

## 桃核承氣湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)의 apoptosis에 미치는 影響

圓光大學校 韓醫科大學 婦人科敎室  
강용구, 안규환, 공복철, 김송백, 조한백

### ABSTRACT

#### *Dohaekseungkitang* extract induced apoptosis in Human Cervical carcinoma HeLa cells

Yong-Goo Kang, Kyu-Hwan Ahn, Bok-Cheul Kong  
Song-Baeg Kim, Han-Baek Cho

Dept. of gynecology, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University.

**Purpose** : To address the ability of *Dohaekseungkitang* (DST: a commonly used herb formulation in Korea, Japan and China to have anti-cancer effect on cervical carcinoma), we investigated the effects of DST on programmed cell death (apoptosis) in HeLa human cervical carcinoma cells.

**Methods** : We cultured HeLa cell which is human cervix carcinoma cell in D-MEM included 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories) below 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Then we observed apoptosis of log phase cell which is changed cultivation liquid 24 Hours periodically.

**Results** : After the treatment of DST for 48 hours, apoptosis occurred in a dose-dependent manner. In this study, we have shown that *DST* induces calpain and the associated caspase-8 and -9 activations. Apoptosis was prevented by pre-incubation of the cells with the calcium chelator-BAPTA-AM, calcium channel blocker-Nifedipine or Ryonidine agonist-Ryonidine peptide, implicating calcium in the apoptotic process. Ubiquitous calpains ( $\mu$ - and  $m$ -calpain) have been repeatedly implicated in apoptosis, especially in calcium-related apoptosis. However this study showed that either calpain inhibitor-calpastatin or caspase-3 inhibitor-DEVD- did not block the herb formulation-induced apoptosis in HeLa human cervical carcinoma cells. *DST* initiates a cell death pathway that is partially dependent of caspases. *DST*-induced apoptosis requires caspase-independent mechanism.

**Conclusion** : We conclude that *DST*-induced calpain activation triggers the intrinsic apoptotic pathway in which caspase-independent mechanism is also involved.

**Key Words** : *Dohaekseungkitang* (DST), apoptosis, HeLa cells

## I. 緒 論

桃核承氣湯은 漢代에 著述된 張<sup>1)</sup>의 《傷寒論》에 最初로 收載된 이래, 여러 文獻에 記載되어 下焦의 蓄血로 인한 小腹急痛, 譫語煩渴, 血瘀經閉, 痛經 등의 證候를 治療하는데 使用되어온 處方으로<sup>2)</sup>, 이후 歷代醫家들에 의해 下焦의 瘀血 積聚나 癥瘕의 治方에 많이 使用되어 왔다<sup>3)</sup>.

積聚는 腹腔內에 發生하는 病變을 通稱하는데 그 性狀과 原因 및 形態에 따라 癥瘕, 腸覃, 痞塊, 血蠱 등의 病名으로 多樣하게 文獻에 收錄되고 있다<sup>4)</sup>.

積聚중 癥瘕는 女性的 生殖器에 好發하는 腫塊로서 腹中積塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉、切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛極盛하는 症狀을 나타내는 婦人科疾患이며 西洋醫學的으로는 子宮頸部癌, 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 卵管癌, 卵巢癌, 絨毛上皮癌 등이 包含된다<sup>5,6)</sup>.

子宮頸部癌은 國內에서 發生하는 女性癌중 5위의 빈도를 보인다<sup>7)</sup>. 2003년 부인암 등록사업 조사 보고서에 의하면 우리나라에서 연간 4,000명의 子宮頸部癌 新患이 報告되고 있다<sup>8)</sup>.

子宮頸部癌 患者의 일반적인 症狀으로는 陰出血, 특히 閉經 후나 性交 후 간헐적인 陰出血, 惡臭가 나는 陰分泌物, 骨盤痛, 腰痛, 尿路症狀, 疲勞感, 體重減少 등이 있다<sup>9)</sup>. 子宮頸部癌 患者의 治療法으로는 手術적 治療, 방사선治療, 보조적 항암화학치료 또는 이들을 혼합한 治療방법 등이 이용되고 있으며, 어떤 治療방법이든 治療받은 患者의 5년 생존율로 治療 結果를 평가하게 되는데,

현재까지 우리나라는 子宮頸部癌의 빈도가 높음에도 불구하고 5년 생존율에 대한 통계가 많지 않은 실정이다<sup>10)</sup>.

최근에 子宮頸部癌의 發生과 治療 연구에서 藥物 투여에 의한 細胞枯死의 活性度가 활발히 연구되고 있으며, 鄭은<sup>11)</sup> 蓬莪朮丸, 李<sup>12)</sup>는 歸朮破癥湯, 高<sup>13)</sup>는 加味桂枝茯苓丸, 朴<sup>14)</sup>은 濟川煎, 金<sup>15)</sup>은 香稜丸, 嚴<sup>16)</sup>은 馬齒莧이 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 增殖을 抑制하는 效果를 나타낸다고 각각 報告한 바 있으나, 桃核承氣湯에 대한 研究는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 著者는 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell에 桃核承氣湯을 投與하여, HeLa cell의 生存度와 細胞枯死와 관련된 caspase-3 및 calpain 活性度 등을 관찰하여 桃核承氣湯이 HeLa cell 에 미치는 抗癌效果에 대한 有意性있는 效果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

#### 1) 材料

實驗에 使用된 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 益山韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였으며, 處方內容과 分量은 《方藥合編》<sup>17)</sup>에 準하였고, 한貼의 分量은 (Table I)과 같다.

Table 1. Components of *Dohaekseungkitang(DST)*

韓藥名	生藥名	重量(g)
桃仁	PERSICAE SEMEN	4
大黃	RHEI RHIZOMA	12
桂枝	CINNAMOMI RAMULUS	8
芒硝	NATRII SULFAS	8
甘草	GLYCYRRHIZAE RADIX	4
Total amount		36

2) 試藥

Nifedipine, BAPTA-AM, Calphastatin 은 Sigma에서 구입하였다. 細胞培養時 필요한 培養液 및 試藥들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다.

