

大黃이 子宮筋腫細胞의 細胞自滅死에 미치는 영향

양영필 · 김현태 · 김상찬 · 백승희¹ · 김미려² · 권영규^{3*}

대구의대학교 한의과대학 방제학교실, 1: 부인과교실, 2: 약리학교실, 3: 생리학교실

Growth Inhibition of Uterine Leiomyoma Cells Using Rhubarb

Young Phil Yang, Hyun Tae Kim, Sang Chan Kim, Seung Hee Baek¹, Mi Rye Kim², Young Kyu Kwon^{3*}

Department of Formulae Pharmacology, 1: Department of OBGY, 2: Department of Pharmacology, 3: Department of Physiology, College of oriental Medicine, Daegu Hanny University

Uterine leiomyoma is the most common tumor in the female genital tract. Although the tumor is benign, it is of paramount importance since it often causes profuse menstrual bleeding, pressure symptoms, and infertility. Nevertheless, the etiology and pathophysiology of this abnormality remain poorly understood. The traditional definitive treatment for uterine leiomyomas is hysterectomy and, even today, symptomatic leiomyomas are the leading cause of hysterectomy in Korea. Clearly, the development of a safe, effective, and nonsurgical method of treatment for leiomyoma would be of great benefit to many women. The present study was designed to investigate the effect of Rhubarb on apoptosis in uterine leiomyoma cells. Results demonstrate that Rhubarb inhibited cell growth in dose-dependent manner. Cell growth significantly decreased to 60% of control in the treatment of Rhubarb (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Associated with the decreased response, there was a concomitant and significant delay of subG1 8.32% above baseline in the treatment of Rhubarb (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The delay of subG1 showed a dose-dependent manner, as evidenced by the flow cytometry. The reduced cellular viability on exposure to Rhubarb may represent the induction of apoptosis, at least in part, as concomitantly evidenced by enhanced DNA fragmentation, PARP cleavage and caspase 9 and decreased pro-caspase 3. In addition, Rhubarb decreased cIAP1 expression levels in dose-dependent manner. Taken together, these results suggest that Rhubarb can produce a potent inhibition effect of apoptosis and implicate the delay of G1 phase in the cell cycle and pathways of caspase 3 and 9 in the mechanism underlying inhibitory apoptosis effect of Rhubarb.

Key words : Uterine leiomyoma, leiomyomas, DNA fragmentation, low cytometry

서론

자궁근종은 자궁평활근에서 발생하는 양성 종양으로, 가입기 여성의 약 20~30%에서 발생하는 질병이다. 발병원인과 발병기전은 estrogen 의존성, 遺傳的, 人種的인 요소가 있다고는 하나, 명확히 알려져 있지 않으며, 이 질환의 20~50%에서 不定腫出血, 骨盤痛, 壓迫痛, 尿症狀, 不妊과 자연유산 등의 증상을 일으킬 수 있다. 이러한 증상의 정도는 종양의 수, 크기와 위치에 따라 다양하다¹⁾. 자궁근종의 일반적인 치료는 자궁적출술이며, 지금까지도 국내외를 통해 자궁적출술의 가장 많은 원인은 자궁근

종이다^{2,3)}. 그러나 오늘날 결혼 양상의 변화와 결혼 연령의 고령화와 더불어 증상이 있는 경우라 해도 자궁적출술이 최선의 방법이 되지 않는다는. 가입기 여성에게는 자궁을 보존하는 방법이 필수인데, 근종제거술은 51%에서 재발의 위험이 있고, 이중 15~20%에서는 재수술을 시행하여야 한다. 지금까지의 연구에서 원인이 되는 유전자들을 밝혀냈지만 이를 치료에 적용하지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 안전하고 효과적인 비수술적인 치료방법의 개발은 많은 여성에게 수술의 공포를 벗어날 수 있게 해줄 것으로 생각된다. 또한 유전자 치료를 이용한 세포독성 유전자치료가 세포주 수준에서 시행되고 있지만 단점이 더 많기 때문에 아직은 연구단계에 머무르고 있는 수준이다⁴⁾. 그리고 환자들은 수술법 이외에 비수술적인 방법을 많이 원하고 있는 실정이므로 비수술적인 요법의 하나로 한약을 이용한 치료제의 개발이 더욱 요구되어지고 있다.

