

## 鹿茸이 *in vitro*에서 子宮筋腫細胞에 미치는 영향

경희대학교 한의과대학 한방부인과학교실  
이윤재, 조정훈, 이창훈, 이진무, 장준복, 이경섭

### ABSTRACT

#### Effects of Cervi Pontotrichum Cornu on Human Uterine Leiomyoma Cell *in vitro*

Yoon-Jae Lee, Jung-Hoon Cho, Chang-Hoon Lee,  
Jin-Moo Lee, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee  
Dept. of Oriental Gynecology, college of Oriental Medicine,  
Kyung Hee University

**Purpose:** This study was conducted to investigate the effects of Cervi Pontotrichum Cornu extract solution on the cell cycle regulation and apoptosis in human leiomyoma cell.

**Methods:** The leiomyoma cell of patients was used in the study, and we administered the extract solution of Cervi Pontotrichum Cornu concentration at 1, 10mg/ml to the leiomyoma cell for 48 hours. We used flow cytometry and western blotting to confirm cell cycle and apoptosis.

**Results:** In flow cytometry, G1 phase of the 1mg/ml group prolonged. But G1 phase of 10mg/ml group was shortened and S phase was increased. Cyclin D1 expression increased in higher concentration group.

And Bax expression that regulates cell apoptosis increased in 1mg/ml and 10mg/ml group than control group. Bcl-2 expression decreased in 1, 10mg/ml groups than control group. VEGF expression rised in higher Cervi Pontotrichum Cornu concentration group.

**Conclusion:** This study means that Cervi Pontotrichum Cornu could induce the apoptosis of leiomyoma cell by increasing Bax and decreasing Bcl-2 expression. But Cervi Pontotrichum Cornu could increase Cyclin D1 and VEGF expression, so more detailed studies would be needed.

**Key Words:** Cervi Pontotrichum Cornu, leiomyoma, apoptosis, cell cycle

## I. 서론

子宮筋腫은 여성에서 발생하는 가장 흔한 양성 종양으로 가임기 여성의 20%에서 발병한다<sup>1)</sup>. 그 원인과 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 에스트로겐 및 프로게스테론과 연관된 체세포 돌연변이나 월경과 관련된 손상기전 및 유전자변화로 생각되고 있다<sup>2)</sup>. 子宮筋腫은 발생부위, 형태 및 크기에 따라 증상이 다르게 나타날 수 있는데, 子宮出血, 腫瘤感, 疼痛, 壓迫 症狀, 貧血로 인한 衰弱感 및 倦怠感 등이 호발한다<sup>1)</sup>. 증상의 감소와 筋腫의 제거를 위하여 비수술적 요법보다 수술적 요법이 많이 사용되어 국내에서는 子宮筋腫 환자의 44.7%가 子宮筋腫 치료를 목적으로 수술을 받았고<sup>3)</sup>, 미국 통계에 따르면 약 5년간 127만 명 이상의 子宮筋腫 환자가 자궁적출술을 받았다<sup>4)</sup>. 그러나 수술 후 환자에게 상실감, 복통 및 안면홍조 등의 다양한 신체적, 정신적 문제가 나타날 수 있다<sup>5)</sup>. 비수술적 방법으로 약물치료가 0.8%<sup>3)</sup>에서 이루어지는데 치료효과가 적고 부작용이 있기 때문에 보조적인 방법으로 사용된다.

한의학적으로 子宮筋腫은 여성 생식기관에 발생하는 腫塊를 총칭하는 癥瘕의 범주에 속한다<sup>1)</sup>. 癥瘕의 原因은 外感寒邪, 七情, 痰, 食積, 死血 및 正氣虛 등으로, 대부분 破積, 消瘀血하는 치법을 사용한다. 또한 養正邪自去를 주장하여 補한 然後에 腫塊를 攻破하기도 하여, 癥瘕 치료에 많이 쓰는 治方 구성약물을 분석하여 보면 活血去瘀藥, 補氣血藥 및 理氣藥이 주로 처방되고 있음을 알 수 있다<sup>6-8)</sup>.

한약이 子宮筋腫細胞에 미치는 영향에 대한 연구는 주로 活血去瘀, 理氣하는 단일 약물<sup>9-16)</sup>과 복합제제<sup>17-19)</sup>로 진행되어 왔으며, 補氣血 약물이나 처방에 대한 연구는 없었다.

