

자궁경부암세포에 대한  
天花粉의 성장억제 및 세포사멸효과

경원대학교 한의과대학 부인과학교실  
이현희, 임은미

**ABSTRACT**

**Growth Inhibition and Apoptosis Induction of *Trichosanthis Radix* Extract  
on Human Uterine Cervical Carcinoma Cells**

**Hyun-Hee Lee, Eun-Mee Lim**

**Dept. of gynecology, College of Oriental Medicine  
Graduate School of Kyungwon University**

**Purpose** : *Trichosanthis Radix* is a traditional medical herb which has been shown to inhibit tumor cell proliferation. In this study, the effects of *Trichosanthis Radix* extract were investigated on inducing growth inhibition and apoptosis of human uterine cervical carcinoma cells.

**Methods** : Human uterine cervical carcinoma cells line, ME-180, was used for the study. The cells were treated with varying concentrations of *Trichosanthis Radix* extract. Cell growth and inhibitory rate were measured by MTT assay. Apoptosis induction was detected by fluorescence microscopy, DNA ladder formation and flow cytometry.

**Results** : *Trichosanthis Radix* extract inhibited the growth of human uterine cervical carcinoma cells in a dose-dependent manner. It induced ME-180 cells to undergo apoptosis including fragmented nuclei and nucleosome-sized DNA fragmentation. Flow cytometric analysis showed the increasing rate of apoptotic cells by *Trichosanthis Radix* extract. Reduction of mitochondrial membrane potential and increase in caspase-3 activity and were found in ME-180 cells treated with *Trichosanthis Radix* extract.

**Conclusion** : Our data suggest that *Trichosanthis Radix* extract inhibit the growth and proliferation of ME-180 cells by apoptotic induction and facilitates its activity via caspase-3 activation initiated by depolarization of mitochondria.

**Key words** : apoptosis, caspase-3, ME-180 cells, *Trichosanthis Radix*, mitochondrial membrane potential

## I. 緒 論

세포사(cell death)의 기전에는 세포괴사(necrosis) 및 세포사멸(apoptosis)이 있다.<sup>1)</sup> 세포사멸은 세포나 장기의 항상성 유지를 위한 중요 기전으로 인식되면서<sup>2,3)</sup> 1980년대 후반기부터는 생명과학에서 중요 관심영역으로 인식되어 많은 발전을 가져왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다.<sup>4)</sup> 항암 치료의 효율성은 세포사멸 기전의 활성화와 밀접한 관련이 있으며 성공적인 암 치료법의 개발을 위해 세포사멸 현상에 대한 정확한 생화학적인 작용기전에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다.<sup>5)</sup>

子宮頸部癌은 여성생식기 惡性腫瘍 중 발생빈도가 가장 높은 것으로 여성에 생기는 모든 악성종양 중 조기진단 및 치료가 가능한 덕분에 가장 괄목할 만한 사망률 감소를 가져온 대표적인 암종이며,<sup>6)</sup> 현재 자궁경부암 치료성적의 개선을 위하여 많은 연구가 진행 중이다.<sup>7)</sup>

그동안 항암제의 개발 방법들은 주로 세포독성이 강력한 물질을 찾는 것이었지만, 최근에는 세포독성은 약하지만 기존 항암제와 併用하여 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 물질을 찾기 위한 시도가 이루어지고 있으며 면역계를 조절함으로써 암의 증식을 억제할 수 있는 생체반응 조절물질을 찾기 위한 노력들을 진행하고 있다.<sup>8)</sup>

오랜 기간 경험적으로 사용되어 온 한 약재들은 이러한 가능성이 많고, 암의 치료시 부작용을 감소시킬 수 있는 해결책이 될 수 있다.

天花粉은 암세포의 호흡과 분자내 호

흡에 장애를 주고 滋養염세포에 응고성 피사를 일으킴으로써 항암작용을 일으키며 자궁경부암세포를 억제하는 作用이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup>

그동안 이루어진 子宮筋腫세포의 성장억제와 세포사멸에 관한 연구로는 五積散<sup>10)</sup>, 蟠蔥散<sup>11)</sup>, 失笑散<sup>12)</sup>, 香附子<sup>13)</sup> 등이 있으며, 자궁경부암 세포의 성장억제와 세포사멸에 관한 연구로는 半枝蓮<sup>14)</sup>, 榆根皮<sup>15)</sup>, 香稜丸<sup>16)</sup>, 濟川煎<sup>17)</sup>, 六合湯<sup>18)</sup>, 加味桂枝茯苓丸<sup>19)</sup> 등이 있으며, 자궁경부암 세포의 성장억제와 세포사멸에 관한 지속적인 연구의 일환으로 항암작용이 있는 것으로 알려진 天花粉을 택했다.

이에 본 연구에서는 天花粉이 자궁경부암세포에 미치는 영향을 알아보고자 天花粉의 ME-180 세포에 대한 성장억제 효과, 형태적 변화, 세포주기 분석, DNA 분절 관찰, caspase-3 활성화 및 미토콘드리아 막전위 변화 등을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 약재

天花粉(*Trichosanthis Radix*) 20g을 200 ml의 이차증류수에 넣어 1시간 동안 불린 후 약한 불에서 2시간 동안 끓인 후 2,000xg의 속도로 20분간 원심분리 하였다. 위쪽의 상층액을 모아 동결건조 후 14.95g의 건조분말을 얻었다. 건조분말은 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹여 최종 농도 50mg/ml로 만든 후 1 ml씩 나누어 사용 직전까지 -20°C 에 보관하였다.

#### 2) 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheny

ltetrazolium bromide (MTT; Sigma, U.S.A.)는 PBS(Phosphate Buffered Saline)를 사용하여 최종농도 5mg/ml로 만든 후 여과멸균 하였다. DMSO(Sigma, U.S.A.), RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS; Invitrogen, U.S.A.), PBS(Invitrogen, U.S.A.)를 사용하였고, Penicillin, streptomycin, trypan blue, rhodamine-123, propidium iodide, proteinase K, RNase A(Sigma, U.S.A.)를 사용하였으며, Ac-DEVD-pNA(Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)를 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포주 배양

자궁경부암세포주, ME-180(KCLB 30033)은 한국세포주은행에서 구입하였다. ME-180 세포주는 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>를 공급한 항온배양기에서 배양하였다. 동결된 상태로 구입한 FBS는 냉장에서 2-3일간 서서히 녹인 후 56°C에서 30분간 heat inactivation 시켰다. RPMI-1640/10% FBS배지에는 penicillin을 100 IU/ml, streptomycin을 최종농도 50 µg/ml로 첨가하여 4°C에 냉장 보관하였으며 사용 직전 37°C로 prewarming시킨 후 사용하였다. 사용된 chemical은 모두 0.2µm filter로 여과 멸균하여 사용하였다.

