

三稜 추출물의 인간 유방암 세포 성장 억제 효과

동신대학교 한의과대학 부인과학교실
정경아, 박경미, 조성희

ABSTRACT

Anti-proliferative effects of Sam-nueng(Sparganii Rhizoma) extract on MCF-7 cells

Jeong Kyoung-ah, Park Kyong-mi, Cho Sung-hee
Dept. of Oriental Medicine Graduate School of Dongshin Univ.
(Directed by Prof. Sung-Hee Cho, O.M.D., Ph. D.)

Purpose : This investigation was undertaken to evaluate the antiproliferation, atoptosis of Sam-nueng(Sparganii Rhizoma) extract using MCF-7 human breast cancer cells.

Methods : MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12(DMEM/F12) supplemented with 10 % fetal bovine serum(FBS; Gibco) and antibiotics. At varying times after extract treatment, cells were harvested with scraper and processed for analysis of protein expression, proliferation, cytotoxicity and apoptosis.

Results : Our results show that the extract of Sam-nueng(Sparganii Rhizoma) strongly inhibits the proliferation of MCF-7 cells in a dose and time-dependent manner. Sulforhodamine B showed that the addition of Sam-nueng(Sparganii Rhizoma) extract reduced the viability of MCF-7 cells in a dose-dependent manner. Poly[ADP(ribose)] polymerase(PARP) which serves as a marker of cells undergoing apoptosis, a major substrate for caspase-3 was extensively cleaved in the Sam-nueng(Sparganii Rhizoma)-treated cells.

Conclusion : So, we can conclude that Sam-nueng(Sparganii Rhizoma) can have an inhibitive effect on MCF-7 human breast cancer cells by variable mechanisms.

Key words : human breast cancer, MCF-7, Sam-nueng(Sparganii Rhizoma), antiproliferation, cytotoxicity, apoptosis

I. 緒論

유방암은 여성암의 발생을 및 사망율에서 높은 비율을 차지하는 암종으로서 증가 속도가 가장 빠른 암의 하나이며, 확실한 병인은 불명이나 호르몬의 자극, 월경 상태, 가족력, 분만과 수유, 지방 식이의 섭취, 비만증이 위험 인자로서 거론되고 있다^{1,2,3}. 유방종괴, 유방통, 병적 유두 분비물 등의 증상을 보이며 치료로는 항암화학요법, 외과적 절제, 방사선 조사 등을 시행하고 있으나 유방암의 높은 발생율과 낮은 생존율에는 충분히 효과적이지 않은 것으로 보고되고 있다⁴. 따라서 유방암의 새로운 치료법을 연구, 모색하는 일이 절실히 요구되고 있으며 유방암에 대한 한약의 치료 효과와 치료 기전을 규명하는 일이 더욱 중요해지고 있다.

유방종괴가 나타나는 한의학적 질환으로 乳巖, 乳癰, 吹乳, 乳癆, 乳中結核, 乳癖, 乳痰 등이 있으나, 이 중 乳巖이 현재의 유방암에 가장 부합되며 그 밖의 명칭들은 乳巖을 단계별로 다양하게 분류한 것으로 보인다. 증상으로는 乳房腫塊, 不痛, 不痒, 不赤하고 或 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體倦瘦, 月經不調 등의 症狀이 나타나며, 그 원인으로는 七情不調, 특히 鬱怒鬱結, 抑鬱이 先行要因이자 主要因이라 하여 정신적 스트레스가 乳巖을 유발한다고 보았고, 治法으로는 疏氣行血之法이 基本이 되고 있다⁵.

三稜(Sparganii Rhizoma)은 黑三稜科에 속한 다년생 草本인 黑三稜과 莎草科에 속한 다년생 草本인 매자기의 根莖을 乾燥한 것으로 破血行氣, 消積止痛하는 효능이 있어 瘀血, 氣滯, 痰積, 癥瘕, 腫

塊에 응용하여 治療하는 藥材로서⁶ 현재 부인과 영역에서는 卵巢囊腫, 癥瘕, 子宮腺筋症, 子宮筋腫, 經閉 및 痛經에 응용하고 있으므로 腫塊의 일종인 유방암에도 유의한 효과를 나타내리라 사료된다.

최근 三稜에 대한 국내 연구 발표를 살펴보면, 三稜의 진통 및 항혈전 효능⁷, 항종양작용⁸, 항산화효과 및 항균활성효과⁹가 보고된 바 있으나 三稜에 대한 항암 효과와 기전 연구는 부족한 편이다. 이에 저자는 MCF-7 인간 유방암 세포주에 대한 三稜 추출물의 세포 증식 억제 효과, 세포 독성 효과, 세포자멸사 유발 효과를 관찰하여 유효한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 실험재료

1) 시약 및 실험 도구

따로 명시하지 않은 시약의 경우 실험에 사용된 것은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것이고, 플라스틱 실험도구는 Falcon Labware (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입한 것이다. CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay는 Promega(CA, USA)에서 구입한 것이고, GIBCO BRL(Life Technologies, CA, USA)에서 구입한 것이다. PARP에 대한 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였고, beta-actin에 대한 항체는 Sigma에서 구입하였으며 인간 유방암 세포주는 MCF-7 cells 을 사용하였다.