鹿茸은 壯元陽, 補氣血하여 虛勞, 滑精, 子宮虛冷 및 崩漏帶下 등을 치료하는 효과가 있다<sup>20)</sup>. 鹿茸에 대한 연구를 살펴보면 골다공증 치료<sup>21)</sup>, 생식기능 향상<sup>22)</sup>, 조혈<sup>23)</sup>, 골모세포 성장<sup>24)</sup> 및 DNA 손상 방지<sup>25)</sup> 등에 대한 보고가 있었다. 또한 鹿茸藥鍼이 인간자궁암세포, 인간 직장암세포에 대해 미약한 감소효과<sup>26)</sup>를 나타내었으며, 醱酵 鹿茸은 복수암<sup>27)</sup>과 대장암<sup>28)</sup>에 항암효과를 나타내었다는 보고가 있다. 하지만 鹿茸이 子宮筋腫에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 鹿茸이 子宮筋腫細胞에 미치는 영향을 알아보기 위하여 flow cytometry를 통해 세포주기를 확인하고, cyclin-D1, Bax, Bcl-2 및 VEGF 유전자를 Western blotting을 통해 연구하여 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 材 料

#### 1) 細 胞

포천중문외과대학 강남차병원에 내원하여 자궁근종(Leiomyoma)으로 수술한 32~51세 여성 환자 6명에게 적출물 사용에 관한 동의서 작성 후, 자궁근종 조직을 채취하여 사용하였다.

#### 2) 藥 材

경희대학교 한의과대학 부속한방병원에서 뉴질랜드산 鹿科 (사슴과: Cervidae)

에 속한 동물인 馬鹿 *Cervys elaphus* L.의 未骨化된 幼角을 잘라 건조한 녹용 (*Cervi Pontotrichum Cornu*)을 3시간 가열 후 여과하여 방막유화식 진공농축기로 농축 후 spray dryer로 동결 건조시킨 엑기스 제제 (코드명; HNYEX)를 구입하여 사용하였다.

## 2. 方 法

### 1) 子宮筋腫細胞의 分離와 培養

멸균 냉동된 자궁근종 조직을 약 1mm로 세절 후 calcium-magnesium-free phosphate-buffered saline (이하 PBS; pH7.4, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)에 보관하였다. 세절된 자궁근종 조직을 PBS로 2~3회 세척하고, 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)과 8mg의 collagenase II가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (이하 DMEM; Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) 12.5ml에 넣어 37°C에서 2~3시간 동안 반응시켰다. 이를 100 $\mu$ m 멸균필터로 여과하고 500G에서 5분간 원심분리한 후, 1% antibiotic-antimycotic solution이 포함된 DMEM으로 2~3회 세척하였다. 세척된 세포 5 $\times$ 10<sup>5</sup>개를 1% antibiotic-antimycotic solution과 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM으로 10cm tissue culture dish (Falcon, USA)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 배양 하였으며, 실험 기간 동안 배지는 3일마다 교환하였다.

### 2) 檢液 製造 및 實驗群 設定

檢液은 녹용 엑기스제를 멸균 증류수에 용해하여 제조하였고, 檢液의 농도에

따라 1mg/ml와 10mg/ml를 실험군으로 설정하였으며, 대조군은 무처리군으로 설정하였다.

### 3) Cell cycle analysis

1 $\times$ 10<sup>6</sup>농도로 조정된 자궁근종 세포에 1mg/ml와 10mg/ml의 檢液을 처리한 후 48시간 배양하고 8000rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 다음날 8000rpm으로 4°C, 5분간 원심 분리 후 상층액을 버리고 PBS 1ml로 2회 세척하였다. 상층액 제거 후 200 $\mu$ l PBS와 2 $\mu$ l RNase (5mg/ml)를 처리하고 5~10분간 반응시켰다. 2 $\mu$ l propidium iodide (5mg/ml)를 처리 후 37°C에서 15분에서 20분간 반응시키고, FACS tube에 담아 flow cytometry (Bd FACS vantage TMSE, BD)를 이용하여 cell cycle을 분석하였다.

