

蒲公英이 유방암 세포의 사멸에 미치는 영향

동신대학교 부인과학교실
서국장, 박경미, 조성희, 양승정

ABSTRACT

Effects of *Taraxaci Herba* on Cell Death in Breast Cancer Cells

Kook-Jang Seo, Kyung-Mi Park, Sung-Hee Joh, Seung-Jeong Yang
College of Korean Medicine, Graduate School of Dong-Shin University

Objectives: This study was designed to investigate the effects of *Taraxaci Herba* (TH) on cell death in breast cancer cells.

Methods: In this experiment, the effects of TH on proliferation rates, cell morphology and growth pattern, intracellular reactive oxygen species (ROS) production. In addition, the effects on nuclear condensation, fragmentation and formation of acidic vesicular organelles (AVO) in MCF-7 cells were also investigated. Finally, autophagy related with protein was observed by using western blot method.

Results: TH inhibited proliferation of MCF-7 cells, TH elevated intracellular ROS levels significantly. Treatment with TH did not affect nuclear morphologies such as condensation or fragmentation. On the other hand, TH treatment effectively induced AVO. Finally, one of autophagy related with protein, Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A (MAP1LC3A, LC3) level was elevated by treatment with TH.

Conclusions: These data indicate that TH is able to be used for patient with breast cancer and mechanisms are involved in autophagy through ROS generation.

Key Words: *Taraxaci Herba*, breast cancer cell, autophagy

I. 서론

유방암은 국제암연구소 통계상 2008년 여성암 발생률 분석에서 일본, 미국, 영국 등에서 1위를 차지하고 있으며 우리나라의 유방암 발생빈도는 2011년 약 14.8%로 여성암 중 갑상선암 다음으로 발생빈도가 높다. 또한, 1999년 이후 연평균 여성의 유방암 증가율은 6.1%로서 그 증가 속도도 갑상선암 다음으로 높다¹⁾.

유방암의 증상으로는 유방종괴, 유방통, 병적 유두 분비물 등이 있으며 이에 대한 서양의학적인 치료로는 유방절제술이 있으며, 수술 후 보조 요법으로 화학요법, 방사선요법, 면역 요법, 호르몬제 투여 등이 시행되고 있다^{2,3)}. 이러한 서양의학적 치료로 사망률은 감소하고 있으나, 유방절제술의 경우 여성에게 심각한 정신적 후유증을 남기며 화학 및 방사선 요법의 경우 심각한 신체적 부작용과 삶의 질적 저하를 유발하고 있어⁴⁾, 이에 부작용이 적고, 삶의 질을 높일 수 있는 새로운 항암 치료에 대한 개발이 필요한 실정이며 한의학적 치료의 관심은 지속적으로 증가할 것이다.

유방암과 유사한 한의학적 질환으로 石癰⁵⁾, 乳巖⁶⁾, 奶巖⁷⁾, 番花奶⁸⁾, 姝巖⁹⁾ 등이 있다. 乳房腫塊가 주 증상으로 不痛, 不痒, 不赤하고 혹 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體倦瘦, 月經不調 등이 나타나기도 한다^{6,10)}. 內因으로서 七情不調, 특히 憂怒鬱結, 抑鬱이 先行要因이자 主要因으로 간주되며 정신적 스트레스를 받기 쉬운 翁姑夫婦나 不得於夫者, 中年婦人 등에 게서 다발한다¹¹⁾. 치료는 초기에 疎氣行血之法이 기본이 되며 氣血虧損한 상태

에서는 補氣補血을 겸하는 치법이 이용되었다¹²⁾.

蒲公英(*Taraxaci Herba*, TH)은 국화과에 속한 다년생 草本인 민들레의 전초를 曬乾한 것으로 清熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋하는 효능이 있어 疔瘡腫毒, 乳癰, 瘰癧, 目赤, 咽痛, 肺癰, 腸癰, 濕熱黃疸, 熱淋澀痛에 응용하여 치료하는 藥材이다¹³⁾. 蒲公英의 항염 및 면역활성 등의 연구¹⁴⁻⁶⁾와 간암, 폐암에 대한 연구^{17,18)} 결과가 보고되고 있으나 유방암에 대한 항암 효과에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 蒲公英(TH)의 유방암 세포주에서의 항암효과를 살펴보기 위하여 본 연구를 진행하였으며, TH가 유방암 세포주의 증식률과 세포 증식 형태에 미치는 영향, Reactive oxygen species(ROS)에 의한 산화적 스트레스의 발생 정도, 형광 물질인 Hoechst 33342와 acridine orange를 이용하여 세포 사멸의 형태 확인, 자가포식(autophagy) 관련 단백질의 생성에 미치는 영향을 western blot법으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 세포주

인간 유래 악성 유방암 세포주(breast cancer cell line)인 MCF-7 cell은 한국세포주은행(서울, 한국)으로부터 냉동상태로 구입하여 사용하였다. 분주 받은 세포주는 해동되어 배양액 속에 분주된 후, 3회 이상 계대 배양하여 실험실 환경 및 기타 배양 환경에 충분히 적응시킨 후 증

식물(Doubling Time)이 구입처에서 제공한 자료와 거의 일치하게 되었을 때, 충분히 적응하였다고 생각하고 실험에 사용하였다.

