

사상자의 세포자기살해능이 자궁경부암세포에 미치는 영향

¹가천대학교 한의과대학 부인과교실, ²부산대학교 한의학전문대학원 한방부인과
³세명대학교 한의과대학 해부학교실, ⁴부산대학교 한의학전문대학원 한방소아과
권나연¹, 박장경², 안상현³, 김기봉⁴

ABSTRACT

Effects of Apoptosis of *Torilis Japonica* on Cervical Cancer Cell

Na-Yoen Kwon¹, Jang-Kyung Park², Sang-Hyun Ahn³, Ki-Bong Kim⁴

¹Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Korean Medicine,
GaChon University

²Dept. of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology,
School of Korean Medicine, Pusan National University

³Dept. of Anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

⁴Dept. of Korean Pediatrics, School of Korean Medicine,
Pusan National University

Objectives: This study was conducted to confirm the anticancer effect of *Torilis Japonica* (TJ) on cervical cancer and to determine whether the effect was apoptosis.

Methods: In this study, the effect of TJ extract on toxicity, mitochondrial morphology, nuclear morphological changes, Extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway were investigated in HeLa cell, human cervical cancer cell.

Results: The cytotoxicity, ratio of cells with nuclear changes to the total number of cells, and P38 phosphorylation increased in a concentration-dependent manner after administration of TJ extract. The length of mitochondria and ERK phosphorylation in HeLa cells decreased in a concentration-dependent manner after administration of TJ extract.

Conclusions: TJ extract has an anticancer effect on cervical cancer cells, which is presumed to be due to apoptosis, and showed potential as a future cervical cancer treatment.

Key Words: *Torilis Japonica*, Cervical Cancer, Apoptosis, Anti-cancer Activity

I. 서 론

자궁경부암이란 자궁의 아랫부분인 자궁경부에 발생한 악성 종양으로 전 세계 여성암 중 발병률과 사망률 모두 4번째로 높은 질환으로 보고되었다^{1,2)}. 2020년 국가암등록통계에 의하면 국내 15-34세 여성 10만 명 중 5.1명이 자궁경부암으로 4.1%를 차지하여 갑상선, 유방암에 이어 3번째 주요 암을 차지하는 것으로 보고되었고 5년 상대 생존율은 96년 이후 80% 전후로 유지되며 세계적으로 여성암 사망률 2위를 기록하고 있다²⁻⁴⁾.

자궁경부암은 인유두종바이러스(Human papilloma virus, HPV)가 발암 인자로서 가장 중요한 역할을 하지만, 어린 나이에 성교를 경험하거나 여러 명의 성교 상대가 있거나, 이른 임신, 월경과 출산과 관련된 면역 저하 상태 등 다양한 부가적인 인자들이 영향을 준다²⁾. 성교 후 질출혈이 자궁경부암의 가장 흔한 증상이며 처음에는 점상출혈로 시작하여 암 진행과 함께 출혈과 질분비물이 증가하는 양상을 보인다. 이차적 감염 여부에 따라 악취가 동반될 수 있으며 주변 장기로 전이 시 골반통, 요천부 통증, 혈뇨, 배뇨곤란, 체중 감소 등의 증상이 나타날 수 있다¹⁾.

자궁경부암의 치료 방법은 항암화학요법, 방사선치료 및 수술이 있으며 전암성 병변인 경우 원추절제술만으로도 완치가 가능하여 치료 후 임신이 가능하지만, 침윤성 자궁경부암의 경우 광범위 자궁적출술, 항암화학요법, 방사선치료를 받게 된다⁵⁾. 그러나 자궁경부암의 경우 병기가 진행됨에 따라 5년 생존율이 급격히 감소하여 새로운 치료제에 대한 필요성이 높

아지고 있으며, 자궁경부암 치료제 세계 시장은 연평균 4.2%씩 지속해서 증가하고 있으며 2029년에는 9,566백 만 달러 규모로 증가할 것으로 전망하고 있다⁵⁾.

한의학 원문에서 자궁경부암에 관한 기술은 찾아보기 어렵지만, 증상과 치료 방법은 崩漏, 帶下, 癥瘕에서 찾아볼 수 있고, 자궁경부암의 원인은 濕熱蘊毒이 자궁에 침범하여 발생한 질환으로 보며, 질환이 진전되면 변증에 맞춘 치료가 필요하다¹⁾.

