

## 當歸芍藥散이 HeLa Cell의 増殖抑制와 死滅에 미치는 影響

경희대학교 한의과대학 부인과학교실  
박명원, 조정훈, 장준복, 이경섭

### ABSTRACT

#### Inhibitory Effects of *Dangguijakyaksan* on Cell Proliferation in HeLa Cells

Myung-Won Park, Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental Gynaecology, College of Oriental Medicine,

Kyung Hee University, Seoul, Korea

**Purpose** : This study was conducted to investigate the inhibitory effects of *Dangguijakyaksan* on cell proliferation in HeLa cells.

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

**Results** : After 24, 48 and 72 hours cultivation, *Dangguijakyaksan* extract solution group showed significant decrease of HeLa cells except 1% solution after 24 hours compared with the control group.

In the FACS analysis, *Dangguijakyaksan* extract solution groups showed increase of caspase activity except 1% solution after 48 hours compared with the control group. In the XTT assay, the caspase-3 activities were increased in *Dangguijakyaksan* extract solution groups except 1% solution after 24 hours in a dose-dependent manner.

In the XTT study, cell activities were significantly decreased in 10% *Dangguijakyaksan* extract solution groups after 48 and 72 hours cultivation compared with the control group.

In all *Dangguijakyaksan* extract solution groups, The activities of MAP kinase were decreased after 24, 48 and 72 hours cultivation compared with the control group.

**Conclusion**: It could be concluded that *Dangguijakyaksan* is available to the inhibition of proliferation of human cervical carcinoma cell line in vitro.

**Key Words** : *Dangguijakyaksan*, HeLa cell, caspase-3, MAP kinase.

## I. 緒 論

子宮頸部癌은 자궁경부 세포진 검사의 일반화로 前癌 단계에서 早期 診斷되는 比率이 높아져 이로 인한 死亡率이 감소하고 있으나 아직도 女性 腫瘍 중 높은 死亡率을 보이는 질환이다<sup>1-3)</sup>.

子宮頸部癌의 危險因子는 이른 첫 性交, 多數의 성교 대상자, 낮은 사회경제 계층 및 인유두종 바이러스 (human papilloma virus; HPV) 등이 있으며, 특히 HPV는 가장 유력한 원인인자로 믿어지고 있다<sup>2,4)</sup>. 子宮頸部癌의 흔한 症狀은 性交後 出血, 閉經後 出血 등의 腔 出血이며, 病變이 진행되면 惡臭性 腔分泌物, 腹痛, 體重 減少, 閉鎖性 尿道病變 등이 나타난다<sup>1)</sup>.

韓醫學에서 여성 생식기관에 발생하는 腫塊를 統稱하는 癥瘕는 積聚物이 존재하며 동반 증상이 유사하므로 子宮頸部癌과 가장 유사하다<sup>5-7)</sup>. 癥瘕 治療에는 虛證에 扶正固本法, 實證에 利水祛濕, 清熱解毒, 化痰軟堅 및 活血祛瘀 등이 주로 사용된다<sup>8-11)</sup>.

張<sup>12)</sup>의 <金匱要略>에 최초로 수록된 當歸芍藥散은 養血和營, 健脾滲濕, 行滯止痛하는 效能이 있어 妊娠腹痛, 胎動不

安, 産後血量 및 月經不順 등 婦人 腹中의 虛證 疾患 및 痛症에 사용된다<sup>13)</sup>.

當歸芍藥散은 血小板 凝集 억제 작용<sup>14)</sup>과 老化에 따른 뇌신경 손상 보호 작용<sup>15,16)</sup> 등이 보고되었으며, 부인과적으로는 뇌경색 후 여성호르몬 분비 촉진 작용<sup>17)</sup>, 난소 세포 증식 촉진 작용<sup>18)</sup> 및 황체 기능 장애 개선 효과<sup>19,20)</sup> 등이 보고된 바 있으나 子宮頸部癌에 관한 연구는 보고된 바 없다.

이에 著者는 當歸芍藥散이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 影響을 알아보기 위해, 相異한 濃度의 當歸芍藥散 檢液을 HeLa cell에 처리한 후 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3의 活性, 細胞活性 및 MAP kinase 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 藥材

이 실험에서 사용한 當歸芍藥散은 (주) 제일약품의 當歸芍藥散 製劑 (商品名: 破邪婦)를 구입하여 사용하였고, 破邪婦 1.875g중에는 다음 비율의 혼합 생약 건조 엑스가 함유되었다 (Table I).

