

## 生地黄이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

김주연, 조옥현, 최창민, 조한백

### ABSTRACT

#### *Rhizoma Rehmanniae* induced Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

Joo-Yeon Kim, Ok-Hyon Jo, Chang-Min Choe, Han-Baek Cho  
Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, Wonkwang  
University

**Purpose** : This study is to evaluate the synergistic cytotoxicity of *Rhizoma Rehmanniae*(RR), in adriamycin-treated HeLa human cervical carcinoma cells.

**Methods** : We culture HeLa cell which is human metrocarcinoma cell in D-MEM included 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories) below 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Then we observed apoptosis of log phage cell which is changed cultivation liquid 24 Hours periodically.

**Results** : The combination of RR and adriamycin synergistically augmented the cytotoxicity of HeLa cells. The apoptotic cell death was accompanied by the activation of caspase-3 and -8 as well as cleavage of poly(ADP- ribose) polymerase (PARP) in HeLa cells. The co-treatment of RR with adriamycin didn't have any effect on either the expression of Bcl-2 or that of Bax. Interestingly, a synergistic increase in apoptosis by the combination of two drugs was accompanied by the enhancement of Fas and Fas ligand (FasL) expression in HeLa cells. Taken together, the combination of RR and adriamycin significantly augmented the apoptotic cytotoxicity of Fas-positive cells, such as HeLa cells. The pathway is not involved in mitochondria-dependent pathway.

**Conclusion** : RR induces apoptosis in HeLa cells via p38 MAPK activation.

**Key Words** : *Rhizoma Rehmanniae* (RR), caspase, Fas/FasL, apoptosis, HeLa cells

이 논문은 2005년도 원광대학교 연구비지원에 의하여 연구됨

## I. 緒論

生地黃은 玄蓼科에 속하는 多年生草本인 地黃의 신선한 根莖으로서, 性味는 甘苦寒 無毒이며 歸經은 心肝腎의 三經이고 清熱涼血, 養陰生津, 祛瘀消腫, 解毒의 功效이 있으며, 吐血, 衄血, 尿血, 下血, 崩漏 등의 一切 出血性疾患에 사용된다<sup>1-4)</sup>.

이중 崩漏란 월경 주기와 무관하게 불규칙적으로 出血이 일어나는 경우를 지칭하는 것으로 大量的의 지속적 出血인 '崩'과 지속적 小量의 出血인 '漏'로 나눌 수 있다<sup>5)</sup>.

崩漏는 子宮頸部癌에서 찾아볼 수 있는 증상으로 接觸性 出血과 月經後 不定期的인 出血 및 血性 白帶下 등의 早期 症狀에는 韓醫學에서의 '崩漏'나 '帶下'가 해당하며, 出血, 惡臭나는 帶下, 排尿困難, 積塊物의 觸知 등의 晚期 症狀은 '癥瘕'나 '血蠱'의 範疇로 볼 수 있다<sup>6-8)</sup>.

子宮頸部癌은 30~50歲에서 多發하며 그 中 70% 以上이 中年婦人으로 陰道出血, 分泌物增加, 貧血, 淋巴節腫大, 體重減少 등의 症狀이 나타나며, 豫防과 治療가 적절치 못하면 晚期에 이르러 感染部位의 出血, 尿毒症, 惡液質 등 危急한 狀態에 이르러 死亡하게 된다<sup>5,6,9-12)</sup>.

治療方法으로는 外科의 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등이 施行되고 있으며 이들을 併합하기도 하지만<sup>5,8-10)</sup>, 治療後의 豫後, 副作用 등이 각기 다양하여 治療에 問題點으로 指摘되고 있으며<sup>13,14)</sup>, 副作用이 적은 새로운 抗癌藥物의 개발이 要求되고 있는 실정이다.

最近 國內 韓醫學界에서도 子宮頸部癌에 관하여 여러 實驗的인 研究가 이루어져 왔다. 鄭<sup>15)</sup>은 蓬莪茂丸, 沈<sup>16)</sup>은 穿山甲散, 李<sup>17)</sup>는 歸朮破癥湯, 高<sup>18)</sup>는 加味桂枝茯苓丸, 李<sup>19)</sup>은 乾漆散, 柳<sup>20)</sup>은 荊蓬煎丸料, 崔<sup>21)</sup>

는 鬼箭羽, 李<sup>22)</sup>은 半枝蓮, 金<sup>23)</sup>은 加味溫經湯, 朴<sup>24)</sup>은 濟川煎, 朴<sup>25)</sup>은 六合湯이 HeLa cell의 增殖을 抑制하는 效果를 나타낸다고 各各 報告한 바 있으나, 이는 주로 癥瘕의 治療에 관한 藥物이었다.

生地黃에 對한 研究는 黃<sup>26)</sup>과 권<sup>27)</sup>의 免疫에 관한 實驗이었으나, 子宮頸部癌에 대한 實驗的인 研究는 아직까지 接하지 못하였다.

