

## 三稜이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사 관련 유전자 발현에 미치는 영향

대구한의대학교 한의학과 부인과교실  
박창건, 김동철, 백승희

### ABSTRACT

**The effect of *Sparganii Rhizoma* on the proliferation inhibition of human uterine leiomyoma cell and expression of gene related cell apoptosis**

**Changgun Park, Dongchul Kim, Seunghee Baek**

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

**Purpose :** This study was aimed to investigate the inhibitory effect of *Sparganii Rhizoma* on the proliferation of human uterine leiomyoma cells and the expression of gene related the mechanism of cell apoptosis.

**Methods :** This study was evaluated the number of death cells treated with indicated concentration of *Sparganii Rhizoma* and investigated cell death rate by MTS assay. Furthermore, fluorescence-activated cell sorter analysis and DNA fragmentation assay were used to dissect between necrosis and apoptosis. and then we observed the differential gene expression by western blot analysis.

**Results :**

- 1) The inhibitory effect on the growth of uterine leiomyoma cell treated with *Sparganii Rhizoma* was increased in a dose dependent manner.
- 2) As the result of FACS analysis, subG1 phase increase was observed 23.49% in uterine leiomyoma cell treated with *Sparganii Rhizoma* at 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  compared to control.
- 3) The gene expression of p53, p21 related cell apoptosis was increased according to increasing concentration but p27 was none exchanged.
- 4) The expression of cyclin A, D and E was decreased in a concentration proportional and then the dephosphorylation of pRb was increased.
- 5) The character of apoptosis, DNA fragmentation was significantly observed according to increasing concentration.
- 6) The expression of pro-caspase3 were decreased dependent on treatment concentration and activated PARP took place.

**Conclusion :** The inhibitory effect of *Sparganii Rhizoma* on the proliferation of human uterine leiomyoma cells was observed with apoptosis and cell cycle arrest. These data suggest that *Sparganii Rhizoma* might be candidate of medical therapy for uterine leiomyoma.

**Key words :** uterine leiomyoma, apoptosis, *Sparganii Rhizoma*

## I. 緒 論

자궁근종은 자궁에서 발생하는 가장 흔한 양성 종양 질환으로서 주로 30~45세에 호발한다<sup>1,2)</sup>. 자궁근종은 약 20~50% 정도에서 임상증상이 나타나는 것으로 알려져 있으며 주요한 증상은 동통, 과다월경, 종유감 등으로<sup>3,5)</sup> 개인마다 다양한 증상을 초래하며, 자궁근종의 치료법으로는 자궁적출술이 보편적으로 시술되고 있다<sup>6)</sup>. 그러나 임신을 원하는 여성에서는 자궁의 보존이 무엇보다도 중요하므로, 자궁근종을 가진 많은 환자들이 단순한 수술로 제거하기보다는 약물 치료나 보존적 치료를 원하고 있다. 따라서 자궁적출술을 통한 수술적 치료보다는 약물적 치료가 이루어진다면 자궁근종으로 고생하는 여성에게 신체적, 정신적 고통을 덜어주는 좋은 치료법의 길잡이가 될 것이다<sup>7)</sup>.

이러한 현실적인 약물개발의 필요성에 의하여 한의학에서는 여성의 월경질환과 종양 질환에 다용되는 처방과 한약재를 이용한 자궁근종의 증식억제 효과에 대한 연구가 진행되어 오고 있다<sup>8-15)</sup>.

三稜은 黑三稜科에 속한 다년생 草本인 黑三稜의 塊莖을 건조한 것으로 性은 平無毒하고 味는 苦하다. 肝脾經에 入하여 破血行氣, 消積止痛하는 작용이 있어서 癥瘕積聚, 氣血癱滯, 心腹疼痛, 産後瘀血腹痛, 經閉 등에 활용할 수 있다<sup>16-21)</sup>.

이에 저자는 임상에서 攻堅破積하는 효능으로 여성 종양 질환에 다용되는 三稜이 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 사람 자궁근종세포를 체외 배양하고 三稜을 처

리하여 증식억제 효과를 검증하였고, 세포자멸사와의 관련을 알아보기 위하여 유전자 분석을 시도한 바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 藥材

黑三稜科(Sparganiaceae)에 속한 다년생 草本인 黑三稜(*Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham.)의 塊莖을 건조한 三稜(*Sparganii Rhizoma*)은 대구한의대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

#### 2) 검액의 조제

실험에 사용된 약제는 일체의 가공이나 수치를 가하지 않는 상태에서 사용하였으며 三稜 80 g에 1차 증류수 1,300 ml를 첨가하여 2시간 30분 동안 중탕하여 검액 300 ml를 추출하였다. 추출한 검액을 100 ml가 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 한 뒤, -70℃ 이하에서 24시간 이상 defreeze한 후 96시간 동안 완전히 동결 건조시켜 4.78 g의 분말을 얻어 3차 증류수에 0.1 g/ml 농도로 용해시킨 후 상층 액을 0.2μm filter (Nalgene, USA)로 걸러서 실험에 사용하였다.

