

玄胡索이 자궁근종세포의 증식억제와 Apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

대구한의대학교 한의학과 부인과교실
이희재, 김동철, 백승희

ABSTRACT

Effect of *Corydalis Tuber* on the inhibition of proliferation of human uterine leiomyoma cell and apoptotic gene expression

Heejae Lee, Dongchul Kim, Seunghee Baek

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

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

Methods : We counted the number of survival cells treated with indicated concentration of *Corydalis Tuber* and investigated cell viability by MTS assay. Furthermore, flow cytometric analysis were used to dissect between necrosis and apoptosis related with cell cycle and then we observed the differential gene expression by western blot analysis.

Results :

- 1) The inhibitory effect on the proliferation of uterine leiomyoma cell treated with *Corydalis Tuber* was increased in a concentration and time proportional.
- 2) The result of flow cytometry analysis, subG1 phase arrest related cell apoptosis was not investigated in uterine leiomyoma cell treated *Corydalis Tuber* but showed G2/M phase prolongation.
- 3) The gene expression of p27, p21 related cell cycle was increased according to increasing concentration, but p53 was not exchanged.
- 4) The dephosphorylation of pRb gene were increased dependent on treatment concentration and pro-caspase 3, CDK4 were not exchanged.

Conclusion : This study showed that *Corydalis Tuber* have the inhibitory effect on the proliferation of human uterine leiomyoma cell but the effect was thoughted no relationship with apoptosis. The inhibitory effect was suggested that dephosphorylation of pRb gene induced with increasing p21, p27 prolonged cell division in G2/M phase.

Key words : uterine leiomyoma, cell apoptosis, *Corydalis Tuber*

I. 緒 論

자궁근종은 자궁평활근층내의 양성종양으로 생식연령에 있는 30~45세의 여성에서 호발하며, 악성종양으로의 변화는 0.5% 미만으로 가족력이 있는 질환으로 알려져 있다^{1,2)}.

자궁근종의 원인에 대하여 살펴보면 내인성 에스트로겐의 자극이 자궁근종의 성장인자로 알려져 있으며^{3,6)} 최근에는 인슐린유사 성장인자 (Insulin-like growth factor, IGF-I/IGF-II)와의 관련성⁷⁻¹¹⁾에 대한 연구가 보고되고 있지만 그 발생과 성장기전에 대하여 아직까지는 명확한 규명이 되어 있지 않는 실정이다.

자궁근종의 치료에 있어서는 전자궁적출술이 가장 일반적이며 그 외에 GnRH agonist의 사용, 근핵적출술, 자궁동맥전색술 등이 있으나 자궁적출술 이외는 확실한 대처방안이 없는 것이 현실이다. 여성 자궁적출술의 약 40%가 자궁근종에 의한 것으로 나타나고 있는데, 자궁적출술은 자궁근종 치료를 위한 근치적 치료법이지만 단순 자궁적출만으로도 여성으로서 건강한 느낌의 장애, 조기폐경 증상, 난소의 기능저하 등의 부작용이 나타날 수 있다^{1,2)}. 특히 우리나라에 있어서는 자궁을 단순히 임신이나 월경과 관계되는 생식기관으로만 간주하지 않고 여성의 생리를 전반적으로 주관하고, 대사와 활동력 및 정신 상태까지 조절해 주는 주요한 기관으로 인식하고 있다¹²⁻¹³⁾. 그러므로 폐경이 된 여성에 있어서도 자궁의 적출이 최선의 치료방법이 될 수는 없으므로 새로운 보존적인 치료방법의 개발이 필요하다.

따라서, 자궁근종에 대한 치료방법과 관련하여 유전자 치료법의 개발이 최근 활발히 진행되고 있으며 한의학에서는 한약처방이나 한약재를 이용한 자궁근종의 증식억제 효과와 유전자 발현에 대한 연구¹⁴⁻¹⁸⁾도 진행되고 있다.

玄胡索(Corydalis Tuber)은 罂粟科에 속하는 다년생 초본인 玄胡索의 근경이며 理氣活血之劑로서 氣味는 苦辛하고 性은 溫無毒하며 肝經과 胃經 등에 歸經하여 活血祛瘀, 理氣止痛하는 효능이 있어 한의학에서는 胸脇脘腹疼痛, 經閉痛經, 產後瘀阻 등의 제반 증상에 응용되고 있는 약물이다¹⁹⁻²³⁾.

