

榆皮가 HeLa Cell의 増殖抑制와 死滅에 미치는 影響

경희대학교 한의과대학 부인과학교실

최윤희, 조정훈, 장준복, 이경섭

ABSTRACT

Inhibitory Effect of *Cortex ulmi pumilae* on Cell Proliferation in HeLa Cell

Yun-Hui Choi, Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental Gynecology, college of Oriental Medicine, Kyung Hee Univ.

Purpose : This study was conducted to investigate the inhibitory effects of *Cortex ulmi pumilae* on cell proliferation in HeLa cell.

Methods : Human uterine cervical carcinoma HeLa cells were cultured in the 1%, 5% and 10% concentration of *Cortex ulmi pumilae* solution for 24 hours, 48 hours and 72 hours for the direct inhibitory effects of *Cortex ulmi pumilae*. Afterwards, we executed the analysis of the effect of *Cortex ulmi pumilae* solution on cell proliferation inhibition using XTT assay, DNA fragmentation, molecular biological method through MAP kinase activity and FACS analysis of caspase activity in the HeLa cells.

Results : After 48 and 72 hours cultivation, the HeLa cells showed the concentration-dependently significant increase in all *Cortex ulmi pumilae* solution containing groups compared to the control. In the FACS analysis, all *Cortex ulmi pumilae* solution containing groups showed concentration-dependent increase compared to the control after 24 hours cultivation and the caspase-3 activities were decreased in all *Cortex ulmi pumilae* solution containing groups compared to the control after 24, 48 and 72 hours cultivation. After 48 and 72 hours cultivation, we could examine the apparent DNA fragmentation in all *Cortex ulmi pumilae* solution containing groups. In the XTT study, all *Cortex ulmi pumilae* solution containing groups showed concentration-dependent decrease compared to the control after 24 and 72 hours cultivation but 10% group after 48 hours and 5% and 10% groups after 72 hours were presumed statistically significant differences. The expressions of MAP kinase were decreased in all *Cortex ulmi pumilae* solution containing groups compared to the control after 24, 48 and 72 hours cultivation.

Conclusion : From this study we could suggest that *Cortex ulmi pumilae* be available to the inhibition of apoptosis of human cervical carcinoma cell line *in vitro*.

Key Words : *Cortex ulmi pumilae*, HeLa cell, FACS, caspase-3, DNA fragmentation, XTT, MAP kinase

I. 緒論

子宮頸部癌은 乳房癌 다음으로 빈번한 女性腫瘍으로¹⁾ 우리나라 女性 生殖器癌 중 가장 흔한 질환이다²⁾. 子宮頸部癌의 臨床症狀은 閉經 後나 性交 後 出血, 惡臭가 나는 膺 分泌物, 骨盤痛, 腰痛, 尿路 症狀, 疲勞感, 體重減少 등이 있으며^{3,4)}, 治療方法으로는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法 등이 施行되고 있다³⁻⁶⁾. 이러한 治療法들은 정상세포 손상으로 인한 각종 부작용과 후유증을 야기하므로^{7,8)}, 인체에 무해하면서도 효과적인 치료법의 개발이 요구되고 있다.

子宮頸部癌에 대해 문 등^{3,6,9)}은 崩漏, 帶下, 癥瘕, 血蠱 등의 範疇에 속한다고 하였으며, 최⁹⁾는 肝氣鬱滯, 肝腎陰虛, 濕熱瘀毒, 脾腎兩虛로 辨證하여 疏肝解鬱, 健脾利濕, 滋養肝腎, 清熱利濕, 溫補脾腎 등의 治法을 사용한다 하였다.

子宮頸部癌에 관하여 疏肝解鬱시키는 香稜丸¹⁰⁾과 加味柴胡疎肝散¹¹⁾, 活血祛瘀시키는 乾漆散¹²⁾, 荊蓬煎丸料¹³⁾, 六合湯¹⁴⁾, 桂枝茯苓丸¹⁵⁾, 濟川煎¹⁶⁾ 및 半枝蓮¹⁷⁾ 등이 연구되었으며, 常 등^{18,19)}은 자궁암에 三七, 三稜, 龍葵, 天南星, 白花蛇舌草, 敗醬草, 金銀花, 莪朮, 紫河車, 半枝蓮, 鐵扁擔, 七葉一枝花, 喜樹根皮, 仙鶴草, 白茅藤, 榆根皮 등이 사용된다 하였다.

그 중 榆皮는 甘平無毒하며 利水通淋消腫의 효능이 있어 小便不通, 諸淋, 水腫, 妊娠中 小便不利, 癰疽發背, 丹毒, 疥癬 및 小兒白禿瘡 등을 치료하며²⁰⁾, 허 등^{21,22)}은 不眠症, 關節炎을 치료한다 하였다.

榆皮에 대한 연구로는 抗菌, 抗炎, 鎮

痛, 抗酸化 작용²³⁻²⁷⁾, 肝癌세포 증식억제 작용과 항암제 병용시 항암제작용 증강 효과²⁸⁾, 榆根皮 단백질당체 추출물의 면역세포 증식효과²⁹⁾, 子宮癌細胞에 대한 抗癌효과³⁰⁾가 보고되었으나 농도에 따른 세포활성과 세포사멸 신호전달효소인 caspase와 유전자 발현을 통한 子宮頸部癌細胞에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 著者는 榆皮가 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 영향을 알아보고자 상이한 농도의 榆皮 檢液을 처리한 후 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 MAP kinase의 活性을 관찰하여 유의한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 藥材

榆皮는 榆科(느릅나무과; Ulmaceae)에 속하는 落葉喬木인 느릅나무(비솔나무; *Ulmus pumila* L.)의 樹皮 및 根皮를 건조한 것으로 慶熙醫院院 韓方病院 藥劑科에서 구입하여 사용하였다.

