

## 靑皮가 유방암세포의 Apoptosis에 미치는 영향

동신대학교 한의과대학

김지은, 박수연, 최창원, 김경수, 김경옥, 위통순, 양승정

### ABSTRACT

#### Effects of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* on the Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cells

Ji-Eun Kim, Soo-Yeon Park, Chang-Won Choi, Kyeong-Soo Kim  
Kyeong-Ok Kim, Tung-Shuen Wei, Seung-Joung Yang  
Dept. of Oriental Gynecology, Dong-Shin University

**Objectives:** In the theory of Korean medicine, *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* (CRVP) can soothe the liver to break qi stagnation, eliminate mass and relieve dyspepsia. This study was carried out to investigate the effects of CRVP on the apoptotic cell death in breast cancer cells.

**Methods:** In the present experiment, the effects of CRVP on proliferation rates, type of cell death, cell cycle distribution, and intracellular oxidative stress were investigated using MDA-MB-231 cells in vitro. In addition, the effects on expression levels of caspase 3, caspase 9, Bax and Bcl-2 were also investigated.

**Results:** Treatment with CRVP decreased proliferation rates in a dose dependent manner. ID50 (50% inhibitory dosage) was 175.4 µg/ml. In the CRVP treated group, cell volumes showed smaller than non-treated normal. In addition, CRVP increased percentage of apoptotic and sub G1 arrested cells respectively. 200 µg/ml of CRVP treatment increased intracellular ROS level significantly. Finally the expression level of caspase 3 and Bax/Bcl-2 ratio were elevated by treatment with CRVP respectively.

**Conclusions:** These results suggest that CRVP can trigger intrinsic apoptotic pathway in MDA-MB-231 cells.

**Key Words:** *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* (CRVP), MDA-MB-231 cells (breast cancer cells), intrinsic apoptotic pathway

---

Corresponding author(Seung-Joung Yang) : Oriental Hospital of Dong-Shin University, 331, Isu-ro, Suncheon-si, Jeollanam-do

Tel : 061-729-7199 E-mail : cigipus@hanmail.net

## I. 서 론

유방암은 서양에서 가장 흔한 여성암으로 우리나라에서도 그 발생빈도가 매년 증가하여, 최근 10년간 여성암 유병률에서 갑상선암 다음으로 2위를 차지하고 있다<sup>1)</sup>. 처음의 증상은 무통의 작은 덩어리, 두껍거나 움푹 들어간 피부, 유두가 퇴축되는 경우 등의 자가 검진에서 대부분 발견되고 병변이 발달함에 따라 유두에서 분비물이 나오며, 아프고 께양화되어 액와선으로 확대된다<sup>2)</sup>.

주된 치료 방법으로는 유방 절제술, 방사선 치료 및 항암제 투여 등이 있으나, 기존의 항암제의 경우 환자가 겪는 부작용이 심하여 지속적인 투여가 힘들기 때문에 부작용이 적은 새로운 항암제의 개발이 필요한 실정이다<sup>3)</sup>.

청피(*Citri Reticulatae Viride Pericarpium*, CRVP)는 운향과(芸香科, Rutaceae)에 속한 常綠小喬木인 귤나무(橘) *Citrus reticulata* Blanco (= *C. unshiu* Markovich)의 幼果 또는 미성숙 果實의 果皮로, 여름에 채취하여 曬乾한 것으로 性味가 苦辛하고 溫하여 辛味는 發散하고 溫性은 通氣시키며 苦味는 泄氣시켜 下行케하여 肝 膽二經에 들어가 肝氣鬱滯로 인한 脇肋脹痛과 乳房脹痛 및 疝氣疼痛 등 證을 치료하는데 양호한 효과가 있다. 이 외에도 消積散滯시키는 효능이 강하여 食積不和로 胃脘部位가 痞悶脹痛한 證을 치료하고, 또한 破氣散結시키는 효능이 있어 氣滯血瘀로 인한 癥瘕積聚와 久瘡癰塊 등 證을 치료하는데 多用한다<sup>4)</sup>. 청피의 실험적 연구에서 뇌혈류학<sup>5)</sup>, 면역세포에 미치는 영향<sup>6)</sup> 등에 대한 보고가 있었으며, 교감신경 β

수용체와 관련되어 극소 뇌혈류량 및 혈압 증가작용과 항알러지 작용 등의 약리작용<sup>7)</sup>이 있다고 알려져 있다.

이상과 같이 유방창통이나 적취 등의 치료에 사용되고 암세포 증식억제 성분을 함유하고 있으며, 인체의 위암세포에 대한 항암효과<sup>8)</sup>가 알려진 청피가 인간 유래 유방암 세포의 사멸에도 관여할 수 있을 것이라는 가설을 세우게 되었다.

본 연구에서는 청피의 유방암에 대한 항암효과를 알아보기 위하여 인간 유래 유방암 세포인 MDA-MB-231에 청피를 처리하고, 세포증식률에 미치는 영향을 살펴본 다음, Annexin V/PI double stain, Cell cycle arrest 등의 방법을 통하여 어떤 type의 세포 사멸이 일어나는지 살펴보았고, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하여 산화적 스트레스의 발현 정도를 살펴보았다. 또한, Caspase 3, Caspase 9과 Bcl-2-associated X protein(Bax)/B-cell lymphoma 2(Bcl-2)의 비율에 미치는 영향을 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 세포주

인간 유래 거대유방암 세포주인 MDA-MB-231은 한국세포주은행(서울, 한국)으로부터 냉동상태로 구입하여 사용하였다. 분주받은 세포주는 해동되어 배양액 속에 분주된 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 생각하

고 실험에 사용하였다.