### 2. 方法

#### 1) 자궁근종 세포의 배양

자궁근종을 가진 환자의 全子宮 적출술시에 자궁근종의 중심에서 가장자리로 향해 3분의 1 지점 부위를 수술 후 채취하였으며, 자궁근종의 선택은 자궁의 크기가 임신 12주 이상, 이차적 변성이 없는 부위를 선택하였다.

환자의 나이는 35~45세 사이의 환자

들로 하였으며 적출한 자궁의 자궁내막 주기는 총 10예 중 증식기 5예, 분비기 5예로 하였다. 일차배양은 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단한 후 15ml 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°C 수조에서 3~4시간 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 pipet을 이용하여 강하게 혼합해서 단일세포로 분리한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 양성 및 음성 양상에 딸 근육 세포인지를 확인하였다.

## 2) 자궁근종세포의 증식억제 검사(MTS assay)

자궁근종 세포를 multi pipet을 사용하여 96 well plate에  $4 \times 10^3$ 개로 분주하였다. 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 시약을 처리하고 MTS 측정시, one solution reagent(-20°C에 보관)를 실온에 90분 또는 37°C에 10분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media 200 µl multi pipet을 이용하여 pipeting하여

cell이 부유된 후 well 당 100 µl 보유하도록 하였다. 각 well 당 one solution reagent를 20 µl 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS를 측정하였으며 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 3) Flow cytometric analysis

자궁근종 세포를 60 mm tissue culture dish에  $3 \times 10^5$  cells/dish로 세포 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 후 대조군과 三稜 검액을 농도 별로 처리하였다. 세포를 24~48시간 배양시키고 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1.5 ml tube에 옮기고 1000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 재부유시킨 뒤 1000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1 ml를 넣고 재부유시킨 후, 4°C에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액을 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 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색한 후 유세포분석기(FACS)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

## 4) DNA fragmentation analysis

자궁근종 세포에 三稜 검액을 농도별 처리한 후 Nucleosome ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, USA)를 이용하여 cytoplasmic histone-associated DNA fragments

(mono and oligonucleosomes)의 생성량을 ELISA reader를 통해 정해진 지침에 의해 정량 분석 하였다.

5) Western Blot analysis

三稜 검액을 농도별로 처리 한 후 cyclin A, cyclin D, cyclin E, CDK2, CDK4 및 세포자멸사에 관계하는 p27, p53, p21, pRb, pro-caspase 3, PARP 유전자 단백질의 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<sup>®</sup> 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, Bedford, UK)로 전기이동을 시행하였다. 전기이동된 막을 blocking용액(5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체인 p27, p53, p21, cyclin A, acyclin D, cyclin E, pro-caspase 3 및 PARP (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1×TBS-T 용액(20 mM/L Tris, 137 mM/L NaCl, 0.5% Tween 20%으로 nitrocellulose 막을 넣

고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비특이적으로 결합해 있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, NJ, USA)로 검출하였다.

6) 통계학적 분석

통계학적 분석은 student-t test를 이용하였고, p<0.05를 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 三稜의 자궁근종세포에 대한 24시간 농도별 세포생존율

일차 배양된 자궁근종세포에 三稜 검액을 100, 250, 500, 1,000 µg/ml의 농도로 처리한 후 24시간이 지난 후의 세포를 회수하여 세포수를 측정한 결과, 500 µg/ml의 농도에서 자궁근종세포의 증식억제 효과가 50%로 나타났으며 또한 농도에 비례하여 증식억제 효과가 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 1).

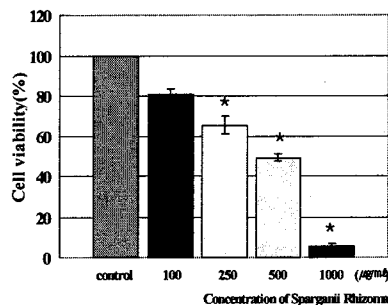


Fig. 1. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Sparganii Rhizoma for 24hr. Cell proliferation was determined using the cell count assay.

\* : Statistically significant compared with control (p < 0.05)

2. 三稜이 세포주기에 미치는 효과  
자궁근종세포에 三稜을 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기를 분석한 결과, 대조군은 subG1이 7.35%로 나타났으나 三稜은 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 25.4%의 subG1 phase의 증가가 확인되어 세포자멸사의 양적 증거를 확인하였고 이러한 subG1 phase의 증가는 농도에 비례하여 증가됨을 관찰하였다(Fig. 2).

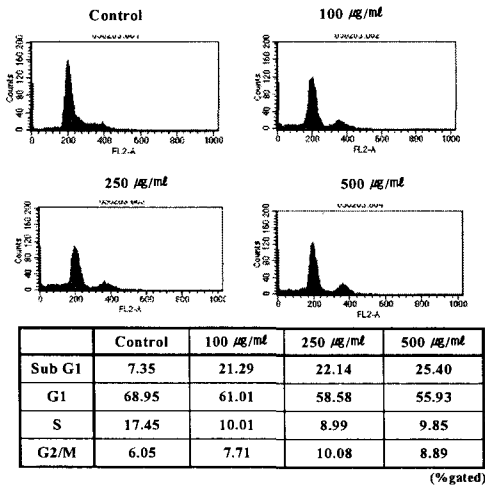


Fig. 2. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Sparganii Rhizoma for 24hr. Cell cycle profile were analyzed by FACS analysis. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

3. 三稜의 p53, p21, p27 및 CDK2, CDK4 단백질에 대한 효과

자궁근종세포에 三稜을 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p53, p21 단백질은 농도에 비례하여 발현이 증가하였으나 p27, CDK2 단백질은 발현 변화가 없었으며, CDK4 단백질은 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소를 보였다(Fig. 3).