玄胡索에 관한 실험적 연구로는 李²⁴⁾의 진통작용에 미치는 영향, 成²⁵⁾의 혈전증에 미치는 영향, 李²⁶⁾의 혈압 및 혈청에 미치는 영향, 文²⁷⁾의 지혈효과 및 적출 자궁근에 미치는 영향, 安²⁸⁾의 항경련, 항궤양 효과에 관한 연구 등이 보고되어 있다. 그러나 현호색이 자궁근종세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

이에 著者는 玄胡索이 자궁근종세포에 미치는 영향 및 그 기전을 알아보기 위하여 체외배양한 자궁근종세포에 현호색을 처리 한 후 자궁근종세포의 증식억제 효과, 세포주기 관련 유전자의 발현에 미치는 효과, 세포주기 분석, 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향에 대하여 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 玄胡索은 대구한의

대학교 부속한방병원에서 구입한 것을精選하여 사용하였다.

2) 檢液의 調製

실험에 사용된 약제는 일체의 가공이나 修治를 加하지 않는 상태에서 사용하였으며 玄胡索 80 g을 1차 증류수 1,300 ml를 첨가하여 2시간 30분 동안 증탕하여 검액 300 ml를 추출하였다. 추출한 검액을 100 ml이 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 한 뒤, -70°C 이하에서 24시간 이상 defreeze한 후 96시간 동안 완전히 동결 건조시켜 5.93 g의 粉末을 얻어 3차 증류수에 0.1 g/ml 농도로 용해시킨 후 상층액을 0.2 µm filter (Nalgene, USA)로 걸러서 실험을 실시하였다.

2. 實驗方法

1) 子宮筋腫 細胞의 일차 배양

자궁근종을 가진 환자의 전자궁 적출술시에 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 10예 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°C 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 serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 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 4×10³으로 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 µl multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 부유 된 후 well 당 100 µl 보유하도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 µl 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 玄胡索 검액을 농도별로 처리하였다. 세포를 24~48시간 배양시키고 PBS로 수세 후, $1 \times$ trypsin-EDTA로 재 부유시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리하였다. 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 부유 시킨 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 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색한 후 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

4) Western Blot analysis

玄胡索검액을 농도별로 처리 한 후 cyclin A, D, E, B1과 apoptosis에 관여하는 유전자인 p27, p53, p21, pRb, pro-caspase 3, CDK4 유전자 단백질 발현차이를 확인하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10mM 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, B1과 p27, p53, p21, pRb, pro-caspase 3, CDK4 (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 $1 \times$ PBS-T 용액(20 mM/L Tris, 137 mM/L NaCl, 0.5% Tween 20%)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. $1 \times$ PBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 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. 玄胡索의 자궁근종세포에 대한 증식 억제 효과

일차 배양된 자궁근종세포에 玄胡索 검액을 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 결과, 24시간 후 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 45%의 증식 억제 효과가 나타났으며 농도가 증가할수록 증식이 억제되었다(Fig. 1).

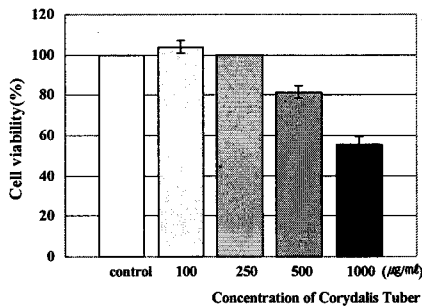


Fig. 1. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Corydalis Tuber* for 24hrs. Cell proliferation was determined using the cell count assay.

