

血府逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식억제와 Apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

대구한의대학교 한의학과 부인과교실
문나영, 김동철, 백승희

ABSTRACT

Effect of *Hyulbuchukeotang* on the Inhibition of Proliferation of Uterine leiomyoma cells and Cell apoptosis

Nayoung Moon, Dongchul Kim, Seunghee Baek

Dep. of gynecology, College of Oriental Medicine, Daeguhaany University

Purpose : The purpose of this study is to demonstrate the direct inhibitory effect of *Hyulbuchukeotang* on the proliferation of uterine leiomyoma cells through an experiment treating uterine leiomyoma cells cultivated by explantation with indicated concentrations of *Hyulbuchukeotang* and to research the gene expression related to cell cycle in order to discover the connection with apoptosis and its mechanism by analyzing cell cycle.

Methods : After primary culture of uterine leiomyoma cells, the cultivated uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Hyulbuchukeotang* for 24 hours. The inhibitory effect on the cell proliferation was determined by the cell count assay. The value of a cell count assay represent the percentage of cells in a phase of the cell cycle compared with total cells. In addition, a link between *Hyulbuchukeotang* and apoptosis was examined through flow cytometric analysis by FACS and DNA fragmentation analysis. Finally, the degree of gene expression related to cell cycle was evaluated by Western blot analysis.

Results : The inhibitory effect of *Hyulbuchukeotang* increase of uterine leiomyoma cells treated with indicated concentrations of *Hyulbuchukeotang* increases. The result of gene expression related to G1 phase after treating with 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of *Hyulbuchukeotang* on uterine leiomyoma cells is that the gene expression of p27 was increased but that of p53 an p21 remained unchanged and the gene of pRB, pro-caspase 3 was decreased.

Conclusion : Through the mentioned experiments, it is demonstrated that *Hyulbuchukeotang* is effective in inhibiting proliferation of uterine leiomyoma cells by extending cell cycle G1. However it is not considered that the inhibitory effect results from the aptoposis.

Key words : uterine leiomyoma, Cell apoptosis, *Hyulbuchukeotang*

I. 緒 論

子宮筋腫은 子宮에서 발생하는 가장 흔한 양성종양으로 어느 연령에서나 발생하나 주로 30~45세에서 호발하며 전가임여성의 30% 정도에서 발생하는 것으로 악성종양으로의 변화는 0.5%미만으로 가족력이 있는 질환으로 알려져 있다(1-5).

子宮筋腫의 원인에 대해서는 내인성 에스트로젠의 자극이 子宮筋腫의 성장 인자로 알려져 있으며(6-8) 치료는 자궁적출술이 가장 일반적이고 그 외에 GnRH agonist의 사용, 근핵적출술, 자궁동맥전색술 등이 있으나 자궁적출술 이외는 확실한 대처 방안이 없는 실정이다(9).

여성에 있어 자궁적출은 약 40%가 子宮筋腫에 의한 것으로 나타나고 있는데, 자궁적출술은 子宮筋腫 치료를 위한 근치적 치료법이지만 단순 자궁적출만으로도 여성상실감, 우울증, 조기폐경, 난소의 기능저하 등의 문제점이 나타나므로(9) 보존적인 치료방법의 개발이 필요한 실정이다.

韓醫學에서는 女性の 生殖器官인 子宮, 卵巢 및 그 주위에 발생하는 腫塊를 癥瘕라 통칭하는데 子宮內膜炎, 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 絨毛性腫瘍, 子宮肉腫, 子宮癌 등을 포괄하는 개념이다(10-6). 癥瘕는 氣滯, 瘀血, 濕痰 등으로 인식되어 大七氣湯(17), 桂枝茯苓丸(18), 膈下逐瘀湯(19), 開

鬱二陳湯(20) 등과 같이 順氣, 活血, 祛瘀의 치료방법이 많이 사용되어 왔다.

血府逐瘀湯은 靑代 王清任의 《醫林改錯(21)》에 처음으로 기록된 瘀血症을 치료하는 대표적인 처방으로 胸中에 瘀血이 氣機를 阻礙하고 肝氣鬱滯로 인한 瘀血을 겸한 증상을 치료하는 방제이다.

血府逐瘀湯에 대한 연구로는 免疫機能에 미치는 영향(22) 血栓生成關與因子에 미치는 영향(23), 스트레스(24), 高脂血症(25), 肝機能(26), 癌轉移 抑制(27)에 대한 효과가 규명된 바가 있으며 자궁근종에 대하여 少腹逐瘀湯(28), 蟠葱散(29), 五積散(30), 七製香附丸(31) 등의 처방에 대한 연구가 있었다.