2) 細胞培養

子宮頸部癌 세포주인 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% CO₂ 배양기 (Forma, USA)에서 HeLa cell을 배양하였다. Phosphate

buffered saline (Gibco, USA; 이하 PBS) 으로 세포를 세척하고 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, USA)를 처리하여 분리한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이렇게 분리한 세포를 1:10의 비율로 繼代培養하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造

楡皮 100 g에 1.5 l의 증류수를 가한 후 1시간 30분 동안 중탕분리한 추출액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 0.45 μ m filter (Gelma, Germany)로 여과하여 楡皮 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% 楡皮 檢液을 첨가한 배양액을 사용하였다.

3) 細胞增殖 測定

24-well plate dish (Nunc, Denmark)에 HeLa cell 1×10^5 개를 접종하여 24시간 동안 배양한 후, 농도별 楡皮 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 楡皮 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 μ l 가하여 30분간 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양한 후 PBS로 세척하였

다. 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 楡皮 檢液을 처리한 HeLa cell을 1,000 rpm에서 4분간 원심분리한 후, 100 μ l의 lysis buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 2~4 mg/ml의 농도로 50 μ l가 되게 하여 96-well flat plate에 분주하고, 50 μ l의 2X running buffer와 1% DTT solution을 가했다. 5 μ l의 caspase-3 colorimetric substrate를 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켜 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6) DNA fragmentation 測定

농도별 楡皮 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 μ 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 5×10^3 개를 접종하고 24시간 동안 배양한 후 농도별 楡皮 檢液을 처리하여 24, 48, 72시간 동안 배양하였

다. 이후 2,3-Bis (2-methoxy4-nitro-5sulfophenyl)-2H tetrazolium-carboxanilide inner salt (JBI, Korea, 이하 XTT)와 phenazine methosulfate (JBI, Korea, 이하 PMS)를 배양액의 20%가 되게 하여 4시간 동안 처리하였다. XTT와 PMS 처리 후 450 nm 파장의 spectrophotometer (Beckman, Germany)를 사용하여 XTT tetrazolium ring 분해 산물인 formazan crystal의 흡광도로 細胞活性을 측정하였다.

8) MAP kinase 活性 測定

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

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

PCR product를 1% agarose gel에 100 V로 30분간 전기영동하여 UV transiluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다. MAP kinase cDNA 분석을 위한 sequence는 GAPDH 5' primer (5'-accacagtccatgccatcac-3')와 GAPDH 3' primer (5'-tccaccacccctgttgctgta-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 B 법으로 multiple comparison test를 실시하였다.

III. 結果

1. 細胞增殖에 미치는 影響

檢皮 檢液群의 경우 24시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 2.00배, 5% 檢液群이 1.00배, 10% 檢液群이 1.00배로 측정되어 대조군의 2.00배에 비하여 유의한 차이가 없었다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 2.33배, 5% 檢液群이 1.67배, 10% 檢液群이 1.00배로 측정되어 대조군의 4.67배에 비하여 농도의존적으로 유의한 增殖抑制($p < 0.05$)를 나타내었다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液군이 2.67배, 5% 檢液군이 0.60배, 10% 檢液군이 0.40배로 측정되어 대조군의 10.33배에 비하여 농도의존적으로 유의한 增殖抑制($p < 0.05$)를 나타내었다 (Table 1, Fig. 1, 2).

Table 1. Inhibitory Effect on Cell Proliferation in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa Cell *In Vitro*

Subjects	Initial concentration of HeLa cells ($\times 10^5$ cell/cm ²)	No ($\times 10^5$ cell/cm ²) of HeLa cells after culturing for		
		24 hr	48 hr	72 hr
Control (n=3)	1	2.00 \pm 0.00 ^{1),a,2)}	4.67 \pm 0.58 ^a	10.33 \pm 1.15 ^a
Sample 1 (n=3)	1	2.00 \pm 0.00 ^a	2.33 \pm 0.58 ^b	2.67 \pm 0.58 ^b
Sample 2 (n=3)	1	1.00 \pm 0.00 ^a	1.67 \pm 0.58 ^{b,c}	0.60 \pm 0.36 ^c
Sample 3 (n=3)	1	1.00 \pm 0.00 ^a	1.00 \pm 0.00 ^c	0.40 \pm 0.10 ^c
p-value ³⁾			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% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Cortex ulmi pumilae* solution

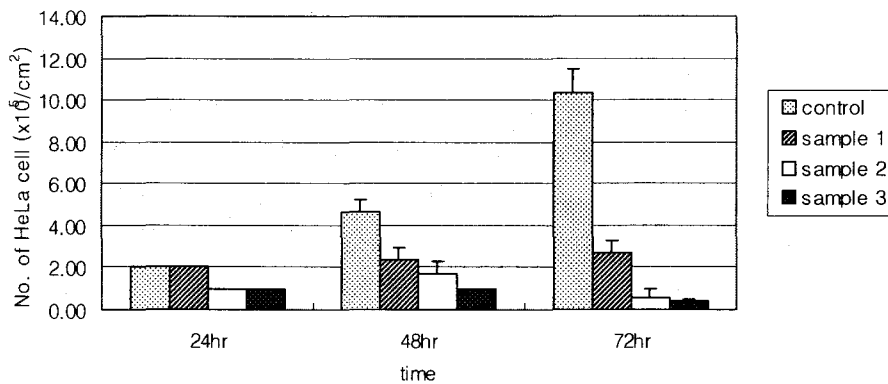


Fig. 1. Inhibitory effect on cell proliferation in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa cell *in vitro*

