

鷄血藤의 Beta-sitosterol 성분이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사의 유도에 미치는 영향

대구한의대학교 한의과대학 부인과 교실
박영선, 백승희

ABSTRACT

The effect of β -sitosterol proliferation and apoptosis in human uterine leiomyoma cells

Youngsun Park, Seunghee Baek

Dept. of gynecology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Purpose : β -sitosterol is kind of phytosterols or plant which are structurally similar to cholesterol. This study was aimed to investigate the inhibitory effect of the β -sitosterol on the proliferation of human uterine leiomyoma cells and the expression of gene related the mechanism of cell apoptosis.

Methods : We counted the number of death cells treated with indicated time of the β -sitosterol and investigated cell death rate by cell count assay. Furthermore, flow cytometry analysis and DNA fragmentation assay were used to dissect between necrosis and apoptosis. and then we observed the differential gene expression by western blot analysis.

Results :

- 1) The inhibitory effect on the growth of uterine leiomyoma cell treated with the β -sitosterol 16 μ M was increased in a time dependent.
- 2) The result of flow cytometry analysis, subG1 phase arrest related cell apoptosis was investigated 16.97% in uterine leiomyoma cell treated with the β -sitosterol 16 μ M and showed the fashion of proportional time dependent.
- 3) The gene expression of p27, p21 related cell cycle was increased according to increasing time interval but cyclin E-CDK2 complex was decreased expression.
- 4) The character of apoptosis, DNA fragmentation was significantly observed on the time dependent.
- 5) The expression of pro-caspase 3 and PARP were decreased dependent on treatment with time dependent.

Conclusion : This study showed that the β -sitosterol have the inhibitory effect on the proliferation of human uterine leiomyoma cell and the effect was related with apoptosis.

Key words : β -sitosterol, uterine leiomyoma, *spatholobus suberectus* Dunn

I. 緒論

자궁근종은 자궁평활근층내의 양성종양으로서 생식연령기에 있는 30~45세의 여성에서 호발하며, 악성종양으로의 변화는 0.5% 미만으로 가족력이 있는 질환으로 알려져 있다^{1,2)}.

자궁근종의 원인에 대하여는 내인성 에스트로겐의 자극이 자궁근종의 성장인자로 알려져 있으며^{3,4)} 최근에는 인슐린유사 성장인자 (Insulin-like growth factor, IGF-I/IGF-II)와의 관련성^{7,11)}에 대한 연구가 보고되고 있지만 그 발생과 성장기전에 대한 명확한 규명이 되어 있지 않다.

자궁근종의 치료는 전자궁적출술이 가장 일반적이며 그 외에 GnRH agonist의 사용, 근핵적출술, 자궁동맥전색술 등이 있으나 자궁적출술 이외는 확실한 대처방안이 없는 실정이다. 여성 자궁적출술의 약 40%가 자궁근종에 의한 것으로 나타나고 있는데, 자궁적출술은 자궁근종 치료를 위한 근치적 치료법이지만 단순 자궁적출만으로도 여성으로서 건강한 느낌의 장애, 조기폐경 증상, 난소의 기능저하 등이 나타난다^{1,2)}. 특히 우리나라 여성은 자궁을 임신이나 월경과 같은 생식기관으로만 간주하지 않고 여성의 생리를 전반적으로 주관하고, 대사와 활동력 및 정신 상태까지 조절해 주는 주요기관으로 인식하고 있다¹²⁻¹³⁾. 그러므로 폐경이 된 여성에 있어서도 자궁의 적출이 최선의 치료방법이 될 수는 없으므로 새로운 보존적인 치료방법의 개발이 필요하다.

따라서, 자궁근종에 대한 치료방법과 관련하여 유전자 치료법의 개발이 최근 활발히 진행되고 있으며 한의학에서는 한약처방이나 한약재를 이용한 자궁근종의 증식억제 효과와 유전자 발현에 대한 연구¹⁴⁻¹⁸⁾도 진행되고 있다.

鷄血藤은 補血行血, 活血祛瘀의 효능이 있어 貧血, 月經不調, 痛經, 血虛經閉 등의 月經病에 주로 사용되고 있으며¹⁹⁻²¹⁾ 실험적

연구로는 막지질 조성변화²¹⁾, HIV-1 protease 활성 억제²²⁾, 항염 활성 효과²³⁾, 조혈 및 면역작용²⁴⁾, 종양전이 억제효과²⁵⁾, 활막세포에 대한 면역반응²⁶⁾, 세포주기 억제 효과²⁷⁾ 등이 보고되어 있다.