이에 본 著者는 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell에 adriamycin으로 인한 細胞의 成長抑制 등의 조건에서 生地黃을 투여하여 HeLa cell의 細胞生存度와 細胞枯死에 관련된 caspase-3와 caspase-8의 activity 增加, PARP (Poly(ADP-Ribose) polymerase) 의 cleavage 確認, Bcl-2와 Bax의 發現, Fas/FasL의 發現 등을 觀察한 結果 生地黃이 HeLa cell에 미치는 抗癌效果에 對한 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

實驗에 使用된 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 益山韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였다.

#### 2) 試藥

Anti-Bcl-2, Bax or PARP antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 공급받았다. 細胞培養時 必要한 培養液 및 試藥들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다.

#### 3) 檢液의 製造

生地黃 400g을 증류수 2,000ml와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 3時間동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 遠心分離하고 진공 농축기로 감압, 농축한 후 凍結乾燥器에서 24

시간 凍結乾燥하여 10%의 수율로 건조 물을 얻었다.

## 2. 方法

### 1) 細胞柱 培養

사람 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa-cell을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 狀況에서 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories)이 包含된 D-MEM (Gibco BRL)에서 培養하는 동안 약 24時間 週期로 培養液을 交替하여 주며 log phase에 있는 細胞에 生地黃을 處理하여 apoptosis 現象을 觀察하였다.

### 2) 細胞 活性度 測定

細胞生存도는 crystal violet dye의 uptake 정도를 colorimetric assay로 測定한다. Apoptosis가 일어난 細胞에 crystal violet solution을 넣고 2분 동안 常溫에서 放置하여 staining한다. 바로 tap water로 水洗한 후, staining된 細胞를 10% acetic acid상에 5분 동안 常溫에서 反應하여 ELISA reader로 405 nm에서 OD값을 計算한다. 細胞 生存度 實驗에서 culture media상의 細胞를 100%의 細胞 活性도를 나타낸다는 基準으로 試藥處理 群의 細胞 生存도를 %로 計算하였다.

### 3) Caspase 活性度 測定

HeLa cell ( $2 \times 10^6$  cells)을 4°C에서 15분 동안 lysing buffer (1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 溶解하고 20,000g로 15분 동안 遠心分離시켰다. 遠心分離하여 얻은 上層液은 BCA (Bicinchonic acid, Sigma, St. Louis, USA) 方法으로 定量하여 assay buffer (100mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH 7.5, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM DTT)에 稀釋된

螢光標識된 機質과 37°C에서 30분간 反應시킨 후, fluorometer로 測定하였다. 이때의 波長은 excitation wavelength (380nm)와 emission wavelength (460nm)를 使用하였다. 機質은 CPP32-like caspase의 경우, fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin (AMC)-DEVD를 使用하였으며 proteolytic cleavage를 測定 함으로써 인지하였다.

### 4) Western blotting

HeLa cell( $5 \times 10^6$ )를 0.5ml lysis buffer 溶液에 넣은 다음 蛋白質 量은 BCA protein assay法으로 定量한다. 定量한 蛋白質은 sample buffer에서 denaturation 시킨 다음 SDS-PAGE를 利用하여 전기영 동을 한다. 전기영동 후 gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer 시킨 다음 抗體를 結合시킨 후 peroxidase가 conjugation된 2次 抗體와 結合시킨 후 luminescence를 利用하여 develop시킨다.

### 5) 結果算出

標示된 結果는 3번 以上の 獨立의인 結果이며 이들의 平均 (mean)과 標準偏差 (standard deviation, SD)를 算出하여 結果를 標示하였다. 細胞毒性을 보이는 값의 比較에 있어서는 students's t-test를 使用하였으며  $p < 0.01$ , 혹은  $p < 0.05$  水準으로 有意性を 檢證하였다.

## III. 實驗結果

### 1. 生地黃으로 因한 HeLa cell의 apoptosis

生地黃으로 因한 抗癌效果를 검색하기 위해 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 生地黃을 處理하고 죽음을 야기하는지 與否를 알아보았다. 하지만 生地黃을 여러 가지 用量에서 處理하여 보았으나 細胞生存度에는 영향이 없었으므로 대표적 인 anti-cancer agent인 adriamycin으로 因한 細胞의 成長抑制 등의 조건에서 보

다 강한 효과를 나타내는지 확인하여 보았다. adriamycin은 1uM의 용량에서는 細胞의 毒性을 야기하지 않았으나 生地黄 2 mg/ml를 同時 處理時 세포죽음이 야기됨을 확인하였다(Fig. 1). 특히 生地黄 5 mg/ml를 處理時에도 同一한 效果를 보였으나 본 실험결과에서는 제시하지 않았다.

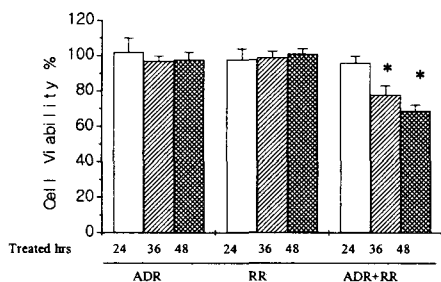


Fig. 1. RR sensitizes adriamycin-induced cell death in HeLa cells.