2. 檢液의 調製

桃核承氣湯 6貼 分量 총 216g을 증류수 4,760cc를 가하여 3시간 동안 電熱器로 煎湯한 후 1960cc를 抽出하여 3,000rpm에서 20분간 遠心分離하고 진공농축기로 減壓, 濃縮한 후 凍結乾燥器에서 凍結乾燥하여 10%의 收率로 凍結乾燥物 196g을 製造하였다. 이 건조물에 滅菌된 蒸溜水를 첨가, 溶解物을 만들어 實驗에 使用하였다.

3. 實驗방법

1) 細胞柱 培養

사람 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa-cell을 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 狀況에서 10%fetal bovine serum (Hyclone Laboratories)이 包含된 D-MEM (Gibco BRL)에서 培養하는 동안 약 24시간 週기로 培養液을 交替하여 주며 log phase에 있는 細胞에 桃核承氣湯을 처리하여 apoptosis 現象을 觀察하였다.

2) 細胞形態 觀察

HeLa cell( $1 \times 10^5$  cells)을 slide chamber dish에 培養하였다. 核의 染色을 위하여 桃核承氣湯을 24시간 處置한 HeLa cell群과 試藥處置를 하지 않은 HeLa cell을 3.7% para-formaldehyde로 固定하였다. PBS로 3번 洗滌한 後, Crystal Violet dye로 染色하였다. 螢光顯微鏡(Nikon, Tokyo)으로 觀察한 後,

사진을 현상( $\times 100$ )하였다.

3) Apoptosis 測定

HeLa cell ( $1 \times 10^6$  cells)을 6cm dish에 배양하였다. 核의 染色을 위하여 桃核承氣湯을 48시간 처리한 HeLa cell群과 試藥處置를 하지 않은 HeLa cell을 Trypsin處置하여 분리 100% methanol로 固定하였다. PBS로 3번 washing한 後, Hoechst 33258 dye로 染色하여 核의 分節, 凝縮 등이 일어난 細胞를 apoptosis가 일어난 細胞로 看做하였으며 螢光顯微鏡(Nikon, Tokyo)으로 觀察한 後 사진을 현상하였다.

4) Caspase 및 Calpain protease 活性度 測定

HeLa cell( $2 \times 10^6$  cells)을 4°C에서 15분 동안 lysing buffer (1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml aprotinin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 溶解하고 20,000xg로 15분 동안 遠心分離시켰다. 遠心分離하여 얻은 上層液은 BCA (Bicichonic acid, Sigma, St. Louis) 方法으로 定量하여 assay buffer (100mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH 7.5, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml aprotinin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 2mM DTT)에 稀釋된 螢光標識된 機質과 37°C에서 30분간 反應시킨 後, fluorometer로 測定하였다. 이 때의 波長은 caspase-3와 calpain의 경우 excitation wavelength (380nm)와 emission wavelength (460nm)를 使用하였다. Caspase-8과 caspase-9의 경우, excitation (400nm) 와 emission(505 nm)wave length을 使用하였다. 機質은

caspase-3 cysteine protease의 경우, fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin AMC-DEVD (200 $\mu$ M), caspase-8과 -9은 각각 AFC-VEID, AFC-LEHD (각각 200 $\mu$ M)를 사용하였으며 calpain의 경우는 fluorogenic substrate인 AMC-LLVY (160 $\mu$ M)를 사용하였다. 상기 protease 活性度는 機質의 proteolytic cleavage를 測定함으로써 인지하였다.

5) 統計處理

標示된 結果는 3번 以上の 獨立的인 結果이며 이들의 平均(mean)과 標準偏差(standard deviation, SD)를 算出하여 結果를 標示하였다. 細胞毒性을 보이는 값의 比較에 있어서는 Student t-test를 사용하였으며  $p < 0.01$ , 혹은  $p < 0.05$  水準으로 有意性을 檢證하였다.

하여 檢證하였다.

### III. 實驗結果

#### 1. 桃核承氣湯으로 因한 HeLa cell의 apoptosis

桃核承氣湯으로 因한 抗癌效果를 檢索하기 위해 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 桃核承氣湯을 處理하여 죽음을 惹起하는지의 與否를 알아보았다. 桃核承氣湯(0, 1, 2, 5mg/ml)을 處理시 用量 依存的으로 세포죽음이 惹起됨을 확인하였다 (Fig. 1A). 細胞 죽음에는 자연적인 細胞枯死(apoptosis)와, 物理的인 刺戟이나 삼투압 등으로 인한 壞死(necrosis)가 있다. Apoptosis시 細胞膜의 blebbing이나 核의 condensation, fragmentation 등이 일어나므로 이의 형태를 관찰, apoptosis와 necrosis를 區別하고자 하였다<sup>18)</sup>. 核을 染色하기 위하여 Hoechst 33258 dye를 利用하였으며 螢光현미경으로 觀察하였다. 2mg/ml의 桃核承氣湯을 48시간 處置 하였을때 전형적인 細胞枯死(apoptosis)의 現狀을 볼 수 있다 (Fig. 1B).

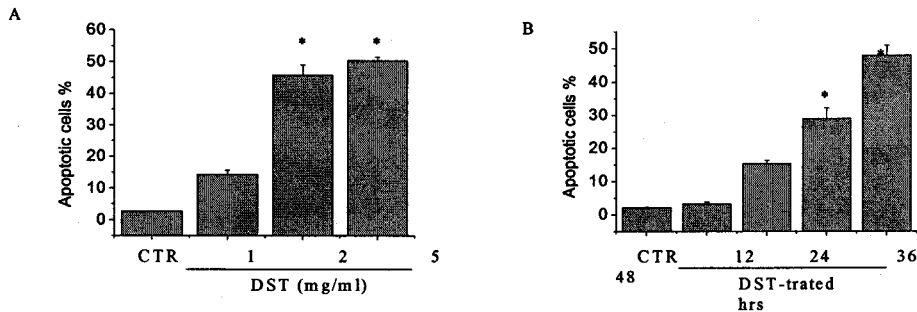


Fig.1. DST induces death in HeLa cells. (A). Cells were treated with various concentrations of DST (0, 1, 2 and 5mg/ml) and then incubated for 48 hrs. The apoptotic cells were trypsinized and the cells were fixed with 3.7% para-formaldehyde and then were washed with PBS. The cells were stained with 1 $\mu$ g/ml Hoechst 33258 dye for 10 mins. The morphologically changed cells were considered as apoptotic cells using a fluorescence microscope. (B) Cells were treated with DST (2mg/ml) for various incubation periods (0, 12, 24, 36 and 48 hrs). The cell death was assessed as described as A. Data were the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. \*Significantly different from control,  $P < 0.05$ . DST: Dohaekseungkitang

