

沒藥이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)의 Apoptosis에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
박종규, 조옥현, 김송백, 조한백

ABSTRACT

Myrrha-induced Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

Jong-Kyu Park, Ok-Hyon Jo, Song-Baeg Kim, Han-Baek Cho

Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose : To address the ability of Myrrha (MY) to induce cell death, we investigated the effect of MY on apoptosis. In human cervical carcinoma HeLa cells, apoptosis occurred following MY exposure in a dose-dependent manner.

Methods : We have tested several kinds of anti-oxidants to investigate the MY-induced apoptotic mechanism. Among the anti-oxidants, N-acetyl cysteine (NAC) or reduced glutathione (GSH) protects MY-induced apoptosis. NAC is an aminothiols and synthetic precursor of intracellular cysteine and GSH. To confirm the role of GSH in MY-induced apoptosis, methionine and cystathionine-glutathione extrusion inhibitors were treated in the presence of MY.

Results : NAC, GSH, methionine or cystathionine led to protective effect against MY-induced apoptosis in HeLa cells. The GSH and GSH-associated reagents regulate MY-induced cytochrome *c* release and the resultant caspase-3 activation. Furthermore, the two specific inhibitors of carrier-mediated GSH extrusion, methionine and cystathionine demonstrate GSH extrusion occurs via a specific mechanism. While decreasing GSH extrusion and protecting against MY-induced apoptosis, methionine and cystathionine failed to exert anti-apoptotic activity in cells previously deprived of GSH.

Conclusion : the target of the protection is indeed GSH extrusion. This shows that the protective effect is achieved by forcing GSH to stay within the cells during apoptogenic treatment. All this evidence indicates the extrusion of GSH precedes and is responsible for the apoptosis, probably by altering the intracellular redox state, thus giving a rationale for the development of redox-dependent apoptosis in MY-treated human cervical carcinoma HeLa cells.

Key Words : Molak (MY), apoptosis, HeLa cells, N-acetyl cysteine (NAC), reduced glutathione (GSH), methionine, cystathionine, GSH extrusion

I. 緒論

자궁경부암은 조기발견 및 치료로 상대적으로 빈도가 점차 감소하는 추세이나 여전히 여성암 중 높은 빈도를 보이는 악성 종양이다. 2002년 한 해 동안 자궁경부암이 우리나라 전체 여성 암의 9.1%로 5위를 차지하며 여성 상피내 암종의 81.3%로 1위를 차지하고 있다¹⁾.

40~49세의 여성들이 질에서 불규칙적인 출혈이 생기거나 성교 후에 질 출혈이 생기거나 질의 배출액이 많아지면 우선 자궁경부암의 가능성을 고려해야 한다²⁾. 자궁경부암의 발생과 이로 인한 사망률을 감소시키기 위해 수술, 방사선 및 화학요법이 시행되고 있다³⁾.

한의학에서 자궁경부암은 癥瘕, 血蠱, 崩漏, 帶下 등의 범주에 속하며^{4,5)} “宿血滯氣 凝結爲癥瘕 腹中痞塊 堅硬作楚 當以破氣藥伐之”라 하여 宿血과 滯氣가 凝結하여 癥瘕가 되고, 腹中の 痞塊가 堅硬하여 아픔을 견디지 못하는데 마땅히 氣를 부수는 藥으로 攻伐한다고 하였다^{6,7)}.

Apoptosis는 necrosis로 인한 세포 죽음과는 다르게 주위 조직에 염증을 일으키지 않으며, 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질내의 칼슘 농도 증가, 염색질의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 사다리 모양의 DNA 분절 형성, transglutaminase의 활성화, 핵의 절단 및 세포고사 소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다⁸⁻¹¹⁾. 정상적인 성인 조직에서는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 apoptosis와 세포의 증식이 상호 작용을 하고 있으며¹²⁾, 종양의 경우에서도 종양의 성장을 조절하기 위하여 apoptosis와 세포의 증식이 상호

작용을 하고 있다¹³⁾. 암세포가 될 가능성이 높은 세포에서 apoptosis의 활성도가 소실되면 癌化 과정에 영향을 미치게 되며, apoptosis의 활성화는 암세포로의 전환을 예방할 수 있게 된다¹⁴⁻¹⁵⁾.

최근 자궁경부암과 apoptosis의 관계를 연구하는 보고¹⁶⁻¹⁸⁾가 많이 있으며 자궁경부암의 apoptosis에 대한 기전 연구도 진행중이다^{3,19,20)}.

沒藥은 沒藥 나무의 樹脂로, 性味가 苦, 平 無毒하고 心·肝·脾로 歸經하며 活血祛瘀, 止痛, 消瘡癰疽 등의 효능을 가지면서 外用藥으로도 활용할 수 있다²¹⁾.

沒藥의 효능은 살균 효과²²⁾, 피부 재생 효과²³⁾, 진통 효과²⁴⁾, 소염 효과²⁵⁾가 보고된 바 있으나 아직까지 活血祛瘀와 消瘡癰疽 등의 효능이 있는 沒藥이 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell에 미치는 영향에 관련된 연구는 없었다.

이 연구에서는 沒藥에 의한 HeLa cell의 apoptosis를 연구하였다. 沒藥에 의한 apoptosis시 free radical scavenger인 NAC 및 GSH의 역할, GSH 특이 억제제인 methionine 및 cystathionine의 역할, GSH 유출의 역할 등을 통해 沒藥에 의한 HeLa cell의 apoptosis 기전을 究明하고자 하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

실험에 사용된 沒藥은 圓光大學校 益山韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 사용하였다.