2) 추출물의 제조

실험에 사용된 약재인 三稜은 중국산을 시중(화림제약, 한국)에서 구입하였으

며 동신대학교 한의과대학 부인과학교실에서 확인 및 정선 과정을 거친 후 추출물을 만들었다. 200g 분량의 三稜을 1500cc의 1차 증류수에 30분 동안 담근 후 약탕기(대용 1500T, 한국)를 이용하여 2시간 동안 전탕하였다. 전탕 후 여과, 감압 농축 및 동결 건조의 과정을 거쳐 4°C 냉장 보관하면서 필요에 따라 소량씩 사용하였다. 중량에 따른 수율은 5% 였다.

2. 방법

1) 세포 배양과 추출물 처리

인간의 유방암 세포주인 MCF-7 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium/F12(DMEM/F12)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco)와 항생제를 가하여 만든 배지를 이용하여 배양하였다. 60-mm 배양접시에는 1×10^6 cells을 접종해 실험을 수행하였고, 96-well plate에는 5×10^3 cells/well로 세포를 접종해 실험을 수행하였다. 추출물을 적절한 시간동안 처리한 후 수거하여 단백질 발현, 세포성장, 세포독성, 세포자멸사에 대한 실험을 수행하였다.

2) 세포 성장 측정

MCF-7 cells을 96-well plates에 접종한 뒤 24시간이 지난 후 다양한 농도의 추출물을 처리하였다. 적절한 시간이 지난 후 각 well에 20 μ l의 CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega Corp.)를 첨가한 후 3시간동안 37°C 세포배양기에서 배양한 후 ELISA plate reader를 사용하여 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) 세포 독성 측정

추출물의 세포 독성은 Invitro Toxicology

Assay Kit(SIGMA)을 이용하여 측정하였다. MCF-7 세포를 96-well flat-bottomed plates에 접종해 24시간동안 배양한 후 다양한 농도로 추출물을 처리하였다. 적당한 시간이 지난 후 1/4 양의 차가운 50% TCA 용액을 가해 세포를 고정시킨 후 1시간 동안 4°C에 두었다. 세포를 증류수를 이용해 7~8회 씻어 TCA를 제거한 후 상온에 두어 완전히 건조시켰다. Sulforhodamin B solution (0.4%)을 세포가 충분히 덮힐 정도로 가한 후 20분 동안 상온에 두어 염색시켰다. 염색 후 1% acetic acid로 7~8회 씻은 후 상온에서 완전히 건조시킨 후 Sulforhodamine B Assay Solubilization Solution(10mM Tris)을 처음 배지의 양과 동량을 가한 후 상온에서 5분간 두어 염료를 녹여냈다. ELISA plate reader를 사용하여 565nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

4) 세포자멸사 측정

MCF-7 cells을 60-mm 배양접시에 접종한 후 다양한 농도로 처리한 후 적절한 시간이 지난 후 수거하여 실험에 사용하였다. 이때 부착되어 있는 세포뿐만 아니라 부유된 세포들도 같이 수거하여 사용하였다. poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 절단은 세포사 진행 표지로 이용되기 때문에, PARP에 대한 항체를 사용하여 Western blot analysis를 수행해 PARP 절단을 확인하였다.

5) Western blot analysis

NP-40 lysis buffer(50 mM Tris-Cl (pH7.4), 150M NaCl, 50mM NaF, 0.5% NP-40, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM PMSF) 50 μ l 를 60mm 배양 접시에 가한 후 세포를 수거하였다. 얻어진 세포 용액을 튜브에 옮긴 후 가볍게 흔들어 섞은 후 4°C,

14000 rpm에서 30분 동안 원심분리 시켰다. 얻어진 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 후 단백질 농도를 측정하였다. 얻어진 단백질에서 35 μ g을 7.5-12% SDS-PAGE에 loading한 후 나이트로셀룰로스 막으로 옮기고 50mM Tris(pH 7.5), 500 mM NaCl, 5% non-fat dried milk가 든 blocking 용액으로 blocking시켰다. 확인하고자 하는 단백질에 대한 항체를 이용하여 표지한 후 각 항체에 적합한 2차 항체로 재 표지하고 Enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 단백질을 확인하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 삼릉 추출물의 MCF-7 세포에 대한 성장 억제 효과

三稜 추출물이 인간 유방암 세포주인 MCF-7 세포의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 1에서 보듯이, 三稜 처리 시 MCF-7 세포의 성장이 억제되었고, 세포의 형태에도 변화가 나타났다. 이러한 효과는 처리 농도에 따라 증가하였다 (Fig. 2).

三稜 추출물의 MCF-7 세포 성장억제 효과는 현미경 상으로 구분이 가능할 만큼 명확하였다(Fig. 1). 이러한 성장억제 효과는 처리 농도에 비례해 증가하였다 (Fig. 2). 1000 μ g/ml 농도로 72시간 동안 처리했을 때 거의 50% 정도의 성장억제 효과를 보였다(Fig. 2).

또한 三稜 추출물의 MCF-7 세포 성장 억제 효과는 시간에 비례해서도 증가하였다 (Fig. 3.) 三稜 추출물을 1000 μ g/ml 농도로 96시간동안 처리했을 때 거의 60% 정도의 MCF-7 세포 성장 억제 효과를 보였다. 이러한 결과로 보아 三稜은

MCF-7 세포의 성장을 농도뿐만 아니라 처리 시간에 비례해서 더 높은 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다.