### 2) 세포수 및 생존세포수 측정

Trypan blue와 hemocytometer를 사용하여 세포수 및 생존세포수를 다음과 같은 방법으로 결정하였다. 60mm 배양용 접시에 키운 monolayer culture에서 배지를 Pasteur pipet을 사용하여 제거하였다. 남아있는 FBS를 제거하기 위하여 1ml

PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>를 사용하여 부착된 cell monolayer를 두 번 헹구었다. 1ml의 0.5% Trypsin/EDTA 용액을 넣은 후 1-3분간 상온에 방치하여 plate에서 떨어진 세포들을 2 ml의 RPMI-1640/10% FBS를 넣은 15ml 원심분리관에 옮겨 200xg의 속도로 상온에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 세포침전물에 1 ml의 RPMI-1640/10% FBS를 넣고 RPMI-1640 배지로 적당히 희석하였다. trypan blue 용액을 최종 농도 0.2%로 첨가한 후 hemocytometer로 살아있는 세포의 비율을 결정하였다.

### 3) 세포독성 효과

天花粉을 처리한 후 야기되는 세포독성 효과를 결정하기 위해 살아 있는 세포에 의해 MTT가 수용성 formazan으로 변환되는 양을 측정하였다. 90µl의 배양 배지에 10,000개의 세포를 포함시켜 96-well plate에 넣은 후 24시간 배양하여 plate에 세포를 부착시켰다. 天花粉추출물(10 µl)을 0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml 등 다양한 농도로 넣은 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 15µl의 MTT를 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 상층액을 조심스럽게 제거한 후 40µl의 DMSO(Aldrich)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 형성된 formazan을 녹이기 위해 15분간 shaking 하였다. Lysate의 농도를 microplate reader (Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하여 570nm에서 측정하였다.

### 4) 염색법에 의한 세포형태 관찰

96-well plate에 5x10<sup>4</sup> cell을 넣고 24시간 후 天花粉추출물을 처리하였다. 천

화분처리 후 24 시간 배양한 후 trypsin 처리로 세포를 plate에서 떼어내어 상온에서 300xg로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 50 $\mu$ l RPMI-1640 배지로 세포를 再浮遊시킨 후 1 $\mu$ l의 Acridine Orange/Ethidium Bromide 혼합염색액 (100 $\mu$ g/ml AcOr and 100  $\mu$ g/ml EtBr in PBS)을 첨가한 후 형광현미경으로 관찰하였다. PI 염색의 경우 再浮遊시킨 세포액을 70% ETOH로 10분간 고정한 후 PBS로 세 번 행구었다. Propidium iodide 염색약(1 $\mu$ g/ml PI in PBS)을 처리하고 10분 후 형광현미경으로 관찰하였다.

5) DNA 분절 분석

96-well plate에 10<sup>6</sup> cell을 넣고 24 시간 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 0.5mg/ml, 1mg/ml, 2 mg/ml 농도의 天花粉을 처리한 후 24 시간 배양한 후 trypsin을 처리하여 세포를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300xg로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 100ml의 PBS 로 再浮遊시킨 후 1ml의 ice-cold 70% ethanol을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정한 후 -20°C에 16시간 이상 넣어두었다. 4°C에서 800xg로 5분간 원심분리 하여 에탄올을 완전히 제거한 후 20 $\mu$ l의 lysis buffer [2 mM EDTA, 100 mM Tris.Cl (8.0), 0.8% SDS] 를 넣은 후 2 $\mu$ l 50mg/ml RNase A를 넣고 혼합한다. 37°C에서 최소한 30분간 배양한 후 10 $\mu$ l의 Proteinase K를 넣어 50°C에서 최소한 1.5 시간 배양한다. 8 $\mu$ l의 4x DNA loading buffer를 넣은 후 1.8% SeaKem agarose gel에서 TBE buffer로 sample을 50 Volt로 running하여 DNA를 분리시켰다.

6) 세포주기 분석

96-well plate에 10<sup>6</sup> cell을 넣고 24 시간 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 0.25mg/ml, 0.5 mg/ml 농도의 天花粉을 처리한 후 24시간 배양한 후 trypsin을 처리하여 세포를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300xg로 5분간 원심분리 하여 세포를 침전시켰다. 100 $\mu$ l의 PBS 로 再浮遊시킨 후 1ml의 ice-cold 70% ethanol을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하였다. 300xg로 5분간 원심분리한 후 침전물에 1ml의 PBS를 넣어 300xg로 5분간 원심분리로 水洗처리 후 다시 한 번 PBS로 水洗하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 $\mu$ l의 PI 염색약 (0.1% Triton X-100, 200 $\mu$ g/ml RNase A, 20 $\mu$ g/ml propidium iodide in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 15분간 배양하였다. flow cytometer(Becton Dickinson, U.S.A.)로 cell fluorescence를 측정하여 cell cycle를 분석하였다.

7) caspase-3 활성도 측정

10<sup>6</sup> cell을 24 시간 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 한 후 1mg/ml와 3mg/ml 농도의 天花粉을 처리하고 24시간 배양하였다. 200 $\mu$ l의 ice-cold lysis buffer [100 mM HEPES (7.4), 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF] 를 넣어 cell을 용해시킨 후 scraper로 바닥에 부착된 세포를 긁어 1.5ml microcentrifuge tube에 옮긴 후 15분간 얼음위에 놓았다. 12,000xg의 속도로 5분간 원심분리한 후 Bradford assay로 단백질의 양을 측정하였다. 1000 $\mu$ l의 2x reaction buffer [100 mM HEPES (7.4), 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 20%

glycerol] 에 caspase-3에 대한 기질로 4 $\mu$ l Ac-DEVD-pNA in DMSO을 최종농도 100  $\mu$ M로 넣고 96 $\mu$ l의 cell lysate를 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. caspase-3에 의한 p-nitroanilide의 방출은 405nm에서 microplate reader(Bio-Rad, U.S.A.)로 측정하였다.