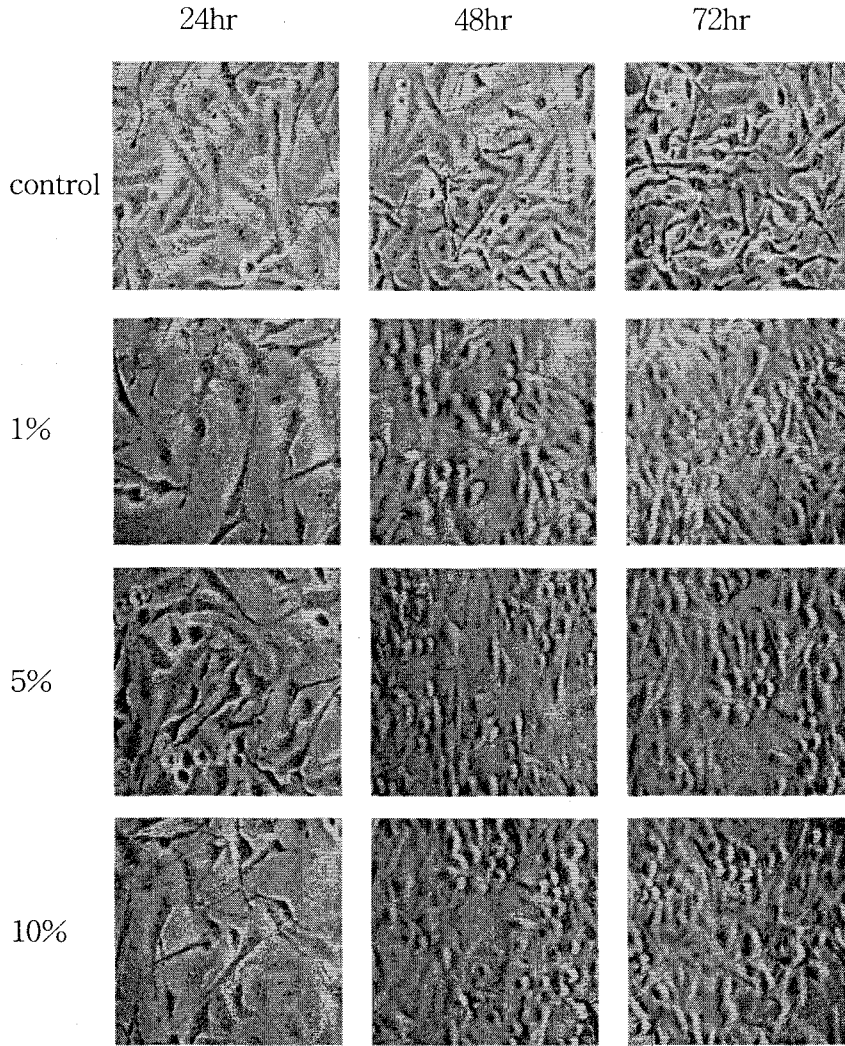


Fig. 2. Configurations of HeLa cells treated with different concentrated *Cortex ulmi pumilae* solution

2. 流細胞 分析 結果

24시간 배양 후 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 22.44%로 측정되었다. 楡皮 檢液群의 경우는 1%, 5%, 10% 檢液群 모두 각각 23.56%, 24%, 59.89%로 측정되어 대조군에 비하여 모두 증가하였다.

48시간 배양 후 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 9.46%로 측정되었다. 楡皮 檢液群의 경우는 1%, 5%,

10% 檢液群 모두 각각 3.77%, 5.26%, 7.67%로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다.

72시간 배양 후 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 8.31%로 측정되었다. 楡皮 檢液群의 경우는 1%, 5%, 10% 檢液群 모두 각각 4.81%, 5.18%, 7.51%로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다 (Table II, Fig. 3).

Table II. Activated Caspase Expression in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa Cell

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	23.56	3.77	4.81
Sample 2	24.00	5.26	5.18
Sample 3	59.89	7.67	7.51

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Cortex ulmi pumilae* solution

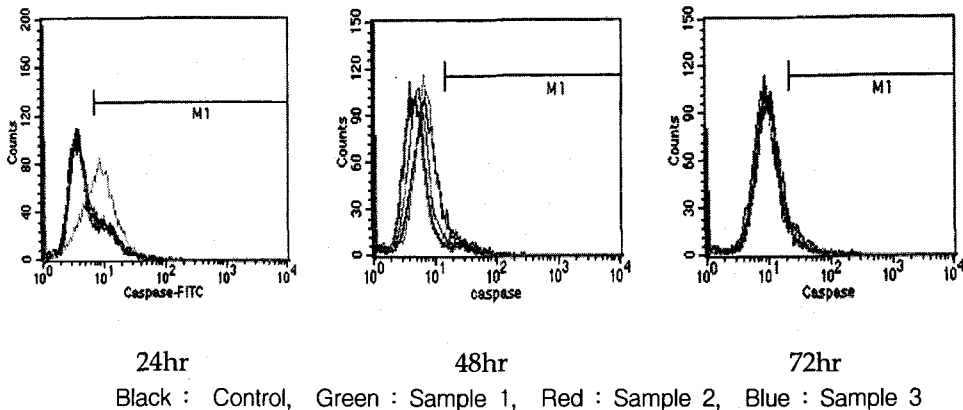


Fig. 3. FACS analysis in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa cell

3. Caspase-3 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 활성도를 조사한 결과 대조군은 0.0846으로 측정되었다. 1%, 5%, 10%榆皮檢液群은 각각 0.0710, 0.0655, 0.0601로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 활성도를 조사한 결과 대조군은 0.0901로

측정되었다. 1%, 5%, 10%榆皮檢液群은 각각 0.0884, 0.0882, 0.0678으로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 활성도를 조사한 결과 대조군은 0.1088로 측정되었다. 1%, 5%, 10%榆皮檢液群은 각각 0.0648, 0.0891, 0.0782로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다 (Table III, Fig. 4).