자궁경부암에 한약재를 이용한 실험 연구로는 黃芩⁶⁾, 鷄血藤⁷⁾, 瓜蒌仁⁸⁾, 天花粉⁹⁾ 등을 활용한 선행 연구가 있다. 이들 연구에서는 각 한약재 추출물이 ME-180, HeLa, SNU-703 등의 자궁경부암 세포를 억제하고 세포사멸을 유발하며 세포자연사와 관련된 단백질 인자를 높이는 것을 확인하였다.

사상자(*Torilis japonica*)는 동의보감에서 이르길 성질이 짜하고 맛은 쓰고 맵고 달며 독이 없으며 여성의 음부가 붓고 아픈 곳에 주로 쓰이며 자궁을 덥게 한다고 하였다¹⁰⁾. 사상자는 최근 항균¹¹⁾, 항염증 효과¹²⁾ 및 항암 작용이 확인되어 교모세포종¹³⁾, 폐암¹⁴⁾, 악성 흑색종¹⁵⁾ 등에 대한 암치료에 대한 연구가 활발하여 진행되었다. 이전 연구에서 사상자는 세포내 핵변화와 유세포 분석을 통해 교모세포종에서 세포자연사를 일으키는 것이 확인되었으며¹³⁾, 폐암에서는 AMP-activated protein kinase(AMPK)/p38 MAPK(Mitogen-activated protein kinases) 신호전달 경로를 통해 미토콘드리아의 외막을 조절하여 세포자연사를 유도하는 것이 확인되었다¹⁴⁾.

이에 사상자가 자궁경부암세포에 미치

는 영향을 알아보기 위해 자궁경부암세포인 HeLa cell에 사상자를 용량별로 투여한 뒤, 세포독성을 확인하고 세포사멸사와 관련된 세포 내 핵 변화, 미토콘드리아 변화, 단백질 변화를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 세포주

본 실험에서 사용된 자궁경부암 세포주 HeLa는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 자궁경부암 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)와 1% penicillin-streptomycin(Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Sigma, USA) 배지를 사용하였다. HeLa 세포가 80% 이상 자랄 때까지 주어진 환경에서 배양하였다.

2) 약 재

사상자(*Torilis japonica*, TJ)는 미나리과에 속하는 和蛇床子의 성숙한 과실로¹⁶⁾, 본 실험에서 사용된 약재는 음니허브(Omniherb, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

3) 시료의 추출

사상자 100 g을 중량의 20배인 증류수 2000 ml에 첨가하고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압하고 농축한 후 동결 건조하여 추출물 11.22 g(수득률 11.22%)을 획득했다.

2. 방 법

1) 세포 독성 분석

세포 독성을 확인하기 위해, HeLa 세포

(1×10^4 cells/well)를 96 well plate에 분주하였다. 24시간 뒤, 세포에 사상자 추출물 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL의 농도로 처리하였다. 이후, 사상자 추출물과 배양된 세포에 20 ul의 Water-Soluble Tetrazolium 1(WST-1) 용액을 넣은 후 2시간을 추가 배양하였다. 이후, 세포 독성은 microplate reader기로 450 nm에서 측정하였다. 무처리군에 대한 값을 100%로 나타내고, 사상자 추출물이 처리된 군을 상대 정량하여 백분율로 환산하여 그래프화 하였다.

2) Live/Dead cell을 이용한 세포 독성 분석

사상자 추출물을 24시간 처리한 후 세포 독성을 재검증하기 위하여, 형광 probe를 이용하여 세포 독성을 확인하였다. HeLa 세포(2×10^6 cells/well)를 6 well plate에 분주하였다. 이후 0, 0.75 및 1.0 mg/mL의 사상자 추출물을 자궁경부암 세포에 처리하고 24시간 배양하였다. 이후, 세포에 Live/Dead cell probe가 포함된 PBS 용액을 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다. 세포는 형광현미경 하에서 관찰하였다. Live 세포는 495 nm에서 관찰하였고 dead 세포는 635 nm에서 관찰하였다.

3) 세포 내 핵 변화 분석

사상자 추출물에 의한 세포 사멸 시에 핵의 변화를 분석하기 위해, 핵을 Hoechst로 염색하였다. HeLa 세포(1×10^5 cells/well)를 confocal dish에 분주하고 0, 0.75 및 1.0 mg/mL의 사상자 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 세포는 4% 포름알데하이드로 고정하였고, Phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척하였다. 이후 핵을 염색하기 위하여 Hoechst 염색약을 15분

간 상온에서 암반응 하였다. 핵의 변화 관찰은 형광현미경으로 분석하였다.