2. 三稜 추출물의 MCF-7 세포에 대한 세포 독성 효과

三稜 추출물에 의한 MCF-7 세포성장 억제 기전의 특성을 알아보기 위해 三稜 추출물이 MCF-7 세포에 세포독성을 나타내는지 Sulforhodamine B assay 방법을 이용해 측정하였다. 이 방법은 Sulforhodamine B를 이용해 세포 내 단백질을 염색함으로써 전체 세포내 물질의 양을 측정하는 방법이다. Fig. 4에서 보여지듯이 三稜 추출물 처리 시 MCF-7 세포에 농도에 비례해 세포독성을 나타내는 것으로 보여진다.

3. 三稜 추출물의 MCF-7 세포에 대한 세포자멸사 유발효과

三稜 추출물에 의한 세포자멸사 과정에서 caspase의 기능 여부를 측정하기 위해 三稜 추출물을 처리한 세포에서 전 단백질을 분리했다. caspase-3의 활성은 caspase-3의 기질로 알려진 poly[ADP (ribose)] polymerase (PARP)의 절단 여부를 western blot analysis 방법을 이용해 측정하였다. PARP (116 kd)은 세포자멸사 과정에서 caspase-3에 의해서 절단되어 89-kd과 22-kd의 절편으로 나누어진다. Fig. 5에서 보여지듯이 三稜 추출물 처리 시 PARP의 절단이 나타나는 것으로 보아, 三稜 추출물에 의해 MCF-7 세포에서는 세포자멸사가 진행되어지고 이 과정에서 caspase-3가 작용하는 것이 확인되었다. Fig. 6에서는 三稜 추출물 처리 시 농도에 비례해 PARP 절단이 증가하는 것을 보여준다.

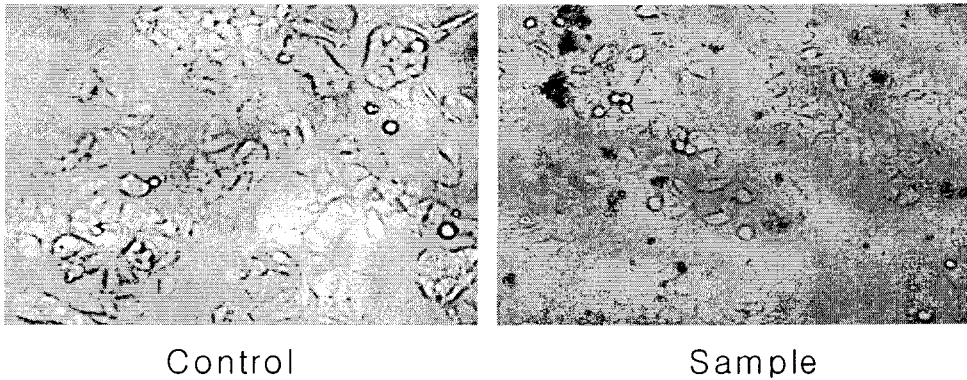


Fig. 1. Microphotographs showing the inhibitory effect of Sam-nueng (Sparganii Rhizoma) extract on cell growth.

MCF-7 cell lines were plated onto 6-well plates and treated with drug-free media (control) or media containing $500\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract for 72 hrs. These photographs were taken directly from culture plates using a phase microscope ($\times 100$ magnification).

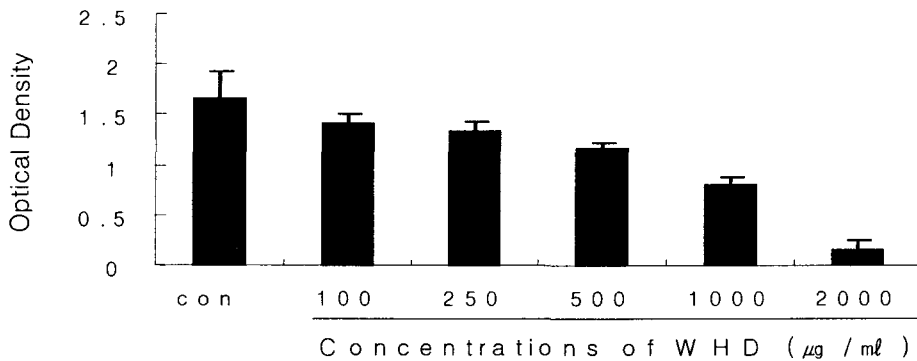


Fig. 2. Dose-dependent effects of Sam-nueng (Sparganii Rhizoma) extract on cell growth.

MCF-7 cells were plated onto 96-well plates and treated with or without (control, con) varying concentrations (100, 250, 500, 1000 and $2000\mu\text{g}/\text{ml}$) of extract for 72 hrs. The number of viable cells in each well was quantified by using MTS assays. Data are representative of at least three independent experiments. Error bars represent mean \pm SD.