최근에 鷄血藤의 자궁근종세포에 대한 증식억제 효과와 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현에 미치는 효과가 규명된 바 있으나²⁸⁾ 鷄血藤의 어떤 성분이 이러한 기전에 작용하는지에 대한 보고는 아직 없었다. 이에 저자는 鷄血藤에서 가능성 있는 목표 성분중 하나인 β -sitosterol에 대한 직접적인 영향을 알아보기 위해 체외배양 한 자궁근종세포에 β -sitosterol을 처리 한 후 자궁근종세포의 증식억제 효과, 세포주기 관련 유전자의 발현에 미치는 효과, 세포주기 분석, 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향에 대하여 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

실험에 사용된 β -sitosterol은 Sigma 회사 (St. Louis, MO)로부터 구입하여 검액의 처리 농도는 β -sitosterol의 국제적 표준에 따라 16 μ M 농도로 처리하였다²⁹⁾.

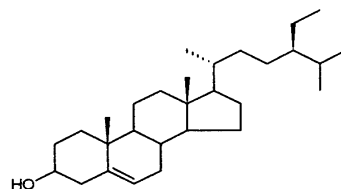


그림 . β -sitosterol

2. 方法

1) 자궁근종세포의 배양

자궁근종을 가진 환자의 전자궁적출술시에 자궁근종의 중심에서 가장자리로 향해 3분의 1

지점 부위를 수술 후 채취하였으며, 자궁근종의 선택은 자궁의 크기가 임신 12주 이상, 이차적 변성이 없는 부위를 선택하였다.

환자의 나이는 40~45세 사이의 환자들로 하였으며 적출한 자궁의 자궁내막주기는 총 10에 중 증식기 5예, 분비기 5예로 하였다. 일차 배양은 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단한 후 15ml 튜브에 옮기고 1000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액은 제거하였다. 이어 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°C 수조에서 3~4시간 동안 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일세포로 분리한 후 2000 rpm에서 다시 5분간 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 근육 세포인지를 확인하였다.

2) 생존세포수의 산정

자궁근종세포를 60mm tissue culture dish에 2×10⁵ cell/dish로 세포를 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 lipofectamine을 이용하여 β-sitosterol 16 µM 검액을 처리한 후 transfection 시켰다. 이렇게 배양시킨 세포를 24~48시간 PBS 용액으로 세척한 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유 시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS 용액으로 세척하여 재부유 시킨 후, cell suspension 20µl와 동

량의 trypan blue 용액을 혼합하여 1분간 방치해 두었다. Hemacytometer 상에서 3회 반복하여 살아있는 세포수만을 계산하였다.

3) 자궁근종세포의 증식억제 검사 (BrdU assay)

자궁근종세포를 multi pipet을 사용하여 96-well plate에 10% FBS를 넣고 1×10⁴/mL으로 분주하였다. 배양기에서 2시간 동안 BrdU labeling agent (Roche, Mannheim, Germany)로 배양한 후 세포를 anti-BrdU peroxidase 시약을 처리하고 실온에 90분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media 200µl multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 부유된 후 well 당 100µl 보유하도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20µl 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 BrdU를 측정하였으며 96-well plate reader기를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Flow cytometric analysis

자궁근종세포를 60mm tissue culture dish에 3×10⁵ cells/dish로 세포 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 후 대조군과 β-sitosterol 16 µM을 시간별로 처리하였다. 세포를 24~48시간 배양시키고 PBS 용액으로 세척한 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유 시킨 뒤, 1.5ml tube에 옮기고 1000 rpm 으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS 용액으로 재부유 시킨 뒤 1000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1 ml를 넣고 재부유 시킨 후, 4°C에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm 으로 3분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 PBS 용액으로 세척한 후, Trisodium citrate (Sigma, MO, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, MO, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/ml, propidium iodide (Sigma, MO, USA) 용

액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4℃에서 염색한 후 유세포분석기(FACS)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

5) DNA fragmentation analysis (Cellular DNA fragmentation ELISA)

자궁근종세포를 multi pipet을 사용하여 96-well plate에 10% FBS를 넣고 1×10⁴/mL으로 분주하였다. 배양기에서 2시간 동안 10 μM BrdU labeling agent (Roche, Mannheim, Germany)로 배양한 후 세포에 β-sitosterol 16 μM을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다 세포를 채부유 시킨 뒤 anti-DNA-antibody 96-well plate에 보유 한 후 실온에 90분 동안 방치하였다. DNA의 고정과 denaturation 과정을 거친 후 anti-BrdU peroxidase 시약을 처리하고 실온에 90분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media 200 μL multi pipet을 이용하여 pipeting 하여 cell이 부유 된 후 well 당 100 μL 보유하도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 μL 넣고 37℃, 5% CO₂ 배양기에 배양한 후 H₂SO₄로 반응을 중지시키고, 96-well plate reader기를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Western Blot analysis