2) 약제의 준비

본 실험에 사용된 蒲公英(*Taraxaci Herba*, TH)은 국화과에 속한 민들레 *Taraxacum mongolicum* Hand Nazz.의 전초로 동신한방병원을 통하여 구입, 정제하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Fetal bovine serum(Gibco, USA) 및 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium, high glucose, Gibco, USA)은 Life technologies(서울, 한국)를 통해 구입하여 사용하였으며, 2,7-Dichloro-fluorescein diacetate(DCFH-DA)은 Eastman Kodak(Rochester, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. Penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl), Trypsin-EDTA, Hoechst 33342 및 기타 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)제품을 구입해 사용하였다. 측정을 위해 Microplate reader(Bio-rad, CA), 광학 현미경(Olympus, Japan), 형광현미경(ZEISS, Germany)등이 사용되었다.

2. 방 법

1) 약물의 준비

세척되고 세절된 상태로 구입된 蒲公英 50 g을 메탄올 1,000 ml를 이용하여 상온에서 24시간 추출하여 모아진 추출액을 원심분리하여 찌꺼기는 버리고 상층액을 모은 다음, 와트만지(Watman paper)를 이용하여 2회 반복 여과하였다. 여과가 끝난 추출액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음 동결 건조되었다. 최종적으로 얻어진 동결

건조 분말 (*Taraxaci Herba*, TH)은 8.6 g으로 수율은 17.2%였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관되었다.

2) 세포주 배양 환경

유방암 세포주인 MCF-7의 생육 배지로는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium, high glucose, Gibco) 배지에 10% fetal bovine serum(Gibco, FBS)와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl)을 첨가하여 사용하였고, 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였다. 부착세포의 탈착을 위해서 Trypsin-EDTA(Sigma)를 사용하였으며, 5% CO₂가 공여되는 배양기 속에서 37°C를 유지하며 배양되었다.

3) 세포 증식률에 미치는 영향 측정

세포 증식률에 미치는 영향은 세포수 측정 kit(Cell Counting Kit-8 kit, CCK-8, dojindo, Japan)를 이용하여 진행되었다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 웰당 5×10³개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 TH를 에탄올에 녹인 다음, 최종 농도 400, 200, 100, 50, 25, 0 µg/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 ul의 CCK-8 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader(Bio-rad, CA)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

24-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 웰당 1×10^5 개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 TH를 에탄올에 녹인 다음, 최종 농도 400, 200, 100, 50, 25, 0 µg/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 광학 현미경(Nicon, Japan)으로 관찰하였다(x100).

5) ROS(Reactive oxygen species) 측정

형광 probe의 일종인 DCFH-DA를 이용하여 세포 내에서 발생하는 ROS(Reactive oxygen species)를 측정하였다. 측정과정을 요약하면, 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 웰 당 5×10^3 개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 TH를 에탄올에 녹인 다음, 최종 농도 400, 100, 25, 0 µg/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 1시간 동안 배양하였으며, DCFH-DA는 50 µM의 농도로 45분간 처리하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 제거하고, 각 well당 100 µl의 인산완충액을 채워준 다음, 형광광도계(TECAN, USA)를 이용하여 형광강도를 측정하였다(excitation at 485 nm, emission at 530 nm).

6) Hoechst 33342 염색

형광 염색 물질인 Hoechst 33342를 이용하여 세포핵의 응축이나 분절을 관찰

하였다. 실험 과정을 간단히 요약하면, 멸균된 cover glass(12 mm, Deckglaser, Germany)를 24-well plate에 넣고, 웰 당 1×10^5 개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 TH를 에탄올에 녹인 다음, 최종 농도 400, 100, 25, 0 µg/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 다시 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 4% paraformaldehyde solution으로 15분간 고정하고, 인산완충액(PBS)으로 수세하였다. 고정된 세포에 10 mM의 Hoechst 33342 용액을 10분간 처리하고 수세한 다음 형광현미경(ZEISS, Germany)을 이용하여 세포핵의 형태를 관찰하였다(x400).

7) Acridine orange 염색

자가포식(Autophagy) 과정에서 발생하는 lysosome과 같은 산성 소포성 세포기관(acidic vesicular organelle, AVO)을 염색하기 위하여 형광 물질의 일종인 acridine orange를 사용하였다. 실험 과정을 요약하면, 멸균된 cover glass(12 mm, Deckglaser, Germany)를 24-well plate에 넣고, 웰당 1×10^5 개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 TH를 에탄올에 녹인 다음, 최종 농도 400, 100, 25, 0 µg/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 다시 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 인산완충액으로 간단히 수세하고, 세포가 붙어있는 cover glass를 slide

glass에 부착시킨 다음 형광현미경(ZEISS, Germany)을 이용하여 관찰하였다(x 200).

