

鷄血藤이 子宮筋腫細胞의 増殖抑制 및 세포자멸사에 미치는 영향

대구한의대학교 부인과교실

이화경, 김동철, 백승희

ABSTRACT

The Effect of *Millettia Reticulatas* on the Proliferation Inhibition of Human Uterine Leiomyoma Cell and Expression of Apoptosis

Hwakyung Lee, Dongchul Kim, Seunghee Baek
Dept. of gynecology, College of Oriental Medicine,
Daegu Haany University

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

Methods : We counted the number of death cells treated with indicated concentration of *Millettia Reticulatas* and investigated cell death rate by MTS assay. Furthermore, flow cytometry 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 *Millettia Reticulatas* was increased in a concentration proportional.
2) The result of flow cytometry analysis, subG1 phase arrest related3 cell apoptosis was investigated 23.49% in uterine leiomyoma cell treated *Millettia Reticulatas* and showed the fession of proportional concentration.
3) The gene expression of p27, p53, p21, p16 related cell cycle was increased according to increasing concentration but cyclin E was none exchanged.
4) The character of apoptosis, DNA fragmentation was significantly observed the fession of proportional concentration.
5) The expression of pro-caspase3 and PARP were decreased dependent on treatment concentration.

Conclusion : This study showed that *Millettia Reticulatas* have the inhibitory effect on the proliferation of human uterine leiomyoma cell and the effect was related with apoptosis. The apoptotic mechanism was observed that the gene expression of p27, p53, p21, p16 related cell cycle was increased according to increasing treatment concentration, induced G1 phase arrest and finally cell death was occurred. The decreased expression of pro-caspase 3 and PARP were noted that apoptosis was related with caspase pathway.

Key words : *Millettia Reticulatas*, uterine leiomyoma, apoptosis

I. 緒論

자궁근종은 평활근 기원의 양성종양으로, 가임기 여성의 약 25%정도에서 발생하며 약 20~50%에서 부정성기출혈, 골반통, 압통, 불임, 자연유산 등을 유발하나 증상의 정도는 종양의 수, 크기, 위치 등에 따라 다양한 양상을 나타낸다¹⁻³⁾.

자궁근종의 치료법으로는 자궁적출술이 보편적으로 시술되고 있으며, 자궁적출술 이외의 치료방법으로는 근종제거술과 약물요법 등이 있다. 근종제거술의 경우 51%에서 재발의 위험이 있으며⁴⁻⁵⁾ GnRh-a 투여와 같은 호르몬요법은 골다공증이나 고콜레스테롤혈증 및 심혈관장애 등의 부작용을 유발할 수 있어 장기간의 사용이 어려울 뿐만 아니라 약물 사용을 중단한 후에는 근종의 크기가 오히려 더 커지는 경향이 있어 근치적 요법으로는 적합하다고 할 수 없다⁶⁻⁹⁾.

자궁근종은 estrogen 의존성 종양으로 지금까지 알려진 원인인자로 estrogen과 progesterone 수용체의 증가¹⁰⁻¹¹⁾, bcl-2 단백질의 증가¹²⁾, transforming growth factor β ¹³⁾, heparin-binding growth factors¹⁴⁾, Insulin-like growth factors¹⁵⁾ 등에 대한 보고가 있으며, 최근 Baek¹⁶⁾ 등은 자궁근종에서 cyclin G1의 발현이 증가되었다고 보고하여 세포주기에 관여하는 유전자의 과발현이 자궁근종의 발생에 중요한 인자로 작용한다는 것을 보고하였다.

자궁근종과 관련하여 유전자 치료법의 개발이 최근 활발히 진행되고 있으며 한약처방이나 한약재를 이용한 증식억제 효과와 유전자 발현에 대한 연구¹⁷⁻²¹⁾도 진행되고 있다.

鷄血藤은 補血行血, 活血祛瘀의 效能이 있어 貧血, 月經不調, 痛經, 血虛經閉 등의 月經病에 주로 사용되는 藥物이다²²⁻⁴⁾.

鷄血藤에 대한 실험적 연구로는 막지질 조성변화²⁵⁾, HIV-1 protease 활성 억제²⁶⁾, 항염 활성 효과²⁷⁾, 조혈 및 면역작용²⁸⁾, 종양전이 억제효과²⁹⁾, 활막세포에 대한 면역반응³⁰⁾, 세포주기 억제 효과³¹⁾ 등이 보고되어 있으나, 鷄血藤이 자궁근종에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

이에 著者は 鷄血藤의 자궁근종에 대한 효과를 실험적으로 규명하기 위하여 체외배양 한 자궁근종세포에 鷄血藤을 처리 한 후 자궁근종세포의 증식억제 효과, 세포주기 관련 유전자의 발현에 미치는 효과, 세포주기 분석, 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향에 대하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 藥材

콩과(Leguminosae)에 속하는 密花豆(Spatholobus suberectus Dun)의 작은 가지인 鷄血藤(*Millettia Reticulatas*)은 대구한의대학교 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 鷄血藤 40g에 1차 증류수 2000ml를 첨가하여 2시간 30분 동안 증탕하여 검액 300ml를 추출하였다. 추출한 검액을 100ml가 되도록 rotary vacuum evaporator에서

감압 농축 한 뒤, -70°C 이하에서 24시간 이상 defreeze한 후 96시간 동안 완전히 동결 건조시켜 13g의 粉末을 얻어 3차 증류수에 0.1g/ml 농도로 용해시킨 후 상층액을 $0.2\mu\text{m}$ filter (Nalgene, USA)로 걸러서 실험에 사용하였다.