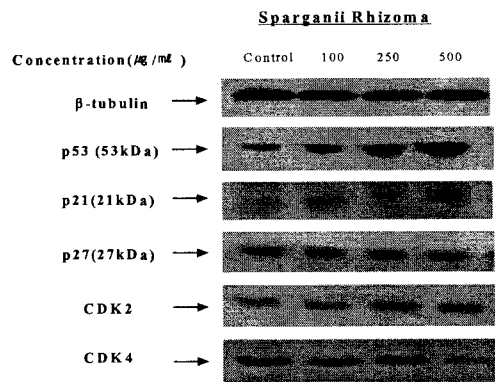


Fig. 3. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Sparganii Rhizoma for 24hr. Effect of Sparganii Rhizoma on p53, p21, p27 and CDK2, CDK4 protein in uterine leiomyoma cells.  $\beta$ -tubulin was used as internal control.

4. 三稜의 Cyclin A, Cyclin D, Cyclin E 및 pRb 단백질에 대한 효과

자궁근종세포에 三稜을 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기에 관계하는 cyclin의 발현을 관찰한 결과, cyclin A, D 및 E 단백질은 농도가 증가할수록 발현이 감소하였으며, pRb 단백질은 농도가 증가할수록 감소되어 탈인산화가 증가됨을 관찰하였다(Fig. 4).

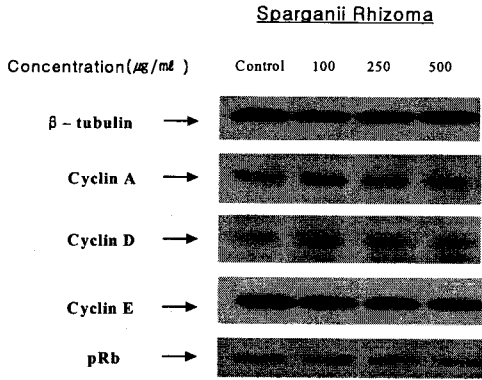


Fig. 4. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Sparganii Rhizoma for 24hrs. Effect of *Sparganii Rhizoma* on Cyclin A, Cyclin D, Cyclin E and pRb protein in uterine leiomyoma cells. β-tubulin was used as internal control.

5. 三稜의 세포자멸사 유도 효과

자궁근종세포에 三稜을 100, 250, 500 µg/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 DNA fragmentation을 ELISA로 정량 분석한 결과, 대조군에 비하여 三稜의 농도가 증가할수록 DNA fragmentation이 증가함을 관찰하였다(Fig. 5).

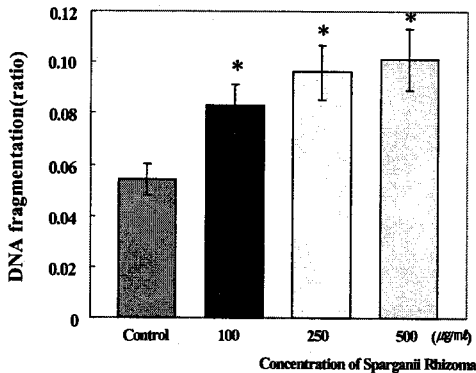


Fig. 5. DNA fragmentation assay of Sparganii Rhizoma on the growth of human uterine leiomyoma cells. Cells

were seeded at a density of 5,000 cells/well in 96-well culture plate. Cells were then treated with a indicated concentrations of Sparganii Rhizoma for 24hrs. Apoptosis was estimated by an ELISA method.

\* : Statistically significant compared with control (p < 0.05)

6. 三稜의 pro-caspase 3와 PARP 단백질에 대한 효과

자궁근종세포에 三稜을 100, 250, 500 µg/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3와PARP 단백질의 발현을 측정 한 결과, 三稜의 처리 농도가 증가할수록 비활성 형태의 pro-caspase 3의 양적 감소가 관찰되었으며 활성화된 PARP 단백질의 발현은 농도에 비례하여 증가됨을 관찰하였다(Fig. 6).

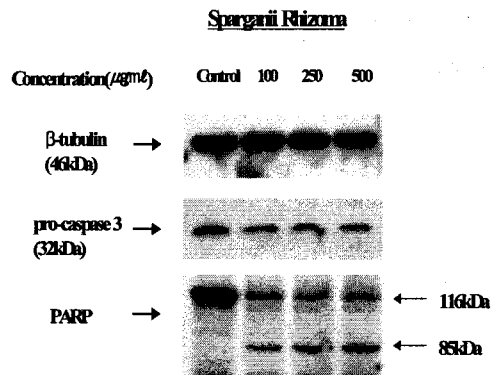


Fig. 6. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Sparganii Rhizoma* for 24 hrs. Effect of *Sparganii Rhizoma* on pro-caspase 3 and PARP protein in uterine leiomyoma cells. β-tubulin was used as internal control.