2) 試藥

Methionine, cystathionine, buthionine sulfoximine, glutathione 및 N-acetyl cysteine(NAC)은 Sigma (St. Louis, Mo,

U.S.A.)에서 구입하였다. Hoechst 33258 dye 역시 Sigma (St. Louis, Mo, U.S.A.)에서 구입하였다. 세포 배양시 필요한 배양액 및 試藥들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, U.S.A.)에서 구입하였다.

3) 檢液製造

沒藥 400 g에 물 4,760 cc를 加하여 3 시간 동안 煎湯한 후 1,560 cc를 추출하였다. 이 沒藥 추출액을 3,000 rpm에서 20분 간 원심분리하고 진공농축기로 減壓, 濃縮한 후 동결건조기에서 동결건조하여 10%의 收率로 건조물 156 g을 얻었다. 이 沒藥 건조물에 滅菌된 증류수를 첨가하여 용해물을 만들어 실험에 사용하였다.

2. 方法

1) 細胞柱培養

人間子宮癌細胞柱인 HeLa cell을 CO₂ 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories) 이 포함된 D-MEM (Gibco BRL)으로 배양하였다. 24시간 주기로 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 沒藥을 처리하여 apoptosis 현상과 이에 연관된 실험을 관찰하였다.

2) Apoptosis 測定

HeLa cell (1 × 10⁶ cells)을 6 cm dish에 배양하였다. 核의 염색을 위하여 沒藥을 24시간 동안 처치한 Hela Cell群과 試藥 처치를 하지 않은 Hela Cell을 Trypsin 처치하여 분리한 다음 100% methanol로 고정하였다. PBS로 3번 세척한 후, Hoechst 33258 dye로 염색하였다. 형광현미경 (Nikon, Tokyo)으로 관찰한 후에 사진을 현상하였다.

3) Caspase 活性度測定

HeLa cell (2 × 10⁶ cells)을 4°C에서 15분 동안 lysing buffer (1% TritonX-100,

0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml aprotinin, 2 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 20,000 g으로 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 bicichonic acid (BCA, Sigma Co., St. Louis, Mo, U.S.A.)방법으로 定量하여 assay buffer (100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석된 형광표식된 기질과 37°C에서 30분간 반응시킨 후, fluorometer로 측정하였다. 이 때의 파장은 excitation wavelength (380 nm)와 emission wavelength (460 nm)를 사용하였다. caspase-3 cysteine protease의 활성측정은 fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin AMC-DEVD (200 µM)를 사용하였으며, 기질의 proteolytic cleavage를 측정함으로써 caspase 활성을 결정하였다.

4) Immunostaining

HeLa cell을 3.7% par-formaldehyde로 고정시킨 후 PBS로 세척한다. PBS-Triton으로 HeLa cell을 permeable한 조건으로 만든 다음, 1%의 bovine serum albumin (BSA)와 2.5%의 fetal bovine serum(FBS)을 PBS-tween(PBS-T)에 넣은 blotto로 blocking 1시간을 실온에서 시행한다. 1차 Ab (anti-cytochrome c)를 blotto에 1:200으로 희석한 후 1시간 동안 실온에서 반응시켜 PBS-T로 3번 세척한다. 2차 Ab (anti-mouse-TRITC)를 1:500으로 희석하여 실온에서 30분 동안 반응시킨다. PBS-T로 3번 세척한 다음 형광현미경하에서 관찰하고 사진 (×100)을 현상하였다.

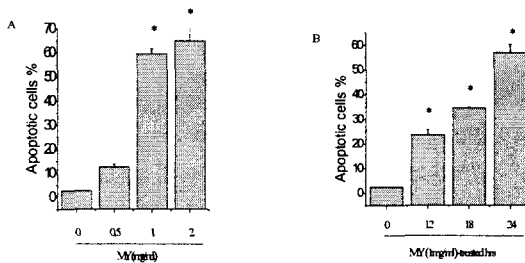
5) 結果算出

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 결과이며 이들의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation, SD)를 산출하여 결과를 표시하였다. 세포 독성을 보이는 값의

비교에 있어서는 Students's t-test를 사용하였으며 $p < 0.01$, 혹은 $p < 0.05$ 수준으로 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 沒藥으로 인한 HeLa cell의 죽음



子宮頸部癌細胞인 HeLa cell에 沒藥을 처리하여 세포 죽음을 야기하는지 여부를 알아보았다. HeLa cell에 沒藥 (0, 0.5, 1 or 2 mg/ml)을 처리시 용량 의존적으로 세포 죽음이 야기됨을 확인하였다 (Fig. 1A). 특히 HeLa cell에 沒藥 (1 mg/ml)을 처리한 24시간 후에 apoptosis의 유발을 확인하였다 (Fig. 1B).

Fig. 1. MY induces death in HeLa cells.

(A) Cells were treated with various concentrations of MY (0, 0.5, 1 and 2 mg/ml) (B) Cells were treated with MY (1 mg/ml) for various incubation periods (0, 12, 18, and 24 hrs). Data were the mean \pm S.E. of three experiments. *Significantly different from control, $P < 0.05$. MY: Myrrha

2. 沒藥으로 인한 HeLa cell의 apoptosis시 free radical scavenger의 역할

HeLa cell에 1 mg/ml의 沒藥을 처리시 유의성 있는 apoptosis를 유발하는 조건에서, 5 mM의 N-acetyl cysteine (NAC)과 5 mM의 reduced glutathione (GSH)을 처리시 HeLa cell에 대한 沒藥의 독성에 유의성 있는 보호 효과를 나타내었다. 이에 반하여 500 U/ml의 catalase, 100 U/ml의 superoxide dismutase (SOD) 및

Manganese superoxide dismutase mimetic agent-Mn-TBAP or Mn-TMyM 50 μ g/ml를 처리시에는 HeLa cell에 대한 沒藥의 독성에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 2A). HeLa cell에서 NAC와 GSH가 沒藥에 의한 apoptosis를 억제함을 다시 한 번 보여주고 있으며, 1 mM와 5 mM 농도의 NAC 및 GSH 처리시 HeLa cell에 대한 沒藥의 독성에 동일한 보호 효과를 유발하였다 (Fig. 2B).