Cell death was assessed by crystal violet staining. HeLa cells were incubated with 1 uM adriamycin, 2 mg/ml RR or the combined agents for 24, 36 or 48 hrs followed by measurement of crystal violet staining. Data were the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. \*Significantly different from control,  $P < 0.05$ . RR: Rhizoma Rehmanniae.

2. 生地黄으로 인한 細胞고사시 caspase-cysteine protease의 活性

Caspase cysteine protease cascade는 여러 生理的인 system에서 apoptosis의 주요 經路로 認識되어 왔으며, caspase family는 pro-form으로 만들어지고 apoptosis 경우 cleavage가 일어나 活性化된다고 알려져 왔으며<sup>28)</sup>, 最近 活發히 進行되고 있는 여러 實驗研究에서는 apoptosis가 進行되는 細胞에서 caspase-3, 6, 8 및 9가 주된 caspase 經路라고 報告되고 있다<sup>29,30)</sup>.

caspase가운데 initiator caspase로 caspase-8 과 caspase-9가 屬하며, 이는 比較的 upstream의 caspase로 分類되어 지고 caspase-9은 mitochondria를 經유하

는 apoptosis 經路에 屬하며, caspase-8은 receptor를 經유하는 經路에 屬하고 TNF-alpha, Fas로 인한 apoptosis에 주요한 役割을 하는 것으로 알려져 있다<sup>31)</sup>.

2 mg/ml 濃度의 生地黄은 1 uM 용량의 adriamycin존재하에 caspase-3와 caspase-8의 活性가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-4).

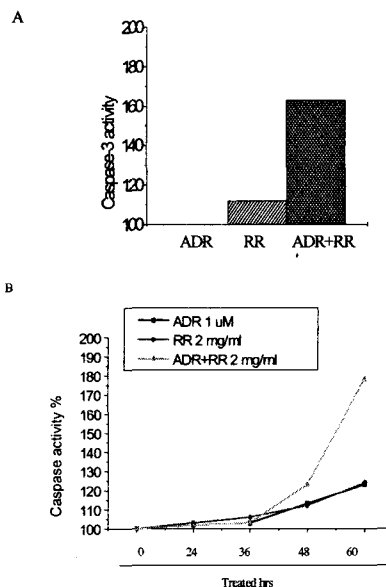
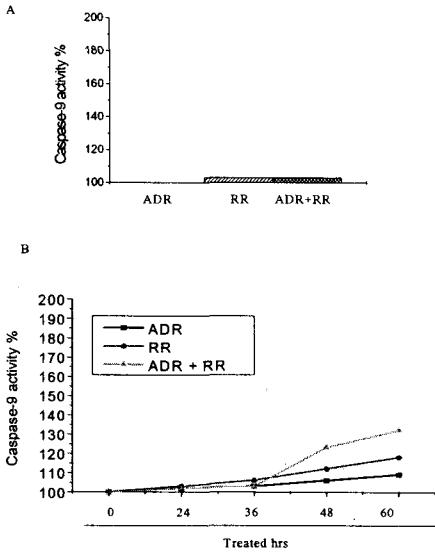


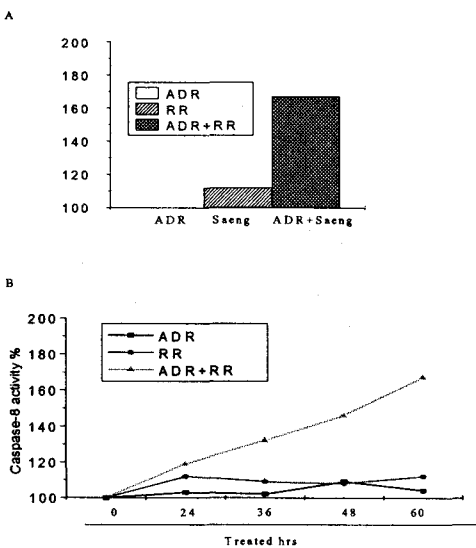
Fig. 2. RR induces caspase-3 activation in adriamycin-treated HeLa cells.

A. HeLa cells were subjected to 1 uM adriamycin, 2 mg/ml RR or the combined agents for 60 hrs. The cell lysates were prepared for caspase activity assay.  
 B. HeLa cells were treated with 1 uM adriamycin, 2 mg/ml RR or the combined agents for the indicated time intervals. The cell lysates were prepared for caspase activity assay as described in Materials and Methods. The result is representative of three independent experiments. RR: Rhizoma Rehmanniae



**Fig. 3. RR has little effect on caspase-9 activation in adriamycin-treated HeLa cells.**

- A. HeLa cells were subjected to 1  $\mu$ M adriamycin, 2 mg/ml RR or the combined agents for 60 hrs. The cell lysates were prepared for caspase-9 activity assay.
- B. HeLa cells were treated with 1  $\mu$ M adriamycin, 2 mg/ml RR or the combined agents for the indicated time intervals. The cell lysates were prepared for caspase-9 activity assay as described in Materials and Methods. The result is representative of three independent experiments. RR: Rhizoma Rehmanniae