#### IV. 考 察

자궁근종은 여성에게 있어서 가장 흔한 양성 종양으로 가임기 여성의 20~25%에서 자궁근종이 발생하고<sup>22)</sup> 40대 이후에는 빈도가 증가하여 증상이 나타나지 않은 경우까지 포함하면 40~45%에서 발생한다<sup>23)</sup>. 그러나 자궁근종의 발생 원인과 기전은 명확히 밝혀져 있지 않고 증상, 동반질환, 검사소견 등 임상적 자료도 학자들 간의 연구와 의견에 따라 다양하게 보고되고 있다<sup>24)</sup>.

현재까지 자궁근종의 치료는 수술적인 방법이 대부분이며 약물치료의 경우 제한적으로만 사용되고 있다. 박 등<sup>25)</sup>은 자궁근종 환자의 55%에서 추적관찰이 이루어졌고, 44.7%에서는 수술이 이루어졌으며, 0.8%에서 약물 치료가 이루어졌다고 보고하고 있다. 자궁근종의 약물적 치료로 progesterone<sup>26)</sup>, Gestrinone<sup>27-8)</sup>, Danazol<sup>29)</sup>, RU486<sup>30)</sup>, GnRH agonist<sup>22)</sup> 등이 사용되고 있으나 그 치료의 효과와 부작용 때문에 보조적으로만 사용되고 있다. 최근에는 이러한 단점을 보완하는 치료제로 SERM(Selective Estrogen Receptor Modulator) 등에 대한 연구<sup>7, 31-3)</sup>가 이루어지고 있다.

한의학적 관점에서 자궁근종은 癥瘕, 石瘕, 血蠱와 유사한 病症을 가지고 있다. 癥瘕는 여성 성기 및 그 주위에 발생하는 종양질환을 포괄적으로 지칭하고, 石瘕는 자궁근종을 지칭하며, 血蠱는 모든 여성 성기 종양의 심한 病症을 지칭한다<sup>34)</sup>. 癥瘕의 원인으로는 外感寒邪, 七情, 痰, 食積, 瘀血, 精氣虛 등과 관련이 있으며 그 중 瘀血을 가장 중요한 원인으로 인식하여 活血祛瘀藥 위주

의 처방이나 약물이 다용되고 있는데<sup>35)</sup>, 대표적인 약물이 三稜이다.

三稜은 《本草拾遺》에 처음으로 收載된 이후로, 여러 本草書에서 破血, 祛瘀, 行氣, 消積, 止痛, 和胃의 효능으로 癥瘕, 積聚, 心腹疼痛, 脇下脹痛, 撲損瘀血, 經閉, 跌打損傷, 產後腹痛, 痛經, 積滯腹痛, 氣血凝滯 등의 증상에 이용된다고 기재되어 있다<sup>36)</sup>. 현대에 알려진 약리작용으로는 家兔의 혈액점도를 저하시키고, mouse의 肉瘤에 대한 억제작용이 있으며, 腸管의 수축을 촉진시키고, 혈소판 응집을 억제시키며, 三稜에 포괄된 정유 성분은 백혈구수를 증가시킨다<sup>37-8)</sup>.

三稜에 대한 실험적 연구로는 항종양 작용<sup>39)</sup>, 항산화 효과와 항균활성 효과<sup>40)</sup>, 진통 및 항혈전 효과<sup>41)</sup>, 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 세포활성 효과<sup>42)</sup>, 간세포에 대한 효과<sup>43)</sup> 등이 보고되어 있으나 아직 三稜이 자궁근종에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

이에 저자는 三稜이 攻堅破積하는 약재로서 자궁근종에 대한 치료 효과가 있을 것으로 생각되어 체외배양한 사람 자궁근종세포에 처리한 후 자궁근종세포의 직접적인 증식억제 효과를 조사하고 분자생물학적 기법인 세포주기 분석법을 통하여 세포주기와 관련한 유전자들의 발현을 조사하였으며 DNA fragmentation 분석을 통하여 이러한 증식억제 효과가 세포자멸사와 관련된 것임을 확인하고 또한 세포자멸사를 일으키는 기전에 대하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었다.

본 연구에서는 자궁근종세포에 三稜을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포수를

검사한 결과 농도가 증가할수록 자궁근종세포수가 감소하였으며, 250  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 대조군에 비하여 유의한 세포수의 감소를 보였으며 특히 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 자궁근종세포의 증식억제 효과가 50%의 높은 결과를 나타내었다 (Fig. 1).

이러한 증식억제 효과와 세포주기와의 상관관계를 보기 위해 자궁근종세포에 三稜을 농도별로 처리하고 24시간 후 FACS를 이용해서 세포주기를 분석한 결과, 대조군은 subG1이 7.35%로 나타났으나 三稜을 500  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 실험군에서는 25.4%의 subG1 phase의 증가가 확인되어 세포자멸사의 양적 증거를 확인하였다(Fig. 2).