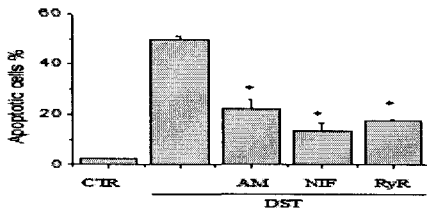
2. 桃核承氣湯으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 calcium의 役割

2mg/ml의 桃核承氣湯 처치 시, HeLa cell의 有意性있는 細胞枯死의 조건에서 4 μM의 BAPTA-AM, Nifedipine-Calcium channel blocker, ryonidine-ryonidine agonist 처치 시, 有意性있게 保護하는 效果를 알 수 있었다 (Fig. 2A). 5mg/ml을 비롯한 桃核承氣湯 처치 시, 동일한 保護效果를 나타내었다. 형태 관찰을 위하여 Crystal violet staining 실시한 후 에는 많은 수의 細胞가 소실되어 桃核承氣湯 처리한 細胞群은 낮은 密度의 細胞數를 보였으며, 附着되어 있는 細胞도 손상된 모습을 보여주고 있다. 이에 비하여 BAPTA-

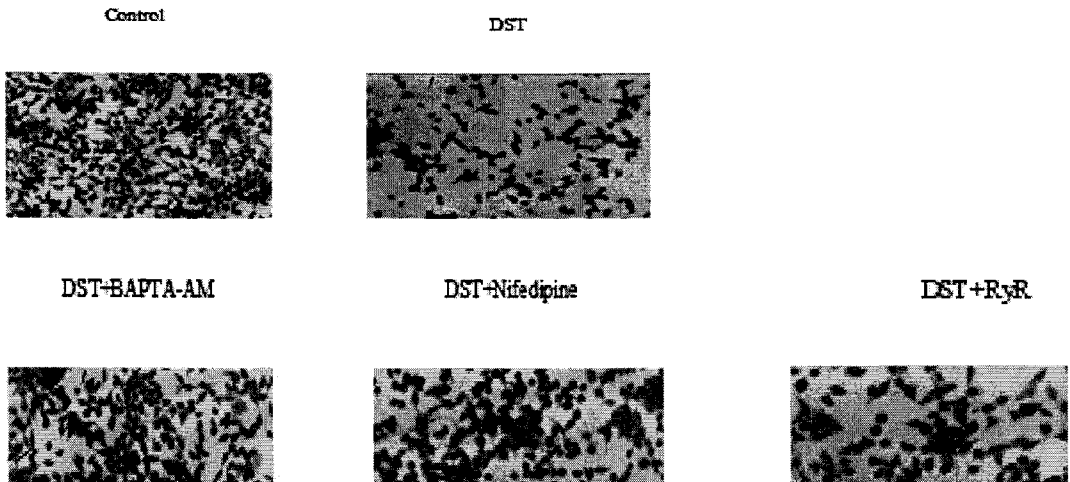
AM, Nifedipine, Ryonidine을 처치 시, 有意性있는 保護된 형태를 보여주고 있다.

이로써 桃核承氣湯으로 인한 HeLa cell의 apoptosis는 세포내 칼슘의 농도가 증가하며 이는 외부의 calcium이 calcium통로를 통하여서 유입되며 한편 ER에서의 calcium이 유리되어 세포질 안에서의 증가된 calcium<sup>19-21</sup>으로 인하여 HeLa cell을 죽일 수 있음을 알 수 있다. 본 실험결과에 의하면 桃核承氣湯으로 Fura-2 AM을 이용하여 calcium의 측정은 할 수 없었다. 桃核承氣湯의 색이 Fura-2의 波長을 흡수한 것으로 간주하고 있다.

A



B

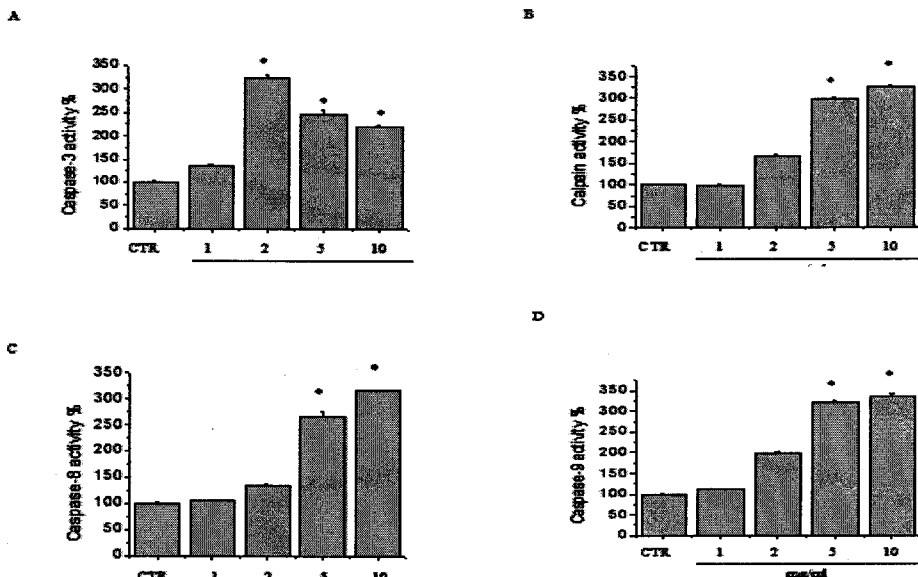


**Fig. 2. Calcium is a major key in DST-induced apoptosis in HeLa cells.** DST (2mg/ml) was treated in HeLa cells with 4μM BAPTA-AM, 100μM Nifedipine or 10μM Ryonidine for 48 hrs. The apoptosis was assessed as described in Materials and Methods (A). Data were the mean ± S.E. of three experiments. \*Significantly different from control, P < 0.05. DST: *Dohaekseungkitang*. #Significantly different from DST-treated, P < 0.05. DST: *Dohaekseungkitang*, RyR: Ryonidine. In parallel, the cells were stained with crystal violet dye for 10 mins. The crystal violet-stained cells were showed in panel B (B). RyR: Ryonidine