8) 미토콘드리아 막전위 측정

96-well plate에 10<sup>6</sup> cell을 넣고 24시간 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 0.25mg/ml와 0.5mg/ml 농도의 天花粉을 처리한 후 24시간 배양한 후 trypsin을 처리하여 세포를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300xg로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 100 $\mu$ l의 PBS로 再浮遊시킨 후 1ml의 ice-cold 70% ethanol을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하였다. 300xg로 5분간 원심분리 한 후 침전물에 1ml의 PBS를 넣어 300xg로 5분간 원심분리로 水洗처리 후 다시 한 번 PBS로 水洗하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 $\mu$ l의 Rh123 염색약(5 $\mu$ g/ml rhodamine 123 in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 세포를

PBS로 水洗한 후 FACS Calibur (Beckton Dickinson, U.S.A.)로 cell fluorescence를 측정하였다.

### III. 結 果

1) ME-180 세포의 성장에 대한 天花粉의 효과

ME-180 세포의 성장에 대해 天花粉이 영향을 미치는지에 대해 알아보기 위해 다양한 농도의 天花粉을 ME-180 세포에 처리하여 생존세포에 의해 MTT가 formazan으로 변환되는 양의 변화를 측정하였다. 天花粉을 처리한 지 24시간 후 0.25mg/ml의 天花粉존재 하에서 약 55%의 세포가 사멸하였고 농도의 증가에 따라 생존율이 점차 감소되었다(Fig. 1).

광학현미경으로 형태학적인 변화를 관찰한 결과 天花粉을 처리하지 않은 세포군들에서는 대부분 크고 둥글거나 다각형의 세포형을 나타내었으나 天花粉을 처리한 세포군에서는 세포들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있는 형태를 나타내었다(Fig. 2).

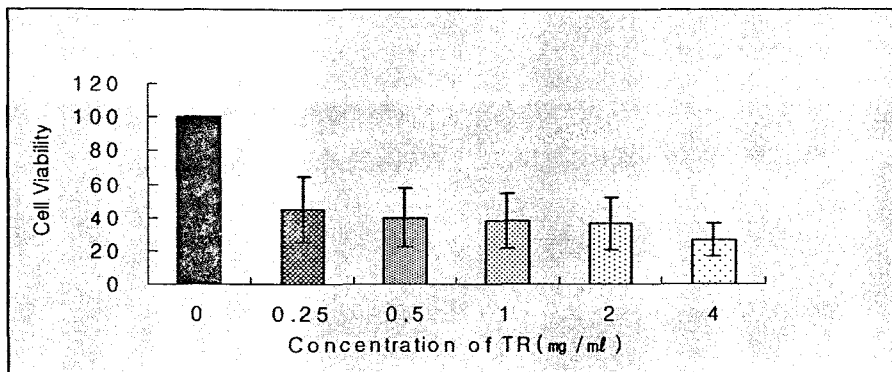


Fig. 1. Growth-inhibitory effect of *Trichosanthis Radix* (TR) on ME-180 cells. ME-180 cells were incubated with various concentrations of TR for 24 hr and cytotoxicity was measured by MTT assay.

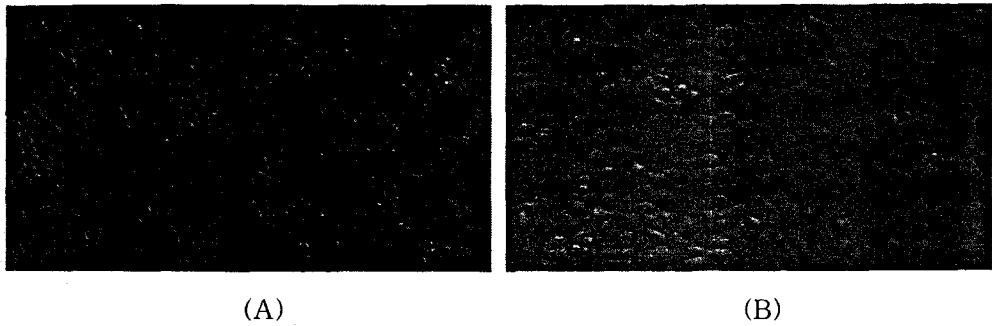


Fig. 2. Morphological characteristics of ME-180 cells. Cells were treated (A) without and (B) with 0.25mg/ml TR extract for 24 hr and observed under light microscope (x200).

2) ME-180 세포의 성장에 대한 천화분의 세포사멸 효과

0.25mg/ml의 天花粉존재 하에서 ME-180세포의 성장억제와 심한 형태적 변화를 나타내는 것이 세포사멸의 유도과 관련이 있는지 조사하기 위해 天花粉을 넣고 ME-180 세포를 배양한 지 24시간 만에 각각 AcOr/EtBr

와 PI로 염색한 후 나타내는 형태적 변화를 조사한 결과, 0.25mg/ml 天花粉존재 하에서 ME-180 세포는 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 특징적인 축소된 세포, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies를 나타내었다(Fig. 3, 4). 화살표가 가리키는 붉은색은 분절된 핵을 지시한다(Fig. 4).

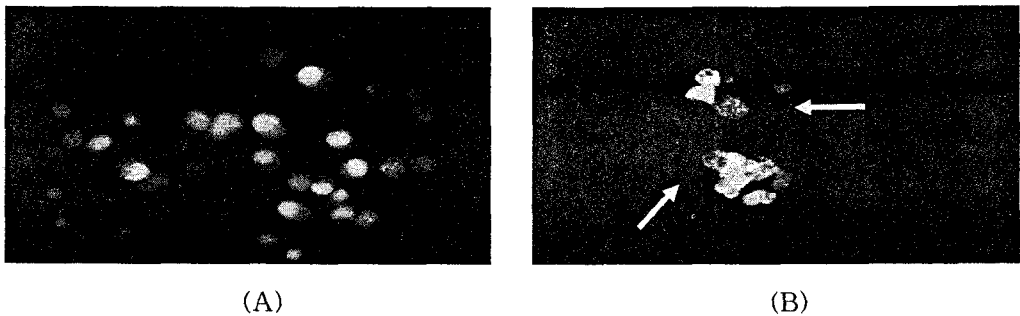


Fig. 3. Detection of apoptotic morphology in ME-180 cells treated (A) without and (B) with 0.25mg/ml TR for 24 hr. After staining with AcOr/EtBr, cells were observed under fluorescence microscope (x200). Arrows indicate fragmented nuclei.

