

虎杖根이 子宮頸部癌細胞의 成長抑制 및 細胞枯死에 미치는 영향

세명대학교 한의과대학 부인과학교실
최변탁, 김연희, 이동녕, 김형준

ABSTRACT

Polygonum cuspidatum Extract Induces Apoptosis in Human Uterine Cervical Carcinoma ME-180 Cells

Byun-Tak Choi, Yeon-Hee Kim, Dong-Nyung Lee, Hyung-Jun Kim

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

Purpose : *Polygonum cuspidatum* extract is an oriental herb which has been used for uterine diseases. In this study, the effects of *Polygonum cuspidatum* extract were investigated on inducing growth inhibition and apoptosis of human uterine cervical carcinoma cells.

Methods : Viability of *Polygonum cuspidatum* extract-induced ME-180 cells was measured by MTT assay. Apoptotic cells were visualized by EtBr/AcOr staining under fluorescent microscope. Nucleosomal DNA fragmentation was assayed by agarose gel electrophoresis. Cell cycle distribution and changes in mitochondrial membrane potential were observed by flow cytometry.

Results : *Polygonum cuspidatum* extract induced ME-180 cell death in a dose- and time-dependent manner. In the cells treated with Pc, the population of cells at sub-G1 phase significantly increased, and the condensed nuclei, apoptotic bodies and nucleosome-sized DNA were detected. Moreover, reduction in mitochondrial membrane potential was detected.

Conclusion : *Polygonum cuspidatum* extract inhibits the growth and proliferation of ME-180 cells by apoptotic induction and facilitates its activity initiated by depolarization of mitochondria.

Key words : apoptosis, ME-180 cells, *Polygonum cuspidatum*, mitochondrial membrane potential

I. 緒 論

子宮頸部癌은 전세계적으로 乳房癌 다음으로 호발하는 여성의 腫瘍이며¹⁾ 우리나라의 경우 2002년 현재 전체 악성종양 중 9.1%로 乳房癌, 胃癌, 大腸癌, 甲狀腺癌에 이어 5위를 차지하고 있을 정도로 중요한 부인과 질환이다²⁾. 장기간의 前癌性 病變인 상피내암의 상태를 거쳐 침윤성 암으로 진행되며³⁾, 처음에는 腔出血, 특히 閉經後나 性交後의 간헐적 腔出血, 악취가 나는 腔分泌物, 골반통, 요통, 요로증상, 피로감이 보이다가 시간이 경과하면서 尿毒症, 體重減少, 他 臟器로의 轉移 등에 이르러 사망하게 된다³⁾. 침윤성 子宮頸部癌은 45-50세에서 好發하고, 상피내암의 평균연령은 35-40세로, 이보다 10세 가량 낮다¹⁾.

子宮頸部癌과 유사한 韓醫學的 病名으로는 崩漏, 帶下, 癥瘕, 血膏, 五色帶下 등이 있으며, 이중 적취물의 유무와 기타 증상의 유사성에 근거해 볼 때 '癥瘕'가 이와 가장 흡사한 질환이라고 할 수 있다^{5,6,7)}.

최근 국내외 學界에서도 子宮頸部癌에 관하여 여러 實驗的인 研究가 이루어져 왔으며, 대부분 癥瘕의 治療에 사용되어온 약물이 여기에 응용되었다. 특히 이런 實驗은 加味桂枝茯苓丸⁴⁾, 濟川煎⁵⁾, 六合湯⁶⁾, 香稜丸⁷⁾, 斑玄丸⁸⁾, 柴胡疎肝散加味方⁹⁾ 등 방제위주의 研究를 중심으로 진행되었으나, 개별 약물이 子宮頸部癌에 미치는 영향에 대한 研究는 吳茱萸¹⁰⁾, 生地黃¹¹⁾, 半枝蓮¹²⁾ 등 몇몇 본초에 국한된 실정이다.

虎杖根은 마디풀科에 속한 다년생 초본인 虎杖 또는 왕호장의 根莖과 根을 건조한 것으로 성질은 微寒無毒하고 味는 苦하며 肝, 膽, 肺經에 들어가서 活血祛瘀, 清熱利濕, 化痰止咳, 解毒止痛, 涼血止血, 瀉熱通

便하는 작용을 한다¹³⁾. 그러므로 黃疸, 帶下, 咳嗽, 咽喉腫痛, 便秘, 痔漏下血, 痺症, 打撲損傷에 쓰일 뿐만 아니라 經閉, 產後惡露不盡, 癥瘕積聚 등 각종 부인과 질환에도 응용될 수 있는 藥材이다¹³⁾.

이에 저자는 活血祛瘀藥材에 해당하는 虎杖根이 子宮頸部癌의 성장억제와 細胞枯死에 어떤 영향을 미치는지에 대해 研究해 보고자 子宮頸部癌細胞인 ME-180 細胞에 대한 成長抑制 효과, 형태적 變化, DNA 분절 현상, 細胞週期 분석 및 mitochondria membrane potential 變化 등을 觀察한 結果, 다음과 같이 抗癌효과에 대한 유의성 있는 結果를 얻게 되었다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

(1) 藥材

虎杖根 20 g을 200 ml의 이차증류수에 넣어 1시간 동안 불리고 약한 불에서 2시간 동안 끓인 후 2,000 x g의 속도로 20분간 원심 분리하였다. 맨 위쪽의 상층액을 모아 동결 건조하여 15.11 g의 건조분말을 얻었다. 건조분말은 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 녹여 最終濃度 50 mg/ml로 만든 후 1ml씩 나누어 사용 직전까지 -20℃에 보관하였다.