4) 세포 내 미토콘드리아 변화 분석

사상자 추출물에 의한 미토콘드리아의 변화 분석을 위하여, 미토콘드리아 염색 시약인 Mito-Tracker를 사용하였다. HeLa 세포(1×10^5 cells/well)를 confocal dish에 분주하고 0, 0.75 및 1.0 mg/mL의 사상자 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후, 세포는 PBS로 세척하고 100 nM의 Mito-Tracker TM(Excitation: 579 nm, emission: 599 nm)을 30분간 37°C에서 배양하였다. 미토콘드리아는 공초점 현미경(Confocal microscopy)으로 분석하였다. 미토콘드리아의 길이는 image J를 이용하여 측정하였다.

5) 단백질 변화 분석

사상자 추출물에 의해 HeLa 세포 내에 단백질의 변화를 분석하기 위해서, 선행연구에서 알려진 방법을 토대로 immunoblotting 시험법을 일부 수정하여 다음과 같이 수행하였다. HeLa 세포(1×10^5 cells/well)를 100 mm dish에 분주하고 0, 0.75 및 1.0 mg/mL의 사상자 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 세포는 Radioimmunoprecipitation assay buffer(RIPA buffer)로 용해하여 단백질을 획득하였고, 단백질의 농도는 Bicinchoninic Acid(BCA) 정량법으로 측정하였다. 40 μ g의 단백질을 10% Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) gel에 로딩하였고 전기영동으로 단백질을 크기별로 분리하였다. 이후 단백질은 PVDF membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)으로 이동시켰다. Membrane은 5% 소 혈청 알부민(Bovine serum albumin, BSA)을 포함하는 PBS 용액에 실온에서 1시간 동안

blocking 한 다음, 특정 1차 항체(P-ERK, ERK, P-p38, P-38, β -actin)를 1:1000으로 각각 처리한 후, 4°C에서 24시간 이상 반응시켰다. 이후, 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, ECL 시약을 처리하고 western blot detector로 단백질의 발현을 분석하였다.

3. 통계처리

실험 결과에 대한 통계적 분석은 GraphPad Prism(GraphPad Prism for Windows, ver. 4.0, GraphPad, U.S.A.)을 이용하였다. 두 그룹 간의 차이는 student's t-test를, 다중비교는 Tukey의 사후검정을 사용하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하여 분석하였다.

III. 결 과

1. 사상자 추출물의 세포 독성 평가

HeLa 세포에 0 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0 mg/ml 농도의 사상자 추출물을 투여하고 세포 독성을 측정한 결과 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

2. 형광 probe를 활용한 사상자 추출물의 세포 독성 평가

HeLa 세포에 0 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0 mg/ml 농도의 사상자 추출물을 투여하고 Live/Dead cell 형광 probe로 염색하여 세포 독성을 측정한 결과 사상자 추출물을 0.75 mg/ml와 1.0 mg/ml를 투여한 실험군에서 각각 $48.1 \pm 1.9\%$, $63.1 \pm 1.0\%$ 의 감소가 관찰되었으며 1.0 mg/ml를 투여한 실험군에서 무처리군에 비해 통계적으로 유의한 결과가 확인되었다(Fig. 2).

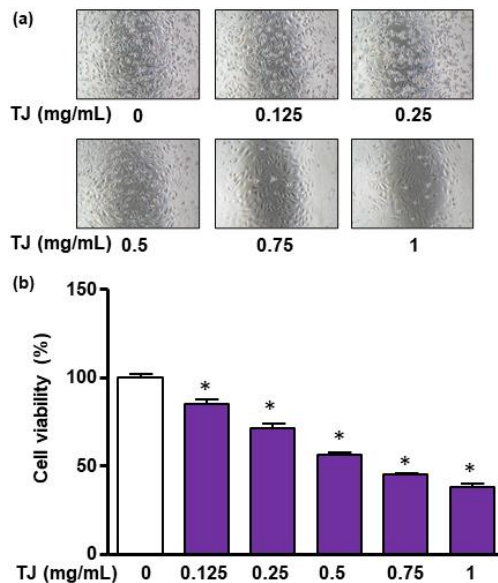


Fig. 1. The cell viability of HeLa cells at various TJ extract concentrations. HeLa cells were incubated with the different concentration of TJ extract (0.125, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 mg/ml) for 24 hours.

(A) The HeLa cell morphology were observed using the microscope. (B) To analyze the cell viability, the cells were incubated with WST-1 solution for 2 hours. Data are expressed as 100% for the untreated group. Data represents the mean±standard deviations (n=3).

* : p<0.05, statistically significant difference compared with untreated group.