이에 저자는 活血祛瘀 효과가 있는 血府逐瘀湯으로 체외배양한 자궁근종세포에 대한 증식억제 효과를 관찰하고 억제효과 기전으로 세포주기 분석, 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 藥材

본 연구에 사용된 血府逐瘀湯의 처방 구성은 《醫林改錯⁽²¹⁾》의 내용을 근거로 하였으며 약물은 대구한의대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 精選하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Hyulbuchukeo-tang*

| 한약명 | 학명 | 생약명 | 용량(g) |
|-----|-------------------------------------|------------------------------|-------|
| 桃仁 | <i>Prunus persica</i> (L.) | Persicae Semen | 16 |
| 紅花 | <i>Carthamus tinctorius</i> L. | Carthami Flos | 12 |
| 當歸 | <i>A. acutiloba</i> KITAG | Angelica Gigantis Radix | 12 |
| 生地黃 | <i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH. | Rehmanniae Radix | 12 |
| 牛膝 | <i>Achyranthes japonica</i> NAKAI | Achyranthis Bidentatae Radix | 12 |
| 赤芍藥 | <i>Paeonia lactiflora</i> PALL. | Paeoniae Radix Rubra | 8 |
| 枳殼 | <i>Citrus aurantium</i> L. | Aurantii Fructus | 8 |
| 川芎 | <i>Cnidium officinale</i> MAKINO | Cnidii Rhizoma | 6 |
| 桔梗 | <i>Platycodon grandiflorum</i> A. | Platycodi Radix | 6 |
| 柴胡 | <i>Bupleurum falcatum</i> L. | Bupleuri Radix | 4 |
| 甘草 | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH. | Glycyrrhizae Radix | 4 |
| 계 | | | 100 |

2) 檢液의 調製

실험에 사용된 약제는 일체의 가공이나 修治를 加하지 않는 상태에서 사용하였으며 血府逐瘀湯 182 g을 1차 증류수 2,000 ml를 첨가하여 2시간 30분 동안 증탕하여 검액 300 ml를 추출하였다. 추출한 검액을 100 ml이 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 한 뒤, -70℃ 이하에서 24시간 이상 defreeze 한 후 96시간 동안 완전히 동결 건조시켜 31.5 g의 粉末을 얻어 3차 증류수에 0.1 g/ml 농도로 용해시킨 후 상층 액을 0.2µm filter (Nalgene, USA)로 걸러서 실험에 사용하였다.

2. 實驗方法

1) 子宮筋腫 細胞의 일차 배양

자궁근종을 가진 환자의 전자궁 적출술 시에 자궁근종은 중심에서 가장자리로 향해 3분의 1 지점 부위와 정상 자궁 조직은 근종에 인접한 정상 조직을 수술 후 채취하였으며, 자궁근종의 선택은 자궁의 크기가 임신 12주 이상, 이차적 변성이 없는 부위를 선택하였다. 환자의 나이는 35~45세 사이의 환자들로 하였으며 적출한 자궁의 자궁내막주기는 총 10

예 중 증식기가 5예, 분비기가 5예로 하였다. 일차배양은 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단 한 후 15 ml 튜브에 옮겨 1000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액은 제거하였다. 이어 절단한 조직에 HEPES (25 mM/L), penicillin (200 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), collagenase type IV (1.5 mg/ml), DNase (0.2 mg/ml)를 HBSS에 넣고 37℃ 수조에서 3~4시간 동안 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일세포로 분리한 후 2000 rpm에서 다시 5분간 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum 이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 근육 세포인지를 확인하였다.

2) 子宮筋腫細胞의 增殖抑制 檢査(MTS

assay)

자궁근종 세포를 multi pipet을 사용하여 96 well plate에 4×10^3 개로 분주하였다. 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 시약을 처리하고 MTS 측정 시, one solution reagent(-20°C에 보관)를 실온에 90분 또는 37°C에 10분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media 200 μ l multipipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 부유된 후 well 당 100 μ l 보유하도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 μ l 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였으며 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) FACS에 의한 細胞週期 分析(Flow cytometric analysis)

자궁근종 세포를 60 mm tissue culture dish에 3×10^5 cells/dish로 세포 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 후 대조군과 血府逐瘀湯 검액을 농도별로 처리하였다. 세포를 24~48시간 배양시키고 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재 부유시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 재 부유시킨 뒤, 1.5 ml tube에 옮겼다. 1000 rpm 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1 ml를 넣고 재 부유시킨 후, 4°C에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액 제거한 후 PBS용액으로 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma, MO, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, MO, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/ml, propidium iodide (Sigma, MO, USA) 용액을 첨가하여 암

실에서 1시간 동안 4°C에서 염색한 후 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

4) Western Blot analysis

血府逐瘀湯 검액을 농도별로 처리한 후 cyclin A, D, E 및 cell apoptosis에 관계하는 p27, p53, p21, pro-caspase 3, pRb, E2F-1, PARP 단백질 발현차이를 확인하고, 세포주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.4), 5 mM EDTA(pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리 하여 상층을 취하고 Biorad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories Inc., PA, USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계(Du[®] 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, Bedford, UK)로 전기이동(electrotransfer)을 시행하였다. 전기이동된 막을 blocking용액(5% skim dry milk in PBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체인 cyclin A, D, E 와 p27, p53, p21, pro-caspase 3, pRb, E2F-1, PARP (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1×PBS-T 용액(20 mM/L Tris, 137 mM/L Nacl, 0.5% Tween 20%)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz,

CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응 시켜 항체를 결합시켰다. 1×PBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10 분간 3번 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 PBS-T를 제거하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, NJ, USA)로 검출하였다.