2. 玄胡索이 cell cycle에 미치는 효과

자궁근종세포에 대하여 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 현호색을 처리한 후 24 시간 후의 세포주기를 분석한 결과, S phase의 감소, G2/M phase의 연장으로 세포의 증식이 지연됨을 관찰하였다(Fig. 2)

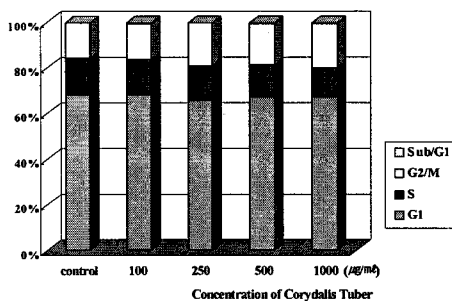


Fig. 2. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Corydalis Tuber* for 24hrs. Cell cycle profile were analyzed by FACS analysis. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

3. 玄胡索이 cyclin A, D, E, B1의 발현에 미치는 영향

자궁근종세포에 玄胡索 검액을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 별로 처리하고 24시간 후 발현을 관찰한 결과, cyclin B1의 발현이 감소하였으며 cyclin A와 cyclin D의 발현은 증가하였다(Fig. 3).

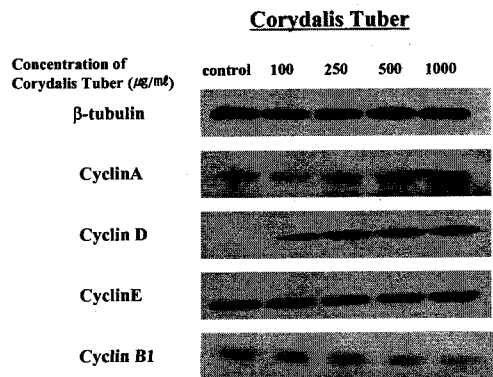


Fig. 3. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Corydalis Tuber*. Effect of *Corydalis Tuber* on cyclin A, D, E, B1 in uterine leiomyoma cells. β -tubulin was used as internal control.

4. 玄胡索이 p27, p53, p21 단백질 발현에 미치는 영향

현호색을 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 세포주기 관련 유전자 분석을 시도한 결과, p27, p21 단백질

발현은 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으며 p53은 변화가 없었다(Fig. 4).

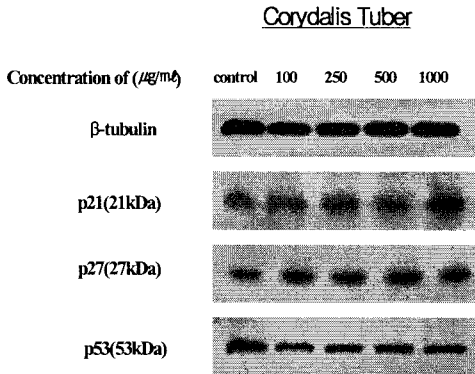


Fig. 4. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Corydalis Tuber*. Effect of *Corydalis Tuber* on p21, p27, p53 in uterine leiomyoma cells. β -tubulin was used as internal control.

5. 玄胡索이 pRb, pro-caspase 3의 발현에 미치는 영향

자궁근종세포에 현호색을 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 western blot으로 분석한 결과, pRb 단백질이 감소하여 탈인산화가 증가되는 것을 확인할 수 있었으며 pro-caspase 3와 CDK4는 특별한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 5).

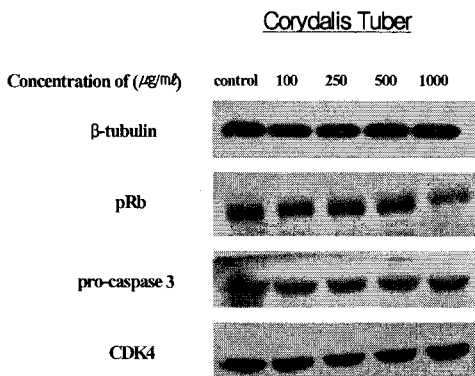


Fig. 5. Uterine leiomyoma cells were

treated with indicated concentrations of *Corydalis Tuber*. Effect of *Corydalis Tuber* was no changed on pro-caspase 3 and CDK4 but the gene of pRb was decreased in uterine leiomyoma cells. β -tubulin was used as internal control.

IV. 考 察

자궁근종은 부인과 영역에서 가장 흔한 양성종양의 하나로 모든 생식 연령의 여성의 20% 이상에서 볼 수 있는 질환으로 단세포군(monoclon)의 형태로 자궁근종에서 기원하여 자궁의 평활근 세포에 위치한다²⁹⁻³⁰. 자궁근종의 부피는 세포외기질(extracellular matrix)의 합성과 세포증식 및 혈관 형성에 관련이 있으며³¹, 자궁근종에 대한 병인론에 대해서는 아직 명확한 기전이 설명되지 않은 상태로 에스트로젠과 프로게스테론에 의해 성장하고, GnRH-agonist (Gonadotropin Releasing Hormone agonist)를 사용했을 경우 저에스트로젠 상태를 유발하여 종양이 위축된다는 보고가 있다³²⁻⁴.

