. Caspase-3 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 활성도를 조사한 결과 대조군은 0.0846으로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 1%, 5%, 10% 檢液群 모두 각각 0.0659, 0.0540, 0.0750으로 측정되어 대조군에 비하여 감소하였다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 활성도를 조사한 결과 대조군은 0.0901로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 1%, 5%, 10% 檢液群 모두 각각 0.0770, 0.0778, 0.0876으로 측정되어 대조군에 비하여 감소하였다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 활성도를 조사한 결과 대조군은 0.1088로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 1%, 5%, 10% 檢液群 모두 각각 0.0600, 0.0723, 0.0765로 측정되어 대조군에 비하여 감소하였다 (Table III, Fig. 3).

Table III. Caspase-3 Activity in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa Cells

Subjects	Caspase-3 activity of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control	0.0846	0.0901	0.1088
Sample 1	0.0659	0.0770	0.0600
Sample 2	0.0540	0.0778	0.0723
Sample 3	0.0750	0.0876	0.0765

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

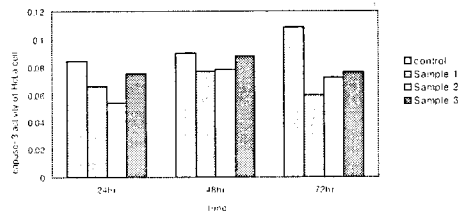


Fig. 3. Caspase-3 activity in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa cells

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

4. DNA fragmentation에 미치는 影響  
 상이한 농도의 半枝蓮을 처리한 결과 24시간, 48시간 및 72시간 동안 HeLa cell의 DNA fragmentation은 관찰되지 않았다 (Fig. 4).

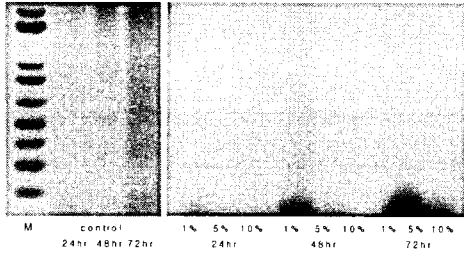


Fig. 4. DNA fragmentation in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa cells

5. 細胞活性에 미치는 影響

세포활성도를 XTT assay로 확인한 결과 24시간 배양 후 대조군의 HeLa cell의 세포활성도는 0.45±0.12로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 5%와 10% 檢液群에서 각각 0.25±0.13와 0.09±0.01로 측정되어 대조군에 비하여 유의한 감소 (p<0.05)를 나타내었다.

48시간 배양 후 대조군의 HeLa cell의 세포활성도는 0.69±0.05로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 10% 檢液群에서만 0.10±0.01로 측정되어 대조군에 비하여 유의한 감소 (p<0.05)를 나타내었다.

72시간 배양 후 대조군의 HeLa cell의 세포활성도는 0.68±0.07로 측정되었다. 半枝蓮 檢液群의 경우는 5%와 10% 檢液群에서 각각 0.49±0.14와 0.12±0.01로 측정되어 대조군에 비하여 유의한 감소 (p<0.05)를 나타내었다 (Table IV, Fig. 5).

Table IV. XTT Activity in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa Cell

Subjects	XTT activity of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control (n=3)	0.45±0.12 <sup>1)</sup> a <sup>2)</sup>	0.69±0.05 <sup>a</sup>	0.68±0.07 <sup>a</sup>
Sample 1 (n=3)	0.47±0.12 <sup>a</sup>	0.74±0.06 <sup>a</sup>	0.69±0.08 <sup>a</sup>
Sample 2 (n=3)	0.25±0.13 <sup>b</sup>	0.71±0.13 <sup>a</sup>	0.49±0.14 <sup>b</sup>
Sample 3 (n=3)	0.09±0.01 <sup>c</sup>	0.10±0.01 <sup>b</sup>	0.12±0.01 <sup>c</sup>
p-value <sup>3)</sup>	p<0.05	p<0.05	p<0.05

1: Mean±standard deviation  
 2: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey's B multiple comparison.  
 3: Statistical significances were tested by ANOVA.