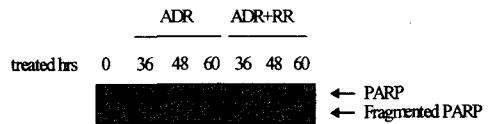


**Fig. 4. RR increases caspase-8 activation in adriamycin-treated HeLa cells.**

- A. HeLa cells were subjected to 1  $\mu$ M adriamycin, 2 mg/ml RR or the combined agents for 60 hrs. The cell lysates were prepared for caspase activity assay.
- B. HeLa cells were treated with 1  $\mu$ M adriamycin, 2 mg/ml RR or the combined agents for the indicated time intervals. The cell lysates were prepared for caspase-8 activity assay as described in Materials and Methods. The result is representative of three independent experiments. RR: Rhizoma Rehmanniae

3. HeLa cell에서 生地黃으로 인한 PARP (Poly(ADP-Ribose)polymerase)의 cleavage 확인

PARP은 caspase-6와 caspase-3의 기질로 apoptosis 관찰시 주요한蛋白質로 研究된 바 있다<sup>32)</sup>. PARP cleavage는 caspase-3의 活性을 間接적으로 보여줄 수 있으며 2 mg/ml 濃度の 生地黃은 1  $\mu$ M 용량의 adriamycin 존재하에 caspase-3 活性 增加와 비슷한 樣相으로 PARP의 cleavage pattern이 보여지고 있음을 確認할 수 있었다(Fig. 5).



**Fig. 5. RR induces PARP cleavage in HeLa cells.**

HeLa cells were subjected to 1  $\mu$ M adriamycin in the presence or absence of 2 mg/ml RR for 0, 36, 48 or 60 hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred into a nitrocellulose membrane. PARP was visualized by western blot analysis. RR: Rhizoma Rehmanniae

4. HeLa cell에서 生地黃으로 인한 Bcl-2와 Bax의 發現變化

Bcl-2 family proteins은 多樣한 經路의 apoptosis에 관련됨을 證明하는 研究

結果가 최근 많이 발표된 바 있다<sup>33,34)</sup>. Bcl-2는 癌細胞에서 expression이 증가되어 있으며 이의 發顯을 癌의 positive marker로 간주하는 報告도 있었다<sup>35,36)</sup>.

Fig. 6 에서 1uM 용량의 adriamycin 단독 처리시, Bcl-2와 Bax protein 發顯은 별다른 변화가 없었으며 2 mg/ml 濃度의 生地黃 동시처리시도 역시 변화가 없었다. mitochondria pathway에서 중요한 비중을 차지하는 Bcl-2 protein에서 변화가 없었다는 결과는 生地黃으로 인한 세포고사의 결과는 mtochondria-dependent pathway와는 별도의 경로를 경유할 것으로 생각하여 볼 수 있었다.

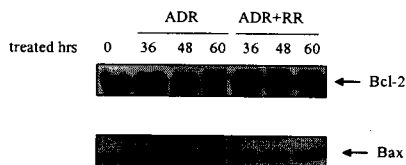


Fig. 6. RR has no effect on the expression of either Bax or Bcl-2 in HeLa cells.

HeLa cells were subjected to 2 mg/ml RR for 0, 36, 48 or 60 hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred into a nitrocellulose membrane. Bcl-2 and Bax were visualized by western blot analysis. The result is representative of three independent experiments. RR: Rhizoma Rehmanniae

#### 5. HeLa cell에서 生地黃으로 因한 Fas와 FasL의 發現變化

Fas는 45 kDa의 tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily의 member로써, Fas cell surface receptor는 FasL와 더불어 apoptosis의 initiation의 주요 molecule로 여겨지고 있다<sup>37)</sup>. Apoptosis에 요구되어지는 de novo protein synthesis pathway시 가장 연구

가 많이 되어온 Fas/FasL를 알아보하고자 하였다<sup>38,39)</sup>. 1 uM 용량의 adriamycin 존재하에 2 mg/ml 生地黃을 동시투여하여 Fas and FasL의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

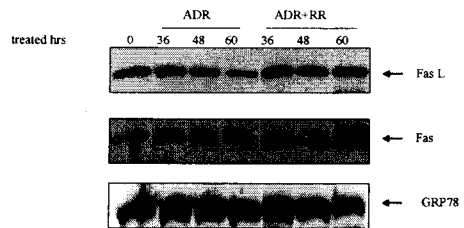


Fig. 7. RR induces the expression of Fas/FasL in HeLa cells.

HeLa cells were subjected to 1 uM adriamycin in the presence or absence of 2 mg/ml RR for 0, 36, 48 or 60 hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred into a nitrocellulose membrane. Fas, FasL and GRP 78 were visualized by western blot analysis. RR: Rhizoma Rehmanniae

## IV. 考 察

子宮頸部癌은 선진국에서는 지난 50년 사이에 1위에서 8위의 女性 癌 死亡原因으로 떨어지고 있는 현실인데 비해 우리나라에서는 아직도 계속 1위를 차지하고 있다<sup>11)</sup>.

子宮頸部癌은 암전구병소로부터 시작되는 것으로 알려져 있으며 따라서 初期의 輕微한 병소가 점차 진행성으로 심해지는 일련의 비정형성변화의 마지막 단계가 子宮頸部癌에 해당된다고 볼 수 있다<sup>11)</sup>.