### 4) Protein isolation

1mg/ml와 10mg/ml의 檢液을 자궁근종 세포에 처리 후 scraper (Corning, UK)로 수집한 다음, 세포가 담겨있던 배지와 함께 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버린 뒤 2ml cold PBS로 2회 세척하였다. 단백질 분리에는 PRO-PREP protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)이 이용되었으며, 200 $\mu$ l의 buffer를 첨가하여 20분 lysis 후 4°C, 13000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 이 중 상층액을 취해서 Quick Start<sup>TM</sup> Bradford Dye Reagent (Bio-rad, USA) 처리 후, VERSA max microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 465nm에서 595nm 단백질의 吸光度를 측정하였다.

### 5) Western blotting

정량된 단백질에 lysis buffer와 sample buffer (60mM tris; pH6.8, 10% glycerol,

2% Sodium dodecyl sulfate (이하 SDS, 0.01% bromophenol blue)를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100°C heat block에서 5분 동안 boiling하고 spin-down하여 시료를 모았다. 30% polyacrylamide mix와 3차 증류수, 1.5M tris-HCl (pH8.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate, N, N, N', N'-tetra methyl ethylene diamine (이하 TEMED)를 혼합하여 12% separating gel을 전기영동 유리판에 부어 굳혔다. Stacking gel은 30% polyacrylamide mix와 3차 증류수, 1M tris(pH6.8), 10% SDS, 당일 제조된 10% ammonium persulfate 및 TEMED를 혼합하여 separating gel 위에 부어 완전한 gel을 형성하였다.

Tris-base 3.0g, glycine 14.4g 및 SDS 1g을 1ℓ에 녹여 running buffer를 만든 후, 20μg으로 정량한 단백질 10μℓ를 loading하고 100V로 약 1시간 running하였다. 1ℓ에 tris-base 3.03g, glycine 14.63g, methanol 200ml로 조성된 transfer buffer를 이용하여 전기영동된 gel을 PVDF membrane (Bio-rad, USA)에 100V 1시간 동안 transfer하였다. Transfer된 membrane은 200mM tris-base, 1.54M NaCl, 3차 증류수 및 tween 20으로 조성된 TBST (pH7.5)용액에 skim milk를 5%로 가한 후, 4°C에 overnight하였다.

다음날 blocking 용액을 제거하고, cyclin-D1, Bax, Bcl-2 및 VEGF (SANTACRUZ Inc., USA)의 1차 항체를 5% skim milk로 1000배 희석하여 만든 용액에 membrane을 넣어 1시간 반응시킨 후, TBST 용액으로 10분간 3회 세척하였다. 1차 항체가 처리된 membrane을 2차 항체인 Goat anti-mouse IgG

HRP (SANTACRUZ Inc., USA)를 5% skim milk로 1000배 희석하여 만든 용액에서 1시간 동안 반응을 유도하고, 용액을 제거 후 TBST로 10분씩 3회 세척하였다. ECL kit (Amersham, USA) 용액 A와 B를 40 : 1로 섞어 membrane에 적시고 1분간 반응시킨 후, cassette에 membrane을 올려놓고 X-ray film으로 감광시켰다. 감광 완료 후 develop하여 band를 확인하고, fixer에 담아 고정시켰다. 고정이 끝난 후, 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조 후 scanning 하여 densitometer (Bio-rad, USA)로 각 밴드의 吸光度를 측정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 檢液이 子宮筋腫細胞의 細胞週期에 미치는 영향

자궁근종세포에 검액 처리 후 flow cytometry를 이용하여 세포주기를 분석하였다. G1 phase는 대조군 84.17%에 비해 1mg/ml군은 86.14%로 증가하였고, 10mg/ml군은 77.18%로 감소하였다. S phase는 대조군 9.05%에 비해 1mg/ml군은 7.61%로 감소하였고, 10mg/ml군은 11.85%로 증가하였다. G2 phase는 대조군 6.78%에 비해 1mg/ml군은 6.25%, 10mg/ml군은 5.71%로 모두 감소하였다 (Fig. 1).

#### 2. 檢液이 cyclin-D1에 미치는 영향

자궁근종세포에 검액 처리 후, 대조군에 비해 1mg/ml군과 10mg/ml군 모두 cyclin-D1 발현이 증가하였다(Fig. 2).