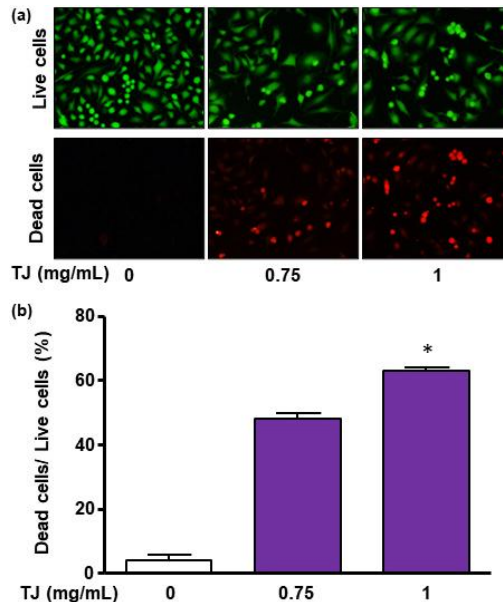


Fig. 2. TJ extract induces cell death in HeLa cells. HeLa cells were treated with TJ extract (0.75 and 1.0 mg/ml) for 24 hours, respectively.

(A) The cells were treated with Live/Dead cell probe for 30 minutes. And then, cell death was observed using the fluorescence microscopy. (B) The bar graphs indicated the dead cells per live cells ratio. The percentage of the dead cell in the untreated group was give 100. Data represents the mean±standard deviations (n=3).

* : p<0.05, statistically significant difference compared with untreated group.

3. 사상자 추출물의 미토콘드리아 변화에 미치는 영향

HeLa 세포에 0 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0 mg/ml 농도의 사상자 추출물을 투여하고 Mito Tracker로 미토콘드리아를 염색하였다. 미토콘드리아의 형태학적 변화

는 형광현미경 하에서 관찰하였다. 사상자 추출물을 0.75 mg/ml와 1.0 mg/ml를 투여한 실험군에서 미토콘드리아의 길이가 각각 $57.3 \pm 4.4\%$, $37.9 \pm 2.9\%$ 로 관찰되었으며 무처치군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 확인되었다(Fig. 3).

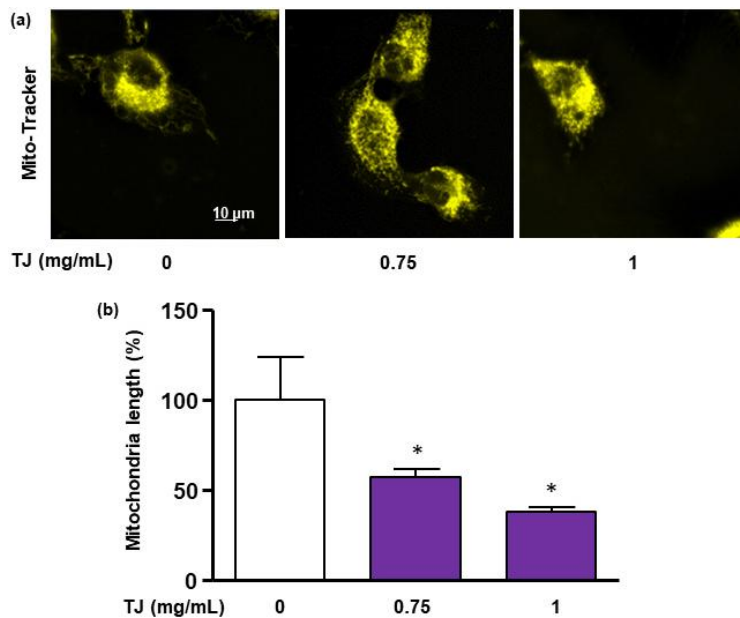


Fig. 3. Analysis of mitochondrial morphology on in TJ extract-treated HeLa cells. The HeLa cells were treated with TJ extract (0.75 and 1.0 mg/ml) for 24 hours and the cells were incubated with Mito-Tracker for 30 minutes at 37°C.

(A) The photographs show the mitochondrial morphology. (B) The bar graph was obtained from panel B. The percentage of the mitochondrial length in the untreated group was given 100. Data are expressed as 100% for the untreated group. Data represents the mean±standard deviations (n=3). * : $p < 0.05$, statistically significant difference compared with untreated group.