8) Western blot

Autophagy 관련 유전자 (autophagy-related genes, ATG)에 의하여 만들어지는 단백질 중 하나인 Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A(MAP1LC3A, LC3)의 세포내 발현 정도를 측정하기 위해 western blot 방법을 사용하였다. 먼저 100 mm dish에 1×10^5 개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 TH를 에탄올에 녹인 다음, 최종 농도 400, 100, 25, 0 µg/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 다시 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 세포를 수거하여 단백질을 추출하였다. 단백질 추출을 위하여 RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin (5 mg/ml), and aprotinin(5 mg/ml)]를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 10% SDS polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였고, polyvinylidene fluoride membranes에 transfer되었다. 단백질이 transfer된 membrane을 blocking solution(5% skim milk in Tris-buffered saline(TBS, pH 7.6) containing 0.1% Tween-20(TBST))을 이용하여 실온에서 1시간 동안 blocking을 시행한 다음, MAP1LC3A(LC3) antibody(Cell signalling,

USA)를 1:5000 비율로 희석하여 처리하고 4°C에서 12시간(overnight) 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, TBST로 3회 수세하고, peroxidase가 부착된 2차 항체를 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 2 ml의 SuperSignal West-Femto reagent(Pierce, Rockford, IL, USA)으로 발색시켜 관찰하였다.

3. 통계 처리

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. 성 적

1. 세포 증식률에 미치는 영향

세포 증식률에 미치는 영향을 관찰한 결과 100 µg/ml 이상에서 유의한 세포 증식률 감소가 관찰되었다. 100, 200, 400 µg/ml의 TH를 처리한 군의 생존율은 각각 87.1±2.4%, 75.9±3.2%, 54.2±4.5%였다 (Fig. 1).

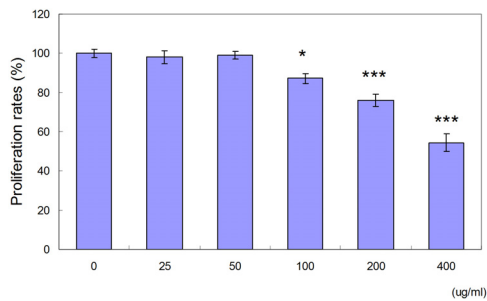


Fig. 1. Effects of TH on proliferation rates in MCF-7 cells.

Proliferation rates were measured using CCK-8 kit for 24 hrs in various concentrations. Values are represented as mean±SD, *p<0.05, ***p<0.001 vs. non-treated control.

2. 세포 증식 양상에 미치는 영향

TH를 처리하지 않은 유방암 세포에서는 특별한 세포형태 및 증식 밀도의 변화를 관찰할 수 없었고(Fig. 2A), 저농도인 25 µg/ml 또는 50 µg/ml 투여군에서도 특별한 이상변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 2B, C). 100 µg/ml 투여군에서부터 세포사멸의 흔적이 보이기 시작했으며, 농도가 올라갈수록 이러한 양상은 심해졌다(Fig. 2D ~ F).

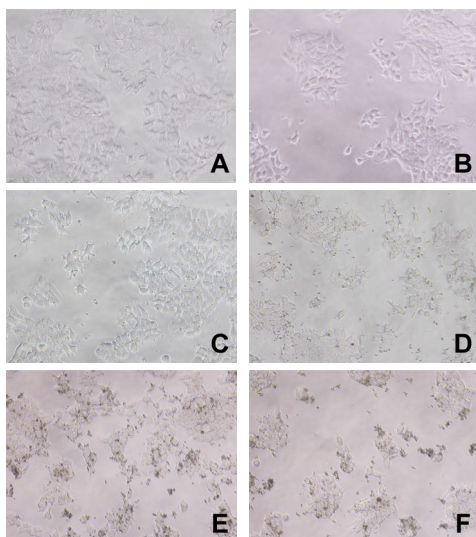


Fig. 2. Effects of TH on cell morphology

and growth pattern in MCF-7 cells.

Cell morphology and growth pattern were observed using light microscope (200x magnifications).

3. ROS 생성에 미치는 영향

저농도 투여군인 50 µg/ml에서는 대조군에 비하여 ROS 생성량이 감소하였으며, 중농도와 고농도인 200 µg/ml 및 400 µg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 수준의 ROS 상승이 관찰되었다. 50 µg/ml, 200 µg/ml 및 400 µg/ml 투여군의 ROS 생성량은 각각 89.2 ±2.1, 121.7±6.5, 144.5±7.2였다(Fig. 3).

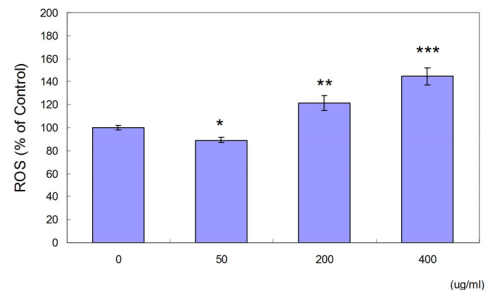


Fig. 3. Effects of TH on ROS in MCF-7 cells.

Intracellular ROS levels were detected using DCFH-DA. TH was treated for 1 hr. Values are represented as mean±SD, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. non-treated control.

4. 세포핵의 형태 변화에 미치는 영향

형광 물질인 Hoechst 33342로 염색하여 관찰한 결과 정상군과 저농도 투여군인 25 µg/ml에서는 세포핵, 개체수 등에서 특별한 변화를 관찰할 수 없었고(Fig. 4A, B), 100 및 400 µg/ml에서는 세포 개체수가 감소하였으나, 세포사멸의 일종인 apoptosis에서 흔히 관찰되는 세포핵의 응축, 분절 등의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4C, D).