子宮頸部癌의 原因은 現在까지 明確히 밝혀지지 않았으나 역학적 연구에 의하면 思春期 中에 始作된 活發한 性接觸과 여러 명의 性交相對者 등이 子宮頸部癌의 發生에 깊이 關係되며 性病을 앓은 病歷, 免疫障礙者, 社會經濟的으로 低所得層 특히 性傳播疾患의 感染과 關聯性

이 높은 것으로 推定되고 있으며, 그 외에도 民族的 差異, 經口避妊藥 服用, 비타민 缺乏, 吸煙, 人유두종 바이러스 (Human papilloma virus, HPV) 感染, 高危險 男便要因 등이 提示되고 있고, 最近에는 HPV가 가장 有力한 發生因子로 믿어지고 있다<sup>5-12,40-42</sup>.

子宮頸部癌 患者의 가장 흔한 症狀은 陰出血로서 대부분 性交後 出血로 나타나나 不規則한 出血 또는 閉經後 出血로 나타나기도 하며, 進行된 患者에서는 惡臭性 陰分泌物, 體重減少, 閉鎖性 尿路病變이 나타난다<sup>6,40,42</sup>.

子宮頸部癌의 西洋醫學的 治療로는 癌의 臨床的 進行病期에 따라 다르며, 子宮摘出術 등의 手術的 療法이나 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등이 使用되고 있고, 比較的 癌細胞의 轉移가 局限되었을 때 手術療法과 放射線療法이, 末期에는 化學療法과 免疫療法의 全身療法이 施行되고 있다<sup>5,6,9-11,40-42</sup>.

子宮頸部癌에 해당하는 韓醫學的인 概念으로는 症狀樣相으로 보아 '崩漏', '帶下', '癥瘕', '血蠱' 등의 範疇에서 찾아볼 수 있다<sup>6-9,43</sup>. 이 중 崩漏란 月經 週期와 무관하게 불규칙적으로 出血이 일어나는 경우를 지칭하는 것으로 대량의 지속적 出血인 '崩'과 지속적인 소량의 출혈인 '漏'로 나눌 수 있다<sup>5,8</sup>.

唐代的 孫<sup>44</sup>의 《千金要方》에 “婦人崩中漏下, 赤白青黑, 腐臭不可近, 令人面黑無顏色, 皮骨上連, 月經失度, 往來無常, 小腹弦急, 或苦絞痛, 上至心, 兩脇脹痛, 食不生肌膚, 令人偏枯, 氣息乏心, 腰背痛連脇, 不能久立, 每嘗臥困頓……陰中腫如有瘡之狀”, “所下之物, 一曰狀如膏, 二曰如黑血, 三曰如紫汁, 四曰如赤肉, 五曰如

膿血”이라 하였는데, 이는 불규칙적인 性器出血, 陰分泌物的 異常色과 惡臭에 消瘦, 貧血, 腰背疼痛 등을 더한 것으로 비교적 전형적인 子宮頸部癌의 病증을 말하고 있다<sup>6,9,42</sup>.

生地黄은 玄蓼科(Scropgulariceae)에 속하는 多年生草本인 地黄의 신선한 根莖으로 9~10월에 根莖을 채취하여 줄기와 잔뿌리를 다듬어서 물에 씻어 햇볕에 말리거나 地中에 묻어서 사용하며, 학명은 *Rehmannia glutinosa* Liboch이다<sup>14</sup>.

生地黄의 效能에 대하여 《別錄》에서는 “治婦人崩中血不止”라 하였고, 《本草求真》에서는 “涼血消瘀 故凡吐血 咯血 衄血 蓄血 溺血 崩中帶下”라 하였으며, 《本草從新》에서는 “治吐衄崩中”이라 하였다<sup>13,4</sup>. 性이 寒하고, 歸經이 手少陰心·足厥陰肝·足少陰腎이기 때문에 血熱妄行으로 인한 崩漏에 사용될 수 있을 것이라고 사료된다.

韓醫學에서는 疾病의 發生을 어떤 發病因子에 의해서 生體의 陰平陽秘한 正常生理 平衡이 파괴되면서 邪氣와 正氣의 투쟁과정으로 표현하였다. 질병의 발생 및 발생과정에 있어서 發病因子가 일으키는 각종 病理的 損傷과 그 損傷에 對抗하기 위한 人體正氣와의 相互鬭爭은 疾病發生過程의 終始에 걸쳐 있으며, 雙方의 力量對比는 疾病過程의 方向과 豫後를 결정짓는다<sup>45</sup>.

腫瘍에 대한 韓方治法을 살펴보면, 扶正法, 祛邪法, 活血化瘀法, 清熱解毒法, 軟堅散結法, 化瘀祛濕法, 以毒攻毒法 등으로 나누어 볼 수 있다<sup>6,9,42</sup>. 이 중 補虛扶正法은 生體의 陰陽, 氣血, 經絡, 臟腑의 生理機能을 調整, 增強하고 生體內的 抗病能을 충분히 발휘하여 암세포를 소

멸 또는 억제시키는 것이다<sup>6,9,40</sup>. 生地黃은 補虛扶正藥에 속하는데 더 세분하여 滋陰補腎藥에 속하며 淸熱作用도 가지고 있어 陰虧液少하고 口乾咽燥하고 乾咳無痰 혹은 痰中帶血하며, 심하면 顛紅潮熱, 手足心熱, 脈細數 등의 陰虛證에 적용할 수 있다고 한다<sup>6,9,42</sup>.