Table III. Caspase-3 Activity in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa Cell

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	0.0710	0.0884	0.0648
Sample 2	0.0655	0.0882	0.0891
Sample 3	0.0601	0.0678	0.0782

Control : Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Cortex ulmi pumilae* solution

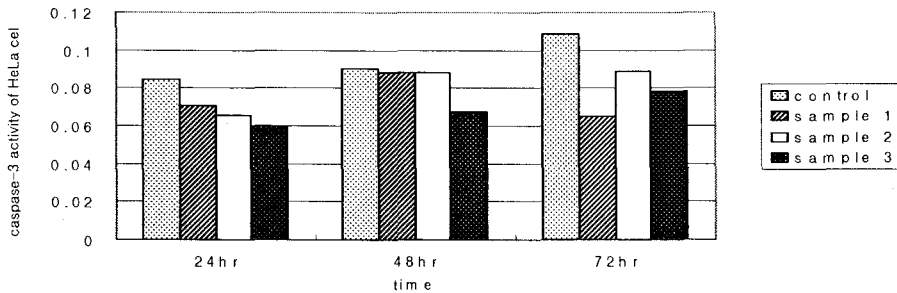


Fig. 4. Caspase-3 activity in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa cell

4. DNA fragmentation에 미치는 影響
상이한 농도의 楡皮 檢液을 처리한 후
HeLa cell의 DNA fragmentation을 관찰

한 결과 48시간과 72시간 배양 후 모든
농도의 檢液群에서 뚜렷한 DNA
fragmentation이 관찰되었다 (Fig. 5).

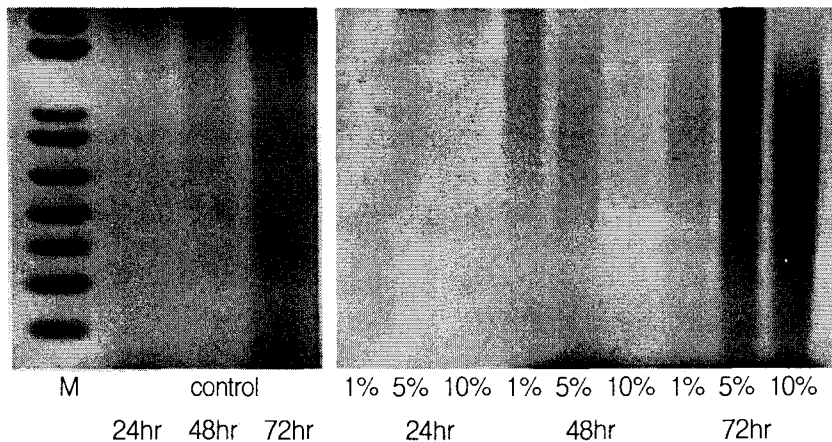


Fig. 5. DNA fragmentation in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa cell

5. 細胞活性에 미치는 影響

細胞活性度를 XTT assay로 확인한 결과 24시간 배양 후 대조군의 세포활성도는 0.53 ± 0.04 로 측정되었다. 榆皮 檢液群의 경우는 1%, 5% 및 10% 檢液群에서 각각 0.43 ± 0.31 , 0.39 ± 0.20 및 0.28 ± 0.06 으로 측정되어 모두 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

48시간 배양 후 대조군의 세포활성도는 0.73 ± 0.03 으로 측정되었다. 榆皮 檢液群의 경우는 1%, 5% 및 10% 檢液群에

서 각각 0.82 ± 0.12 , 0.66 ± 0.25 및 0.31 ± 0.09 로 측정되어 10% 檢液群만 대조군에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 나타내었다.

72시간 배양 후 대조군의 세포활성도는 0.66 ± 0.07 로 측정되었다. 榆皮 檢液群의 경우는 1%, 5% 및 10% 檢液群에서 각각 0.62 ± 0.06 , 0.54 ± 0.05 및 0.30 ± 0.03 으로 측정되어 5%와 10% 檢液群에서 유의하게 감소 ($p < 0.05$)하였다 (Table IV, Fig. 6).

Table IV. Cell Viability in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa Cell

Subjects	XTT proliferation of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control (n=3)	$0.53 \pm 0.04^{1),a,2)}$	0.73 ± 0.03^a	0.66 ± 0.07^a
Sample 1 (n=3)	0.43 ± 0.31^a	0.82 ± 0.12^a	0.62 ± 0.06^a
Sample 2 (n=3)	0.39 ± 0.20^a	0.66 ± 0.25^a	0.54 ± 0.05^b
Sample 3 (n=3)	0.28 ± 0.06^a	0.31 ± 0.09^b	0.30 ± 0.03^c
p-value ³⁾		$p < 0.05$	$p < 0.05$

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% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Cortex ulmi pumilae* solution

