

백글채 추출물이 MDA-MB-231 유방암 세포주에서 세포사멸에 미치는 효과

대전대학교 한의과대학 부인과교실
장새별, 유동열

ABSTRACT

Effects of *Chelidonium Majus* Extract on Apoptosis Induction of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells

Sae-Byul Jang, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine,
Dae-Jeon University

Objectives: In this study, we investigated the anti-proliferative and apoptosis inducing effect of water extract of *Chelidonium majus* (CM) on human breast cancer cell MDA-MB-231.

Methods: The MTT assay was used to assess cell proliferation. The expression of apoptosis related gene was assessed by quantitative Real-time PCR. Cell apoptosis detected by flow cytometry using Annexin-V/PI staining.

Results: Our data revealed that CM inhibited the cell growth in a dose dependent manner (0, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml). CM increased mRNA expression of pro-apoptotic genes Bax, caspase-3, and caspase-9. Annexin-V/PI staining assays revealed that apoptosis-induced cell death increased in a dose-dependent manner in cells.

Conclusions: CM induces cell death in MDA-MB-231 human breast cancer cell and shows potentials for use in cancer therapy as apoptosis-inducing agent.

Key Words: *Chelidonium majus*, breast cancer, MDA-MB-231, apoptosis, anti-proliferative

I. 서 론

유방암은 유방 구성조직인 유선, 유엽, 유관 및 유선 조직을 지지하는 지방, 결합조직, 림프관 등에 발생하는 암으로 다른 암에 비해 종류가 다양하나 대부분의 유방암은 유관 상피세포에서 기원하고, 다른 암에 비하여 예후는 좋은 편이나 역시 혈류와 림프관을 따라 전신으로 전이되어 사망에까지 이를 수 있다¹⁾. 유방암의 발생률은 전세계적으로 빠르게 증가하는 추세에 있으며 세계 전체 여성암의 25.2%를 차지하여 여성암 중 최다 발생률을 보이고²⁾, 우리나라에서도 2011년 전체 여성암의 14.8%를 차지하여 갑상선암 다음으로 높은 발병률을 보였다³⁾.

한의학에서는 宋代 陳自明의 《婦人良方大全》⁴⁾에서 “初起內結小核, 或如鰲棋子, 不赤不痛, 積之歲月漸大 巉岩崩破如熟榴, 或內潰深洞 血水滴瀝 此屬肝脾鬱怒, 氣血虧損 名曰乳巖 爲難療”이라 하여 초기의 통증을 수반하지 않는 유방종괴, 더 진행되어 나타나는 유두의 분비물, 출혈, 염증 및 함몰, 유방 피부의 부종, 발적, 함몰, 염증, 액외부 종괴 등의 증상이 나타나는 현대의 유방암을 가장 잘 서술하고 있다⁵⁾. 乳巖의 원인으로 肝氣鬱滯, 七情所傷과 血氣枯槁, 正氣不足, 氣血損傷, 衝任失調, 痰飲, 外感 등이 있으며, 疏氣行血을 기본 치법으로 하되 氣血虧損할 때는 大補氣血해야 하며, 肝鬱氣滯型, 肝腎陰虛型, 瘀毒內毒型 등으로 변증하여 舒肝理氣, 軟堅散結, 滋補肝腎, 活血化瘀의 치법을 활용한다⁶⁾.

현대 의학에서는 대부분 1차적으로 수술을 시행한 뒤 재발을 막기 위한 보조요법으로 방사선치료, 항암화학요법을 시

행하고 경우에 따라 항호르몬요법, 표적치료 등을 시행하는데 보편적으로 응용되는 항암화학요법 후에 구토, 진신쇠약, 식욕부진, 탈모, 신경증, 무월경, 안면홍조, 골수기능 억제, 면역기능 저하 등의 부작용이 나타나므로^{1,7)} 이러한 부작용을 최소화 하면서 치료 효과를 가진 새로운 약물을 찾기 위하여 자연스럽게 천연물에 대한 관심이 높아지고 있다.

