대한한방부인과학회지
J Korean Obstet Gynecol. VOL.28 NO.1 : 046-057 (2015)
http://dx.doi.org/10.15204/jkobgy.2015.28.1.046

五靈脂가 유방암세포의 사멸에 미치는 영향

동신대학교 한의과대학 한방부인과교실
송유림, 김지은, 양승정, 박경미, 정수정, 조성희

ABSTRACT

Effects of *Trogopterorum Faeces* on the Apoptostic Cell Death in Breast Cancer Cells

Yu-Rim Song, Ji-Eun Kim, Seung-Jeong Yang
Kyung-Mi Park, Su-Jung Jung, Seong-Hee Cho
Dept. of Korean Gynecology and Obstetrics, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

Objectives: This study was designed to investigate the effects of *Trogopterorum Faeces* on the apoptostic cell death in breast cancer cells.

Methods: In the experiment, the effects of *Trogopterorum Faeces* on proliferation rates and type of cell death were investigated using MCF-7 cells *in vitro*. The effects on expression levels of caspase 3 and caspase 9 were also investigated.

Results: The effects on expression levels of caspase 3 and caspase 9 were also investigated. In the present results, treatment with *Trogopterorum Faeces* decreased proliferation rates in a dose dependent manner. ID_{50} (50 % inhibitory dosage) was 177.2 μg/ml. In addition, treatment with *Trogopterorum Faeces* increased percentage of apoptotic cells. Finally the expression level of caspase 3 and caspase 9 were elevated by treatment with *Trogopterorum Faeces* respectively.

Conclusions: This study suggests that *Trogopterorum Faeces* can trigger caspase dependent apoptosis in MCF-7 cells.

Key Words: *Trogopterorum Faeces*, Apoptostic Cell Death, Breast Cancer Cells

Corresponding author(Seong-Hee Cho) : Korean Hospital of Dong-Shin University, 377-12, Wolsan-dong, Nam-gu, Gwang-ju
Tel : 062-350-7213 E-mail : drlmp72@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

최근 수명이 증가함에 따라 암에 의한 사망률이 높아지고 있는 추세인데, 전세계적으로 여성들이 앓는 주요 암에 해당하는 것이 유방암이며[1], 특히 국내의 경우 여성암 중 유방암 발생률은 2013년 15,942명이었는데 이는 갑상선암에 이어 두번째를 차지하는 수치이다[2].

유방암은 유방에 생기는 악성 종양으로, 주로 40세 이후의 여성에서 발병하며, 미국을 비롯한 서방에서는 흔한 암이지만 우리나라에서는 다소 낮은 편이었으나, 폐경 후 비만, 유전적 소인, 경구 피임약 등과 같은 요인들과 식생활과 환경의 변화로 점점 그 발병율이 높아지고 있는 실정이다[3].

유방암은 유두의 내번이나 함몰, 편위 및 발적같은 습진성 병변과 유방피부의 변화나 피부 압흔, 액와부 종괴 등의 증상을 보이는데[4], 이는 한의학적으로 乳癰, 乳巖, 乳癖, 乳痰 등의 질환과 유사하다[5].

유방암의 서양의학적 치료 방법은 치료받는 대상과 병의 정도에 따라 유방 절제술, 방사선 치료, 항암화학요법, 항호르몬 치료 등이 있으나, 이러한 기존의 방법들은 유방암 환자들의 생존율은 높여주나 수술부위 및 그 주변부위의 통증 뿐 아니라 수술부위와 상관없는 전신통증을 야기하여 삶의 질을 떨어뜨리므로 보다 부작용이 적은 항암제의 개발이 필요한 실정이다[6,7].

五靈脂는 活血祛瘀藥에 속하며, 날다람쥐과에 속한 동물인 하늘다람쥐(날쥐, *Trogopterus xanthopes* Milne-Edwards)의 분변을 건조한 것으로 vitamin A류 물질과 수지, 뇨산, 뇨소 등을 함유하고 있으며, 性은 溫하고 味는 苦甘하며 心, 肝經으로 귀경하는 약재로 活血止痛, 化瘀止血, 消積解毒의 효능을 가져 產後血瘀疼痛, 經痛, 產後惡露不下, 胃脘痛 등 모든 血瘀諸痛을 치료하며 馬兜鈴 檳榔 등을 배합하여 乳腫을 치료한다 하였다[8]. 이러한 五靈脂의 효능을 규명하는 한의학적 연구로는 항염증작용[9,10], 근종조직과 근종세포의 성장 억제작용[11] 항암작용[12], 지혈작용[13] 등에 대한 연구가 있으며 五靈脂가 포함된 처방의 항암효과[14-18]를 발표한 연구사례들을 볼 때 五靈脂가 항암제로서의 역할을 할 수 있다는 가능성을 시사하고 있다.