* 교신저자 : 권영규, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : ykkown@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2242

· 접수 : 2003/12/04 · 수정 : 2003/12/29 · 채택 : 2004/01/26

韓醫學에서는 女性의 생식기 및 그 주위에 발생하는 腫瘍性疾患의 일종인 자궁근종을 癥瘕라 칭하며, 그 원인을 주로 瘀血로 보아 活血祛瘀藥을 사용하여 치료하였다³⁾. 大黃은 마디풀과 (polygonaceae)에 속한 多年生草本으로 性寒 味苦하며 瀉熱通腸, 涼血解毒, 逐瘀通經 등^{5,7)}의 효과가 있고, 그 약리작용은 瀉下作用, 抗菌作用, 抗腫瘍作用 등⁸⁾이 있는 것으로 밝혀져 있다. 大黃을 이용한 研究로는 박 등⁹⁾의 胃腸管機能 및 CD4 T세포에 미치는 영향, 이 등¹⁰⁾의 혈중 지질 함량에 미치는 영향, 오 등¹¹⁾의 肥滿模型에 미치는 영향, 황 등¹²⁾의 大黃이 配伍된 方劑에 대한 고찰 등의 보고가 있으나 大黃이 자궁근종세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

이에 大黃이 자궁근종치료에 일정한 효과가 있을 것으로 사료되어, 大黃을 체외배양한 자궁근종세포에 투여하여 증식억제와 세포자멸사를 유도하는 단백질발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

마디풀과(polygonaceae)에 속한 다년생초본인 大黃을 대구 한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 양질의 것을 정선하여 사용하였다.

2) 검액의 조제

실험에 사용된 약재는 일체의 가공이나 修治를 加하지 않는 상태에서 사용하였으며 大黃 9g을 methanol 18ml에 24시간 동안 침지시켜 검액의 상층액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 한 뒤, -70℃ 이하에서 24시간 이상 deep-freeze한 후 96시간 동안 완전히 동결 건조시켜 18g의 粉末을 얻었다. 3차 증류수에 100mg/ml (DMSO)로 용해시킨 후 상층액을 0.2µm filter (Nalgene, USA)로 여과하여 사용하였다.

2. 방법

1) 연구 대상

계명대학교 동산의료원 산부인과 교실에서 자궁근종으로 수술 받은 10명의 환자에서 수술시 신선한 자궁근종과 자궁근 조직을 채취하여 실험시까지 -78℃에서 냉동 보관하였다. 조직의 채취는 환자의 동의와 윤리 위원회에 통과한 지침서에 준해서 시행하였다. 이외에 1차 조직배양을 위해 수술시 신선한 조직을 얻어 자궁근종 세포를 일차 배양하여 실험 재료로 사용하였다.

2) 일차 세포 배양

수술 후 얻은 자궁근종조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단한 후 15mL 튜브에 옮겨 1000rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액은 제거하였다. 절단한 조직에 HEPES (25mmol/L), penicillin (200U/mL), streptomycin (200µg/mL), collagenase type IV (1.5mg/mL), DNase (0.2mg/mL)를 HBSS에 넣고 37℃ 수조에서 3~4시간 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 감하게 혼합해서 단일 세포로 분리

한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 양성 및 음성 결과에 따라 근육 세포인지를 확인하였다.