백굴채는 罌粟科의 다년생 본초인 *Chelidonium majus* Linne의 전초로⁸⁾, 性은 涼하고 味는 辛하며 有小毒하고 肺·脾·胃經으로 歸經하며 鎮痛, 止咳, 利尿, 解毒효능이 있어 胃痛, 腹痛, 腸炎, 痢疾, 慢性氣管支炎, 百日咳, 咳嗽, 黃疸, 水腫, 腹水, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷을 치료하고⁹⁾, 이러한 전통적인 효능 이외에도 항염증, 항균, 면역조절, 위보호 및 항괴양, 담즙분비 촉진, 간보호, 항산화, 항암 효능 등의 다양한 효능을 가지고 있다¹⁰⁾. 또한 백굴채에서 추출한 각종 alkaloids에 thiophosphoric acid를 합성하여 만든 ukrain이라는 항암제가 개발되었으며¹¹⁾, 뇌암 및 흑색종¹²⁾, 위암¹³⁾, 간암¹⁴⁾, 백혈병¹⁵⁾, 자궁경부암¹⁶⁾, 피부상피암¹⁷⁾ 등에 항암효과를 나타내는 것이 밝혀져 백굴채의 새로운 항암제로서의 가능성이 주목되고 있으나 아직 유방암 세포에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 논문에서는 백굴채(*Chelidonium majus*) 열수추출물(이하 CM)이 유방암 세포(MDA-MB-231)의 증식에 미치는 영향과 세포사멸에 미치는 영향을 flow cytometry를 통해 확인하였으며, apoptosis 기전에 관여하는 유전자를 mRNA 수준에서 분석을 통하여 백굴채의 천연 항암 물질로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 실험

1. 재료 및 방법

1) 시약 및 배지

RPMI 1640, trypan blue, Fetal Bovine Serum(FBS), Trypsin-EDTA, Tail Apoptosis detection kit 및 모든 세포배양 시약은 Life Technology(Rockville, MD, USA)사에서 구입하여 사용하였으며, 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 세포배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

2) 시료제조

본 실험에 사용한 백굴채(*Chelidonium majus*)는 둔산한방병원에서 구입하였으며, 분쇄가루 150 g을 1:25의 비율로 3차 증류수를 첨가하여 3시간 동안 환류추출하였다. 추출된 용액은 whatman No.1 disc paper를 이용하여 여과하였다. 그 후 추출액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, N-1000, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조(EYELA, FDU-1000, Tokyo, Japan)하여 10%의 수득율로 분말 시료 15 g을 얻었다.

3) 세포배양

본 실험에 사용된 사람유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. MDA-MB-231 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 70~80% 정도 증식하면 1×phosphate

buffered saline(PBS, pH 7.4)로 세척하고, 0.025% Trypsin-EDTA(Life Technology, USA)용액을 이용해 단일 세포로 분리한다. 다음 세포를 1×10⁶ cells/ml로 계대 배양하였다. 실험을 위해 세포를 seeding 후 CM을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 10 mg/ml의 농도로 만들어 배지로 희석하여 사용하였다.

4) Anti-proliferative activity

CM 처리에 따른 세포사멸효과를 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT assay)분석법을 이용하였다. 이것은 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색 수용성 기질인 MTT를 보라색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로, 살아있는 세포수에 비례하여 formazan이 생성된다¹⁸⁾. 배양된 유방암세포를 96-well plate에서 24시간 동안 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양한 후, 각각 0, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml로 CM을 처리하였다. 24시간 배양한 세포에 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 생성된 보라색의 formazan을 DMSO를 첨가하여 용해시켜 550 nm에서 흡광도(Tecan, Austria)를 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군(non treated group, 이하 C)을 100%로 하여 상대적인 세포 생존율을 구하였다.

5) Flow cytometry analysis

유방암세포에서 CM이 유발하는 apoptosis 정도를 정량적으로 분석하기 위해 CM을 처리한 세포를 1×phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 수세하고, Tail Apoptosis Kit(Annexin-V/PI staining)을 이용하여 상온에서 고정 및 염색 하

였다. CM이 처리된 세포를 모아 1000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 세포에 1×ABB(annexin binding buffer) 100 μ l 와 10 μ l Annexin-V를 첨가하여 상온에서 20분간 염색시킨 뒤 1 μ l PI를 첨가하고 암실온에서 5분간 염색하였다. 염색된 세포의 분석은 Tali Image-based cytometer와 TaliPCApp (version 1.0)을 이용하여 분석 하였다.

6) Quantitative Real-time PCR 에 의한 세포사멸 관련 유전자 분석
세포사멸유도에 관여하는 유전자의 발

현을 관찰하기 위해 CM을 각각 0, 50, 200, 400 μ g/ml로 처리하여 세포부터 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA로부터 표적유전자의 mRNA를 역전사시켜 cDNA를 합성하고 SYBR-green Ex Taq(TAKARA Bio INC, Japan)에 세포사멸에 관여하는 유전자인 Bcl-xL, Bax, caspase-3, caspase-9를 첨가하여 qPCR을 수행하였다. 모든 반응 실험은 3회 시행하였으며, $2^{-\Delta\Delta CT}$ method로 분석하였다. 본 실험에 사용한 primer는 아래와 같다(Table 1).