자궁근종의 원인과 치료에 대한 연구로는 호르몬과 관련하여 progesterone receptor blocker인 RU-486에 대한 치료 효과, GnRH antagonist, angio-inhibitor의 효과에 대한 보고가 있으며³⁵ 폐섬유증의 치료제로 시험하고 있는 항섬유제인 pirfenidon을 이용한 자궁근종의 세포증식 및 collagen 생성을 억제하였다는 보고도 있다³⁶. Nowak 등³⁷⁻⁸은 성장 인자가 자궁근종 세포의 증식 및 collagen 이나 혈관 등을 자극하여 자궁근종이 증식한다고 생각하고 이런 성장

인자를 차단함으로써 치료 약제로서의 가능성을 연구하고 있다.

韓醫學에서는 자궁근종을 여성생식에 발생하는 종양질환인 癥瘕의 범주로 보고 있으며³⁹⁻⁴⁰⁾ 癥瘕의 원인으로는 外感寒邪, 七情, 痰, 食積, 死血, 正氣虛 등과 관련이 있으며 그 중 瘀血을 가장 중요한 원인으로 인식하여 活血祛瘀藥 위주의 처방이나 약물이 다용되고 있다⁴¹⁾.

玄胡索(Corydalis Tuber)은 罂粟科에 속하는 다년생 초본인 玄胡索의 근경이며 理氣活血之劑로서 氣味는 苦辛하고 性은 溫無毒하며 肝經과 胃經 등에 歸經하여 活血祛瘀, 理氣止痛하는 효능이 있어 한의학에서는 胸脇脘腹疼痛, 經閉痛經, 產後瘀阻 등의 제반 증상에 응용되고 있는 약물이다¹⁹⁻²³⁾.

이러한 현호색의 효능 및 주치에 근거하여 임상에서는 여성의 생식기에 생기는 종양 질환이 자궁근종에 대하여 많이 응용되고 있는 바 본 연구에 있어서는 현호색이 자궁근종세포의 증식억제 효과에 관하여 실험적인 연구를 실시하였다.

먼저 배양된 자궁근종세포에 현호색을 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 후 24시간이 지난 후의 세포를 회수하여 세포 생존률을 측정된 결과, 처리한 현호색의 농도가 높을수록 증식이 억제되었으며 현호색의 농도가 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 45% 증식억제가 관찰되었다(Fig. 1).

세포주기는 유사분열 각 단계의 적절한 시기(timing)를 결정하는 일련의 checkpoint들에 의해 조절되어 진다. 또한 부가적으로 checkpoint는 염색체의

움직임을 용이하게 하는 미세소관의 정교한 network의 부착과 조립뿐만 아니라 DNA합성의 정교함을 조절하고 감시한다⁴²⁾. 세포주기에는 2개의 check point가 있는데 G1 check point와 G2 check point가 있다. G1 check point에서는 세포가 G1기에서 S기로 넘어갈지의 여부가 결정되는 시기로 세포가 성장과정을 지속할 것인지, 세포분화과정으로 들어갈 것인지를 결정하는 시기이다. G2 check point는 세포가 G2기의 상태에서 세포질이 충분히 형성되었다면 세포분열이 일어나는 M기로의 진행여부가 결정되어 진다. 만약, 이러한 과정이 원활하지 못하다면 세포는 G2기에서 세포주기가 멈추게 된다⁴³⁾.

최근 들어 이러한 세포주기 조절에 관여하는 많은 유전자들이 발견되었고 그 유전자 산물들 간의 분자생물학적 조절 기전이 급속히 밝혀지고 있어서, 의학 및 생물학의 많은 연구 분야 중에서도 최대의 관심분야 중 하나가 되고 있으며, 그 중에서도 G1 phase로 이행되도록 결정하는 과정인 G1 checkpoint 조절에 대한 분자생물학적 연구가 대단히 활발하게 진행이 되고 있다. 왜냐하면 세포가 S phase로 들어가서 증식을 할 것인지, G1 phase에 머무르면서 분화할 것인지, 아니면 DNA 손상이나 기타의 장애가 너무 심해서 세포자멸사로 죽을 것인지 여부가 주로 이 단계에서 결정이 되기 때문이다⁴⁴⁾.