3) 생존 세포수 산정

자궁근종 세포를 60mm tissue culture dish에 2×10⁵cell/dish로 cell seeding 하였다. 24시간 배양시킨 후 大黃을 농도별로 투여하였다. 24~48시간 배양시킨 세포를 PBS로 세척 후, 1×trypsin-EDTA로 resuspension 시킨 뒤, 1000rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 세척하여 resuspension 시킨 후, cell suspension 20µL 와 동량의 trypan blue solution을 혼합하여 1분간 두었다. Hemacytometer 상에서 살아있는 세포수를 3회 반복 계산하였다.

4) MTS(Tritiated thymidine incorporation) 분석

96 well plate에 자궁근종세포를 multi pipet을 사용하여 4×10³/well으로 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 다음 大黃을 처리 한 후 MTS 측정시, One Solution Reagent를 실온에 90분 또는 37℃에 10분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media를 200µL multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 suspension 된 후 well 당 100µL 되도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20µL 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에 배양한 후 1~4 시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였다. 96 well plate reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western blot analysis

大黃을 투여한 후 세포 주기 회로에 관계하는 유전자와 세포자멸사에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에 Lysis Buffer (10mm Tris-Cl(pH 7.4), 5mm EDTA(pH 8.0), 130mm NaCl, 1% TritonX-100), 0.2M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계(Du[®] 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 Nitrocellulose paper (Immbilon, Milipore Co., USA)로 전기이동(electrotransfer)을 시행하였다. 전기 이동된 막을 blocking용액(5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체(Santa Cruze Biotechnology Inc., USA)인 p27, p21, p53, caspase 3, caspase 9, PARP, cIAP1, cIAP2, 그리고 Bcl-2를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후, 1×TBS-T 용액(20m mol/L Tris, 137m mol/L NaCl, 0.5% Tween 20)에 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (santa

Cruze Biotechnology Inc., USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응 시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비 특이적으로 결합해 있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

6) FACS(fluorescence-activated cell sorter)에 의한 세포주기 분석

자궁근종 세포를 60mm tissue culture dish에 3×10⁵ cells/dish로 cell seeding 하였다. 배양기에 24시간 배양 후 大黃을 용량별로 투여하였다. 24-48시간 배양시킨 세포를 PBS로 세척 후, 1 × trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1000rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 재부유시킨 뒤, 1000rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1mL넣고 재부유 시킨 후, 4℃에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액 제거하고 PBS 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma, USA) 0.1%, IGEAL-Ca-630 (Sigma, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5mg/ml, propidium iodide (Sigma, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4℃에서 염색하였다. 유세포분석기(FACS)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

7) DNA fragmentation 분석

자궁근종 세포에 大黃을 농도별로 처치한 후 10mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 5mM EDTA와 0.5% Triton X-100이 든 완충액을 얼음에 30분간 용해시켰다. 용해된 용해질을 충분히 혼합한 후 10,000rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액에 분절된 DNA를 동일 양의 neutral phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25:24:1)로 추출한 뒤, 0.1g/mL ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

결 과

1. 大黃의 세포증식 억제효과

일차배양 자궁근종세포에 大黃을 농도별로 투여한 24시간 후의 세포 증식에 대한 억제작용은 농도가 증가할수록 억제 작용이 증가하였으며 300µg/ml에서는 60%의 증식 억제를 보였다(Fig. 1).