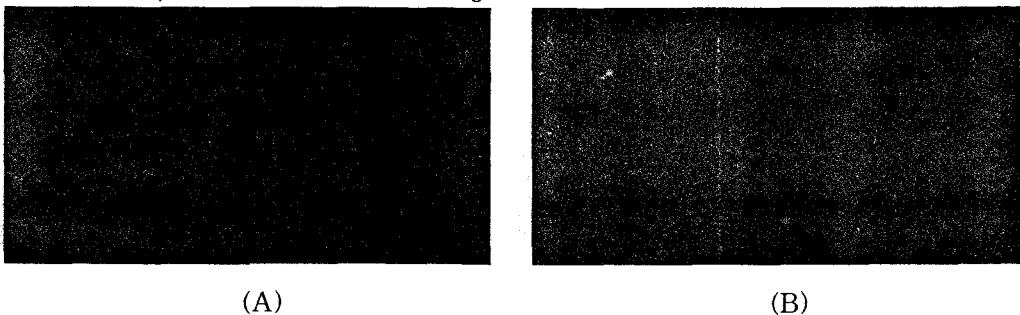


Fig. 4. Detection of apoptotic morphology in ME-180 cells treated (A) without and (B) with 0.25mg/ml TR for 24 hr. After staining with PI, cells were observed under fluorescence microscope (x200). Fragmented nuclei and apoptotic bodies are seen.

3) DNA 분절 분석 결과  
0.5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml 농도의 天花粉을 처리한 후 24시간 만에 ME-180

세포에서 분리한 genomic DNA는 대조군 lane 1에 비해 nucleosome 크기의 DNA가 낮은 비율로 형성되었다(Fig. 5).

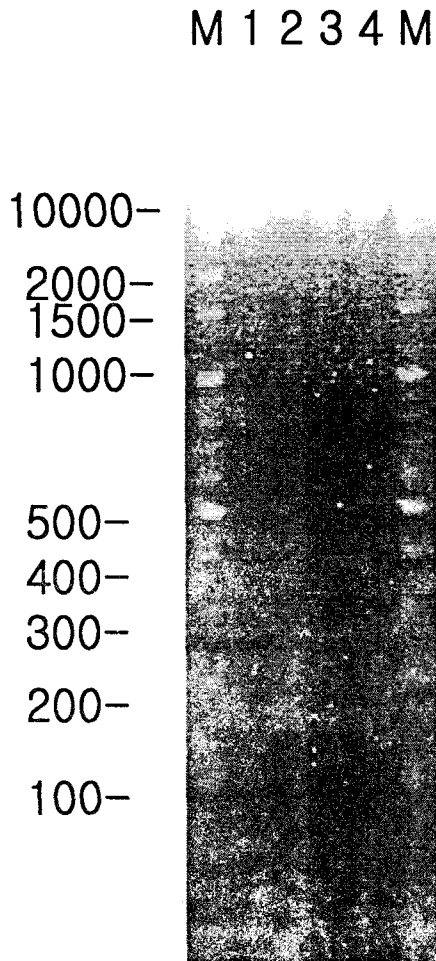


Fig. 5. TR-induced DNA fragmentation analysis in ME-180 cells. ME-180 cells were cultured in the presence of TR for 24 hr, and genomic DNA was extracted and separated by 1.8% agarose gel. M; molecular weight marker, lane 1; 0mg/ml TR, lane 2; 0.5mg/ml TR, lane 3; 1mg/ml and lane 4; 2mg/ml TR. Number indicates the size of DNA in base pairs.

4) 세포주기 분석 결과  
0.25mg/ml의 天花粉을 처리하여 24시간 배양한 후 cell cycle 분포를 flow cytometer로 분석하였다(Fig. 6). 天花粉을 처리하지 않은

세포군(control)에서는 apoptosis를 일으킨 세포의 비율이 0.23%에 불과하였으나 天花粉을 처리한 세포군에서는 약 10%로 증가함을 관찰할 수 있었다.

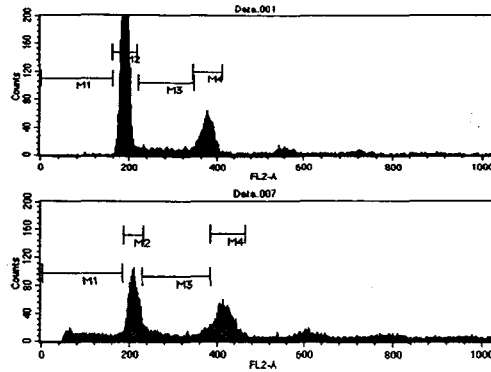


Fig. 6. Flow cytometric analysis of ME-180 apoptotic changes. ME-180 cells were incubated in the absence (upper panel) or presence of 0.25mg/ml TR (lower panel) for 24 hr. Cells were stained with PI as described in Materials and method and analyzed by Flow cytometer.

5) caspase-3 활성화도

天花粉에 의해 일어나는 apoptosis가 caspase-3의 활성화에 의한 경로로 일어나는지를 조사하기 위하여 알아본 결과 Fig. 7에서 보여지는 바와 같이 1mg/ml

天花粉을 처리한 세포군에서는 약 17±4.2% 정도 caspase-3 효소 활성화도의 증가를 나타내었고, 3mg/ml 天花粉을 처리한 세포군에서는 65±1.4%의 증가를 나타내었다.

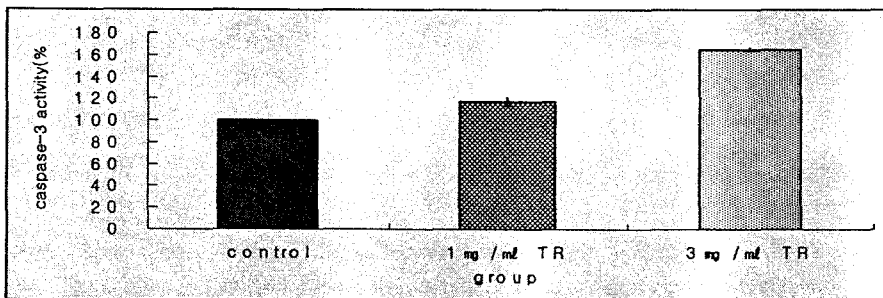


Fig. 7 Effect of TR on caspase-3 activity. ME-180 cells were incubated in the absence or presence of TR for 24 hr. Cells were lysed and centrifuged. Supernatant was collected and protein concentration was measured by Bradford assay. Extracts (96µl) were incubated with 4µl Ac-DEVD-pNA at 37°C for 1 hr. Release of p-nitroanilide was detected at 405nm by microtiter plate reader (Bio-rad, U.S.A.).