Table I. Components of Dangguijakyaksan Extract

韓藥名	生藥名	學名	含量(g)
芍藥	Paeoniae Radix Alba	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	1.00
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	<i>Atractylodes lancea</i> DC	1.00
澤瀉	Alismatis Rhizoma	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk	1.00
茯苓	Poria	<i>Poria cocos</i> Wolf	1.00
川芎	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> Makino	0.75
當歸	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa	0.75

## 2) 細胞培養

子宮頸部癌 細胞株인 HeLa cell line을 ATCC社 (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, RPMI 1640 media (Sigma, USA)를 기본 배지로 하여 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA; FBS)와 1% penicilin/streptomycin (Sigma, USA)을 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기 (Forma, USA)에 HeLa cell을 배양하였다. Phosphate buffered saline (Gibco, USA; PBS)로 세척한 후 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, USA)를 처리하여 배양기로부터 분리하고 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와 實驗群 設定

100 ml의 증류수에 當歸芍藥散 製劑 1g, 5g 및 10g을 용해한 후 0.45 μm filter (Gelma, Germany)로 여과하여 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液을 製造한 후 실험에 사용하였다.

실험군은 2% FBS와 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液을 첨가한 培養液을 사용하였고, 대조군은 2% FBS만 첨가된 培養液을 사용하였다.

### 2) 細胞增殖 測定

24-well plate dish (Nunc, Denmark)에 HeLa cell 1×10<sup>5</sup>개를 접종하여 24시간 동안 배양한 후, 농도별로 當歸芍藥散 檢液을 처리하여 24, 48 및 72시간 배양한 후에 tryphan blue (Sigma, USA)로 염색하여 細胞增殖를 측정하였다.

### 3) 流細胞 分析

농도별로 當歸芍藥散 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 μl 가하여 30분간 37 °C 배양기에서 배양한 후 PBS로 세척하였다. 이를 0.5 ml PBS 용액에 녹인 후 BD FACS vantage (Becton & Dickinson, USA)로 분석하였다.

### 4) Caspase-3 活性 測定

Caspase-3 活性를 측정하기 위해 caspase-3 ELISA kit (R&D system, USA)를 이용하였다. 농도별로 桂枝茯苓丸 檢液을 처리한 HeLa cell을 1,000 rpm에서 4분간 원심분리한 후, 100 μl의 lysis buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 2~4 mg/ml의 농도로 50 μl가 되게 하여 96-well flat plate에 분주하고, 50 μl의 2X running buffer와 1% DTT solution을 가했다. 5 μl의 caspase-3 colorimetric substrate를 넣은 후 37 °C에서 2시간 동안 반응시켜 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 5) 細胞活性 測定

96-well plate에 HeLa cell 5×10<sup>3</sup>개를 접종하고 24시간 동안 배양한 후 농도별로 桂枝茯苓丸 檢液을 처리하여 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다. 이후 2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H tetrazolium-carboxanilide inner salt (JBI, Korea, 이하 XTT)와 phenazine methosulfate (JBI, Korea, 이하 PMS)를 培養液의 20%가 되게 하여 4시간 동안 HeLa cell에 처리하였다. 細胞活性은 XTT와 PMS 처리 후 450 nm 파장의

spectrophotometer (Beckman, Germany)를 사용하여 XTT tetrazolium ring 분해 산물인 formazan crystal의 optical density로 측정하였다.

#### 6) MAP kinase 活性 測定

농도별로 當歸芍藥散 檢液을 처리한 HeLa cell을 trypsin/EDTA로 분리하였다. 이를 PBS로 세척하고 TRIZOL 1 ml를 처리하여 세포를 분쇄한 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 세척 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 polymerase 1 unit을 가한 후 93  $^{\circ}$ C 30초, 55  $^{\circ}$ C 30초 및 72  $^{\circ}$ C 1분으로 PCR을 30 cycle 수행하였다. 세포 성장인자 marker인 MAP kinase도 동일한 방법으로 PCR을 수행하였으며 annealing 온도만 58  $^{\circ}$ C로 하였다.

각 PCR product를 1% agarose gel에 100 V로 30분간 전기영동한 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다. MAP kinase cDNA 분석을 위

한 sequence는 GAPDH 5' primer (5'-accacagtccatgccatcac-3')와 GAPDH 3' primer (5'-tccaccaccctgttgctgta-3')를 사용하여 PCR 정량을 실시하였다.

#### 7) 統計處理

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

### III. 結 果

#### 1. 細胞增殖에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 대조군의 2.00배에 비하여 1% 檢液群은 2.00배로 차이가 없었으나, 5% 檢液群은 0.83배, 10% 檢液群은 0.47배로 대조군에 비하여 각각 유의한 增殖抑制 ( $p < 0.05$ )를 나타내었다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 대조군의 4.67배에 비하여 1% 檢液群은 0.57배, 5% 檢液群은 0.13배, 10% 檢液群은 0.13배로 각각 유의한 增殖抑制 ( $p < 0.05$ )를 나타내었다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 대조군의 10.33배에 비하여 1% 檢液群은 0.37배, 5% 檢液群은 0.02배, 10% 檢液群은 0.01배로 각각 유의한 增殖抑制 ( $p < 0.05$ )를 나타내었다 (Table II, Fig. 1, 2).