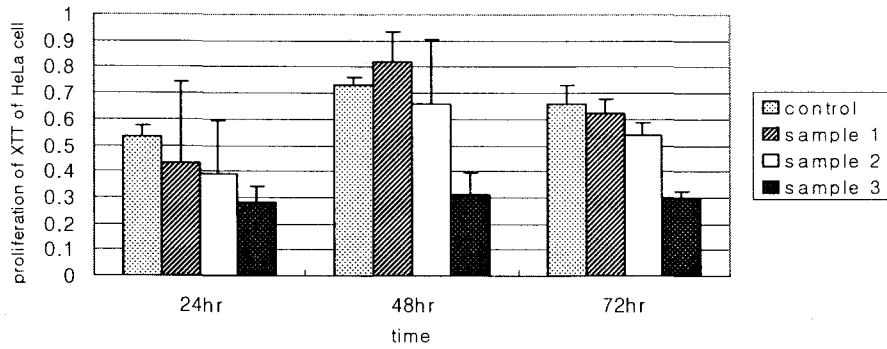


Fig. 6. Cell viability in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa cell

6. MAP kinase 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 72522 CNT/㎎로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 榆皮 檢液群의 MAP kinase 활성도는 각각 63847 CNT/㎎, 61795 CNT/㎎, 63952 CNT/㎎로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 71083. CNT/㎎로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 榆皮 檢液群의 MAP kinase 활성

도는 각각 65061 CNT/㎎, 65089 CNT/㎎, 59482 CNT/㎎로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 70753 CNT/㎎로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 榆皮 檢液群의 MAP kinase 활성도는 각각 66882 CNT/㎎, 65953 CNT/㎎, 58670 CNT/㎎로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다 (Table V, Fig. 7, Fig. 8).

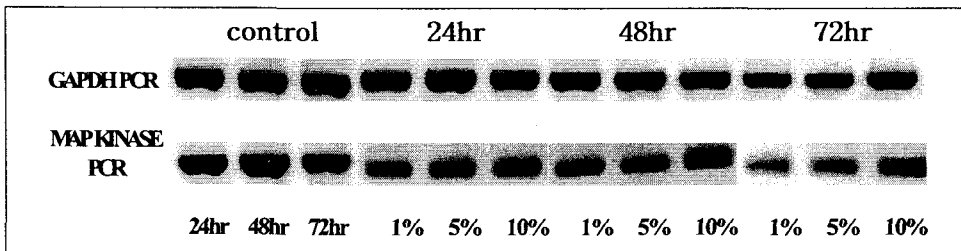


Fig. 7. MAP kinase activity of HeLa cell treated with *Cortex ulmi pumilae* solution

Table V. MAP Kinase Activity in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa Cell

Subjects	MAP kinase activity (density CNT/mm ²) of HeLa cells		
	after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control	72522	71083	70753
Sample 1	63847	65061	66882
Sample 2	61795	65089	65953
Sample 3	63952	59482	58670

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Cortex ulmi pumilae* solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Cortex ulmi pumilae* solution

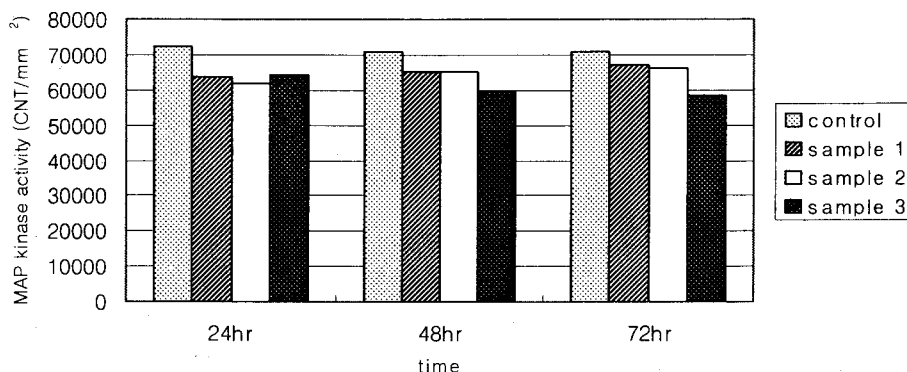


Fig. 8. MAP kinase activity in *Cortex ulmi pumilae*-treated HeLa cell

IV. 考 察

子宮頸部癌은 長期間의 上皮內癌 狀態를 거쳐 浸潤癌으로 進行하므로 조기진단과 조기치료가 가능하여 최근 浸潤癌은 減少 추세에 있으나 子宮頸部 上皮內癌은 增加 추세에 있다^{1,5)}.

子宮頸部癌의 高危險 要素는 민족적 차이, 사회경제적 수준이 낮은 사람, 농촌사람, 多産, 早期 性活動, 多數의 성교 상대자, 남성요인, 性病의 과거력 등이 있으며 그밖에 흡연, 영양상태, 경구피임약 복용,

질세척, herpes simplex virus type 2 (HSV-2) 감염, human immunodeficiency virus (HIV) 감염, human papillomavirus (HPV) 감염 등도 위험요인이 된다⁴⁾.

子宮頸部癌에 대한 치료는 환자의 연령과 건강상태, 癌의 波及정도, 동반된 合併症의 有無 등에 따라 子宮摘出術 등의 手術療法이나 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등이 사용되고 있고, 手術과 放射線治療가 일차적인 치료방법으로 시행되고 있다^{4,5)}.

癌은 한의학적으로 積³¹⁾가 積聚, 腫瘤, 臆, 癌, 反胃, 噎膈, 痞塊, 癥瘕, 疝瘕, 腸

覃, 血蟲, 乳巖, 癭瘤, 癰疽, 惡瘡, 石癰, 石疽, 卒中風, 疔 등에 포함시켰고 채³²⁾는 癰이 癰疽形態 중의 하나로 분류하였다. 子宮頸部癌은 증상적으로 崩漏, 帶下, 癥瘕, 血蟲, 五色帶下 등에 속하며^{3,6,9)}, 積聚物의 有無와 患處의 畵양, 괴사 등으로 보아 癥瘕와 癰疽에 유사한 개념이다.