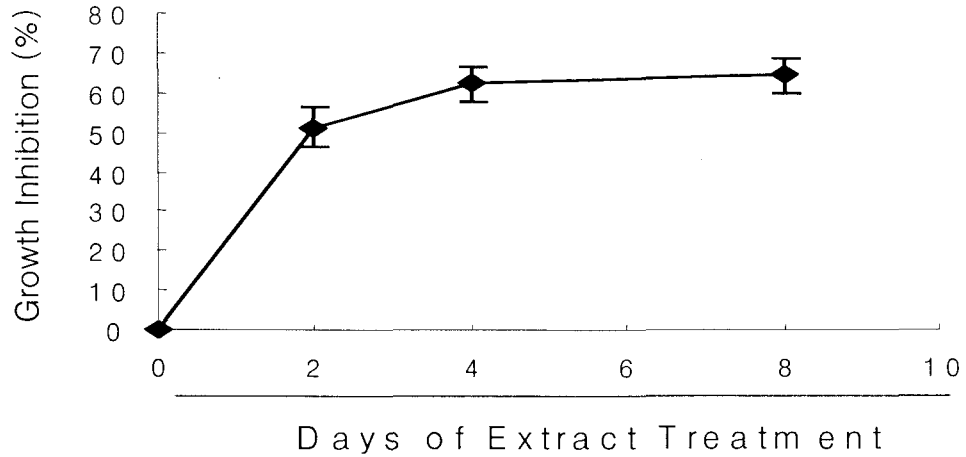


Fig.3. Time-dependent effects of extract of Sam-nueng (Sparganii Rhizoma) on cell growth.

MCF-7 cells were plated onto 96-well plates and treated with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration or without of extract for 48, 96 and 192 hrs. The number of viable cells in each well was quantified by using MTS assays. Results (optical densities) were calculated as the percentage of unexposed control cultures. Data are representative of at least three independent experiments. Error bars represent mean \pm SD.

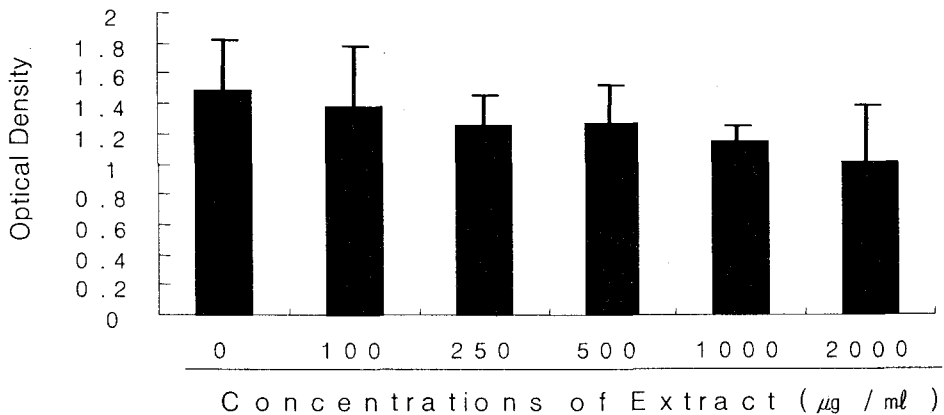


Fig.4. Cytotoxic effects of extract of Sam-nueng (Sparganii Rhizoma) in MCF-7 cells.

MCF-7 cells were treated with the indicated concentrations of extract for 48 hr. The cells were then processed for Sulforhodamine B assay. Each bar represents the mean \pm SD values of three separate experiments.

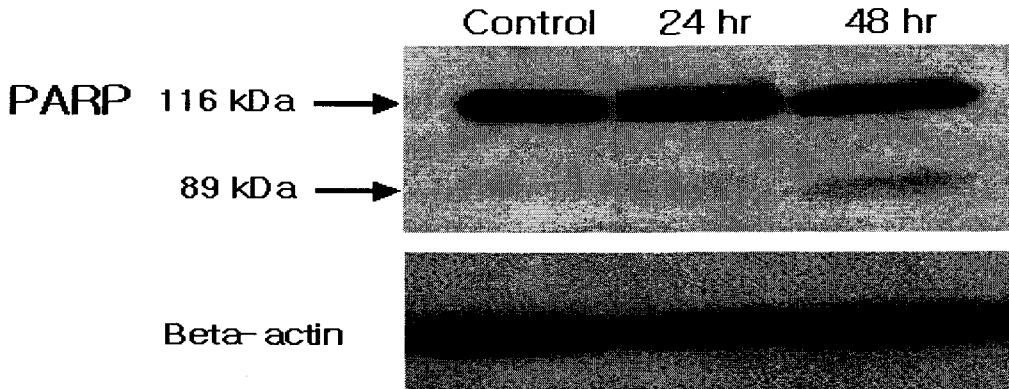


Fig.5. Caspase activation in Sam-nueng (Sparganii Rhizoma) extract treated MCF-7 cells.
 The whole cell lysate from extract-treated cells was assayed by Western blotting after a 24 and 48-hr exposure period. Poly[ADP(ribose)] polymerase (PARP), a major substrate for caspase-3 was extensively cleaved in the extract-treated cells, while control cells failed to show PARP cleavage.