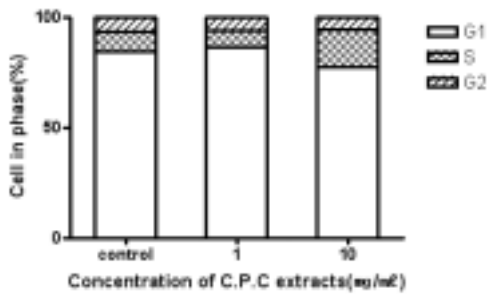


Fig. 1. Cell cycle analysis of human leiomyoma cells cultivated with *Cervi Pontotrichum Cornu* extracts for 48 hours

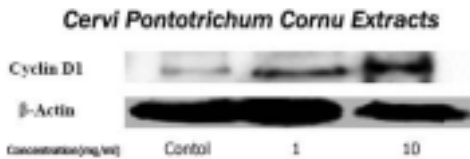


Fig. 2. Cyclin D1 of human leiomyoma cells cultured with *Cervi Pontotrichum Cornu* extracts for 48 hours.  $\beta$ -Actin was used of as an internal control.

3. 檢液이 Bax와 Bcl-2에 미치는 영향  
 자궁근종세포에 검액 처리 후 Bax와 Bcl-2의 발현을 보았다. Bax는 대조군에 비해 1mg/ml군과 10mg/ml군 모두 증가하였다. Bcl-2는 1mg/ml군과 10mg/ml군 모두 발현이 감소하였다(Fig. 3).

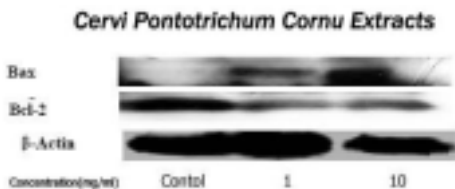


Fig. 3. Bax and Bcl-2 analysis of human leiomyoma cells cultured with *Cervi Pontotrichum Cornu* extracts for 48 hours.  $\beta$ -Actin was used of as an internal control.

4. 檢液이 VEGF에 미치는 영향

자궁근종세포에 검액 처리 후 대조군에 비해 1mg/ml군과 10mg/ml군 모두 VEGF 발현이 증가하였다(Fig. 4).

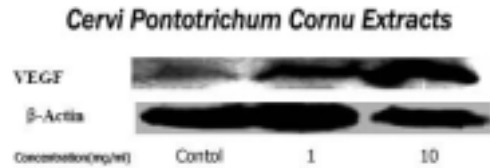


Fig. 4. VEGF of human leiomyoma cells cultured with *Cervi Pontotrichum Cornu* extracts for 48 hours.  $\beta$ -Actin was used of as an internal control.

#### IV. 고찰

자궁근종은 자궁 및 자궁 부속기에 발생하는 종양 중 가장 흔한 양성종양이다. 자궁근종의 발생에는 나이, 비만, 미분만부, 인종 및 이른 초경 등<sup>2)</sup>의 다양한 위험인자가 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 자궁근종의 원인과 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으며, 현재까지는 에스트로겐 및 프로게스테론과 연관된 체세포 돌연변이나 월경과 관련된 손상기전 및 유전자변화로 인한 것으로 생각되고 있다<sup>2)</sup>.

자궁근종은 발생부위나 형태 및 크기에 따라 증상이 다르게 나타날 수 있는데, 동통, 압박으로 인한 빈뇨와 변비, 월경과다, 빈혈로 인한 전신쇠약, 권태감 및 현훈 등의 증상이 호발한다<sup>1)</sup>. 증상의 감소와 근종의 제거를 위하여 호르몬 치료<sup>29)</sup>, 수술요법<sup>3)</sup>, 고주파 근종용해술<sup>30)</sup> 및 자궁동맥색전술<sup>31)</sup> 등이 응용되고 있다. 자궁근종 환자의 44.7%<sup>3)</sup>가 수술요법을 받아왔으나, 이러한 근종의 제거 및 억제 치료는 상실감, 복통, 안면홍조 및

성기능 장애 등을 유발할 수 있다<sup>5)</sup>. 따라서 최소한의 침습적인 치료 방법이 선호되고 있으며, 그에 따른 다양한 치료 방법이 모색되고 있다.