2. 方法

1) 자궁근종 세포의 배양

자궁근종을 가진 환자의 전자궁 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 환자들로 하였으며 적출한 자궁의 자궁내막 주기는 총 10例 중 증식기 5例, 분비기 5例로 하였다. 일차배양은 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단 한 후 15ml 튜브에 옮기고 1000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액은 제거하였다. 이어 절단한 조직에 HEPES (25mmol/l), penicillin (200U/ml), streptomycin ($200\mu\text{g/ml}$), collagenase type IV (1.5mg/ml), DNase (0.2mg/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 배

양액에서 부유시킨 후 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 근육 세포인지를 확인하였다.

2) 생존세포수의 산정

자궁근종 세포를 60mm tissue culture dish 에 2×10^5 cell/dish로 세포를 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 lipofectamine을 이용하여 鷄血藤 검액을 처리한 후 transfection 시켰다. 이렇게 배양시킨 세포를 24~48시간 PBS 용액으로 수세 후, $1 \times$ trypsin-EDTA로 재 부유 시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 수세하여 재 부유 시킨 후, cell suspension $20\mu\text{l}$ 와 동량의 trypan blue 용액을 혼합하여 1분간 방치해 두었다. Hemacytometer 상에서 3회 반복하여 살아있는 세포수 만을 계산하였다.

3) 자궁근종세포의 증식억제 검사 (MTS assay)

자궁근종 세포를 multi pipet을 사용하여 96 well plate에 4×10^3 으로 분주하였다. 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 시약을 처리하고 MTS 측정 시, one solution reagent(-20°C 에 보관)를 실온에 90분 또는 37°C 에 10분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media $200\mu\text{l}$ multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 부유 된 후 well 당 $100\mu\text{l}$ 보유하도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 $20\mu\text{l}$ 넣고 37°C , 5% CO_2 배양기에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS를 측정하였으며 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를

측정하였다.

4) Flow cytometric analysis

자궁근종 세포를 60mm tissue culture dish에 3×10^5 cells/dish로 세포 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 후 대조군과 鷄血藤 검액을 농도별로 처리하였다. 세포를 24~48시간 배양시키고 PBS로 수세 후, $1 \times$ trypsin-EDTA로 재 부유 시킨 뒤, 1.5ml tube에 옮기고 1000 rpm 으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 재 부유시킨 뒤 1000 rpm 으로 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1ml를 넣고 재 부유 시킨 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 5mg/ml, propidium iodide (Sigma, MO, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색한 후 유세포분석기 (FACS)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

5) DNA fragmentation analysis

자궁근종 세포에 鷄血藤 검액을 처리한 후 10mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 5mM EDTA와 0.5% Triton X-100이 든 완충액을 얼음에 30분간 용해시켰다. 용해된 용해질을 충분히 혼합한 후 10,000 rpm 으로 20분간 원심분리 하였다. 상층액에 분절된 DNA를 동일한 양의 neutral phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25:24:1)로 추출 한 뒤, $0.1 \mu\text{g/ml}$ ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에 전기영동 한 후 관찰하였

다.

6) Western Blot analysis

鷄血藤 검액을 농도별로 처리 한 후 cyclin E 및 cell apoptosis에 관계하는 p27, p53, p21, p16, pro-caspase 3, PARP 유전자 단백질의 발현차이를 확인 하고, 세포주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10mM Tris-Cl(pH 7.4), 5mM EDTA(pH 8.0), 130mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2M 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 595nm에서 흡광도를 측정 하여 단백질을 정량 하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, Bedford, UK)로 전기이동(electrotransfer)을 시행 하였다. 전기이동 된 막을 blocking용액(5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체인 p27, p53, p21, p16, cyclin E, PARP (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실은)에 3시간 동안 반응시킨 후 $1 \times$ TBS-T 용액(20mmol/l Tris, 137mmol/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 반응 시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, NJ, USA)로 검출하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 鷄血藤의 자궁근종세포에 대한 증식 억제 효과

鷄血藤에 의한 자궁근종세포의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 먼저 자궁근종에서 분리하여 일차 배양된 세포를 smooth muscle actin 항체를 이용한 면역조직화학염색을 실시한 결과 대부분이 양성반응을 나타내어 일차배양세포가 이들 조직에서 자란 평활근 세포임을 확인하였다(Fig. 1).