세포분열주기는 분열기(M phase)와 간기(interphase)로 구분되며, 세포는 분열기에는 핵분열(mitosis)과 세포질분열(cytokinesis)이 1시간 이내에 신속하게 일어나고 대부분의 시간을 간기에서 보내게 된다. 간기는 제1간기(G1 phase), 제2간기(G2 phase) 및 DNA 증식이 일어나는 합성기(S phase)로 구분된다<sup>44,5)</sup>.

이러한 세포의 성장 및 분화의 조절은 세포가 정상적으로 자라는데 필수적이며 이 과정이 어떤 원인에 의하여 손상되면 정상세포는 비정상적인 세포주기를 거치게 된다<sup>46)</sup>. 이에 근거하여 어떠한 약물이 세포주기의 각 단계에 관계할 것이라는 것이 최근의 세포주기관련 유전자 연구들에 있어서 핵심 포인트가 되고 있는 것이다.

성장인자 등에 의해 세포주기가 시작되면 mid G1에서는 cyclin D, late G1에서는 cyclin E, S기에서는 cyclin A, G2와 M기에서는 cyclin B가 강하게 발

현된다<sup>47)</sup>. 세포주기의 특이적인 시기에 발현되는 cyclin들은 세포주기의 변화에 큰 영향을 받지 않고 항상 일정한 양으로 발현되어지는 cyclin-dependent kinase (CDK)들과 특이적으로 결합하여 CDK의 효소 기능을 조절함으로써 정상적인 세포주기가 이루어지도록 한다<sup>48)</sup>.

Cyclin D는 핵단백으로 이것의 발현은 G1 phase의 진행에 있어 필수적인 것뿐만 아니라 rate-limiting factor로서 작용하는 것으로 cyclin D의 대표적인 파트너는 CDK4와 CDK6이며 이것의 활성화는 CAK에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 반면 CDK2는 cyclin E 및 cyclin A와 결합하여 G1이나 S phase에서 역할을 한다<sup>49)</sup>.

세포의 주기를 정확히 조절하기 위해서 세포는 cyclin이나 CDK같은 positive regulator 이외에도, CDKI(cyclin dependent kinase inhibitor)들을 가지고 있으며 이들은 cyclin-CDK complex의 CDK 활성을 저해하여 세포주기를 조절하는 negative regulator로서 필수적인 인자들로 한 종류는 p21<sup>cip1</sup> family(p27, p57, p21) 등이며 다른 한 종류는 p16<sup>INK4a</sup> family(p15, p16, p18, p19, p20) 등이다<sup>46,50)</sup>. p16군은 retinoblastoma product (pRb)의 인산화만을 조절하나 p21/27군은 G1, S, G2, M phase에 모두 작용하는 것으로 알려져 있다. 한 phase에서 다른 phase로의 세포주기의 진행은 한 과정이 완전히 이루어진 후 다음 phase로 진행되는데 이것을 check point라고 한다<sup>51)</sup>. CDKI 중에서 p27 단백질은 세포내에서 항상 일정량으로 발현되어 cyclin 혹은 cyclin-CDK 복합체와 결합할 수 있는데 특히 cyclin E-CDK2



복합체에 결합하여 CDK의 활성을 저해하며 G1/S phase의 지연을 유발하게 됨으로써 세포자멸사를 유도하게 된다<sup>44,52</sup>. p53 단백질은 G1 phase check point에 주로 작용을 하여 손상된 염색체의 합성이 일어나는 것을 막아준다고 알려져 있는데 이 과정에 p21 단백질이 관여한다. p53 단백질에 의해 활성화된 p21 단백질은 cyclin D-CDK4, cyclin E-CDK2 complex와 결합하여 이를 불활성화 시켜 세포주기가 G1 phase에서 S phase로 넘어가는 것을 막는다<sup>53</sup>. 이 때 세포는 손상된 DNA의 복구를 하게 되는데 만약 손상된 DNA의 복구가 실패한 경우에는 p53 단백질에 의하여 세포는 세포자멸사 과정을 거쳐 사망에 이르게 되어 비정상적인 세포의 증식을 차단하는 것으로 알려져 있다<sup>46,54</sup>.

Cyclin D1-CDK4의 주된 기질은 pRb인데 pRb는 transcription factor인 E2F의 활성을 조절함으로써 G1/S transition에 중추적인 역할을 한다. E2F는 DNA 합성에 관련된 많은 유전자들의 전사를 조절하는 전사 조절 인자로 알려져 있는데 여기에 pRb가 결합하게 되면 전사 인자로서의 기능이 상실된다. 한편 E2F를 불활성화시키는 pRb의 기능은 pRb 자체의 인산화 상태에 따라 조절된다. Cyclin D1-CDK4 complex는 pRb에 직접 결합하여 mid G1에서 late G1 동안 이를 인산화 하는데 이렇게 pRb가 과인산화되어 E2F와 결합하지 못하게 되면, 자유롭게 된 E2F는 S phase를 위하여 필수적인 유전자의 발현을 촉진하게 되어 세포주기는 G1 phase에서 S phase로 진행하게 되는 것이다. 그러므로 cyclin D1-CDK4 complex의 기

본적인 기능은 pRb를 인산화시켜 pRb의 E2F에 결합하는 능력을 불활성화하는 것으로 생각된다<sup>55</sup>.