3. 桃核承氣湯으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 Caspase 및 calpain 活性 惹起

Caspase 가운데 initiator caspase로 caspase-8과 caspase-9가 속하며, 이는 비교적 upstream의 caspase로 분류되어 지고 caspase-9은 mitochondria을 경유하는 apoptosis pathway에 속하며 caspase-8은 receptor을 경유하는 pathway에 속하고 TNF-α, fas로 인한 apoptosis에 주요한 役割을 하는 것으로 알려져 있다<sup>22-31</sup>. Apoptosis의 executor caspase인 caspase-3 cysteine protease의 活性은 桃核承氣湯 2mg/l을 48시간 처치 시 3배이상 증가함을 확인할 수 있

었으며 桃核承氣湯 5, 10mg/ml 처치 시 caspase-3의 더 이상의 증가는 관찰되지 않았다 (Fig. 3A). Fig 3B는 Fig 3A의 caspase-3 活性度 결과와는 달리 桃核承氣湯의 用量依存的인 calpain 活性度 증가를 보여주었다. 桃核承氣湯 고용량으로 인한 죽음에서는 주로 calpain 活性度가 중요한 役割을 할 수도 있음을 시사한다. Initiator caspase인 caspase-8과 caspase-9 역시 桃核承氣湯 用量依存的인 活性度 증가를 나타내었다. (Fig 3C, 3D) 즉 桃核承氣湯으로 인한 죽음에서 calpain과 caspase-8 및 caspase-9의 有機的 聯關性을 示唆한다.



**Fig. 3. DST induces calpain and caspase activation in HeLa cells.** Various concentrations of DST (0, 1, 2, 5 or 10mg/ml) were treated in HeLa cells and then incubated for 48 hrs. Caspase-3, calpain, caspase-8 and caspase-9 were measured as described in Materials and Methods. DST: *Dohaekseungkitang*

4. 桃核承氣湯으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 Caspase-3 및 calpain 活性化 증가시 calcium의 役割

2mg/ml의 桃核承氣湯 처치 시, HeLa cell의 有意性있는 細胞枯死의 條件에서 calpain과 caspase-3의 活性化를 測定하였다. 4μM의 BAPTA-AM, Nifedipine-Calcium channel blocker, ryonidine-ryonidine agonist 처치 시, 桃核承氣湯으로 인

한 calpain과 caspase-3 增加를 조절하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 이들 細胞內 calcium 조절물질들은 桃核承氣湯으로 인한 caspase-3 및 calpain의 증가된 活性化를 抑制하였다. 특히 calpain의 活性化 增加시에 calcium의 役割이 결정적임을 보여주고 있다. 5mg/ml을 비롯한 고농도의 桃核承氣湯 처치 시에도 동일한 결과를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

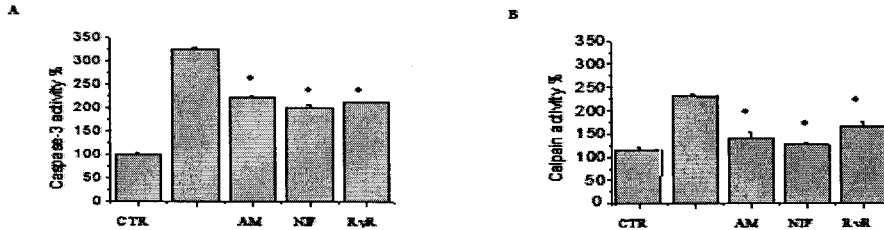


Fig. 4. Calcium is a key factor in DST-induced caspase-3 and calpain activations in HeLa cells. DST (2mg/ml) was treated in HeLa cells with or without 4μM BAPTA-AM, 10μM Nifedipine or 100μM Ryonidine. And then the cells were incubated for 48 hrs. Caspase-3 (A), calpain activity (B) were measured as described in Materials and Methods. \*Significantly different from DST-treated P < 0.05. DST: Dohaekseungkitang.

5. 桃核承氣湯으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 caspase 및 calpain의 役割 細胞枯死시 주된 경로는 caspase-의존적인 경로이며 최근 caspase-비의존적인 細胞枯死 경로 역시 주목받아 왔다<sup>32-34</sup>. 이 가운데, calpain protease-의존적인 죽음<sup>35-37</sup> 역시 매우 중요한 경로로 인정되고 있으나 calpain의 경우 caspase-의존적/ 비의존적인 경향으로 조절된다는 데에 대하여 異見이 많이 제시되어 왔다. 桃核承氣湯으로 인한 caspase와

calpain의 役割을 알기위하여 caspase 抑制劑인 DEVD 100μM을 처치, 혹은 calpain의 抑制劑인 calpastatin (10μM)을 처치하여 알아보았다. 본 결과는 caspase 抑制劑, calpain 抑制劑 모두 부분적인 抑制效果만을 보여주었다 (Fig. 5). 따라서 본 결과는 caspase cysteine protease, calpain protease와는 다른 또 별도의 단백질 등이 작용, 桃核承氣湯으로 인한 죽음을 誘發하고 있음을 示唆하고 있다.