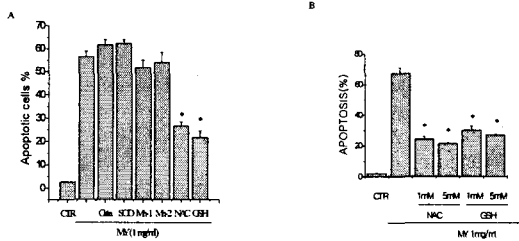


Fig. 2. Glutathione is a major key in MY-induced apoptosis in HeLa cells.

(A) MY (1 mg/ml) was treated in HeLa cells with 500 Unit/ml catalase (Cata), 100 Unit/ml superoxide dismutase (SOD), 50 μ g/ml Mn-TBAP (Mn-1) or 50 μ g/ml Mn-TMyM (Mn-2), 5 mM N-acetyl cysteine (NAC) or 5mM reduced glutathione (GSH) for 24 hrs. (B) MY (1 mg/ml) was treated in HeLa cells with 1 or 5 mM NAC or 1 or 5 mM GSH for 24 hrs. Data were the mean \pm S.E. of three experiments. *Significantly different from control, $P < 0.05$.

3. 沒藥으로 인한 apoptosis시 GSH 유출의 역할

沒藥으로 인한 세포 독성에서 GSH의 중요성을 보여 주는 결과를 바탕으로 GSH 유

출이 하나의 기전이 될 수 있다는 가설하에, GSH 유출의 특이 억제제인 methionine과 cystathionine을 처리함으로 沒藥으로 인한 apoptosis에 미치는 영향을 알아보았다²⁶⁻²⁹⁾. HeLa cell에 1 mM의 Methionine과 1 mM의 cystathionine을 처리시, 5 mM의 GSH를

처리할 때와 동일한 보호 효과를 관찰하였다. HeLa cell에서 1 mg/ml의 沒藥을 처리했을 때와 2 mg/ml의 沒藥을 처리했을 때 모두 GSH, methionine, cystathionine에 의해 沒藥으로 인한 apoptosis가 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 3).

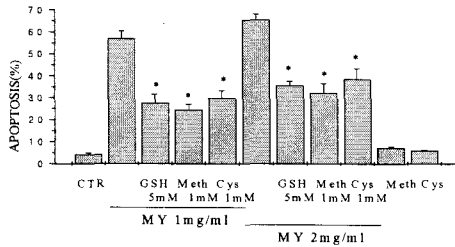


Fig. 3. GSH extrusion has an important role in GSH-associated apoptotic mechanism. (A) MY (1 and 2 mg/ml) was treated in HeLa cells with 5 mM GSH, 1 mM methionine or 1 mM cystathionine for 24 hrs. *Significantly different from control, P < 0.05.

4. 沒藥으로 인한 caspase cysteine protease 활성화시 GSH의 관련성

沒藥으로 인한 caspase cysteine protease 활성화시 GSH의 관련성을 알아보기 위하여 caspase-3의 활성화도와 cytochrome c의 유리에 대해 알아보았다. HeLa cell에서 24시간 동안 5 mM의 GSH, 1 mM의 methionine 및 1 mM의

cystathionine을 처리하면 沒藥 (1 and 2 mg/ml)으로 인한 caspase-3의 활성화 증가가 억제됨을 보여주었다 (Fig. 4A). 또한 HeLa cell에서 5 mM의 NAC, 5 mM의 GSH, 1 mM의 methionine 및 1 mM의 cystathionine의 沒藥으로 인한 cytochrome c 유리 억제를 제시하였다 (Fig. 4B).

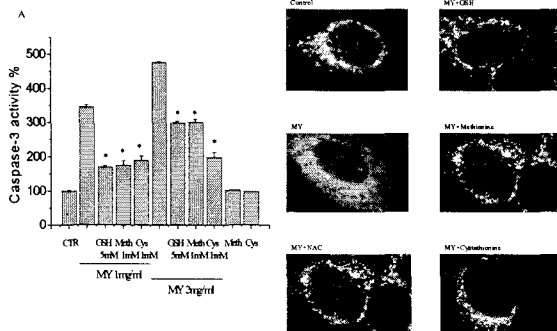


Fig. 4. Cytochrome c and the resultant caspase-3 are regulated in the presence of GSH extrusion inhibitors.

MY (1 and 2 mg/ml) was treated in HeLa cells with 5 mM reduced glutathione (GSH), 1 mM methionine, 1 mM cystathionine for 24 hrs. *Significantly different from MY-treated, P < 0.05.