4. 사상자 추출물의 핵 morphology에 미치는 영향

세포 사멸 시에 관찰되는 DNA 손상을 확인하기 위해 HeLa 세포의 핵을 Hoechst로 염색하여 변화를 형광현미경으로 관찰하였다. 사상자 추출물을 0.75 mg/ml와

1.0 mg/ml를 투여한 실험군에서 전체 세포 수 대비 핵 변화가 일어난 세포의 비율이 각각 $36.8 \pm 9.3\%$, $52.4 \pm 10.8\%$ 로 관찰되었으며 무처치군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

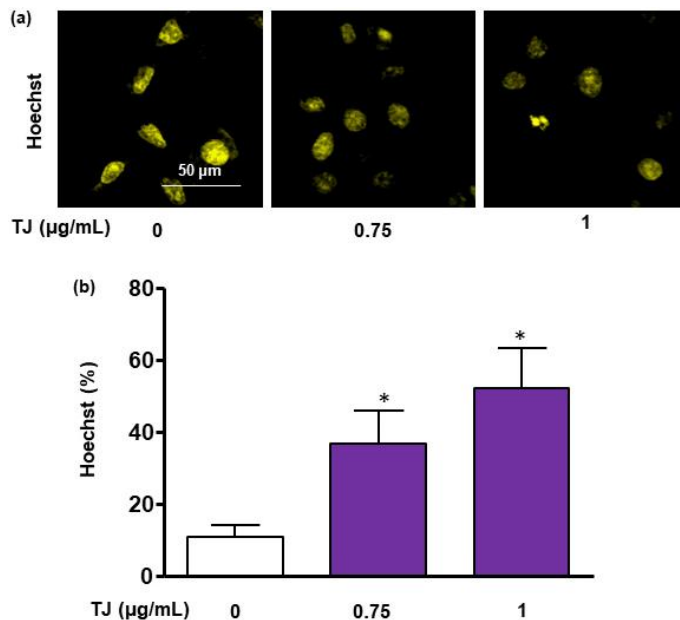


Fig. 4. Analysis of nuclear morphological changes in TJ extract-treated HeLa cells. The cells were treated with TJ extract (0.75 and 1.0 mg/ml) for 24 hours and the nucleus was stained with Hoechst.

(A) The photographs represent the Hoechst-positive cells. (B) The bar graph was obtained from panel B. The percentage of the Hoechst-positive cell in the untreated group was give 100%. Data represents the mean±standard deviations (n=3).

* : p<0.05, statistically significant difference compared with untreated group.

5. 사상자 추출물의 항암 효능에 대한 Mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 변화 분석

사상자 추출물이 세포사멸 신호를 전달하는 단백질인 MAPK의 발현의 변화를 유도하는지 확인하기 위해, immunoblotting을 수행하였다. 사상자 추출물을 투여한 실험군에서 Extracellular signal-regulated kinase

(ERK)의 인산화는 0.75 mg/ml에서는 통계적 유의한 차이가 없었으나 1.0 mg/ml에서 $23.0\pm 6.54\%$ 로 유의성 있는 감소가 확인되었다. P38의 인산화는 0.75, 1.0 mg/ml에서 각각 $135.6\pm 28.3\%$, $205.33\pm 4.33\%$ 로 통계적 유의성 있는 증가가 확인되었다 (Fig. 5).

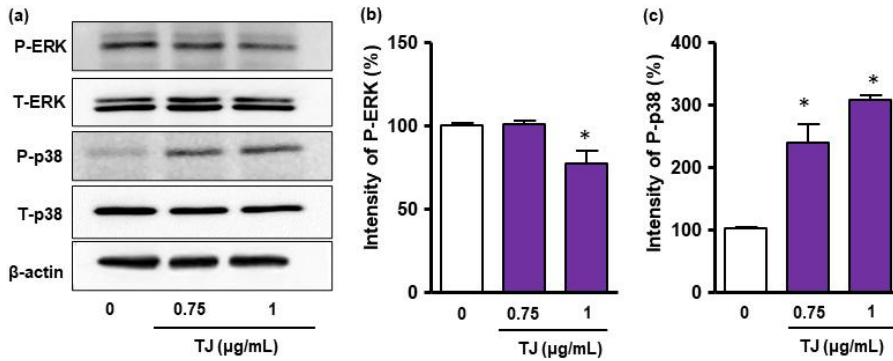


Fig. 5. Effect of TJ extract on MAPK kinase activity in HeLa cells. (A and B) HeLa cells were treated with TJ extract (0.75 and 1.0 mg/ml) for 24 hours.

The expression of ERK and p38 were determined using the specific antibodies such as anti-phosphor ERK and phosphor p38. The relative expression of phosphorylated JNK, relative to the untreated group. Data represents the mean±standard deviations (n=6).

*: p<0.05, statistically significant difference compared with untreated group.