## 2) 약 재

본 실험에 사용된 靑皮는 운향과의 귤나무 *Citrus reticulata Blanco*의 미성숙한 과실의 과피로 동신대학교 부속 순천한방병원을 통하여 구입 정제하여 사용하였다.

## 3) 시약 및 기기

세포 배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone(UT, USA)에서, penicillin/streptomycin mix는 Invitrogen(NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 증식률 측정을 위한 Cell Count Kit-8(CCK-8) kit는 Dojindo(Kumamoto, Japan)에서, Cell cycle arrest 측정을 위한 propidium iodide(PI) solution은 Sigma-Aldrich(MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, Annexin V/PI double staining kit는 BD pharmingen(CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 산화적 스트레스 측정을 위한 DCFH-DA는 Kodak(NY, USA)에서 구입하여 사용하였으며, caspase 3, caspase 9, Bax, Bcl-2의 1차 항체는 Cell Signaling Technology(MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

측정을 위해 사용된 기기는 유세포 분석기(BD bioscience, Heidelberg, Germany), 형광측정기(Molecular Devices, USA), Micro-plate reader(Bio-rad, USA), 광학현미경(Olympus, Japan)등이며, 시료의 조제를 위하여 원심분리기(Vision, 한국), 감압농축기(EYELA, Japan), 동결건조기(삼원, 한국)를 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 약물의 준비

세척되고 세절된 상태로 구입된 靑皮

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 여과하였다. 여과가 끝난 추출액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음 동결 건조하였다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 5.2 g으로 수율은 10.4%였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관하였다.

### 2) 세포주 배양 환경

인간 유래 거대유방암 세포주인 MDA-MB-213 세포의 생육 배지로는 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl)을 첨가하여 사용하였고, 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였다. 부착 세포의 탈착을 위해서 Trypsin-EDTA(Sigma, USA)를 사용하였으며, 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 배양기 속에서 37°C를 유지하며 배양하였다.

### 3) 세포 독성에 미치는 영향 측정

Highly water-soluble tetrazolium salt, WST-82-(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<sup>3</sup>개의 분량으로 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 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/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 µl의 CCK-8 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader(Bio-rad, CA, USA)를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로 는 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×100의 사진으로 제시하였다.

#### 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 well당 5×10<sup>4</sup>개의 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°C에서 30분간 반응 시켰다. 30분의 반응이 끝난

후, 원심분리를 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) Cell cycle analysis

시료가 Cell cycle distribution에 미치는 영향을 유세포분석법을 이용하여 관찰하였다. 실험과정을 간단히 요약하면, 6-well plate에 well당 5×10<sup>4</sup>개의 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, 세포를 고정시키고, Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 탈착하여 50 ml tube에 모은 후, 원심분리를 거쳐 cell pellet을 얻었다. 얻어진 cell pellet을 500 µl의 FACS sol.에 부유시킨 다음, 10 µg/ml의 PI를 처리하고 4°C에서 30분간 반응 시켰다. 형광 측정은 FACS canto II(BD bioscience)을 이용하여 유세포분석법(flow cytometry)으로 시행하였다.

#### 7) 세포내 산화적 스트레스 측정

세포 내에서 산화적 스트레스에 의하여 형광이 발생하는 시약인 DCFH-DA를 이용하여 세포 내 산화적 스트레스 발생 정도를 관찰하였다. 이를 위하여 세포를 96 well-plate에 3×10<sup>3</sup>개로 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, 5 mM의 DCFH-DA를 45분간 처리해 준 다음 배양액을 제거하고, 각 well당 100 µl의 인산완충액(PBS)를 넣고 1시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 형광측정기를 이용하여 발생하는

형광의 양을 측정하였으며, 산화적 스트레스의 양은 아무것도 처리하지 않은 정상군과의 비율로 나타내었다.

#### 8) 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, Bax, Bcl-2, beta-actin 각각의 1차 항체를 4°C에서 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.

### 3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS(The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, USA)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. 유방암 세포 증식률에 미치는 영향

인간 유래 거대유방암 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 증식률은 각각 76.2±7.3%, 41.4±6.0%, 12.6±3.1%였다(Fig. 1).

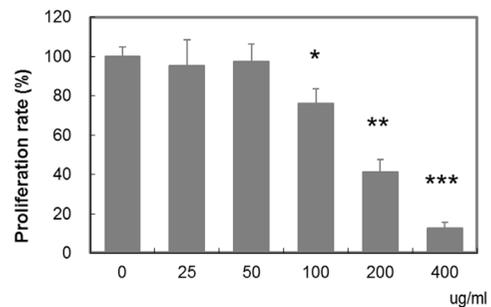


Fig. 1. Effects of CRVP on proliferation rates of MDA-MB-231 cells.