Table 1. Primer Sequence Used for PCR

| | | |
|-----------|-----------|---------------------------|
| Bcl-xL | sense | CTTTGCCTAAGGCGGATTTGAA |
| | antisense | AATAGGGATGGGCTCAACCAGTC |
| Bax | sense | GCGAGTGTCTCAAGCGCATC |
| | antisense | CC AGTTGAAGTTGCCGTCAGAA |
| caspase-3 | sense | ATGGAGAACAACACTGAAAACCTCA |
| | antisense | GCTGTTTACAAGACCCACGTGG |
| caspase-9 | sense | TGGCTTCGTTTCTGCGAACTA |
| | antisense | GTTACTGCCAGGGGACTCGTC |

2. 통계분석

실험 결과는 SPSS v12.0을 이용하여 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 p값이 0.05보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. CM이 MDA-MB-231 세포 생존율에 미치는 영향

CM은 500 μ g/ml 농도에서 MDA-MB-231 유방암세포의 증식을 61.7% 억제하는 것으로 나타났으며, 농도 의존적으로 세포 증식 억제 효과가 있었다(Fig. 1).

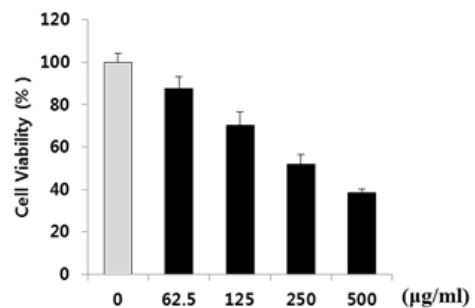


Fig. 1. Effect of CM on cell viability of MDA-MB-231 cell.

Cells were treated with different concentration of CM for 24hrs. Cell viability was determined by the MTT assay.

0 : C (non treated group)

62.5 : CM 62.5 μ g/ml

125 : CM 125 μ g/ml

250 : CM 250 μ g/ml

500 : CM 500 μ g/ml

2. CM의 세포사멸 유도 효과

CM을 MDA-MB-231 유방암세포에 150, 300 µg/ml 농도로 처리한 결과, 세포 증식이 억제되는 것을 현미경 관찰을 통해 확인하였다(Fig. 2).

세포에 Annexin-V/PI staining을 하여 세포사멸 정도를 정량적으로 분석한 결과 대조군에서는 3%, CM 150, 300 µg/ml 처리군에서는 각각 23%, 42%에서 apoptosis가 일어났으며 세포사멸이 CM에 농도의존적으로 증가하였다(Table 2).

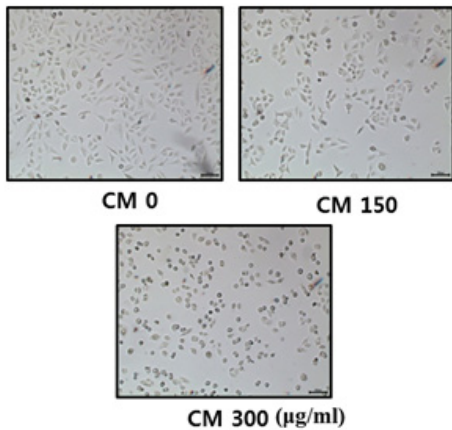


Fig. 2. Effect of CM on the cell morphology and cell apoptosis in MDA-MB-231 cell. Cells were treated with various concentration of CM. The morphological change observed under the phase-contrast inverted microscope ($\times 100$, scale bars 50 µm).

Table 2. Effect of CM on the Cell Death of MDA-MB-231 Cells

| Cells at different death processes | Proportions of cells at the following concentrations of CM (%) | | |
|------------------------------------|--|-----------|-----------|
| | 0 µg/ml | 150 µg/ml | 300 µg/ml |
| Live | 91 | 71 | 51 |
| Dead | 6 | 6 | 7 |
| Apoptosis | 3 | 23 | 42 |

Proportion (%) of the cells revealed apoptosis in MDA-MB-231 cells treated with different concentration of CM for 24hrs analyzed by Image-based cytometric analysis.