Table II. Inhibitory Effect on Cell Proliferation in Dangguijakyaksan-treated HeLa Cell Line *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	2.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>
Sample 2(n=3)	1	0.83 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Sample 3(n=3)	1	0.47 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>b</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% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

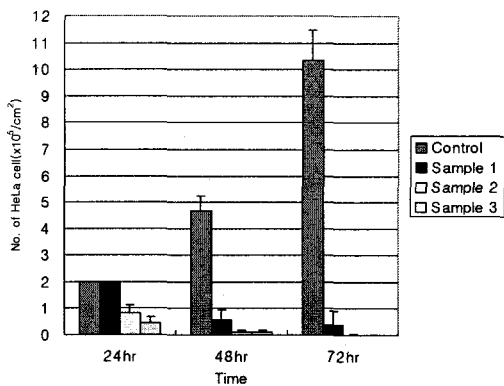


Fig. 1. Inhibitory effect on cell proliferation in Dangguijakyaksan-treated HeLa Cell *in vitro*

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

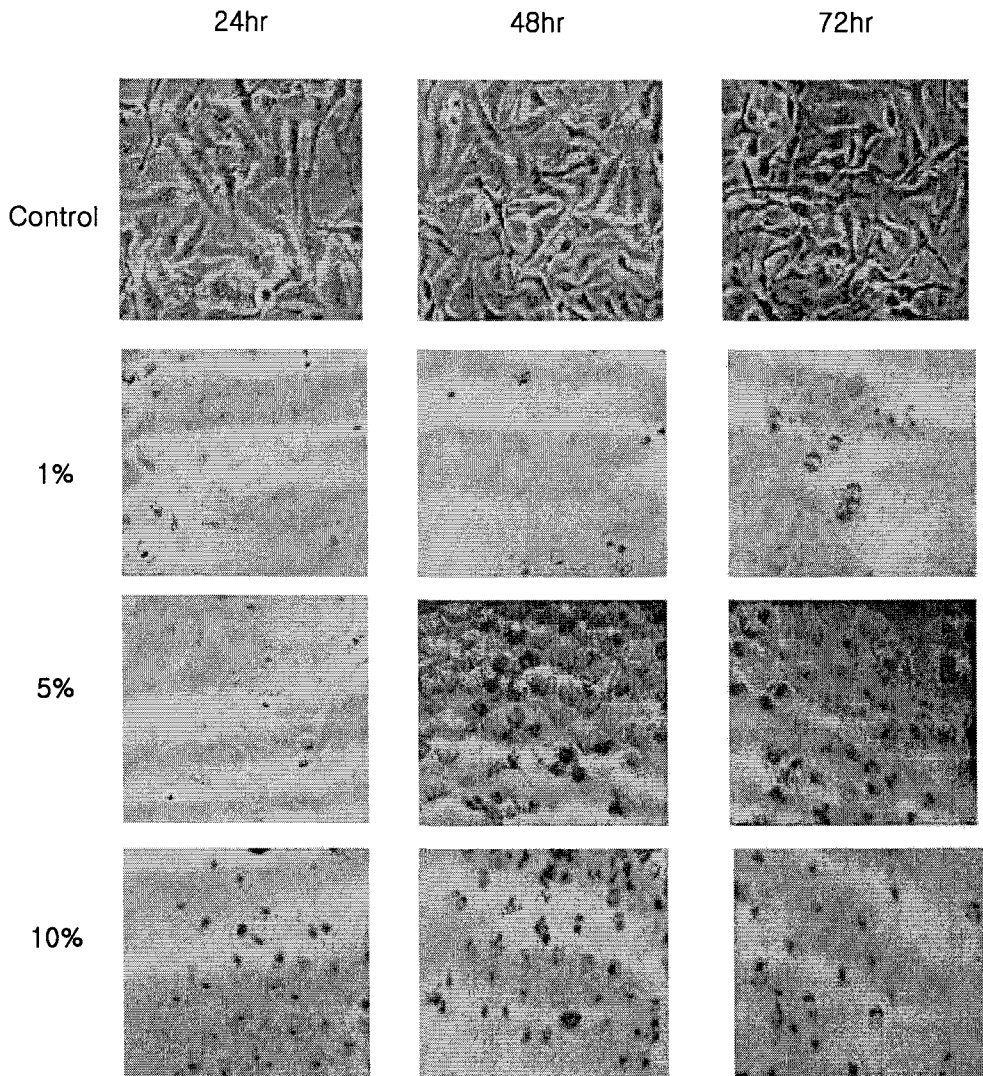


Fig. 2. Configurations of HeLa Cells treated with Different Concentrated Dangguijakyaksan extract solution