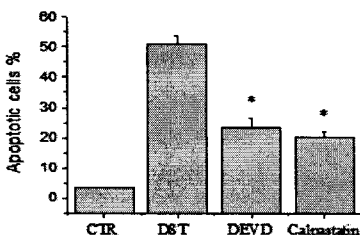


Fig. 5 Both caspase and calpain are related in DST-induced apoptosis in HeLa cells. DST (5mg/ml) was treated in HeLa cells with 100μM Z-VAD peptide or 100μM, calpastatin for 48 hrs, followed by measurement of apoptotic cells. \*Significantly different from DST-treated, P < 0.05. DST: Dohaekseungkitang

## IV. 考 察

子宮頸部癌은 2003년 婦人癌 등록사업 조사 보고서에 의하면 우리나라에서 연간 4,000명의 子宮頸部癌 新患이 報告되고 있어 국민보건상 중대한 문제가 되고 있다<sup>8)</sup>.

子宮頸部癌의 原因은 현재까지 명확히 밝혀지지 않았으나 疫學的 研究에 의하면 思春期 중에 시작된 활발한 性接觸과 여러 명의 性交相對者 등이 子宮頸部癌의 발생에 깊이 관계되며, 性病을 앓은 病歷, 免疫障礙者, 社會經濟的으로 低所得層 특히 性傳播疾患의 感染과 關聯性이 높은 것으로 추정되고 있다<sup>5,6,9)</sup>. 그 외에도 民族的 差異, 經口避妊藥 服用, 비타민 缺乏, 吸煙, 人유두종 바이러스(Human papilloma virus, HPV) 感染, 高危險 男便要因 등이 제시되고 있고, 최근에는 HPV가 가장 有力한 發生因子로 믿어지고 있다<sup>38-45)</sup>. 특히, 근래에는 分子生物學적인 기술을 이용한 여러 研究에서 子宮頸部癌 발생에 있어 HPV에 의한 감염이 原因이 된다는 충분한 증거들이 제시되고 있으며, 이러한 결과들을 종합해 볼 때 지속적인 HPV DNA의 존재 없이 子宮頸部癌은 발생하지 않는다는 개념에까지 도달할 정도가 되었다<sup>46)</sup>.

子宮頸部癌의 서양의학적 治療로는 癌의 임상적 進行病期에 따라 다르며, 자궁적출술 등의 手術적요법이나 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 사용되고 있고, 비교적 癌細胞의 轉移가 국한되었을 때 手術요법과 방사선요법, 末期에는 화학요법과 면역요법의 全身療法이 시행되고 있다<sup>9,38-45)</sup>. 하지만, 子

宮頸部癌의 手術 및 방사선치료의 발달에도 불구하고 최근 수십년 동안 病期 별 예후는 크게 향상되지 못하였다. 일차적 치료로 手術을 받은 초기 子宮頸部癌 患者의 약 10-25%가 再發하는데, 子宮頸部癌의 再發은 원격전이보다는 주로 주변장기를 침범하고 국소 림프절로 轉移하는 국소 再發의 양상을 보이며, 75%의 환자가 대부분 치료 후 2년 내에 再發하게 된다<sup>47)</sup>. 또한 手術적 치료 후 再發의 고위험 因子가 있는 환자의 경우, 手術 후 방사선 치료가 사용되고 있지만 子宮頸部癌의 국소 再發은 감소시켰음에도 불구하고 평균 생존률에 미치는 효과는 미미하거나 거의 없다는 연구결과들<sup>48-50)</sup>도 나오고 있다.

癌의 原因은 아직 불명확한 부분이 많이 있지만 外界環境 중의 致癌因子 즉 化學的, 物理的, 生物學的 致癌因子가 중요한 要因으로 認識되고 있는데, 일반적으로 癌發生의 80%정도가 外部環境중의 致癌因子와 關係가 있다고 보고 있다. 그러나 이와 같은 因子 이외에도 內的 素因으로 遺傳因子, 個個人的 感受性, 精神的인 影響, 人體免疫監視系統의 機能的 障礙, 內分泌 消失 등도 癌發生에 있어서 중요한 因子로 認識하고 있는 趨勢이다<sup>51)</sup>. 癌의 發生過程은 여러 가지 複合的인 機轉이 작용하는데 특히 遺傳的으로는 癌遺傳子와 癌抑制遺傳子의 役割에 의하여 細胞의 增殖과 消滅이 變化를 일으키게 되며, 이러한 遺傳的인 機能的 障礙로 정상적으로는 消滅되어야 할 損傷된 細胞들의 壽命이 延長되고 결국 腫瘍으로 발전하게 된다. 이때 癌細胞가 될 可能性이 높은 細胞에서 細胞枯死 活性度(Apoptotic



activity)의 消失은 癌化 過程에 影響을 미치게 되며, 子宮頸部癌의 發癌過程에도 子宮頸部 上皮細胞의 전체 細胞 數增加와 細胞枯死(apoptosis)의 減少가 密接한 關聯이 있다고 생각되고 있다<sup>52)</sup>.

細胞枯死(apoptosis)는 計劃된 細胞死滅(programmed cell death)로서 細胞壞死(necrosis)와는 그 과정에 組織學的 및 生化學的으로 差異가 있다. 즉 細胞枯死에서는 細胞膜이 維持되면서 細胞 脫水 現狀에 의한 細胞收縮, 細胞膜의 氣胞化 현상, 세포질내의 칼슘농도 증가, 염색질 凝縮, 핵산분해효소(endonuclease)의 活性化에 의한 사다리모양의 DNA分節形成, 核 絶斷, 細胞枯死 小體 形成 등이 동반된다<sup>53,54)</sup>.

子宮頸部癌에 해당하는 韓醫學的인 症狀과 治療는 ‘崩漏’, ‘帶下’, ‘癥瘕’, ‘血蠱’ 등의 範疇에서 찾아볼 수 있다. 이 중 接觸性 出血과 月經後 不定期的인 出血 및 血性 白帶下 등의 早期 症狀에는 ‘崩漏’나 ‘帶下’가 해당하며, 惡臭나는 帶下, 排尿困難, 積塊物 觸知 등의 晚期 症狀은 ‘癥瘕’나 ‘血蠱’의 範疇로 볼 수 있다<sup>53,58)</sup>.

癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로서 西洋醫學的으로는 子宮頸部癌, 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 卵管癌, 卵巢癌, 絨毛上皮癌 등과 聯關된다<sup>5,6)</sup>.

癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로서 西洋醫學的으로는 子宮頸部癌, 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 卵管癌, 卵巢癌, 絨毛上皮癌 등과 聯關된다<sup>5,6)</sup>.

癥瘕의 病因 病理를 살펴보면 <黃帝內經><sup>55)</sup>에서는 癥瘕에 대한 직접적인 언급이 없으며 ‘積聚’, ‘疝瘕’라고만 하였고, 寒邪外侵과 內傷憂怒로 인해 血氣가

留하고 津液이 澁滲하여 着而不舉하면 漸結成績하므로 이 疾病들을 形成한다 하여 外感寒邪와 七情을 主因으로 보았고, 華<sup>56)</sup>는 “積聚癥瘕雜蟲者 皆五臟六腑 眞氣失而邪氣病 遂乃生焉”이라 하여 正氣가 虛한 가운데 邪氣가 併合된 것을 原因으로 보았다. 孫<sup>57)</sup>은 食物相感에 起因한 것으로 보았으며, 李<sup>58)</sup>는 傷食에 起因한 것으로 보아 孫의 說을 따랐으며, 朱<sup>59)</sup>는 痰 食積 死血 등이 癥瘕를 形成한다고 보았다.

이렇듯 韓醫學 文獻 중에는 癌發生의 病因病機에 대한 論述이 많이 있으며 이 방면에 대한 歷代 醫家들의 認識 역시 勿論히 깊어졌음을 알 수 있는데, 일반적인 韓醫學 이론에 근거한 癌 發病 病機는 氣滯, 血瘀, 痰結濕聚, 毒熱內蘊, 臟腑失調, 經絡瘀阻 등 몇 가지 方面으로 歸結된다<sup>60)</sup>. 이러한 發病的 病因病機에 關與하는 因子들은 서로 影響을 미치고, 相互 作用을 거쳐 전체적인 癌發生의 病理過程을 形成하게 된다. 그 중 血瘀는 癌의 形成과 發展過程중에서 중요한 病理機轉중 하나이며, 病이 進行되면서 각 段階에서 나타날 수 있는 病理的 現象중 하나이기도 하다<sup>61)</sup>.

<內經><sup>55)</sup>에는 “血氣稽留不得行 故宿昔而成積矣”라 하여, 血瘀가 오래되어 “積” 즉 腫塊가 된다고 하였고, <醫林改錯><sup>62)</sup>에는 “臟腹結塊, 必有形之血也, 血受寒即凝結成塊, 血受熱即 煎熬成塊... 血府, 血之根本, 瘀即瘕名”이라 하여 癌과 같은 新生物形成에 血瘀의 病理가 聯關되어 있음을 推測할 수 있다.

桃核承氣湯은 調胃承氣湯에 桂枝와 桃仁을 加한 것으로, 瘀熱을 下行하게 하여 蓄血을 治療하는 良方이며<sup>63)</sup>, 張<sup>1)</sup>

의 《傷寒論》에 "太陽病不解 熱結膀胱 其人如狂 血自下 下者愈. 其外不解者 尙未加攻 當先不解. 外解已 但少腹急結者 乃可攻之 宜桃核承氣湯" 이라 하여 最初로 收載된 이래, 여러 文獻에 記載되어 下焦의 蓄血로 인한 小腹急痛, 譫語煩渴, 血瘀經閉, 痛經 등 下焦의 瘀血蓄結의 證候를 治療하는데 사용되어 왔다<sup>3)</sup>.

각 構成藥物의 性味와 效能을 살펴보면, 桃仁의 性味는 苦·平 無毒하고 破血祛瘀의 效能이 있고, 大黃의 性味는 苦·寒 無毒하며 功積導滯·行瘀痛經의 效能이 있고, 桂枝는 辛·苦·溫 無毒하며 溫通經脈 通陽化氣의 效能이 있고, 芒硝의 性味는 鹹·苦·寒 無毒하며 瀉火消腫의 效能이 있고, 甘草의 性味는 甘·平 無毒하고 補裨益氣·清熱解毒의 效能이 있다<sup>64)</sup>. 桃仁은 破血祛瘀하고, 大黃은 瘀積을 攻下하며 邪熱을 蕩滌하므로 二藥을 合用하여 瘀熱을 함께 治療하여 같이 君藥이 되고, 桂枝는 血脈을 通行시키면서 桃仁의 破血行瘀作用을 協助하고, 芒硝는 軟堅散結하면서 大黃의 通便瀉熱을 協助하므로 臣藥으로 하였으며, 甘草는 調胃安中하고 아울러 諸藥의 峻烈한 性質을 緩和해주므로 佐·使藥으로 하였다<sup>65)</sup>. 이와 같이 全方이 破血下於하는 效能을 나타내면서 下焦의 瘀熱蓄結의 證候를 治療한다<sup>66)</sup>.

이에 著者는 癌의 形成과 發展過程중에서 중요한 病理機轉인 血瘀, 특히 下焦의 瘀熱蓄結의 證候를 개선함으로써, 癥瘕 및 子宮頸部癌의 治療에 적합하다고 생각되는 桃核承氣湯에 대한 抗癌效果를 究明하고자 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 桃核承氣湯을 처리하고, HeLa cell의 生存度 및 細胞枯死

(apoptosis)에 관련된 細胞의 形態 變化, 細胞 蛋白質의 發顯 등의 生化學的인 變化를 관찰하였다.