β-sitosterol 16 μM을 처리한 후 cyclin E, CDK2, CDK4 및 세포자멸사에 관계하는 p27, p21, Skp2, pro-caspase 3, PARP, Rb, E2F 유전자 단백질의 발현 차이를 확인하고, 세포주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10mM Tris-Cl(pH 7.4), 5mM EDTA(pH 8.0), 130mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2M phenyl-methylsulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리로 상층을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., PA, USA)를 이용하여 단백

질을 추출한 후 분광광도계 (Du® 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 이렇게 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, Bedford, UK)로 전기이동(electrotransfer)을 시행하였다. 전기이동 된 막을 blocking 용액(5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking 용액을 제거하고 일차항체인 cyclin E, CDK2, CDK4, p27, p21, Skp2, pro-caspase 3, PARP, Rb, E2F (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1×TBS-T 용액(20mmol/l Tris, 137mmol/l NaCl, 0.5% Tween 20%)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz, CA, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비특이적으로 결합해 있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, NJ, USA)로 검출하였다.

7) 통계분석

모든 시험은 3회 반복 측정 하였으며, 유의값의 판정은 student's t-test, paired t-test를 이용하여 분석하였고, p값이 0.05 이하일 때를 유의값으로 하였다.

III. 成績

1. 자궁근종세포에 대한 증식억제 효과

β-sitosterol에 의한 자궁근종세포의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 일차 배양된 자궁근종세포에 β-sitosterol 16 μM을 처리한 결과,

72시간 후의 세포증식 억제효과가 최고조에 달하여 40%의 증식이 억제되었다 (* ; p<0.05) (Fig. 1).

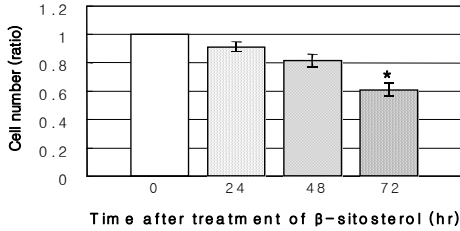


Fig 1. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated time of β -sitosterol 16 μ M. Cell proliferation was determined using the cell count assay(* ; p<0.05).

2. 자궁근종세포에 대한 DNA 증식억제 효과 β -sitosterol에 의한 자궁근종세포의 DNA 증식억제 효과를 알아보기 위하여 일차배양된 자궁근종세포에 β -sitosterol 16 μ M을 처리한 결과, 72시간 후에 42%의 DNA 증식이 억제되어 통계학적으로 의미가 있었다 (* ; p<0.05)(Fig. 2).

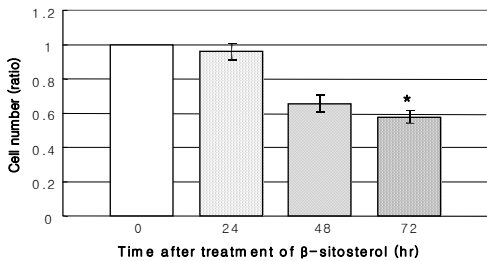
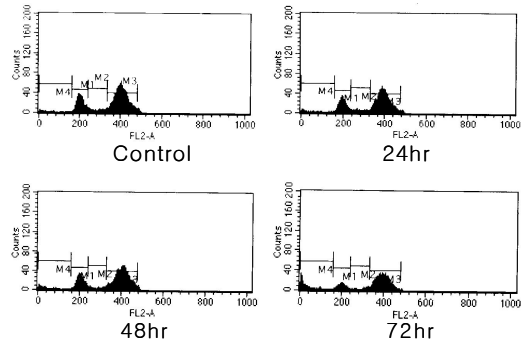


Fig 2. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated time of β -sitosterol 16 μ M. Cell proliferation was determined using the BrdU incorporation assay (* ; p<0.05).