6) 천화粉的 미토콘드리아 막전위에 대한 효과

Fig. 8은 대조군에 대한 천화粉 처리군의 미토콘드리아 막전위가 감소됨을

보여주고 있으나 Rh123 형광 강도는 0.25mg/ml 天花粉 처리군과 0.5 mg/ml 天花粉 처리군에서 유의한 차이를 나타내지는 않았다.



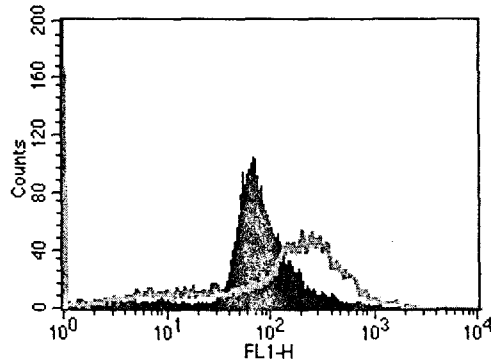


Fig. 8 TR-induced changes on mitochondrial membrane potential in ME-180 cells.

upper panel; 0.25mg/ml TR, lower panel; 0.5mg/ml TR.

ME-180 cells were incubated in the absence (violet peak in the middle) or presence of 0.25mg/ml and 0.5mg/ml TR (green lines in upper and lower panel) for 24 hr. Cells were stained with Rh123 as described in Materials and method and analyzed by Flow cytometer.

#### IV. 考察

자궁경부암은 우리나라 여성의 암 발생빈도 순위에서 수위(여성암의 27%)를 차지하고 있으며, 婦人科적 암중에서는 가장 흔하다.<sup>20)</sup> 국내의 경우 자궁경부암의 유병률 수준은 10만 명당 31명 정도인데, 발생률은 미국의 3배, 일본의 2.5배, 브라질의 1/3 수준이며, 자궁경부암으로 인한 사망률이 전체 암 사망률에서 차지하는 비율은 6%이다.<sup>21)</sup>

확실한 원인은 밝혀져 있지 않지만 고위험요소를 살펴보면 다음과 같다. 민족적 차이, 사회·경제수준이 낮은 군, 농촌사람, 多産, 결혼·임신·성교를 일찍 시작한 사람, 여러 명의 성교대상자를 가진 사람, 성병에 노출된 경험이 있는 사람, 성교 대상자가 포경인 사람, 경구피임약 사용자, 바이러스(인두유종 바이러스, 성기 헤르페스 바이러스) 감염자 등

이다.<sup>20)</sup>

자궁경부암의 臨床증상을 살펴보면, 첫 증세는 주로 경미한 출혈인데 月經間 질 출혈이 가장 빈번하며 성교 후 혹은 閉經 후에 발생하는 것이 특징적이다. 대개 초기에는 鮮紅色의 질 분비물이 증가하며 병이 진행될수록 출혈과 분비가 심하여지고 궤양이 심화되며 2차 감염을 초래할 시 악취를 발산한다. 병이 더 진행되어 주위장기를 침범하면 요로증상, 直腸불쾌감, 골반통, 腰痛, 입과부종, 尿管 폐쇄현상 등이 나타난다.<sup>7,21)</sup>

자궁경부암에 대하여 한방의 문헌에서 명확하게 기술한 것은 찾아보기 힘들지만 癥瘕의 증상에 대한 묘사에 근거하면, 자궁경부암의 臨床과정상 癥瘕의 범주에 포함시킬 수 있다.<sup>22)</sup>

서양의학에서는 특히 항암제에 의한 치료 시 생체에 대한 독성이 강력하기 때문에 새로운 항암제의 개발이 시도되고 있지만 아직 부작용이 극소화된 항암제는 개발되지 못하고 있는 실정이다.<sup>21)</sup>

그동안 항암제의 개발방법들은 주로 세포독성이 강력한 물질들을 찾는 것이었지만 최근에는 세포독성은 약하지만 기존 항암제와 併用하여 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 물질을 찾기 위한 시도가 이루어지고 있으며, 면역계를 조절함으로써 암의 증식을 억제할 수 있는 생체반응 조절물질을 찾기 위한 노력들을 하고 있다.<sup>23)</sup>

본 실험에 사용된 天花粉은 박과(Cucurbitaceae)식물인 栝樓 [하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 또는 노랑하늘타리(*Trichosanthes japonica*)]의 뿌리로서 栝樓根, 栝樓粉, 栝樓, 白藥이라고도 한다. 栝樓의 뿌리를 봄이나 가을에 채취하여 외피를 벗겨내고 작게 토막 내 건조시킨 것이 天花粉으로, 天花粉 중의 유효성분은 trichosanthin이고 이것은 다종의 단백질의 혼합물이다. 또 뿌리에는 saponin이 약 1% 함유되어 있다.<sup>24,25,26)</sup>

天花粉의 性은 微寒 無毒하고, 味는 甘 微苦 酸하여, 肺·胃經에 귀경하며 津液을 생성하고 갈증을 멎게 하며 火를 낮추고 燥한 것을 촉촉하게 하며 膿을 배출시키고 부기를 가라앉히는 효능이 있다. 熱病에 의한 口渴, 消渴, 黃疸, 肺燥 咳血, 癰腫, 痔瘻를 치료한다.<sup>25)</sup>

天花粉 단백질(trichosanthin)은 妊娠한 mouse 및 개의 태내의 새끼를 모두 죽이는 作用이 있으며, 물 역기스는 mouse의 stress성 胃양을 억제하는 作用이 있다.<sup>27)</sup> 天花粉의 근육주사제가 妊娠中期의 태반에 일으키는 특수한 病理변화는 광범위한 영양염 세포의 변성과 응고성 괴사에 의한 것으로 天花粉이 직접 영양염 세포에 손상을 준 결과라고 볼 수 있다. 대량 투약하면 간장 신장 기능에 영