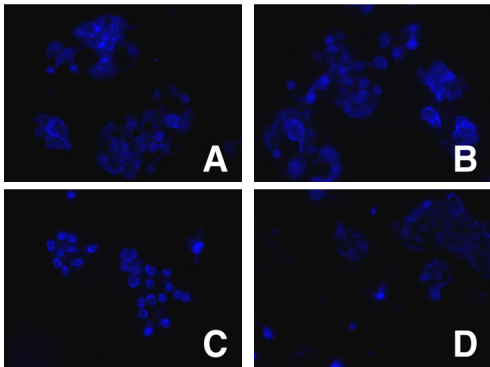


Fig. 4. Effects of nuclear condensation and fragmentation in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with 0, 25, 100, 400 µg/ml of TH for 24 hrs, then stained with Hoechst 33342. Nuclear morphologies were observed using fluorescence microscope (x400).

5. 세포 내 산성 소포성 세포 기관 생성에 미치는 영향

형광 물질인 acridine orange로 염색하여 관찰한 결과 대조군 및 25 µg/ml 투여군에서는 특별한 산성 구조물이 발견되지 않았으며(Fig. 5A, B), 100 µg/ml 및 400 µg/ml 투여군에서는 산성 구조물이 발견되었으며, 400 µg/ml 투여군에서 더 많은 산성 소포성 세포기관을 발견할 수 있었다(Fig. 5C, D).

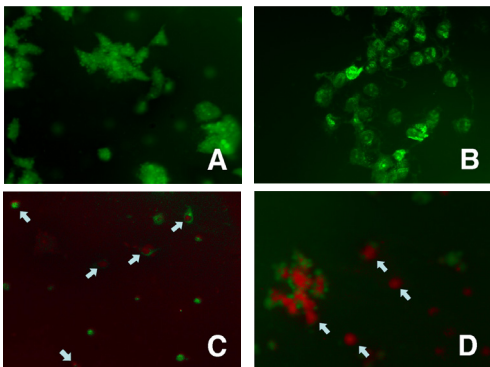


Fig. 5. Effects of TH on AVO in MCF-7 cells. Acidic vesicular organelles (AVOs) were stained using acridin orange and observed using fluorescence microscope (x400).

6. Autophagy 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Autophagy 관련 단백질의 일종인 LC3의 세포 내 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 western blot를 시행한 결과 처리한 TH 농도 의존적으로 LC3의 발현이 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 6).

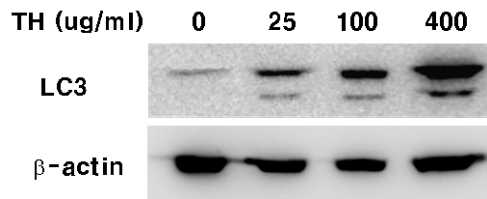


Fig. 6. Effects of TH on intracellular level of LC3 in MCF-7 cells. Intracellular level of LC3 in MCF-7 cells was measured using western blotting method.

IV. 고 찰

유방암은 미국을 비롯한 서구 국가에서 여성의 가장 흔한 암으로 보고되고 있고, 한국 여성의 유방암 발생비율도 뚜렷한 증가 추세를 보이고 있다. 보건복지부와 중앙암등록본부의 국가암등록 통계사업에 따르면 유방암 발생빈도는 2011년 14.8%로 여성암 중 갑상선암 다음으로 발생빈도가 높으며 여자 10만 명당 유방암 발생빈도는 1996년 16.7명에서 2011년 63.7명으로 발병률이 세 배 이상 증가하였다¹⁾.

유방암의 증상으로는 유방종괴, 유방통, 병적 유두 분비물 등이 있으며 위험인자로는 나이, 성별, 유전적 인자, 개인의 병력, 에스트로겐 노출, 호르몬 요법의 시행 등이 있다. 또한 과거에 유방암을 앓았던 경우나 초경을 일찍 시작한 여성, 폐경이 늦은 여성 및 비만 여성들은 고농도의

에스트로겐에 장기간 노출되어 유방암의 발생이 더욱 증가하는 것으로 알려져 있다. 치료법으로는 근치유방절제술이 시행되고 있으며, 수술 후 보조요법으로 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬제 투여 등이 있다^{2,3)}. 최근에는 유방을 최대한 보존하기 위하여 초기 유방암환자를 대상으로 유방보존술식을 시행하고 있지만 여전히 방사선치료 및 항암화학요법을 지속해야 하며 이로 인한 부작용으로 신체적 불편감은 물론 삶의 질에도 부정적인 영향을 미치고 있다⁴⁾. 따라서, 서양의학적 치료의 부작용과 그 한계점에 봉착한 환자들은 새로운 치료법에 관심을 가질 수밖에 없고, 이에 한의학적 치료에 대한 기대치는 점차 증가하고 있다.