3. CM이 세포사멸관련 유전자의 발현에 미치는 영향

CM을 유방암 세포주에 처리하였을 때 세포사멸사를 억제하는 anti-apoptotic 단백질 Bcl-xL의 발현이 감소하였으나 유의성은 없었다. 반면에 세포사멸사를 촉진하는 pro-apoptotic 단백질 Bax는 CM 200 µg/ml 처리군에서 발현량이 유의성 있게 ($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 3).

또한 apoptosis를 유도하는 마지막 단계에서 활성화되어 여러 세포에서 세포 사멸을 유도하는 유전자인 caspase의 발현량을 측정된 결과 CM을 처리하였을 때 caspase-3, caspase-9의 발현이 CM 200 µg/ml, 400 µg/ml 처리군에서 유의성 있게 ($p < 0.001$) 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 4).

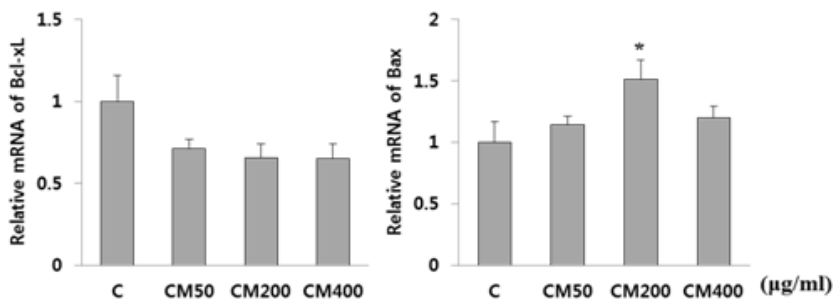


Fig. 3. Effect of CM on apoptosis related gene expression of MDA-MB-231 cell. Cells were treated with CM for 24hrs and then mRNA level evaluated by quantitative real-time PCR. C : non treated group
* : $p < 0.05$ vs C

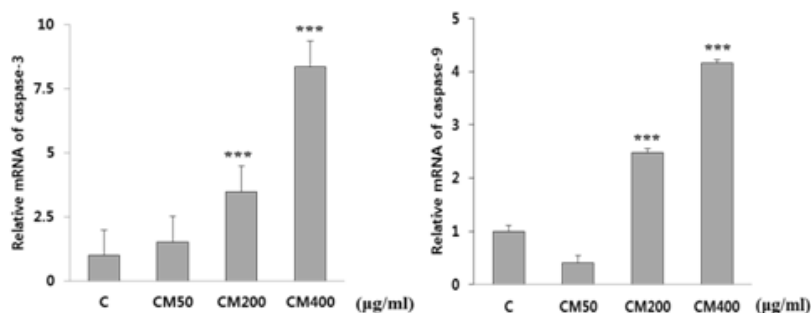


Fig. 4. Effect of CM on caspase gene expression of MDA-MB-231 cell. Cells were treated with CM for 24hrs and then mRNA level were evaluated by quantitative real-time PCR.

C : non treated group

*** : p<0.001 vs C

IV. 고찰

유방암의 발생률은 전 세계적으로 빠르게 증가하고 있는데 2014년 국제암보고서에 따르면 2012년 유방암의 발생률은 2008년에 비해 20%나 증가하였고²⁾, 우리나라 보건복지부의 중앙암등록보고서에 따르면 2011년 기준으로 유방암은 전체 여성암의 14.8%를 차지하여 갑상선암(31.1%) 다음으로 흔하게 발생함을 알 수 있다³⁾. 유방암의 발생빈도는 경제수준과 식생활 습관에 따라 큰 차이를 보이고 있으며 일반적으로 고지방, 고단백 등의 고칼로리식이 습관, 25세 미만의 1,500 mg 이상의 피임약 복용 또는 폐경 이후의 부적절한 호르몬 대체요법 등 호르몬제를 많이 사용한 경우, 가족력이 있는 경우에 위험도가 높고, 채식 등으로 섬유질을 많이 섭취하고 출산횟수가 많고 모유수유를 한 여성에서는 위험도가 낮다¹⁹⁾.