세포주기 분석을 통하여 G1 phase 지연을 확인하였으며 세포주기와 관련된 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 p27, p53, p21, CDK2, CDK4 및 cyclin A, cyclin D, cyclin E, pRb 단백질에 대하여 Western blot analysis를 실시하였다.

p53, p21 단백질은 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 p27, CDK2 단백질은 발현 변화가 없었으며, CDK4 단백질은 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소를 보였다(Fig. 3). 또한 cyclin A, D 및 E 단백질은 농도가 증가할수록 발현이 감소하였으며, pRb 단백질은 농도가 증가할수록 탈인산화가 증가되어 종양억제 기능이 있음을 관찰하였다(Fig. 4).

p53 단백질의 증가는 三稜의 처리로 인하여 DNA에 심각한 손상을 당하였을 것으로 생각되는 자궁근종세포가 회복되지 못한 상태에서 p53 단백질에 의하여 세포자멸사가 유도된 것으로 생각되며 이는 p53 단백질이 G1/S phase 진행에 있어서 G1 checkpoint의 조정자 역할을 한다는 것을 입증하는 것이다. 또한 발현도가 증가된 p53 단백질은 CDKI 중 하나인 p21 단백질의 생성을 유도한 결과 p21 단백질이 CDK와 결합하여 G1 phase 지연을 유도하게 되어 결국 p53 단백질에 의하여 자궁근종세포는 세포자멸사를 일으켜 증식이 억제되고 사멸되는 효과를 나타내게 되며 이는 三稜의 처리 농도에 비례하여 증가되는 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

p21과 p27 단백질에 의해 조절받는 CDK2 단백질은 본 연구에서는 크게 변화

를 보이지 않았지만, CDK4 단백질은 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 감소를 나타내어 영향하에 있다고 할 수 있겠다. 이 외에 종양억제 유전자 중의 하나인 pRb 단백질의 탈인산화가 농도 의존적으로 일어나는 것으로 보아 종양억제 유전자도 三稜의 처리로 인해 활성화되는 증거를 보여 주었다(Fig. 3). 또한 cyclin A, D 및 E 단백질의 발현도 농도 의존적으로 감소하며, 이는 G1 checkpoint인 p53 단백질에 의한 cyclin의 발현 감소로 보여준 결과이다(Fig. 4).

앞의 실험들에서 三稜은 자궁근종세포의 증식억제 효과가 있으며 이는 세포주기 상에서 G1 phase 지연을 일으켜서 일어나며 여기에는 p53, p21 등의 세포주기 관련 유전자가 관계되어 있음을 알 수 있었다.

세포자멸사는 세포 내부에 프로그램된 신호를 따라 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성이 조절되어 일어나는 능동적인 죽음이며, 그 과정을 통해 생성된 apoptotic body들은 주변의 세포들이나 대식세포 등의 식세포 작용에 의해 제거됨으로서 염증을 유발하지 않는다. 세포자멸사의 형태적, 생리적 특징으로는 cytoplasm shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation, DNA fragmentation, 세포막을 이루는 지질인 phosphatidylserine의 세포 외부로의 노출, apoptotic body의 형성 등이 보고되고 있다. 반면에 세포괴사는 수동적 죽음이며, 염색사의 불규칙한 응집과 세포질의 팽창과정을 거치게 되고, 최종적으로 세포들의 분해를 통해 세포파편이 생성되고 이들이 염증을 유발하게 된다<sup>49)</sup>.

세포자멸사 과정 중 생화학적인 변화는 형태적인 변화보다 먼저 일어난다. 즉, 양이온 의존적인 핵산 분해효소가 활성화되는 것이다. 이러한 핵산분해효소의 활성화는 특정한 유전자의 전사나 단백질 합성과는 관계없이 일어나는 것으로 알려져 있으며, 규칙적으로 DNA를 절편함으로써 DNA는 180~200 bp 크기의 절편을 형성하게 된다<sup>56)</sup>. 따라서 이것을 agarose gel 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하면 여러 개의 DNA fragmentation이 사다리꼴로 보이는 것을 관찰할 수 있으며, 세포괴사는 무작위적인 DNA fragmentation로 인해 전기영동 후에 도말 양상을 보이기 때문에 세포자멸사에서 일어나는 DNA fragmentation과 뚜렷하게 구별되어 세포자멸사의 가장 큰 특징이 된다<sup>57-8)</sup>.

三稜에 의한 자궁근종세포의 세포자멸사를 확인하기 위하여 DNA fragmentation을 조사하였다. 대조군에 비하여 三稜의 농도가 증가할수록 DNA fragmentation이 증가함을 관찰하여 三稜에 의한 증식억제 효과가 세포자멸사에 의한 것임을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

일반적으로 세포자멸사 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해효소에 의해 세포내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는 일련의 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포자멸사에 관여하는 것으로 보고되고 있다<sup>59)</sup>. Caspase들은 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들은 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase들 중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극

에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있으며, 활성화된 caspase-3는 세포내의 여러 종류의 기질 단백을 절단한다<sup>60</sup>. 최종적으로 활성화된 caspase-3는 poly(ADF-ribose) polymerase (PARP)를 활성화시켜 DNA fragmentation과 핵의 응축을 유도하면서 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>61</sup>.