癰疽는 氣血이 溜滯不行하여 蓄毒, 膿成而潰하는 外科疾患으로 鬱滯, 不通, 蓄毒, 化熱하여 肌肉, 筋骨, 臟腑 등 인체조직을 손상시키는 것으로³³⁾ 시기와 정도에 따라 散腫內消, 排膿斂毒, 去腐內塞, 生肌付痂하며 기혈순환을 돕기 위해 托裏, 疏通, 行營衛 등의 治法을 시행한다²¹⁾.

癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로 腹中腫塊가 上下로 攻築하고 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 形瘦不食, 胸腹飽悶 및 疼痛劇盛하는 婦人科 질환으로³⁴⁾ 李³⁵⁾는 癥者堅而不能移 瘕者堅而能移라 하여 癥과 瘕를 증상에 따라 구분하기도 하였으나 그 病形이 서로 유사하고 瘕聚가 오래되면 氣와 血에 영향을 미쳐 癥이 되는 경우가 많으므로 임상에서는 흔히 癥瘕를 함께 언급한다⁶⁾.

癥瘕는 外感寒邪, 七情所傷, 正氣虛, 傷食, 瘀血, 痰濕 등으로 인해 胞中の 血行이 방해를 받아 血瘀 狀態가 誘發되어 硬塊를 形成하는 것으로^{6,9,34)}, 養正邪自除, 必先調養, 使營衛充實, 若不消散, 方可議下를 原則으로³⁶⁾ 發病 原因에 따라 活血, 理氣, 導滯, 消痰의 治法이 使用된다.

다양한 한약재를 이용한 子宮頸部癌細胞에 대한 많은 실험적 연구들¹⁰⁻¹⁷⁾에서도 주로 疏肝解鬱, 活血祛瘀 藥物이 유효함이 보고되고 있다.

榆皮는 榆科에 속하는 落葉喬木인 느릅나무의 樹皮 및 根皮를 건조한 것²⁰⁾으

로 실험적으로 抗菌, 抗炎, 鎮痛, 抗酸化 작용과²³⁻²⁷⁾ 榆根皮의 肝癌細胞와 子宮癌細胞 증식억제 및 면역증가효과²⁸⁻³⁰⁾가 보고된 바 있으나 子宮頸部癌細胞의 증식억제와 사멸에 미치는 영향은 아직까지 보고된 바 없다.

이에 著者는 榆皮가 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 영향을 알아보려고 상이한 농도의 榆皮檢液을 처리한 후 細胞增殖, 流細胞分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 MAP kinase의 活性 등을 관찰하였다.

상이한 농도의 榆皮檢液이 HeLa cell의 細胞增殖에 미치는 영향을 관찰한 결과 48시간과 72시간 배양 후 모든 농도에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 유의한 增殖抑制를 나타내어 榆皮의 細胞增殖 抑制효과는 초기 이후에 나타나는 것을 알 수 있었다.

流細胞分析은 액체 속에 부유된 세포나 생물학적인 입자의 물리적 혹은 화학적인 특성을 측정하는 방법으로, 초기에는 살아있는 림프구의 기능과 유전학적 연구를 위해 세포들을 쉽고 신속하게 분리하려는 필요성에 의해 개발되었으나 최근에는 분자생물학 영역에서 세포사멸, 유전자발현, cytokine 발현, 세포생화학, 산화환원반응 조절과 AIDS 등의 연구에도 적용되고 있다^{37,38)}.

榆皮檢液이 HeLa cell의 사멸에 미치는 영향을 알아보려고 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 流細胞分析을 이용하여 조사한 결과 24시간 배양 후에는 대조군에 비하여 농도의존적으로 증가되었으나 48시간과 72시간 배양 후에는 대조군에 비하여 감소하였다. 이상의 결과

로 볼 때 caspase 경로를 통한 楡皮 檢液의 HeLa cell의 사멸효과는 24시간 배양 후 가장 뚜렷함을 알 수 있었다.

Caspase는 세포사멸 기간동안 aspartic acid基에서 일어나는 단백용해과정을 통해 활성 단백질분해효소로 전환되며 주로 연쇄적으로 작용하는데, initial caspase가 caspase adaptor와의 상호작용으로 활성화되는 과정이 세포사멸에 있어서 중요한 조절단계이며 proapoptotic 혹은 antiapoptotic protein 모두에 의하여 조절된다. 활성화된 초기 caspase는 효과기 caspase에 작용하여 이들을 활성화시키고, 활성화된 효과기 caspase들이 다양한 세포단백의 분열을 통해 세포사멸에 이르게 한다^{39,40}.

Caspase cascade의 활성화의 한 경로는 세포막에서부터 시작되는 경로로서 대표적으로 TNF 혹은 Fas 신호전달에 의한 caspase-8을 활성화시키는 경로이고, 다른 하나는 미토콘드리아에서부터 시작되는 경로로서 ultra violet 등의 스트레스에 의한 caspase-9이 활성화되는 경로이다⁴⁰. Caspase-3는 32 kDa 효소전구체의 분리에 의해 유도된 17 및 12 kDa 이중이합체가 활성화된 형태이며, 어떤 종류의 자극에도 활성화되는 주요 pool로⁴¹, 최근의 많은 실험연구에서도 사멸이 진행되는 세포에서 caspase-3가 주된 caspase 경로라고 보고되고 있어^{41,42} caspase cascade는 다양한 생리적인 모델에서의 세포사멸 기전에서 거의 공통적으로 나타나는 신호전달효소라고 할 수 있다.