(2) 試藥

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma社)는 PBS를 사용하여 最終濃度 5 mg/ml로 만든 후 여과멸균하였다. DMSO는 Aldrich社에서 구입하였고, RPMI-1640, fetal bovine serum, PBS는 Invitrogen社에서 구입하였다. Penicillin, streptomycin, trypan blue, rhodamine-123, propidium iodide, proteinase K, RNase A는 Sigma社에서 구입하였다. Ac-DEVD-pNA는 Santa Cruz

Biotechnology社에서 구입하였다.

2. 方法

(1) 細胞柱 培養

子宮頸部癌細胞柱인 ME-180 (KCLB 30033)은 韓國細胞柱銀行에서 구입하였다. ME-180 細胞柱는 10% fetal bovine serum을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여 5% CO₂를 공급한 항온배양기에서 培養하였다. 동결된 상태로 구입한 fetal bovine serum은 냉장에서 2-3일간 서서히 녹인 후 56℃에서 30분간 heat inactivation시켰다. 사용된 RPMI-1640/10% FBS배지에는 항생제 penicillin을 100 IU/ml, streptomycin을 最終濃度 50 µg/ml로 첨가하여 4℃에 냉장 보관하였으며 37℃로 prewarming시킨 후 사용하였다.

chemical은 모두 0.2 µm filter로 여과멸균하여 -20℃에 보관하였고 사용 직전 녹여서 사용하였다.

(2) 細胞數 및 生存細胞數 測定

Trypan blue와 hemocytometer를 사용하여 細胞數 및 生存細胞數를 다음과 같은 방법으로 결정하였다. 60 mm culture용 dish에 키운 monolayer culture에서 배지를 Pasteur pipet을 사용하여 제거하였다. 남아 있는 FBS를 제거하기 위하여 1 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) without Ca²⁺ and Mg²⁺를 사용하여 부착된 cell monolayer를 두 번 행구었다. 1 ml의 0.5% Trypsin/EDTA 용액을 넣은 후 1~3분간 상온에 방치하여 plate에서 떨어진 細胞들을 2 ml의 RPMI-1640/10% FBS를 넣은 15 ml 원심분리관에 옮겨 200 x g의 속도로 상온에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한후 세포침전물에 1 ml의 RPMI-1640/10% FBS를 넣고 RPMI-1640 배

지로 적당히 희석하였다. Trypan blue용액을 최종 濃度 0.2%로 첨가한 후 hemocytometer로 살아있는 細胞의 비율을 결정하였다.

(3) 細胞毒性效果

韓藥材를 처리한 후 야기되는 細胞毒性效果(cytotoxic effect)를 결정하기 위해 살아 있는 細胞에 의해 MTT가 수용성 formazan으로 변환되는 양을 측정하였다. 90 µl의 培養 배지에 10,000개의 細胞를 포함시켜 96-well plate에 넣은 후 24시간 培養하여 plate에 細胞를 부착시켰다. 약재추출물 (10 µl)을 여러 濃度로 넣은 후 다시 24시간 동안 培養하였다. 15 µl의 MTT를 넣고 37℃에서 4시간 동안 培養하고 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 그리고 40 µl의 DMSO를 첨가하여 細胞를 용해시킨 후 형성된 formazan을 녹이기 위해 15분간 shaking하였다. Lysate의 濃度를 Bio-Rad microplate reader를 사용하여 570 nm에서 측정하였다.

(4) Acridine Orange/Ethidium Bromide와 Propidium Iodide 染色에 의한 細胞形態 觀察

96-well plate에 5 x 10⁴ cell을 넣고 24시간 후 약품을 처리하였다. 약품처리 후 24시간 培養한 후 trypsin처리로 細胞를 plate에서 떼어내어 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 細胞를 침전시켰다. 50 µl RPMI-1640 배지로 細胞를 재부유한 후 1 µl의 Acridine Orange/Ethidium Bromide 혼합염색액 (100 µg/ml AcOr and 100 µg/ml EtBr in PBS)을 첨가하고 형광현미경으로 觀察하였다. PI 염색의 경우 재부유한 細胞液을 70% ETOH로 10분간 고정한 후 PBS로 세 번 행구었다. Propidium iodide 염색액 (1 µg/ml PI in PBS)을 처리하고 10분 후 형

광현미경으로 觀察하였다.

(5) DNA 分析

96-well plate에 10^6 cell을 넣고 24시간 동안 5% CO₂ 培養器에서 培養하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 적당한 濃度の 虎杖根 추출물을 처리하고 24시간 培養한 후 trypsin을 처리하여 細胞를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 細胞를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하고 -20°C에 16시간 이상 넣어두었다. 4°C에서 800 x g로 5분간 원심분리하여 에탄올을 완전히 제거한 후 20 μ l의 lysis buffer (2 mM EDTA, 100 mM Tris · Cl (8.0), 0.8% SDS)를 넣은 다음 2 μ l 50 mg/ml RNase A를 넣고 혼합하였다. 37°C에서 최소한 30분간 培養한 후 10 μ l의 Proteinase K를 넣어 50°C에서 최소한 1시간 30분 培養하였다. 8 μ l의 4x DNA loading buffer를 넣은 후 1.8% SeaKem agarose gel에서 TBE buffer로 sample을 50 Volt로 running하여 DNA를 분리시켰다.