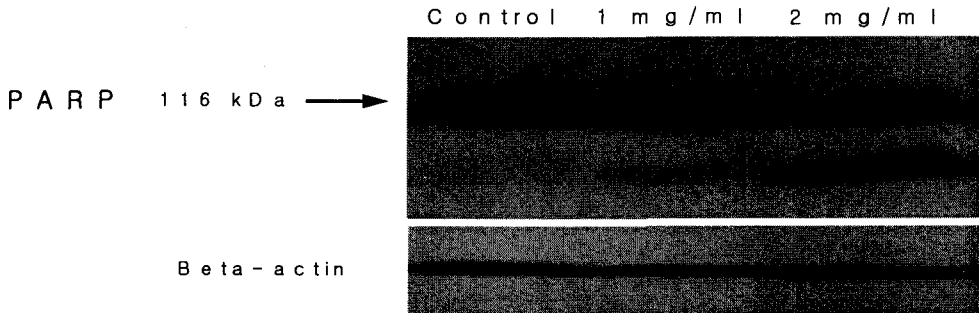


Fig.6. Caspase activation in Sam-nueng (Sparganii Rhizoma) extract treated MCF-7 cells.
 The whole cell lysate from extract-treated cells with 1, 2mg/ml concentration or without extract was assayed by Western blotting after a 24-hr exposure period. PARP was extensively cleaved in the extract-treated cells, while control cells failed to show PARP cleavage.

IV. 考察

한국 여성의 유방암 발생빈도는 여성암 수위를 차지하고 있고 미국의 경우도 19%로 미국 여성에서 가장 흔하게 발생하는 암으로 제시되고 있으며, 증가 속도

가 가장 빠른 암의 하나로서 그 위험성이 매우 높아지고 있는 추세이다^{1,2)}.

유방암은 40대 이후, 남자보다는 여자, 유전적 소인이나 과거병력, 에스트로겐에 의 장기간 노출, 즉 고령출산, 미경산부, 조기 초경, 만기 폐경의 경우 호발하며¹⁰⁾ 여성의 사회 활동에 따른 경구피임약제

의 복용과 각종 정신적 스트레스, 식생활의 변화에 따른 지방 식이의 섭취와 비만증이 늘어남에 따라 위험도가 증가하고 있다^{3,5)}. 증상으로는 유방종괴, 섬유화, 유방통, 병적 유두 분비물이 나타나며 치료는 항암화학요법, 외과적 절제, 방사선조사 등을 시행하고 있으나⁴⁾ 유방암의 높은 발생율과 낮은 생존율에는 충분히 효과적이지 않은 것으로 보고되고 있다. 따라서 유방암의 새로운 치료법을 연구, 모색하는 일이 절실히 요구되고 있으며 유방암에 대한 한약의 치료 효과와 치료 기전을 규명하는 일이 더욱 중요해지고 있다.

유방종괴가 나타나는 한의학적 질환으로 乳巖, 乳癰, 吹乳, 乳勞, 乳中結核, 乳癖, 乳痰 등이 있으나, 이 중 乳巖이 현재의 유방암에 가장 부합되며 그 밖의 명칭들은 乳巖을 단계별로 다양하게 분류한 것으로 보인다. 乳房腫塊가 주증상으로 不痛, 不痒, 不赤하며 或 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體捲瘦, 月經不調 등의 증상이 나타나기도 한다. 薛己¹¹⁾는 《校注婦人大全良方》〈乳癰乳巖方論〉에서, 처음에 작은 硬結로 시작하여 不赤不痛하며 점점 커져 潰瘍이 되기 시작하여 구멍이 생기고 血水가 흐른다고 하여 乳巖의 초기 발생부터 진행되는 과정을 묘사하였다. 여러 문헌에서 진행 단계에 따른 乳巖의 예후에 대해 언급하였는데, 朱震亨¹²⁾은 《丹溪心法附餘》〈癰疽〉에서 수년이 지나 瘡이 생기면 不治라 하였으며, 龔廷賢¹³⁾은 《萬病回春》〈乳巖〉에서, 아직 터지지 않은 것은 치료가 가능하나 瘡이 생기면 不治라 하여 진행된 乳巖의 예후가 不良함을 서술하였다.

乳巖의 病因은 內因, 外因, 不內外因으로 나눌 수 있으나, 內因으로서 七情不

調, 특히 鬱怒鬱結, 抑鬱이 先行要因이자 主要因으로, 특히 翁姑夫婿이나 不得於夫者, 中年婦人등에 다발한다고 하여 정신적 스트레스를 받기 쉬운 사회적 요소가 강조되고 있다⁵⁾. 樓英¹³⁾은 《醫學綱目》에서 한 예를 들어 60세 부인이 평소 厚味를 즐기고 鬱氣形實하고 성급하고 질투가 많았는데 갑자기 왼쪽 가슴에 작은 核이 생겼는데 이것은 巖으로서 과부에게 호발하는 질환이라 하였고 또한, 龔廷賢¹⁴⁾은 《萬病回春》〈乳巖〉에서 이 질환은 憂鬱과 忿怒가 많은 中年 婦人에게서 다발한다 하였다. 張景岳¹⁵⁾은 《景岳全書 婦人規》〈乳房病〉에서 乳巖은 肝脾二藏에 속하며 鬱怒氣血虛損이 원인이라 하여 七情氣鬱과 氣血虛損을 함께 언급하였으며, 閻純璽¹⁶⁾도 《胎產心法》에서 乳巖의 원인으로 憂慮鬱遏, 氣血虧損을 들어, 주원인은 七情鬱結이지만 氣血虧損이 기저요인 또는 유발요인으로 작용한다고 보았다. 外因으로는 羅元愷¹⁷⁾가 《中醫婦科學》〈外科眞詮〉에서 寒氣를 만나거나 形寒飲冷하면 痛한다고 하였으며, 樓英¹³⁾은 《醫學綱目》에서 厚味를 많이 먹고 氣鬱忿怒하면 乳房에 작은 核이 結한다고 하여 不內外因을 언급하였으나, 乳巖의 原因으로 外因이나 不內外因이 언급된 文獻은 매우 드물어 乳房疾患은 外因이나 不內外因과는 비교적 직접적인 관계가 없음을 보여주고 있으며 단독 병인이 아닌 七情氣鬱의 복합 요인의 하나로 인식하고 있다⁵⁾.