3. 세포주기(Cell cycle)에 미치는 효과

자궁근종세포에 β -sitosterol 16 μ M을 처리하고 시간에 따른 세포주기를 분석한 결과, 대조군은 subG1기가 1.90%로 나타났으나 β -sitosterol 16 μ M 72시간 후에는 16.97%의

subG1기의 지연이 확인되어 세포자멸사의 量的 증거를 확인하였다(Fig. 3).



| | Control | 24hr | 48hr | 72hr |
|--------|---------|-------|-------|-------|
| Sub G1 | 1.90 | 3.11 | 4.78 | 16.97 |
| G1 | 22.84 | 22.51 | 21.72 | 15.00 |
| S | 6.20 | 6.77 | 5.10 | 4.84 |
| G2/M | 68.36 | 67.01 | 68.24 | 63.22 |

Fig 3. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated time of β -sitosterol 16 μ M. 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.

4. 세포자멸사 유도 효과

자궁근종세포에 β -sitosterol 16 μ M을 처리하고 시간에 따른 DNA fragmentation을 정량적으로 ELISA법으로 분석한 결과, 대조군에 비하여 β -sitosterol 16 μ M 처리 후 시간이 지날수록 DNA의 분절현상이 증가함을 관찰하였다(Fig. 4).

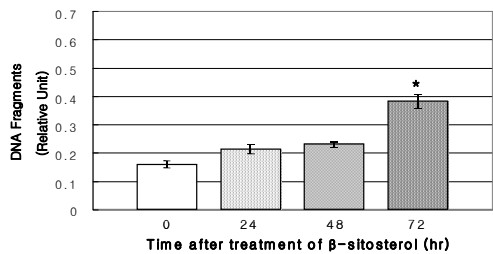


Fig 4. To analyze fragmentation of genomic DNA, cells were treated for indicated time interval with control and β -sitosterol 16 μ M (* ; p<0.05).

5. cyclin E, CDK2, CDK4, p27, p21 및 Skp2 유전자에 대한 효과

자궁근종세포에 β -sitosterol 16 μ M을 처리하고 시간에 따른 cell cycle에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p27, p21 유전자는 시간이 지날수록 발현이 증가하였고, CDK2, cyclin E, Skp2는 발현이 감소하였으나 CDK4는 발현의 변화가 없었다(Fig. 5).

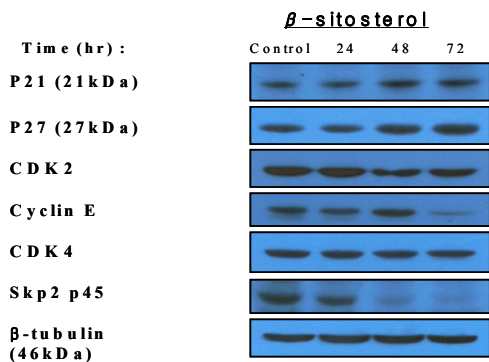


Fig 5. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated time of β -sitosterol 16 μ M. Effect of β -sitosterol 16 μ M on p27, p21, CDK2, CDK4, Skp2 and cyclin E protein in uterine leiomyoma cells. β -tubulin was used as internal control.

6. 세포자멸사 관련 유전자에 대한 효과

자궁근종세포에 β -sitosterol 16 μ M을 처리하고 시간에 따른 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3, PARP 유전자의 발현을 측정한 결과, 시간에 비례하여 비활성 형태의 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 PARP는 농도가 증가할수록 발현이 감소하며 PARP cleavage는 농도가 증가할수록 발현이 증가됨을 관찰하였다. 또한 Rb는 농도가 증가할수록 탈인산화가 진행되고, E2F 유전자의 발현도 감소되는 것을 보여주었다(Fig. 6).

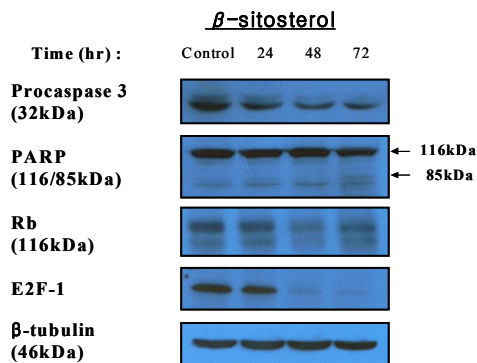


Fig 6. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated time of β -sitosterol 16 μ M. Effect of β -sitosterol 16 μ M on pro-caspase 3, PARP, Rb and E2F protein in uterine leiomyoma cells. β -tubulin was used as internal control.