한의학에서 자궁근종에 해당하는 癥瘕란 腹中積塊가 上下로 攻築하고 腫塊가 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 疼痛極盛하는 증상을 나타내는 질환으로<sup>32)</sup>, 病因은 外感寒邪, 七情, 傷食, 正氣虛, 痰 및 死血 등과 연관되어 일반적으로는 破積, 消瘀血之劑로 치료하나, 養正邪自去라 하여 補한 연후에 積塊를 攻破하기도 한다<sup>6-8)</sup>. 癥瘕의 치료에 많이 쓰는 治方 구성약물을 분석하여 보면 活血去瘀藥, 理氣藥 및 補氣血藥이 주로 처방되고 있음을 알 수 있다<sup>6)</sup>.

한약이 자궁근종세포에 미치는 영향에 대한 단일 약물 연구로는 魚腥草, 半支蓮, 鷄血藤 및 香附子 등<sup>9-16)</sup>이 있었으며, 복합제제 연구로는 少腹逐瘀湯, 七製香附丸 등<sup>17-19)</sup>이 있었다. 이는 活血去瘀藥과 理氣藥 위주의 처방과 약물에 대한 연구들이며, 癥瘕의 처방 구성에 쓰이는 補氣血藥이 자궁근종에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

鹿茸은 補氣血, 壯元陽하여 虛勞, 滑精, 子宮虛冷 및 崩漏帶下 등을 치료하는 효과<sup>20)</sup>가 있어 자궁질환을 가진 여성에게 임상에서 辨證에 따라 처방되고 있다. 鹿茸은 실험연구에서 수컷생쥐의 생식능력을 향상하고<sup>22)</sup>, 사람 태아 골모세포 G2/M주기를 증가시켜 골모세포 증식을 유도하며<sup>24)</sup>, 당뇨병자에서 임파구 DNA 손상을 억제하는<sup>25)</sup> 등의 효과가 보고되었다. 또한 鹿茸藥鍼은 인간자궁암세포, 인간직장암세포에 미약하게 세포군 형성능 감소효과<sup>26)</sup>를 나타냈고, 醱

醱鹿茸은 복수암<sup>27)</sup>, 대장암<sup>28)</sup> 쥐 모델의 생존기간과 생존율을 증가시켜 항암효과를 나타내었다는 연구가 있었다.

이에 저자는 鹿茸이 자궁근종에 미치는 영향을 알아보기 위해 flow cytometry를 이용한 세포주기 및 western blotting을 통한 cyclin-D1, Bax, Bcl-2 및 VEGF 유전자 발현을 확인하였다.

세포는 여러 가지 분화 유도 신호에 의해 G1 phase에 머물면서 분화관련 유전자들의 순차적인 발현으로 최종분화에 이르게 되며 세포가 G1 phase에 영구적으로 머물게 되면 결국 노화에 이르게 된다. G1 phase에서 S phase로 들어가 증식할 것인지, apoptosis로 죽을 것인지 여부가 결정되는 checkpoint 조절이 세포자멸사와 증식을 조절하기 때문에 이에 영향을 미치는 인자에 대한 분자생물학적 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>33)</sup>. G1 phase에서 주기가 시작되려면 호르몬이나 growth factor 같은 외부 신호들의 영향이 있어야 하기 때문에 외부 신호들은 주로 G1 phase를 통해 세포의 증식을 조절하게 된다. Nuclear protein인 cyclin D1은 G1 phase의 진행에 있어 필요한 인자이며 또한 rate-limiting factor로 작용하기 때문에 cyclin D1이 과발현하면 phase가 단축되면서 S phase로 진행을 돕게 된다<sup>34)</sup>.