5. 沒藥으로 인한 GSH 유출시 methionine과 cystathionine의 역할

HeLa cell의 沒藥으로 인한 apoptosis

에서 GSH의 유출이 관여하고 있음을 보여주고 있으므로 실제 沒藥 처리시 배양액내로 GSH가 유리되고 있는지를 알아

보았다³⁰⁻³²). HeLa cell에 沒藥 (1 and 2 mg/ml)을 처리한 24시간 후 5 mM의 GSH 유무에 따른 cell lysate내의 GSH의 양을 측정하였다. 이로써 HeLa cell의 cell lysate에서 沒藥에 의한 GSH의 고갈을 관찰하였다 (Fig. 5A). 역시 24시간 동안 HeLa cell에 沒藥 (1 and 2 mg/ml)을 처리한 후 5 mM의 GSH 유무에 따른 배양액내에 존재하는 GSH의 양을 측정하였다. 이것으로 HeLa cell에서 沒藥으

로 인해 배양액내로 GSH가 유출됨을 관찰하였다 (Fig. 5B). HeLa cell에 沒藥 (1 mg/ml)을 처리한 후 1 mM의 methionine과 1 mM의 cystathionine의 유무에 따른 배양액내에 존재하는 GSH의 양을 측정하였다. 이로써 HeLa cell에서 沒藥으로 인해 배양액내로 GSH가 유출되는 것이 methionine과 cystathionine에 의해 억제됨을 보여주었다 (Fig. 5C).

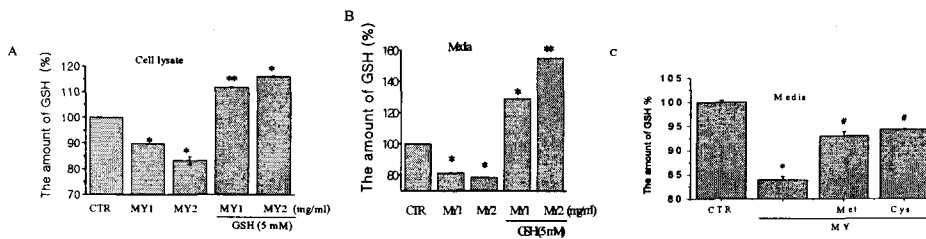


Fig. 5. Glutathione is extruded in the presence of MY.

MY (1 and 2 mg/ml) was treated in HeLa cells with or without 5 mM GSH for 24 hrs. In both the cell lysates (A) and the media (B). HeLa cells were treated with MY (1 mg/ml) in the presence or absence of 1 mM methionine or 1 mM cystathionine (C). *Significantly different from control, $P < 0.05$. #Significantly different from MY-treated, $P < 0.05$.

6. 沒藥으로 인한 apoptosis시 GSH 고갈의 효과

HeLa cell의 沒藥으로 인한 apoptosis시 GSH 고갈의 효과를 알아보기 위해 먼저 GSH depleting agent인 BSO (Buthionine sulfoximine) 100 μ M, 200 μ M을 24시간 전처리하여 세포내의 GSH를 고갈시켰다³³⁻³⁴). BSO에 의해 GSH가 고갈된 HeLa cell에 沒藥 (1 mg/ml)의

처리 여부에 따른 차이를 관찰하였다. GSH가 고갈된 HeLa cell에 沒藥 (1 mg/ml)을 12시간 동안 처리하였을 때 HeLa cell의 沒藥에 의한 apoptosis에 있어 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 6A). 보다 상세한 결과를 제시하기 위하여 HeLa cell의 沒藥에 의한 apoptosis를 24시간, 36시간 동안 관찰하였다 (Fig. 6B).

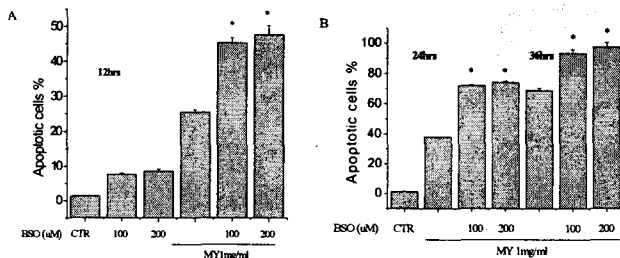


Fig. 6. The deprivation of GSH leads to severe apoptosis in HeLa cells.

The cells were treated with or without 1 mg/ml MY under the pretreated BSO (100 or 200 μ M) for 12 (A) or 24 and 36 hrs (B). *Significantly different from MY-treated, $P < 0.05$.

7. GSH가 고갈된 상태에서 沒藥으로 인한 apoptosis시 GSH 유출 억제제의 효과

沒藥을 처리하기 전에 세포내 GSH level을 매우 낮게 한 상태에서, GSH 유출 억제제인 methionine과 cystathionine을 처리시 沒藥에 의한 GSH 유출이 보호될 수 있는지를 알아보았다. HeLa cell

에 沒藥을 처리하기 전에 100 uM의 BSO로 24시간 전처리하여 세포내의 GSH를 고갈시켰다. GSH가 고갈된 HeLa cell을 24시간 동안 沒藥 1 mg/ml으로 처리하여 methionine 1 mM이나 cystathionine 1 mM의 유무에 따른 HeLa cell의 沒藥에 의한 apoptosis를 관찰하였다 (Fig. 7).

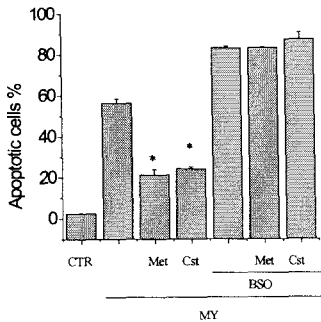


Fig. 7. The inhibition of GSH extrusion has no effect on GSH-depletion-increased apoptosis in HeLa cells.