향을 주고 실질 세포에 경도의 변성, 출혈, 괴사를 초래하게 된다.<sup>24,28)</sup>

栝樓는 체외에서 大腸균, 痢疾균, 변형균에 대하여 어느 정도의 억제작용이 있다. 栝樓에는 또한 강렬한 瀉下를 일으키는 물질이 함유되어 있다. 天花粉의 臨床 보고로는 中期妊娠, 죽은 태아, 계류유산의 분만 유발에 효과가 좋으며 방법이 간단하고 출혈이 적은 등의 장점이 있다고 한다.<sup>29)</sup>

《神農本草經》에는 天花粉이 주로 消渴, 身熱, 煩滿, 大熱을 치료한다고 하였으며, 中焦를 안정시키며 絕傷을 이어준다고 하였다.<sup>30)</sup> 《本草問答》에서는 天花粉이 滋潤하여 生津함으로써 熱痰을 치료하며, 苦寒한 약물로서 氣分の 熱을 清熱시킨다고 하였다.<sup>31)</sup> 申佶求是 《申氏本草學》에서 天花粉은 殺菌 消炎作用이 있어 折傷腫痛에 外敷하면 熱이 除고 痛이 止하여 排膿生肌, 消腫의 要藥이라고 하였고,<sup>32)</sup> 黃道淵은 《方藥合編》에서 寒除熱痰하여 排膿消毒煩渴堪한다고 하였다.<sup>33)</sup>

제가의 본초서를 종합하여 볼 때, 天花粉은 전반적으로 生津止渴, 降火潤燥, 排膿消腫을 하는 효능을 가지고 있어, 熱病 口渴, 消渴, 黃疸, 肺燥咳血, 癰腫痔瘻 등을 치료하는 효과가 있다.<sup>24,25)</sup> 天花粉은 甘味로 潤하게 하며 寒性으로 氣를 아래로 내리게 하므로, 鬱熱이 스스로 通하게 되고, 鬱한 것을 開하고 痰火를 降하여 積滯된 것도 풀어 내릴 수 있다.<sup>25)</sup> 여성의 肝氣鬱結은 염증성 질환을 일으킬 수 있는데,<sup>20)</sup> 天花粉은 清熱瀉火작용이 있어 肝鬱에 의한 염증성 질환을 치료할 수 있는 것으로 보인다.

최근 자궁경부암에 대한 기존 연구로

서양의학에서는 안 등<sup>34)</sup>, 김<sup>35)</sup>, 김<sup>36)</sup>, 이<sup>37)</sup> 등의 연구가 있으며, 한의학에서는 김 등<sup>13)</sup>은 香附子가, 이 등<sup>14)</sup>은 半枝蓮이, 김 등<sup>15)</sup>은 榆根皮가 부인암에 대한 항암효과가 있음을 발표하였다. 天花粉도 排膿消腫하여 자양엽 세포에 응고성 괴사를 일으킴으로써 항암작용을 일으킨다.<sup>9,38)</sup>

이에 저자는 天花粉이 자궁경부암 세포 ME-180에 대하여 성장억제 및 세포사멸의 효과가 있음을 확인하기 위하여 天花粉 검액이 처리된 자궁경부암 세포 ME-180에 대한 성장억제 효과, 형태적 변화, 세포주기 분석, DNA 분절 관찰, caspase-3 활성화 및 미토콘드리아 막전위 변화 등을 관찰하였다.

天花粉이 ME-180 세포에 대해 세포독성 효과가 있는지에 대해 알아보기 위해 다양한 농도의 天花粉을 ME-180세포에 처리하여 세포 생존율을 조사한 결과 약 55%의 세포가 사멸하였다. 따라서 天花粉은 자궁암세포의 성장을 억제하여 그 세포의 수를 감소시키는 기전으로 자궁암에 효과가 있음을 알 수 있었다. 또 天花粉의 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소되었다. 이 결과는 天花粉이 ME-180 세포에 대해 농도와 시간에 따라 세포성장을 억제함을 나타낸다.

세포성장이 억제되면 세포들이 위축되는 세포의 형태학적 변화가 일어난다. 天花粉을 처리하지 않은 세포군들에서는 대부분 크고 둥글거나 다각형의 세포형을 나타내었으나 天花粉을 처리한 세포군에서는 세포들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있는 형태를 나타내었다(Fig.2). 따라서 天花粉은 자궁암세포의 성장을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

세포사의 기전에는 세포괴사 및 세포사멸이 있다. 세포사멸은 일종의 예정된 세포사멸로서 독특한 형태학적인 변화로 특징지어지는 능동적인 과정이다. 세포사멸이 일어나는 동안 뉴클레오솜 사이가 갈라져서 염색체 DNA는 분절화되고, 염색질은 응축되며, 그 후 핵이 작은 조각들로 갈라지고, 마지막으로 세포사체가 오그라들고 apoptotic body라고 하는 막으로 둘러싸인 절편으로 쪼개진다.<sup>1,2,39,40)</sup>

본 실험에서도 AcOr/EtBr와 PI로 염색한 후 나타내는 형태적 변화를 조사한 결과, 天花粉 처리 후 ME-180 세포는 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 특징적인 축소된 세포, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies를 나타내었다(Fig. 3, 4). 따라서 天花粉의 ME-180 세포에 대한 성장억제가 apoptosis에 의한 것임을 추정할 수 있다.

天花粉처리 후 ME-180 세포에서 분리한 genomic DNA는 대조군 lane 1에 비해 nucleosome 크기의 DNA가 낮은 비율로 형성되었다(Fig. 5).

전체적으로 볼 때 天花粉에 의한 apoptosis 유도효과는 높지 않은 것으로 여겨지나, 흔히 세포사멸이 일어나는 세포에서 관찰되는 DNA ladder에 비해 天花粉처리 세포군에서는 180-200사이의 단일 band가 관찰이 되었는데, 이 이유는 독특한 endonuclease의 활성이 더 많이 되어 단일 nucleosome 단위로 분절화가 잘 이루어진 것으로 apoptosis에 의한 유도효과로 보인다.