(6) 細胞週期 分析

96-well plate에 10^6 cell을 넣고 24 시간 5% CO₂ 培養器에서 培養하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 적당한 濃度の 藥품을 처리한 후 24 시간 培養한 다음 trypsin을 처리하여 細胞를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 細胞를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하였다. 300 x g로 5분간 원심분리 한 후 침전물에 1ml의 PBS를 넣어 300 x g로 5분간 원심분리로 水洗처리하고 다시 한 번 PBS로 수세하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 μ l의 PI 염색약

(0.1% Triton X-100, 200 μ g/ml RNase A, 20 μ g/ml propidium iodide in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 15 분간 培養하였다. Flow cytometry (Beckton Dickinson社)로 cell fluorescence를 측정하여 細胞週期를 분석하였다.

(7) Mitochondria membrane potential 測定

Mitochondria의 membrane potential 變化는 Rh123으로 염색하고 난 뒤 flow cytometry에 의해 결정하였다. 96-well plate에 10^6 cell을 넣고 24 시간 5% CO₂ 培養器에서 培養하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 적당한 濃度の 虎杖根을 처리하고 24시간 培養한 후 trypsin을 처리하여 細胞를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 細胞를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하였다. 300 x g로 5분간 원심분리한 후 침전물에 1ml의 PBS를 넣어 300 x g로 5분간 원심분리로 수세처리하고 다시 한번 PBS로 수세하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 μ l의 Rh123 염색약 (5 μ g/ml rhodamine 123 in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 30분간 培養하였다. 細胞를 PBS로 수세한 후 FACS Calibur로 cell fluorescence를 측정하였다.

III. 結 果

1. ME-180 細胞에 대한 成長抑制 效果

虎杖根 추출액을 다양한 濃度(0, 0.63, 1.25, 2.5 mg/ml)로 처리한 결과, 48시간 후 虎杖根 추출액 1.25 mg/ml 존재하에서 약 60%의 細胞가 枯死하였고 虎杖根 濃度の 增加에 따라 세포생존율이 점차 減少됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 이 結果는 虎杖根이 ME-180 細胞에 대해 濃도와 시간에 따라 細

胞成長을 抑制함을 나타낸다. 아울러 ME-180 細胞에 대해 虎杖根 추출액 1mg/ml 을 처리한 후 그 형태를 광학현미경으로 觀察하였다. 虎杖根 추출액을 처리하지 않은 細胞群에서는 대부분 크고 둥글거나 다각형의 細胞形을 나타내었으나 虎杖根 추출액을 처리한 細胞群에서는 細胞들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있는 형태를 나타내었다.

Concentration of Pc (mg/ml)	Cell Viability
0	100
0.63	88.1 ± 12.7
1.25	41.7 ± 3.1
2.5	36.7 ± 2.5

Data are expressed as means +standard deviation. Data were analyzed for statistical significance by Student's t-test. P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Fig. 1. Growth-inhibitory effect of *Polygonum cuspidatum*(Pc) extract on ME-180 cells.

ME-180 cells were incubated with various concentrations of Pc for 48 hrs and cytotoxicity was measured by MTT assay.

2. ME-180 細胞에 대한 apoptosis 效果

虎杖根 추출액 1 mg/ml 존재하에서 48시간만에 일어나는 형태적 變化를 AcOr/EtBr 와 PI로 염색하고 조사한 결과, ME-180 細胞는 apoptosis가 일어난 細胞에서 觀察되는 특징적인 축소된 細胞, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies를 나타내었다.

3. DNA fragmentation 分析

虎杖根 추출액 1.5 mg/ml을 처리한 후 48시간 만에 ME-180 細胞에서 분리한 genomic DNA(Fig. 2, lane 2)는 대조군(Fig.

2, lane 1)에 비해 뉴클레오솜 크기의 DNA 가 낮은 비율이나마 형성되었다. 이로 미뤄 볼 때 虎杖根에 의한 DNA fragmentation 유도효과는 그리 높지 않은 것으로 여겨진다.