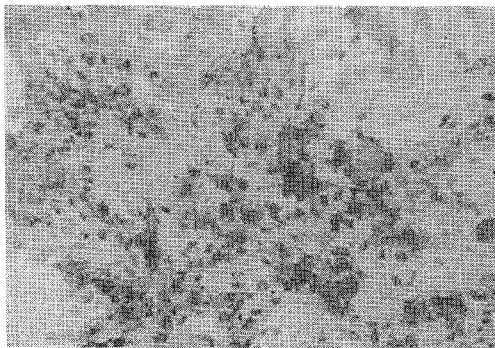


Fig. 1. Immunohistochemical staining of smooth muscle actin in primary cultured leiomyoma cells. Notice specific and strong positive staining of smooth muscle cells (original magnification, ×200).

일차배양된 자궁근종세포에 鷄血藤을 농도별로 처리한 결과 24시간 후의 세포 증식 억제효과는 농도가 증가할수록 증가하였으며, 300 μ g/ml 에서는 65%의 증식이 억제되었다(Fig. 2).

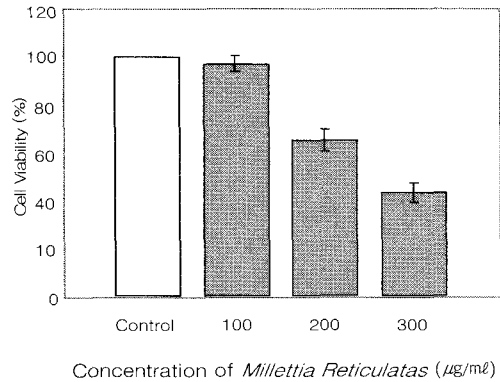


Fig. 2. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Millettia Reticulatas* for 24hr. Cell proliferation was determined using the cell count assay.

2. 鷄血藤이 cell cycle에 미치는 효과

자궁근종세포에 鷄血藤을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기를 분석한 결과 대조군은 subG1이 1.07%로 나타났으나 鷄血藤은 300 μ g/ml 농도에서 23.49%의 subG1기의 지연이 확인되어 세포자멸사의 量的 증거를 확인하였고 농도의 증가에 따라 subG1의 연장이 증가됨을 관찰하였다(Fig. 3).

	Control	100 μ g/ml	200 μ g/ml	300 μ g/ml
sub G1	1.07	1.69	6.85	23.49
G1	56.8	60.57	58.45	46.80
S	7.8	4.55	3.88	5.00
G2/M	33.58	32.03	30.53	24.52

Fig. 3. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Millettia Reticulatas* 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. 鷄血藤의 p27, p53, p21, p16 및 cyclin E 유전자에 대한 효과

자궁근종세포에 鷄血藤을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 cell cycle에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p27, p53, p21, p16 유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 cyclin E는 발현 변화가 없었다(Fig. 4).

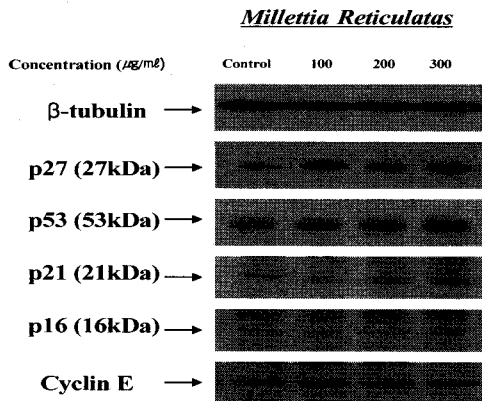


Fig. 4. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Millettia Reticulatas*. Effect of *Millettia Reticulatas* on p27, p53, p21, p16 and cyclin E protein in uterine leiomyoma cells. β -tubulin was used as internal control.

4. 鷄血藤의 세포자멸사 유도 효과

자궁근종세포에 鷄血藤을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 DNA fragmentation을 분석한 결과, 대조군에 비하여 鷄血藤의 농도가 증가할수록 DNA의 분절현상이 증가함을 관찰하였다(Fig. 5).

Millettia Reticulatas

Concentration (μ g/ml) M C 100 200 300

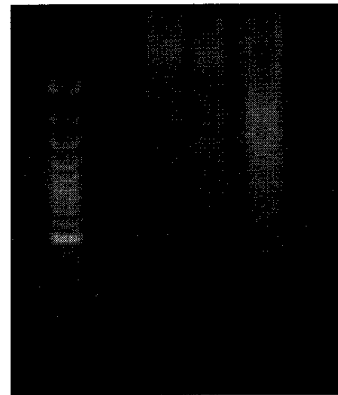


Fig. 5. To analyze fragmentation of genomic DNA, cells were treated for 24hr with control and *Millettia Reticulatas*.

5. 鷄血藤의 pro-caspase 3와 PARP 유전자에 대한 효과

자궁근종세포에 鷄血藤을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3, PARP 유전자의 발현을 측정된 결과, 鷄血藤의 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 PARP는 농도가 증가할수록 발현이 감소하며 PARP cleavage는 농도가 증가할수록 발현이 증가됨을 관찰하였다(Fig. 6).