The cells were pretreated with 100 uM BSO for 24 hrs and then the cells were washed with culture media. The cells were treated with 1 mg/ml MY in the presence or absence of 1 mM methionine or 1 mM cystathionine for 24 hrs. *Significantly different from MY-treated, P < 0.05.

IV. 考察

자궁경부암은 조기 진단과 치료가 가능한 대표적인 질환이다¹⁶⁾. 자궁경부암은 점차 빈도가 감소하고 있는데, 그 원인은 규칙적인 암검진으로 인하여 암으로 진행되기 전단계인 자궁경부 상피이형성증과 상피내암에서 발견되어 치료하는 경우가 상대적으로 증가하기 때문인 것으로 보고 있다. 여성의 주요 부위별 암등록 건수 추이의 그래프를 보면 암의 전단계인 자궁경부의 상피내암을 포함한 경우에는 자궁경부암이 여성의 암에서 1위를 차지하지만 상피내암을 제외시킨 자궁경부암은 5위를 차지하고 있음을 볼 수 있다. 그러나 암 통계에 등록되지 않는 자궁경부 상피이형성증까지 포함한다면 아직도 가장 중요한 여성암이다. 또한 전에는 자궁암의 거의 90% 이상이 자궁

경부암이었으나 근간에는 자궁체부암의 발생 빈도가 높아지고 자궁경부암의 빈도는 낮아지고 있다. 현재는 자궁경부암과 자궁체부의 비율이 약 5 : 1의 비율을 나타내고 있다¹⁾.

한의학에서 자궁경부암은 癥瘕, 血蠱, 崩漏, 帶下 등의 범주에 속한다⁴⁻⁵⁾. 積聚는 복강내에 발생하는 有形的인 病變을 通稱하는데 그 性狀과 원인 및 형태에 따라서 癥瘕, 痰癖, 腸覃, 痞塊, 血蠱 등의 기타 병명으로 다양하게 문헌에 수록되어 있다³⁵⁾. 東醫寶鑑에서 癥瘕痰癖證治는 “治法同積聚”라 하여 治法은 積聚와 같다고 하였고 積聚治法은 “宿血滯氣 凝結爲癥瘕 腹中痞塊 堅硬作楚 當以破氣藥伐之”라 하여 宿血과 滯氣가 凝結하여 癥瘕가 되고, 腹中の 痞塊가 堅硬하여 아픔을 견디지 못하는데 마땅히 氣를 부수는 藥으로 攻伐한다고 하였다⁶⁻⁷⁾.

Apoptosis는 세포수를 조절하는 과정

에서 유사분열(mitosis)에 반대되는 개념이다. 비슷한 개념으로 계획된 세포사망(programmed cell death)이 있는데 넓은 의미에서 계획된 세포 사망은 apoptosis의 일종으로 주로 생리적인 현상으로 생체에서 일어나는 경우에 한하여 사용하고, 생리적이거나 병적 자극이나 신생물에 의해서 일어나는 특이한 세포 사망 형태는 모두 apoptosis라고 한다. Apoptosis의 세포사망 형태는 necrosis로 인한 세포사망과 대조적으로 주위 조직에 염증을 일으키지 않으며, 특이한 형태로 세포사망을 한다^{8-10,36}. 수동적인 사고사(accidental death)인 necrosis와는 달리 apoptosis는 자연사(natural death)로서, 능동적이면서 자발적인 사망기전이다³⁶⁻³⁷.

沒藥은 橄欖科(감람나무과: Burseraceae)에 속한 低矮灌木 혹은 喬木인 몰약나무와 애룬모 몰약나무의 幹枝에서 얻은 樹脂로, 性味が 苦, 平 無毒하고 心·肝·脾로 歸經하며 그 效能은 內服하면 活血祛瘀, 止痛, 消瘡癰疽하고 外用하면 消腫生肌한다. 沒藥의 主治에 대해 日華子本草는 “破癥結宿血 消腫毒”, 本草綱目은 “散血消腫 定痛生肌 沒藥敗血 能止痛 消腫 生肌”, 本草述은 “久服舒筋膜 通血脈”, 本草衍義는 “大概通滯血”, 海藥本草는 “推陳置新 能生好血”, 藥性本草는 “心腹血瘀 筋骨疼痛 痛不可忍”라 하였다²¹.

沒藥의 효능에 대한 논문으로 식중독 미생물 증식 억제 효과와 살균 효과²², 화상에 대한 피부재생 및 치유 효과²³, 藥鍼에 의한 진통 효과²⁴, 沒藥 등의 추출물이 함유된 치약의 소염 효과²⁵가 보고되었다.

이에 저자는 “破癥結宿血” 하는 沒藥을 “宿血滯氣 凝結爲癥瘕 腹中痞塊 堅硬作楚 當以破氣藥伐之”의 積聚治法으로 子宮頸部癌治療에 응용할 수 있다고 思料하

여 沒藥이 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 apoptosis에 미치는 影響을 알아보고자 하였다.

子宮頸部癌細胞인 HeLa cell에 沒藥을 처리한 결과 농도 및 시간 의존적으로 세포 독성을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 1A, 1B). 또한 沒藥을 처리한지 24시간 후에 형태학적 변화에 의해 apoptosis 유발을 확인할 수 있었다. 일반적으로 심각한 상해를 입었을 경우에 나타나는 necrosis는 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반한다. 반면에 apoptosis는 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질내의 칼슘 농도 증가, 염색질의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 사다리 모양의 DNA 분절 형성, transglutaminase의 활성화, 핵의 절단 및 세포고사 소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다^{8-10,36}.