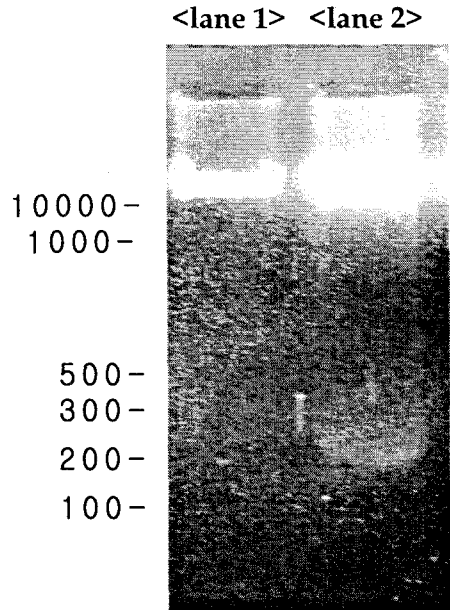
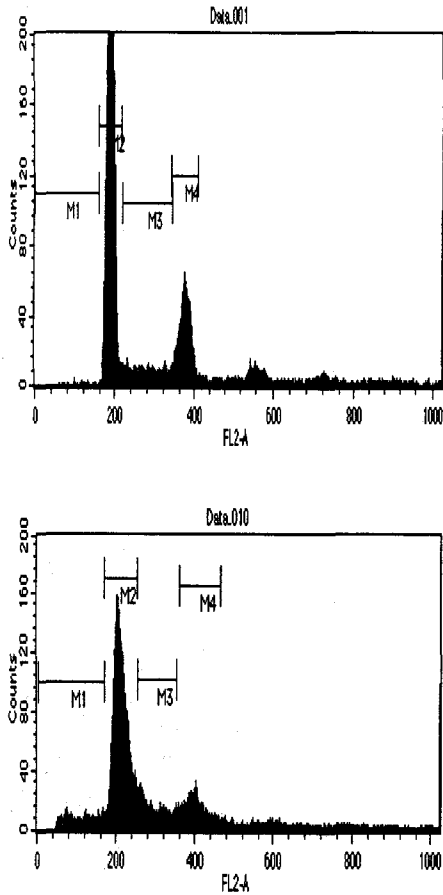


Fig. 2. Pc-induced DNA fragmentation analysis in ME-180 cells.

ME-180 cells were cultured in the presence of Pc for 48 hr, and genomic DNA was extracted and separated by 1.8% agarose gel. lane 1; 0 mg/ml Pc, and lane 2; 1.5 mg/ml Pc. Left numbers indicate the size of DNA in base pairs.

4. 細胞週期 分析

虎杖根 추출액 1 mg/ml를 처리하여 24시간 培養한 후 cell cycle 분포를 flow cytometer로 분석하였다(Fig. 3). 虎杖根을 처리하지 않은 細胞群(control)에서는 apoptosis를 일으킨 細胞, 즉 M1의 비율이 0.23%에 불과하였으나 虎杖根을 처리한 細胞群에서는 7.91%로 增加함을 觀察할 수 있었다.



Marker	control	1 mg/ml Pc, 24 hr
All	100.00	100.00
M1	0.23	7.91
M2	59.98	53.38
M3	7.62	10.37
M4	18.35	12.39

Fig. 3. Flow cytometric analysis of ME-180 apoptotic changes.

ME-180 cells were incubated in the absence (upper panel) or presence of 1 mg/ml Pc (lower panel) for 24 hrs. Cells were stained with PI as described in Materials and method and analyzed by Flow cytometer.

5. Mitochondrial membrane potential에 대한 효과

虎杖根 추출액 처리군의 mitochondrial membrane potential은 대조군에 비해 현저하게 減少하였다(Fig. 4). Rh123 형광 강도도 0.5 mg/ml 虎杖根 처리군에서는 매우 미약하게 減少되었으나 1 mg/ml 虎杖根 처리군에서는 현격하게 減少된 것으로 나타났다.

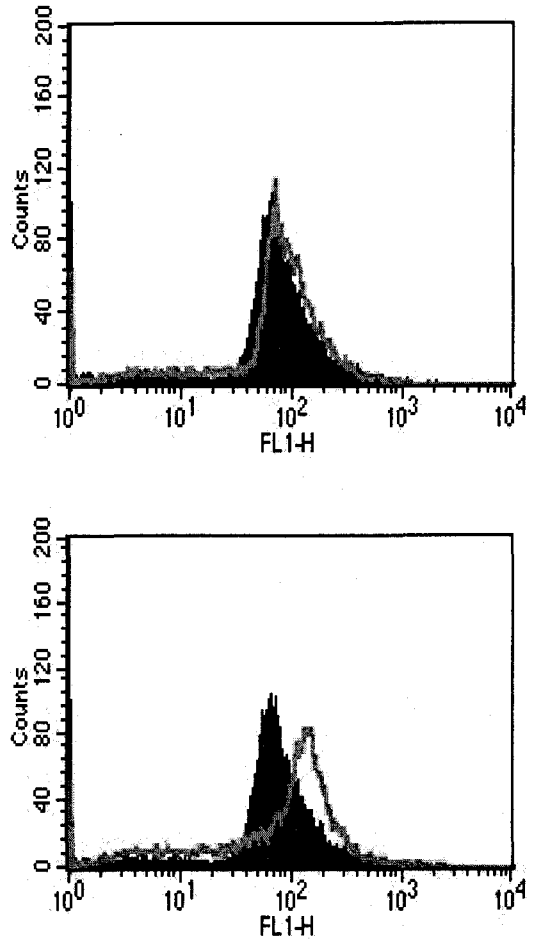


Fig. 4. Pc-induced changes on mitochondrial membrane potential in ME-180 cells.

ME-180 cells were incubated in the absence (violet peak in the middle) or presence of 0.5 and 1 mg/ml Pc (green lines in upper and lower panel) for 24 hrs. Cells were stained with Rh123 and analyzed by Flow cytometer.