세포사멸에 주도적인 역할을 하는 caspase-3의 활성도를 ELISA assay로 측정 한 결과 24시간, 48시간 및 72시간 배양

의 경우 모두 농도에 관계없이 楡皮 檢液群의 caspase-3 활성도가 대조군에 비하여 감소된 것으로 관찰되었다. 이 결과는 楡皮의 세포증식 억제효과가 caspase-3 활성화 외의 다른 기전에 의한 것임을 의미하는 것으로 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

세포죽음에는 자연적인 세포사멸 (apoptosis)과 물리적인 자극이나 삼투압 등으로 인한 괴사 (necrosis)가 있다. 세포사멸은 예정된 세포죽음으로서 세포분열과 함께 正常組織塊 (normal tissue mass)의 조절과 유지에 중요한 역할을 한다⁴³.

사멸된 세포들은 형태학적인 혹은 생화학적인 변화를 겪게 되는데 형태학적 변화로 원형질막의 수포형성, 세포의 수축, 세포파열로 인한 소체 (apoptotic body) 형성 등이 나타나고, 생화학적 변화로 전기영동상 분리된 DNA 조각들이 보이거나 형질막 내부침판 (inner leaflet)에서 외부침판 (outer leaflet)에 이르는 phosphatidylserine의 flipping 및 다양한 세포단백 분열의 장애소견이 보인다^{40,43}. DNA fragmentation은 세포사멸에 있어서 특징적인 변화의 하나로, DNA fragmentation의 측정이 세포사멸을 증명하기 위하여 이용되고 있다.

楡皮 檢液이 HeLa cell의 사멸에 미치는 영향을 구체적으로 알아보기 위해 HeLa cell에서 DNA를 추출하여 fragmentation을 관찰한 결과 48시간과 72시간 배양 후 모든 농도의 楡液群에서 뚜렷한 DNA fragmentation이 관찰되었다. 이상의 결과로 楡皮의 세포사멸 촉진효과가 48시간과 72시간에 뚜렷함을 알 수 있었다.

XTT assay는 生細胞의 활성을 측정하는 방

법으로 生細胞의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 XTT의 tetrazolium ring이 분해되어 생성되는 formazan crystal의 흡광도를 측정하는 방법이다⁴⁴⁾.

HeLa cell의 세포활성도의 예측지표인 XTT 활성도를 조사한 결과 24시간 배양 후는 모든 농도에서 대조군에 비하여 농도의존적인 감소를 나타내었으나 유의한 차이는 없었으며, 48시간 배양 후에는 10% 榆皮 檢液群이 대조군에 비하여 유의하게 감소되었고, 72시간 배양 후에는 모든 농도에서 대조군에 비하여 농도의존적인 감소를 나타내었으나 5%와 10% 榆皮 檢液群이 유의한 차이를 나타내었다.

XTT의 값이 감소하는 것은 그만큼 살아있는 세포의 수가 줄어든 것으로 해석할 수 있으므로 이상 실험을 통해 榆皮 檢液이 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 증식과 활성을 억제하는 작용이 있음을 확인할 수 있었다.

MAP kinase 신호전달체계는 mitogen activated protein의 약자로 유전자 발현, 세포 증식, 세포 생존과 사망, 세포 운동성을 포함한 중요한 세포 과정을 조절한다^{45,46)}. 또한 MAP kinase 신호체계의 뚜렷한 억제인자는 MAP kinase 신호전달 체계를 deregulation하여 炎症이나 癌과 같은 상태를 치료하는데 有效하며⁴⁷⁾, 특정한 화학적 억제인자, 동물 모델, 유전학에서의 사용의 심화된 개발은 전통적인 접근을 보충하여 질병치료에 있어서 약물학적 개입을 위한 부가적인 범위를 제공하게 될 것으로 전망되고 있다⁴⁸⁾.

榆皮 檢液이 HeLa cell의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 MAP kinase activity를 확인한 결과 24시간, 48시간 및 72시간 배양 후 모든 농도의 榆皮 檢

液群이 대조군에 비하여 감소하였다. 이는 榆皮 檢液이 세포내의 활성조절에 직접적으로 작용하는 MAP kinase 신호전달 체계에 관여하여 MAP kinase activity를 감소시켜 HeLa cell에 억제인자로 작용하는 것으로 추론된다. 이는 桂枝茯苓丸, 桃仁承氣湯의 자궁근종세포에 대한 결과^{49,50)}와 유사한 것으로, 한약을 이용한 세포사멸 과정이 MAP kinase activity와 관련이 있음을 시사하므로 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과에서 榆皮는 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell에 대해 증식억제와 사멸촉진 효과가 있으며 향후 子宮頸部癌의 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

榆皮가 子宮頸部癌細胞의 增殖抑制와 死滅에 미치는 영향을 알아보고자 HeLa cell에 상이한 농도의 榆皮 檢液을 처리한 후 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 MAP kinase의 活性 등을 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 細胞增殖은 48시간과 72시간 배양 후 모든 농도의 榆皮 檢液群에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 유의하게 억제되었다.
2. 流細胞 分析은 24시간 배양 후 모든 농도의 榆皮 檢液群에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 증가되었다.
3. Caspase-3 活性은 24시간, 48시간 및 72시간 배양 후 모든 농도의 榆皮 檢液群에서 대조군에 비하여 감소되었다.