2. 流細胞 分析에 미치는 影響  
 24시간 배양 후 caspase 유전자 활성화 세포의 비율은 대조군이 22.44%로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각 39.01%, 32.65% 및 70.82%로 측정되어 대조군에 비하여 모두 增加하였다.  
 48시간 배양 후 caspase 유전자 활성화 세포의 비율은 대조군이 9.46%로 측정

되었다. 5%와 10% 檢液群은 각각 36.20%와 33.81%로 측정되어 대조군에 비하여 增加하였다.  
 72시간 배양 후 caspase 유전자 활성화 세포의 비율은 대조군이 8.31%로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 檢液群에서는 각각 8.83%, 13.87% 및 47.76%로 측정되어 대조군에 비하여 모두 增加하였다 (Table III, Fig. 3).

Table III. Activated Caspase Expression in Dangguijakyaksan-treated HeLa Cell 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	39.01	5.30	8.83
Sample 2	32.65	36.20	13.87
Sample 3	70.82	33.81	47.76

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

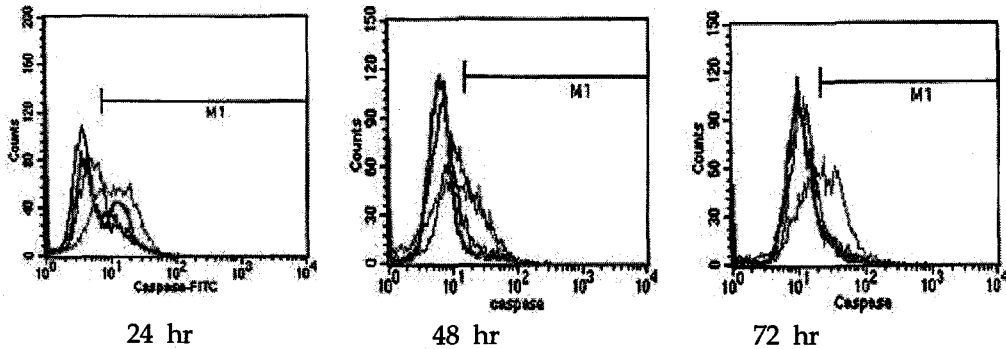


Fig. 3. FACS analysis in Dangguijakyaksan-treated HeLa cell

Black: control, Green: sample 1, Red: sample 2, Blue: sample 3

3. Caspase-3 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 caspase-3 활성도는 대조군이 0.0846으로 측정되었다. 5%와 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각 0.1033와 0.1086으로 측정되어 대조군에 비하여 增加하였다.

48시간 배양 후 caspase-3 활성도는 대조군이 0.0901로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각

0.1002, 0.1278, 0.1359로 측정되어 대조군에 비하여 모두 增加하였다.

72시간 배양 후 caspase-3 활성도는 대조군이 0.1088로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각 0.1721, 0.1803, 0.1884로 측정되어 대조군에 비하여 모두 增加하였다 (Table IV, Fig. 4).

Table IV. Caspase-3 Activity in Dangguijakyaksan-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	0.0577	0.1002	0.1721
Sample 2	0.1033	0.1278	0.1803
Sample 3	0.1086	0.1359	0.1884

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

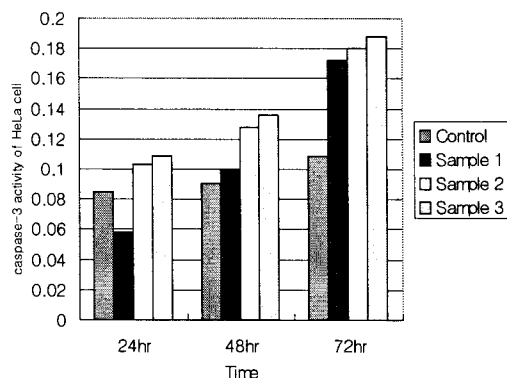


Fig. 4. Caspase-3 activity in Dangguijakyaksan-treated HeLa Cell

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

#### 4. 細胞活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 XTT assay를 통한 세포활성도는 대조군이  $0.45 \pm 0.12$ 로 측정되었다. 1%와 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각  $0.56 \pm 0.19$ 와  $0.63 \pm 0.05$ 로 측정되어 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았으며 5% 檢液群에서는  $0.65 \pm 0.09$ 로 측정되어 유의하게 증가 ( $p < 0.05$ )하였다.

48시간 배양 후 세포활성도는 대조군이  $0.69 \pm 0.05$ 로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각  $0.65 \pm 0.19$ ,  $0.56 \pm 0.11$  및  $0.22 \pm 0.10$ 으로

측정되어 대조군에 비해 농도의존적으로 減少하는 경향을 보였고, 10% 檢液群이 유의하게 減少 ( $p < 0.05$ )하였다.