IV. 考察

자궁근종은 부인과 영역에서 가장 흔한 양성 종양의 하나로 모든 생식 연령의 여성의 20% 이상에서 볼 수 있는 질환으로 단세포군(monoclon)의 형태로 자궁근종에서 기원하여 자궁의 평활근 세포에 위치한다³⁰⁻³¹. 자궁근종의 부피는 세포외기질(extracellular matrix)의 합성과 세포증식 및 혈관 형성에 관련이 있으며³², 자궁근종에 대한 병인론에 대해서는 아직 명확한 기전이 설명되지 않은 상태로 에스트로젠과 프로게스테론에 의해 성장하고, GnRH-agonist를 사용했을 경우 저에스트로젠 상태를 유발하여 종양이 위축된다는 보고가 있다³³⁻³⁵.

자궁근종의 원인과 치료에 대한 연구로는 호르몬과 관련하여 progesterone receptor blocker인 RU-486에 대한 치료효과 GnRH antagonist, angio-inhibitor의 효과에 대한 보고가 있으며³⁶ 폐섬유증의 치료제로 시험하고 있는 항섬유제인 prifenidon을 이용한 자궁근종의 세포증식 및 collagen 생성을 억제하였다는 보고도 있다³⁷. Nowak 등³⁸⁻³⁹은 성장인자가 자궁근종 세포의 증식 및 collagen이나 혈

관 등을 자극하여 자궁근종이 증식한다고 생각하고 이런 성장 인자를 차단함으로써 치료 약제로서의 가능성을 연구하고 있다.

韓醫學에서는 자궁근종을 여성생식기에 발생하는 종양질환인 癥瘕의 범주로 보고⁴⁰⁻⁴¹⁾ 癥瘕의 원인으로는 外感寒邪, 七情, 痰, 食積, 死血, 正氣虛 등과 관련이 있으며 그 중 瘀血을 가장 중요한 원인으로 인식하여 活血祛瘀藥 위주의 처방이나 약물이 다용되고 있다⁴²⁾.

鷄血藤은 清代 《本草綱目拾遺⁴³⁾》에 최초로 기재되어 豆科에 속하는 密花豆(*spatholobus suberectus* Dunn)와 昆明鷄血藤(*M. reticulata benth*), 百花油麻藤(*M. birdwoodiana* Tutcher) 등 그 藤莖을 건조한 것으로 한의학에서는 주로 行血補血, 舒筋活絡하여 關節酸痛, 風濕痺痛, 手足麻木, 月經不調, 血虛經閉, 月經痛 등에 사용된다⁴⁴⁾.

鷄血藤(*spatholobus suberectus* Dunn)은 flavononetin, diazein, isoliquiritigenin 등의 flavonoids계 성분과 β -sitosterol, stigmasterol campesterol 등의 sterols계 성분으로 구성되어 있는 것으로 보고⁴⁵⁻⁴⁶⁾되고 있다.

본 실험은 鷄血藤을 이용하여 자궁근종세포에 투여하여 증식억제효과와 세포자멸사를 유도하는 유전자 발현에 유의한 효과가 나타났으나²⁸⁾ 그 구체적인 성분과 기전을 밝히고자 鷄血藤의 중요 구성성분 중의 하나인 β -sitosterol을 사용하여 자궁근종세포에 대한 효과를 알아보기 위해 시도된 것이다.

β -sitosterol은 식물성 sterol 중의 하나이며, 콜레스테롤과 유사한 구조를 가지나 24번 위치의 탄소 구조가 다르게 배열되어 있다. 인체내에서는 식물성 sterol을 합성할 수가 없고, 흡수에 의해서만 취해지는 것으로 주로 식물성 음식, 씨, 콩이나 콩과식물에서 유래한다⁴⁷⁻⁴⁸⁾. 이러한 식물성 sterol은 항암 효과가 있는 것으로 밝혀져 있고, 특히 전립선암에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다⁴⁹⁾. 또한 식

물성 지방을 많이 섭취하면 유방암의 위험 인자가 줄어드는 것으로 보고⁵⁰⁾되고 있어, 호르몬과 관계하는 세포 증식의 억제에 유용하다는 입증될 수 있으나 아직 β -sitosterol이 자궁근종에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 β -sitosterol을 체외배양 한 자궁근종세포에 처리 한 후 자궁근종세포의 직접적인 증식억제 효과를 조사하고, DNA fragmentation 분석과 세포주기분석법을 통하여 세포주기와 관련한 유전자들의 발현을 조사하였다. 그 결과 이러한 증식억제 효과가 세포자멸사와 관련된 것임을 확인하고 또한 세포자멸사를 일으키는 기전에 대하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

먼저 β -sitosterol에 의한 자궁근종세포의 증식억제 효과를 알아보기 위해 배양된 자궁근종세포에 16 μ M의 농도로 처리한 후 24, 48, 72 시간이 지난 후의 세포를 회수하여 세포수를 측정된 결과, 자궁근종세포의 증식억제 효과가 3일째 40%의 증식억제 효과가 관찰되었다(Fig. 1). 세포증식 억제의 효과를 보기 위해 시행한 DNA 증식억제 분석으로 시행한 BrdU를 이용한 분석에서도 의미 있는 증식억제를 보여 주었다(Fig. 2). 그러므로 β -sitosterol에 의한 자궁근종세포의 증식억제 효과를 확인하였다.