한의학 문헌에서는 일찍이 唐代 巢元方的 《諸病源候論》²⁰⁾에 “乳中隱核, 不痛不癢, 漸漸長大, 堅硬者 稱爲石癰”이라 하였고, 宋代 《婦人良方大全》⁴⁾에서는

“初起內結小核, 或 如鰲棋子, 不赤不痛, 積之歲月漸大 巉岩崩破 如熟榴, 或內潰深洞 血水滴瀝 此屬肝脾鬱怒, 氣血虧損 名曰乳巖 爲難療”라 하여, 초기의 통증을 수반하지 않는 유방 종괴, 더 진행되어 나타나는 유두의 분비물, 출혈, 염증 및 함몰, 유방 피부의 부종, 발적, 함몰, 염증, 액와부의 종괴 등의 현대 유방암의 증상을 가장 잘 서술하고 있다⁵⁾. 이외에도 한의 학문헌에서 乳巖은 石奶, 妒乳, 番花奶, 乳束, 奶巖, 石榴番花發, 番花石榴發 등으로 다양하게 표현되고²¹⁾ 乳癰, 吹乳, 乳癆, 乳中結核, 乳癖, 乳痰, 妳奶도 유방암의 단계별로 다르게 나타나는 여러 가지 증상들을 나타낸 것으로 보이므로 진단과 치료에 참고할 수 있다⁶⁾. 乳巖의 원인은 肝氣鬱滯, 七情所傷이 선행요인이자 주요인이며 이것이 오래되면 血氣枯槁, 正氣不足, 氣血損傷, 衝任失調 등으로 나타나는 장부기능의 실조, 이외에 痰飲이나 外感 등에 의해서도 乳巖이 될 수 있다. 그러므로 乳巖을 치료할 때에는 疏氣行血을 기본 치법으로 하되 초기에 肝氣鬱結은 疏氣行血, 疏肝解鬱 하는 반면에 氣血虧損할 때는 大補氣血해야 하며, 肝鬱

氣滯型, 肝腎陰虛型, 癩毒內毒型 등으로 변증하여 舒肝理氣, 軟堅散結, 滋補肝腎, 活血化癥의 처방을 응용해 볼 수 있다⁶⁾.

현대 의학에서 유방암의 치료는 발생 연령, 병기, 암의 병리학적 특성, 환자의 심리상태 등을 고려하여 적절한 치료법을 선택하게 되는데 대부분 1차적으로 수술을 시행한 뒤 재발을 막기 위한 보조요법으로 방사선치료, 항암화학요법을 시행하고 경우에 따라 항호르몬요법, 표적치료 등을 시행할 수 있다. 보편적으로 응용되는 항암화학요법은 대부분 세포분열을 강하게 억제하여 정상세포에도 영향을 주므로 구토, 전신쇠약, 식욕부진, 탈모, 신경증, 무월경과 안면홍조 등의 폐경증상뿐만 아니라 골수기능을 억제하여 적혈구, 백혈구, 혈소판, 림프구 등의 수가 감소됨으로서 면역기능을 저하시키는 심각한 부작용을 나타낸다^{1,7)}. 따라서 이러한 부작용을 최소화 하면서 치료 효과를 가진 새로운 약물을 찾기 위해 자연스럽게 천연물에 대한 관심이 높아지고 있는데²²⁾ 鬼箭羽²³⁾, 鬱金²⁴⁾, 三稜²⁵⁾, 薑黃²⁶⁾, 川楝子²⁷⁾, 玄胡索²⁸⁾, 苦參²⁹⁾, 五味子³⁰⁾ 등의 천연물이 유방암에 대하여 항암효능을 가지고 있다는 것이 실험적으로 증명되었다.

백굴채는 《救荒本草》⁸⁾에 처음으로 기록된 罌粟科의 다년생 본초인 *Chelidonium majus* Linne의 전초로 전초를 자르면 橙黃色 유즙이 나온다고 하여 민간에서는 애기똥풀이라고도 불린다. 예로부터 백굴채는 의약품으로 사용되지 않았으나 文豪 紅葉山人이 胃癌에 罹患되어 良藥을 찾던 중 栗本醫學博士가 백굴채의 엑기스를 투여하면서부터 그 이름이 전하여지기 시작했으며, 性은 涼하고 味는 辛

하며 有小毒하고 肺·脾·胃經으로 歸經하며 鎮痛, 止咳, 利尿, 解毒효능이 있어 胃痛, 腹痛, 腸炎, 痢疾, 慢性氣管支炎, 百日咳, 咳嗽, 黃疸, 水腫, 腹水, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷을 치료한다고 알려져 있다⁹⁾.

이러한 전통적인 효능 이외에도 항염증, 항균, 면역조절, 위보호 및 항궤양, 담즙분비 촉진, 간보호, 항산화, 항암 효능 등의 다양한 효능을 가지고 있는 것이 실험적으로 밝혀졌고¹⁰⁾, 주요 성분으로는 sanguinarine, chelidonine, chelerythrine, berberine, propopin, coptisine 등의 isoquinoline alkaloids와 flavonoid, phenolic acids를 함유하고 있으며³¹⁾, 백굴채에서 추출한 각종 alkaloids에 thiophosphoric acid를 합성하여 만든 ukrain¹¹⁾이라는 유도체가 흑색종, 유방암, 자궁경부암, 난소암 등 다양한 암에 항암효과가 있음이 보고되었다³²⁾.