산소 유리기(oxygen free radical)는 산소를 이용하여 생존하는 세포 내에서 생성되는 독성이 강한 물질로서, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS), 산소 라디칼(oxygen radicals)이라고도 한다³⁸. Superoxide radical($\cdot\text{O}_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$) 등이 있으며³⁹⁻⁴⁰ 세포의 DNA나 세포막 지질 및 단백질 등을 손상시켜서 세포 손상을 초래할 수 있는데, 산화적 세포 손상은 동맥경화증, 퇴행성 관절염 등 여러 가지 퇴행성 질환이나 암 및 노화에도 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁴¹⁻⁴². 이러한 산화 과정을 예방하거나 지연시키는 물질을 항산화제(antioxidants)라고 한다. 세포 내에서는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSHPX) 등의 항산화효소와 glutathione, uric acid 등의 여러가지 비효소적 항산화물질이 있

다. 이들은 산화촉진물질(pro-oxidants)을 제거하는 scavenger 역할을 하여 산소 유리기에 의한 산화적 손상으로부터 각종 세포 구조물을 보호한다⁴³⁾. 인체 내에서 glutathione은 환원형 glutathione(GSH)와 산화형 glutathione(GSSG)의 두 가지 형태로 균형을 이루면서 존재하게 된다. 만약 세포내에 독성 또는 산화적 손상이 일어난 경우에는 GSSG가 서서히 증가하게 되어 GSH/GSSG의 불균형을 초래하게 되어 방어기전으로서의 역할이 소실된다. GSH는 산소 유리기에 의한 세포 손상을 방지하고 세포내 해독 작용을 담당하는 중요한 물질로 여겨지고 있다⁴⁴⁾. NAC(N-acetyl cysteine)는 aminothiolor서 세포내 cystein의 합성 전구체로서 GSH와 동일한 기능을 한다고 간주되어 왔다⁴⁵⁾. 沒藥으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 다양한 Free radical scavenger 중에서도 NAC와 GSH 처치시에만 沒藥에 대한 보호 효과를 나타냈다 (Fig. 2). 본 결과로 沒藥으로 인한 세포 독성은 세포내의 GSH level의 감소로 추정하여 볼 수 있다⁴⁶⁾.

沒藥의 세포 독성이 세포내 GSH level의 감소와 관련이 있음을 확인하기 위해 GSH 유출의 특이 억제제인 methionine과 cystathionine을 처리함으로 沒藥으로 인한 apoptosis에 미치는 영향을 알아보았다²⁶⁻²⁹⁾. Methionine과 cystathionine 처리시 NAC 및 GSH와 동일한 보호 효과를 관찰하였다 (Fig. 3). Glutathione 등과 더불어 합황아미노산인 methionine의 항산화 역할이 보고되고 있다⁴⁷⁻⁴⁹⁾. Tak²⁶⁾ 등은 methionine이 glutathione의 생합성을 항진시킬 뿐만 아니라 glutathione의 유출을 방지하여 세포내 glutathione의 높은 농도를 유지하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

Apoptosis의 신호 전달 기전으로는 세포막 단백질을 통한 신호 전달 체계와 미토콘드리아를 통한 신호 전달 체계로 나누어진다. 세포막 단백질을 통한 신호 전달 체계는 Fas와 같은 세포막 단백질이 caspase-8 protease을 활성화시켜 활성화된 caspase-8에 의해 미토콘드리아에서 cytochrome *c*가 방출되어 apoptosis를 유도한다⁵⁰⁾. 미토콘드리아를 통한 신호 전달계는 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어지는 cytochrome *c*가 apoptotic protease factor-1 (Apaf-1)과 결합하여 procaspase-9 protease를 활성화 형태로 전환시키고, 또한 하부의 caspase-3 protease를 활성화시켜 apoptosis를 유도한다⁵¹⁾. Caspase-3는 protease cascade의 하방에 위치하여 여러 apoptosis 경로가 공통으로 통과하는 중요한 경로로 apoptosis에 필수적이다⁵²⁾. HeLa cell에서 GSH, methionine과 cystathionine을 처치시 沒藥으로 인한 caspase-3 활성화증가 억제 (Fig. 4A)와 NAC, GSH, methionine, cystathionine의 cytochrome *c* 유리 억제 (Fig. 4B)를 통해 HeLa cell에 대한 沒藥의 apoptosis가 mitochondria와 관련된 기전임을 알 수 있었다.

HeLa cell의 沒藥으로 인한 apoptosis에서 GSH의 유출이 관여하므로 실제 沒藥 처리시 배양액내로 GSH가 유리 되는지를 알아보았다^{32,53-54)}. 沒藥 처리 24시간 후 cell lysate내의 GSH양이 고갈되었으며 (Fig. 5A) 배양액내로도 유리되었다 (Fig. 5B). GSH 유출 억제제인 methionine과 cystathionine을 처리시 GSH의 배양액내로의 유출이 억제됨을 보여주었다 (Fig. 5C).

Glutathione의 약물에 대한 영향을 관찰하기 위해서 세포내 glutathione량을 변화시키는 경우가 있는데, 실험적으로 세포

내 glutathione량을 저하시키는 방법으로 glutathione 합성효소 억제제인 BSO가 많이 이용된다⁵⁵⁻⁵⁶. GSH 고갈 상태에서 沒藥을 처리하였을 때 apoptosis에 있어 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 6).