最近 國內 韓醫學界에서도 子宮頸部癌細胞에 關하여 여러 實驗的인 研究가 이루어져 왔다. 鄭<sup>15</sup>은 蓬莪茂丸, 沈<sup>16</sup>은 穿山甲散, 李<sup>17</sup>는 歸朮破癥湯, 高<sup>18</sup>는 加味桂枝茯苓丸, 李 등<sup>19</sup>은 乾漆散, 柳 등<sup>20</sup>은 荊蓬煎丸料, 崔<sup>21</sup>는 鬼箭羽, 李 등<sup>22</sup>은 半枝蓮, 金<sup>23</sup>은 加味溫經湯, 朴<sup>24</sup>은 濟川煎, 朴 등<sup>25</sup>은 六合湯이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖을 抑制하는 效果를 나타낸다고 各各 報告한 바 있으나, 이는 대부분이 癥瘕의 治療에 사용되어온 藥物이었다.

生地黃에 對한 研究는 黃<sup>26</sup>과 권<sup>27</sup>의 免疫에 關한 實驗이었으나, 子宮頸部癌에 대한 實驗的인 研究는 아직까지 接하지 못하였다.

이에 著者는 子宮頸部癌이 韓醫學의 崩漏에도 해당되고, 또한 生地黃이 崩漏에 사용되는 藥物이며, 抗癌治療에도 사용할 수 있다는 점에 着眼하여, 生地黃을 子宮頸部癌의 治療에 사용할 수 있을 것으로 思料되어 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 生地黃을 處理하고, HeLa cell의 細胞枯死(apoptosis)와, 生存度, 細胞 蛋白質의 發顯을 觀察하였다.

細胞枯死(apoptosis)는 計劃된 細胞死滅(programmed cell death)로서 細胞壞死(necrosis)와는 그 과정에 組織學的 및 生化學的으로 差異가 있다. 즉 細胞枯死에서는 細胞膜이 維持되면서 細胞 脫水

現狀에 의한 細胞收縮, 細胞膜의 기포화 현상, 세포질내의 칼슘농도 증가, 염색질 凝縮, 핵산분해효소(endonuclease)의 活性化에 의한 사다리모양의 DNA分節 形成, 核 絶斷, 細胞枯死 小體 形成이 동반된다<sup>46,47</sup>.

Adriamycin은 자궁경부암과 난소암, 백혈병 등에 항암치료제로 널리 사용되고 있으나, 장기간 사용시 약제의 내성이 쉽게 획득되며 심근병증과 같은 심각한 부작용을 초래한다<sup>48</sup>.

生地黃으로 因한 抗癌效果를 檢索하기 위해 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 生地黃을 處理하고 細胞枯死(apoptosis)를 야기하는지 與否를 알아보았다. 하지만 生地黃을 여러 가지 용량에서 처리하여 보았으나 細胞生存度에는 影響이 없었으므로 대표적인 anti-cancer agent인 adriamycin으로 인한 細胞의 成長抑制 등의 조건에서 보다 강한 效果를 나타내는지 확인하여 보았다. Adriamycin은 1uM의 용량에서는 세포의 독성을 야기하지 않았으나 生地黃 2 mg/ml을 동시 처리시 細胞枯死(apoptosis)가 야기됨을 확인하였다 (Fig. 1). 특히 生地黃 (5 mg/ml)을 처리시에도 동일한 效果를 보였으나 본 실험결과에서는 제시하지 않았다.

Caspase cysteine protease cascade는 여러 生理的인 system에서 apoptosis의 주요 經路로 認識되어 왔으며, caspase family는 pro-form으로 만들어지고 apoptosis 경우 cleavage가 일어나 活性化된다고 알려져 왔으며<sup>28</sup>, 最近 活發히 進行되고 있는 여러 實驗研究에서는 apoptosis가 進行되는 細胞에서 caspase-3, 6, 8 및 9가 주된 caspase 經路라고 報告되고 있다<sup>29,30</sup>.



Caspase가운데 initiator caspase로 caspase-8 과 caspase-9가 屬하며, 이는 比較的 upstream의 caspase로 分類되어 지고 caspase-9은 mitochondria를 經유하는 apoptosis 經路에 屬하며, caspase-8은 receptor를 經유하는 經路에 屬하고 TNF-alpha, Fas로 인한 apoptosis에 주요한 役割을 하는 것으로 알려져 있다<sup>31)</sup>. 이 가운데 生地黃은 adriamycin존재하에 caspase-3와 caspase-8의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2-4).