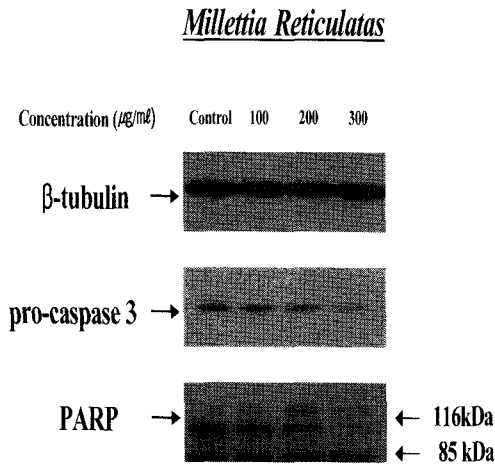


Fig. 6. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Millettia Reticulatas*. Effect of *Millettia Reticulatas* on pro-caspase 3 and PARP protein in uterine leiomyoma cells. β -tubulin was used as internal control.

IV. 考察

자궁근종은 자궁 및 여성의 골반강 내에서 발생하는 평활근 기원의 양성종양으로^{1,2,6)}, 가임기 여성의 약 25% 정도에서 발생된다. 자궁근종의 약 20~50%에서 부정 성기출혈, 골반통, 압통, 불임, 자연유산 등이 유발되며, 이러한 증상의 정도는 종양의 수, 크기, 위치 등에 따라 다양한 양상을 나타낸다¹⁻³⁾.

자궁근종의 치료법으로는 자궁적출술이 보편적으로 시술되고 있으며^{4,5)}, 자궁적출술 이외의 치료법으로는 근종제거술과 GnRh-a 등의 호르몬제제 투여와 같은 약물요법이 있으나 약물요법에 있어서 투여 중단 이후에는 근종의 크기가 오히려 더 커지는 등의 부작용이 있어 현재까지는 자궁근종에 대한 치료로서

한계를 가지고 있다^{6-9,32-3)}.

자궁근종의 원인과 치료에 대한 연구로는 호르몬과 관련하여 progesterone receptor blocker 인 RU-486에 대한 치료 효과, GnRH antagonist, angio-inhibitor의 효과에 대한 보고가 있으며³⁴⁾ 폐섬유증의 치료제로 시험하고 있는 항섬유제인 prifenidon을 이용하 자궁근종의 세포 증식 및 collagen 생성을 억제하였다는 보고도 있다³⁵⁾. Nowak 등³⁶⁻⁷⁾은 성장인자가 자궁근종 세포의 증식 및 collagen이나 혈관 등을 자극하여 자궁근종이 증식한다고 생각하고 이런 성장 인자를 차단함으로써 치료 약제로서의 가능성을 연구하고 있다. 또한 유전인자에 대한 연구로 Baek¹⁶⁾ 등이 세포주기에 관여하는 유전자의 과발현이 자궁근종의 발생에 중요한 인자로 작용한다는 것으로 자궁근종의 유전적인 원인에 대하여 보고하였다. 유전자 치료법은 현재까지는 생체 외 실험단계에 있으며 향후 자궁근종의 치료에 효과적일 것으로 기대되고 있어 연구가 지속적으로 진행 중이다.

韓醫學에서는 자궁근종을 여성생식에 발생하는 종양질환인 癥瘕의 범주로 보고 있으며³⁸⁻⁹⁾ 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 있다⁴⁰⁾.

실험에 사용된 鷄血藤은 콩과(Leguminosae)에 속하는 密花豆(Spatholobus suberectus Dun)의 작은 가지를 약으로 사용하는 것으로 汁液이 마치 닭의 피와 흡사하다고 해서 鷄血藤이라 불린다⁴¹⁻²⁾.

鷄血藤(Mucunae Caulis)은 明代 《本

草綱目拾遺⁴³⁾》에 최초로 수록된 약물로서 性味는 苦, 微甘, 溫, 無毒하고, 歸經은 肝, 腎經이며 補血行血, 舒筋活絡의 效能이 있어 貧血, 月經不調, 痛經, 血虛經閉, 風濕痺痛, 關節酸痛, 肢體癱瘓 등을 치료하는데 사용되어 왔으며 活血祛瘀하며 行血補血하는 작용이 주된 藥物이다²²⁻⁴⁾.

鷄血藤에 대한 實驗的 研究로는 막지질 조성변화²⁵⁾, HIV-1 protease 활성 억제²⁶⁾, 항염 활성 효과²⁷⁾, 조혈 및 면역작용²⁸⁾, 종양전이 억제효과²⁹⁾, 활막세포에 대한 면역반응³⁰⁾, 세포주기 억제 효과³¹⁾ 등이 보고되어 있으며 癥瘕나 자궁근종의 處方에 관한 연구¹⁷⁻²¹⁾는 다수가 있으나 아직 鷄血藤이 자궁근종에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

이에 著者は 鷄血藤이 活血祛瘀하는 주된 效能을 가진 약재로서 자궁근종에 대한 치료 효과가 있을 것으로 생각되어 체외배양 한 자궁근종세포에 처리 한 후 자궁근종세포의 직접적인 증식억제 효과를 조사하고 분자생물학적 기법인 세포주기분석법을 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 얻을 수 있었다.