이상과 같이 임상에서 부인과 질환에 다용되고 있고, 위의 연구사례들을 볼 때 五靈脂(*Trogopterorum Faeces*, TF)가 인간 유래 유방암 세포의 사멸에 관여할 수 있을 것이라는 가설을 세우고 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 TF의 유방암에 대한 항암효과를 알아보기 위하여 인체 유래 유방암 세포인 MCF-7 세포에 TF를 처리하고, 세포증식율과 증식 형태에 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 Annexin V/PI double stain 방법을 통하여 어떤 type의 세포 사멸이 일어나는지 살펴보았으며, Caspase 3 와 Caspase 9의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실 험

1. 재 료

1) 세포주

인간 유래 유방암 세포주인 MCF-7 cell은 한국세포주은행(서울, 한국)으로부터 냉동상태로 구입하여 사용하였다. 분주받은 세포주는 해동시켜 배양액 속에 분

주시킨 후, 3회 이상 계대 배양하여 실험실 환경 및 기타 배양 환경에 충분히 적응시킨 후 증식률(Doubling Time)이 구입처에서 제공한 자료와 거의 일치하게 되었을 때, 충분히 적응하였다고 생각하고 실험에 사용하였다.

2) 약 재

본 실험에 사용된 五靈脂(Trogopterorum Faeces, TF)는 날다람쥐과에 속한 동물인 하늘다람쥐(날쥐, *Trogopterus xanthopes* Milne-Edwards)의 분변을 건조한 것으로 동신대학교 부속 광주한방병원을 통하여 구입하여 정선한 후 사용하였다.

3) 시약 및 기기

세포 배양을 위한 Roswell Park Mamorial Institute(RPMI) 1640 배지와 fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone(UT, USA)에서, penicillin/streptomycin mix는 Invitrogen (NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 증식율 측정을 위한 Cell Count Kit-8(CCK-8) kit는 Dojindo(Kumamoto, Japan)에서 구입하여 사용하였으며, Annexin V/PI double staining kit는 BD pharmingen (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Caspase 3, caspase 9, beta-actin의 1차 항체는 Cell Signaling Technology(MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

측정을 위해 사용된 기기는 유세포 분석기(BD bioscience, Heidelberg, Germany), 광학 현미경(Olympus, Japan)등이며, 시료의 조제를 위하여 원심 분리기(Vision, 한국), 감압농축기(EYELA, Japan), 동결건조기(삼원, 한국)가 사용되었다.

2. 방 법

1) 약물의 준비

세척되고 세절된 상태로 구입된 五靈脂 50 g을 에탄올 500 ml를 이용하여 상온에서 24시간 추출한 다음, 다시 500 ml의 에탄올을 부어 재차 추출하였다. 모아진 추출액을 원심분리하여 찌꺼기는 버리고 상층액을 모은 다음, 와트만지(Watman paper)를 이용하여 2회 반복 여과 하였다. 여과가 끝난 추출액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음 동결건조시켰다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 2.7 g으로 수율은 5.4%였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관하였다.

2) 세포주 배양 환경

인체 유래 거대유방암 세포주인 MCF-7 세포의 생육 배지로는 RPMI 1640배지에 10% fetal bovine serum와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 μg/μl)을 첨가하여 사용하였고, 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였다. 부착세포의 탈착을 위해서 Trypsin-EDTA(Sigma, USA)를 사용하였으며, 5% CO_2가 공여되는 배양기 속에서 37℃를 유지하며 배양되었다.

3) 세포 독성에 미치는 영향 측정

Highly water-soluble tetrazolium salt. WST -8 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt(CCK-8 kit)를 사용하여 살아있는 세포를 정량하는 방법을 사용하였다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 well당 5×10^3개의 분량으로 분주하고, 37℃, 5% CO_2가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 시료를 DMSO(Dimethyl sulfoxide, Sigma, USA)에 녹인 다음, 최종 농도 400 μg/ml, 200 μg/ml, 100 μg/ml, 50 μg/ml, 25 μg/ml, 0 μg/ml이 되게 배양액에 희

석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 μl의 CCK-8 용액을 첨가하고 37℃, 5% CO_2가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader(Bio-rad, CA, USA)를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

4) 세포 증식 형태 관찰

시료가 투여된 군의 세포 증식 형태를 아무것도 처리되지 않은 정상군과 비교하기 위하여, 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)이 이용되었으며, 그 결과는 배율 ×200의 사진으로 제시되었다.