72시간 배양 후 세포활성도는 대조군이  $0.68 \pm 0.07$ 로 측정되었다. 1%와 5% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각  $0.75 \pm 0.07$ ,  $0.71 \pm 0.05$ 로 측정되어 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으나, 10% 檢液群은  $0.40 \pm 0.05$ 로 측정되어 대조군에 비하여 유의하게 減少 ( $p < 0.05$ )하였다 (Table V, Fig. 5).



Table V. XTT Activity in Dangguijakyaksan-treated HeLa Cell

Subjects	XTT proliferation of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control (n=3)	0.45±0.12 <sup>1/a2)</sup>	0.69±0.05 <sup>a</sup>	0.68±0.07 <sup>a</sup>
Sample 1(n=3)	0.56±0.19 <sup>a,b</sup>	0.65±0.19 <sup>a</sup>	0.75±0.07 <sup>a</sup>
Sample 2(n=3)	0.65±0.09 <sup>b</sup>	0.56±0.11 <sup>a</sup>	0.71±0.05 <sup>a</sup>
Sample 3(n=3)	0.63±0.05 <sup>a,b</sup>	0.22±0.10 <sup>b</sup>	0.40±0.05 <sup>b</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% Dangguijakyaksan extract solution  
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution  
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

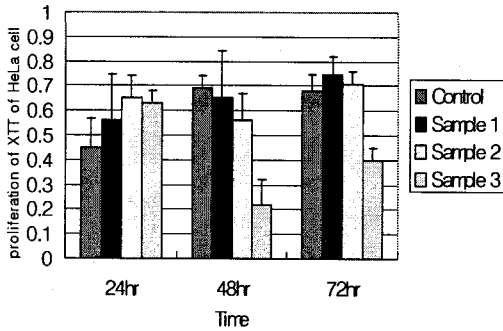


Fig 5. XTT activity in Dangguijakyaksan-treated HeLa cells

Control: Group with 2% FBS  
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Dangguijakyaksan extract solution  
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution  
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

5. MAP kinase 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 MAP kinase 활성도는 대조군이 72522 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각 66756 CNT/mm<sup>2</sup>, 69845 CNT/mm<sup>2</sup> 및 58875 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되어 대조군에 비하여 모두 減少하였다.

48시간 배양 후 MAP kinase 활성도는 대조군이 71083 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각 49758 CNT/mm<sup>2</sup>, 45523 CNT/mm<sup>2</sup>

및 37029 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되어 대조군에 비하여 모두 농도의존적으로 減少하였다.

72시간 배양 후 MAP kinase 활성도는 대조군이 70753 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 當歸芍藥散 檢液群에서는 각각 42937 CNT/mm<sup>2</sup>, 37020 CNT/mm<sup>2</sup>, 34574 CNT/mm<sup>2</sup>로 측정되어 대조군에 비하여 모두 농도의존적으로 減少하였다 (Table VI, Fig. 6-8).

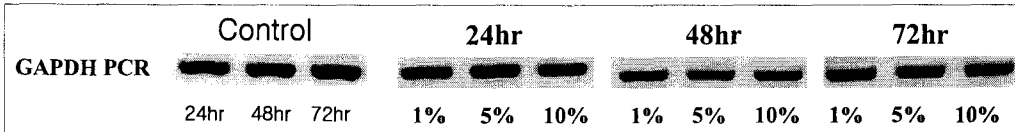


Fig. 6. GAPDH analysis for quantitative PCR

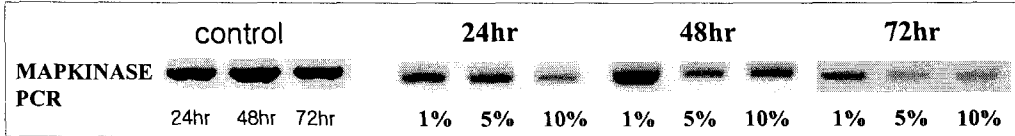


Fig. 7. MAP kinase activity of HeLa cell treated with Dangguijakyaksan extract solution

Table VI. MAP Kinase Activity in Dangguijakyaksan-treated HeLa Cell

Subjects	MAP kinase activity (density CNT/mm <sup>2</sup> ) of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control	72522	71083	70753
Sample 1	66756	49758	42937
Sample 2	69845	45523	37020
Sample 3	58875	37029	34574