앞의 실험을 통하여 현호색이 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 효과를 확인하였으므로 현호색이 cell cycle에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁근종세포에 현호색을 100, 250, 500, 1000 μg

/ml의 농도별로 처리하고 24시간 후 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과 SubG1기의 세포정지는 없었으며 G2/M기의 연장을 보이고 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 이것으로 보아 자궁근종세포의 증식억제에 대한 현호색의 효과는 G2/M기의 연장으로 인한 세포분열억제 작용에 기인한 것으로 사료된다.

다음 단계로서 각 주기별로 담당하는 cyclin 들의 발현증가에 대한 관찰을 시행하기 위하여 玄胡索을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 처리하고 24시간 후 cyclin A, cyclin D, cyclin E 및 cyclin B1 단백 발현을 알아본 결과, cyclin B1의 발현이 감소하여 G2/M기의 연장에 의한 증식억제효과가 나타난다는 것을 보여주었으며 cyclin A와 cyclin D는 발현이 증가하였으나 큰 의미가 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

세포의 주기를 정확히 조절하기 위해서 세포는 cyclin이나 CDK같은 positive regulator 이외에도, CDKI(cyclin dependent kinase inhibitor)들을 가지고 있으며 이들은 cyclin-CDK 복합체의 CDK 활성을 저해하여 세포주기를 조절하는 negative regulator로서 필수적인 인자들로 한 종류는 p21^{clP1} family(p27, p57, p21) 등이며 다른 한 종류는 p16^{INK4a} family(p15, p16, p18, p19, p20) 등이다^{44,45}).

위의 실험에서 세포주기 분석을 통하여 G1 phase arrest는 확인되지 않았으나 이러한 세포증식억제의 결과가 어떠한 유전자의 발현과 관계가 있는 것인지를 관찰하기 위하여 세포주기관련 유전자인 p21, p27, p53에 대하여 western

blot 분석을 실시하였다.

먼저 현호색을 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 조정하면서 24시간 후 세포로부터 단백질을 추출한 후 western blot 분석을 통하여 위의 단백질을 분석한 결과 p21, p27의 농도가 높아질 수록 현저한 증가를 보였으며 p53 단백질의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 4).

이 결과로 보아 세포주기조절에 관여하는 CDKI인 p21, p27은 p53과 관계없이 독립적인 방식으로 그 발현이 증가됨을 알 수 있다. 그러나, 이러한 p21, p27의 증가는 직접적으로 CDK의 활성화를 저해하여 G1 phase arrest를 유발하는데 관여하여 세포자멸사를 일으키는 기전을 유도하는 것은 아닌 것으로 생각되며 G2/M기에 있어서 세포주기의 연장이라는 결과를 가져오는 것에 관여함으로써 자궁근종세포의 증식을 억제하는 것으로 생각된다. 또한, 이는 처리한 현호색의 농도가 증가할 수록 세포 증식을 억제하는 비율이 증가하는 것으로 생각된다.

위의 결과에서 이러한 증식억제가 세포자멸사인지 또 다른 기전에 의한 것인지를 명확하게 규명하기 위하여 세포자멸사에 관여하는 pro-caspase 3와 전사조절인자에 관여하는 pRb 단백질 및 CDK4를 western blot으로 분석하였다.

그 결과 pro-caspase는 아무런 변화도 보이지 않는 것으로 보아 위의 증식억제 기전은 세포자멸사와는 무관한 것으로 생각되며 pRb유전자의 발현은 농도가 증가할 수록 감소되어 탈인산화가 증가되는 것을 확인 할 수 있었으며 또한, CDK4는 별다른 변화를 보이지 않았다(Fig. 5).