앞의 실험을 통하여 β -sitosterol에 의한 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 효과를 확인하였으므로 β -sitosterol이 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁근종세포에 16 μ M 농도의 β -sitosterol을 처리하고 시간별로 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과 대조군은 1.90%로 나타났으나 β -sitosterol 72시간 뒤에는 16.97%의 subG1기의 지연이 확인되어 세포자멸사의 양적 증거를 확인하였고 시간의 지남에 따라 subG1의 연장이 증가됨을 관찰하였다(Fig. 3). 또한 β -sitosterol에 의한 세포자멸사 유도 효과를 알아보기 위하여 자궁근

종세포에 β -sitosterol 16 μ M을 처리하고 시간 별로 DNA fragmentation 분석을 시도하여 ELISA법으로 정량분석하여 관찰한 결과, 대조군에 비하여 시간이 지날수록 특징적인 DNA의 분절현상이 증가되므로 β -sitosterol에 의한 증식억제 효과는 세포자멸사에 의한 것임을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

저자는 세포주기 분석을 통하여 subG1기의 지연을 확인하였으며 세포주기와 관련한 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 세포주기관련 유전자인 p27, p21, cyclin E, CDK2, CDK4 및 Skp2 유전자에 대하여 western blot analysis를 실시하였다. 먼저 cell cycle에 관계하는 유전자 분석을 위하여 β -sitosterol을 16 μ M의 농도로 처리하고 시간대 세포로부터 단백질을 추출한 후 western blot analysis를 통하여 G1 checkpoint에 관계하는 p27, p21의 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 p27의 증가는 cyclin E-CDK2 복합체와 결합함으로써 CDK의 활성화를 저해하여 subG1기의 지연을 유발하여 결과적으로 세포자멸사를 일으키는 것으로 생각되어지며 β -sitosterol 16 μ M의 투여 시간이 증가할수록 p27과 p21의 발현도가 증가하는 것으로 보아 시간에 비례하여 세포증식을 억제하는 것으로 생각된다. 본 실험에서 cyclin E-CDK2 복합체의 발현 감소를 관찰할 수 있었으며, proteasome pathway에 해당되는 Skp2의 발현 감소는 p27 유전자의 과발현으로 인해 발생하는 반대 과정으로 생각되어진다.

이에 β -sitosterol에 의한 세포자멸사의 경로를 밝히고자 caspase-3의 활성과의 관계에 대하여 알아본 결과, β -sitosterol 처리 시간이 증가할수록 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며 이러한 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소는 caspase-3의 활성도가 상대적으로 증가되었음을 의미하는 것이다(Fig. 6). 또한, PARP 단백질의 양적인 감소가 관찰되어 활성화된 caspase-3에 의하여 DNA 회복의 실패로

인한 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다 (Fig. 6). 따라서 β -sitosterol의 처리는 caspase-3의 활성도를 증가시키며 이는 PARP 단백질의 절단을 일으켜 종국에는 caspase pathway를 거쳐 세포자멸사가 일어나는 것으로 생각된다. 또한 Rb 유전자의 탈인산화가 증가되고, E2F의 발현이 감소함으로써 Rb 유전자의 종양억제 기능이 활성화되는 것을 보여주었다(Fig. 6).

현재까지 수많은 세포자멸사 관련 유전자가 알려져 있는데, caspase들은 항상 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들은 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase 중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있으며, 활성화된 caspase-3는 세포내 여러 종류의 기질 단백을 절단한다⁵¹⁾. Caspase에 의하여 선택적으로 절단되는 다양한 단백질 중 PARP 단백질은 DNA 회복과정에 관계되는 핵 내에 존재하는 효소 중의 하나인데 이는 활성화된 caspase-3에 의하여 DNA 결합 부위로부터 절단되며 이러한 PARP의 특이적인 단백질 분해 효소의 절단은 세포자멸사의 생화학적인 특징으로 간주된다⁵²⁾.