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

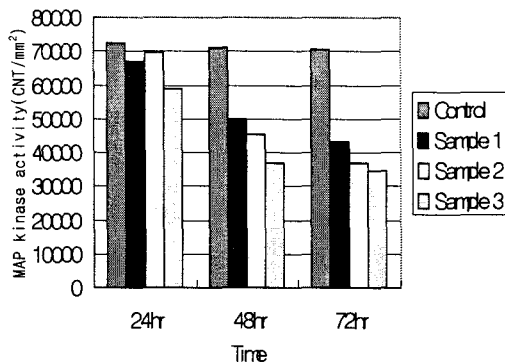


Fig. 8. MAP kinase activity in Dangguijakyaksan-treated HeLa cell

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Dangguijakyaksan extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Dangguijakyaksan extract solution

#### IV. 考 察

癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로서 腹中積塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉, 切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛極盛하는 증상을 나타내는 부인과 질환으로 子宮頸部癌과 가장 유사한 질환이다<sup>6,7</sup>. 癥瘕의 原因은 外感寒邪, 七情, 痰, 食積, 死血 및 正氣虛 등으로, 破積, 消瘀血之劑가 주요 약물로 사용되나, 養正邪自除의 원칙에 따라 補한 연후에 積塊를 攻破하는 것이 治法의 基本이다<sup>8,21</sup>.

當歸芍藥散은 張<sup>12</sup>의 <金匱要略>에 처음 수록된 처방으로 補血活血하는 當歸, 芍藥, 川芎과 健脾利水하는 蒼朮, 澤瀉, 茯苓로 구성되어<sup>22</sup>, 婦人腹痛이나 妊娠腹痛뿐만 아니라 胎動不安, 産後血暈, 月經不順, 崩中, 産前産後의 泄瀉 및 癰癤 등의 婦人 虛證 疾患에 광범위하게 활용된다<sup>13,23</sup>.

當歸芍藥散에 대한 실험적 연구로 血小板 凝集 억제 작용<sup>14</sup>, 老化에 따른 神經 손상 보호 작용<sup>15,16</sup> 등이 있으며, 부인과와 관련된 연구로는 神經색 후 여성호르몬 분비 촉진 작용<sup>17</sup>, 난소 세포 증식 촉진 작용<sup>18</sup>, 황체 기능 장애 개선 효과<sup>19,20</sup> 등이 보고된 바 있으나 子宮頸部癌에 관한 연구는 보고된 바 없다.

이에 著者は 當歸芍藥散이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 影響을 알아보기 위해, 상이한 농도의 當歸芍藥散 檢液을 HeLa cell에 처리한 후 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3의 活性, 細胞活性 및 MAP kinase 발현을 관찰하였다.

Apoptosis는 유전학적으로 프로그램된 세포 자살 기전으로, 細胞核과 細胞質은 凝縮되고, 細胞 組織은 細胞膜으로 둘러싸인 apoptotic body로 분해되어 食細胞 作用에 의해 소멸된다<sup>24,25</sup>. 正常 子宮頸部 上皮細胞가 浸潤性 子宮頸部癌으로 진행할수록 apoptosis 활성도가 減少하므로, 子宮頸部 上皮內 腫瘍이 浸潤性 子宮頸部癌으로 이환하는 비율은 apoptosis 활성도와 밀접한 상관관계를 가지고 있을 것으로 생각된다<sup>26</sup>.

HeLa cell에 當歸芍藥散 檢液群을 상이한 농도로 처리하여 각각 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하면서 細胞增殖에 미치는 영향을 관찰한 결과, 24시간 배양한 경우 5%와 10% 檢液群에서 뚜렷한 細胞增殖 抑制效果를 나타내었다. 48시간과 72시간 배양한 모든 檢液群의 細胞增殖은 대조군에 비하여 유의한 減少를 나타내었다. 이러한 결과는 龍葵<sup>27</sup>의 HeLa cell에 대한 결과와 유사하다.

流細胞 分析은 단세포로 분산된 세포를 염색하여 Laser 등을 조사하였을 때 발생하는 산란광과 형광을 측정하여 각 세포의 생물학적 특성을 분석하는 방법이다<sup>28</sup>. 流細胞 分析을 활용하면 액체 속에서 부유하는 세포의 물리적, 화학적 특성을 측정하여 여러 종류의 세포표면 항원이나 세포질 내 단백질, RNA, DNA 및 Ca<sup>2+</sup> 등을 분석할 수 있다<sup>29,30</sup>.

當歸芍藥散 檢液이 HeLa cell의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 流細胞 分析을 이용하여 caspase 활성을 보이는 세포의 비율을 측정하였다. 48시간 배양한 1% 當歸芍藥散 檢液群을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해

caspase 유전자 활성을 보이는 세포의 비율이 증가하였다. 10% 농도로 當歸芍藥散을 처리하고 24시간 배양한 실험군에서 caspase 활성을 보이는 세포의 비율이 최대로 관찰되었다.