5) 통계분석

모든 시험은 3회 반복 측정 하였으며, 유의값의 판정은 student's t-test, paired t-test를 이용하여 분석하였고, p값이 0.05 이하일 때를 유의값으로 하였다.

III. 成 績

1. 血府逐瘀湯의 자궁근종세포에 대한 증식억제 효과

일차 배양된 자궁근종세포에 血府逐瘀湯 검액을 처리한 결과, 24시간 후 1,000 µg/ml의 농도에서 증식 억제 효과가 나타났다(Fig. 1).

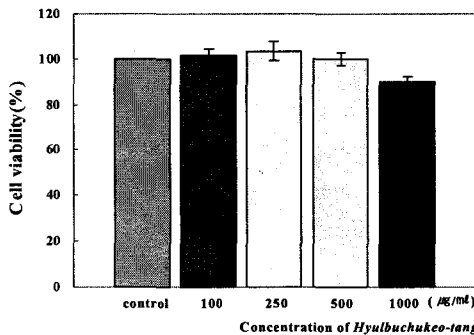


Fig. 1. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Hyulbuchukeo-tang* for 24hrs. Cell proliferation was determined using the cell count assay. The effect of *Hyulbuchukeo-tang* on the proliferation of uterine leiomyoma cell was inhibited in concentration of 1, 000 µg/ml.

2. 血府逐瘀湯이 cell cycle에 미치는 효과
자궁근종세포에 血府逐瘀湯 검액을 100, 250, 500, 1,000 µg/ml 농도별로 처리하고 24 시간 후 세포주기를 분석한 결과 S phase의 감소, G1 phase의 연장으로 세포의 증식이 지연됨을 관찰하였다(Fig. 2).

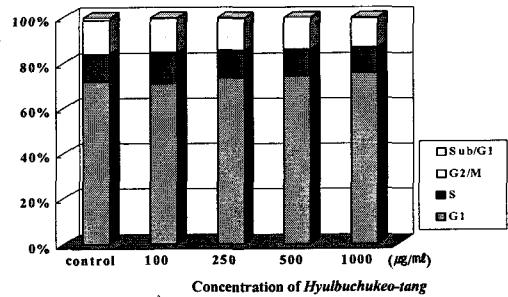


Fig. 2. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Hyulbuchukeo-tang* for 24hrs. Cell cycle profile were analyzed by FACS analysis. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells. *Hyulbuchukeo-tang* induced G1 cell cycle arrest.

3. 血府逐瘀湯이 cyclin A, cyclin D, cyclin E, CDK2, CDK4의 발현에 미치는 영향

자궁근종세포에 血府逐瘀湯 검액을 100, 250, 500, 1,000 µg/ml의 농도 별로 처리하고 24시간 후 발현을 관찰한 결과, cyclin A의 발현이 감소하였으며 cyclin D, cyclin E, CDK2, CDK4의 발현은 변화가 없었다(Fig. 3).

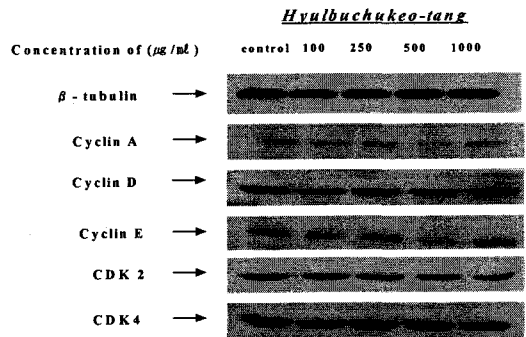


Fig. 3. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Hyulbuchukeo-tang*. Effect of *Hyulbuchukeo-tang* on cyclin A, cyclin D, cyclin E, CDK2, CDK4 in uterine leiomyoma cells. *Hyulbuchukeo-tang* decreased the expression of cyclin A, but that of cyclin D, cyclin E, CDK2, CDK4 showed no change. β -tubulin was used as internal control.

4. 血府逐瘀湯이 p21, p27, p53 단백질 발현에 미치는 영향

자궁근종세포에 血府逐瘀湯 검액을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 처리하고 24시간 후 subG1 단계에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p27 유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였다(Fig. 4).

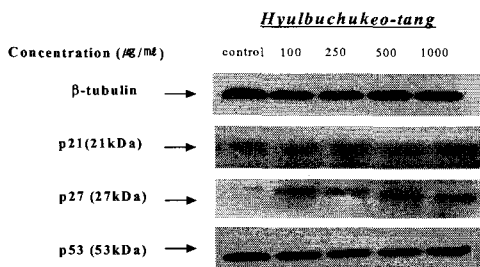


Fig. 4. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Hyulbuchukeo-tang*. Effect of *Hyulbuchukeo-tang* on p21, p27, p53 on uterine leiomyoma cells. *Hyulbuchukeo-tang* enhanced the expression of p27, but that of p53 and p21 showed no change. β -tubulin was used as internal control.