沒藥 처리전에 세포내 GSH level을 매우 낮게 하여 methionine과 cystathionine을 처리하면 沒藥에 대한 보호 효과가 나타나지 않았다 (Fig. 7). 이는 沒藥의 apoptosis는 세포내 GSH level이 이미 매우 낮은 상태에서는 GSH 유출 억제는 이미 소용이 없음을 시사한다. 이러한 결과들은 沒藥의 apoptosis 기전으로 GSH가 세포내에서 세포외로 배출됨으로써 발생되어짐을 제시할 수 있다⁵⁷.

이상의 실험 결과를 정리하면 沒藥은 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell의 apoptosis를 유도하였으며, 그 과정에서 沒藥에 의한 apoptosis시 free radical scavenger인 NAC 및 GSH가 HeLa cell에 대한 沒藥의 세포 독성에 보호 효과를 나타냈다. GSH 특이 억제제인 methionine 및 cystathionine도 GSH와 마찬가지로 HeLa cell에 대한 沒藥의 세포 독성에 보호 효과를 보였다. GSH, methionine, cystathionine 등은 caspase-3의 활성 증가와 cytochrome c의 유리 억제를 통해 HeLa cell에 대한 沒藥의 apoptosis가 mitochondria와 관련된 기전임을 알 수 있었다. GSH가 고갈된 상태에서 HeLa cell에 대한 沒藥의 apoptosis는 증가하였고, 이 상태에서 GSH 유출 억제는 HeLa cell에 대한 沒藥의 세포 독성에 영향을 미치지 못했다. 이로써 HeLa cell에 대한 沒藥의 apoptosis는 GSH가 세포내에서 세포외로 배출됨으로써 발생되어짐을 알 수 있었다.

V. 結 論

子宮頸部癌細胞인 HeLa cell에서 沒藥으로 인한 apoptosis를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HeLa cell에 沒藥을 처리시 용량 의존적으로 세포 죽음이 야기됨을 확인하였다.
2. HeLa cell에 沒藥을 처리시 유의성 있는 apoptosis 유발의 조건에서 N-acetyl cysteine (NAC)과 reduced glutathione (GSH) 처리시에 유의성 있는 보호 효과를 나타내었다.
3. HeLa cell에 대한 沒藥의 세포 독성은 GSH 유출 억제제인 methionine과 cystathionine 처리시 GSH와 동일한 보호 효과를 관찰하였다.
4. HeLa cell에 GSH, methionine, cystathionine을 처리시 沒藥으로 인한 caspase-3 활성증가 억제가 나타났다. NAC, GSH, methionine, cystathionine을 처리시 cytochrome c 유리 억제가 나타났다.
5. HeLa cell에 沒藥 처리 24시간 후 cell lysate내의 GSH양이 고갈되었음을 제시하였고, 배양액내로의 GSH 유리 역시 보여주었다. methionine과 cystathionine이 沒藥으로 인한 GSH 유출을 억제함을 보여주었다.
6. HeLa cell에 GSH가 고갈된 상태에서 沒藥을 처리하였을 때 apoptosis에 있어 유의성 있는 증가를 보여주었다.
7. HeLa cell에 沒藥을 처리하기 전에 세포내 GSH level을 매우 낮게 하면 methionine과 cystathionine을 처리해도 沒藥의 세포 독성은 보호되지 않음을 보여주었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 沒藥은 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 apoptosis를 유도하였으며, 그 과정에서 GSH가 세포내에서 세포외로 배출됨으로써 mitochondria를 통한 신호 전달이 이루어져 沒藥으로 인한 apoptosis가 발생되어짐을 알 수 있었다.

- 투 고 일 : 2005년 10월 28일
- 심 사 일 : 2005년 11월 01일
- 심사완료일 : 2005년 11월 10일

參考文獻

1. 한국 중앙 암등록 본부, 한국 중앙 암등록 사업 연례보고서(2002. 1~2002.12), 보건복지부, 2003.
2. 김갑성 등, 實用東西醫學臨床叢書 8 권, 서울: 정담, 2001; 104.
3. 안태규 등, 배양 자궁경부암 세포주에서 Cis-platinum의 세포독성에 대한 Glutathione의 영향, 대한산부인과학회지, 2002; 45(8); 1289-1293.
4. 문구 등, 암 동서의 결합 치료. 익산: 원광대학교출판국, 1999; 379-421.
5. 최승훈, 동의 종양학, 서울: 행림출판사, 1995; 229-34.
6. 허준, 원본 동의보감, 서울: 南山堂, 2001; 489-90.
7. 허준, 국역증보 동의보감, 서울: 南山堂, 1998; 747, 750.
8. Cohen JJ., Apoptosis. Immunol Today, 1993; 14; 126-130.
9. Wyllie AH, Kerr JF., Cell death, the significance of apoptosis. Int Rev Cytol, 1980; 68; 251-306.
10. Searle F, Kerr JF., Necrosis and apoptosis, distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol Annu, 1982; 12, 229-259.
11. Sutherland RL, Brandon MR, Effect of ionic strength and ionic composition of assay buffers on the interaction of thyroxine with plasma proteins. Endocrinol, 1975; 66, 319-327.
12. Thompson CB., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science(Washington DC), 1995; 267; 1456-1462.
13. Kihara SI. et al., A comparative study of apoptosis and cell proliferation in infantile and adult fibrosarcoma. Am J Clin Pathol, 1996; 106; 493-497.
14. Harrington EA. et al, Oncogens and cell death. Curr Opin Genet Dev, 1994; 4; 120-129.
15. Bedi A. et al, Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. Cancer Research, 1995; 55; 1811-1816.
16. 최규연 등, 자궁경부암의 발암과정에서 아포토시스의 역할, 대한부인종양종콜포스키회학회지, 1997; 8(3); 250-257.
17. 이창환 등, 자궁경부종양과 Apoptosis와의 상관 관계, 대한산부인과학회지, 1999; 42(2); 369-375.
18. 김태진 등, 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성, 대한부인종양종콜포스키회학회지, 1999; 10(2); 138-147.
19. 김병륜 등, 자궁경부암의 Chemotherapeutic Response를 증가시키는 Baicalin Hudrate의 세포 내 신호전달 기전, 대한산부인과학회지, 2003; 46(10); 1965-1974.
20. 조영신 등, 자궁경부암 세포주에서 ci