유방암과 유사한 한의학적 질환으로 石癰⁵⁾, 乳巖⁶⁾, 奶巖⁷⁾, 番花奶⁸⁾, 姝巖⁹⁾ 등으로 볼 수 있고, 증상으로는 乳房腫塊, 不痛, 不痒, 不赤하고 혹 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體倦瘦, 月經不調 등이 나타나기도 한다^{6,10)}. 龔廷賢의 《萬病回春·乳巖》에서 “처음에는 멍울처럼 부었다가 바둑알 만하게 되면 통증은 없고 가렵지도 않다가 5~7년 되면 혈기 시작한다. 바위굴처럼 구멍이 나거나 사람의 입과 입술처럼 생기게 되면 붉은 즙액과 고름 섞인 물인 나온다”고 하여 乳巖의 진행되는 과정을 묘사하였다¹⁹⁾. 여러 문헌에서 진행단계에 따른 예후에 대해 언급하였는데, 陳實功의 《外科正宗·乳癰論》에서 “凡犯此者, 百人百必死”라 하였으며¹²⁾, 朱震亨은 《丹溪心法附餘·癰疽》에서 “수년이 지나瘡이 생기고 움푹 패이게 되면 치료할 수 없다”고 하여 유암의 예후가 불량함을 서술하였다²⁰⁾.

유암의 病因은 內因, 外因, 不內外因으

로 나눌 수 있으나, 內因으로서 七情不調, 특히 憂怒鬱結, 抑鬱이 主要因으로 간주된 것은 乳房과 肝經과의 관계에서 根源을 찾을 수 있다. 肝主疎泄의 작용이 원활하지 못하면 肝氣鬱滯되어 乳房에 그 形象이 나타나게 되므로 정신적 스트레스를 받기 쉬운 翁姑夫婿나 不得於夫者, 中年婦人 등에게서 다발한다¹¹⁾. 張景岳은 《景岳全書·婦人規·乳房病》에서 乳巖은 肝脾二藏에 속하며 鬱怒氣血虛損이 원인이라 하여 七情氣鬱과 氣血虛損을 함께 언급하였다¹⁰⁾. 外因으로서 羅元愷은 《外科眞詮》에서 寒氣를²¹⁾, 不內外因으로서 朱震亨은 《丹溪心法附餘·癰疽》에서 厚味所釀의 不內外因을 언급하였으나²⁰⁾ 유암의 원인으로 外因은 직접적인 관계가 없으며 不內外因은 單獨病因 보다는 七情氣鬱의 복합요인으로 인식하고 있다¹¹⁾.

治法으로는 疎氣行血之法이 기본이 되며 氣血虧損한 상태에서 다발하게 되므로 補氣血法도 겸하게 된다. 薛己는 《校注婦人良方大全·瘡瘍門·乳癰乳巖方論》에서 乳巖의 초기 치료에 있어서 疎氣行血의 治法을 강조하면서 行氣破血해서는 안된다고 서술하였으며²²⁾ 張景岳은 《景岳全書·婦人規·乳房病》에서 노동을 많이 하여 腫痛할 때는 補氣血을 爲主로 하고 怒하여 腫痛할 때는 養肝血을 爲主로 하라 하여 補氣補肝補血의 治法을 겸하였다¹⁰⁾.

또한, 변증에 따른 치법으로 肝鬱氣滯에는 疎肝理氣, 軟堅散結하고 肝腎陰虛에는 滋補肝腎하며 瘀毒內毒에는 活血化瘀의 치법이 활용되었다³⁾.

2000년대 이후 다양한 한약재에 대한 유방암의 항암효과에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 단일약물제제로는 귀

전우, 울금, 감초, 하고초, 황금, 천궁, 삼릉, 어성초, 유근피, 단삼 등이 연구되었고, 혼합제제로는 귀출과징탕, 활락효영단, 익기양영탕, 굴엽산변방 등에 대한 연구가 이루어졌다²³⁾. 이들 연구는 한약재 추출물의 항암, 항산화, 암전이억제 효과를 밝혔으며 또한 유방암 세포의 증식을 억제하고 세포분화나 세포사에 영향을 주는 것으로 보고되었다.

蒲公英은 菊花科에 속한 다년생 草本인 민들레의 全草를 曬乾한 것으로 苦甘寒한 性味가 淸熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋하는 효능이 있어 外科의 각종 熱毒, 癰腫과 기타 熱毒으로 인한 疔瘡腫毒, 乳癰, 瘰癧, 目赤, 咽痛, 肺癰, 腸癰, 濕熱黃疸, 熱淋澀痛에 응용하여 치료하는 藥材이다. 또한 疎鬱通乳 작용을 겸하고 있어 乳癰치료에 더욱 양호해 乳癰초기에 紅腫堅硬하고 膿腫이 아직 형성되지 않은 증상에 뚜렷한 치료효과가 있다¹³⁾. 포공영에 대한 최근 연구 발표를 살펴보면 항염 및 면역활성 등의 연구가 보고되고 있으며¹⁴⁻¹⁶⁾, 간암, 폐암 등에 대한 항암 효과에 대한 연구가 보고 되고 있으나^{17,18)} 유방암에 대한 항암 효과에 대한 기전 연구는 없었다. 이에 본 저자는 유방암 치료에 쓰였던 굴엽산 처방의 구성약물이면서 청열해독작용이 있고 항염, 항산화 및 면역활성 효과가 있는 蒲公英(TH)에 대하여 유방암 세포주에 대한 항암효과와 기전을 살펴보기 위하여 본 연구를 진행하였다.