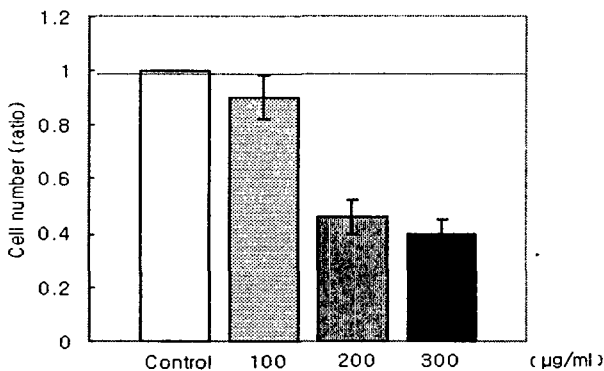
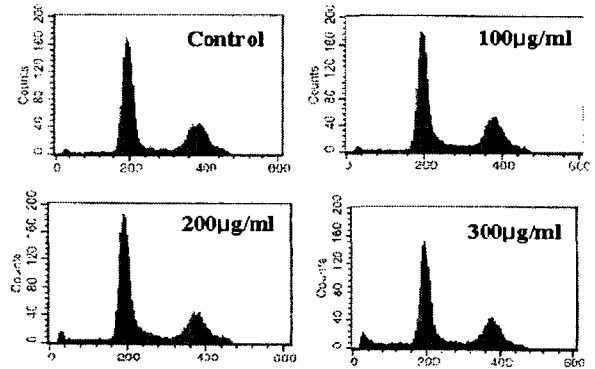


Fig 1. Dose dependent effect of Rheum undulatum on growth inhibition in human leiomyoma cells

2. 大黃에 의한 세포주기분석

大黃에 의한 증식억제를 유세포 분석기로 시행한 결과 대조군이 1.50%나 300µg/ml 농도에서 8.32%의 subG1기의 지연이 확인되어 세포자멸사의 양적 증거를 확인하였고, 농도별로 투여하여 농도 증가에 따른 subG1의 연장이 증가됨을 확인하였다(Fig. 2).



	Control	100µg/ml	200µg/ml	300µg/ml
Sub G1	1.50	1.55	4.69	8.32
G1	60.52	58.47	60.32	54.85
S	6.01	7.88	7.43	7.27
G2/M	31.28	31.39	26.91	29.03

(% gated)

Fig 2. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Rheum undulatum. Cell cycle profile were analyzed by FACS analysis. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

3. 大黃에 의한 DNA fragmentation 분석

세포자멸사의 증거를 확인하기 위한 DNA fragmentation 분석에서도 대조군에 비해 大黃 투여군에서 농도가 증가할수록 DNA의 분절이 증가하는 세포자멸사의 증거를 확보하였다(Fig. 3).

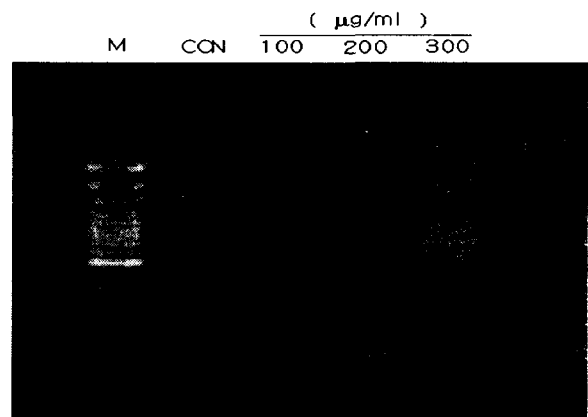


Fig 3. To analyze fragmentation of genomic DNA, cells were treated for 24 hr with control and Rheum undulatum.

4. 大黃이 cell cycle 관련 단백질에 미치는 영향

大黃이 세포주기회로에 미치는 영향을 확인하기 위해 p27, p21과 p53단백질을 관찰하였으나, p27, p21과 p53에서는 변화를 확인할 수 없었다(Fig. 4).

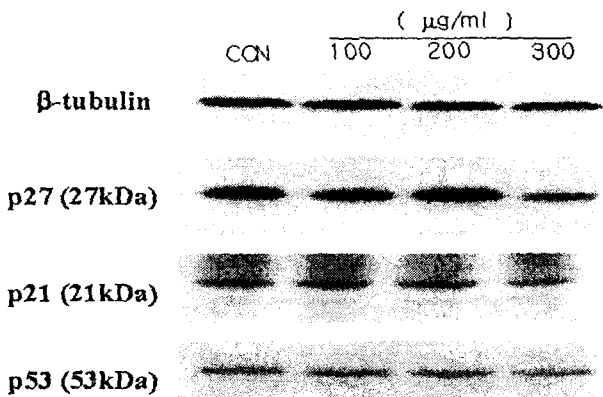


Fig. 4. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Rheum undulatum*. Effect of *Rheum undulatum* on p27 and p21, p53 protein in uterine leiomyoma cells. Beta tubulin was used as internal control.