- splatin의 세포독성에 미치는 glutathione 투여 시간의 효과, 대한산부회지, 2004; 47(1); 161-165.
21. 신민교, 臨床本草學, 서울: 永林社, 1997; 485, 536, 553, 555, 847, 853, 516-7, 720-2.
 22. 한지숙 등, 몰약(Commiphora molmol Engl.)의 식중독 미생물 증식 억제 물질의 구조동정 및 식품적용, 한국식품과학회지, 2001; 33(4); 401-408.
 23. 남성우 등, 특정전자과 조사와 몰약의 도포에 의한 화상 피부의 치유 촉진효과, 대한본초학회지, 2003; 18(4); 263-268.
 24. 안춘재 등, 玄胡索, 乳香 및 沒藥藥鍼刺戟이 鎮痛效果에 미치는 影響, 대한침구학회지, 1994; 11(1); 145-158.
 25. 강인구 등, 녹차, 몰약, 상백피, 승마추출물을 함유한 치약의 임상 및 미생물학적 효과에 관한 연구, 대한치주과학회지, 1991; 21(1); 173.
 26. Reed DJ., Glutathione, toxicological implication. Annu Rev Biochem, 1990; 52; 711-760.
 27. Aw TY. et al, Inhibition of glutathione efflux from isolated rat hepatocytes by methionine. J Biol Chem, 1984; 259; 9355-9358.
 28. Iu SC. et al, Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells. J Clin Invest, 1996; 97; 1488-1496.
 29. Chow SC. et al, Reevaluation of the role of de novo protein synthesis in rat thymocytes apoptosis. Exp Cell Res, 1995; 216; 149-159.
 30. Ghibelli L. et al, Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. Biochem Biophys Res Commun, 1995; 216; 313-320.
 31. Kane DJ. et al, Bcl-2 inhibition of neuronal death, decreased generation of reactive oxygen species. Science 262, 1274-1277, 1993.
 32. Slater AFC. et al, Nitron spin traps and a nitroxide antioxidant inhibits a common pathway of thymocyte apoptosis. Biochem J, 1995; 306; 771-778.
 33. Honda T. et al, GSH depletion enhances adenoviral bax-induced apoptotic lung cancer cells. Cancer Gene Ther, 2004; 11; 249-255.
 34. Bass R. et al, A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. J Biol Chem, 2004; 279(7); 5257-5262.
 35. 최종백, 積聚에 관한 文獻的 考察, 동서의학, 1993; 18(3); 5-29.
 36. Kerr JF. et al, Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972; 26; 239-257.
 37. Barr PJ, Tomei LD., Apoptosis and its role in human disease. Bio Technol, 1994; 12; 487-93.
 38. Fridovich I., Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys, 1986; 247; 1-15.
 39. Chandra J. et al, Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic Biol Med, 2000; 2

- 9; 323-333.
40. Buttke TM, Sandstrom PA., Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 1994; 15; 7-10.
 41. Hasan HM, Fridovich I., Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch Biochem Biophys*, 1979; 196; 385-395.
 42. Proctor PH., Free radicals and human disease, CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine. vol 1. Florida. Niquel J. Quintanilha AT. Weber H. CRC Press, 1989; 209-222.
 43. Potischman N, Brinton LA., Nutrition and cervical neoplasia. *Cancer Causes Control*, 1996; 7; 113-126.
 44. Anderson ME., Glutathione, an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*, 1998; 24; 1-14.
 45. Meister A, Anderson ME., Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 1983; 52, 711-760.
 46. Ghibelli L. et al, Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J*, 1998; 12; 479-486.
 47. Tappel AL., Biological antioxidant protection against lipid preoxidation damage. *Am J Clin Nutr*, 1970; 23; 1137.
 48. Dean G. et al, protection against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in the rat by dietary Vitamin E, Selenium, Methionine as measured by Ethan evolution. *J Nutr*, 1977; 107, 656.
 49. Mitchell JR. et al, Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther*, 1973; 187, 211.
 50. Scott H. et al, induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Experimental Cell Research*, 2000; 256; 42-49.
 51. Desagher S, Martinou JC., Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol Sep*, 2000; 10(9); 369-377.
 52. 김병륜 등, 자궁경부암의 Chemotherapeutic Response를 증가시키는 Baicalin Hydrochlorate의 세포 내 신호전달 기전, *대한산부회지*, 2003; 46(10); 1965-1974.
 53. Ghibelli L. et al, Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; 216; 313-320.
 54. Kane DJ. et al, Bcl-2 inhibition of neuronal death, decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 1993; 262; 1274-1277.
 55. Kartalou M, Essigmann JM., Mechanism of resistance to cisplatin. *Mutat Res*, 2001; 478; 23-43.
 56. Bass R. et al, A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem*, 2004; 279(7); 5257-5262.
 57. Liuzzi F. et al, Rescue of cells from apoptosis by anti-oxidants occurs d

ownstream from GSH extrusion. A
nn N Y Acad Sci, 2003; 1010; 441-4
45.