이번 연구에서 검액 농도가 증가할수록 cyclin D1이 증가 하였으므로 자궁근종세포의 세포주기가 G1 phase에서 S phase로의 이행이 촉진되어야 하나, G1 phase는 1mg/ml군에서 대조군에 비해 증가하였고, 10mg/ml군에서는 감소하였다. S phase는 대조군에 비해 1mg/ml군은 감소하였고, 10mg/ml군은 증가하였다. 10mg

/ml군에 G1 phase는 감소하고 S phase는 증가하여 cyclin D1이 증가에 따른 정상적인 반응을 보였으나, 1mg/ml군의 경우 G1 phase가 증가하고 S phase도 감소하여 cyclin D1 발현에 일치하는 세포주기 변화를 보이지 않았다. 1mg/ml군에서 G1 phase의 세포가 증가한 것은 G1 phase가 cyclin D1 뿐만 아니라 cyclin A, cyclin E 등 다양한 인자의 영향을 받기 때문이라 생각된다. 검액 투여 후 세포주기 결과에 따르면 녹용이 자궁근종 세포주기에 미치는 영향은 저농도의 경우 자궁근종세포의 증식이 억제되었고, 고농도의 경우 자궁근종세포의 증식이 증가 될 것으로 사료된다.

자궁근종은 세포분열이 활발하지 않음에도 불구하고 25cm 이상 크기의 근종<sup>35)</sup>도 보고된 예가 있을 정도로 그 크기가 다양하여 세포증식과 세포자멸사가 자궁근종 성장 원인의 하나로 고려되고 있다<sup>36,37)</sup>. Bcl-2는 26-kDA 세포내막 연관 단백질로 caspases 활성을 막아 예정된 세포사를 저해하여 세포 생존을 연장하는 유전자이다<sup>36)</sup>. 이러한 기전으로 Bcl-2의 발현은 자궁경부암, 비소세포암 등의 종양질환의 예후와 연관된다고 연구되어 있다<sup>38,39)</sup>. Bcl-2는 다른 양성종양과 달리 자궁근종세포에서 발현이 관찰되었던 만큼 자궁근종세포의 성장 및 세포자멸사에 많은 역할을 할 것이라 예측할 수 있다<sup>40)</sup>. Bax는 Bcl-2와 heterodimer를 형성하고 있어 상호간의 기능을 억제하고 있으며 Bax가 Bcl-2와 분리되면 직접적으로 혹은 간접적으로 세포 사망의 기전에 관여한다<sup>41)</sup>.

자궁근종세포에 검액 처리 후 Bax와 Bcl-2의 발현을 보았을 때, Bax는 대조

군에 비해 1mg/ml군, 10mg/ml군 모두 증가하였고, Bcl-2는 1mg/ml군, 10mg/ml군 모두 발현이 감소하였다. 이는 검액 투여가 자궁근종세포의 세포자멸사를 촉진하는 것으로 보인다.

VEGF란 내피세포에 특이하게 작용하는 유사분열물질로 유방암, 뇌암, 폐암 및 자궁경부암의 악성 종양에서 발현이 증가한 양상을 보여 암의 성장, 맥관형성 및 전이 등의 과정을 활성화한다고 알려져 있다<sup>42)</sup>. VEGF는 다른 growth factor인 TGF, PDGF 및 EGF와 함께 자궁근종성장에 잠재적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>43)</sup>. 이는 VEGF가 혈관신생을 촉진하는 인자인 만큼 종양 성장 활성화에 필수적이며 모세혈관 permeability를 증가시켜 내막세포의 증식을 유도하는 간접적 효과를 나타낼 수 있기 때문이다<sup>2)</sup>. 이번 연구에서 VEGF는 대조군에 비해 모든 농도의 검액에서 발현이 증가하는 양상을 보였고, 1mg/ml군의 발현이 10mg/ml군보다 더 증가하였다. 그러나 자궁근종세포와 정상 자궁근세포에서 VEGF의 발현이 다르지 않다는 보고<sup>44)</sup>도 있어, 자궁근종세포는 다른 요소에 어떤 영향을 받느냐에 따라 증식 및 억제정도가 다를 것으로 사료된다.

연구 결과를 종합해보면 VEGF는 대조군에 비해 모든 농도의 검액에서 발현이 증가하는 양상을 보였으나, 세포자멸사에 관한 유전자 발현에서 1mg/ml군과 10mg/ml 군 모두 자궁근종세포의 자멸사를 유도경향을 나타내므로 자궁근종세포의 증식이 억제될 것으로 사료된다. 그리고 세포주기와 세포주기조절 유전자 cyclin D1에 관한 결과를 보면, 1mg/ml군에서는 cyclin D1 유전자의 증가에도 불

구하고 세포주기가 느리게 나타났고, 10 mg/ml군은 세포주기가 촉진되었다. 검액의 투여가 자궁근중세포의 증식이나 억제로의 일관된 효과는 보이지 않았으나, 저농도의 검액이 자궁근중세포의 증식을 억제할 것으로 사료된다.