5. 血府逐瘀湯이 pRb, E2F-1 및 pro-caspase 3와 PARP의 발현에 미치는 영향

자궁근종세포에 血府逐瘀湯 검액을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 처리하고 24시간 후 발현을 관찰한 결과, pRb와 pro-caspase 3의 발현이 감소하였으며 E2F-1, PARP의 발현은 변화가 없었다 (Fig.5).

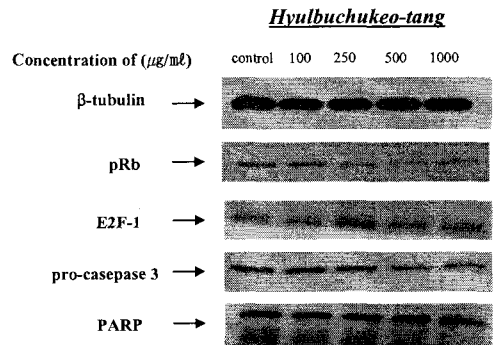


Fig. 5. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Hyulbuchukeo-tang*. Effect of *Hyulbuchukeo-tang* on pRb, E2F-1 and pro-caspase 3, PARP in uterine leiomyoma cells is that the gene expression of pRb and pro-caspase 3 were decreased but that of E2F-1 and PARP showed no change. β -tubulin was used as internal control.

IV. 考 察

子宮筋腫은 여성에서 발생하는 종양 가운데 가장 흔한 종양으로, 가임기 여성의 약 25~30%에서 발생하는 것으로³²⁻³⁾ 자궁적출술을 시행한 자궁에서는 子宮筋腫이 조직병리학적으로 77%에서 발견되었다고 보고하고 있으나³⁴⁾, 子宮筋腫의 발생원인과 기전은 아직도 명확하게 규명되지는 않고 있다.

지금까지 밝혀진 발생 원인으로는 연령, 인종, 및 호르몬 등이 주로 보고되고 있고 흑인에서 백인이나 유색인종보다 3배 더 많으며³⁵⁾, 난포 호르몬, 성장 호르몬, 황체 호르몬이 자궁근종의 성장에 밀접한 영향을 미친다고 보고되었고³⁶⁾, 또한 난소의 기능이 왕성할 때 子宮筋腫이 잘 자라며 초경 이전이나 폐경기 이후에는 발생이 드물고 근종의 크기가 감소하는 것으로 보아 난포 호르몬이 子宮筋腫의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³³⁾. 붉은 고기(red meat), 쇠

고기(beef), 햄 등은 자궁근종의 빈도를 증가시키며 채소, 과일류의 섭취는 빈도를 감소시킨다.³⁷⁾ 흡연여성에서 子宮筋腫의 성장속도가 증가하고 다산부에서 빈도가 감소한다고 보고되고 있다³⁸⁾.

자궁근종은 약 20~50%에서 임상증상이 나타나는 것으로 알려져 있으며 흔한 증상으로는 골반내 동통, 이상자궁출혈, 월경과다증, 불임증 등이었다고 보고되고 있다³⁶⁾. 이상자궁출혈은 자궁에 존재하는 수많은 성장인자의 비 조절로 인해 새로운 신생혈관들이 만들어지고 혈관을 확장시키며, 자궁에 각종 수용체의 발현을 증가시킴으로써 유발되고^{39,40)}, 점막하근종은 子宮筋腫 주위의 자궁내막선의 확장 과 팽창에 의하거나 난소호르몬의 과다 분비에 의해 월경과다가 유발된다⁴¹⁾. 子宮筋腫으로 인한 동통은 주로 골반압통이나 월경통으로 표현되며 子宮筋腫 때문에 인접부의 신경계, 하부비뇨기계, 소화기계 등을 압박하여 빈통, 빈뇨, 변비 등을 일으킬 수도 있다.³³⁾ 子宮筋腫으로 인한 불임증은 수정란의 착상방해⁴⁰⁾, 생리적인 자궁수축에 대한 장애로 정자의 이동이 방해되거나⁴²⁾, 나팔관 경로의 변형, 자궁경관의 압박, 자궁경관의 위치의 변화로 인한 정자수송을 방해⁴³⁾, 혈액순환 장애로 인한 착상방해 등으로 유발된다³⁶⁾.

子宮筋腫의 현재까지의 치료방법으로는 양방적으로는 비수술적 치료로 프로그스테론제제⁴⁴⁾, GnRH agonist⁴⁵⁾, 항에스트로젠 및 프로그스테론제제인 R-2323⁴⁶⁾, danazol³³⁾, Gestrinone⁴⁷⁾, interferon α⁴⁸⁾, RU486⁴⁹⁾의 호르몬 제제 등이 사용되고 있으나 그 치료의 효과와 부작용 때문에 보조적으로 사용되고 있다. 수술적

치료는 증상의 유무에 따라 시행되며 복식 전자궁적출술이 60.9%로 대부분을 차지하였고, 복강경을 이용한 전자궁적출술과 자궁근핵절제술이 증가 추세에 있다⁵⁰⁾.