5) Annexin V/PI double stain

세포 사멸의 종류를 판별하기 위하여, 세포에 시료를 처리한 다음 Annexin V와 PI를 처리하고, flow cytometry 기법으로 결과를 분석하였다. 실험과정을 간단히 요약하면, 6-well plate에 웰당 5×10^4개의 세포를 분주하고, 24시간 동안 부착을 시행한 다음, 0 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml 농도의 시료를 처리하였다. 24시간의 배양이 끝나고 난 후, Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 탈착하여 50 ml tube에 모은 후, 원심분리를 거쳐 cell pellet을 얻었다. 얻어진 cell pellet을 500 μl의 FACS sol.(5% bovine serum albumin(BSA) in phosphate buffered saline(PBS))에 부유시킨 다음, 10 μl의 Annexin V와 PI를 처리하고 4℃에서 30분간 반응 시켰다. 30분의 반응이 끝난 후, 원심분리기를 시행하여 상층액을 버리고 여기에 다시 300 μl의 FACS sol.을 첨가하였다. 형광 측정은 FACS canto II(BD bioscience)을 이용하여 유세포분석법(flow cytometry)으로 시행하였다.

6) Western blot analysis

시료가 처리된 유방암 세포주를 수거하여, 세포를 용해시킨 다음 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid assay(BCA) 법을 이용하여 정량되었으며, 50 μg의 단백질이 SDS-polyacrylamide gel에 loading 되었다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 polyvinylidene fluoride membrane으로 이동되고 난 후, caspase 3, caspase 9, beta-actin 각각의 1차 항체를 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다(over night). 반응이 끝난 후, 간단히 수세하고, Horseradish peroxidase(HRP)가 부착된 2차 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음, SuperSignal West-Femto reagent(Pierce, IL, USA)를 이용하여 발색시켰다.

7) 통계처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS(The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, U.S.A.)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 각 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's *t*-test로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포 증식률에 미치는 영향

인간유래 유방암 세포에 시료를 처리하고 세포 증식률에 미치는 영향을 살펴본 결과 100 μg/ml 이상 처리군에서 유의한 수준의 세포 증식률 저하가 관찰되었다. 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml의 세포 증식율은 각각 84.1±3.0%, 39.9±3.0%,

13.6±1.6%였다(Fig. 1).

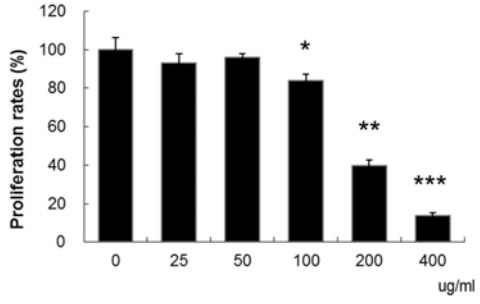

Fig. 1. Effects of TF on proliferation rates of MCF-7 cells.
Proliferation rates were measured using CCK-8 kit. Cells were treated with indicated concentrations of TF for 24 hr. Values were represented as mean±S.D. of 3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. non treated normal.

2. 세포 증식 형태에 미치는 영향

Vehicle만을 처리한 정상군에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고(Fig. 2A), 농도가 증가함에 따라 세포 밀집도가 감소함을 알 수 있었으며, 이는 세포 증식률에서 나타낸 바와 유사한 경향을 보였다(Fig. 2). 특히, 200 μg/ml의 고농도 군에서 세포가 둥그렇게 위축되는 경향이 관찰되었으나, 전형적인 apoptosis의 형태는 관찰하기 어려웠다(Fig. 2D).

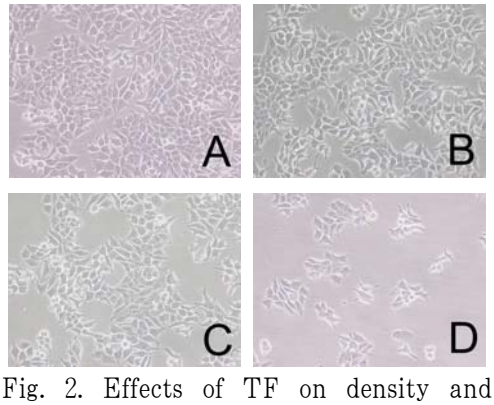

Fig. 2. Effects of TF on density and morphologic changes in MCF-7 cells.
Cells were treated with various concentrations of TF for 24 hr, then density and morphologic changes were observed using photo-microscope (A) normal, (B) 50 μg/ml treated group, (C) 100 μg/ml treated group, (D) 200 μg/ml treated group ×200.