PARP(Poly(ADP-Ribose)polymerase)는 caspase-6와 caspase-3의 기질로 apoptosis 관찰시 주요한 단백질로 연구된 바 있으며<sup>32)</sup>, PARP cleavage(분절)는 caspase-3의 활성을 間接적으로 보여줄 수 있다. 細胞枯死 信號傳達系의 下部 經路에 해당하는 PARP의 分節은 細胞枯死의 특징으로 나타나고 있다. 刺戟에 의하여 損傷된 DNA의 回復은 PARP의 分節로 因하여 저해됨으로서 genomic DNA의 分節이 규칙적으로 일어나게 된다. 따라서 活性化된 caspase-3 protease에 의해 세포내 기질 단백질인 PARP단백질이 分節되는지 알아보고자 하였다. 生地黃과 adriamycin 동시처치시 caspase-3활성증가와 비슷한 양상으로 PARP의 cleavage pattern이 보여지고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

Bcl-2 family proteins은 多様な 經路의 apoptosis에 관련됨을 證明하는 研究結果가 최근 많이 발표된 바 있다<sup>33,34)</sup>. Bcl-2는 癌細胞에서 expression이 증가되어 있으며 이의 發顯을 癌의 positive marker로 간주하는 報告도 있었다<sup>35,36)</sup>.

Fig. 6 에서 adriamycin (1uM) 단독 처치시, Bcl-2와 Bax protein 발현은 별다

른 變化가 없었으며 生地黃 동시처치시 도 역시 變化가 없었다. mitochondria pathway에서 중요한 비중을 차지하는 Bcl-2 protein에서 變化가 없었다는 結果는 生地黃으로 因한 세포고사의 結果는 mtochondria-dependent pathway와는 별도의 經路를 經유할 것으로 생각하여 볼 수 있었다.

Fas는 45 kDa의 tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily의 member로써, Fas cell surface receptor는 FasL와 더불어 apoptosis의 initiation의 주요 molecule로 여겨지고 있는데<sup>37)</sup>, apoptosis에 요구되어지는 de novo protein synthesis pathway시 가장 연구가 많이 되어온 Fas/FasL를 알아보고자 하였다<sup>38,39)</sup>. 1 uM 용량의 adriamycin 존재하에 2 mg/ml 生地黃을 동시투여하여 Fas and FasL의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

以上の 實驗結果로 볼 때 生地黃은 細胞의 毒性을 야기하지 않은 1uM 용량의 adriamycin 존재하에 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell의 apoptosis를 誘導하였으며, 그 過程에서 caspase-3과 caspase-8의 活性化, PARP의 分節, Fas와 FasL의 발현 증가가 일어나고 있으며, Bcl-2와 Bax의 발현 變化는 일어나지 않음이 밝혀졌다. 따라서 生地黃은 韓方의 崩漏에 屬하는 子宮頸部癌의 豫防과 治療에 活用될 수 있으리라 생각된다.

## V. 結論

子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에서 生地黃으로 因한 細胞枯死를 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. HeLa cell에 1uM 용량의 adriamycin 과 2 mg/ml 生地黃을 동시처치시 세포죽음이 야기됨을 확인하였다.
2. HeLa cell에 1uM 용량의 adriamycin 과 2 mg/ml 生地黃을 동시처치시 aspase-3과 caspase-8의 活性이 增加하는 것을 確認할 수 있었다.
3. HeLa cell에 1uM 용량의 adriamycin 과 2 mg/ml 生地黃을 동시처치시 caspase-3 活性 增加와 비슷한 양상으로 PARP (Poly(ADP-Ribose)polymerase)의 cleavage pattern이 보여지고 있음을 確認할 수 있었다.
4. HeLa cell에 1uM 용량의 adriamycin 과 2 mg/ml 生地黃을 동시처치시 Bcl-2와 protein 발현은 별다른 變化가 없었다.
5. HeLa cell에 1uM 용량의 adriamycin 과 2 mg/ml 生地黃을 동시처치시 Fas/FasL의 發顯이 增加하는 것을 確認할 수 있었다.

以上の 實驗結果로 볼 때 生地黃은 細胞의 毒性을 야기하지 않은 1uM 용량의 adriamycin 존재하에 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell의 apoptosis를 誘導하였으며, 그 過程에서 caspase-3과 caspase-8의 活性化, PARP의 分節, Fas와 FasL의 발현증가가 일어나고 있으며, Bcl-2와 Bax의 발현변화는 일어나지 않음이 밝혀졌다. 따라서 生地黃은 韓方의 崩漏에 屬하는 子宮頸部癌의 豫防과 治療에 活用될 수 있으리라 생각된다.