韓醫學에서는 子宮筋腫을 여성생식에 발생하는 종양질환인 癥瘕의 범주로 보고 있으며^{10,13)} 癥瘕의 原人으로는 外感寒邪, 七情, 痰, 食積, 死血, 正氣虛 등과 관련되어 있다고 보며, 癥瘕의 治法으로는 대체적으로 養正則邪自除의 원칙하에 發病原因에 따라 活血 理氣 消積 破結 消痰의 治法을 使用하였다⁵¹⁾. 그 중 瘀血을 가장 중요한 원인으로 인식하여 活血祛瘀藥 위주의 처방이나 약물이 다용되고 있다.

血府逐瘀湯은 活血化瘀法을 集大成한 靑代 王清任이 著述한 <醫林改錯²¹⁾>에 최초로 기록되어 있는 處方으로, 上中下部位別 血瘀證症 치료제 중에서 中部의 瘀血을 제거하여 '頭痛, 胸痛, 胸不任物, 胸任重物, 天亮出汗, 食自胸右下, 心裏熱, 銳敏, 急躁, 夜睡夢多, 呃逆, 飲水即噎, 不眠, 小兒夜啼, 心跳心慌, 夜不安, 俗言肝氣病, 乾嘔, 晚發一陣熱의 症狀를 治療한다.'고 하였다. 그 조성은 桃紅四物湯과 四逆散, 胸膈의 結氣를 열어주는 桔梗과 瘀血을 下行시키는 牛膝로 조성되어 일체의 氣滯血瘀證을 通治한다^{52,3)}.

血府逐瘀湯을 구성하는 약물별 효능을 살펴보면 當歸는 心, 肝, 脾經에 들어가 補血和血, 調經止痛, 破惡血, 養新血함으로써 一切의 血證을 치료하고, 生地黃은 心, 肝, 腎經에 들어가 滋陰, 涼血, 消瘀, 通經함으로써 陰虛發熱, 吐衄崩中, 瘀血癰血, 折跌絕筋 등 증을 치료하고, 桃仁은 心, 肝, 大腸經에 들어가 活血, 破血,

祛瘀함으로써 血滯經閉, 通經, 産後瘀滯腹痛, 癥瘕積聚, 跌打損傷 등의 瘀滯作痛의 증을 치료하고, 紅花는 心, 肝經에 들어가 活血, 祛瘀, 通經함으로써 血滯經閉, 癥瘕積聚, 跌打損傷 등의 瘀滯作痛의 증을 치료하고, 枳殼은 肺, 胃經에 들어가 破氣, 行痰, 消積함으로써 胸痞結胸, 脘腹, 痞悶脹滿, 心腹結氣 等 症을 치료하며, 赤芍藥은 肝, 脾經에 들어가 清熱涼血, 活血散瘀함으로써 經閉, 跌打損傷, 疝瘕積聚 등 氣血瘀滯의 증을 치료하고, 柴胡는 肝膽經에 들어가 退熱, 疎肝解鬱, 升舉陽氣하고 血凝氣滯를 散함으로써 肝氣鬱結 胸脇疼痛, 月經不調 等 症을 치료하며, 甘草는 肝, 脾經에 들어가 補中益氣, 通經脈, 理血氣, 瀉火解毒함으로써 十二經을 通行시키고 諸藥을 조화하며, 桔梗은 肺, 胃經에 들어가 開宣肺氣 함으로써 開胸膈滯氣하여 胸膈刺痛, 脇痛, 咽喉腫痛, 腹滿 等 症을 치료하며, 川芎은 肝膽經에 들어가 行氣開鬱, 活血止痛, 消瘀血 함으로써 月經不調, 産後瘀滯腹痛, 跌打損傷, 癰疽瘡瘍 等 症을 치료하고, 牛膝은 肝, 腎經에 들어가 散惡血, 破癥結, 通經함으로써 婦女血滯經閉, 通經, 月經不調, 跌打損傷 등의 瘀滯作痛 등을 치료한다⁵⁴⁻⁶⁾.

血府逐瘀湯은 최초에는 中部의 瘀血을 除去하는 處方으로 입방되었으나 桃紅四物湯, 四逆散의 처방구성이 女性의 瘀血疾患에 응용되는 處方이므로 氣滯, 瘀血 등으로 인한 癥瘕治療에 능히 應用될 수 있을 것으로 思料된다.

그간 子宮筋腫에 대한 치료로 大七氣湯¹⁷⁾, 桂枝茯苓丸¹⁸⁾, 膈下逐瘀湯¹⁹⁾, 開鬱二陳湯²⁰⁾, 小腹逐瘀湯²⁸⁾, 蟠葱散²⁹⁾, 五積散³⁰⁾, 七製香附丸³¹⁾, 失笑散⁵⁷⁾, 鷄血藤⁵⁸⁾ 등을

이용한 연구가 보고된 적은 있으나 血府逐瘀湯이 子宮筋腫細胞의 增殖抑制와 Apoptosis 관련 유전자의 발현에 미치는 영향에 대한 효과는 아직까지 실험적으로 규명되지 않아 연구에 착수하게 되었다.