Caspase는 목표 단백질의 aspartic acid를 분해하는 단백질 분해효소로 apoptosis의 주요한 효과기이다. 이온화 방사선이나 화학 요법에 반응하게 되면 내부경로를 통해 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 분비되어 caspase-9을 활성화하고, 면역반응을 통해 원하지 않는 細胞를 제거할 때는 Fas 신호전달을 통해 caspase-8이 활성화한다. Caspase-8과 caspase-9과 같은 initiator caspase가 caspase 연쇄반응을 통해 executioner caspase를 활성화하면 세포 단백을 분해하여 apoptosis가 일어나게 된다. Apoptosis 경로에 여러 caspase가 관여하는데 그 중에서 caspase-3는 caspase 연쇄반응의 최종산물로 세포 단백을 분해하는 executioner caspase이다<sup>31)</sup>.

Apoptosis 진행에 필요한 단백질인 caspase-3의 활성도를 caspase colorimetric ELISA assay로 측정한 결과 24시간 배양한 1% 當歸芍藥散 檢液群을 제외한 모든 실험군에서 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다. 當歸芍藥散 檢液이 처리된 HeLa cell은 농도의존적으로 caspase-3 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이상의 결과로 當歸芍藥散이 HeLa cell의 apoptosis 작용을 촉진함을 알 수 있으며 龍葵<sup>27)</sup>와 달리 caspase-3가 주요한 역할을 한다는 점을 확인할 수 있었다.

XTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아가 탈수소 효소작용에 의하여

XTT tetrazolium ring을 분해하여 생성되는 XTT formazan crystal의 흡광도를 측정하는 방법으로 살아있는 細胞의 활성도를 정확하게 측정할 수 있는 방법이다<sup>32)</sup>.

HeLa cell의 세포활성도의 예측지표인 XTT 활성도를 조사한 결과 10% 檢液群을 48시간과 72시간 배양한 경우 XTT 활성도가 대조군에 비해 유의하게 減少하는 결과가 관찰되어, 10%의 농도로 48시간 이상 배양한 當歸芍藥散 檢液에서 HeLa cell의 세포활성도가 減少하는 것을 알 수 있다.

Map kinase는 세포 밖 신호를 세포 내 목표 물질로 전달하기 위해 세포질에 존재하는 단백질 인산화 효소로, 유전자 발현, 세포 증식, 세포 성장과 사멸, 세포 운동성을 포함한 세포 과정에서 중요한 역할을 한다<sup>33,34)</sup>. MAP kinase 신호전달 억제인자는 MAP kinase 신호전달체계를 통제하여 炎症, 癌을 治療하는데 有效하게 작용한다<sup>35)</sup>. 세포의 활동이 활발할 때는 Map kinase의 활성이 증가하고, 세포가 사멸한 경우에는 減少한다.

當歸芍藥散의 MAP kinase 신호전달체에 대한 영향을 알아보기 위하여, 當歸芍藥散 檢液 처리된 HeLa cell의 RNA를 채취하여 PCR 정량을 통해 MAP kinase의 활성도를 측정하였다. 24시간, 48시간 및 72시간 배양한 모든 當歸芍藥散 檢液群에서 대조군에 비하여 모두 減少하였으며, 특히 48시간과 72시간에서는 농도의존적 減少를 나타내었다.

이상의 실험 결과를 통해 고찰해 볼 때, 當歸芍藥散은 子宮頸部癌 細胞인

HeLa cell의 增殖을 抑制하고, apoptosis에 關係하는 caspase-3를 活性化하며, MAP kinase의 活性을 減少시키므로, 子宮頸部癌 細胞의 成長을 抑制하고 死滅效果로 인해 抗癌作用을 일으키는 것으로 사료된다.

### V. 結 論

當歸芍藥散이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 影響을 알아보고자 상이한 濃도의 當歸芍藥散 檢液이 함유된 培養液 하에서 HeLa cell을 제외 배양하여 細胞增殖과 流細胞 分析을 통한 caspase 活性, caspase-3의 活性, 細胞活性 抑制 및 MAP kinase 發現을 살펴본 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 當歸芍藥散 檢液 처치 후 HeLa cell의 細胞增殖은 24시간 1% 檢液群을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 有意하게 抑制되었다.
2. 當歸芍藥散 檢液 처치 후 HeLa cell의 caspase 유전자 활성은 48시간 1% 檢液群을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 增加하였다.
3. 當歸芍藥散 檢液 처치 후 HeLa cell의 caspase-3 활성도는 24시간 1% 檢液群을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 濃도의존적으로 增加하였다.
4. 當歸芍藥散 檢液 처치 후 HeLa cell의 세포 활성도는 48시간과 72시간 10% 檢液群만이 대조군에 비하여 有意하게 減少하였다.
5. 當歸芍藥散 檢液 처치 후 HeLa cell의 MAP kinase activity는 24시간, 48

시간 및 72시간 檢液群에서 대조군에 비하여 減少하였으며, 48시간과 72시간 檢液群에서는 濃도의존적으로 減少하였다.