3. 세포 사멸의 종류에 미치는 영향

TF가 유방암세포에 유발하는 사멸의 종류를 구분하기 위하여, Annexin V/PI double stain을 시행한 결과 아무것도 처리하지 않은 정상군에서는 대부분의 세포가 Q3에 속해 있었으며(96.6%), TF의 농도가 증가함에 따라 Q3에 속하는 세포(live cell)는 감소하고, Q2(late apoptosis)와 Q4(early apoptosis)에 속하는 세포가 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3).

이를 세포 사멸의 종류별로 구분해보면, 모든 군에서 세포 괴사(necrosis)에 의한 세포 사멸(Q1)은 큰 차이를 보이지 않았고, early apoptosis, late apoptosis 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

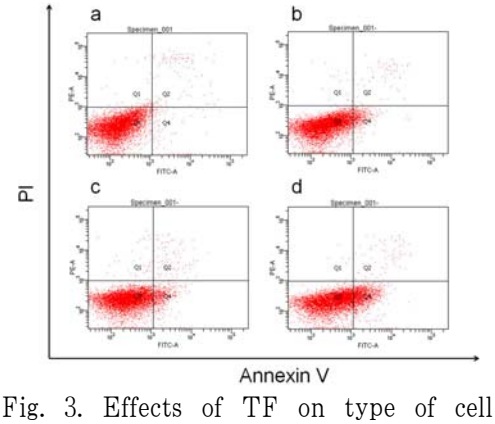

Fig. 3. Effects of TF on type of cell death in MCF-7 cells.
The effects of TF on type of cell death were observed using Annexin V/PI double stain method. Cells were treated with 0 μg/ml (a), 50 μg/ml (b), 100 μg/ml (c) and 200 μg/ml (d) of TF for 24 hr.

Table 1. Effect of TF on the Distribution of Cell Death Type

Group		TF treatment (μg/ml)			
		0	50	100	200
Live		96.6	90.9	89.3	76.9
Apoptosis	Early apoptosis	0.9	6.5	7.5	19.9
	Late apoptosis	1.7	1.8	2.1	2.3
	Total apoptosis	2.6	8.3	9.6	22.2
Necrosis		0.8	0.8	1.1	0.9
Total cell death		3.4	9.1	10.7	23.1

All values were represented as percentage of all number of cells (%).

4. Caspase 3 발현에 미치는 영향

유방암 세포에 시료를 처리하고, 단백질을 추출하여 caspase 3의 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 농도 의존적으로 caspase 3의 발현이 증가함이 관찰되었다(Fig. 4).

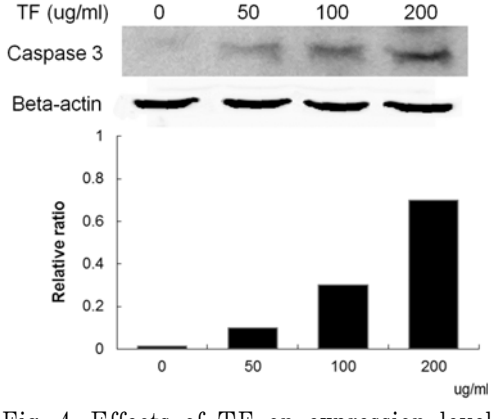

Fig. 4. Effects of TF on expression level of caspase 3 in MCF-7 cells.
The expression level of caspase 3 was evaluated using western blot method. Cells were treated with indicated concentrations of TF for 24 hr. Relative ratio was represented as expression level of caspase 3/beta-actin ratio.

5. Caspase 9 발현에 미치는 영향

유방암 세포에 시료를 처리하고, 단백질을 추출하여 caspase 9의 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 농도 의존적으로 caspase 9의 발현이 증가함이 관찰되었다(Fig. 5).

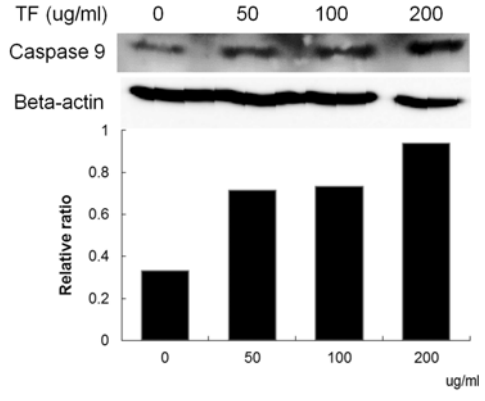

Fig. 5. Effects of TF on expression level of caspase 9 in MCF-7 cells.
The expression level of caspase 9 was evaluated using western blot method. Cells were treated with indicated concentrations of TF for 24 hr. Relative ratio was represented as expression level of caspase 9/beta-actin ratio.