먼저 血府逐瘀湯에 의한 子宮筋腫細胞의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 배양된 자궁근종세포에 血府逐瘀湯 검액을 처리한 후 24시간이 지난 후의 세포를 회수하여 세포 생존율을 측정된 결과 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 증식이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

세포가 정상적으로 자라는 데는 성장 및 분화의 세포주기를 거치게 되며 어떤 원인에 의하여 세포손상이 되면 비정상적인 세포주기를 나타내게 된다⁵⁹⁾.

앞의 실험을 통하여 血府逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 효과를 확인하였으므로 血府逐瘀湯이 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁근종세포에 血府逐瘀湯을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도별로 처리하고 24시간 후 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과 S phase의 감소, G1 phase의 연장으로 세포의 증식이 지연됨을 관찰하였다(Fig. 2).

이러한 결과는 G1 phase에서 세포분화가 계속 일어나고 있으며 S phase로 이행되지 못하여 세포성장을 지연시키고 있는 결과로 血府逐瘀湯이 세포성장을 억제시키는 기전으로 G1 checkpoint 조절에 영향을 주는 것으로 생각된다.

다음 단계로서 G1 phase를 담당하는 G1 cyclin 들의 발현증가에 대한 관찰을 시행하기 위하여 血府逐瘀湯 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 처리하고

24시간 후 cyclin A, cyclin D, cyclin E 및 CDK2, CDK4 유전자 발현을 알아본 결과, cyclin A의 발현이 감소하였으며 cyclin D, cyclin E, CDK2, CDK4의 발현은 변화가 없었다(Fig. 3).

동물세포에서 G1/S phase에서 특징하게 작용을 나타내는 G1 cyclin으로는 type A, D, E 등이 있으며 특히, cyclin E는 G1 phase 말기에 발현되어 CDK2(cyclin dependent kinase)와 결합하여 G1/S phase 전이기에 CDK2의 활성도가 최고조에 달하도록 도와 G1/S 전이에 필수적인 인자이다⁵⁹⁾.

Cyclin이나 CDK 이외에 세포주기를 조절하는 CDKI(cyclin dependent kinase inhibitor)들이 있으며 이들은 cyclin-CDK 복합체의 CDK 활성을 저해하여 세포주기를 조절하는 인자들로 p27, p57, p21 등이 있다⁶⁰⁾.

CDKI 중에서 p27은 세포내에서 항상 일정량으로 발현되고 있는데 p27은 cyclin 혹은 cyclin-CDK 복합체와 결합할 수 있는데 특히 cyclin E-CDK2복합체에 결합하여 CDK의 활성을 저해하며 G1/S phase의 정지(arrest)를 유발하게 됨으로써 apoptosis를 유도하게 된다⁶¹⁻²⁾.

p53은 손상받은 DNA를 지닌 세포로 하여금 분열을 하지 못하도록 세포주기를 중단시키는 역할을 하는 것으로 심각한 DNA 손상을 입은 세포가, 다음 세포 분열 주기로 들어가기 전에 DNA가 복구되지 못하면 p53은 apoptosis를 유발하며 G1/S phase 진행에 있어서 G1 checkpoint의 조정자 역할을 한다. 또한 p53은 CDKI 중 하나인 p21의 생성을 유도하게 되며 p21은 CDK와 결합하여 G1 phase arrest를 유도하고, 세포는 손상된

DNA의 복구를 하게 된다. 이 때 만약 손상된 DNA의 복구가 실패한 경우에는 p53에 의하여 세포는 apoptosis 과정을 거쳐 사망에 이르게 되며 비정상적인 세포의 증식을 차단하는 것으로 알려져 있다⁶³⁾.

위의 실험에서 세포주기 분석을 통하여 G1 phase arrest를 확인하였으며 세포주기와 관련한 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 p27, p57, p21에 대하여 western blot 분석을 통하여 조사하였다.

Cell cycle 관련 유전자 p27, p53, p21의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 자궁근종세포에 血府逐瘀湯을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 처리하고 24시간 후 G1 단계에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p27 유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 p53, p21의 발현은 변화가 없었다(Fig. 4).

이러한 결과는 p27의 증가로 cyclin-CDK 복합체와 결합하여 세포주기를 지연시키는 결과를 보이거나 p53, p21의 변화는 없는 것으로 보아 세포자멸사를 유도하는 효과는 없는 것으로 생각된다.

血府逐瘀湯이 세포자멸사를 유도하는 다른 인자인 pRb, E2F-1 및 pro-caspase 3와 PARP의 발현을 관찰한 결과, pBb와 pro-caspase 3의 발현이 감소하였으며 E2F-1, PARP의 발현은 변화가 없었다(Fig. 5).