煎湯 방법 연구를 보면 한약재는 어떤 약물과 같이 달여지느냐, 또 어떻게煎湯되느냐에 따라 추출되는 양이 다르며, 인체가 복용하는 약물에서 실제 유효성분은 120 $\mu$ g-210 $\mu$ g 정도의 저농도이다<sup>45)</sup>. 이번 연구에서는 *in vitro*이나 매우 고농도로 실험한 만큼 실제 인체에서 다른 결과를 나타낼 수 있다. 그리고 정상 자궁근세포와 자궁근중세포로 나누어 녹용이 정상 자궁근세포에 미치는 영향을 확인하는 것이 필요하다. 추가적인 연구를 통해 이 연구결과가 종양특이적인 반응인지 확인하여야 할 것이다.

## V. 결 론

녹용이 *in vitro*에서 자궁근중세포의 세포주기와 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 48시간동안 1mg/ml 및 10mg/ml 농도에서 자궁근중세포를 배양한 후 flow cytometry를 이용한 세포주기와 western blotting을 통한 cyclin-D1, Bax, Bcl-2 및 VEGF 유전자 발현을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포주기에서 G1 phase는 대조군에 비해 1mg/ml군은 증가하였고, 10mg/ml군은 감소하였다.
2. 세포주기 조절인자 cyclin D1은 대조군에 비해 검액 농도가 증가함에 따

라 발현이 증가하였다.

3. 세포자멸사 조절 인자 Bax는 대조군에 비해 1mg/ml군 및 10mg/ml군 모두 증가하였다. Bcl-2는 대조군에 비해 1mg/ml군 및 10mg/ml군 모두에서 발현이 감소하였다.
4. 혈관신생을 촉진하는 VEGF는 대조군에 비해 발현이 증가하였다.

□ 투 고 일 : 2008년 4월 24일

□ 심 사 일 : 2008년 4월 29일

□ 심사완료일 : 2008년 5월 10일

## 참고문헌

1. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 ( I ). 서울: 정담. 2007;353-363.
2. Flake GP et al. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. Environ Health Perspect. 2003;111(8):1037-1054.
3. 박정규 등. 자궁근종에 관한 임상통계학적 연구. 대한산부인과학회지. 2005; 48(2):436-445.
4. Whiteman MK et al. Inpatient hysterectomy surveillance in the United States, 2000-2004. Am J Obstet Gynecol. 2007;39(5):1-7.
5. 오재성 등. 자궁적출술후 시간경과에 따라 발현되는 증상의 양상에 대한 고찰. 대한한방부인과학회지. 2002;15(3):97-106.
6. 이경섭 등. 癥瘕治方에 關한 文獻考察. 대한한의학회지. 1982;5(2):54-62.
7. 李 槌. 懸吐醫學入門. 서울: 翰成社. 1983;680-682.



8. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울: 翰成社. 1983;734-738.
9. 정병천 등. 魚腥草가 자궁근종 세포의 성장억제와 세포자멸사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(3):1-12.
10. 김민성 등. 半支蓮의 Bcl-2 발현감소를 통한 자궁근종세포 성장억제에 미치는 효과. 대한한방부인과학회지. 2004;17(4):82-90.
11. 이화경 등. 鷄血藤이 子宮筋腫細胞의 增殖抑制 및 세포자멸사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):135-149.
12. 이지연 등. 鬼箭羽에 의한 자궁근종 세포와 자궁평활근세포에서의 PKC 활성화도 조절에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2004;17(3):54-71.
13. 박창건 등. 三稜이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(2):199-213.
14. 이희재 등. 玄胡索이 자궁근종세포의 증식억제와 Apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(2):214-225.
15. 양영필 등. 大黃이 子宮筋腫細胞의 細胞自滅死에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2004;18(1):200-205.
16. 김동철 등. 香附子가 子宮筋腫細胞의 成長抑制와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):18-33.
17. 김석중 등. 七製香附丸이 자궁근종세포의 성장억제와 세포자멸사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(2):25-42.
18. 김윤근 등. 蟠蔥散이 子宮筋腫細胞의 死滅과 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):34-44.
19. 이영림 등. 少腹逐瘀湯이 子宮筋腫細胞의 成長抑制와 MAP Kinase 活性 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):1-17.
20. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 本草學. 서울: 영림사. 2004;591-593.
21. 심상도 등. 鹿茸이 卵巢摘出로 유발된 흰쥐의 骨多孔症에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1999;14(1):153-166.
22. 오재성 등. 鹿茸이 수컷생쥐의 生殖과 胚發生에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):129-137.
23. 김연태 등. 노화 촉진 생쥐에서 녹용의 조혈 작용에 관한 연구. 생약학회지. 1996;27(4):371-377.
24. 양대승 등. 녹용이 사람 태아 골모세포의 세포주기조절에 미치는 영향. 원광치의학. 2003;12(1):375-393.
25. 김혜영 등. 당뇨병환자에 있어서 녹용 추출물의 섭취가 혈압, 혈당 및 임파구 DNA 손상에 미치는 영향. 한국영양학회지. 2004;37(9):794-800.
26. 변부형 등. 유전독성시험에 의한 녹용약침의 안전성 연구. 대한본초학회지. 2005;20(2):1-6.
27. 김동현 등. 복수암 생쥐에 대한 발효 녹용의 항암작용. 약학회지. 1994;38(6):795-799.
28. 김동현 등. 대장암모델 생쥐에 발효 녹용의 발암억제효과. 경희약대논문집. 1995;23(1):93-95.
29. 도효신 등. 자궁근종의 약물치료(GnRH Agonist)에 대한 효용성에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1998;41(1)

- :67-75.
30. 황인택 등. 자궁근종의 보존적 치료를 위한 질식 고주파 자궁근종용해술. 대한산부인과학회지. 2007;50(2):337-344.
  31. 최정범 등. 양측 자궁동맥 색전술을 이용한 자궁근종의 치료. 대한산부인과학회지. 2006;49(11):2310-2315.
  32. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울: 행림출판사. 1994;252-253.
  33. 서민호 등. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 1996;15(4):381-393.
  34. 이수재. Cell Cycle, Cell Death and Apoptosis. 제 23차 대한핵의학회 연수교육. 2002;57-69.
  35. 이정운 등. 광인대내 거대 자궁평활근종 1예. 대한산부인과학회지. 2001;44(12):2316-2319.
  36. Dixon D et al. Cell proliferation and apoptosis in human uterine leiomyomas and myometria. Virchows Arch. 2002;441(1):53-62.
  37. 송은섭 등. 자궁근종의 원인으로서의 자궁근육세포의 세포증식과 세포자멸사의 비교 및 그 결과와 생리 주기 및 ER/PR발현과의 상관관계. 대한산부인과학회지. 2003;46(11):2244-2251.
  38. 김용범 등. 자궁경부암에서 Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA 단백질 발현 및 Apoptosis 양상과 선행항암화학요법 반응도의 상관관계에 관한 연구. 대한부인종양콜포스코피학회지. 2000;11(1):24-37.
  39. 홍현주 등. 비소세포폐암에서 Survivin, HSP 및 Bcl-2 발현에 관한 면역조직화학적 분석. 결핵 및 호흡기질환. 2002;52(5):441-452.
  40. Miettinen M et al. Cell-type- and tumour-type-related patterns of bcl-2 reactivity in mesenchymal cells and soft tissue tumours. Virchows Arch. 1998;433(3):255-260.
  41. St. Clair EG et al. Bcl-2 counters apoptosis by Bax heterodimerization-dependent and -independent mechanisms in the T-cell lineage. J Biol Chem. 1997;272(46):29347-29355.
  42. 문혜성 등. 자궁경부암 환자에서의 혈청 VEGF 측정의 임상적 유용성. 대한산부인과학회지. 1998;41(1):168-195.
  43. Robboy SJ et al. Pathology and pathophysiology of uterine smooth-muscle tumors. Environ Health Perspect. 2000;108(suppl 5):779-784.
  44. Dixon D et al. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. Environ Health Perspect. 2000;108(suppl 5):795-802
  45. 김호철 등. 大黃과의 配合煎湯이 大黃中 sennoside b의 抽出量에 미치는 影響. 대한본초학회지. 1996;11(1):75-78.
-