먼저 鷄血藤에 의한 자궁근종세포의 증식억제 효과를 알아보기 위한 실험의 전 단계로서 일차배양된 세포를 smooth muscle actin 항체를 이용한 면역조직화학염색을 실시한 결과, 대부분 양성반응을 나타내는 것으로 확인된 바, 이는 실험의 재료로 채취한 자궁근종 조직에서

분리되어 일차배양된 세포가 이들 조직에서 자란 평활근 세포임을 확인하였다 (Fig. 1).

배양된 자궁근종세포에 鷄血藤 검액을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리한 후 24시간이 지난 후의 세포를 회수하여 세포수를 측정 한 결과, 300 μ g/ml의 농도에서 자궁근종세포의 증식억제 효과가 65%의 높은 결과를 나타내었으며 또한 농도가 높아질수록 증식억제 효과가 증가되는 것이 관찰되었다 (Fig. 2).

세포의 성장 및 분화의 조절은 세포가 정상적으로 자라는데 필수적이며 이 과정이 어떤 원인에 의하여 손상되면 정상세포는 비정상적인 세포주기를 거치게 된다⁴⁴⁾. 이에 근거하여 어떠한 약물이 세포주기의 각 단계에 관계할 것이라는 것이 최근의 세포주기관련 유전자 연구들에 있어서 핵심 포인트가 되고 있는 것이다.

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 감시한다. 만약 유전체에 대한 손상이 가해진다면 이 유사분열 checkpoint는 그것이 회복되거나 그렇지 않으면 다시 만들어질 때까지 또는 손상이 심한 경우에는 세포자멸사에 의해 죽게 될 때까지 세포주기의 진행을 정지시킨다⁴⁵⁾.

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 때문이다⁴⁶⁾.

앞의 실험을 통하여 鷄血藤이 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 효과를 확인하였으므로 鷄血藤이 cell cycle에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁근종세포에 鷄血藤을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도 처리하고 24시간 후 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과 대조군은 1.07%로 나타났으나 鷄血藤은 300 μ g/ml의 농도에서 23.49%의 subG1기의 지연이 확인되어 세포자멸사의 量的 증거를 확인하였고 농도의 증가에 따라 subG1의 연장이 증가됨을 관찰하였다(Fig. 3).

여러 성장인자들에 의하여 활성화된 여러 신호전달 물질들은 protoon(Ras, Raf, Myc, Fos, Jun)의 발현을 증가시킨다. 그러면 다음 단계로서 G1 phase를 담당하는 G1 cyclin 들의 발현이 증가하게 된다. 동물세포에서 G1/S phase에서 특징하게 작용을 나타내는 G1 cyclin으로는 type A, D, E 등이 있다. 한편 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 인자이다⁴⁴⁾.

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^{cip1} family(p27, p53, p21) 등이며 다른 한 종류는 p16^{INK4a} family(p15, p16, p18, p19, p20) 등이다^{44,46)}.

CDKI 중에서 p27은 세포내에서 항상 일정량으로 발현되어 cyclin 혹은 cyclin-CDK 복합체와 결합할 수 있는데 특히 cyclin E-CDK2 복합체에 결합하여 CDK의 활성을 저해하며 G1/S phase의 정지(arrest)를 유발하게 됨으로써 세포자멸사를 유도하게 된다⁴⁷⁻⁹⁾.

p53은 손상받은 DNA를 지닌 세포로 하여금 분열을 하지 못하도록 세포주기를 중단시킨다는 관점에서 볼 때, genome의 방패역할을 한다 하겠다. 만약 심각한 DNA 손상을 입은 세포가, 다음 세포분열 주기로 들어가기 전에 DNA가 복구되지 못하면 p53은 세포자멸사를 유발하며 G1/S phase 진행에 있어서 G1 checkpoint의 조정자 역할을 한다⁴⁴⁾. 또한 p53은 CDKI 중 하나인 p21의 생성을 유도하게 되며 p21은 CDK와 결합하여 G1 phase arrest를 유도하고, 세포는 손상된 DNA의 복구를 하게 된다. 이때 만약 손상된 DNA의 복구가 실패한 경우에는 p53에 의하여 세포는 세포자멸사 과정을 거쳐 사망에 이르게 되며 비정상적인 세포의 증식을 차단하는 것으로 알려져 있다^{44,50)}.

위의 실험에서 세포주기 분석을 통하

여 G1 phase arrest를 확인하였으며 세포주기와 관련한 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 세포주기관련 유전자인 p27, p53, p21, p16, cyclin E에 대하여 western blot 분석을 실시하였다.

먼저 cell cycle에 관계하는 유전자 분석을 위하여 鷄血藤을 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 300 μ g/ml의 농도로 조정하면서 24시간 후 세포로부터 단백질을 추출한 후 western blot analysis를 통하여 G1 checkpoint에 관계하는 p27의 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 4).