- 투 고 일 : 2005년 07월 29일
- 심 사 일 : 2005년 08월 01일
- 심사완료일 : 2005년 08월 10일

## 參考文獻

1. 凌一揆, (中藥)本草學, 서울:保健新聞社 出版局, 1998;229-231.
2. 金載益, 臨床本草學講座上, 서울:대성 의학사, 2001;333-336.
3. 김창민, 中藥 大辭典, 서울:鼎談, 1998;3033-3038.
4. 申民教, (原色)臨床本草學, 서울:南山堂, 1986;297-1298.
5. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會, 韓醫婦人科學(상), 서울:정담, 2001;319-326.
6. 최승훈, 東醫腫瘍學, 서울:杏林出版, 1995;229-234.
7. 李鍾華, 韓方婦人科 臨床診療, 서울:癸丑文化社, 1982;264, 274.
8. 宋炳基, 韓方婦人科學, 서울:癸丑文化社, 1992;249-257.
9. 문구, 정병학, 김병주, 癌 東西醫結合 治療, 益山:圓光大學校 出版局, 1999;379-421.
10. 서울대학교 의과대학 산부인과학교실, 산부인과학, 서울:군자출판사, 1999;404-411.
11. 大韓病理學會, 病理學(II), 서울:고문사, 1995;966-967.
12. 이중달, 病理學, 서울:高麗醫學, 1991; 691-700.
13. Hersh EM, Ereish EJ. Host defence mechanisms and their modification by cancer chemotherapy. In methods in Cancer Research, New York: Academic Press, 1986;335.
14. Madewell BR. Tumor immunology and immunotherapy. Tumor immunol. 1982;69, 213.
15. 鄭鎮鴻, 蓬莪茂丸 煎湯液과 抗癌劑 併

- 用投與時 子宮癌 細胞에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 博士學位論文, 1993.
16. 沈龍燮, 子宮癌細胞에 미치는 穿山甲散 煎湯液과 抗癌劑 併用投與 效果, 大田大學校 大學院, 博士學位論文, 1993.
  17. 李廷華, 歸朮破癥湯이 子宮癌 細胞(HeLa Cell)에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1994.
  18. 高昊奎, 加味桂枝茯苓丸과 抗癌劑 併用時 子宮癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1995.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 崔達永, 鬼箭羽(Euonymus alatus (Thunb.) Sieb)가 肝癌細胞(Hep3B)와 子宮癌細胞(HeLa)의 成長抑制에 미치는 影響에 관한 研究, 東國韓醫學研究所論文集, 1999;7(2);155-162.
  22. 김동일 등, 半枝蓮이 子宮癌細胞(HeLa 22918)의 成長抑制에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 1999;12(1);185-196.
  23. 金修敬, 加味溫經湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 碩士學位論文, 2001.
  24. 박경미, 濟川煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 碩士學位論文, 2002.
  25. 박종문, 六合湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 碩士學位論文, 2002.
  26. 黃永明, 生地黃, 乾地黃, 熟地黃이 細胞性免疫反應 및 體液性免疫反應에 미치는 影響, 경희대학교 대학원, 석사학위논문, 1987.
  27. 권영달, 生地黃의 投與가 마우스의 先天免疫 및 適應免疫 反應에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 博士學位論文, 1998.
  28. Takahashi H et al. Fas antigen modulates ultraviolet B-induced apoptosis of SVHK cells: sequential activation of caspase 8, 3, and 1 in the apoptotic process, *Exp Cell Res*, 1999;242(2):291-298.
  29. Chae HJ et al. Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblast: possible role for ceramide, *Endocrinology*, 2000;141(8):2904-2913.
  30. Perry DK et al. Zinc is a potent inhibitor protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis, *J Biol Chem*, 1997;272:18530-18533.
  31. 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):1031-1042.
  32. Belizario JE, Lorite MJ, Tisdale MJ. Cleavage of caspase-1, -3, -6, -8, -9

- substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia, *Br J Cancer* 2001;84(8):1135-1140.
33. Hattori T et al. Heterodimerization of Bcl-2 and Bcl-X(L) with Bax and Bad in colorectal cancer, *Acta Oncologica*, 2000;39(4):495-500.
34. Tudor G et al. Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. *Cell Death & Differentiation*. 2000;7(6):574-586.
35. Dekker NP et al. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 26(4), 1997;170-175.
36. Kang M et al. Ki-67, p53 and Bcl-2 expression of serrated adenomas of the colon, *Am J Surg Pathol*, 1997;21(4):417-423.
37. Schneider P et al. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction, *J Biol Chem*, 1997;272:18827 - 18833.
38. Nakamura S et al. Anti-Fas IgM monoclonal antibody enhances apoptosis induced by low-dose cytosine arabinoside, *Anticancer Res*, 1999;19:197 - 204.
39. Sun SY et al. Induction of Fas expression and augmentation of Fas/Fas ligand -mediated apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in human lung cancer cells, *Cancer Res*, 2000;60:6537 - 6543.
40. 이승호, 자궁경부암의 역학과 병인론, 啓明醫大論文集, 1997;16(1):29-36.
41. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회, 부인과학, 서울:칼빈출판사, 1997;980-1027.
42. 조종관, 한방임상중양학, 대전:주민출판사, 2001;799-818.
43. 陳貴廷, 楊思澍, 實用中西醫結合診斷治療學, 서울:一中社, 1998;959-964.
44. 孫思邈, (千金要方 千金翼方)千金方, 北京:華夏出版社, 1996;52, 54.
45. 文濬典, 東醫病理學, 서울:高文社, 1990;78-81.
46. Cohen JJ. Apoptosis, *Immunol Today*, 1993;14:126-130.
47. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, *Pathol Annu.* 17 Pt 2, 1982;229-259.
48. 이태형 등, 자궁경부암 HeLa 세포에서 adriamycin 에 의한 세포주기와 유전자 발현, 대한산부인과학회지, 2001;44(12):2194-2197.