Proliferation rates were measured using CCK-8 kit. Cells were treated with indicated concentrations of CRVP 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

Vehicle 만을 처리한 정상군에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었고(Fig. 2A), 농도가 증가함에 따라 세포밀집도가 감소함을 알 수 있었으며, 이는 세포 증식률에서 나타낸 바와 유사한 경향을 보였다(Fig. 2). 특히, 200 µg/ml의 고농도 군에서 세포의 크기(굵기)가 줄어드는 경향이 관찰되었으나, 전형적인 apoptosis의 형태는 관찰하기 어려웠다(Fig. 2D).

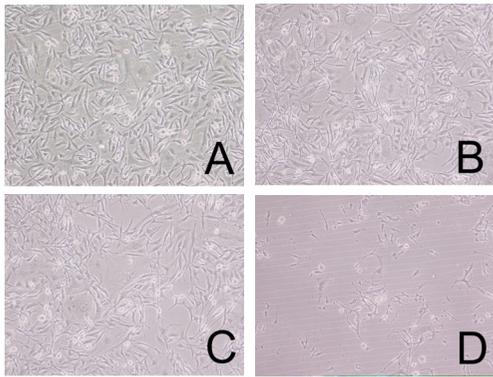


Fig. 2. Effects of CRVP on density and morphologic changes in MDA-MB-231 cells. Cells were treated with various concentrations of CRVP for 24 hr. then density and morphologic changes were observed using photo-microscope  $\times 100$  (A) normal, (B) 50  $\mu\text{g/ml}$  treated group, (C) 100  $\mu\text{g/ml}$  treated group, (D) 200  $\mu\text{g/ml}$  treated group.

### 3. 세포 사멸의 종류에 미치는 영향

Annexin V/PI double stain을 시행한 결과 아무것도 처리하지 않은 정상군에서는 대부분의 세포가 Q3에 속해 있었으며(91.8%), CRVP의 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).

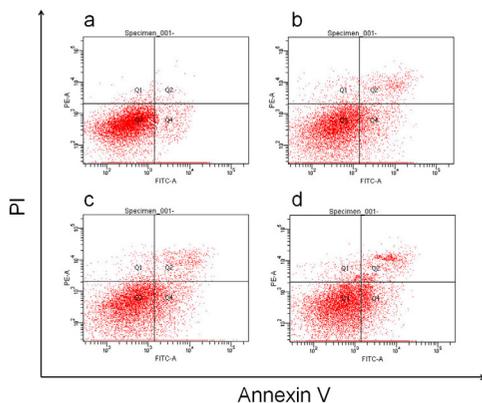


Fig. 3. Effects of CRVP on type of cell death in MDA-MB-231 cells.

The effects of CRVP on type of cell death were observed using Annexin V/PI double stain method. Cells were treated with 0  $\mu\text{g/ml}$  (a), 50  $\mu\text{g/ml}$  (b), 100  $\mu\text{g/ml}$  (c) and 200  $\mu\text{g/ml}$  (d) of CRVP for 24 hrs.

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 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

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

Group	CRVP treatment ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	50	100	200	
Live	91.8	79.9	77.2	71.2	
Apoptosis	Early apoptosis	4.1	11.7	13.4	15.5
	Late apoptosis	2.4	6.5	7.3	10.6
	Total apoptosis	6.5	18.2	20.7	26.1
Necrosis	1.7	1.9	2.1	2.7	
Total cell death	8.2	20.1	22.8	28.8	

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

### 4. Cell cycle distribution에 미치는 영향

유방암 세포에 시료를 처리한 다음 cell cycle arrest에 미치는 영향을 관찰한 결과 Sub G1 arrest가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4). 0  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  각 농도별로 sub G1 arrest가 나타난 세포의 비율은 각각 2.4%, 4.5%, 8.8%, 21.7%였다(Fig. 5).

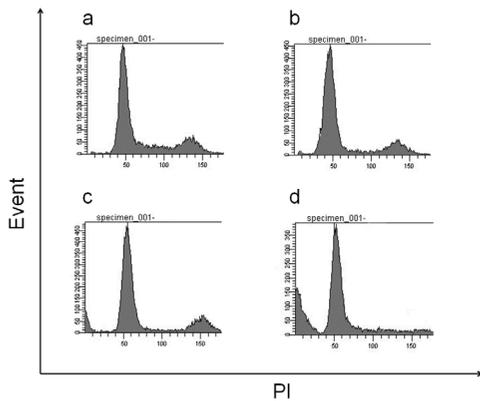


Fig. 4. Effects of CRVP on cell cycle distribution in MDA-MB-231 cells. Cell cycle arrest was measured using flow cytometry as shown in materials and methods. Cells were treated with 0 µg/ml (a), 50 µg/ml (b), 100 µg/ml (c) and 200 µg/ml (d) of CRVP for 24 hrs.

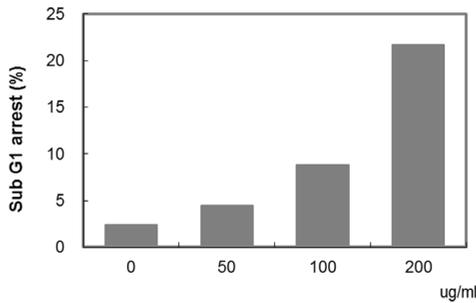


Fig. 5. Effects of CRVP on Sub G1 arrest in MDA-MB-231 cells. The percentage of cells in the state of sub G1 were measured by PI staining method. Cells were treated with 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml and 200 µg/ml of CRVP for 24 hrs.