현재까지 발표된 백굴채의 항암효과에 대한 연구 결과에 의하면 백굴채의 성분 중 chelidonine이 섬유모세포의 유사분열을 억제하여 악성 종양의 성장을 억제하고³³⁾, 백굴채 추출물이 뇌암 및 흑색종 세포주에 세포독성을 나타내 항암작용을 나타낸다고 하였다¹²⁾. 또한 AGS cell에서 mitochondria경유 apoptosis에 관여하는 단백질에 변화를 일으켜 apoptosis를 유도해 위암에 효과가 있고¹³⁾, 항종양, 항유전독성, 간보호 효능이 있어 간암 치료제로서의 가능성이 확인되었으며¹⁴⁾, 백굴채의 isoquinoline alkaloids와 flavonoid의 항산화능을 통해 암을 예방하고 세포독성 및 apoptosis를 유도하여 백혈병 세포의 증식을 억제하는 효능이 있다고 하였다¹⁵⁾. 그뿐만 아니라 백굴채에서 분리된 정제된 핵산분해효소인 CMN1과 CMN2

가 자궁경부암세포(HeLa tumor)에서 염증반응 없이 세포자멸사를 유도하고¹⁶⁾, 백골채 추출물이 피부상피암 세포에서 caspase를 활성화하고, MAPK-비의존적 경로를 통한 NF- κ B를 억제해 apoptosis를 유도하여 세포 증식을 억제하여 항암 작용을 나타낸다고 보고하였다¹⁷⁾.

현재까지 이처럼 여러 종류의 암에서 백골채의 항암 효과가 증명되었으나 아직 유방암 세포에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 실험을 통해 CM이 MDA-MB-231 유방암세포 증식에 미치는 영향과 세포사멸에 미치는 영향을 각각 MTT assay와 flow cytometry를 통해 확인하고, apoptosis 기전에 관여하는 유전자를 mRNA 수준에서 분석하여 백골채의 천연 항암물질로서의 가능성을 확인하고자 본 실험을 진행하였다.

CM이 MDA-MB-231 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 CM을 0, 62.5, 125, 250, 500 μ g/ml로 처리하여 24 시간 동안 배양한 뒤 MTT assay를 실시하고 아무것도 처리하지 않은 대조군(non treated group, 이하 C)을 100%로 하여 상대적인 세포 생존율을 구한 결과 500 μ g/ml 농도에서 MDA-MB-231 유방암세포의 증식을 61.7% 억제하는 것으로 나타났으며, CM은 MDA-MB-231 세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하는 효과가 있었다. 이로 보아 CM은 유방암 세포에서 성장 억제능을 가지고 있다고 할 수 있다.

Apoptosis는 세포자신의 DNA와 핵, 세포질 단백을 파괴시키는 효소를 활성화시켜 엄격히 조절되는 자살 프로그램에 의해 세포사로 유도하여 잠재적인 유

해세포와 노화된 세포, 손상된 세포들을 제거하여 조직 내 다양한 개체의 숫자를 일정하게 유지하기 위한 정상적인 현상으로 배아발생, 월경, 창자 샘상피세포, 면역반응, 종양에 대한 방어기전 등에서 중요한 역할을 한다. apoptosis가 일어나면 자멸 사체의 원형질막은 그대로 남아 있지만, 세포와 그 절편이 포식세포의 주요 목표가 될 수 있도록 세포막 모양이 변하고, 죽은 세포는 그 내용물이 유출되기 전에 빠르게 제거되기 때문에 염증반응을 일으키지 않는다. 따라서 apoptosis는 특징적인 세포막의 소실, 세포의 효소적 소화, 세포 내용물의 누출 등에서 염증반응을 일으키는 괴사와 차이가 있다³⁴⁾.