治法으로는 疏氣行血之法이 基本이 되며 경우에 따라 補氣血法을 兼하기도 한다⁵⁾. 薛己¹¹⁾는 《校注婦人良方大全》〈瘡瘍門 乳癰乳巖方論〉에서 乳巖의 초기 치료에 있어서 疎氣行血의 治法을 강조하

였으며, 張景岳¹⁵⁾은 《景岳全書 婦人規》 <乳房病>에서 노동을 많이 하여 腫痛할 때는 補氣血을 爲主로 하고 怒하여 腫痛할 때는 養肝血을 爲主로 하라 하여 補氣補肝補血의 治法을 檢하였다. 許浚¹⁸⁾은 《東醫寶鑑》 <直指>, <丹心>에서 나이와 月經 유무에 따라 주된 治法이 달라짐을 示하였다.

三稜(Sparganii Rhizoma)은 黑三稜科에 속한 다년생 草本인 黑三稜과 莎草科에 속한 다년생 草本인 매자기의 根莖을 乾燥한 것으로 血瘀로 인한 腹部腫塊에 많이 適用하여 治療하는 藥材이다⁶⁾. 《本草拾遺》에 三稜, 《開寶本草》에 京三稜의 이름으로 荊三稜이 처음으로 수록된 이후로 많은 本草書에서 破血, 祛瘀, 行氣, 消積, 和胃의 效능으로 癥瘕, 積聚, 心腹疼痛, 脇下脹滿, 瘡腫堅硬, 經閉, 跌打損傷, 產後腹痛, 痛經, 積滯腹痛, 氣血凝滯 등에 모두 應用하며^{19,20)} 현재 부인과 영역에서는 卵巢囊腫, 癥瘕, 子宮腺筋症, 子宮筋腫, 經閉 및 痛經에 응용하고 있다.

三稜에 대한 국내 연구를 살펴보면, 허⁷⁾의 三稜 및 蓬朮 藥鍼液의 止痛 및 行血 效능, 신⁸⁾의 三稜, 黃芩, 沙參, 山慈姑 5種 藥材의 三稜, 黃芩, 沙參, 山慈姑 5種 藥材의 三稜의 항산화 效능 및 항균 效능⁹⁾ 보고가 있었으며, 안, 李^{28,29)} 등은 三稜의 항암 效능 및 血管收縮 阻斷과 反신부수에 대한 效능을 보고하였다. 또한 최근의 中醫學 연구를 살펴보면, 三稜이 家兔의 血壓을 降低시키고, mouse의 六瘤에 대해 抑制 效능이 있으며, 腸管의 收縮을 促進시키고, 血小板 凝集을 抑制시키며, 백혈구 수를 증가시킨다고 보고한 바 있다^{23,24)}. 三稜이 癥瘕, 腫塊에 많이 應用되고 瘀血과 氣滯, 腫塊를 해소

하는 基本 效능이 있으며 一定한 阻斷 效능을 가진다는 報告가 있는 것으로 보아 腫塊의 一종인 유방암에도 有의한 效능을 나타내리라 示된다. 그러나 三稜의 阻斷 效능과 阻斷에 대한 研究는 아직 未滿한 狀態이다.

유방암에 관해 국내 연구 발표된 단일 약재로는 鬼箭羽²⁵⁾, 黃芩²⁶⁾, 半枝蓮²⁷⁾, 蜂毒 藥鍼液²⁸⁾, 米榭²⁹⁾, 糖약으로는 抗癌丹³⁰⁾, 加味雙和湯³¹⁾, 清肝解鬱湯³²⁾이 있어 유방암에 대한 三稜의 단독 效능은 아직 研究된 바가 없다. 이에 저자는 MCF-7 세포에 대한 三稜 抽出物의 細胞 增殖 抑制 效능, 細胞 毒害 效능, 細胞 自滅 誘發 效능을 觀察하여 有의한 效능을 얻었다.

三稜 抽出物의 MCF-7 細胞 增殖 抑制 效능은 顯微鏡 上으로 구분이 可能할 만큼 明確하였으며 MCF-7 細胞의 增殖이 抑制되었고, 細胞의 형태에도 變化가 나타났다(Fig.1). 이러한 效능은 處理 濃度에 따라 增加하였는데(Fig.2.), 1000 μ g/ml 濃度로 72시간 동안 處理했을 때 거의 50% 程度의 增殖 抑制 效능을 보였다.