### 5. 세포 내 산화적 스트레스 유발에 미치는 영향

DCFH-DA를 이용하여 세포 내 산화적 스트레스 유발에 미치는 영향을 살펴본 결과 50 µg/ml 투여군에서는 산화적 스트레스를 감소시키는 경향을 보였으나, 고농도인 200 µg/ml 군에서는 유의한 수준으로 산화적 스트레스를 유발시킴이 관찰되었다(Fig. 6).

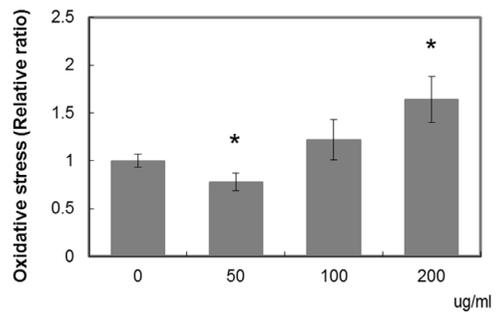


Fig. 6. Effects of CRVP on intracellular oxidative stress in MDA-MB-231 cells. The intracellular oxidative stress was measured using DCFH-DA. Cells were treated with indicated concentrations of CRVP for 24 hr. Values were represented as mean±S.D. of 3 independent experiments. \*P<0.05 vs. non treated normal.

### 6. Caspase 3 발현에 미치는 영향

MDA-MB-231 세포에 시료를 처리하고, 단백질을 추출하여 caspase 3의 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 농도의존적으로 caspase 3의 발현이 증가함이 관찰되었다(Fig. 7).

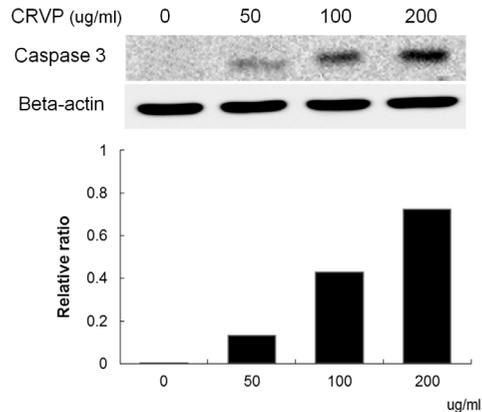


Fig. 7. Effects of CRVP on expression level of caspase 3 in MDA-MB-231 cells. The expression level of caspase 3 was evaluated using western blot method. Cells were treated with indicated concentrations of CRVP for 24 hr. Relative ratio was represented as expression level of caspase 3/beta-actin ratio.

### 7. Caspase 9 발현에 미치는 영향

MDA-MB-231 세포에 시료를 처리하고, 단백질을 추출하여 caspase 9의 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 모든 농도에서 특별한 발현량의 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 8).

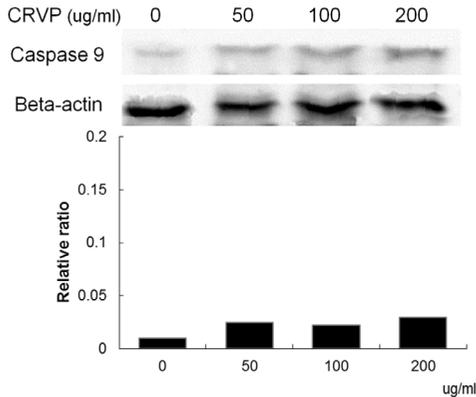


Fig. 8. Effects of CRVP on expression level of caspase 9 in MDA-MB-231 cells. The expression level of caspase 9 was evaluated using western blot method. Cells were treated with indicated concentrations of CRVP for 24 hrs. Relative ratio was represented as expression level of caspase 9/beta-actin ratio.

### 8. Bax/Bcl-2 ratio에 미치는 영향

24시간 동안 다양한 농도의 시료를 처리하고 단백질을 추출하여 Bax/Bcl-2 ratio에 미치는 영향을 살펴본 결과 모든 투여군에서 아무것도 처리하지 않은 정상군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 농도의존적 반응을 보이지는 않았다(Fig. 9).

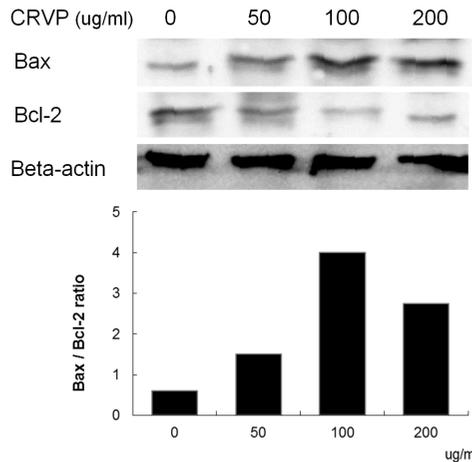


Fig. 9. Effects of CRVP on Bax/Bcl-2 ratio in MDA-MB-231 cells. The expression levels of Bax and Bcl-2 were evaluated using western blot method. Cells were treated with indicated concentrations of CRVP for 24 hrs. Bax/Bcl-2 ratio was represented as expression level of Bax/Bcl-2 ratio.