桃核承氣湯으로 인한 抗癌效果를 檢索하기 위해 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 桃核承氣湯을 처리하여 죽음을 惹起하는지 與否를 알아본 결과, 桃核承氣湯(0, 1, 2, 5mg/ml)을 처리시 用量 依存的으로 세포죽음이 惹起됨을 확인하였다(Fig 1A). Apoptosis시 細胞膜의 blebbing(水泡形成)이나 核의 condensation(凝縮), fragmentation(分節) 등이 일어나므로 本 실험에서 apoptosis와 necrosis를 구별하기 위하여 이의 형태를 관찰하였다. 核을 染色하기 위하여 Hoechst 33258 dye를 이용하였으며 螢光顯微鏡으로 관찰하였다. 특히 桃核承氣湯 2mg/ml을 48시간 처리한 後 細胞生存度의 현저한 감소를 확인하였다(Fig 1B).

桃核承氣湯으로 인한 HeLa cell의 apoptosis를 誘導하는 條件에서 4μM의 BAPTA-AM, Nifedipine-Calcium channel blocker, ryonidine-ryonidine agonist 處置시 有意性 있게 保護하는 效果를 알 수 있었다(Fig 2A). 이로써 桃核承氣湯으로 인한 HeLa cell의 apoptosis는 세포내 calcium농도의 증가와 연관되어 있으며, 외부의calcium이 유리되어 세포질 안에서의 증가된 calcium으로 인하여 子宮頸部癌 細胞를 죽일 수 있음을 알 수 있다.

Caspase cysteine protease cascade는 여러 生理的인 system에서 apoptosis의 주요 經路로 認識되어 왔으며, caspase family는 pro-form으로 만들어지고 apoptosis 경우 cleavage가 일어나 活性

화된다고 알려져 왔으며<sup>67)</sup>, 最近 活發히 進行되고 있는 여러 實驗研究에서는 apoptosis가 進行되는 細胞에서 caspase-3, 6, 8 및 9가 주된 caspase 經路라고 報告되고 있다<sup>68,69)</sup>. Caspase 가운데 initiator caspase로 caspase-8 과 caspase-9가 屬하며, 이는 比較的 upstream의 caspase로 分類되어지고 caspase-9은 mitochondria를 經유하는 apoptosis 經路에 屬하며, caspase-8은 receptor를 經유하는 經路에 屬하고 TNF- $\alpha$ , fas로 인한 apoptosis에 주요한 役割을 하는 것으로 알려져 있다<sup>70)</sup>.

본 연구의 桃核承氣湯 處置로 인한 apoptosis에서는 calpain, caspase-8, caspase-9 이 用量 依存的인 活性度 增加를 보였으며(Fig 3B, 3C, 3D), 서로간의 有機的인 聯關性을 示唆한다. 3가지 細胞內 칼슘조절물질 (BAPAT-AM, nifedipine-calcium channel blocker, Ryonidine agonist) 處置시 caspase-3, 및 calpain의 活性度の 增加를 抑制하였다 (Fig. 4). 이는 桃核承氣湯으로 인한 apoptosis의 機轉에서 calcium이 중요한 役割을 하고 있음을 示唆한다.

桃核承氣湯으로 인한 caspase 및 calpain의 役割을 알아보기 위해 calpain 抑制劑(DEVD), caspase 抑制劑(calpastatin)를 處置해 본 결과 모두 부분적인 抑制效果 (Fig 5)를 보여주었으며, 이는 桃核承氣湯의 HeLa cell apoptosis에 있어서 caspase cystein protease, calpain protease와는 별도로 다른 단백질이 작용하고 있을 可能性을 示唆하고 있으며, 이를 위한 별도의 研究가 필요할 것으로 思料된다.

以上の 實驗結果로 볼 때 桃核承氣湯

은 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa의 apoptosis를 誘導하였으며, 그 過程에서 caspase-3, 8, 9의 活性化, calpain protease의 活性化 등의 變化가 일어나고 있음이 밝혀졌다. 따라서 桃核承氣湯은 癥瘕의 範疇에 속하는 子宮頸部癌의 治療에 活用될 수 있으리라 思料된다..

## V. 結 論

桃核承氣湯을 이용해서 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell의 細胞枯死를 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. HeLa cell에 多様な 濃度の 桃核承氣湯(0, 1, 2, 5mg/ml)을 처리시 用量 依存的으로 세포죽음이 惹起됨을 確認하였다. 특히 桃核承氣湯(2 mg/ml)을 處理한 48時間 後 전형적인 細胞枯死 현상을 確認하였다.
2. 桃核承氣湯 (2mg/ml)을 처리하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 4 $\mu$ M의 BAPTA-AM, nifedipine-calcium channel blocker, ryonidine-ryonidine agonist 處置시, 保護效果를 나타내었다.
3. HeLa cell에 桃核承氣湯 (0, 1, 2, 5, 10mg)을 처리시 用量 依存的으로 caspase-8, 9 및 calpain의 活性이 增加하였다.
4. 桃核承氣湯 (2mg/ml)을 처리하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 4 $\mu$ M의 BAPTA-AM, nifedipine-calcium channel blocker, ryonidine-ryonidine agonist 處置시 caspase-3 및 calpain의 活性이 抑制되었다.
5. 桃核承氣湯 (2mg/ml)을 처리하고

HeLa cell의 죽음을 誘導하는 조건에서 calpain 抑制劑(DEVD), caspase 抑制劑(calpastatin) 處置시 부분적인 抑制效果를 觀察하였다.

以上の 實驗結果로 볼 때, 桃核承氣湯은 子宮頸部癌細胞柱인 Hela cell의 apoptosis를 誘導하였으며, 그 過程에서 caspase-3, 8, 9의 活性化, calpain protease의 活性化 등의 變化가 일어나고 있음이 밝혀졌다. 따라서 桃核承氣湯은 癥瘕의 範疇에 속하는 子宮頸部癌의 治療에 活用될 수 있으리라 思料된다.