- 투 고 일 : 2006년 04월 28일
- 심 사 일 : 2006년 05월 01일
- 심사완료일 : 2006년 05월 09일

### 參考文獻

1. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울: 칼빈서적. 1997;980-1027
2. 이승호. 자궁경부암의 역학과 병인론. 계명의대논문집. 1997;16(1):29-36
3. 이호표. 자궁경부암의 검진. 계명의대논문집. 1997;16(1):37-52
4. 최유덕. 새임상 부인과학. 서울: 고려의학. 2001;501-511
5. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學(上). 서울: 鼎談. 2002;303-329
6. 李京燮, 宋炳基. 癥瘕病態에 關한 文獻考察. 東洋醫學. 1980;6(2):46-50
7. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울: 杏林出版社. 1992;249-253
8. 李京燮, 宋炳基. 癥瘕治方에 關한 文獻考察. 大韓韓醫學會誌. 1982;3(2):54-62
9. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울: 杏林出版社. 1995;229-234
10. 趙鍾寬. 韓方臨床腫瘍學. 대전: 周珉出版社. 2001;799-818
11. 金賢兒, 林成祐, 李源哲. 韓藥을 利用한 抗癌 實驗研究의 傾向에 關한 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1998;4(1):211-232
12. 張仲景. 仲景全書. 서울. 大星出版社.

- 1992;428, 438
13. 李東建 編. 國譯 金匱要略. 서울: 서원당. 1996;276, 301-302
  14. 김종구 등. 桂枝茯苓丸 및 當歸芍藥散과 그 構成藥物의 血小板凝集反應에 관한 實驗的 研究. 大韓韓方診斷學會誌. 2000;4(2):71-84
  15. Kou J, Zhu D, Yan Y. Neuroprotective effects of the aqueous extract of the chinese medicine Danggui-Shaoyao-san on aged mice. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):313-318
  16. Itoh T *et al.* Regulatory effect of Danggui-Shaoyao-san on central cholinergic nervous system dysfunction in mice. *Am J Chin Med.* 1996;24(3-4):205-217
  17. 崔載永, 李源哲, 尹相協. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄후 當歸芍藥散 투여가 여성호르몬 및 뇌위축에 미치는 영향. 대한한방성인병학회지. 1998;4(1):179-194
  18. Usuki S *et al.* Tokishakuyakusan effect on DNA polymerase  $\alpha$  activity in relationship to DNA synthesis before and/or after the LH/FSH surge in rats. *Am J Chin Med.* 1995;23(3-4):231-242
  19. Usuki S, Kotani E. Tokishakuyakusan directly attenuates PACAP's luteolytic action on luteal function in the rat ovary. *Am J Chin Med* 2002; 30(4):521-531
  20. Usuki S, Higa TN, Soreya K. The improvement of luteal insufficiency in fecund women by Tokishakuyakusan treatment. *Am J Chin Med.* 2002;30(2-3):327-338
  21. 李熙祥, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 癥瘕의 治方에 對한 文獻的 考察. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 1998;6(2):417-435
  22. 李尙仁. 天真處方解說. 서울:성보사. 1995;198-200
  23. 梁原美, 李泰均. 『金匱要略』 婦人三篇이 朝鮮時代 婦人門에 미친 影響에 關한 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 1998;11(2):237-268
  24. Steller H. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science.* 1995;267:1445-1449
  25. Takahashi H *et al.* Fas antigen modulates ultraviolet B-induced apoptosis of SVHK cells: sequential activation of caspases 8, 3, and 1 in the apoptotic process. *Exp Cell Res.* 1999; 249(2):291-298
  26. 김태진 등. 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성. 대부종콜포회지. 1999;10(2):138-147
  27. 高維美 등. 龍葵가 HeLa cell의 增殖抑制와 apoptosis 에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2005;18(2):1-11
  28. 고창원, 강순범. 자궁경부암에서 선행항암화학요법시 유세포분석에 의한 DNA 양상과 임상적 특성과의 관계에 관한 연구. 대한산부회지. 1995;38(5):848-860
  29. 조영주. Multiparameter flow cytometry의 응용. *Biochemistry News.* 1992;12(2):84-90
  30. Martin JC, Swartzendruber DE. Time: a new parameter for kinetic measurements in flow cytometry. *Science.* 1980;207(4427):199-201
  31. Boatright KM, Salvesen GS. Mechan

- isms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(6):725-731
32. Braeckman BP *et al.* Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(2-3):105-119
33. 정광철. MAP kinase signaling pathways. *Biochemistry News.* 1997;17(3):116-125
34. Caffrey DR, O'Neill LA, Shields D C. The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *J Mol Evol.* 1999;49(5):567-582
35. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature.* 2001;410(6824):37-40