5. 大黃이 세포자멸사 관련 단백질에 미치는 영향

大黃을 농도별로 투여한 결과, pro-caspase 3과 pro-caspase 9는 농도의존적인 감소를 보였고, active caspase 9의 발현은 농도의존적으로 증가되었으며, PARP의 발현감소 및 분절증가를 확인하였다. 이는 caspase 3과 caspase 9 경로를 통한 세포자멸사를 의미한다. 그리고, cIAP1유전자에서는 농도의존적으로 발현이 감소되었으나, Bcl-2와 cIAP2유전자는 농도별 투여후의 발현 변화에서 발현의 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 5).

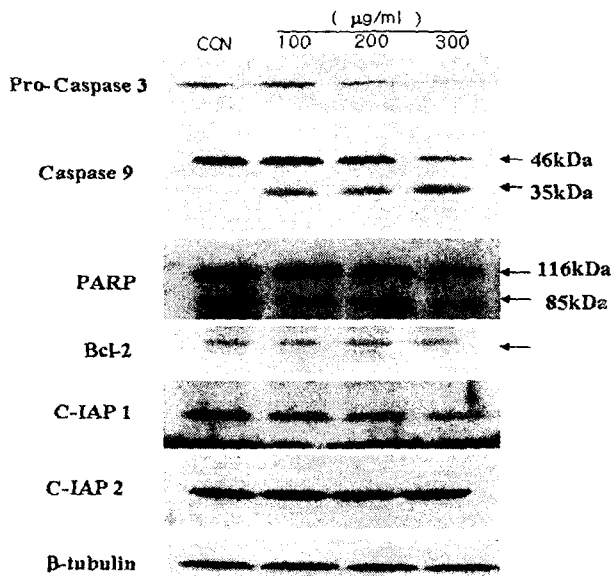


Fig. 5. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Rheum undulatum*. Effect of *Rheum undulatum* on Pro-caspase3, caspase9, PARP, Bcl-2, c-IAP1 and c-IAP2 protein in uterine leiomyoma cells. Beta tubulin was used as internal control.

고찰

자궁근종은 여성 생식기에서 발생하는 가장 흔한 양성 질환으로서 일반적으로 근종(myoma) 또는 평활근종(leiomyoma)이라 불리고 있다. 원인은 estrogen의존성, 유전적, 인종적 요소가