Control: Group with 2% FBS  
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

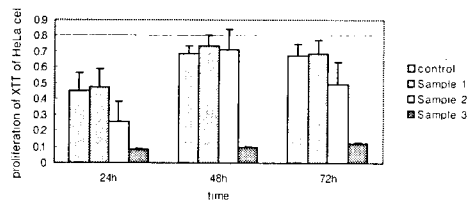


Fig. 5. XTT activity in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa cells

Control: Group with 2% FBS  
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

6. MAP kinase 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 MAP

kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 72522.02 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 半枝蓮 檢液群의 MAP kinase 활성도는 각각 52644.74 CNT/mm<sup>2</sup>, 55715.40 CNT/mm<sup>2</sup>, 42286.01 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 71083.89 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 半枝蓮 檢液群의 MAP kinase 활성도는 각각 57338.97 CNT/mm<sup>2</sup>, 50360.65 CNT/mm<sup>2</sup>, 39421.13 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 70753.59 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 半枝蓮 檢液群의 MAP kinase 활성도는 각각 34955.92 CNT/mm<sup>2</sup>, 38705.52 CNT/mm<sup>2</sup>, 38896.87 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었다 (Table V, Fig. 6, 7, 8).

Table V. MAP Kinase Activity in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa Cells

Subjects	MAP kinase activity (density CNT/mm <sup>2</sup> ) of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control	72522.02	71083.89	70753.59
Sample 1	52644.74	57338.97	34955.92
Sample 2	55715.40	50360.65	38705.52
Sample 3	42286.01	39421.13	38896.87

Control: Group with 2% FBS  
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

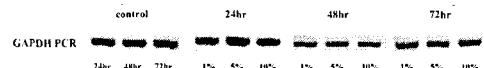


Fig. 6. GAPDH analysis for quantitative PCR

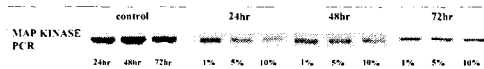


Fig. 7. MAP kinase activity of HeLa cells treated with *Scutellaria barbata* D. Don solution

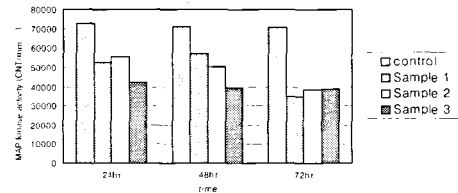


Fig. 8. MAP kinase activity in *Scutellaria barbata* D. Don-treated HeLa cells

Control: Group with 2% FBS  
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Scutellaria barbata* D. Don solution  
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Scutellaria barbata* D. Don solution

#### IV. 考 察

子宮頸部癌의 증상은 陰道出血 특히 성교시의 輕한 질출혈, 질분비물, 빈혈, 임파절종대, 피로, 체중 감소 등이 나타나므로 한의학적으로는 崩漏, 帶下, 癥瘕, 血枯, 石瘕 등이 이의 범주에 속한다<sup>2-4)</sup>. 이 중 積聚物의 有無와 동반 증상의 유사성으로 볼 때 癥瘕와 가장 유사한 질환으로 생각할 수 있다.

癥瘕는 여성의 下腹腔內에 생기는 여성 고유의 腫塊를 지칭하는 것<sup>4,30)</sup>으로 《黃帝內經·骨空論》<sup>31)</sup>에 “任脈爲病, 男



子內結七疝，女子帶下癥聚”라고 하여 癥瘕는 任脈의 病이라는 인식을 가졌다. 吳<sup>32)</sup>는 “癥積不動有定處，瘕聚推移無定型”이라 하였고, 張<sup>33)</sup>은 “癥瘕之病，則積聚之別名... 蓋癥者徵也，瘕者假也. 癥者成形而堅硬不移者是也；瘕者無形而可聚可散者是也”라고 하여 癥과 瘕를 모양과 증상에 따라 구분하였으나 그 病形이 유사하고 확연히 구분하기 힘든 면이 많아서 임상에서는 흔히 癥과 瘕를 함께 언급하였다.