세포사멸의 방식은 세포예정사(Programmed cell death, PCD)와 예기치 않은 세포사멸(Unprogrammed cell death, UCD)로 나눌 수 있는데, 세포예정사는 세포의 다양한 신호전달기전을 조절하고, 항상

성을 유지하는 세포의 정상적 기전이라고 할 수 있다. 예기치 않은 세포 사멸에는 대표적으로 괴사(Necrosis)가 있는데, 이는 세포에 물리적 충격과 같은 외적 요인에 의하여 발생한다. 세포예정사는 크게 세포고사(Apoptosis, PCD type I)와 자가포식(Autophagy, PCD type II)으로 구분할 수 있다²⁴⁾.

세포예정사는 세포의 분열과 함께 가장 기본적인 정상적인 생물학적 특성이며, 생체는 이를 통하여 생체는 세포 수를 조절하고, 비정상적인 발달을 제어한다. 기능이 끝나 더 이상 필요하지 않은 세포를 제거하거나, 정상세포가 암세포로 변화되는 경우나 바이러스에 감염된 경우와 같이 문제가 발생한 세포를 제거하는 기능이 세포예정사의 가장 주된 기능이라고 할 수 있다²⁵⁾. 따라서, 이러한 기능의 활성화는 암 치료에 매우 중요한 인자 중의 하나이다.

세포고사는 세포의 자살 메커니즘 경로를 주관하는 유전자의 활성화를 통해 세포의 구조 단백질과 유전물질을 파괴하는 것으로 Bcl-2와 Bcl-xL과 같은 세포사멸을 억제하는 단백질(anti-apoptotic protein)의 기능이 저해되거나, Bax와 Bak과 같은 세포사멸을 유도하는 단백질(pro-apoptotic protein)의 활성화에 의하여 발생한다²⁶⁾. 자가포식은 세포 내에서 손상된 단백질, 세포 내 소기관 등을 탐식하는 과정으로 세포막과 유사한 형태의 지질이 이중막으로 구성된 액포(membranous vacuole)가 세포 내 소기관을 둘러싸서 autophagosome을 형성하고 형성된 autophagosome이 기존의 lysosome과 합쳐져 autolysosome을 형성하는 과정을 거쳐 세포 내 소기관이 분해되고 궁극적으로 세포사멸에 이르는

과정을 거친다²⁷⁾. 이들 과정들은 외부적인 환경 변화 즉 영양분의 고갈, 감염, 산소 결핍 등에 의하여 유도될 수 있다^{28,29)}.

본 연구의 결과에서 TH는 100 µg/ml 이상 처리에 의하여 농도 의존적으로 유방암 세포주의 증식률을 감소시켰다(Fig. 1). 이러한 결과는 TH가 유방암 세포주의 증식을 유의하게 억제함을 의미한다. 또한, 세포 증식 형태와 세포 형태 관찰 결과에서도 100 µg/ml 이상 농도에서 점진적인 세포 개체 수의 감소가 나타났으며(Fig. 2), 이는 세포 증식률의 결과와 일치한다. 세포 형태 관찰에서는 세포고사와 같은 세포예정사의 전형적인 모습이 관찰되지 않았으며, 고농도군으로 갈수록 세포수가 감소하고 죽은 세포의 검은 흔적이 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2).

산화적 스트레스는 다양한 경로로 세포사멸에 관여함이 알려져 있다. 대표적으로 ROS에 의한 산화적 스트레스가 정상세포 및 암세포의 세포예정사에 직접적으로 관여하며, 세포고사 및 자가포식을 유발할 수 있음이 알려져 있다^{30,31)}. 이에, 본 연구에서도 TH의 세포사멸 기전과 산화적 스트레스의 연관성을 살펴본 결과 200 µg/ml 이상 농도에서 유의한 수준으로 ROS의 수준이 상승함이 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 TH의 암세포 사멸 기전이 산화적 스트레스로부터 시작된다는 증거로 해석된다. 본 연구의 결과에서 저농도인 25 µg/ml 처리는 ROS를 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 3). 이는 저농도의 TH가 항산화 효과를 발휘하기 때문으로 해석된다. 이러한 결과는 25 µg/ml 이하에서 유방암 세포의 증식률을 감소시키지 못한 연구 결과와 일맥상통한다.

TH는 시험관 내에서 그리고, 인간 유래 피부 각질화 세포에서 항산화 효과를 발휘하는 것이 알려져 있다^{32,33)}. 이러한 결과를 종합적으로 고려하면, TH의 항암 효과는 산화적 스트레스에 기인하며, 저농도에서 발생하는 항산화 효과는 암세포와 정상세포에 또 다른 다양한 영향을 미칠 것임을 알 수 있다. 이는 한약재의 경우 많은 활성성분이 상호 복합적으로 작용하기 때문에 생체 내에서 다양한 반응을 보일 수 있다는 측면 때문인 것으로 생각된다. 실제로 많은 한약재들은 항산화 작용과 항암 작용을 각각 가지고 있음이 알려져 있으나^{34,35)}, 항산화 작용과 항암작용의 명확한 기전과 작용에 대해서는 알려진 바가 적다.