CM에 의한 증식 억제가 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있는지 확인하기 위해 image-based cytometer를 이용해 early apoptosis를 측정하여 분석한 결과 CM 150 μ g/ml와 CM 300 μ g/ml 처리군에서 apoptosis가 대조군에 비하여 3%에서 각각 23%와 42%로 증가하는 것을 확인하였다. 이는 CM이 세포 증식을 저해하고 결국 세포 사멸을 유도하여 유방암세포에 대한 항암 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

Apoptosis의 경로에는 대부분의 세포자멸사와 관련이 있다고 생각되는 미토콘드리아 경로와 세포사 수용체 경로가 있는데 두 경로 모두 기본 반응은 caspase의 활성화로, caspase는 수많은 표적들을 분해하고, DNA를 파괴하는 핵분해효소를 활성화시키며, 핵산 단백질과 세포골격단백질을 파괴하는 다른 효소들을 활성화시키는 역할을 한다³⁴⁾.

미토콘드리아 경로에서 영양부족, DNA 손상, misfolded protein의 축적, 감염 등

의 신호에 노출되면 Bcl-2 family sensor가 세포자멸사를 촉진하는 pro-apoptotic 단백질인 Bax, Bak을 활성화 하여 Cytochrome c와 다른 미토콘드리아 단백질이 세포질로 나갈 수 있는 통로를 형성하고, 다른 관련된 sensor에서는 세포자멸사를 억제하는 anti-apoptotic 분자인 Bcl-2와 Bcl-xL을 억제한다. 세포질로 유출된 Cytochrome c는 caspase-9를 활성화 시키고 다른 단백질은 caspase 길항제의 활성을 차단하여 caspase 연쇄반응의 활성화를 나타낸다³⁴⁾. 이러한 apoptosis의 능력을 소실하게 되면 형질 변화를 일으킨 개체가 이상증식을 멈추지 않고 계속해서 증식하여 결국 암이나 자가면역질환 등과 같은 여러 질병의 원인이 되며, 실제로 각종 암에서 caspase가 감소 또는 결핍되어 있는 것이 발견되었다³⁵⁾.

Real-time PCR을 통해 세포사멸관련 유전자인 Bcl-xL, Bax, caspase-3, caspase-9 유전자의 발현 정도를 관찰한 결과 CM은 Bcl-xL의 발현을 감소시켰으나 유의성은 없었으며, CM 200 µg/ml 처리농도에서 Bax의 발현을 유의성 있게 증가시켰다. 또한 CM 200, 400 µg/ml 처리군에서 caspase-3, caspase-9의 활성을 유의성 있게 증가시켰다. 그러므로 CM은 Bcl-xL의 발현의 감소와 Bax, caspase-3, caspase-9 활성 증가를 통해 유방암 세포의 사멸에 영향을 주는 것으로 사료된다.

이상을 종합하여 볼 때 백굴채 열수추출물은 유방암세포의 세포 증식 억제 뿐 아니라 세포사멸을 유도하고 세포 사멸 프로그램에 관여하는 유전자들의 발현 조절을 통해 세포증식을 억제하였으므로 항암효과를 기대해볼 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

CM이 MDA-MB-231 유방암 세포 증식에 미치는 영향과 세포사멸에 미치는 영향을 flow cytometry를 통해 확인하였으며, apoptosis기전에 관여하는 유전자를 mRNA 수준에서 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CM은 MDA-MB-231 유방암 세포에서 500 µg/ml 농도에서 세포 증식을 61.7% 억제하였다.
2. CM 150, 300 µg/ml 처리군에서 apoptosis는 각각 23%, 42%로 농도의존적으로 증가하였다.
3. CM은 Bcl-xL의 발현을 감소시켰으나 유의성은 없었다.
4. CM은 200 µg/ml 농도에서 Bax의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.
5. CM은 200, 400 µg/ml 농도에서 caspase-3, caspase-9의 활성을 유의성 있게 증가시켜 apoptosis를 유도하였다.

Received : April 21, 2015

Revised : April 27, 2015

Accepted : May 06, 2015

참고문헌

1. Yoon JH. 2014 breast cancer white paper. Seoul:Korean breast cancer society. 2014:2-5.
2. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon. 2014. Available