현재까지 수많은 세포자멸사 관련 유전자가 알려져 있는데, 그 중에서도 공통적인 경로는 단백질 분해 효소의 활성화와 관련이 깊음이 알려져 있다. 특히 시스테인계 단백질 분해 효소인 caspase가 발견되면서 세포자멸사 기전의 중심적인 요소로 여겨지고 있다⁴⁶⁾. caspase들은 항상 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들은 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase 중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 caspase-3는 세포내의 여러 종류의 기질 단백을 절단한다⁴⁷⁾. 이러한 결과로 세포자멸사가 유도되는데 본 실험에서는 caspase-3의 활성화도에 아무런 변화가 없는 것으로 보아 세포자멸사와는 무관한 것으로 밝혀졌다. 또한, Fig. 4에서의 p21의 증가가 CDK4의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 보아 이는 G1 check point에서는 세포증식이 억제되는 것이 아니라는 것을 알 수 있었으며 이는 pRb 단백질의 탈인산화가 증가하는 결과를 유도하는 것으로 생각된다. 결과적으로 pRb 단백질의 탈인산화 증가는 전사조절인자들의 활성화를 억제하여 세포가 분열하는 것을 억제하는 것으로 생각된다.

위의 실험을 통하여 확인된 현호색의 자궁근종세포에 대한 효과는 G2/M 세포주기의 연장을 통한 자궁근종세포의 증식을 억제하는 효과가 있으며 증식억제 효과는 apoptosis에 의한 세포자멸사는 아닌 것으로 생각되며 G2/M기에 있어서 pRb 단백질의 탈인산화 증가로 인한 세포분열의 지연에 따른 결과로 생각된다.

V. 結 論

현호색이 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현호색을 농도별로 처리한 후 증식억제 효과 및 apoptosis 관련 세포주기 분석 및 세포주기관련 단백질 분석을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 玄胡索을 농도별로 처리한 자궁근종 세포는 농도가 증가할수록 증식 억제 효과가 크게 나타났으며 1000 µg/ml 농도에서 45% 증식억제가 관찰되었다
2. 세포주기 분석을 시도한 결과, G2/M의 연장을 보여 세포증식 억제효과가 나타났다.
3. 玄胡索을 농도별로 처리한 후 세포주기 관련 단백질발현을 관찰한 결과, cyclin B1의 발현이 감소하였으며 p21, p27의 발현이 증가하였다.
4. 현호색을 농도별로 처리한 후 pRb 단백질의 탈인산화가 증가되었으며 procaspase-3, CDK4는 특별한 변화가 나타나지 않았다.

□ 투 고 일 : 2006년 04월 28일

□ 심 사 일 : 2006년 05월 01일

□ 심사완료일 : 2006년 05월 09일

參 考 文 獻

1. 조현희 등. 자궁적출시 부속기절제 유무에 따른 성호르몬의 변화. 대한산부회지. 2001;44:2283-8.
2. Culter WB, Genovese SE. Wellness in women after 40 years of age; the rol

- e of sex hormones and pheromones. *Dis Mon.* 1998;44(9):421-546.
3. Rein MS et al. Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin releasing hormone agonist leuprolide acetate. *Fertil Steril.* 1990;53:1018-23.
 4. Lumsden MA, West CP, Baird DT. Goserelin therapy before surgery for uterine fibroids. *Lancet.* 1987;1:36-7.
 5. Ross RK et al. Risk factors for uterine fibroids: Reduced risk associated with oral contraceptives. *Br Med J.* 1986;293:359-62.
 6. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996;392:49-53.
 7. 김기철, 김정구, 이진용. 성선자극호르몬 유리호르몬 협동제로 전처치된 자궁근종내 인슐린양 성장인자 및 그 결합단백의 양상에 관한 연구. 대한내분비학회지. 1997;12:364-75.
 8. 김정구 등. 자궁근종조직내 인슐린 유사 성장인자(IGF)-Ia, IGF-Ib, IGF-II 전령리보핵산 발현양상. 대한산부회지. 1999;42:777-83.
 9. 김정구 등. 17 β -estadiol이 배양된 인간 자궁근종조직과 정상자궁근조직에서 인슐린 유사 성장인자들과 그 결합단백질들의 mRNA 발현 및 인슐린 유사 성장인자들의 분비에 미치는 영향. 대한산부회지. 1998;41:1575-85.
 10. Kim JG et al. Decreased expression of mac25 mRNA in uterine leiomyoma compared with adjacent myometrium. *Am J Reprod Immunol.* 2000;43:53-7.
 11. 임경실, 김정구. 자궁근종조직 및 정상자궁근조직에서 에스트로겐 수용체 알파, 베타 및 인슐린 유사 성장인자 결합단백질 관계 펩티드-1 전령리보핵산의 발현양상. 대한산부회지. 2002;45:391-7.
 12. 노영숙 등. 한국여성에서의 자궁의 전통개념에 대한 기초적조사연구. 대한산부회지. 1985;29:973- 85.
 13. 이은지 등. 근치적자궁적출술을 시행한 여성의 삶의 질. 대한산부회지. 2001;44:1761-8.
 14. 김진희, 백승희. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP kinase 활성화에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2001;14(2):85-101.
 15. 이인호 등. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 증식 억제에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):12-24.
 16. 김소연, 백승희. 膈下逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식과 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(4):1-16.
 17. 이영림, 백승희. 少腹逐瘀湯이 자궁근종세포의 성장 억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):1-17.
 18. 김동철 등. 香附子가 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):18-33.
 19. 전국한의학대학교본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1991;180, 195, 336, 353, 578, 401, 412, 540.
 20. 辛民敎. 臨床本草學. 서울:永林社. 1986;470-1.

21. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院.1981;410-2.
22. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1979;605-7.
23. 陸昌洙. 韓國藥品植物資源圖鑑. 서울:進明出版社. 1981;157-9.
24. 李丙天. 玄胡索水鍼이 鎮痛作用에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 1991.
25. 成日煥. 玄胡索, 當歸尾水鍼이 Endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 1993.
26. 李惠景. 夏枯草, 玄胡索, 甘菊 複方水鍼이 自發性高血壓 흰쥐의 血壓 및 血清에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 1993.
27. 문영식. 玄胡索 煎湯液이 實驗動物의 鎮痛, 止血效果와 摘出子宮筋에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1990.
28. 안현석. 玄胡索 藥鍼刺戟이 鎮痛, 抗痙攣 및 抗潰瘍 效果에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 1994.
29. Buttram VC Jr, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril.* 1981;36:433- 45.
30. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol.* 1990;94:435-8.
31. Huang SC et al. Intratumoral blood flow in uterine myoma correlated with a lower tumor size and volume, but not correlated with cell proliferation or angiogenesis. *Obstet Gynecol.* 1996 Jun;87(6):1019-24.
32. Brandon DD et al. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:1876-81.
33. Vu K et al. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum Pathol.* 1998;29:359-63.
34. Shozu M et al. Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuprorelin acetate. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5405-11.
35. Murphy AA et al. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogesterone RU486 : dose- response effect. *Fertil Steril.* 1995 Jul;64(1):187-90.
36. Lee BS, Margolin SB, Nowak RA. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:219-23.
37. Nowak RA. Novel therapeutic strategies for leiomyomas: targeting growth factors and their receptors. *Environ Health Perspect.* 2000;108(5):849-53.
38. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor-beta 3 (TGF-beta 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF beta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:913-20.
39. 金相佑 등. 癥瘕患者에 對한 臨床的 考察. 대한한방부인과학회지. 1992;4(1): 2-8.
40. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:杏林出版社. 1978;249-257.
41. 李熙祥, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 癥瘕의 治方

- 에 對한 文獻的 考察. 대전대학교 한
의학연구소 논문집. 1998;6(2):417-35.
42. 김승철. Cell cycle and Apoptosis. 이
화여자대학교 의과대학 산부인과 교실
춘계심포지엄. 1998;23-42.
43. 朴贊烈 등. 細胞週期の 概要 및 遺傳
因子の 分子生物學 檢査 技法에 對한
考察. 大韓鍼灸學會誌.1999;16(4):165-74.
44. Thompson & Thomson 의학유전학
편찬위원회. 의학유전학. 서울:정담.
2002;6.
45. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apopt
osis. 계명의대논문집. 1996;15(4):381-93.
46. Kamesaki H. Mechanism involved i
n chemotherapy induced apoptosis a
nd their implications in cancer chem
otherapy. *Int J Hematil.* 1998;68:29-43.
47. 정용근. 아포토시스의 실행자 : caspas
e를 통하여. 유전 제 2권. 1998;106-28.