Ⅳ. 고 찰

최근 수명이 증가함에 따라 암에 의한 사망률이 높아지고 있는 추세인데, 전세계적으로 여성들이 앓는 주요 암에 해당하는 것이 유방암이며[1], 특히 국내의 경우 여성암 중 유방암 발생률은 2013년 15,942명이었는데 이는 갑상선암에 이어 두번째를 차지하는 수치이다[2].

유방암은 유방에 생기는 악성 종양으로, 주로 40세 이후의 여성에서 발병하며, 미국을 비롯한 서방에서는 흔한 암이지만 우리나라에서는 낮은 편이었으나, 폐경 후 비만, 유전적 소인, 경구 피임약 등과 같은

요인들과 식생활 및 환경의 변화로 인한 점점 그 발병률이 높아지고 있는 실정이다[3].

유방암을 일으키는 요인은 중요한 위험인자와 경미한 위험인자로 나뉘는데, 중요한 위험인자는 45세 이후의 연령, 유방암 가족력, 반대쪽 유방의 유방암, 비침습적 암종, 이형성을 동반한 양성 증식성 변화가 있으며, 경미한 위험인자인 방사선 노출, 12세이전의 이른 초경, 50세 이후의 늦은 폐경, 폐경 후 비만과 같은 요인으로 이는 모두 유방암의 발생 위험을 증가시킨다[19].

유방암은 유두의 내번이나 함몰, 편위 및 발적같은 습진성 병변과 유방피부의 변화나 피부 압흔, 액와부 종괴 등의 증상을 보이는데[4], 서양의학적 치료 방법으로는 치료 받는 대상과 병의 정도에 따라 유방 절제술, 방사선 치료, 항암화학요법, 항호르몬치료 등이 있다. 그러나 이러한 기존의 방법들은 유방암 환자들의 생존율은 높여주나 수술 부위 및 그 주변부위의 통증 뿐 아니라 수술 부위와 상관없는 전신통증을 야기하여 방사선 치료의 경우 유방암 발생 반대편의 유방에까지 노출되어 이렇게 노출된 환자에게서 2차 암의 발생확률을 높이고 항암요법과 항호르몬치료를 받는 경우 열감 호소, 수면부족, 일상생활의 장애, 우울감 증가 등의 여러 부작용을 야기하여 환자의 삶의 질을 떨어뜨리게 되므로 보다 부작용이 적은 항암치료가 필요한 실정이다[6,7,20-22].

한의학적으로 유방암은 乳癰, 乳巖, 乳癖, 乳痰 등의 질환과 유사하다[5]. 특히 이 중 乳巖과 유사한데, 부인이 근심이 많거나 화를 잘 내거나 답답한 마음이 쌓여서 脾氣가 약해지고 막히며 肝氣가 거슬러 올라 납작한 바둑알처럼 생긴, 잘 보이지 않는 멍울이 처음엔 아프지 않았는데 수년이 지난 후 밖으로는 자흑색으로 붓고 안으로 점점 짓물린다고 하여 급히 十六味流氣飮과 單子靑皮湯을 쓰는데 허한 사람은 淸肝解鬱湯을 써서 치료한다고 기록되어있다[23]. 이렇듯 乳巖은 肝氣鬱滯, 憂怒抑鬱, 憂鬱傷肝 및 思慮傷肝 등의 七情損傷으로 증상이 發한 것이 주요 요인이거나 이것이 오래되어 장부기능이 失調된 것으로 볼 수 있으며 치료초기에는 肝鬱氣滯로 인한 것으로 보아 疏肝解鬱, 疏氣行血하는 治法을 이용하며, 오래된 때에는 大補氣血하는 治法을 이용하여야 한다 하였으며[19], 국내에 보고된 논문을 살펴보면 단일약물로는 黃芩[24], 鬱金[25], 三稜[26] 등의 효과가 증명되었고, 처방으로는 抗癌丹[27], 歸朮破癥湯[28] 등에서 유방암의 암세포성장 억제에 효과가 있다고 보고되고 있다.

五靈脂는 活血祛瘀藥에 속하며, 날다람쥐과에 속한 동물인 하늘다람쥐(날쥐, *Trogopterus xanthopes* Milne-Edwards)의 분변을 건조한 것으로 vitamin A류 물질과 수지, 뇨산, 뇨소 등을 함유하고 있으며 性은 溫하고 味는 苦甘하며 心, 肝經으로 귀경하는 약재로 活血止痛, 化瘀止血, 消積解毒의 효능을 가져 產後血瘀疼痛, 經痛, 產後惡露不下, 胃脘痛 등 모든 血瘀諸痛을 치료하며 馬兜鈴 檳榔 등을 배합하여 乳腫을 치료한다 하였다[8]. 이러한 五靈脂의 효능을 규명하는 한의학적 연구로는 항염증작용[9,10], 근종조직과 근종세포의 성장 억제작용[11] 항암작용[12]과 지혈작용[13]등에 대한 보고가 있으며 五靈脂가 포함된 처방의 항암효과[14-18]를 발표한 연구사례들은 볼 때 五靈脂가 항

암제로서의 역할을 할 수 있다는 가능성을 시사하고 있다.