세포의 분열과 증식과정은 생명체의 기본현상이며 이러한 현상은 영양적인 요소와 유전적인 요소에 의해서 조절된다. 세포는 분열을 반복하는데 1회 분열

후 다음번의 분열까지를 세포주기라 한다.<sup>41)</sup> 진핵세포의 세포주기는 DNA 합성의 조절시기에 따라 합성전기(G1 phase), 합성기(S phase), 합성후기(G2 phase), 유사분열기(M phase)로 나눌 수 있는데, 많은 종류의 세포에서 세포주기의 주요 조절점은 합성전기의 후반에 있어서, 합성전기에서 합성기로 넘어가지 못하고 sub G1 이라고 불리는 apoptosis 단계에 머물러 더 이상 발전하지 못하는 세포의 비율이 늘어난다.<sup>42)</sup>

본 실험에서는 apoptosis가 초래된 세포를 정량적으로 분석하고자 flow cytometry를 이용하여 세포주기의 변화를 조사한 결과, 대조군에서 apoptosis를 일으킨 세포의 비율이 0.23%로 증가된 것에 비해, 天花粉을 처리한 세포군에서 apoptosis를 일으킨 세포의 비율은 9.94%로 증가되었다.

Caspase는 apoptosis과정 중 단백질을 분해하는 매우 중요한 과정으로 몇 가지의 단백질 분해효소가 관여하며<sup>43)</sup> 세포사멸의 신호전달과정을 통한 caspase의 활성화는 caspase의 N-말단에 존재하는 앞부위가 단백질-단백질 결합을 통하여 세포사멸신호를 전달하고 활성화시킨다. 활성화된 caspase는 특정 기질 단백질의 분해를 통하여 세포사멸을 일으킨다.<sup>44)</sup>

Caspase는 두 group으로 구성되어 있는데 하나는 caspase-8이나 caspase-9 같은 개시 caspase (initiator caspases)이고 다른 하나는 caspase-3와 같은 실행 caspase(executor caspase)로 caspase로 활성화된 DNase의 억제자(ICAD)와 항세포고사 단백질인 Bcl-2 같은 기질을 분해시키는 역할을 한다. 특히 caspase-3는 ICAD를 분해 시켜 DNA분절을 유도하

거나 PARP 절단을 유도한다.

따라서 天花粉에 의해 일어나는 apoptosis가 caspase-3의 활성화에 의한 경로로 일어나는지를 조사하기 위하여 caspase-3의 기질인 Ac-DEVD-pNA와 天花粉을 처리하여 24시간 배양한 세포군의 세포추출물을 혼합하여 이 기질이 天花粉에 의해 유도된 세포추출물에 의해 단백질 분해가 되는가를 기질의 분해산물인 p-nitroanilide의 방출량을 측정할 결과 1mg/ml 天花粉을 처리한 세포군에서는 약 17%정도 caspase-3의 활성도의 증가를 나타내었고, 3mg/ml 天花粉을 처리한 세포군에서는 65%정도 caspase-3의 활성도의 증가를 나타내었다. 즉 天花粉에 의해 ME-180 세포에서는 apoptosis의 경로 중 caspase-3를 통한 경로가 활성화되는 것을 알 수 있었다.

Apoptosis의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 미토콘드리아에 대한 최근 보고에 의하면 미토콘드리아의 기능조절은 세포질로 방출되는 cytochrome c, caspase activators, 막전위 위치의 변화 그리고 Bcl-2 family 단백질 등이 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>2,45)</sup> Apoptosis를 억제하는 Bcl-2나 BclXL단백질 등은 세포에서 항암제 처리시 인산화되어 그 기능을 상실하게 된다. 그러나 Bax, Bak, Bad, 그리고 BclXS같은 apoptosis 촉진 단백질은 미토콘드리아로 이동되어 cytochrome c를 방출할 수 있는 pore를 형성하게 하여 apoptosis를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 추정되고 있다.<sup>46,47)</sup>

세포의 죽음에 대한 자극의 반응으로서 미토콘드리아의 막이 permeabilization 되면서 cytochrome c가 방출된다. 세포질에 방출된 cytochrome c는 세포사멸 단

백질 분해효소 활성화 인자-1(Apaf-1)에 결합하여 (Apaf-1)-caspase-9 복합체를 형성하게 되며 이 복합체가 caspase-3를 더 활성화시킨다.<sup>45)</sup> Fig. 8은 대조군에 대한 天花粉처리 세포군의 미토콘드리아 막전위가 감소됨을 보여주고 있다.

본 연구에서도 天花粉의 처리는 자궁경부암 세포 ME-180에서의 미토콘드리아 막전위 변화를 유발하였으므로, 세포사멸 촉진 단백질의 발현증가와 연관된 미토콘드리아의 막전위 변화를 유발시켜 세포사멸 신호전달과정에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 실험결과로 볼 때 天花粉은 자궁암세포인 ME-180 세포의 성장을 억제하고 apoptosis를 촉진하므로 자궁경부암의 치료에 효과가 있음을 알 수 있었으며, 더 많은 연구를 통하여 자궁암 치료에 효과적으로 한약재가 활용되는 방안을 모색하여야 할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

天花粉(*Trichosanthis Radix*)을 이용하여 자궁경부암세포(ME-180)에 대한 성장억제 및 세포사멸 효과를 알아보려고 세포 생존율, 형태적 변화, 세포주기 분석, DNA분석, caspase-3 활성화, 미토콘드리아 막전위 변화 등을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ME-180 세포에 농도별로 天花粉을 처리하여 세포 생존율을 관찰한 결과, 농도에 비례하여 성장이 억제되는 경향을 보였다.
2. 0.25mg/ml 天花粉 처리한 ME-180 세포는 apoptosis가 일어난 세포의 특징인 세포의 축소, 응축된 염색질

및 핵의 분절현상에 의한 apoptotic bodies가 관찰되었다.

3. 天花粉 처리 ME-180 세포는 낮은 비율로 nucleosome 크기의 DNA 분절을 나타내었다.
4. 세포주기를 분석한 결과 0.25mg/ml 天花粉 처리 세포군의 apoptosis가 일어난 세포비율은 약 10%로 나타났다.
5. 대조군에 비해 天花粉을 처리한 모든 세포군에서 caspase-3 활성의 증가를 나타내었다.
6. 대조군에 비해 天花粉 처리 후의 미토콘드리아 막전위가 감소되었다. 그러나 농도에 따른 유의한 효과는 없었다.

이상의 실험결과로 보아 天花粉은 자궁경부암세포 ME-180에 대하여 apoptosis 기전에 의한 세포독성의 효과를 나타내고, 미토콘드리아의 탈분극을 유도하면서 caspase-3를 활성화하는 경로를 통해 자궁경부암세포에 대하여 apoptosis 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

□ 투 고 일 : 2005년 07월 27일

□ 심 사 일 : 2005년 08월 01일

□ 심사완료일 : 2005년 08월 10일

## 參考文獻

1. Zhang Y et al. Evodiamine induces tumor cell death through different pathway; apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25(1): 83-89.