산화적 스트레스에 의하여 세포예정사가 일어날 수 있다는 사실은 잘 알려져 있다. 따라서, 본 저자는 TH에 의하여 유발되는 세포 사멸의 형태가 어떤 것인지 알아보기 위하여 형광 물질을 이용하여 세포핵의 형태와 산성 구조물의 유무를 관찰하였다. 형광 염색에 사용된 Hoechst 33342는 bisbenzimidazole이라고 하며, 일종의 organic compound로 DNA를 염색할 수 있다. Hoechst 33342는 DNA의 A-T(아데닌-티민) 결합이 풍부한 곳에 결합하며 파란색 형광을 띠기 때문에 세포핵의 형태를 관찰할 수 있다³⁶⁾. 본 연구의 결과를 살펴보면, 농도 의존적으로 세포의 개수가 감소하였을 뿐, 세포고사의 전형적인 특징인 세포핵의 응축, 분절 등이 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이는 TH가 일으키는 세포예정사는 apoptosis가 아닐 가능성이 높음을 시사한다. 따라서, 본 연구자는 세포예정사의 두 번째 형태인 자가포식의 가능성을 염두에 두고 acridine

orange 염색을 시행하였다.

세포예정사 type I인 세포고사는 cysteine aspartases(caspases)와 mitochondria의 기능과 관련한 다양한 factor들 간의 연쇄 반응을 통하여 일어나며, 일반적으로 세포핵의 응축과 분절을 동반하는데 반해³⁷⁾, 세포예정사 type II인 자가포식은 세포핵의 응축이나 분절과 같은 특별한 세포핵의 변화가 없이 세포질의 자가포식에 의해서 일어난다. 세포질의 자가포식에 관여하는 것이 autolysosome이며, 이는 산성을 띠기 때문에 산성 소포성 세포기관(acidic vesicular organelles, AVO)이라고 부른다. 이러한 AVO는 형광 물질인 acridine orange에 의하여 형광 염색이 가능하다^{37,38)}. 본 연구의 결과에서 100 µg/ml과 400 µg/ml 투여군에서 AVO가 관찰되었으며, 400 µg/ml에서 더 많은 AVO가 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 TH의 세포사멸 기전이 자가포식과 연관될 가능성이 매우 높음을 시사한다.

Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A(MAP1LC3A, LC3)은 자가포식의 주요한 마커중의 하나로 autophagy related gene 8(ATG8)과 생물학적 동등성을 가진다. LC3는 자가포식 과정 중에 발생하는 autophagosome의 membrane에 존재하는 인지질의 일종인 Phosphatidylethanolamine의 C-terminus에 결합하며, protein kinase A에 의하여 인산화된다³⁹⁾. LC3가 인산화되어 활성화되면 세포 내로 신호가 전달되어 자가포식과정이 진행되게 된다. 본 연구 결과에서 TH의 처리는 농도 의존적으로 LC3의 발현을 증가시켰다(Fig. 6). 이는 TH의 세포사멸 기전이 자가포식임을 증명하는 결과라고 할 수 있다.

선행 연구를 통하여 ROS가 자가포식

을 일으킬 수 있음이 알려져 있다⁴⁰⁾. He 등⁴⁰⁾ ROS에 의해 세포내 기관이 손상되고, 이러한 손상에 기인하여 자가포식이 발생할 수 있음을 언급하였다. 따라서, 이러한 내용을 감안하면, TH는 유방암 세포 내에서 산화적 스트레스를 유발함으로써 자가포식을 일으키는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과에서 볼 때, TH는 유방암 세포의 증식률을 감소시키고, 유방암 세포의 세포예정사를 촉진시킬 수 있는 약물로 생각할 수 있다. 이러한 결과는 추후 유방암 환자의 치료에 참고할 수 있을 것이며, 아울러 이의 명확한 기전 탐구를 위한 후속연구가 진행되어야 할 것이다.

V. 결 론

蒲公英 추출물(TH)이 유방암 세포주인 MCF-7 세포의 사멸에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유방암 세포의 증식률을 유의한 수준으로 감소시켰다.
2. 유방암 세포의 사멸을 유도하고, 형태를 비정상적으로 만들었다.
3. 유방암 세포 내에서 ROS 생성을 유의한 수준으로 증가시켰으나 세포핵의 응축, 단절 등의 변화에는 특별한 영향을 미치지 않았다.
4. 세포 내의 산성 소포성 세포 기관을 증가시켰다.
5. 세포 내에서 autophagy related protein의 일종인 LC3의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 蒲公英 추출물(TH)의 항암효과를 볼 수 있었으며, 蒲公英의 항암효과는 ROS의 생성을 통한 자가포식(autophagy)과 관련 있음을 알 수 있었다.