내경[29]에는 血瘀가 오래되어 종괴가 내부에 형성된다 하였고, 치료에 活血化瘀藥이 관여한다는 최근 연구[30]를 보면 活血化瘀藥이 혈액순환을 촉진개선하고 혈관을 확장시켜 결체조직의 증식을 억제하여 종양의 성장 및 전이를 억제할 수 있다는 것을 알 수 있다. 이에 저자는 본 연구에서 五靈脂의 유방암에 대한 항암효과를 알아보기 위하여 인체 유래 유방암 세포인 MCF-7 세포에 TF를 처리하고, 세포증식율과 증식 형태에 미치는 영향을 살펴본 다음, Annexin V/PI double stain 방법을 통하여 어떤 type의 세포사멸이 일어나는지 살펴보았고, Caspase 3와 Caspase 9의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 연구의 결과에서 TF는 투여 농도 100 μg/ml 이상에서 유의한 수준의 세포 증식율 억제 효과를 보였으며, 50% growth inhibition 값(ID_{50})은 177.2 μg/ml이었다(Fig. 1). 이는 TF가 200 μg/ml 이하 농도에서 50% 이상의 세포 증식률 억제 효과를 발휘하는 것으로 해석된다. 이러한 경향은 세포 증식 밀도 및 형태 관찰 결과에서도 유사하게 나타났다. 세포 증식형태에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고, 처리 농도가 증가함에 따라 세포의 밀도가 감소하는 경향을 보였고, 또한, 고농도 투여군에서는 세포가 둥그렇게 위축되는 경향을 보이기도 하였다. 그러나, 전형적인 apoptosis의 형태를 찾기는 어려웠다(Fig. 2).

상기한 이유로 TF가 일으키는 세포사멸의 형태가 어떤 것인지 살펴보기 위하여 Annexin V/PI double stain을 시행하였다. Annexin V는 실험실에서 다용되는 일종의 형광 probe로 세포 표면에 존재하는 phosphatidylserine (PS)나 phosphatidylethanolamine(PE)에 결합하며, PS나 PE는 apoptosis를 포함한 몇 가지 세포 사멸 과정에서 발견된다[31-33]. 일반적으로 PI는 DNA 염색에 사용되며, 세포 생존율 측정, cell cycle analysis의 분석에 사용되며, 정상세포와 necrosis 또는 apoptosis를 일으키고 있는 세포의 구분에도 사용된다[34].

본 연구의 결과에서 TF는 농도 의존적으로 Annexin V positive(Q2, Q4)세포를 증가시켰으나, PI only positive(Q1) 영역에 속하는 세포의 수에 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 TF가 유방암세포에 일으키는 세포사멸이 apoptosis임을 시사한다. PI와 Annexin V double negative인 Q3 영역은 살아있는 정상세포, PI only positive인 Q1 영역에 속하는 세포는 necrosis, PI와 Annexin V double positive 영역인 Q2는 late apoptosis, Annexin V only positive 영역인 Q4는 early apoptosis라는 가정 하에 각각의 영역에 해당하는 세포의 비율을 좀 더 자세하게 살펴본 결과 정상세포는 정상군에서 96.6%였던 것이 200 μg/ml 투여군에서 76.9%로 감소하였고, Q2와 Q4를 합한 total apoptosis는 2.6%에서 22.2%로 증가하였다. 이에 반해 necrosis는 정상군 0.8%, 200 μg/ml 0.9%로 큰 차이가 없었다(Table 1).

Caspase는 cysteine-aspartic proteases 또는 cysteine-dependent aspartate-directed proteases라고도 하며, cysteine proteases family의 일종으로 apoptosis, necrosis 염증 반응 등에서 매우 중요한 역할을 담당

하는 단백질이다[35]. 특히 caspase는 apoptosis 뿐만 아니라 programmed cell death 전체의 조절에 관여함으로써 세포의 주기를 조절하게 되고, 나아가서 개체의 생명 유지에 직접적으로 관여하게 된다. 만약 이러한 caspase에 문제가 생겨 apoptosis가 정상적으로 이루어지지 않을 경우 자가면역질환, 암질환에 대한 이환율이 증가한다. Caspase family는 그 기능에 따라서 initiator(apical) caspase와 effector(executioner) caspase로 나눌 수 있으며, caspase 2, caspase 8, caspase 9, caspase 10 등은 initiator caspase에 속하고, caspase 3, caspase 6, caspase 7 등은 effector caspase에 속한다[36,37].