IV. 考 察

子宮頸部癌은 전세계적으로 乳房癌 다음으로 빈번한 여성의 腫瘍이며, 국내에서도 점차 그 빈도가 감소하고 있긴 하나 여전히 여성암중 가장 중요한 위치를 점하고 있는 질병이다²⁾. 증상은 질출혈, 악취가 나는 膻分泌物, 골반통, 요통, 요로증상, 피로감, 尿毒症, 體重減少 등이 있으며, 子宮 경부 外口에 경화된 과립성 돌출, 접촉성 출혈, 종괴 육안 검사, 세포진 검사, 子宮頸部 촬영술, Schiller검사, 질확대경 검사, 질현미경 검사, 조직 검사, 종양표지물질, 臨床病機 설정검사 등을 통해 확인할 수 있다¹⁾.

子宮頸部癌의 西洋醫學的 治療는 임상적 進行病機에 따라 다르지만, 子宮摘出術 등의 수술적 療法이나 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 사용되고 있고, 비교적 癌細胞의 전이가 국한되었을 때는 수술요법과 방사선요법이, 말기엔 화학요법과 면역요법 등 전신요법이 시행되고 있다¹⁴⁾.

子宮頸部癌과 유사한 韓醫學的 개념으로는 崩漏, 帶下, 癥瘕, 血膏, 五色帶下 등이 있으나 이중 적취물의 유무와 증상의 유사성에 근거해 볼 때 '癥瘕'가 가장 흡사한 질환이라고 할 수 있다^{5,6,7)}.

癥瘕의 病因에 대해 <靈樞 百病始生篇>에서는 外感寒邪와 七情所傷¹⁶⁾, 巢元方은 外感寒邪와 食傷¹⁷⁾, 孫思邈은 正氣虛¹⁸⁾, 李梴은 傷食과 瘀血¹⁹⁾, 薛己는 瘀血²⁰⁾을 지적하였다. 治法에 대해서는 <素問 至眞要大論>에서 攻, 消, 散, 補¹⁵⁾, 張景岳은 "養正邪自除"²¹⁾, 龔廷賢은 消痰, 活血, 順氣, 健脾²²⁾, 吳謙은 理氣, 消導, 活血²³⁾, 王清任은 活血化癥²⁴⁾ 등의 치법을 각각 제시하였다.

최근 한의학계에서는 子宮頸部癌을 정복하기 위해 전통적으로 癥瘕의 치료에 사용되어 온 加味桂枝茯苓丸, 濟川煎, 六合湯, 香稜丸, 斑玄丸, 柴胡疎肝散加味方 등 방제위주의 研究가 많이 이루어졌으나⁴⁻⁹⁾, 개별 약물이 子宮頸部癌에 미치는 영향에 대한 研究는 吳茱萸, 生地黃, 半枝蓮 등 극히 일부 본초에 국한된 실정이다¹⁰⁻¹²⁾.

본 실험에서 사용된 虎杖根은 마디풀과에 속한 다년생 초본인 虎杖, 또는 왕호장의 根莖과 根을 건조한 것으로 性은 微寒 無毒하고 味는 苦하며 肝, 膽, 肺經에 들어간다¹³⁾. <東醫寶鑑>에서는 "性이 微溫하고 味가 苦하며 無毒하여 留血癥結을 破하고 通經하며 産後의 惡露를 下한다. 排膿하여 瘡癤, 癰毒과 撲損瘀血을 主하고 小便을 利하여 五淋을 通하게 한다."고 하였으며²⁵⁾, <方藥合編 藥性賦>에서도 "虎杖溫平治煩渴 諸淋可利通經血"이라 하여 煩渴, 淋症, 經閉 등에 많이 응용됨을 설명하였다²⁶⁾. 최근 한의학계에서도 通絡止痛, 清熱利濕, 苦降泄熱, 化痰止咳, 瀉下通便하는 효능에 기초하여 風濕痺痛, 跌打損傷, 濕熱黃疸, 淋濁帶下, 水火燙傷, 瘡癤腫毒, 毒蛇咬傷, 肺熱咳嗽, 熱結便秘, 膽石症, 尿路結石 등의 치료에도 부분적으로 활용하고 있긴 하나, 무엇보다도 活血祛瘀하는 작용이 있어서 부인과에서 瘀阻로 인한 經閉를 治療하는데 가장 널리 이용하고 있다¹³⁾.

현대의학에서는 과학의 발달과 더불어 각종 질병의 기전, 치료 및 예방에 대한 研究에서 細胞와 유전자 차원에 대한 研究가 진행되고 있으며 韓醫學에서도 최근 細胞와 관련한 분자생물학적 방법으로 한약의 유효성과 침구 치료의 기전을 증명하는 實驗들이 시행되고 있다²⁷⁻²⁹⁾.

細胞의 死滅에는 자연적인 細胞枯死

(apoptosis)와, 물리적인 자극이나 삼투압 등으로 인한 細胞壞死(necrosis)가 있는데, 그 중 특히 細胞枯死은 '細胞의 예정된 죽음(programmed cell death)'이라고도 하며, 생리적인 자극의 變化로 細胞 사멸을 유도함으로써 細胞의 항상성을 유지하는 과정이다⁷⁾. 細胞枯死은 죽는 細胞가 면역 반응을 일으켜서 주위 細胞에 악영향을 주는 부작용 없이 蝕細胞(phagocyte)에 의해 청소가 될 수 있는 상태로 진행되는데, 핵산의 농축 및 DNA가 일정한 크기로 조각나는 현상, 細胞質속 세포소기관, 소포체, 細胞膜 등에서의 變化가 발생하는 등 독특한 양상을 띤다³⁰⁾.