□ Received : April 16, 2015

□ Revised : April 27, 2015

□ Accepted : May 06, 2015

참고문헌

1. National Cancer Information Center. Cancer facts & figures. 2014. Available from: URL: http://www.cancer.go.kr/mbs/cancer/jsp/album/gallery.jsp?addCancerTitle&spage=3&boardId=31817&boardSeq=4580992&mcategoryId=&id=cancer__050207000000.
2. Korean Society of Obstetrics and Gynecology. Gynecology(4). Seoul: Korea Medical Book Publisher Co. 2013:931-48.
3. The Society of Korean Obstetrics and Gynecology. Korean Obstetrics and Gynecology(2). Seoul:EuiSeongDang. 2012:393-9.
4. Han MO, et al. Body image and physical discomfort during the period of radiotherapy in breast cancer patients with breast conserving operation. Graduate School of Industry University Of Ulsan. 2014.
5. So WB. Jaebeongwonhuron. Seoul: Daesung Publishers. 1992:296.
6. Jin JM. Buindaejeonyangbang. Seoul: Jungdam Publishing. 1993:72.
7. Woo D. Uihakjungjeon. Seoul:Seongbosa Publishing. 1986:310.
8. Ju S. Bojaebang. Beijing:Beijing Publishing. 1988:1-3.
9. Huh J. Donguibogam. Seoul:Bubin Publishers. 2007:765.
10. Jang GB. Kyoungakjeonseo. Seoul :Hanmi Medical Publishing. 2006: 1841-2.
11. Kim JJ, et al. A bibliographic study on the treatment of the breast mass. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 1998;11(2):29-43.
12. Jin SG. Oeguwaajeungjong. Beijing: People's Medical Publishing House. 1964:144-5.
13. Nationwide College of Oriental Medicine, Herbalism edited by Professor. Herbalism. Seoul:Younglim Inc. 2006:245-7.
14. Hwang KJ, et al. A study of the anti-inflammatory effects of *Taraxaci Herba*. Gyeonggi-do:Graduate school of Korean Medicine Gachon University. 2011.
15. Ham DH, et al. Anti-inflammatory activity of *dandelion* in animal models. The Korea Journal of Physiology & Pathology. 2008;22:810-4.
16. Yea HK, et al. Study of immunomodulating activities of the fractions from *Taraxacum officinale*. Gyeongsangnam-do:Department of Microbiology, Graduate school Inje University. 2005.
17. Lee BH, et al. Apoptosis Induction Effect of Hepatoblastoma by *Taraxacum officinale*. Iksan:Graduate school of

- Korean medicine Wonkwang University. 2001.
18. Sun T, et al. Effect of aconiti lateralis radix praeparata and taraxaci herba on chinese medicine signs and symptoms of urethane-induced lung cancer in mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2012 Oct;37(20):3097-101.
 19. Gong JH. ManByeungHweochun. Beijing: People's Medical Publishing House. 1990:373.
 20. Ju JH. Dangyeasimbubburok. Seoul: Daesung Publishers. 1993:585-9.
 21. Ra WG, et al. Gynecology of traditional Chinese Medicine. Beijing: People's Medical Publishing House. 1988:44-50.
 22. Sul G. Kyojubuinyangbang yeokhae. Seoul:Jungdam Publishing. 2011:798-804.
 23. Lee JH, et al. Meta Analysis of researches about herbal extracts used in breast cancer in South Korea since 2000. Daejeon University, Institute of korean medicine, Thesis Collection. 2007;16(2):241-9.
 24. Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol*. 2004;14(4):184-93.
 25. Lee KJ, et al. Analysis of paper related herba of anti-cancer effects by Autophage. Daejeon University, Institute of korean medicine, Thesis Collection. 2012;20(2):91-8.
 26. Lorenzo HK, Susin SA. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase independent programmed cell death. *Drug Resist Updat*. 2007;10(6):235-55.
 27. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy :molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005;12:1542-52.
 28. Bursch WA, et al. Active cell death: role in hepatocarcinogenesis and subtypes. *Biochem Cell Biol*. 1994;72(11-12):669-75.
 29. Dunn WA Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the utophagic vacuole. *J Cell Biol*. 1990;110(6):1923-33.
 30. Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 2007;17:422-7.
 31. Guo WJ, et al. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(5):577-82.
 32. Cheon SJ, et al. Study on the application of cosmetic agent and antioxidative activity of *Taraxcum platycarpuma*. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*. 2007;13(1):293-7.
 33. Kim HW, et al. Protective effects of keratinocytes and antioxidative effects of *Taraxaci Herba* Extracts. *The Korea Journal of Herbology*. 2009;24(3):103-8.
 34. Ha YD. The anticancer, antioxidative and antimicrobial effects of *Grifola umbellata* Extracts. *Korean Journal of Food Preservation*. 2001;8(4):481-7.
 35. Lee HK, et al. The antioxidative, antimutagenic and anticancer activity effects of *Cirsium japonicum* Extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2003;11(1):53-61.

36. Lacombe F, Belloc F. Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia. *Hematol Cell Ther.* 1996 Dec;38(6):495-504.
37. Zakeri Z, et al. R. A. Cell death: programmed apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ.* 1995;2:87-96.
38. Paglin S, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 2001;61(2):439-44.
39. Cherra SJ, et al. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol.* 2010;190(4):533-9.
40. He H, et al. Physalin A induces apoptosis via p53-Noxa-mediated ROS generation, and autophagy plays a protective role against apoptosis through p38-NF- κ B survival pathway in A375-S2 cells. *J Ethnopharmacol.* 2013;148(2):544-55.