있다고 하나 아직 명확하게 밝혀진 발병원인이나 발병기전은 없다. 증상은 비정상자궁출혈과 골반통이 가장 많고, 그 외 뇨증상, 불임 및 임신 합병증 등이 나타난다고 한다¹³⁾. 치료법으로는 외과적으로 자궁적출술, 근종제거술이 있으나, 자궁적출술은 불임을 유발하고 임신능력의 보존이 필요한 여성에 대해서는 적절한 치료법이 아니며, 30~40대의 경산부에게서도 자궁적출술이 적절한 치료법은 아니다. 근종제거술은 자궁적출술보다 통증, 출혈이 많으며, 51%의 재발위험이 있고 15-20%가 재수술을 시행한다. 지금까지 사용하는 약물적 치료는 GnRH agonist 투여로 호르몬 생성을 일시적으로 감소시키는 치료로, 근종의 크기를 일시적으로 줄이는 데는 성공했지만 약제 투여 중단 후에는 근종이 다시 커지므로 완전한 치료는 되지 못하고 있다¹⁴⁾. 현재 외국에서는 다양한 각도에서 자궁근종의 약물 치료를 개발하고 있으나 아직까지 그 결실이 이루어지지 않고 있다. 자궁근종이 호르몬과 관계한다고 생각하여 progesterone receptor blocker 인 RU-486을 세포주 수준에서 치료하여 효과가 있다는 보고가¹⁵⁾ 있으나 이것도 장기간의 효과에 대해서는 검증되지 않았다. 이외에 폐섬유증의 치료제로 시험하고 있는 항섬유제인 pirfenidon을 이용하여 근종의 세포 증식 및 collagen 생성을 억제하였다는 보고도 있다¹⁶⁾. Nowak 등¹⁷⁾은 성장인자가 근종 세포의 증식 및 collagen이나 혈관 등을 자극하여 자궁근종이 증식한다고 생각하고 이런 성장인자를 차단하는 치료약제의 가능성을 연구하고 있다. 또한 유전적인 연구도 진행되어 근종의 40%에서 염색체 이상을 동반하고 이것이 자매간이나 수직으로 영향을 받는 인자에 대한 연구도 행해지고 있다¹⁸⁾. 최근에는 설치류에서 자궁근종 세포주를 확립하여 자궁근종의 발병 과정에서 에스트로겐의 중요성과 항에스트로젠 투여 후 근종의 크기를 줄인다는 보고도 있다¹⁹⁾. 이외에 GnRH antagonist, angiogenesis inhibitor에 관한 연구가 활발히 진행되고 있고, 임신을 원하는 여성에게서 국소적인 유전자 치료 가 가능한지를 활발히 연구하고 있다.

韓醫學에서는 女性の 생식기 및 그 주위에 발생하는 腫瘍性疾患의 일종인 자궁근종을 癥瘕라 칭하며^{6,8,11)}, 그 원인을 주로 瘀血로 보아 活血祛瘀藥을 사용하여 치료하였다. 한편 大黃은 마디풀과(polygonaceae)에 속한 多年生草本으로 基源植物로는 장엽대황(*Rheum palmatum* Linne), 당고특대황(*R. tanguticum* Maxim. et BALF.), 약용대황(*R. officinale* BAILL.), 장군풀(*R. coreanum* NAKAI), 종대황(*R. undulatum* LINNE)등의 乾燥根 및 根莖이다^{5,6,9,20)}. 性寒 味苦하며 瀉熱通腸, 涼血解毒, 逐瘀通經하여, 實熱便秘, 破癥瘕積聚, 積滯腹痛, 瀉痢不爽, 濕熱黃疸, 腸癰腹痛, 瘀血經閉, 跌打損傷등을 치료하고⁵⁻⁷⁾, 그 약리작용은 瀉下作用, 抗菌作用, 抗腫瘍作用 등⁸⁾이 있는 것으로 밝혀져 있다. 大黃을 이용한 研究로는 박 등⁹⁾의 胃腸管機能 및 CD4 T세포에 미치는 영향, 안 등²¹⁾의 前腦虛血의 神經細胞損傷에 대한 防禦효과, 이¹⁰⁾의 혈중 지질 함량에 미치는 영향, 손 등²²⁾의 血중지질 및 효소활성에 미치는 영향, 배 등²³⁾의 體重과 副辜丸脂肪組織 변화에 미치는 영향, 오 등¹¹⁾의 肥滿模型에 미치는 영향, 김 등²⁴⁾ 煎湯時間에 따른 瘀血病態模型에 미치는 영향, 김 등²⁵⁾의 胸部大動脈血管弛緩에 미치는 영향, 김 등²⁶⁾의 火傷 皮膚組織과 血清 내 호

중구 chemokine의 생성억제 효과, 황 등¹²⁾의 大黃이 配伍된 方劑에 대한 고찰 등의 보고가 있으나 大黃이 자궁근증세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