IV. 고찰

암은 건강한 세포가 대사 활동이 변화하여 발생하는 병리적인 상태로, 증식과 생존을 유지하기 위해 다양한 대사경로를 가진다¹⁷⁾. 이 과정에서 암세포는 정상 세포와 다른 특징을 가지는데, 지속적 증식 신호 유지, 성장 억제 회피, 조직 침습 및 전이, 무한한 복제 능력, 혈관 신생 유도 그리고 세포자연사 회피가 이에 해당한다^{18,19)}. 그 중 세포자연사는 선택적으로 손상된 세포를 제거하여 조직의 항상성을 유지하는 조절 작용을 의미하는 것으로, 세포자연사의 기전은 다양하고 복잡한 신호전달 체계를 가지며 크게 내인성 경로와 외인성 경로로 구분할 수 있다²⁰⁾. 내인성 경로는 세포내에서 유전적 손상, 저산소증, 산화 스트레스 등의 자극으로 미토콘드리아의 투과성이 증가하여 세포자연사와 관련된 분자가 세포질로 방출되어 발생한다²¹⁾. 암세포의 세포자연사에 대한 변화는 암세포의 발달

뿐만 아니라 치료제에 대한 저항성에도 관련이 있는데, 현재 임상 종양학에서 사용되는 대부분의 항암제는 세포자연사를 일으켜 암세포의 사멸을 유도하는 것으로 이러한 경로에 문제가 발생하면 치료 효과가 감소할 수 있다²⁰⁾.

자궁경부암은 전암단계인 상피내암에서 침윤성 암으로의 비교적 긴 진행단계를 거치는 악성 종양으로, 조기 진단과 조기 치료가 필요한 질환이다¹⁾. 한의학적으로 濕熱蘊毒이 자궁을 침범하여 발생한다고 보며, 자궁경부암의 증상에 맞추어 癥瘕, 崩漏, 帶下의 범주에 속하는 것으로 보고 있다¹⁾. 자궁경부암의 치료에 있어 종양에 대한 일반적인 한의학적 치료 방법인 扶正祛邪法, 活血和瘀法, 清熱解毒法, 軟堅散結法 등을 적용할 수 있고, 초기에는 活血和瘀法, 清熱解毒法을 활용할 수 있다²²⁾.

사상자(*Torilis japonica*, TJ)는 미나리과에 속하는 和蛇床子의 성숙한 과실로 주요성분은 guaiane-type sesquiterpene 화합물인 torilin이며²³⁾, 활성과 관련된 연구로는 진통소염작용²⁴⁾, 항침습작용²⁵⁾, 혈관

신생억제효과²⁶⁾ 등이 보고되었다. 최근에는 사상자의 항암 효과와 관련된 연구도 진행되어 암치료의 적용 가능성을 넓혀가고 있다. 사상자에서 추출한 Guaiane Sesquiterpenoids은 폐암, 난소암, 흑색종, 대장암, 전립선암에 세포사멸효과가 확인되었으며 그 기전으로는 세포자연사 유발, Wnt/ β -catenin 신호 전달 저해, 안드로젠 수용체 신호전달체계 차단, EGFR 신호 전달 차단을 통한 암 전이 저하 등이 보고되었다^{14,27,28)}. 또한, 사상자는 자궁경부 상피내 증양의 환상투열요법 후의 환자들에게 한방 약물치료 중 가장 많이 활용된 약재 중 하나로 보고된 바 있으며²⁹⁾, 위축성 질염³⁰⁾과 세균성 질증³¹⁾ 등 여성생식기의 병변에 다용되는 외용법 중 하나이다. 사상자는 본래 祛風燥濕하고 殺蟲의 효능이 있어서 여성의 帶下陰痒에 활용되는 본초로서¹⁶⁾, 陰虛와 濕熱로 인한 帶下에서의 효과가 기존 연구에서 확인되었기에, 濕熱蘊毒이 원인이 되는 자궁경부암과 자궁의 염증성 질환 치료에도 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 사상자 추출물의 항암 작용을 확인하기 위하여 사상자 추출물과 HeLa 세포를 함께 배양하여 사상자 추출물의 HeLa 세포에 대한 독성을 확인하였다. 사상자 추출물 투여 시 HeLa 세포의 생존이 농도 의존적으로 감소하였으며 Live/Dead cell 비율을 추가로 확인한 결과 농도 의존적으로 Dead cells의 비율이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 사상자 추출물로 내인성 경로에 의한 세포자연사 유발을 확인하기 위해서 HeLa 세포의 미토콘드리아의 길이 변화를 공초점 현미경으로 분석한 결과 사상자 추출물을 투여한 실험군에서 농도 의존적인 미토콘드리아의 길

이가 감소하는 것을 관찰하였으며 이는 무처치군에 비해 통계적으로 유의한 결과였다.