Apoptosis를 유발하는 경로는 크게 extrinsic과 intrinsic pathway로 나누어 볼 수 있는데, extrinsic pathway는 세포 표면에 위치하는 TNF-α receptor, Fas와 같은 death receptor와 밀접한 관련이 있으며, 이러한 death receptor에 ligand가 결합함으로서 apoptosis가 시작된다[38]. Effector caspase의 일종인 Caspase 3는 initiator caspase의 일종인 caspase 8이나 caspase 9에 의해서 활성화 될 수 있다[39].

본 연구의 결과를 살펴보면, TF의 처리는 caspase 9과 caspase 3의 발현양을 농도의존적으로 증가시켰다(Fig. 4, 5). 이러한 결과는 TF가 일으키는 apoptosis가 TFNR, Fas와 같은 death receptor를 자극함으로써 caspase 9을 활성화시키고, 그 결과 궁극적으로 caspase 3를 활성화시켜 유방암 세포를 apoptosis에 이르게 한 것으로 해석된다. 다만, Caspase 3는 intrinsic pathway에 속하는 cytochrome c에 의해서도 활성화되는 등[40] extrinsic과 intrinsic 두 가지 경로를 통하여 활성화될 수 있기 때문에 후속 연구를 통하여 좀 더 정확한 기전을 확인해야 할 것으로 생각된다.

이상을 정리하여 보면, TF는 인간 유래 유방암 세포 내에서 세포 표면에 존재하는 death receptor인 TNF-α receptor, Fas 등과 관계가 있는 caspase 9을 활성화시키고, 이어서 caspase 3를 활성화시켰다. Effector caspase인 caspase 3가 활성화됨으로써 농도 의존적으로 세포 증식률이 감소하였고, annexin V 양성인 세포를 증가시켰다. 이러한 결과는 TF가 인간의 유방암에 항암제로서 사용될 가능성이 있음을 시사한다.

Ⅳ. 결 론

五靈脂 추출물이 인간 유래 유방암 세포의 사멸에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인간 유래 유방암 세포주인 MCF-7 세포의 증식율을 농도의존적으로 감소시켰으며, ID_{50}은 177.2 μg/ml이었다.
2. 유방암 세포의 증식 밀도를 감소시켰으며, 그 양상은 세포 증식률에 미치는 영향과 유사하였다.
3. 농도의존적으로 Annexin V 양성인 apoptotic cell의 숫자를 증가시키는 경향을 보였다.
4. 농도의존적으로 effector caspase에 속하는 Caspase 3의 발현을 증가시켰다.
5. 농도의존적으로 initiator caspase에 속하는 Caspase 9의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로부터 五靈脂가 유방암 세포에서 caspase 의존적인 apoptosis를 일으킴을 알 수 있었으며, 추후 유방암

치료에 활용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

☐ Received : January 30, 2015
☐ Revised : February 01, 2015
☐ Accepted : February 07, 2015

참고문헌

1. Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer 2013;49:1374-403.
2. National cancer information center. Breast cancer statistics. 2013. Available from :URL: http://www.cancer.go.kr/mbs/cancer/jsp/cancer/cancer.jsp?cancerSeq=4757&menuSeq=4762&viewType=all&id=cancer__020112000000.
3. Shim JK. A study on dose analysis of lung and cardiac with respiration methods in radiotherapy of breast cancer. Graduate school of Health promotion Hanseo University. 2010.
4. Editing commission of Globooks. Gynecology. Daegu:Globooks. 2009:220.
5. Kim JJ, et al. A bibliographic study on the treatment of the breast mass. The Journal of Korean Obstetrics & Gynecology. 1998:12(4):29-43.
6. Hwang EK, Yi MS. Factors influencing quality of life in patients with breast cancer on hormone therapy. the Journal of Korean Academy of Nursing. 2014;44(1):108-17.
7. Chung, JW, Hwang EK, Hwang SW. Details of lymphedema, upper limb morbidity, and self management in women after breast cancer treatment. Korean Journal of Women Health Nursing. 2001;17(5):474-83.
8. The compilation committee of Herbalogy, University College of Korean Medicine. Herbalogy textbook of The national University College of Korean Medicine. Seoul:Yeongrimsa. 2005:464-5.
9. Moon CM. Inhibiting effect of faeces trogopterori on MCP-1 gene expression. Iksan:Graduate school of Korean medicine Wonkwang University. 2005:15-7.
10. Kim BJ, et al. Inhibitory effect of extract of trogopterorum faeces on the production of inflammatory mediaters. The Korea Journal of Herbology. 2009;24(3):153-60.
11. Oh YE. Effect of trogopterus xanthipes milen-edwards and paeonia lactiflora pallas extracts on uterine leiomyoma cell. Daegu:Graduate school of Kyung buk University. 2012:27-32.
12. Lee YW, Cho CK. Study on inhibition of metastasis of acute skin infection via method of promoting blood flow to eliminate blood stasis. Daejeon University, Institute of korean medicine, Thesis Collection. 1999;7(2):437-51.
13. Jeong G, Song BK, Koo BH. An experimental study on the effect to the serum prothrobin time in mouse by the pteropi stercus and tythae pollen extract administration. The Kyung Hee University Oriental Medical Journal. 1979;2(1):171-81.