## IV. 고 찰

유방암은 유관(ductal carcinoma)이나 유엽(유선, lobular carcinoma)에서 발생하는 암<sup>9)</sup>으로 유전적 소인이 있거나, 과거 병력이 있는 경우, 장기간 에스트로겐에 노출된 경우, 경구피임약 복용, 지방섭취의 증가로 인한 비만 등이 원인이 될 수 있고, 40대 이후의 여자에게 많이 나타나는 편이다<sup>10)</sup>.

유방암을 치료하기 위해서는 수술, 항암 치료, 선행 항암 치료, 방사선 치료, 호르몬 치료를 환자의 상태에 따라 적절하게 시행한다. 외과적 치료로 유방 전절제술이나 부분 절제술(유방 보존술)을 하며, 과거엔 액와림프절을 무조건 제거하였으나 최근에는 감시 림프절 생검술을 통해 불필요한 림프절의 제거를 피하는 추세이다<sup>11)</sup>.

암환자의 생존율이 많이 높아졌기는

하나 암은 환자의 고통이 극심한 병이며 주기적이고 꾸준한 관리가 필요한 질병이다. 이에 유방암 환자에 대한 효과적인 치료나 증상 개선을 위한 장기적 관리체계의 중요성이 주목받고 있으며<sup>12,13)</sup>, 높은 전이율과 재발률, 항암치료와 방사선 치료의 부작용 등으로 이를 보완해줄 새로운 치료법이 절실히 요구되고 있다<sup>14)</sup>.

현대의 유방암은 한의학적으로는 '乳巖'과 가장 가깝다고 볼 수 있고 乳巖, 乳癰, 吹乳, 乳癆 乳中結核, 乳癰, 乳痰 등과 유사하여 그 진단과 치료 방법을 참고할 수 있다. 원인으로는 肝氣鬱滯, 憂怒抑鬱, 憂鬱傷肝 및 思慮傷肝 등의 七情所傷이 선행요인이자 주요인이고, 이것이 오래되거나 血氣枯槁와 房勞로 正氣不足, 氣血損傷 및 衝任失調 등으로 나타나는 장부기능의 실조가 발병원인이 된다. 기본 치료 방법은 疏氣行血之法으로 하되 초기에 肝氣鬱結은 疏氣行血, 疏肝解鬱하고 氣血虧損할 때는 大補氣血해야 한다<sup>9)</sup>.

行氣之劑의 대표적인 약물인 靑皮는 芸香科에 속한 귤나무의 果皮로써 미성숙한 것을 말하고, 성숙한 果皮는 陳皮라 한다. 靑皮는 性이 峻烈하여 肝膽을 疏暢시키고 氣滯를 破滯하는 작용이 있는 것이 다르다. 또한 靑皮는 梔子淸肝湯에서는 柴胡·香附子·靑橘葉 등을 배합하여 乳房脹痛을 치료하며 瓜蒌·金銀花·蒲公英·甘草 등을 배합하여 乳癰腫痛을 치료한다<sup>4)</sup>.

靑皮를 포함하는 처방인 橘葉散이 유방암 세포주 성장억제에 유효한 효과를 보였다<sup>15)</sup>는 보고도 있으며 위와 같이 유방창통이나 적취 등에 사용되고 있고 인체의 위암세포에 대하여 항암효과<sup>8)</sup>가 알

려진 靑皮가 인간 유래 유방암 세포에도 항암 효과가 있을 것이라는 가설을 세우게 되었다.

본 연구의 결과에서 청피는 투여 농도 100 µg/ml 이상에서 유의한 수준의 세포 증식률 억제 효과를 보였으며, 50% growth inhibition 값(ID<sub>50</sub>)은 175.4 µg/ml이었다 (Fig. 1). 이는 청피가 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. 처리 농도가 증가함에 따라 세포의 밀도가 감소하는 경향을 보였고, 또한 고농도 투여군에서는 세포 형태가 가늘어지는 경향을 보이기도 하였다(Fig. 2). 그러나 세포의 위축과 같은 전형적인 apoptosis의 형태를 찾기는 어려웠다(Fig. 2).

상기한 이유로 청피가 일으키는 세포 사멸의 형태가 어떤 것인지 살펴보기 위하여 Annexin V/PI double stain을 시행하였다. Annexin V는 Annexin group에 속하는 세포내 단백질의 일종으로 세포내에서 그 기능은 잘 알려져 있지 않다. Annexin V는 실험실에서 다용되는 일종의 형광 probe로 세포 표면에 결합하며, apoptosis를 포함한 몇 가지 세포 사멸 과정에서 발견된다<sup>16-8)</sup>. PI는 분자량 668.4 Da의 형광물질로 세포를 염색할 때 사용하는데 PI가 세포핵과 결합했을 때 발생하는 형광은 excitation 최고 535 nm이며, emission은 최대 617 nm이다. 일반적으로 PI는 DNA 염색에 사용되며, 세포 생존율 측정, cell cycle analysis의 분석에 사용되고<sup>19)</sup>, 또한 PI는 정상세포와 necrosis 또는 apoptosis를 일으키고 있는 세포의 구분에도 사용된다<sup>19)</sup>.