P38은 세포 신호전달을 조절하는 주요한 MAPK(Mitogen-activated protein kinases) 중 하나로 염증반응, 산화스트레스 반응, 면역 기능, 감염에 대한 반응 그리고 종양억제 기능에 중요한 역할을 한다³²⁾. ERK (Extracellular signal-regulated kinase)는 MAPK 계열에 속하며 세포의 신호를 세포내 표적으로 전송하는 역할을 하고 과활성화될 경우 암의 발달과 진행에 중요한 역할을 한다³³⁾. 이전 연구에서 암세포에서 신경성장인자 제거 시 ERK이 감소하고 P38이 상승하는 것을 확인하였으며 세포자연사 유도에는 P38의 활성화와 ERK의 억제가 동시에 유발되는 것이 중요하다³⁴⁾.

본 연구에서는 사상자 추출물이 MAPK의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 사상자 추출물을 투여한 실험군에서 MAPK 중 ERK의 인산화는 농도 의존적으로 감소하는 경향이 있었고, P38의 인산화는 증가하는 것을 확인하였다.

세포사멸은 세포자연사와 세포괴사로 나뉜다. 세포자연사는 세포소기관과 세포막이 한동안 형태가 유지되나 핵은 조기 변성이 일어나며 세포괴사는 핵은 유지되나 세포막과 세포소기관이 조기 퇴화한다³⁵⁾.

본 연구에서는 사상자 추출물이 핵 변화에 미치는 영향을 확인하였고 사상자 추출물을 투여한 실험군에서 전체 세포수 대비 핵 변화가 일어난 세포의 비율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

결과적으로 본 실험을 통해 사상자 추

출물은 HeLa세포에 독성이 있어 세포사멸을 일으키며 이는 세포괴사가 아닌 내인성 경로를 통한 세포자연사를 일으킨다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 정상세포에 대한 사상자 추출물 투여 시의 세포독성을 확인하지 못했다. 향후 사상자 추출물의 안전성과 암세포 선택적인 치료 효과를 규명하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

사상자 추출물이 자궁경부암 세포주(HeLa cell)에 미치는 영향을 관찰하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사상자 추출물의 HeLa cell에 대한 세포 독성을 측정된 결과 농도 의존적인 증가를 확인하였다.
2. 사상자 추출물의 HeLa cell에 대한 세포 독성을 형광 probe로 염색하여 측정된 결과 농도 의존적으로 dead cells의 비율이 증가하는 것을 확인하였다.
3. 사상자 추출물 투여 후 HeLa cell의 미토콘드리아의 형태적 변화를 확인한 결과 농도 의존적으로 미토콘드리아의 길이가 감소한 것을 확인하였다.
4. 사상자 추출물 투여 후 HeLa cell의 핵 변화를 확인한 결과 전체 세포수 대비 핵 변화가 일어난 세포의 비율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.
5. 사상자 추출물 투여 후 HeLa cell의 ERK 인산화는 감소하고 P38 인산화는 증가하는 것을 확인하였다.

Acknowledgement

이 연구는 2019년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2019R1A2C1002443).

- Received : Jan 12, 2023
- Revised : Jan 16, 2023
- Accepted : Feb 24, 2023

References

1. Korean Medicine Obstetrics & Gynecology compilation committee. Korean Medicine Obstetrics & Gynecology (Vol 2). 4th ed. Seoul:Jeongdam Publisher. 2021:393, 401.
2. Korean Society of Obstetrics and Gynecology. Gynecology. 6th ed. Paju:Koonja Publisher. 2021:771.
3. National cancer information center. Cancer incidence rate by age group. [Cited January 8,2022]. Available from: <https://cancer.go.kr/lay1/S1T639C642/contents.do>
4. Ministry of Health and Welfare. 2020 National Cancer Registry Statistics Reference. 2022.
5. Lee JW. ASTI MARKET INSIGHT 82: Cervical Cancer Treatment. ASTI MARKET INSIGHT:2022-082.
6. Jo HJ, et al. Effects of Scutellariae Radix on Gene Expression of Human Cervical Cancer Cells(SNU-703). J Korean Obstet Gynecol. 2009;22(3) :117-34.
7. Kim BH, Baek SH. The Effects of the Stem of Spatholobus suberectus