이러한 p27의 증가는 cyclin E-CDK2 복합체와 결합함으로써 CDK의 활성화를 저해하여 G1 phase arrest를 유발하여 결과적으로 세포자멸사를 일으키는 것으로 생각되며 이는 鷄血藤의 처리 농도가 증가할수록 p27의 발현도가 증가하는 것으로 보아 농도에 비례하여 세포증식을 억제하는 것으로 생각된다.

또한, p27과 관련된 상하위 유전자의 분석이 필요하여 p53, p21 유전자에 대한 분석을 시도한 결과, p53, p21 유전자의 발현 정도는 鷄血藤의 처리 농도에 비례하여 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

이러한 결과로 보아 p53의 증가는 鷄血藤의 처리로 인하여 DNA에 심각한 손상을 당하였을 것으로 생각되는 자궁근종세포가 회복되지 못한 상태에서 p53에 의하여 세포자멸사가 유도된 것으로 생각되며 이는 p53이 G1/S phase 진행에 있어서 G1 checkpoint의 조정자 역할을 한다는 것을 입증하는 것이다. 또한 발현도가 증가된 p53은 CDKI 중 하나인 p21의 생성을 유도한 결과 p21이 CDK와 결합하여 G1 phase arrest를 유

도하게 되어 결국 p53에 의하여 자궁근종세포는 세포자멸사를 일으켜 증식이 억제되고 사멸되는 효과를 나타내게 되며 이는 鷄血藤의 처리 농도에 비례하여 증가되는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

또 다른 G1/S checkpoint에 관여하는 유전자로 p16의 鷄血藤 처리 후 발현도를 관찰한 결과, 鷄血藤의 처리 농도가 증가할수록 p16의 증가를 확인할 수 있었으며 이는 세포주기에서 late G1 phase로의 진행을 통제하는 유전자인 p16의 증가로 다시 한번 G1/S checkpoint의 지연을 보여주며 결과적으로 자궁근종세포의 세포자멸사가 유도되는 것을 확인할 수 있었으며 cyclin E는 p27의 down stream에 있는 것으로 변화를 보이지 않았다(Fig. 4).

일반적으로 다양한 종류의 외부 자극 물질에 의해 영향을 받은 세포들이 세포괴사와 세포자연사를 일으킬 때는 이를 구분 지을 수 있는 외부 형태학적인, 생화학적인 특징을 동반한다⁵¹⁾. 즉, 갑작스런 상해로 인한 사고사에 해당하는 괴사(necrosis)로 인해 사망한 세포는 팽창되고 용해되어 세포외 공간으로 내용물을 방출하므로써 염증을 유발하는데 비하여 세포자멸사는 자발적이고 능동적인 세포사망 기전으로 염색질의 응축과 핵의 분절화를 특징으로 한다⁵²⁻⁴⁾. 결국 세포자멸사란 어떤 자극에 대한 내인성인 program이 작용하여 세포가 자발적으로 죽는 현상으로 endonuclease가 활성화되어 DNA가 분절되고 세포의 형태가 변하는 과정을 겪게되는 것이다⁵⁵⁾.

면역세포 선별과정의 분자적인 기전이 세포 능동 사망인 것으로 밝혀지면서 염색질의 농축이 일어날 때 DNA가

180-200개의 염기로 분할되어 나타나고 이것은 내인성의 nuclease의 활성화 때문인 것으로 알려지게 되면서 전기영동상에서 necrosis는 무작위적인 DNA 분절화로 인해 전기영동 후 도마 양상을 보이기 때문에 세포자멸사에서 일어나는 DNA의 사다리꼴 분절화 현상은 세포괴사와 세포자멸사를 구별하는 정통적인 방법으로 사용되고 있다⁵⁶⁻⁸⁾.

앞의 실험들(Fig. 2-4)에서 鷄血藤은 자궁근종세포의 증식억제 효과가 있으며 이는 세포주기상에서 G1 phase arrest를 일으켜서 일어나며 여기에는 p27, p53, p21, p16 등의 세포주기 관련 유전자가 관계되어 있음을 알 수 있었다.

이에 鷄血藤에 의한 세포자멸사 유도 효과를 알아보기 위하여 자궁근종세포에 鷄血藤을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 후 DNA fragmentation 분석을 시도한 결과, 대조군에 비하여 鷄血藤의 농도가 증가할수록 특징적인 DNA의 분절현상이 증가됨을 관찰한 바 鷄血藤에 의한 증식억제 효과는 세포자멸사에 의한 것임을 확인 할 수 있었다(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 있다⁵⁹⁾. caspase들은 항상 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들은 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase 중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있

으며, 활성화된 caspase-3는 세포내의 여러 종류의 기질 단백을 절단한다⁶⁰⁾.

Caspase에 의하여 선택적으로 절단되는 다양한 죽음기질이 알려져 있으며 그 중 PARP단백질은 DNA 회복과정에 관계되는 핵 내에 존재하는 효소 중의 하나인데 이는 활성화된 caspase-3에 의하여 DNA 결합 부위로부터 절단되며 이러한 PARP의 특이적인 단백질 분해 효소의 절단은 세포자멸사의 생화학적 특징으로 간주된다⁶⁰⁻¹⁾.