2. Mike Jacobson and Nicola J. McCarthy. Apoptosis. New York: Oxford University press. 2002; 1-10, 161-171.
3. 정해영. 분자세포생물학·분자의학. 서울: 월드사이언스. 2001; 255-260.
4. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. Adv. Pharmacol. 1997; 41, 461.
5. 윤유식. 한약재에 의한 세포사(apoptosis) 조절의 의학적 응용가능성에 대한 연구. 한국한의학연구원. 1998; 5: 401-435.
6. 대한병리학회. 病理學 제2판. 서울: 고문사. 1995; 961.
7. 조종관. 韓方臨床腫瘍學. 대전: 주민출판사. 2001; 799-818.
8. Hersh, E. M and Ereish, E. J. Host defence mechanism and their modification by cancer chemotherapy. In methods in Cancer Research. New York: Academic Press. 1986; 335.
9. 商穀敏. 抗癌本草. 서울: 도서출판 바람과 물결. 1992; 89-92.
10. 전미혜 등. 五積散이 子宮筋腫세포의 사멸과 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003; 16(2): 45-55.
11. 김윤근 등. 蟠蔥散이 子宮筋腫세포의 사멸과 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003; 16(2): 34-44.
12. 백승희, 김동철. 失笑散이 子宮筋腫세포의 증식억제와 MAP Kinase활성 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004; 17(1): 29-42.
13. 김동철 등. 香附子가 子宮筋腫세포의 성장억제와 MAP Kinase활성 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003; 16(2): 18-33.
14. 이윤정 등. 半枝蓮이 자궁암세포(Hela22918)의 성장억제에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999; 12(1): 185-196.
15. 김건옥. 자궁경부암세포(Hela cell)에 대한 榆根皮, 四君子湯, 四君子湯加榆根皮의 抗癌효과. 대전: 대전대학교. 1993.
16. 유심근 등. 香稜丸이 자궁경부암세포(Hela cell)의 apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004; 17(2): 011-026.
17. 박경미 등. 濟川煎이 자궁경부암세포(Hela cell)에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003; 16(2): 161-176.
18. 박종문 등. 六合湯이 자궁경부암세포(Hela cell)에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003; 16(3): 128-146.
19. 고호규. 加味桂枝茯苓丸과 항암제 併用시 자궁암세포(Hela cell)에 미치는 영향. 대전: 대전대학교. 1995.
20. 한의부인과학 교재편찬위원회. 韓醫婦人科學 上. 서울: 도서출판 정담. 2001; 319-326.
21. 대한산부인과학회. 婦人科學 제3판. 서울: 도서출판 칼빈서적. 1997; 980-984.
22. 문구, 정명학, 김병주. 癌 東西醫 結合 治療. 익산: 원광대학교 출판국. 1999; 379-405.
23. Oldham, R.K.. Biologicol Response Modifiers. J. Natl. Cancer Inst. 1983; 70, 789.
24. 정보섭, 신민교. 圖解 鄉藥(生藥)大辭

- 典 植物編. 서울: 영림사. 1998; 960-963.
25. 전국한의과대학 본초학교실. 本草學. 서울: 영림사. 1998; 165-166.
  26. 박종희. 한약백과도감. 서울: 도서출판 신일상사. 2002; 76-77.
  27. 약품식물학연구회. 藥品植物學. 서울: 학창사. 1997; 377-379.
  28. 서부일, 최호영. 臨床 韓方本草學. 서울: 도서출판 영림사. 2004; 191-194.
  29. 신민교 등. 中藥大辭典. 서울: 도서출판 정담. 1997; 471, 5389.
  30. 吳普. 神農本草經 卷二. 서울: 醫道韓國社. 1976; 6-7.
  31. 唐宗海 著. 金俊錡 譯. 國譯 本草問答. 서울: 대성문화사. 1996; 48, 50, 173, 210, 212.
  32. 신길구. 申氏本草學 各論. 서울: 수문사. 1988; 617-620.
  33. 황도연. 方藥合編. 서울: 남산당. 1995; 313.
  34. 안중걸 등. 자궁경부암 세포주에서 세포주기조절 유전자들의 발현. 대한암학회지. 2000; 32(1): 110-119.
  35. 김용범. 자궁경부암에서 Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA 단백질 발현 및 Apoptosis 양상과 선행항암화학요법 반응도와의 상관관계에 관한 연구. 서울: 서울대학교. 2000.
  36. 김태진. 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성. 서울: 한양대학교. 1999.
  37. 이종민. 자궁경부암에서 복합선행화학요법의 반응성과 bcl-2, p53 유전자 발현 및 Apoptosis와의 상관관계에 관한 연구. 서울: 고려대학교. 1999.
  38. 김재익. 臨床本草學講座 上. 서울: 대성의학사. 2000; 299-302.
  39. Geoffrey M. Cooper 著. 정병갑 외 14인 譯. 분자세포 생물학. 서울: 도서출판 한우리. 2002; 592-593.
  40. G. Kroemer and C. Martinez-A. Apoptosis in Immunology. Germany: Springer-Verlag. 1995; 107-117.
  41. 한창열. 분자세포유전학. 서울: 일조각. 1990; 56-71.
  42. 서울대학교 의과대학. 세포생물학. 서울: 서울대학교 출판부. 1990; 1-9, 63-65, 145-150.
  43. 김정희, 성차경. Apoptosis의 조절기전. J Korean Soc Hyperthermia Oncol. 2000; 5(1): 1-11.
  44. 한국유전자학회. 유전 제2권. 서울: 도서출판 월드사이언스. 1998; 77-128.
  45. Wei-Wei An et al. Norcantharidin Induces Human Melanoma A375-S2 Cell Apoptosis through Mitochondrial and Caspase Pathways. J Korean Med Sci. 2004; 19: 560-566.
  46. Green DR, Reed Jc. Mitochondria and apoptosis. Science. 1998; 281(5381): 1309-1312.
  47. 허종찬 등. 인간 폐암세포주 H-460세포에서 加減十全大補湯과 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 併用처리에 의한 항종양 증진효과. 동의생리병리학회지. 2004; 18(4): 1089-1097.