본 연구의 결과에서 청피는 농도 의존적으로 Annexin V positive(Q2, Q4)세포를 증가시켰다(Fig. 3). 또한 PI only positive(Q1) 영역에 속하는 세포의 수에 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 청피가 거대 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 가정하에 각각의 영역에 해당하는 세포의 비율을 좀 더 자세하게 살펴본 결과 정상세포는 정상군에서 91.8% 였던 것이 200 µg/ml 투여군에서 71.2%로 감소하였고, Q2와 Q4를 합한 total apoptosis는 6.5%에서 26.1%로 증가하였다. 이에 반해 necrosis는 정상군 1.7%, 200 µg/ml 2.7%로 큰 차이가 없었다(Table 1).

암세포를 포함한 진핵세포는 모두 유사한 방식으로 성장과 분열을 반복한다. 이러한 반복적 과정을 cell cycle 또는 cell division cycle이라고 하며, DNA의 복제 단계에 따라 G0, G1, S, G2, M의 5단계로 나뉜다. G0단계는 post-mitotic 단계라고 하며, 일종의 휴지기에 해당한다. 이 단계에 해당하는 세포들은 세포 증식과 분열이 정지되어 있는 것으로 본다. G1, S, G2의 3단계는 interphase 단계라고 하는데, 이는 세포의 분열에 들어가기 전에 세포의 크기가 커지고 DNA가 복제되며, 분열을 위한 모든 준비를 갖추는 단계이다. G1 phase는 이러한 interphase의 첫 단계로 growth phase라고 부르기도 한다. 이 단계에서 세포는 다양한 세포내 소기관을

합성하고, 세포 분열을 위한 영양분을 축적하면서 세포의 크기가 커진다. G1 phase가 끝나면 S phase가 시작되는데, S phase에는 DNA 복제가 이루어지는 시기이다. 따라서, 이 시기에는 DNA의 양이 점진적으로 증가한다. G2 phase는 interphase 단계의 마지막 단계로 세포가 둘로 나뉘기 전 최종 준비를 마칠 때까지를 말한다. 이러한 interphase 단계가 끝나면, 한 세포 내에 2배의 DNA를 보유한 상태로 세포 분열 과정에 들어가게 되는데 이를 M phase 또는 Mitotic phase라고 한다<sup>21,22</sup>). PI를 이용한 cell cycle analysis에서 결과는 일반적으로 가로축은 PI 형광 강도, 세로축은 세포의 개수를 나타내는 event로 구성된 histogram으로 나타낸다. 세포분열이 왕성한 정상세포의 경우 일반적으로 2개의 피크와 그 피크 사이를 잇는 낮은 골곡이 나타나는데, 2개의 피크는 이론적으로 PI 형광 강도가 2배에 가깝다. 보통의 경우 PI 형광 강도가 낮은 부분에 위치하는 피크가 event 수가 많고 PI 형광 강도가 높은 쪽에 위치하는 피크의 event 수가 상대적으로 적다. 일반적으로 PI 형광 강도가 낮은 피크 부분에 위치한 세포를 G1 phase에 위치한 것으로 보고 PI 형광 강도가 높은 피크 부분에 위치한 세포를 G2/M phase에 위치한 것으로 여기며, 이 두 피크의 사이를 S phase로 판단하며, G1 피크보다 더 낮은 PI 형광 강도를 보이는 모든 세포들을 G0를 포함한 sub G1 영역에 있다고 판단한다. 따라서 특정 항암제가 암세포의 분열을 억제시키는 효과를 발휘하기 위해서는 많은 세포가 G0 영역을 포함한 sub G1 영역에 위치하게 해야 한다. 이러한 점을 감안하고 본 연구

결과를 살펴보면, 청피의 투여는 농도의존적으로 sub G1 영역에 속한 세포의 수를 증가시켰다(Fig. 4). 정상군에서 Sub G1 영역에 2.4%의 세포가 속해 있었던 반면, 50 µg/ml, 100 µg/ml 200 µg/ml 처리군에서 각각 4.5%, 8.8%, 21.7%로 농도의존적으로 sub G1 arrest된 세포들이 증가하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 Annexin V/PI double stain 결과와 함께 청피의 세포 살해 기전이 apoptosis임을 시사한다.

산화적 스트레스(Oxidative stress)는 다양한 세포에서 세포의 사멸에 관여한다. 산화적 스트레스는 Reactive oxygen species(ROS)의 생성과 이를 적절하게 제거해주는 세포 내 기능들 간의 불균형에서 발생하며, 단백질, 지질, DNA를 포함한 모든 세포내 기관을 손상시킬 수 있다. 많은 항암제가 암세포를 죽일 때 세포 내에서 ROS를 증가시킨다. 만약, 이러한 ROS의 증가에 암세포가 적응하거나, 증가되는 ROS를 효율적으로 감소시키는 기전을 갖춘다면 이러한 암세포는 항암제에 내성을 보이며, 악성으로 분류된다<sup>22,23)</sup>. 본 연구에서 청피가 암세포 내의 산화적 스트레스에 대하여 어떤 영향을 미치는지 살펴본 결과는 1시간 동안 50 µg/ml 농도로 처리해준 군에서는 산화적 스트레스를 줄여주는 효과가 있는 것으로 나타났으며, 100 µg/ml 처리군에서는 거의 정상군 수준으로 유지되었고, 200 µg/ml 투여군에서는 유의한 수준의 산화적 스트레스 증가가 관찰되었다(Fig. 6).