따라서, 자궁근종세포에 대한 β -sitosterol의 처리는 caspase-3의 활성도를 증가시키며 이는 PARP 단백질의 절단을 일으켜 종국에는 caspase pathway를 거쳐 세포자멸사가 일어나는 것으로 생각된다.

이러한 결과는 β -sitosterol이 세포주기와 세포자멸사에 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 향후 자궁근종의 치료에 있어서 효과적인 치료 약물이 될 것으로 사료된다.

V. 結 論

β -sitosterol이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 β -sitosterol을 16 μ M의 농도로 처리한 후 시간

에 따른 증식억제 효과, 세포자멸사와 관련한 세포주기 분석 및 유전자 분석을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. β -sitosterol 16 μ M을 처리한 72시간 후 40%의 증식억제 효과를 보였으며 시간이 지날수록 증식억제 효과는 증가하였다.
2. β -sitosterol 16 μ M을 처리한 72시간 후 세포주기 분석을 시도한 결과 16.97%의 subG1 기의 지연이 관찰되었으며 처리 시간이 지날수록 증가되었다.
3. β -sitosterol 처리 후 세포주기관련 유전자 분석을 시도한 결과 p27, p21 유전자 발현은 시간에 비례하여 증가하였으며 cyclin E-CDK2 복합체와 Skp2의 발현은 감소하였다.
4. β -sitosterol 처리 후 세포자멸사의 특징인 DNA fragmentation의 양적 증가가 시간이 지날수록 더욱 현저하게 관찰되었다.
5. β -sitosterol 처리 후 pro-caspase 3 및 PARP의 발현은 시간에 비례하여 감소하고, Rb 유전자의 탈인산화 증가와 E2F의 발현은 시간에 비례하여 감소하였다.

이상의 결과로 보아 β -sitosterol의 처리에 의해서 자궁근종세포의 증식억제 효과가 일어나며 이러한 현상은 세포자멸사에 의한 것이며 그 기전은 p27, p21의 발현 증가로 인한 세포주기 회로에서 subG1기의 지연과 관련한 세포자멸사가 일어나는 것과 PARP 및 pro-caspase 3의 발현이 감소하는 것으로 보아 caspase 경로를 거쳐 세포자멸사를 유도하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2005년 01월 26일
- 심 사 일 : 2005년 01월 28일
- 심사완료일 : 2005년 02월 03일

參考文獻

1. 조현희 외. 자궁적출시 부속기절제 유무에 따른 성호르몬의 변화. 대한산부회지. 2001; 44:2283-8.
2. Culter WB, Genovese SE. Wellness in women after 40 years of age; the role of sex hormones and pheromones. *Dis Mon.* 1998;44(9):421-546.
3. Rein MS et al. Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin releasing hormone agonist leuprolide acetate. *Fertil Steril.* 1990;53:1018-23.
4. Lumsden MA, West CP, Baird DT. Goserelin therapy before surgery for uterine fibroids. *Lancet.* 1987;1:36-7.
5. Ross RK et al. Risk factors for uterine fibroids: Reduced risk associated with oral contraceptives. *Br Med J.* 1986;293:359-62.
6. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996;392:49-53.
7. 김기철, 김정구, 이진용. 성선자극호르몬 유리호르몬 협동제로 전치치된 자궁근종내 인슐린양 성장인자 및 그 결합단백의 양상에 관한 연구. 대한내분비학회지. 1997;12:364-75.
8. 김정구 외. 자궁근종조직내 인슐린유사 성장인자(IGF)-Ia, IGF-Ib, IGF-II 전령리보핵산 발현양상. 대한산부회지. 1999;42:777-83.
9. 김정구 외. 17 β -estadiol이 배양된 인간 자궁근종조직과 정상자궁근조직에서 인슐린유사 성장인자들과 그 결합단백질들의 mRNA 발현 및 인슐린 유사성장인자들의 분비에 미치는 영향. 대한산부회지. 1998;41:1575-85.
10. Kim JG et al. Decreased expression of mac25 mRNA in uterine leiomyomata compared with adjacent myometrium. *A*