또한 三稜 抽出物의 MCF-7 細胞 增殖 抑制 效능은 時間에 比례해서도 增加하였다(Fig.3.). MCF-7 細胞를 96-well plates에 接種한 後 배지만으로(control) 또는 1000 μ g/ml의 三稜 抽出物이 든 배지로 處理한 後 48, 96, 192 時間 동안 배양하였다. 三稜 抽出物을 1000 μ g/ml 濃度로 96시간 동안 處理했을 때 거의 60% 程度의 MCF-7 細胞 增殖 抑制 效능을 보였다. 이러한 結果로 보아 三稜은 MCF-7 細胞의 增殖을 濃도뿐만 아니라 處理 時間에 比례해서 더 높은 抑制 效능을 보이는 것으로 나타났다.

三稜 추출물에 의한 MCF-7 세포 성장 억제 기전의 특성을 알아보기 위해 三稜 추출물이 MCF-7 세포에 세포 독성을 나타내는지를 Sulforhodamine B assay 방법을 이용해 측정하였다. 三稜 추출물 처리 시 농도에 비례해 세포독성을 나타내는 것으로 보여진다(Fig.4).

caspase-3의 활성화는 세포자멸사 개시의 신호로서 작용하는 중요한 기전이다³³⁾. caspase-3의 활성화는 caspase-3의 기질로 알려진 poly[ADP (ribose)] polymerase(PARP)의 절단 여부로 알 수 있는데, PARP (116 kd)은 세포자멸사 과정에서 caspase-3에 의해서 절단되어 89-kd과 22-kd의 절편으로 나누어진다. 三稜 추출물 처리 시 PARP의 절단이 나타나는 것으로 보아(Fig.5), 三稜 추출물에 의해 MCF-7 세포에서는 세포자멸사가 진행되고 이 과정에서 caspase-3가 작용하는 것이 확인되었으며 농도에 비례해 PARP 절단이 증가하였다(Fig.6). 그러나 三稜 추출물을 처리하지 않은 세포에서는 PARP 절단이 거의 일어나지 않았다.

이상의 실험 결과로 볼 때, 三稜 추출물은 처리 농도와 시간에 비례하여 MCF-7 세포의 성장을 억제하고 형태학적인 변화를 일으켜 MCF-7 인간 유방암 세포주의 세포 증식을 강력하게 억제하였으며, 농도에 비례해 MCF-7에 대한 세포 독성효과 및 세포자멸사 유발 효과를 나타내었다. 三稜 추출물 처리 시 PARP의 절단이 나타나는 것으로 보아, 三稜 추출물에 의해 MCF-7 세포에서 세포자멸사가 진행되어지고 이 과정에서 caspase-3가 작용하는 것이 확인되었다.

三稜 추출물은 처리 농도와 처리 시간

에 비례하여 MCF-7 세포 성장 억제 효과를 나타내었는데(Fig.1,2,3) 1000 μ g/ml 농도로 72시간 처리 했을 때 거의 50% 정도의 세포 성장 억제 효과가 나타난 것으로 보아(Fig.2,3) 임상에서 三稜을 적용할 때는 1000 μ g/ml 이상의 농도를 유지하면서 72시간, 즉 3, 4일 이상 적용해야 그 효과를 제대로 이끌어 낼 수 있을 것이다. 또한 三稜 추출물은 처리 농도에 비례하여 세포 독성 효과 및 세포자멸사 유발 효과를 나타냈는데(Fig.5, 6), 2mg/ml 농도일 때 PARP의 절단이 명확한 것으로 보아(Fig.6), 농도를 2mg/ml 이상으로 높인다면 임상에서 더 나은 치료 효과를 보일 것으로 생각된다. 三稜은 破血行氣, 消積止痛하므로 특히 七情鬱結로 인해 발생된 초기 유방암에 효과가 있을 것이라 기대되며, 乳巖 뿐 아니라 七情鬱結로 인한 乳癰, 吹乳, 乳癆, 乳中結核, 乳癖, 乳痰 등에도 응용해 볼 수 있을 것이다.

따라서 三稜은 韓方의 乳巖에 해당하는 유방암의 예방 및 치료제로 사용될 수 있다고 사료된다. 그러나 앞으로 유방암에 대한 三稜의 임상 적용 연구가 충분히 이루어져야 할 것이며, 三稜의 破血行氣, 消積止痛하는 효능을 고려하여 유방암 뿐 아니라 다른 암종에 대한 三稜의 효과도 연구해 볼 필요성이 있으며, 나아가 三稜 뿐 아니라 한약의 항암 효과에 대한 광범위한 연구가 필요하다 하겠다.

V. 結論

MCF-7 인간 유방암 세포주에 대한 三稜 추출물의 세포 증식 억제 효과, 세포 독성 효과, 세포자멸사 유발 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 三稜 처리시 MCF-7 세포의 성장이 억제되었고, 세포의 형태에도 변화가 나타났으며 이러한 효과는 처리 농도와 처리 시간에 비례하여 증가하였다.
2. 三稜 추출물 처리 시 MCF-7 세포에 세포독성을 나타내는 것으로 보이며 이러한 효과는 농도에 비례해 증가하였다.
3. 三稜 추출물에 의해 MCF-7 세포에서는 세포자멸사가 진행되어지고 이 과정에서 caspase-3가 작용하는 것이 확인되었으며 이러한 효과는 농도에 비례해 증가하였다.