- Dunn on the Proliferation and Gene Expression Related Apoptosis in Human Cervical Cancer Cells. *J Korean Obstet Gynecol*. 2005;18(1):169-80.
8. Lee JG, et al. Growth Arrest and Apoptosis of Human Uterine Cervical Carcinoma Cells Induced by Trichosanthes Semen Extract. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2005;19(4):965-72.
 9. Lee HH, Lim EM. Growth Inhibition and Apoptosis Induction of Trichosanthes Radix Extract on Human. *J Korean Obstet Gynecol*. 2005;18(3):77-91.
 10. Huh J. Donguibogam(東醫寶鑑). 1st. Seoul:Bubin Publishers. 2007:2165.
 11. Kim GS, et al. Anti-biofilm Effects of Torilis Japonica Ethanol Extracts against Staphylococcus Aureus. *J Microbiol Biotechnol*. 2022;32(2):220-7.
 12. Lee KY, Song EH, Hong CH. Effects of Torilis Japonica Extract on DNCB-induced Contact Dermatitis in BALB/c Mice. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2016;29(4):61-77.
 13. Jung HW, Ghil SH. A Torilis Japonica Extract Exerts Anti-proliferative Activities on the U87MG Human Glioblastoma Cell Line. *Mol Med Rep*. 2010;3(6):1041-5.
 14. Kim GT, Kim SY, Kim YM. Torilis Japonica Extract Fraction Compound, EGFR-targeted Inhibition of Cancer Abnormal Metastasis in A549 Lung Cancer Cells. *Oncol Rep*. 2017;38(2):1206-12.
 15. Song DH, et al. Sesquiterpenes from Fruits of Torilis Japonica with Inhibitory Activity on Melanin Synthesis in B16 cells. *J Nat Med*. 2018;72(1):155-60.
 16. Nationwide College of Oriental Medicine. Herbalism edited by Professor. Herbalism. 1st. Seoul:Younglim Inc. 2006:628-9.
 17. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer Metabolism: Looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(10):669-80.
 18. Park JG, Pyun WY, Park HW. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic targets. *Cells*. 2020;9(10):2308.
 19. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
 20. Pistrutto G, et al. Apoptosis as Anticancer Mechanism: Function and Dysfunction of Its Modulators and Targeted Therapeutic Strategies. *Aging(Albany NY)*. 2016;8(4):603-19.
 21. Wong RSY. Apoptosis in Cancer: from Pathogenesis to Treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):87.
 22. Cho JG. Oriental clinical oncology. Daejeon:Ju Min Publishers. 2001:799-818.
 23. Hwang EI, et al. Isolation and Development of Quantitative Determination of Torilin from the Torilis Fructus. *Kor J Pharmacogn*. 2007;38(4):321-6.
 24. Lee EB, et al. Isolation of torilin from Torilis Japonica Fruit and Its Analgesic and Anti-inflammatory Activities. *Kor J Pharmacogn*. 1999;30(2):137-44.
 25. Kim MS, et al. Anti-invasive Activity of Torilin, a Sesquiterpene Compound Isolated from Torilis Japonica. *Oncol Rep*. 2001;8(2):359-64.
 26. Kim MS, et al. Anti-angiogenic Activity

- of Torilin, a Sesquiterpene Compound Isolated from *Torilis Japonica*. *Int J Cancer*. 2000;87(2):269-75.
27. Park HW, et al. Guaiane sesquiterpenoids from *Torilis japonica* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Arch Pharm Res*. 2006;29(2):131-4.
28. Kim DH, et al. Antitumor mechanism of combination of *Angelica gigas* and *Torilis japonica* in LNCaP prostate cancer cells via G1 arrest and inhibition of Wnt/ β -catenin and androgen receptor signaling. *Phytother Res*. 2022;36(7):2999-3008.
29. Lee SJ, et al. Herbal Medicine for Cervical Intraepithelial Neoplasia after Loop Electrosurgical Excision Procedure: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Korean Obstet Gynecol*. 2020;33(2):44-62.
30. Park KD, Bae JE, Yoon YJ. Systematic Review of Fumigation Therapy for Atrophic Vaginitis. *J Korean Obstet Gynecol*. 2016;29(1):92-101.
31. Hwang YS, et al. Analysis for Randomized Controlled Clinical Trials of Korean Medicine External Treatment on Bacterial Vaginosis. *J Korean Obstet Gynecol*. 2019;32(2):50-70.
32. Bulavin DV, Fornace AJ. P38 MAP Kinase's Emerging Role as a Tumor Suppressor. *Advances in cancer research*. 2004;92:95-118.
33. Guo YJ, et al. ERK/MAPK Signalling Pathway and Tumorigenesis. *Exp Ther Med*. 2020;19(3):1997-2007.
34. Xia Z, et al. Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science*. 1995;270(5240):1326-31.
35. Eidet JR, et al. Objective Assessment of Changes in Nuclear Morphology and Cell Distribution Following Induction of Apoptosis. *Diagn Pathol*. 2014;9:92.