본 연구자는 大黃을 투여하여 자궁근증 세포에 미치는 영향을 평가하였다. 우선 약재 투여 후의 세포증식에 미치는 영향은 농도가 증가할수록 세포증식 억제가 많이 일어났으며, 300 μ g/ml에서는 60%의 증식억제를 보였다. 이러한 증식억제가 세포자멸사로 유도하는지를 유세포 분석기를 이용한 세포주기회로 분석에서 subG1기의 연장을 확인하였다. 또한, DNA fragmentation 분석을 통해 약재 투여 후에 농도가 증가할수록 DNA의 분절이 증가되는 것을 확인하였다. 그러므로 G1기의 연장을 초래하여 세포자멸사로 이끈다고 하겠다. 세포주기회로 분석에서 subG1기의 연장이 확인되어 p27, p21과 p53 단백질을 분석하였다. 약재를 농도별로 투여하였으나 농도에 따른 p27, p21과 p53 유전자의 발현변화가 없는 것으로 보아 대황은 세포 주기회로에는 관여하지 않는 것으로 보여진다. 세포자멸사의 경로를 알아보기 위해 caspase과 PARP 분석을 하여 pro-caspase 3, pro-caspase 9의 감소와 caspase 9의 증가를 확인하였고, PARP의 분절을 확인하였으므로 大黃은 caspase 3 및 caspase 9의 경로를 통한 세포자멸사를 유도한다. 이외에 Bcl-2, cIAP1과 cIAP2 유전자를 분석한 결과 Bcl-2와 cIAP2는 농도에 따른 발현변화를 관찰할 수 없었고, cIAP1는 농도의존적으로 발현이 감소되므로 세포자멸사에 관여하는 caspase의 활성을 증가시킨 것으로 생각된다. 그러므로 大黃에 의한 자궁근증 세포의 증식억제는 cIAP1의 억제 및 caspase 3, caspase 9의 활성화를 통한 세포자멸사에 기인한 것으로 요약된다.

이상의 결과로 보아 大黃은 자궁근증 세포에서 증식억제 작용이 있으며, 세포주기회로의 G1기를 연장하여, 세포자멸사로 이르게 한다. 그러므로 이 大黃을 이용한 자궁근증의 약물치료를 위한 약재로서의 가능성을 보여주었다.

결 론

大黃이 자궁근증에 미치는 영향을 평가하기 위해, 환자로부터 적출한 1차 배양 자궁근증세포에 大黃을 처치한 후 세포주기와 세포자멸사에 관련된 단백질 발현을 살펴본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

大黃은 자궁근증세포에 대하여 농도의존적으로 증식억제 효과를 나타내었으며, 300 μ g/ml에서는 60%의 증식 억제를 보였다. 大黃은 농도의존적으로 subG1기의 증가를 유도하였다. 大黃은 농도의존적으로 DNA 분절을 유도하였다. 大黃은 p27, p21과 p53 유전자의 발현에는 변화가 없으므로 세포주기회로에 관여하지 않는다. 大黃은 caspase 3 및 caspase 9 경로를 통하여 세포자멸사를 유도한다.

이상의 결과로 보아 大黃은 자궁근증 세포에서 증식 억제 작용이 있으며, 세포주기회로의 G1기를 연장하여, 세포자멸사로 이르게 한다. 그러므로 大黃은 자궁근증의 약물치료를 위한 약재로서의 가능성을 보여주었다.