細胞枯死이 細胞나 臟器의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요 기전으로 인식되면서 1980년대 후반기부터는 생명과학에서 중요 관심영역으로 인식되어 많은 연구가 행해져 왔으며 특히 신경계와 면역계 細胞의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다.³¹⁾

이에 저자는 虎杖根이 子宮頸部癌 細胞인 ME-180 細胞의 細胞枯死과 成長抑制에 대해 어떤 영향을 미치는지에 대해 알아보기 위해 다양한 濃度의 虎杖根 추출액을 투여했을 때 生存細胞에 의해 MTT가 보라색의 formazan으로 변환되는 양의 變化를 측정하였다. 그 결과 농도가 올라갈수록 생존세포의 비율이 줄어드는 경향을 확인할 수 있었는데, 특히 1.25 mg/ml을 투여하자 48시간 후 약 60%의 細胞가 死滅하였고, 濃度가 2.5 mg/ml로 增加함에 따라 생존세포는 약간 더 감소함을 알 수 있었다(Fig. 1).

또한 광학현미경상 虎杖根 추출액을 처리하지 않은 細胞群에서는 대부분 크고 둥글거나 다각형의 細胞形을 나타내었으나 虎

杖根 추출액을 처리한 細胞群에서는 細胞들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있는 형태를 나타내어 세포 자체의 성장을 억제하고 있음을 확인할 수 있었다.

이것을 좀 더 확인하기 위해 세포들을 각각 AcOr/EtBr와 PI로 염색한 후 나타내는 형태적 變化를 조사하였다. 虎杖根 추출액을 1mg/ml 투여한 뒤 48시간이 경과했을 때 ME-180 細胞는 apoptosis가 일어난 細胞에서 觀察되는 細胞 크기의 축소, 염색질의 응축 및 apoptotic bodies를 나타내었다.

細胞枯死이 일어나면 endonuclease가 활성화되어 DNA가 작은 길이로 잘라지는 경향이 있다. 이를 확인하기 위해서 전기영동(electrophoresis)기법이 많이 활용되는데, 그 중 분자생물학에서 가장 폭넓게 사용되는 기술은 polyacrylamide gel electrophoresis이며, 이는 전하와 크기의 차이를 통해 핵산의 분리에 이용된다. 분리될 분자들의 전하에 의해 분자들은 반대전하를 띤 전극으로 젤 상에서 이동하는데, 실험장치 젤을 수직방향으로 놓고 시료를 위에서 주입한 후 전류를 걸어주면 음전하를 띤 올리고뉴클레오타이드들이 아랫부분의 양전극 방향으로 움직인다³²⁾.

본 實驗에서 虎杖根추출액 1.5 mg/ml을 처리한 후 48시간 만에 ME-180 細胞에서 분리한 genomic DNA(Fig. 2, lane 2)는 대조군(Fig. 2, lane 1)에 비해 nucleosome 크기의 DNA가 약간 형성되었다. 이를 통해서 볼 때 虎杖根에 의해 DNA fragmentation 유도 효과가 미약하나마 나타나고 있음을 확인하였다. 또한 細胞枯死이 일어나는 細胞에서는 대체로 DNA ladder가 160, 320, 480, 640 등 사다리 모양으로 gel 상에 나타난다. 그러나 본 實驗에서 虎杖根을 細胞에 처리

해 보니 160 base pair 크기의 단일 band만이 觀察되었다. 그 이유는 독특한 endonuclease의 활성화가 더 많이 진행되어 단일 뉴클레오솜 단위로 분절화가 잘 이루어진 것으로 보인다.

최근 암세포의 성장억제와 관련하여 細胞週期에 관한 관심이 높아지고 있다. 細胞가 분열기와 분열간기 사이를 순환하는 과정을 細胞週期라 하는데³³, 진핵세포의 細胞週期는 DNA 합성의 조절 시기에 따라 합성전기(G1 phase), 합성기(S phase), 합성후기(G2 phase), 유사분열기(M phase)로 나눌 수 있다^{34,35}. 최근 연구에 의하면 細胞枯死는 細胞週期和 필연적인 연관성을 가지고 있으며, 특히 細胞週期の 변화 과정에서 어느 단계에서 다른 단계로 넘어가는 과정이 억제됨에 따라 細胞枯死가 촉진될 수 있다는 사실이 확인되었다. 이에 따르면 細胞週期の 주요 조절점은 합성전기의 후반에 있어서 합성전기에서 합성기로의 진행을 통제하며, 細胞枯死가 일어나면 합성전기에서 합성기로 넘어가지 못하고, sub-G1기(M1)라고 불리는 단계에 머물러 더 이상 발전하지 못하는 細胞의 비율이 늘어난다. sub-G1기는 정상 2n보다 적은 양의 DNA를 가지므로 細胞枯死를 일으켜 DNA fragmentation이 일어남에 따라 적은 양의 DNA를 가지는 것으로 보인다. 즉, M1은 apoptotic cell의 비율을 측정하는 기준이 될 수 있다는 것이다³⁷⁻³⁹.