4. DNA fragmentation은 48시간과 72시간 배양 후 모든 농도의 楡皮 檢液群에서 뚜렷하게 관찰되었다.
5. XTT로 분석한 細胞活性은 24시간과 72시간 배양 후 모든 농도의 楡皮 檢液群에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, 48시간 배양 후 10% 檢液群, 72시간 배양 후 5%와 10% 檢液群이 유의하였다.
6. MAP kinase 발현은 24시간, 48시간 및 72시간 배양 후 모든 농도의 楡皮 檢液群에서 대조군에 비하여 감소하였다.

- 투 고 일 : 2005년 07월 20일
- 심 사 일 : 2005년 08월 01일
- 심사완료일 : 2005년 08월 10일

參考文獻

1. 이승호. 자궁경부암의 역학과 병인론. 계명의대는문집. 1997;16(1):29-36
2. 보건복지부. 한국중양암등록사업 연례 보고서 2002. 보건복지부. 2003
3. 문구, 정병학, 김병주. 암 (동서의결합치료2). 益山:圓光大學校出版局. 1999;379-421
4. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈출판사. 1997;980-1027
5. 서울대학교 의과대학 산부인과학교실. 산부인과학. 서울:군자출판사. 1999;393-411
6. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學 (上). 서울:정담출판사. 2001; 303-307, 319-326
7. Kirwan JM et al. A systematic review of acute and late toxicity of concomitant chemoradiation for cervical cancer. Radiother Oncol. 2003;68(3):217-226
8. Maduro JH et al. Acute and long-term toxicity following radiotherapy alone or in combination with chemotherapy for locally advanced cervical cancer. Cancer Treat Rev. 2003;29(6):471-488
9. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林出版. 1995;229-234
10. 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
11. 조옥현 등. 柴胡疎肝散加味方이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004;17(4):101-111
12. 李俊成, 柳同烈. 乾漆散 煎湯液이 女性癌 細胞株에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1997;10(2):201-221
13. 柳浩粉, 鄭鎮鴻, 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
14. 박중문 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
15. 金倫槿 등. 桂枝茯苓丸이 子宮癌細胞의 成長抑制와 MAP kinase 活性에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2002;15(1):31-43
16. 박경미 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
17. 李允貞 등. 半枝蓮이 자궁암세포 (Hela22918)의 성장억제에 미치는 영향.

- 大韓韓方婦人科學會誌 . 1999;12(1):185-196
18. 常敏毅, 金泳哲. 抗癌本草. 서울:도서출판 바람과 물결. 1988;499
 19. 김일훈. 神藥. 서울:광제원. 1997;65-71
 20. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林社. 1994;614-615
 21. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 2000; 834,1216
 22. 黃度淵. 證脈 方藥合編. 서울:南山堂. 1998;235
 23. 홍남두 등. 榆白皮의 약효연구. 생약학회지. 1990;21(3):217-222
 24. 이홍용 등. 榆白皮 추출물의 항세균 작용. Kor J Appl Microbiol Biotechnol. 1992;20(1):1-5
 25. 盧石善. 榆白皮가 抗炎작용에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1998;7(1):837-852
 26. 박주성 등. 榆白皮 (*ulmi cortex*)의 항균활성. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1999;28(5):1022 -1028
 27. 이경행 등. 榆白皮 (*ulmi cortex*) 추출물의 항산화 활성. Korean J Postharvest Sci Technol. 2000;7(4):373-379
 28. 은재순, 송원영. 암세포주에 대한 榆根皮 n-BuOH 분획과 항암제의 병용 효과. 생약학회지. 1994;25(2):144-152
 29. 양영렬 등. 榆根皮로부터 단백질당체의 분리 및 항암 면역활성 연구. 한국생물공학회지. 2001;16(6):547-553
 30. 金建沃. 子宮癌細胞에 對한 榆根皮, 四君子湯, 四君子湯加榆根皮의 抗癌效果. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 1993
 31. 崔鍾百. 癌證에 對한 文獻의 考察. 東洋醫學. 1994;20(1):8-18
 32. 蔡炳允. 漢方外科. 서울:高文社. 1989;36-38
 33. 任允鄉 등. 癰疽灸法에 對한 文獻의 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1996;13(2):160-176
 34. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울:행림출판. 1998;249-257
 35. 李槇. 編註醫學入門. 서울:대성문화사. 1986;40-43
 36. 薛己. 校註婦人良方. 台北: 宇宙醫藥出版社. 1963;157-60
 37. 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
 38. 조영주. Multiparameter flow cytometry의 응용. Biochemistry news. 1992;12(2):84-90
 39. Schloffler D et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human cervix carcinoma cells during therapy by cisplatin. Cancer Detect Prev. 2003;27(6):481-493
 40. Chang HY, Yang X. Protease for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(4):821-846
 41. 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
 42. Chae HJ et al. Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in osteoblasts: possible role for ceramide.

- Endocrinology. 2000;141(8):2904-2913
43. 이규완 등. 자궁경부 상피내 종양 및 자궁경부암 조직에서 p53, MIB-1, bcl-2 및 세포고사 (apoptosis)에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 2001;44(6):1115-1122
44. Braeckman BP et al. Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev. 2002;123(2-3):105-119
45. 최의주, 심재경. Stress-activated MAP kinase의 기능과 조절. Biochemistry news. 1996;16(3):184-187
46. 정광철. MAP kinase signaling pathways. Biochemistry news. 1997;17(3):116-125
47. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature. 2001;410(6824):37-40
48. Wilkinson MG, Millar JB. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. FASEB. 2000;14(14):2147-2157
49. 이인호 등. 桂枝茯苓丸이 자궁근종 세포의 증식 억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2002;15(2):12-24
50. Yoon JM et al. A study on the inhibitory effect of Doinseunggi-tang on the growth of human uterine myomal cells. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(1):18-24