이러한 결과는 고농도 처리군에서 발생하는 세포 사멸에 청피에 의해 발생하는 산화적 스트레스가 관여할 가능성으로 해석된다. 50 µg/ml 농도로 처리한

군에서 항산화 효과가 발생한 것은 대부분의 천연물이 항산화 효과를 가지고 있고, 청피 역시 항산화 효과<sup>24)</sup>를 가지고 있기 때문인 것으로 사료되며, 50 µg/ml 농도에서 특별한 세포 증식을 증가 소견을 보이지 않았기 때문(Fig. 1)에 저농도에서 청피가 암세포를 산화적 스트레스로부터 보호하여 암의 경과를 악화시킬 가능성은 낮은 것으로 판단된다.

항암제의 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 apoptosis는 크게 intrinsic pathway와 extrinsic pathway의 두 가지 경로를 통해 일어난다<sup>25,26)</sup>. Extrinsic pathway는 세포 표면에 위치하는 tumor necrosis factor alpha receptor(TNFR), Fas와 같은 death receptor와 밀접한 관련이 있으며, 이러한 death receptor에 ligand가 결합함으로써 apoptosis가 시작된다<sup>27)</sup>. Intrinsic pathway는 mitochondrial apoptotic pathway라고도 하며, 이름에서와 같이 미토콘드리아가 apoptosis의 중추적인 역할을 담당한다. 일반적으로 항암제의 화학요법과 관련된 경로로서 extrinsic pathway는 몇 가지 논란거리가 있으며, 상당히 제한적으로 적용되고, intrinsic pathway와 관련된 연구가 보다 일반적으로 적용된다<sup>28,29)</sup>.

Caspase 3는 상기한 extrinsic과 intrinsic 두 가지 경로를 통하여 활성화 될 수 있다. 대표적으로는 extrinsic pathway에 속하는 caspase 8이나 caspase 9에 의해서 활성화될 수 있고, intrinsic pathway에 속하는 cytochrome c에 의해서도 활성화될 수 있다<sup>30,31)</sup>. 본 연구의 결과를 살펴보면, 청피의 처리는 caspase 9의 발현에는 특별한 영향을 미치지 않은 반면, caspase 3의 발현량을 농도의존적으로 증가시켰

다(Fig. 7, 8). 이러한 결과는 청피가 일으키는 apoptosis가 extrinsic pathway보다는 intrinsic pathway의 활성화와 관계 있을 가능성이 높음을 시사한다.

Intrinsic(mitochondrial) pathway는 Bcl-2 family에 속하는 pro-apoptotic 또는 anti-apoptotic protein들에 의해 조절되며, Bcl-2, Bcl-w 등은 anti-apoptotic protein에 속하고 Bax, Bcl-2 homologous antagonist/killer(Bak) 등은 pro-apoptotic protein에 속한다. 따라서, apoptosis의 진행은 Bcl-2의 발현량과 반비례하고, Bax의 발현량과는 비례하기 때문에 BAX/Bcl-2 비율이 증가할수록 apoptosis는 활성화된다<sup>32,33</sup>. 본 연구의 결과에서 청피의 처리는 Bax/Bcl-2 비율을 증가시키는 경향을 보였다(Fig. 9). Bax가 미토콘드리아로부터 cytochrome c와 pro-apoptotic factors들의 유리를 일으킨다는 사실<sup>34</sup>을 감안할 때, 이러한 결과는 청피가 intrinsic pathway를 통하여 apoptosis를 유도하는 증거로 해석될 수 있다. 이러한 가설을 증명하기 위해 후속 연구에서는 cytochrome c 유리, mitochondrial membrane potential 등에 미치는 영향을 조사해야 할 것으로 사료된다.

이상을 정리하여 보면, 청피는 인간 유래 거대유방암 세포 내에서 산화적 스트레스를 유발한 결과 미토콘드리아와 밀접한 관련이 있는 intrinsic 경로의 apoptosis를 유발하였으며, 그 결과 농도의존적으로 세포 증식률이 감소하였고, Annexin V 양성인 세포를 증가시켰으며, sub G1 영역에 arrest되는 세포 수를 증가시켰다. 이러한 결과는 청피가 유방암에 사용될 가능성이 있음을 시사한다.