위의 실험을 통하여 확인된 血府逐瘀湯의 자궁근종세포에 대한 효과는 세포주기의 연장을 통한 자궁근종세포의 증식을 억제하는 효과가 있으며, 증식억제 효과가 apoptosis에 의한 세포자멸사는 아닌 것으로 생각된다.

V. 結 論

血府逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 血府逐瘀湯을 농도별로 처리한 후 증식억제 효과 및 apoptosis 관련 세포주기 분석 및 세포주기관련 유전자 분석을 시도한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 일차 배양된 자궁근종세포에 血府逐瘀湯을 농도별로 처리한 결과, 24시간 후 1,000 μ g/ml의 농도에서 증식 억제 효과가 나타났다.

2. 血府逐瘀湯을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포주기를 분석한 결과, S phase의 감소, G1 phase의 연장으로 세포의 증식이 지연되었다.

3. 血府逐瘀湯을 농도별로 처리하고 24시간 후 cyclin A, cyclin D, cyclin E 및 CDK2, CDK4 유전자 발현을 알아본 결과, cyclin A의 발현이 감소하였으며 cyclin D, cyclin E, CDK2, CDK4의 발현은 변화가 없었다.

4. 血府逐瘀湯을 농도별로 처리하고 24시간 후 G1 단계에 관계하는 단백 발현을 관찰한 결과, p27 단백질은 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 p53, p21의 발현은 변화가 없었다.

5. 세포자멸사와 관련된 유전자 pRb, E2F-1 및 pro-caspase 3와 PARP의 발현을 관찰한 결과, pRb와 pro-caspase 3의 발현이 감소하였으며 E2F-1, PARP의 발현은 변화가 없었다.

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

參考文獻

1. 대한 산부인과학의 교과서 편찬위원회. 부인과학. 서울:도서출판 칼빈서적. 1997;176, 178-80.
2. Healy DL et al. LH-RH analogues in the treatment of uterine fibroids. Boston:Wright. 1989;126-43.
3. 한의부인과학 편찬위원회. 韓醫婦人科學. 서울:도서출판정담. 2002;303-313.
4. Culter WB, Genovese SE. Wellness in women after 40 years of the role of sex hormones and pheromones. Dis Mon. 1998;44(9):421-546.
5. Rein MS et al. Fibroid myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin releasing hormone agonist leuprolide acetate. Fer Steri. 1990;53:1018-23.
6. Lumsden MA, West CP, Baird DT. Goserelin therapy before surgery or uterine fibroids. Lancet. 1987;1:36-7.
7. Ross RK, Pike MC, Vessey MP, Bull D, Yeates D, Casa grande JT. Risk factors for uterine fibroids: Reduced risk associated with oral contraceptives. Br Med J. 1986;293:359-62.
8. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEIS Lett. 1996;392:49-53.
9. 조현희 등. 자궁적출시 부속기절제 유무에 따른 성호르몬의 변화. 대한산부회지. 2001;44:2283-8.
10. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:杏林出版. 1992;251,254-6.
11. 金鍾桓. 子宮筋腫의 治療法에 관한

- 韓醫學的 考察. 大韓韓方婦人科學會誌. 1998;11(1):209-27.
12. 裴恩敬, 李京燮, 宋炳基. 子宮筋腫의 韓醫學的 接近. 大韓韓方婦人科學會誌. 1994;7(1):79-86.
13. 金相佑 등. 癥瘕患者에 대한 臨床的 考察. 大韓韓方婦人科學會誌. 1991;4:23-8.
14. 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 癥瘕의 東西醫學的 考察. 韓醫學會誌. 1986;7(1):84-8.
15. 申鎭湜. 比較醫學的 側面에서 본 癥瘕의 疾病에 관한 文獻的 高찰. 東醫病理學學會誌. 1984;1:67-70.
16. 鄭奉天. 子宮筋腫의 治驗. 大田大學校 論文集. 1992;1(1):15-33.
17. 許浚. 原本 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1991;490.
18. 張機. 金櫃要略自學保. 서울:中醫古籍出版社. 1988;172-3.
19. 余桂清. 歷代中醫腫廕安論選粹. 北京:北京出版社. 1988;1-49.
20. 萬全. 萬氏婦人科. 湖北:湖北人民出版社. 1983;10.
21. 王清任. 醫林改錯. 北京:中國中醫藥出版社. 1995;24-8.
22. 洪喜鐸, 金淳烈, 李泰均. 血府逐瘀湯이 免疫機能에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):177-89.
23. 金英宣. 血府逐瘀湯이 血栓生成關與 因子에 미치는 影響. 暎園大學校 大學院 韓醫學科. 2000;2.
24. 崔裕旻. 血府逐瘀湯이 스트레스에 미치는 影響. 暎園大學校大學院 醫學科. 2004;11.
25. 崔順子. 血府逐瘀湯이 STZ 糖尿病 랫트의 高脂血症에 미치는 影響. 暎園大學校 大學院 韓醫學科. 2004;11.
26. 梁秀光. 血府逐瘀湯이 STZ 유도 糖尿病 狀態의 肝 機能에 미치는 影響. 暎園大學校 大學院 韓醫學科. 2004;11.
27. 李眞華 등. 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 影響. 대한한방중앙의학회지. 1999;5(1):61-75.
28. 이영림, 백승희. 少腹逐瘀湯이 자궁근증세포의 성장 억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis 에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):18-33.
29. 김윤근 등. 蟠葱散이 子宮筋腫細胞의 死滅과 Cell Apoptosis에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):34-44.
30. 전미혜 등. 五積散이 子宮筋腫細胞의 死滅과 Cell Apoptosis에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):56-67.
31. 白承嬉, 李京燮, 宋炳基. 七製香附丸이 子宮細胞柱의 成長과 排卵 및 着床前胚發生에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):186-200.
32. Arthur LH et al. Comprehensive Gynecology 2nd ed. St. Louis;Mosby Year Book 1992;182.
33. Stewart EA. Uterine fibroids. Lancet 2001;357:293-8.
34. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. Am J Clin Pathol 1990;94:435-8.
35. Marshall LM et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. Obstet Gynecol 1989;96:200.