또한 구체적으로 五積散이나 香附子 등을 투여하면 DNA의 분절화로 세포주기 중 sub-G1 fraction의 비율이 증가하여 자궁암세포의 細胞枯死가 촉진되는지를 확인할 수 있다는 연구 발표도 있었다^{35,36}. 이에 본 실험에서는 虎杖根이 細胞枯死에 미치

는 영향을 확인하기 위해 虎杖根 추출액 1 mg/ml을 처리하여 24시간 培養한 후 cell cycle 분포를 유세포분석기로 분석하였다 (Fig. 3). 虎杖根을 처리하지 않은 細胞群(control)에서는 apoptosis를 일으킨 細胞, 즉 M1의 비율이 0.23%에 불과하였으나 虎杖根을 처리한 細胞群에서는 7.91%로 增加함을 觀察할 수 있었다. 이는 虎杖根이 子宮頸部癌細胞의 세포분열을 억제함으로써 apoptosis를 촉진하고 있음을 보여준다.

細胞枯死에 있어서 미토콘드리아 膜電位差(mitochondrial membrane potential)가 지니는 중요성도 학계에서 주목하고 있는 분야이다. 미토콘드리아는 단순히 ATP를 생산하여 대사에너지를 생성하는 것만이 아니라 caspase, cytochrome-c 등 細胞枯死를 야기시키는 단백질을 머물게 하는 장소의 역할을 한다⁴⁰. 즉 細胞枯死의 발현은 mitochondrial dysfunction으로 이어지며 이로 인하여 caspase의 활성화가 이루어진다고 한다⁴¹. 그 과정에 대해서는 여러 주장들이 있으나 현재까지의 研究結果를 종합해 볼 때, mitochondrial membrane potential collapse는 특히 cytochrome-c를 유리시키며, cytochrome-c는 pro-caspase-9를 활성화형의 caspase-9로 바꾸고, 이어서 활성화형의 caspase-8이나 caspase-9에 의해 caspase-3도 활성화된다. 이와 같이 모든 단백질 분해효소가 활성화되면서 DNA가 분해되어 apoptosis가 일어난다⁴²⁻⁴⁴. 이를 종합해 볼 때 미토콘드리아의 膜電位差가 감소하면 子宮頸部癌 細胞의 細胞枯死가 촉진된다는 결론에 이르게 된다.

본 實驗에서 虎杖根 추출액을 투여했을 때 대조군에 비해 虎杖根 처리군의 膜電位差가 減少됨을 보여주고 있으며 Rh123

형광 강도도 虎杖根 추출물을 0.5 mg/ml 투여했을 때는 매우 미약하게 減少되었으나 1 mg/ml을 투여했을 때는 현격히 減少된 것을 확인할 수 있다 (Fig. 4). 이는 결국 虎杖根이 미토콘드리아의 膜電位差를 낮춤으로써 細胞枯死을 유도하고 있음을 보여 준다.

이상의 모든 實驗結果를 종합해 볼 때 虎杖根은 子宮頸部癌細胞柱인 ME-180 cell에 대한 成長抑制, 축소된 細胞, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies 등 細胞의 형태적 變化, 전기영동상 DNA 분절 형성, 細胞週期상 sub-G1기(M1) 비율의 增加, 미토콘드리아 膜電位差의 감소 등을 통해 子宮頸部癌에 대한 細胞枯死을 촉진시키고 있음을 확인할 수 있다.

V. 結 論

活血祛瘀藥材인 虎杖根이 子宮頸部癌細胞 ME-180의 成長抑制 및 細胞枯死에 미치는 영향을 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 虎杖根 추출액을 처리했을 때 濃度(0, 0.63, 1.25, 2.5 mg/ml)에 비례하여 ME-180 細胞의 成長이 抑制됨을 확인할 수 있었다. 특히 濃度가 1.25 mg/ml 일 때는 세포의 60% 정도가 死滅하였다. 또한 광학현미경 상으로 虎杖根을 처리한 細胞는 정상군에 비해 크게 위축된 모습을 나타내었다.
2. 虎杖根 추출액 1 mg/ml을 처리하고 ME-180細胞에 대해 AcOr/EtBr과 PI 염색처리를 했을 때 전형적인 apoptosis가 일어난 세포에서 觀察되는 세포 크기의 축소, 염색질의 응축, apoptotic bodies의 형태를 나타내었

다.

3. 虎杖根 추출액 1.5 mg/ml을 처리하고 세포주를 전기영동하였을 때 DNA fragmentation이 이루어져, 160 base pair 단위의 단일 DNA 분절이 다량 검출되었다.
4. 虎杖根 추출액 1 mg/ml을 처리하고 유세포분석기로 ME-180 細胞의 細胞週期를 분석해 본 結果, Sub-G1기(M1) 細胞의 비율이 대조군에 비해 유의성 있게 增加한 7.91%로 나타났다.
5. 虎杖根 추출액 0.5 mg/ml을 투여했을 때는 膜電位差의 減少가 그다지 크게 나타나지는 않았으나 1 mg/ml을 투여했을 때는 유의성 있게 膜電位差가 減少하였다.