子宮頸部癌에 대한 연구로는 歸朮破癥湯과 加味歸朮破癥湯<sup>5)</sup>, 斑玄丸<sup>6)</sup>, 加味礬石丸<sup>7)</sup>, 荊蓬煎丸料<sup>8)</sup>, 濟川煎<sup>9)</sup>, 六合湯<sup>10)</sup>, 香稜丸<sup>11)</sup> 등의 處方을 응용한 실험 연구와, 人蔘 抽出物<sup>12)</sup>, 半枝蓮<sup>13)</sup>, 鬼箭羽<sup>14)</sup>, 표고버섯<sup>15)</sup>, 烏梅<sup>16)</sup> 등의 單味材를 이용한 연구가 이루어져 왔는데 이는 주로 活血祛瘀, 清熱解毒, 化痰軟堅, 扶正祛邪 효능의 약물이다.

半枝蓮의 性은 平 또는 涼하고 味는 辛, 微苦하며 肝, 脾, 肺, 胃, 大腸經으로 歸經한다. 그 효능은 清熱解毒, 祛瘀止痛, 消腫散結, 行氣利水, 止血 등의 작용이 있어서 濕熱黃疸, 咽喉腫痛, 肺癰, 疔瘡, 瘰癧, 吐血, 衄血, 血淋과 간암과 소화기암, 자궁암 등의 각종 암치료에 사용된다<sup>17-20)</sup>. 半枝蓮에 대한 실험 연구로는 자궁암세포에서 세포독성 유발 및 단백질 합성을 억제한다고 보고되었고<sup>13)</sup>, 난소암<sup>21)</sup>, 유방암<sup>22)</sup>, 폐암 세포 성장 억제효과<sup>23)</sup>, 자궁근종 세포에서는 활성억제와 c-fos 유전자의 발현을 유도하며<sup>24-26)</sup>, 항균 작용<sup>27,28)</sup>, 암세포의 apoptosis<sup>29)</sup>에 관한 연구가 있었다. 또한 肝障害保護 효과가 있어 장기간 抗癌治療에 응용할 수 있다고 보고되었다<sup>22)</sup>.

半枝蓮이 子宮頸部癌 HeLa 22918 cell에 대하여 농도별 세포 독성과 형태학적 변화에 대한 연구<sup>13)</sup>와 U937 암세포에 대한 세포 독성, 세포사멸 및 cell cycle에 관한 연구<sup>29)</sup>는 있으나 HeLa cell을 이용하여 농도별 처치에 따른 시간별 세포 활성의 관찰, 세포사멸의 신호전달효소인 caspase에 대한 관찰과 유전자 발현에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 저자는 清熱解毒, 祛瘀止痛의 효과<sup>20)</sup>가 있는 半枝蓮이 子宮頸部癌 세포인 HeLa cell에 미치는 작용을 알아보고자 HeLa cell의 細胞增殖 抑制와 流細胞 分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 RT-PCR을 통하여 MAP kinase 活性을 관찰하였다.

HeLa cell에 半枝蓮 檢液을 상이한 농도로 처치하여 각각 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하면서 세포의 增殖을 측정된 결과 24시간 배양했을 경우 5%와 10% 檢液群에서 뚜렷한 세포증식 억제효과를 나타내었다. 48시간, 72시간 배양에서도 檢液群이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. 이상의 실험에서 半枝蓮 檢液은 子宮頸部癌 세포인 HeLa cell의 增殖을 抑制하는 작용이 있음을 확인할 수 있었고, 농도 및 시간의 존적으로 세포 增殖을 억제하는 것으로 나타났다.

세포배양시간과 半枝蓮 檢液의 처리농도에 따른 apoptosis의 신호전달효소인 activated caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 알아보기 위하여 流細胞 分析을 이용하였다. 流細胞 分析이란 액체 속에서 부유하는 세포나 입자세포를 포함한 생물학적인 입자의 물리적 혹은 화학적