鷄血藤에 의한 세포자멸사의 경로를 밝히고자 caspase-3의 활성화의 관계에 대하여 알아본 결과, 鷄血藤 처리 농도가 증가할 수록 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 이러한 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소는 caspase-3의 활성화도가 상대적으로 증가되었음을 의미하는 것이다(Fig. 6).

또한, PARP 단백질의 양적인 감소가 관찰되어 활성화된 caspase-3에 의하여 116kDa의 PARP가 85kDa로 절단되는 정도가 증가하였음을 확인함으로써 DNA 회복의 실패로 인한 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 6).

따라서, 자궁근종세포에 대한 鷄血藤의 처리는 caspase-3의 활성도를 증가시키며 이는 PARP 단백질의 절단을 일으켜 종국에는 caspase pathway를 거쳐 세포자멸사가 일어나는 것으로 생각된다.

이러한 결과는 鷄血藤이 세포주기와 세포자멸사에 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 향후 자궁근종의 치료에 있어서 유전자 치료의 효과적인 치료 약물이 될 것으로 사료된다.

V. 結 論

鷄血藤이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보기 위하여鷄血藤을 100, 200, 300 μ g/ml의 농도로 처리한 후 증식억제 효과, 세포자멸사와 관련한 세포주기 분석 및 유전자 분석을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 鷄血藤을 처리한 24시간 후 300 μ g/ml의 농도에서 65%의 증식억제 효과를 보였으며 농도가 증가할수록 증식억제 효과는 증가하였다.
2. 鷄血藤 처리 후 세포주기 분석을 시도한 결과 23.49%의 subG1기의 지연이 관찰되었으며 처리 농도가 증가할수록 증가되었다.
3. 鷄血藤 처리 후 세포주기관련 유전자 분석을 시도한 결과 p27, p53, p21, p16 유전자 발현은 농도에 비례하여 증가하였으며 cyclin E는 별다른 변화가 없었다.
4. 鷄血藤 처리 후 세포자멸사의 특징인 DNA fragmentation이 처리 농도가 증가할수록 더욱 현저하게 관찰되었다.
5. 鷄血藤 처리 후 pro-caspase 3 및 PARP의 발현은 농도에 비례하여 감소하였다.

以上の 결과로 보아鷄血藤의 처리에 의해서 세포증식 억제가 일어나며 이러한 현상은 세포자멸사에 의한 것이며 그 기전은 p27, p53, p21, p16의 발현 증가로 인한 세포주기 회로에서 G1 phase arrest와 관련한 cell 세포자멸사가 일어

나는 것과 PARP 및 pro-caspase 3의 발현이 감소하는 것으로 보아 caspase 경로를 거쳐 세포자멸사를 유도하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2006년 07월 26일
- 심 사 일 : 2006년 08월 01일
- 심사완료일 : 2006년 08월 09일

參 考 文 獻

1. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈서적. 1987:472,477-8,481.
2. 이란옥 등. 자궁근종에 대한 임상통계학적 관찰. 대한산부인과학회지. 1994;37(11):2216-26.
3. Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata : etiology, symptomatology, and management. Fertil Steril 1981;36:433-45.
4. 신영우 등. 복식 전자궁 적출술에 관한 임상 통계적 고찰. 대한산부인과학회지. 1985:28:90.
5. Gambone, JC, et al. The impact of a quality assurance process on the frequency and confirmation rate of hysterectomy. Am. J. Obstet. Gynecol., 1990;63:545-50.
6. 韓醫婦人科學教材編纂委員會. 韓醫婦人科學(上). 서울:도서출판정담. 2001:305.
7. 도효신 등. 자궁근종의 약물치료 (GnRH Agonist)에 대한 효용성에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1998;41(1):67-75.
8. 김동호 등. 자궁근종에 대한 임상 및 병리학적 연구. 대한산부인과학

- 회지. 1994;37(6):1205-16.
9. Stewart EA, Faur A. The future of fibroid therapy. *Contemp Obstet Gynecol.* 2000;45:26-35.
 10. Brandon DD, et al. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J clin Endocrinol Metab.* 1995;80:1876-81.
 11. Sumitani H, et al. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology.* 2000;141:3852-61.
 12. Matuo H, et al. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:293-9.
 13. Arici A, Sozen I. Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 2000;73:1006-11.
 14. Klagsbrun M, Dluz S. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. *J Biol Chem.* 1993;268:1830-4.
 15. Strawn Jr EY, et al. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172:1837-44.
 16. Baek W, et al. Increased expression of cyclin G1 in leiomyoma compared with normal myometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:634-9.
 17. 김진희, 백승희. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP kinase 활성화에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2001;14(2):85-101.
 18. 이인호 등. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 증식 억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2002;15(2):12-24.
 19. 김소연, 백승희. 膈下逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식과 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(4):1-16
 20. 이영림, 백승희. 少腹逐瘀湯이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):1-17
 21. 김동철 등. 香附子가 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):18-33
 22. 李尙仁. 韓藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990;271-1.
 23. 康秉秀. 本草學. 서울:永林社. 1991;445-6.
 24. 安德均. 原色韓國本草圖鑑. 서울:敎學社. 1999;670.
 25. Wang W, et al. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dum, *Euonymus alatus*(Thunb) Sieb and *Eupolyphaga sinensis* Walker on

- regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhonguo Yao Za Zhi*. 1991;16:299-301.
26. Lam T, et al. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci*. 2000;67:2889-96.
 27. 이진훈. 계혈등의 항염활성효과. 강원대학교 대학원. 1999.
 28. 오형숙. 계혈등 추출물이 생쥐의 조혈 및 면역작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2000.
 29. 이현철 등. 계혈등 EtOAc subfraction-2가 종양전이 억제효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):525-8.
 30. 서해경 등. 류마티오이드 關節炎 患者 滑膜細胞에 대한 鷄血藤의 免疫反應. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):780-6.
 31. 趙南守. 鷄血藤 추출물이 Jurkat T 임파구의 세포고사 및 세포주기 억제에 미치는 효과. 원광대학교 대학원. 2002.
 32. 이영이 등. 자궁근종에 대한 임상병리학적 연구. 대한산부인과학회지. 1992;35(8):1170-80.
 33. West CP, et al. Shrinkage of uterine fibroids during therapy with goserelin(Zoradex) : a lutenizing hormone-releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. *Fertil Steril* 1987;48:45-51.
 34. Murphy AA, et al. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestosterone RU486: dose-response effect. *Fertil Steril* 1995 Jul;64(1):187-90.
 35. Lee BS, et al. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibit leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clin Endocrinology Metabolism*. 1998;83: 219-223
 36. Nowak RA. Novel therapeutic strategies for leiomyomas: targeting growth factors and their receptors. *Environ Health Perspect*. 2000;108(5):849-53.
 37. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- beta3(TGF beta 3) and altered responses to the atiproliferative effects of TGF beta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86: 913-20.
 38. 金相佑 등. 癥瘕患者에 對한 臨床的 考察. 大韓韓方婦人科學會誌. 1992;4 (1):2-8.
 39. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:杏林出版社. 1978:249-257.
 40. 李熙祥 등. 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):417-35.
 41. 황상구 등. p53-결핍 Jurkat T 임파구의 세포사멸에 대한 계혈등 추출물의 세포주기 억제효과. 동의생리병리학회지. 2001;15(6):887-8.
 42. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典(1). 上海: 上海科學技術出版社. 1979.

43. 趙學敏. 本草綱目拾遺. 香港:商務印書館香港分館. 1986:260-2.
44. 김승철. Cell cycle and Apoptosis. 이화여자대학교 의과대학 산부인과 교실 춘계심포지엄. 1998:23-42.
45. Thompson & Thomson 의학유전학 편찬위원회. 의학유전학. 서울:정담. 2002:6.
46. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 1996:15(4):381-93.
47. Peters G. Stifled by inhibitions. *Nature*. 1994;371:204-5.
48. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclin D. *Cell*. 1993;73:1059-65.
49. 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.
50. 羅載衡. 자궁경부의 침윤암과 상피내 종양에서 인유두종바이러스 감염과 p53 및 p21 유전자 변이. 전남대학교 대학원. 1998.
51. Alnemri, E. S., et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cel*. 1996;87:171.
52. Geoffrey M. Cooper 著 전국분자생물학 교수 譯. 세포학(The Cell). 서울:한우리. 2000:316-7,336-8.
53. 서정선. 20세기말의 의,생물학의 새로운 비전 apoptosis. 몸의 효율적 생존을 위한 세포의 능동적 사망기전. 서울:의학연구의 최신동향. 1998:30-2.
54. 박상대. 분자세포생물학. 서울:아카데미서적. 1998:551.
55. 金聖財. 韓醫學系の 癌研究動向과 研究 戰略에 대한 研究. 대한한의학회지. 1998;19(1):470-99.
56. 정성민. 세포고사. 서울:臨床耳鼻. 1996;7(1):77-92.
57. Bold, R. J, et al. Apoptosis, cancer and cancer therapy, *Surg. oncol*. 1997;6:133-42.
58. 김태진 등. 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성. 대한산부인과 종양 콜 포 스 코 피 학 회 지 . 199;10(2):138-47.
59. Kamesaki H. Mechanism involved in chemotherapy induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematil*. 1998;68:29-43.
60. 정용근. 아포토시스의 실행자: caspase를 통하여. 유전 제 2권. 1998:106-28.
61. 진선두 등. 綠茶의 주성분인 Epigallocatechin gallate의 항암활성과 Apoptosis 기전에 관한 분자생물학적 연구. 동의생리병리학회지. 2001;15(4):611-20.
62. Heintz N. cell death and the cell cycle. *Trends Biochem Sci*. 1993;18:157-9.