- m J Reprod Immunol.* 2000;43:53-7.
11. 임경실, 김정구. 자궁근종조직 및 정상자궁근조직에서 에스트로겐 수용체 알파, 베타 및 인슐린 유사 성장인자 결합단백질 관계 펩티드-1 전령리보핵산의 발현양상. *대한산부회지.* 2002;45: 391-7.
 12. 노영숙 외. 한국여성에서의 자궁의 전통 개념에 대한 기초적 조사연구. *대한산부회지.* 1985;29:973-85.
 13. 이은지 외. 근치적자궁적출술을 시행한 여성의 삶의 질. *대한산부회지.* 2001;44:1761-8.
 14. 김진희, 백승희. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP kinase 활성화에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지.* 2001;14(2);85-101.
 15. 이인호 외. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 증식 억제에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지.* 2002;15(2):12-24.
 16. 김소연, 백승희. 膈下逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식과 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지.* 2002;15(4);1-16.
 17. 이영림, 백승희. 少腹逐瘀湯이 자궁근종세포의 성장 억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지.* 2003;16(2);1-17.
 18. 김동철 외. 香附子가 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지.* 2003;16(2);18-33.
 19. 李尙仁. 韓藥臨床應用. 서울:成輔社 1990:271-1.
 20. 전국한의대 본초학교수 공저. 本草學. 서울:永林社. 1991:445-6.
 21. 安德均. 原色韓國本草圖鑑. 서울:敎學社. 1999:670.
 22. Wang W et al. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dunn, *Euonymus alatus* (Thunb) Sieb and *Eupolyphaga sinensis* Walker on regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhongguo Yao Za Zhi.* 1991;16:299-301.
 23. Lam T et al. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci.* 2000;67:2889-96.
 24. 이진훈. 계혈등의 항염 활성효과. 강원대학교 대학원. 1999.
 25. 오형숙. 계혈등 추출물이 생쥐의 조혈 및 면역작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2000.
 26. 이현철 외. 계혈등 EtOAc subfraction-2가 종양전이억제효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):525-8.
 27. 서해경, 오민석, 김동희. 류마티드關節炎患者 滑膜細胞에 대한 鷄血藤의 免疫反應. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):780-6.
 28. 이화경. 계혈등이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사 관련 유전자의 발현에 미치는 영향. 대구한의대 대학원. 2004.
 29. Awad AB, Williams H, Fink CS. Effect of phytosterol on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J of Nutr Biochem.* 2003;14:111-9.
 30. Buttram VC Jr, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril.* 1981;36:433-45.
 31. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol.* 1990;94:435-8.
 32. Huang SC et al. Intratumoral blood flow in uterine myoma correlated with a lower tumor size and volume, but not correlated with cell proliferation or angiogenesis. *Obstet Gynecol.* 1996 Jun;87(6):1019-24.
 33. Brandon DD et al. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:1876-81.
 34. Vu K et al. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum Pathol.* 1998;29:359-63.

35. Shozu M et al. Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuprorelin acetate. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5405-11.
36. Murphy AA et al. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestosterone RU486 : dose- response effect. *Fertil Steril.* 1995 Jul;64(1):187-90.
37. Lee BS, Margolin SB, Nowak RA. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:219-223.
38. Nowak RA. Novel therapeutic strategies for leiomyomas: targeting growth factors and their receptors. *Environ Health Perspect.* 2000;108(5):849-53.
39. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor-beta 3 (TGF-beta 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF beta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:913-20.
40. 金相佑 외 癥瘕患者에 對한 臨床的考察. 대한한방부인과학회지. 1992;4(1):2-8.
41. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울杏林出版社. 1978:249-257.
42. 李熙祥, 鄭鎭鴻, 柳同烈. 癥瘕의 治方에 對한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1998;6(2):417-35.
43. 조학민. 본초강목습유. 북경 중국중의약출판사. 1998:230-3.
44. 김창민 외. 中藥大辭典. 서울:도서출판정담. 1997:287-90.
45. 윤정선. 계혈등의 플라보노이드 성분. 서울대학교 대학원. 2003.
46. Cui YJ, Liu P, Chen RY. Studies on the chemical constituents of *Spatholobus suberectus* Dunn. *Yao xue xue bao.* 2002;37(10):784-7.
47. Rao AV, Janezic SA. The role of dietary phytosterols in colon carcinogenesis. *Nutr Cancer.* 1992;18:43-52.
48. Weihrauch, J. & Gardner, J. Sterol content of foods of plant of origin. *J. Am. Diet Assoc.* 1978;73:39-44.
49. Von Holtz RL et al. [beta]-Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Nutr Cancer.* 1998;32:8-12.
50. Awad AB et al. Dietary phytosterols inhibit the growth and metastasis of MD A-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Res.* 2001; 20:821-4.
51. 정용근. 아포토시스의 실행자 : caspase를 통하여. 유전 제 2권. 1998:106-28.
52. 진선두 외. 綠茶의 주성분인 Epigallocatechin gallate의 항암활성과 Apoptosis 기전에 관한 분자생물학적 연구. 동의생리병리학회지. 2001;15(4):611-20.