## V. 결 론

靑皮 추출물이 인간 유래 거대유방암 세포의 사멸에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인간 유래 거대유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포의 증식률을 농도의존적으로 감소시켰으며, ID<sub>50</sub>은 175.4 µg/ml 이었다.
2. 유방암 세포의 증식 밀도와 세포 크기를 감소시켰다.
3. 농도의존적으로 Annexin V 양성인 apoptotic cell의 숫자를 증가시키는 경향을 보였다.
4. 농도의존적으로 sub G1 영역에 속한 세포들을 증가시키는 경향을 보였다.
5. 세포 내 산화적 스트레스 측정에서 50 µg/ml 처리 군에서는 항산화 효과를 보였으나, 200 µg/ml 처리군에서는 산화적 스트레스를 유의한 수준으로 증가시켰다.
6. 농도의존적으로 Intrinsic pathway에 속하는 Caspase 3의 발현을 증가시켰다.
7. Extrinsic pathway에 속하는 Caspase 9의 발현에는 특별한 영향을 미치지 않았다.
8. Bax/Bcl-2 비율을 증가시키는 경향을 보였다.

이상의 결과로부터 靑皮가 유방암 세포에서 intrinsic pathway를 통한 apoptosis를 일으킬 수 있었으며, 추후 유방암에 활용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

- Received : April 22, 2015
- Revised : April 27, 2015
- Accepted : May 06, 2015

## 참고문헌

1. Annual report of cancer statistics in Korea in 2012. Available from:URL: [http://ncc.re.kr/common/downloadByNTC.jsp?attnum=357&code=999\\_\\_101](http://ncc.re.kr/common/downloadByNTC.jsp?attnum=357&code=999__101).
2. Mosby, et al. Mosby's medical, nursing & allied health dictionary. 6th. Seoul: Hyunmoon Inc. 2002:264.
3. Kang JO. Radiation Therapy for Breast Cancer. Kyung Hee Medical. 2005:21(1):37-42.
4. College of Oriental Medicine, Herbalism Compilation Committee. Herbalism. Seoul:Younglim Inc. 2005:394-5.
5. Lee KS, Jeong HY, Lee YS. Experimental Study of *Citri Reticulatae Viride Pericarium* extract on the Cerebral Hemodynamics in Rats. Korean J. Oriental Medical Physiology & Pathology. 2002;16(1):104-10.
6. Jeong HY, Oh CH, Eun JS. Effect of *Citri Reticulatae Viride Pericarium* water extract on Immunocytes in mice. The Korean Society of Oriental Medical Pathology. 1998;12(2):55-62.
7. Kim NS. A Experimental Study on the *Citri Reticulatae Viride Pericarium*. Wonkwang University. 1998:11-2.
8. Kim JB, et al. Effects of *Citrus Reticulata* on the Cell Detachment and Apoptosis in Human Gastric Cancer SNU-668 Cells. Oriental Medical Physiology & Pathology. 2005;19(1):212-7.
9. Oriental obstetrics & Gynecology. Korean obstetrics & Gynecology(Ha). Seoul:Euseongdang. 2012:393-9.
10. Hand D, et al. Hormonal therapies for early breast cancer: systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess. 2007;11(26):1-134.
11. No DY, et al. Now not afraid of breast cancer. Seoul:ezenmedia. 2012:46-9.
12. Cameron DA, et al. Bone mineral density loss during adjuvant chemotherapy in premenopausal women with early breast cancer : is it dependent on oestrogen deficiency? Breast Cancer Research and Treatment. 2010;123:805-14.
13. Twiss JJ, et al. Health behaviors in breast cancer survivors experiencing bone loss. J the American Academy of Nurse Practitioners 2006;18:471-81.
14. 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 oriental obstetrics & Gynecology. 2013;26(3):44-58.
15. Jo HY, et al. Anti-proliferation effect of Gyulyupsanbyonbang extracts on MCF-7 cells. The Journal of oriental obstetrics & Gynecology. 2007;20(1):50-60.
16. Meers P and Mealy T. Phospholipid determinants for annexin V binding

- sites and the role of tryptophan. *Biochemistry* 33. 1994;19:5829-37.
17. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GAM, et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84. 1994;5:1415-20.
  18. 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* 184. 1995;1:39-51.
  19. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Exp. Cell Res.* 2002; 277(1):1-14.
  20. Cooper GM. Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle. *The cell: a molecular approach*. 2nd. Washington D.C: ASM Press. 2000:106.
  21. Rubenstein, Irwin, Susan M., Wick. *Cell*. World Book Online Reference Center. 2008. 12 January 2008. Available from: URL: [http://en.citizendium.org/wiki/Cell\\_cycle](http://en.citizendium.org/wiki/Cell_cycle).
  22. Stresing V, et al. Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene*. 2012.
  23. Bhandary B, et al. Mitochondria in relation to cancer metastasis. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(6):623-7.
  24. Zhang Y, et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chem.* 2014;145:674-80.
  25. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11:621-32.
  26. Sarosiek KA, Ni Chonghaile T, Letai A. Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol.* 2013;23(12):612-9.
  27. Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25:4798-811.
  28. Johnstone RW, et al. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy *Cell*. 2002;108:153-64.
  29. Scott HK, William CE. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research.* 2000; 256:42-9.
  30. Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ.* 2002;9(1):3-5.
  31. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* 2009;46(8):497-510.
  32. Czabotar PE, et al. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 2013;152:519-31.
  33. Kim H, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* 2006;8:1348-58.
  34. Weng C, et al. Specific cleavage of

Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat

leukemia T cells. J. Biol. Chem. 2005; 280(11):10491-500.