14. Oh YS. Apoptotic effect of Sojucktang on human KLE endometrial cancer cells. Gyeonggi-do:Graduate school of Kyung Hee University. 2008:28-31.
15. Lee YS, et al. Clinical case report on the treatment of medicines for promoting blood circulation to remove blood stasis(沽血化瘀劑) on Three Patients With an Ovarian Cyst. The Journal of Korean Obstetrics & Gynecology. 2001;14(3):218-27.
16. Park YS, Kim DC, Baek SH. A report on 2 cases of Uterine myoma. The Journal of Korean Obstetrics & Gynecology. 2004;17(3):199-208.
17. Shin SW, et al. Study on apoptosis-inducing mechanism of Sujeom-san. The Korea Journal of Physiology & Pathology. 2001;15(5):745-56.
18. Shin WW, et al. Study on antitumor activity of Sobokchukeotang and Kamisobokchukeotang. The Journal of Korean Oriental Medicine. 2001;22(2):22-30.
19. The Society of Korean Obstetrics and Gynecology. Korean Obstetrics and Gynecology(2). Seoul:Euiseongdang. 2012:371-90.
20. Jone DB, et al. Cancer in the contralateral breast after radiotherapy for breast cancer. The New England Journal of Medicine. 1992;326:781-5.
21. Son SM. Predictive factors of fatigue in breast cancer patients undergoing chemotherapy. Busan:Kosin University. 2009:1-2.
22. Moxley G. Rheumatic disorders and functional disability with aromatase inhibitor therapy. Clinical Breast Cancer. 2010;10(2):144-7.
23. Huh J. Dong-Eui-Bo-Kham. Kyung Nam:Dong-Eui-Bo-Kham 2006:683.
24. Yong HS, Ko SG. Inhibition of cellular proliferation and apoptosis by scutellaria baicalensis in MDA-MB-231 breast cancer cells The Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2004;25(3):451-60.
25. Yang DS, Yang SJ. Effects of curcuma longa L. on MDA-MB-231 human breast cancer cells and DMBA-induced breast cancer in rats. The Journal of Korean Obstetrics & Gynecology. 2013;26(3):44-58.
26. Jeong KA, Park KM, Cho SH. Anti-proliferative effects of Sam-nueng (Sparganii Rhizoma) extract on MCF-7 cells. The Journal of Korean Obstetrics & Gynecology. 2006;19(1):166-177.
27. Song KC, et al. The clinical study in 60 cases for breast cancer patients on the effects by Hangamdan(抗癌丹). The Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2001;22(4):669-74.
28. Cho SH, Park KM, Ban HR. Anti-proliferative effects of Guichulpajing-Tang extract on MCF-7 cells. The Journal of Korean Obstetrics & Gynecology. 2006;19(1):155-65.
29. Hong WS. Whang Jae Nae Kyung. Seoul:Komoonsa. 1974:103-4, 249-68, 358-9.
30. Lee SH, Cho CK. A bibliographic study on the inhibitory of tumor growth,

and metastasic using Hwalhyulhwau. Daejeon University, Institute of korean medicine, Thesis Collection. 1998;7(1):700.
31. Meers P, Mealy T. Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan. Biochemistry. 1994;33(19):5829-37.
32. Koopman G, et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood. 1994;84(5):1415-20.
33. Vermes I, et al. A novel assay for apoptosis-flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. Journal of Immunology Methods. 1995;184(1):39-51.
34. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. Exp. Cell Res. 2002;277(1):1-14.
35. Alnemri ES, Emad S. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. Cell. 1996;87(2):171.
36. Chu ZL, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. A novel enhancer of the apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. J. Biol. Chem. 2001;276(12):9239-45.
37. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell. 1996;87(2):171.
38. S. Fulda, K-M. Debatin extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene. 2006;25(34):4798-811.
39. Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. Cell Death Differ. 2002;9(1):3-5.
40. Ghavami S, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. J. Med. Genet. 2009;46(8):497-510.