인 특성들의 측정하여, 여러 종류의 세포 표면 항원들, 세포 형질내에 존재하는 단백질, RNA, DNA, nuclear antigen, membrane potential 및 intracytoplasmic  $Ca^{2+}$  등을 정량적으로 측정 분석하게 된다<sup>34-36)</sup>. 세포사멸 과정에서 실행 경로의 활성화 과정에 관여하는 caspase는 세포사멸시 활성화되는 중요한 단백질 분해효소이므로<sup>37)</sup> 이 효소의 활성도를 측정하여 세포사멸 정도를 파악할 수 있다. Caspase cystein protease cascade는 여러 생리적인 system에서 세포사멸의 주요 경로로 인식되어 왔으며, 세포사멸이 일어나는 경우 caspase-3는 세포사멸의 실행자 역할을 하며, 어떤 종류의 자극에도 활성화되는 주요 pool로 알려져 왔다<sup>38-40)</sup>. 이번 실험의 결과 24시간 배양 후 半枝蓮 檢液群의 경우 1%, 5% 및 10%에서 대조군에 비해 상대적으로 높은 세포 사멸이 관찰되었다. 48시간 배양 후 5% 檢液群에서, 72시간 배양에서는 5%와 10% 檢液群에서 대조군에 비하여 세포 사멸이 증가하여, 半枝蓮 檢液은 HeLa cell의 사멸을 촉진하는 것으로 보이며 24시간 배양시, 5% 농도에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.

그러나 세포사멸에 주도적인 역할을 하는 caspase-3의 활성도를 ELISA assay로 측정한 결과에서는 24시간, 48시간 및 72시간 배양의 경우 모두 농도에 관계없이 半枝蓮 檢液群의 caspase-3 활성도가 대조군에 비하여 감소된 것으로 관찰되어 activated caspase 유전자 활성화와는 상반된 결과를 나타내었다.

半枝蓮 檢液이 HeLa cell의 사멸에 미치는 영향을 구체적으로 알아보기 위해 HeLa cell에서 DNA를 추출하여 세포

사멸에 의하여 유도되는 DNA fragmentation을 관찰하였다. 신체를 구성하고 있는 기본단위인 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 조절하는데 이중에서 능동적인 죽음을 apoptosis 또는 programmed cell death라고 한다<sup>41)</sup>. 이 과정 중 생화학적 변화는 형태적인 변화보다 먼저 일어나 핵산분해효소의 활성화는 규칙적으로 유전자를 절단하여 DNA는 다양한 크기의 절편을 형성하게 된다<sup>42)</sup>. 따라서 이것을 전기영동하면 여러 개의 DNA fragmentation들을 관찰할 수 있다.

그러나 24시간, 48시간 및 72시간동안 半枝蓮 檢液群을 1%, 5% 및 10% 농도로 처리한 HeLa cell에서 뚜렷한 DNA laddering은 관찰되지 않았다. 즉 半枝蓮 檢液은 子宮頸部癌 세포인 HeLa cell의 세포 사멸과 관련된 DNA fragmentation에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

HeLa cell의 세포 활성도의 예측지표인 XTT 활성도를 조사한 결과 24시간 배양의 경우 대조군에 비교하여 5%, 10% 檢液群에서 세포 활성도의 유의한 감소를 보였다. 48시간 배양 후는 10% 檢液群에서, 72시간 배양 후는 5%, 10% 檢液群에서 子宮頸部癌 세포의 활성도가 감소되는 것으로 관찰되었다. 이는 이 등<sup>13)</sup>의 24시간 배양하였을 경우 농도가 증가할수록 자궁암세포에 대한 세포독성과 형태학적 변화가 뚜렷하였다는 결과와 일치하며 半枝蓮은 子宮頸部癌 세포인 HeLa cell의 활성도를 억제하여 子宮頸部癌 치료에 도움을 줄 것으로 사료된다.

MAP kinase (mitogen activated protein

kinase)는 세포 밖 신호가 세포 내에 존재하는 target 물질로 전달이 이루어지기 위해서 세포질에 존재하는 몇 개의 연속적인 단백질 인산화 효소들의 활성화 경로이다. 이 과정을 거쳐서 여러 유전자들의 발현을 변화시켜 세포가 성장, 분화, 발달, 세포 사멸 등의 다양한 반응을 일으키게 된다. MAP kinase는 세 개의 kinase들로 구성된 신호경로의 제일 마지막에 위치하는 단백질 인산화 효소로서, 각각의 신호전달 경로 상에서 하나의 효소가 바로 다음 아래 위치에 존재하는 구성효소를 인산화하여 연속적으로 활성화시키게 된다.<sup>43-45)</sup>

MAP kinase 신호전달체계의 억제인은 MAP kinase 신호전달체계를 통제하여 염증이나 암과 같은 상태를 치료하게 되므로<sup>46)</sup> MAP kinase의 활성화는 세포 활동이 활발할 때 증가하고, 세포성장 지연 또는 사멸시 감소한다.