이상의 실험결과를 분석해 볼 때 虎杖根은 子宮頸部癌 세포인 ME-180 cell에 대해 成長抑制效果, 형태적 變化, DNA fragmentation 현상, 細胞週期에서 Sug-G1기(M1) 비율 증가, 미토콘드리아 막전위차의 감소를 통해 細胞枯死을 유도함으로써 유의성 있는 抗癌效果를 거두었다.

□ 투 고 일 : 2005년 04월 29일

□ 심 사 일 : 2005년 05월 02일

□ 심사완료일 : 2005년 05월 10일

參考文獻

1. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學(上). 서울:鼎談. 2001: 319-326.
2. 한국중앙암등록본부·보건복지부. 한국중앙암등록사업 연례 보고서 (2002. 1-2002.12). 보건복지부. 2003.

3. 대한병리학회. 제3판 병리학. 서울:고문사. 1998: 31-38, 896-900.
4. 高昊奎. 加味桂枝茯苓丸과 항암제 併用時 子宮癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 효과. 대전대학교 석사학위논문. 1995.
5. 박경미 등. 濟川煎이 子宮經部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1995; 16(2): 161-176.
6. 朴鍾文 등. 六合湯이 子宮經部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003; 16(3): 128-146.
7. 김송백 등. 香稜丸이 子宮經部癌細胞(HeLa Cell)의 apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004; 17(2): 11-26.
8. 曹永斗. 斑玄丸과 抗癌劑의 併用投與가 子宮癌細胞(HeLa)에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 1995.
9. 옥현 등. 柴胡疎肝散加味方이 子宮經部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004; 17(4): 101-111.
10. Ying ZHANG et al. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 Jan; 25(1): 83-89.
11. 金柱延. 生地黃이 子宮經部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文. 2003.
12. 李允貞 등. 반지련이 자궁암세포(Hela 22918)의 성장억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004; 17(4): 101-111.
13. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 永林社. 1998: 420-421.
14. 목정은 등. 자궁경부암 환자 1,058례의 임상적 분석. 대한산부인과학회지. 2001; 44(1): 101-110.
15. 王冰. 新編 黃帝內經素問. 서울:대성문화사. 1999: 123-360.
16. 郭謁春. 黃帝內經靈樞 校注語譯. 서울:醫聖堂. 1993: 434-442.
17. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울:대성출판사. 1983: 736-738.
18. 孫思邈. 備急千金要方校釋. 北京:人民衛生出版社. 1998; 卷 11: 258-263.
19. 李梴. 國譯編註醫學入門(V卷). 서울:南山堂. 2001: 36-43.
20. 薛己. 橋注 婦人良方註釋. 서울:일중사. 1989: 157-160.
21. 張介賓. 景岳全書. 北京:人民衛生出版社. 1997: 504-512.
22. 龔廷賢. 國譯萬病回春(上卷). 서울:癸丑文化社. 1997: 352-361.
23. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울:대성문화사. 1983: 452-458.
24. 王清任. 醫林改錯篇釋. 서울:정보사. 1998: 129-132.
25. 東醫寶鑑國譯委員會. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999: 1962.
26. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울:傳統醫學研究所. 1993: 557.
27. Gao-Liang Ouyang et al. Growth arrest and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells induced by hexamethylene bisacetamide. *World j Gastroenterol.* 2004; 10(7): 954-958.
28. Shu-Lan Yuan et al. Growth

- inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells. *World j Gastroenterol.* 2004; 10(14): 2024-2028.
29. Wei-wei An et al. Norcantharidin induces human melanoma A375-S2 cell apoptosis through mitochondrial and caspase pathways. *J Korean Med Sci.* 2004; 19: 560-566.
30. Alnemri ES. Mammalian cell death proteases, A family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J. Cell Biochem.* 1997: 33-42.
31. 허종찬 등. 인간 폐암세포주 H-460 세포에서 加減十全大補湯과 As_2O_3 의 병용처리에 의한 항종양 증진 효과. 동의생리병리학회지. 2004; 18(4): 1089-1097.
32. 김재호 등. 생화학. 서울:청문각. 1997: 172.
33. 강신성 등. 생물과학. 아카데미서적. 1997: 292-304.
34. 李和京. 鷄血藤이 子宮筋腫細胞의 增殖抑制와 細胞自滅死 관련 遺傳子의 發顯에 미치는 影響. 대구한의대학교 대학원 博士學位論文. 2004.
35. 전미혜 등. 五積散이 子宮筋腫細胞의 死滅과 Cell Apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003; 16(2): 45-54.
36. 백승희 등. 香附子가 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003; 16(2): 18-33.
37. Le XF et al. Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene.* 1998; 16(14): 1839-1849.
38. Musgrove EA et al. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(17): 8022-8026.
39. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 1995; 17(6): 471-480.
40. Emad S. Alnemri. Hidden powers of mitochondria. *nature cell biology.* 1999; 1: 40-42.
41. Susin SA et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptotic protease. *J. Exp. Med.* 1996; 184(4): 1331-41.
42. Zamzami N et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 1995; 182(2): 367-377.
43. Castedo et al. Mitochondrial perturbation defines lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *Eur. J. Immunol.* 1995; 3277-3284.
44. Van Loo G et al. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than

one bullet: Cell death and
Differentiation Shared pathways:
death receptors and cytotoxic
drugs in cancer therapy: Petak I,
Houghton JA. Pathol, Oncol.
Res. 2002; 9(1): 1031-42.