- from:URL:http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.
3. Korea central cancer registry. Ministry of Health & welfare. Annual report of cancer statistics in Korea in 2011. 2013. Available from:URL:http://meta.narastat.kr/metasvc/index.do?confmNo=11744&inputYear=2011. Accessed September 1st, 2014.
 4. 陳自明. 婦人良方大全. 臺北:集文書局. 1950:71-5.
 5. Cho JK. The clinical oncology in oriental medicine. Korea:Joomin publisher. 2005:4-5, 533-49.
 6. Korean obstetrics & gynecology. Oriental obstetrics & gynecology(下). Seoul: Euiseongdang. 2012:399.
 7. Lim SJ. Study on cancer patients presenting to the emergency department due to chemotherapy induced side effects. Department of Nursing, The Graduate school of Seoul National University. 2013.
 8. Lee SI. Herbology. Seoul:Suseowon. 1981:532-3.
 9. The compilation committee of Herbology. Herbology. Seoul:Younglim publisher. 2008:725.
 10. Gilca M, et al. *Chelidonium majus*-an integrative review: traditional knowledge versus modern findings. *Forsch Komplementmed*. 2010;17(5):241-8.
 11. Sokoloff B. The oncostatic and oncolytic factors present in certain plants. *Oncology*. 1969;22:49-60.
 12. So JB, et al. The study on anticancer effect of *Chelidonium majus*. *The Korea journal of herbology*. 1997;13(2):63-72.
 13. Kim SC, et al. The Effects of *Chelidonium Herba* Extract on Apoptosis in Human Stomach Adenocarcinoma Cell Line. *The Korean journal of oriental medical prescription*. 2005;13(1):71-83.
 14. Biswas SJ, Bhattacharjee N, Khuda-Bukhsh AR. Efficacy of a plant extract (*Chelidonium majus* L.) in combating induced hepatocarcinogenesis in mice. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(5):1474-87.
 15. Nadova S, et al. Potential antioxidant activity, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. extract on leukemia cells. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29(5):649-52.
 16. Nawrot R, Wóluń-Cholewa M, Goździcka-Józefiak A. Nucleases isolated from *Chelidonium majus* L. milky sap can induce apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells but not in Chinese Hamster Ovary CHO cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(1):79-83.
 17. Park SW, et al. *Chelidonium majus* L. extract induces apoptosis through caspase activity via MAPK-independent NF- κ B signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Oncol Rep*. 2015; Epub 2014 Oct 23;33(1):419-24.
 18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
-

19. Paik NS. Current Status of Breast Cancer. Journal of Korean Association of Cancer prevention. 2003;8(4):236-44.
20. 巢元方. 巢氏諸病源候論. Seoul:DSprint. 1992:296.
21. Kim JB, Ahn GS. Articles : A Study on the Pathology of Breast Cancer. The Journal of oriental medical pathology. 1994;9(1):189-208.
22. Lee JH, Yoo DY. Meta Analysis of researches about herbal extracts used in breast cancer in South Korea since 2000. Institute of Korean Medicine of Daejeon university. 2007;16(2):241-9.
23. Kim JS, Lee TK, Kim DI. A study of antiproliferative effect by *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb water-extract on SKBR3 human breast cancer cell Line. J Korean Obstet Gynecol. 2005; 18(4):1-9.
24. Yang DS, Yang SJ. Effects of *Curcuma longa* L. on MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells and DMBA-induced Breast Cancer in Rats. J Korean Obstet Gynecol. 2013;26(3):44-58.
25. Park KM, Cho SH, Jeong KA. Anti-proliferative effect of Sam-nueng (*Sparganii Rhizoma*) extract on MCF-7 cells. J Korean Obstet Gynecol. 2006; 19(1):166-77.
26. Jung S, et al. Inhibition of Cellular Proliferation by *Curcumae Longae Rhizoma* Extracts on MCF-7. The Korea journal of herbology. 2006;21(1):71-7.
27. Yoon WK, Kim DC. *Toosendan Fructus* Induces Apoptotic Cell Death in MCF-7 Cell, Via the Inhibition of Bcl-2 Expression. J Korean Obstet Gynecol. 2008;21(3):18-33.
28. Park YA, Kim DC. *Corydalis Tuber* Induces Apoptosis in MCF-7 Cells, Via Inhibition of Bcl-2 and Bcl- XL Expression. J Korean Obstet Gynecol. 2008;21(4):90-103.
29. Lee HJ, et al. Effects of *Sophorae Radix* on Human Breast Adenocarcinoma Cells. Korean journal of oriental medicine. 2012;18(1):75-84.
30. Kim JN, et al. Effects of Schisandra Chinensis on Human Breast Cancer Cells. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2014;28(2):162-8.
31. Colombo ML, Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). Pharmacol Res. 1996; 33(2):127-34.
32. Ernst E, Schmidt K. Ukrain - a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials. BMC Cancer. 2005;5:69.
33. Sang ME. Juhaedosul Hangamboncho. Seoul:Iljoong publisher. 1992:204-5.
34. Vinay Kumar, et al. Robbins Basic Pathology. 8e. Elsevier Inc:USA. 2007:19-23.
35. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell. 1991; 65(7):1097-8.