이상의 실험 결과로 볼 때, 三稜 추출물은 농도와 시간에 비례하여 MCF-7 세포 증식을 강력하게 억제하였으며, MCF-7 세포의 세포독성과 세포자멸사 유발 효과를 나타내었다.

- 투 고 일 : 2006년 01월 27일
- 심 사 일 : 2006년 01월 31일
- 심사완료일 : 2006년 02월 06일

參考文獻

1. 양진향, 발반사 요법이 항암화학요법을 받는 유방암환자의 오심, 구토 및 피로감에 미치는 영향, 대한간호학회지, 2005; 35(1): 177
2. 강진오, 유방암의 방사선치료, 경희의학지, 2005; 21(1): 37
3. 대한산부인과학회, 부인과학 제3판, 서울: 칼빈서적, 1997; 1299-301
4. 한의부인과학회재편집위원회, 한의부인과학 상, 서울: 도서출판정담, 2001; 364-6
5. 김정진, 이경섭, 송병기, 유방종괴에 관한 문헌적 고찰, 대한한방부인과학회지, 1998; 11(2): 29-43
6. 전국한의과대학 본초학교수, 본초학, 서울: 영림사, 1991; 418-9
7. 허수진, 이경섭, 송병기, 삼릉 및 봉출 약침의 진통, 항혈전 효능에 관한 연구, 대한한방부인과학회지, 2000; 8: 98
8. 신숙정, 이정호, 삼릉, 황금, 살송편버섯 혼합추출물의 항종양작용, 한국생약학회지, 2004; 35(4): 325
9. 김정균 등, 천연 한약재(목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화 효과 및 항균 활성효과, 경상대학교 농업생명과학연구원 농업생명과학연구, 2003; 37(4): 73-4
10. Townsend, Sabiston Textbook of surgery, Elsevier saunders, 2004; 870-2, 881-5
11. 薛己, 校注婦人良方大全, 文光圖書有限公司, 71-5
12. 朱震亨, 丹溪心法附餘, 서울: 大星文化社, 1993; 585-89
13. 樓英, 醫學綱目卷19, 臺南: 臺南北一出版社, 1973; 44-50
14. 龔廷賢, 萬病回春, 北京: 人民衛生出版社, 1990; 373
15. 張景岳, 景岳全書 婦人規, 廣東: 廣東科技出版社, 1986; 286-9
16. 閻純璽, 胎產心法, 北京: 人民衛生出版社, 1988; 469-76
17. 羅元愷 主編, 中醫婦科學, 北京: 人民衛生出版社, 1988; 44-50
18. 許浚, 東醫寶鑑, 東醫寶鑑國譯委員會譯, 서울: 법인문화사, 1999; 689, 692
19. 이극로, 박순달, 삼릉에 대한 문헌적

- 고찰, 동서의학회지, 1995; 20(2): 36
20. 冉先德, 中華藥海 哈爾濱: 哈爾濱出版社, 1993; 1144-1147
21. 安德均, 韓國本草圖鑑, 서울: 敎學社, 1998; 527, 569
22. 李尙仁, 漢藥臨床應用, 서울: 傳統醫學研究所, 1993; 289-291
23. 梅全喜, 現代中藥藥理水冊, 北京: 中國中醫藥出版社, 1998; 495-499
24. 蔡永民, 最新中藥藥理與臨床應用, 北京: 華夏出版社, 1999; 311-3
25. 박영수 등, SKBR3 유방암세포주에 대한 귀전우 매탄올 추출물의 성장억제 및 항산화 효과, 대한한방부인과학회지, 2005; 18(1): 45-54
26. 용형순, 고성규, 황금의 유방암 세포주에 대한 항암작용, 대한한방내과학회지, 2004; 25(3): 451-60
27. 권은정 등, 반지련이 유방암에 미치는 영향에 관한 연구, 대한한방부인과학회지, 1999; 12(2): 148-82
28. 여성원 등, 봉독약침액에 의한 인체 유방암세포의 성장억제 및 세포에 관한 연구, 대한한방침구학회지, 2003; 20(3): 45-62
29. 하정일, 정선형, 전이된 유방암 환자에 대한 미슬토를 사용한 면역요법의 임상례, 대한한방부인과학회지, 2001; 14(3): 209-17
30. 송기철 등, 항암단을 투여한 유방암환자 60예에 대한 임상보고, 대한한방내과학회지, 2001; 22(4): 669-74
31. 현동환 등, 가미쌍화탕의 유방암 발생 및 전이 억제에 대한 실험적 연구, 대한동의병리학회지, 1997; 11(2): 108-12
32. 서정민, 유동열, 청간해울탕이 소염, 진통, 면역세포 및 유방암 세포에 미치는 영향, 대한한방부인과학회지, 1997; 10(2): 69-83
33. D.W. Nicholson, N.A. Thornberry, Caspase: killer proteases, Trend Biochem science, 1997; Sci. 22: 299-306