36. Buttram VC Jr, Reiter RC. Uterine leiomyoma: Etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril* 1981; 36: 433.
37. Chiaffarino F et al. Diet and uterine myomas. *Obstet Gynecol* 1999;94:395-8.
38. Paraziini F et al. Epidemiologic characteristics of women with uterine fibroids: a casecontrol study. *Obstet Gynecol* 1988;72:853-7.
39. Sampson JA. The blood supply of uterine myomata. *Surg Gynecol Obstet* 1912;14:215-30.
40. Farrer-Brown G, Beily JOW, Tarbit MH. Venous changes in the endometrium of myomatous uteri. *Obstet Gynecol* 1971;38:743-51.
41. Stewart EA, Nowak RA. Leiomyoma-related bleeding: a classic hypothesis updated for the molecular era. *Hum Reprod Update* 1996;2:295-306.
42. Coutinho EM, Maia HS. The contraceptive response of the human uterus, fallopian tubes, and ovary to prostaglandines in vivo. *Fertil Steril* 1971; 22:539-43.
43. Hunt JE, Wallach EE. Uterine factors in infertility; an overview. *Clinical Obstet Gynecol* 1974;17:44-64.
44. Coutinho EM, Boulanger GA, Goncalves MT. Regression of uterine leiomyomas after treatment with gestrinone, an antiestrogen, antiprogestosterone. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;155:761.
45. Letterie GS et al. Efficacy of a GnRH agonist in the treatment of uterine leiomyoma: long-term follow-up. *Fertil Steril* 1989;51:951.
46. Matta WH, Shaw RW, Nye M. Long-term follow-up of patients with uterine fibroids after treatment with the LHRH agonist buserelin. *Br J Obstet Gynecol* 1989;96:200.
47. Coutinho EM, Concalves MT. Long-term treatment of leiomyomas with gestrinone. *Fertil Steril* 1989;51:939-46.
48. Minakuchi K et al. Remarkable and persistent shrinkage of uterine leiomyoma associated with interferon alfa treatment of hepatitis. *Lancet* 1999;363:2127-8.
49. Murphy AA, Morales AJ, Kettel LM, Yen SS. Regression of Uterine leiomyomata to the antiprogestosterone RU486: dose-response effect *Fertil Steril*. 1995;64:187-90.
50. 박정규외 8인. 자궁근종에 관한 임상통계학적 연구. 대한산부회지 제48권 제 2호, 2005;436-5.
51. 姜孝信. 東醫婦人科學. 서울:醫文社.1966;203-204.
52. 上海中醫學院 : 方劑學, 香港, 商務印書館. 1977;177.
53. 葉威禮. 從活血化瘀十方試探王清任的臨床思惟. 福建中醫藥, 1985;16(110):2-4.
54. 李尙仁. 本草學. 서울:成輔社. 1975;57-9, 100-2, 107-8, 197-9, 325-6, 350-2, 398-400, 420-1, 425-7, 448-9, 455-6.
55. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 香港:商務印書館. 1997;74-76, 220-2, 417-20, 567

- 73, 876-9, 992-4, 1093-395, 1507-8, 1775-7, 1787-9, 1832-7.
56. 李時珍. 本草綱目. 서울:高文社. 1975; 400-3, 414-6, 456-8, 484-9, 494-6, 563-4, 596-601, 996-7, 1189-90.
57. 백승희, 김동철. 失笑散이 자궁근종세포의 증식억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):29-42.
58. 이화경. 鷄血藤이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사관련 유전자의 발현에 미치는 영향. 대구한의대 대학원. 2004.
59. 김승철. Cell cycle and Apoptosis. 이화여자대학교 의과대학 산부인과 교실 춘계심포지엄. 1998;23-42.
60. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 1996;15(4):381-93.
61. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclin D. Cell. 1993;73:1059-65.
62. Chellappan S et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:4549-53.
63. 羅載衡. 자궁경부의 침윤암과 상피내종양에서 인유두종바이러스 감염과 p53 및 p21 유전자 변이. 전남대학교 대학원. 1998.