이 실험에서도 三稜에 의한 자궁근종 세포의 세포자멸사가 caspase의 활성화로 인한 것인지 밝히기 위하여 Western blot analysis를 시행하였다. pro-caspase 3는 三稜을 처리한 실험군에서 농도에 비례하여 비활성화된 단백(32kDa)이 감소하였다. 비활성화된 pro-caspase 3의 양적 감소는 caspase-3의 활성도가 상대적으로 증가되었음을 의미하는 것이다. 아울러 세포자멸사 기전의 최종 단계라고 볼 수 있는 PARP 단백질의 활성도를 조사한 결과, 三稜의 처리 농도에 비례하여 활성화된 PARP 단백질(85kDa)의 발현이 증가됨을 관찰하였다(Fig. 6).

그러므로 三稜에 의한 사람 자궁근종 세포의 세포자멸사 기전은 세포자멸사와 직접적인 관계가 있는 caspase-3를 활성화시키면서 세포사멸에 대한 신호가 전달되는 것으로 판단된다. 이러한 세포자멸사 신호는 최종적으로 PARP 단백을 활성화시키면서 핵내 DNA fragmentation를 유도하고 이로 인하여 사람 자궁근종세포가 세포자멸사로 진행되는 것으로 생각된다.

결론적으로 三稜을 사람 자궁근종세포에 반응시켰을 때, 세포증식이 억제되었으며 그 기전은 세포주기 진행에 있어서 중요한 CDK4, cyclin A, cyclin D, cyclin E와 같은 positive regulator의 발

현을 감소시키고 세포주기 진행을 억제하는 p21, p53와 같은 종양 억제 단백질 발현을 증가시켜 나타나는 것으로 생각된다. 또한 三稜이 caspase-3의 활성도를 증가시켜 최종적으로 PARP 단백을 활성화시키고 DNA fragmentation을 유도해서 세포자멸사가 일어나는 것으로 생각된다.

## V. 結 論

三稜이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 三稜을 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 증식억제 효과, 세포자멸사와 관련한 세포주기 분석 및 유전자 분석을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 三稜을 처리한 24시간 후 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 50%의 증식억제 효과를 보였으며 농도에 비례하여 증식억제 효과는 증가하였다.
2. 三稜 처리 후 세포주기 분석을 시도한 결과, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 25.4%의 subG1 phase의 증가가 관찰되었으며 처리 농도에 비례하여 증가되었다.
3. 三稜 처리 후 세포주기에 관계하는 유전자 분석을 시도한 결과 p53, p21 단백질 발현은 처리 농도에 비례하여 증가하였고, p27, CDK2 단백질 발현 변화가 없었으며, CDK4 단백질은 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소를 보였다.
4. 三稜 처리 후 cyclin A, D 및 E는 농도에 비례하여 발현이 감소하였으며, pRb 단백질은 농도에 비례하여 탈인산화가 증가되었다.
5. 三稜 처리 후 세포자멸사의 특징인 DNA fragmentation이 처리 농도에 비

례하여 증가되었다.

6. 三稜의 처리 농도에 비례하여 pro-caspase 3 의 양적 감소가 관찰되었으며 활성화된 PARP 단백질의 발현은 증가하였다.

이상의 결과로 보아 三稜이 자궁근종의 치료에 있어서 유효한 치료 약물일 것으로 생각된다.

□ 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;175-83.
2. 한방부인과학 편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울:도서출판정담. 2002;308-13.
3. Babaknia A et al. Pregnancy success following abdominal myomectomy for infertility. Fertil Steril. 1978;30(6):644-7.
4. Hunt JE, Wallach EE. Uterine factors in infertility. Clin Obstet Gynecol. 1974;17(4):44-64.
5. 김동호 등. 자궁근종에 대한 임상 및 병리학적 연구. 대한산부인과학회지. 1994;37(6):1205-16.
6. 김평식 등. 자궁적출술 방법에 따른 임상적 고찰. 대한산부인과학회지. 2004;47(6):1191-8.
7. 이민용 등. Selective Estrogen Receptor Modulator에 의한 자궁근종의 증식 억제. 대한산부인과학회지. 2004;47(6):1071-9.
8. 박영선, 백승희. 鷄血藤의 Beta-sitosterol 성분이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사의 유도에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(1):181-91.
9. 김동철, 백승희. 失笑散이 자궁근종세포의 증식억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):29-42.
10. 이영림, 백승희. 少腹逐瘀湯이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):1-17.
11. 김동철 등. 香附子가 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):18-33.
12. 김윤근 등. 蟠蔥散이 자궁근종세포의 사멸과 Cell Apoptosis 에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):34-44.
13. 전미혜 등. 五積散이 자궁근종세포의 사멸과 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):45-55.
14. 김소연, 백승희. 膈下逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식과 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(4):1-16.
15. 김진희, 백승희. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP kinase 활성화에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2001;14(2):85-101.
16. 全國韓醫學大學 本草學教授. 本草學. 서울:영림사. 1991;418-9.

17. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:영림사. 1996;403-4.
18. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1977;883-7.
19. 吳儀洛. 本草從新. 北京:人民衛生出版社. 1990;38-9.
20. 汪昂. 本草備要. 서울:고문사. 1984; 54-5.
21. 唐宗海. 本草問答. 臺北:文光圖書有限公司. 1982:35-6.
22. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet*. 2001;357(9252):293-8.
23. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol*. 1990;94(4):435-8.
24. 정진국 등. 자궁근종에 관한 임상통계학적 고찰. *대한산부인과학회지*. 1998;41(1):210-9.
25. 박정규 등. 자궁근종에 관한 임상통계학적 연구. *대한산부인과학회지*, 2005;48(2):436-45.
26. Coutinho EM, Boulanger GA, Goncalves MT. Regression of uterine leiomyomas after treatment with gestrinone, an antiestrogen, antiprogestone. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;155(4):761-7.
27. Coutinho EM, Goncalves MT. Long-term treatment of leiomyomas with gestrinone. *Fertil Steril*. 1989;51(6):939-46.
28. Coutinho EM. Gestrinone in the treatment of myomas. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl*. 1989;150:39-46.
29. De Leo V, la Marca A, Morgante G. Short-term treatment of uterine fibromyomas with danazol. *Gynecol Obstet Invest*. 1999;47(4):258-62.
30. Murphy AA et al. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestone RU486: dose-response effect. *Fertil Steril*. 1995;64(1):187-90.
31. Palomba S et al. Raloxifene administration in premenopausal women with uterine leiomyomas: a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3603-8.
32. Palomba S et al. Effectiveness of combined GnRH analogue plus raloxifene administration in the treatment of uterine leiomyomas: a prospective, randomized, single-blind, placebo-controlled clinical trial. *Hum Reprod*. 2002;17(12):3213-9.
33. Palomba S et al. Does raloxifene inhibit the growth of uterine fibroids? *Fertil Steril*. 2004;81(6):1719-20.
34. 배은경, 이경섭, 송병기. 자궁근종의 한의학적 접근. *대한한방부인과학회지*. 1994;7(1):79-86.
35. 이선희, 정진홍, 유동렬. 징가의 처방에 대한 문헌적 고찰. *대전대학교 한의학연구소 논문집*. 1998;6(2):417-35.
36. 이극노, 박순달. 삼릉에 대한 문헌적 고찰. *동서의학*. 1995;20(2):36-56.
37. 梅全喜. 現代中藥藥理手冊. 北京:中國中醫藥出版社. 1998;495-9.
38. 蔡永民. 最新中藥藥理與臨床應用. 北京:華夏出版社. 1999;311-3.
39. 신숙정, 이정호. 삼릉, 황금, 살송편버섯 혼합추출물의 항종양 작용. *생약학회지*. 2004;35(4):324-9.
40. 김정균 등. 천연한약재(목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화효과 및 항균

- 활성효과. 농업생명과학연구. 2003;37(4):69-75.
41. 허수진, 이경섭, 송병기. 삼릉 및 봉술 약침의 진통, 항혈전효능에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):89-103.
  42. 최광수, 신형식. 홍화, 목단피, 삼릉이 치은섬유모세포와 치주인대세포에 미치는 영향. 원광치의학. 1997;7(2):171-84.
  43. Xi ZT et al. Experimental study on *Rhizoma sparganii* and *Radices zedoariae* treating hepatic fibrosis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2002;27(12):929-32.
  44. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 1993;73:1059-1065.
  45. DelSal G, Loda M, Pagano M. Cell cycle and cancer;critical events at the G1 restriction point. *Crit Rev Oncog*. 1996;7:127-42.
  46. 김승철. Cell cycle and Apoptosis. 이화여자대학교 의과대학 산부인과 교실 춘계심포지엄. 1998;23-42.
  47. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 1993;73(6):1059-65.
  48. Hartwell LH et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*. 1974;183(120):46-51.
  49. 이수재. Cell Cycle, Cell Death and Apoptosis. 제23차 대한핵의학회 연수교육, 2002;57-69.
  50. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 1996;15(4):381-93.
  51. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989;246(4930):629-34.
  52. Peters G. Cell cycle. Stifled by inhibitions. *Nature*. 1994;371(6494):204-5.
  53. Harper JW et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993;75(4):805-16.
  54. 나재형, 최호선. 자궁경부의 침윤암과 상피내종양에서 인유두종바이러스 감염과 p53 및 p21 유전자 변이. 대한암학회지. 2000;32(1):100-9.
  55. Kato J et al. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*. 1993;7(3):331-42.
  56. Tapanainen JS et al. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*. 1993;7(5):643-50.
  57. Wyllie AH et al. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*. 1984;142(1):67-77.
  58. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*. 1990;136(3):593-608.
  59. Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*. 1997;64(1):33-42.
  60. 정용근. 아폽토시스의 실행자: caspas

- e를 통하여. 유전 제2권. 1998;106-28.
61. Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*. 2002;7(4):321-8. Nicotera P., Regulation of Cell death: The calcium-Apoptosis link, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003;4:552-65.