HeLa cell의 사멸 효과를 구체적으로 알아보기 위해 半枝蓮 檢液이 처리된 HeLa cell로부터 채취한 RNA를 이용하여 子宮頸部癌 세포인 HeLa cell의 MAP kinase 활성을 조사하였다. 24시간, 48시간 및 72시간 배양 후 檢液群에서 대조군보다 MAP kinase 활성이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이 실험의 결과에서 볼 때 半枝蓮 檢液은 HeLa cell 대사에 직접적으로 작용하는 MAP kinase 신호전달체계에 관여하여 MAP kinase 활성을 감소시켜 HeLa cell에 억제인자로 작용하는 것으로 사료된다. 그러나 농도와 배양 시간별로 일정한 규칙은 관찰되지 않았다.

이상의 실험 결과를 종합하여 볼 때, 半枝蓮 檢液이 子宮頸部癌 세포인 HeLa

cell의 세포 증식과 세포 활성도를 억제시키며 MAP kinase 활성을 감소시키고, 그 결과 세포사멸이 촉진되어 HeLa cell의 억제를 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

## V. 結 論

半枝蓮이 子宮頸部癌 세포인 HeLa cell에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도의 半枝蓮 檢液을 HeLa cell에 처리하여 細胞增殖 억제효과, 流細胞 分析을 통한 caspase 발현, caspase-3 活性, 배양된 細胞株의 活性를 알아볼 수 있는 지표인 DNA fragmentation 및 MAP kinase 活性 등을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 半枝蓮 檢液이 처리된 HeLa cell은 농도 의존적으로 細胞增殖이 억제되었다.
2. HeLa cell에서 caspase 활성을 보이는 세포 비율을 측정한 결과 5% 半枝蓮 檢液群에서 가장 증가하였다.
3. 半枝蓮 檢液이 처리된 HeLa cell의 세포 활성도는 24시간 및 72시간 배양에서는 5%와 10% 농도에서, 48시간 배양에서는 10% 농도에서 대조군에 비하여 감소하였다.
4. 半枝蓮 檢液이 처리된 HeLa cell의 MAP kinase 활성은 대조군에 비하여 감소하였다.
5. 半枝蓮 檢液의 처리는 HeLa cell의 DNA fragmentation과 caspase-3 활성에 유의한 변화를 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 半枝蓮은 子宮頸部癌 세포의 增殖抑制 효과가 나타났으므로 子宮頸部癌 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2006년 10월 27일
- 심 사 일 : 2006년 10월 30일
- 심사완료일 : 2006년 11월 06일

## 參考文獻

1. 대한병리학회. 병리학 (제2판). 서울: 고문사 1995:960-967
2. 대한산부인과학회. 부인과학 (제3판). 서울: 도서출판 칼빈서적 1997:924-925, 980-1027
3. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林出版 1995:229-234
4. 韓醫婦人科學 編纂委員會. 韓醫婦人科學 (上). 서울: 도서출판 정담 2002:303-307, 322-329
5. 宋錫鎬, 宋炳基, 李京燮. 癥瘕에 應用되는 歸朮破癥湯과 加味歸朮破癥湯의 效能에 關한 研究. 慶熙醫學. 1994;10(1):26-40
6. 曹永斗 등. 斑玄丸과 抗癌劑의 併用投與가 子宮癌細胞(HeLa)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1995;8(1):49-62
7. 朴世敏, 鄭鎭鴻, 柳同烈. 加味礬石丸의 鎮痛, 消炎 및 女性癌細胞에 對한 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 1997;10(1):39-49
8. 柳浩粉, 鄭鎭鴻, 柳同烈. 荊蓬煎丸料가 女性癌細胞 및 마우스 免疫細胞에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1998;11(1):109-129
9. 朴경미 등. 濟川煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(2):161-176
10. 朴중문 등. 六合湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(3):128-146
11. 유심근 등. 香稜丸이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)의 apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004;17(2):11-26
12. Youn JY, Noh HT. The effects of Ginseng extract on the inhibition of DNA synthesis in HeLa cells treated with anticancer drugs. Korean J Obstet Gynecol. 1990;33(1):69-75
13. 李允貞 등. 半枝蓮이 子宮암세포(Hela22918)의 성장억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1999;12(1):185-196
14. Kim CH. Effects of buthanol and methanol extracts from *Euonymus Alatus* on matrix metalloproteinase-9 in cervical epithelial carcinoma cells. The Journal of Oriental Gynecology & Gynecology. 2003;16(1):143-150
15. 朴정민 등. 子宮경부암동물세포에서 표고버섯의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암 효과, apoptosis에 의한 종양세포주의 성장억제. 한국식품과학회지. 2004;36(1):141-146
16. 정승은, 배지현. 간암 및 자궁암 세포주 증식에 미치는 오매 추출물의 영향. 한국영양학회지. 2002;35(4):439-445
17. 顏正華. 中藥學. 北京: 人民衛生出版