참고문헌

1. Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata : etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril* 36:433-45, 1981.
2. 신영우, 변영진, 나영호, 김창학, 권순욱. 복식 전 자궁 적출술에 관한 임상 통계적 고찰. *대한산부인과학회지* 28(1):90-97, 1985.
3. Gambone, JC., Reiter, RC., Lench, JB. and Moore, JG. The impact of a quality assurance process on the frequency and confirmation rate of hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 63:545-550, 1990.
4. Brandon DD, Erickson TE, Keenan EJ, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Warner C, Clinton GM. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab* 80; 1876-81, 1995.
5. 전국 한의과대학 본초학 교수 공저 : 本草學, 서울, 영림사. p.241-244, 1991.
6. 陳存仁. 圖說 漢方醫藥大事典. 東都文化社 III10-13, 1984.
7. 吳陣. 神農本草經. 서울, 수림사. 40, 1971.
8. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 完譯中藥大事典. 서울 정담. pp.1324-1333, 1997.
9. 박종배, 이해정. 大黃전탕액 경구투여가 흰쥐의 胃腸管機能 및 CD4 T세포에 미치는 영향. *경희한의대논문집*. 19(2):1-12, 1996
10. 이영종. 大黃 전탕액 분획이 고지사료 투여 흰쥐의 혈중 지질 함량에 미치는 영향. *대한본초학회지* 15(2):87-93, 2000.
11. 오명길, 송용선. 大黃 抽出액이 白鼠의 肥滿模型에 미치는 영향. *한방재활의학회지*. 7(2):46-64, 1997.
12. 황기명, 이기옥, 윤용갑. 大黃이 配伍된 方劑의 活用範圍, 主治作用 및 病理에 대한 고찰(東醫寶鑑을 중심으로). *대한방제학회지* 8(1); 99-128, 2000.
13. 이태균. 자궁근증에 관한 고찰. *대한한방부인과학회지*. 16(1); 164-169, 2003.
14. West CP, Lumsden MA, Lawson S, Williamson J, Baird DT. Shrinkage of uterine fibroids during therapy with goserelin (Zoradex) : a lutenizing hormone-releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. *Fertil Steril* 48:45-51, 1987.
15. Murphy AA, Morales AJ, Kettel LM, Yen SS. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogesterone RU486: dose-response effect. *Fertil Steril* 64(1):187-90, 1995.
16. Lee BS, Marolin SB and Nowa RA. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibit leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clinic Endocrinology Metabolism* 83: 219-223, 1998.
17. Nowak RA. Novel therapeutic strategies for leiomyomas: targeting growth factors and their receptors. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 5:849-53, 2000.
18. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle

- cells show increased expression of transforming growth factor-beta3(TGF beta 3) and altered responses to the atiproliferative effects of TGF beta. J Clin Endocrinol Metab 86:913-20, 2001.
19. Howe SR, Gottardis mm, Everitt JI, et al. Rodent model of reproductive tract leiomyomata; Establishment and characterization of tumor derived cell lines. Am J Pathol. 146:1568-79, 1995.
 20. 신민교. 原色臨床本草, 서울, 영일사. pp. 308-312, 463-464, 1981.
 21. 안덕균, 원도희, 김종호. 4-vessel occlusion으로 유발한 흰쥐 前腦虛血의 神經細胞 損傷에 대한 大黃의 防禦效果. 대한본초학회지. 14(1);111-121, 1999.
 22. 손영종, 김윤상, 이영종. 大黃이 高脂血症 흰쥐의 혈중지질 및 효소활성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 14(1);61-68, 1999.
 23. 배정환, 이종수, 김성수, 신현대. 大黃이 비만유발 白鼠의 體重과 副睪丸脂肪組織 변화에 미치는 영향에 대한 연구. 한방재활의학회지. 8(2);62-76, 1998.
 24. 김도완, 박창국. 전탕시간에 따른 生大黃 및 酒大黃이 瘀血病態 模型에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 19(1);114-123, 1998.
 25. 김형환, 구분식, 박수연, 안덕균, 최호영, 박성규. 장엽大黃이 白鼠의 胸部大動脈 血管弛緩에 미치는 영향. 대한본초학회지. 17(2);111-118, 2002.
 26. 김성배, 강병수. 종대황의 皮膚塗布로 인한 白鼠의 火傷 피부 조직과 혈청 내 호중구 Chemokine의 생성억제 효과. 대한본초학회지. 15(2);25-31, 2000.