- 社 1991:221-222
18. 常毅敏. 抗癌本草. 서울: 도서출판 바람과 물결 1992:171-174
  19. 盛展能. 抗癌治驗本草. 重慶: 重慶出版社 1994:27-29, 213-215
  20. 潘鴻鵠. 中醫藥抗癌學. 北京: 中醫古籍出版社 1998:274, 280-281
  21. 서진우 등. 半枝蓮이 난소암세포(SNU-251)의 성장억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1999;12(1):151-160
  22. 권은정 등. 半枝蓮(*Scutellaria barbata* D. Don)이 乳房癌에 미치는 影響에 關한 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 1999;12(2):148-182
  23. Yin X *et al.* Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sci.* 2004;75(18):2233-2244
  24. 오민주 등. 半枝蓮의 GnRH agonist 유사활성에 의한 자궁근종 배양세포 성장억제효과. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004;17(3):44-53
  25. Lee TK *et al.* Inhibitory effects of *Scutellaria barbata* D. Don on human uterine leiomyoma smooth muscle cell proliferation through cell cycle analysis. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(3):447-454
  26. Lee TK *et al.* *Scutellaria barbata* D. Don induces c-fos gene expression in human uterine leiomyoma cells by activating  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14(3):526-531
  27. Sato Y *et al.* Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(3):483-488
  28. Yu J *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry.* 2004;65(7):881-884
  29. Cha YY *et al.* Methylene chloride fraction of *Scutellaria barbata* induces apoptosis in human U937 leukemia cells via the mitochondrial signaling pathway. *Clin Chim Acta.* 2004;348(1-2):41-48
  30. 송병기. 漢方婦人科學. 서울: 杏林出版社 1998:249-253
  31. 洪元植 編纂. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究院 1985:209, 304
  32. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울: 大星文化社 1983:452-457
  33. 張介賓. 景岳全書 婦人規. 서울: 法人文化社 1999:251-264
  34. 조영주. Multiparameter flow cytometry 의 응용. *Biochemistry News.* 1992;12(2):84-90
  35. Martin JC, Swartzendruber DE. Time: a new parameter for kinetic measurements in flow cytometry. *Science.* 1980;207(4427):199-201
  36. Herzenberg LA *et al.* The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48(10):1819-1827
  37. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88(3):355-365

38. Chae HJ *et al.* Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in osteoblasts: possible role for Ceramide. *Endocrinology*. 2000;141(8):2904-2913
39. Perry DK *et al.* Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3: a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18530-18533
40. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanism of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):725-731
41. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995;267(5203):1445-1449
42. Tapanainen JS *et al.* Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*. 1993;7(5):643-650
43. Herskowitz I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*. 1995;80(2):187-197
44. 최의주, 심재경. Stress-activated MAP kinase의 기능과 조절. *Biochemistry News*. 1996;16(3):184-187
45. 정광철. MAP kinase signaling pathways. *Biochemistry News*. 1997;17(3):116-125
46. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature*. 2001;410(6824):37-40