- 투 고 일 : 2006년 04월 28일
- 심 사 일 : 2006년 05월 01일
- 심사완료일 : 2006년 05월 09일

## 參考文獻

1. 李培生 主編, 傷寒論, 北京: 人民衛生出版社, 1987;pp.164-5.
2. 金楨汎. 崔昇勳, 安圭錫, 桃仁承氣湯 및 그 構成藥物이 瘀血病態模型에 미치는 影響, 大韓東醫病理學會誌, 1997; 11(1):65-76.
3. 矢數道明 著 李文瑞 等譯, 臨床應用處方解說, 北京: 人民衛生出版社, 1983;30 5-9.
4. 崔鍾百, 積聚에 관한 文獻的 考察, 東西醫學 1993;18(3):5-29.
5. 宋炳基, 韓方婦人科學, 서울: 杏林出版社, 1992;249-57.
6. 李鐘華, 韓方婦人科臨床診療, 서울: 癸丑文化社, 1982;264-87,514-7.
7. 한국중양암등록본부, 보건복지부, 한국 중양암 등록사업 연례 보고서 (2002,1-2002.12) 보건복지부, 2003.
8. 대한산부인과학회 중양분과위원회, 한국 부인암 등록사업 조사 보고서(1997. 1.1-2001.12.31) 대한산부회지 2003;46:1 849-87.
9. 韓醫婦人科學 教材 編纂委員會 : 韓醫婦人科學(上), 서울: 정담, 2001;319-26.
10. 조현일 등, 고위험 자궁경부암의 수술 후 보조요법으로서 Paclitaxel과 Carboplatin 동시 항암화학방사선요법의 효능과 안전성, 대한산부회지 2004;47 (5):917-22.
11. 鄭鎭鴻, 蓬莪朮丸 煎湯液과 抗癌劑 併用投與時 子宮癌 細胞에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 博士學位論文, 1993.
12. 李廷華, 歸朮破癥湯이 子宮癌 細胞(HeLa Cell)에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1994.
13. 高昊奎, 加味桂枝茯苓丸과 抗癌劑 併用時 子宮癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1995.
14. 朴慶美, 濟川煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 碩士學位論文, 2002.
15. 金松百, 香稜丸이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 碩士學位論文, 2003.
16. 嚴柱五, 馬齒莧이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 碩士學位論文, 2003.
17. 黃度淵, 國譯 證脈方藥合編, 서울: 南山堂, 2000;133-4.
18. Wyllie AH.: Apoptosis, an overview. Brit Med Bull 1997;53:451-65.
19. Ferrari D. et al, Endoplasmic reticul

- um, Bcl-2 and Calcium handling in apoptosis: *Cell Calcium*, 2002;32:413-20.
20. Orrenius S., Zhivotovsky B., and Nicotera P., Regulation of Cell death: The calcium-Apoptosis link, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003;4:552-65.
  21. Oakes SA., et al, Regulation of endoplasmic reticulum Ca dynamics by proapoptotic Bcl-2 family members, *Biochemical Pharmacology*, 2003;66:1335-40.
  22. Ashkenazi A., Dixit VM., Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998;281:1305-8.
  23. Bernardi P. et al, Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issue. *Eur. J. Biochem.* 1999;264:687-701.
  24. Brenner C. et al, Apoptosis. Mitochondria-the death signal integrators, *Science*, 2000;289:1150-1.
  25. Thornberry N., Lazebnik Y., Caspases: enemies within, *Science*, 1998;281:1312-6.
  26. Cryns V., Yuan Y., Proteases to die for. *Genes Dev*, 1999;12:1551-70.
  27. Salvesen GS., Dixit VM., Caspase activation : the induced-proximity model, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;96:10964-7.
  28. Wallach D. et al., Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanism. *Annu. Rev. Immunol*, 1999;17:331-67.
  29. Green DR., Reed JC., Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998;281:1309-12.
  30. Varfolomeev E., et al, Targeted disruption of the mouse caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 1998;9:267-76.
  31. Hakem R. et al, Differential requirement for caspase-9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 1998;94:339-52.
  32. Danial NN, Korsmeyer SJ., Cell death Critical Control Points, *Cell* 2004;116:205-19.
  33. Cryns V., Yuan Y., Proteases to die for, *Genes Dev*, 1998;12:1551-70.
  34. Bidere N., Senik A., Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: A minireview, *Apoptosis*, 2001;6:371-375.
  35. Liu X., Van Vleet T., Schnellmann RG., The role of calpain in oncotic cell death, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004;44:349-70.
  36. Goll DE., et al, The calpain system, *Physiol Rev*, 2003;83(3):731-801.
  37. Ray SK., Banik NL., calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration, *Curr Drug targets CNS Neurol Disord*, 2003;2(3):173-89.
  38. 최승훈, 東醫腫瘍學, 서울:杏林出版, 1995;229-34.
  39. 문구, 정병학, 김병주, 癌 東西醫結合治療, 益山, 圓光大學校 出版局, 1999;3

- 79-421.
40. 서울대학교 의과대학 산부인과 교실, 산부인과학, 서울: 군자출판사, 1999;40 4-11.
  41. 大韓病理學會, 病理學(II), 서울: 高文社, 1995;966-7.
  42. 이증달, 病理學, 서울: 高麗醫學, 1991; 691-700.
  43. 이승호, 子宮頸部癌의 疫學과 病因論, 啓明醫大論文集 1997;16(1):29-36.
  44. 대한산부인과학회 교과서 편찬위원회, 부인과학, 서울: 칼빈출판사, 1997; 980-1207.
  45. 조종관, 한방임상종양학, 대전: 주민출판사, 2001;799-818.
  46. Zur Hausen H., Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix? Int J cancer, 1995;63(2):315-6.
  47. DiSasia PJ., Creasman WT., Clinical gynecologic oncology. 5th ed. St Louis: Mosby; 1997.
  48. Morrow CP., Is pelvic radiation beneficial in the postoperative management of stage IB squamous cell carcinoma of the cervix with pelvic node metastasis treated by radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy? Gynecol Oncol, 1983;10:105-10.
  49. Kinney WK., et al, Value of adjuvant whole-pelvis irradiation after Wertheim hysterectomy for early stage squamous carcinoma of the cervix with pelvic lymph node metastasis: a matched control study. Gynecol Oncol, 1989;34:258-62.
  50. Soisson AP., et al, Adjuvant radiotherapy following radical hysterectomy for patients with stage IB and IIA cervical cancer. Gynecol Oncol 1990;37: 390-5.
  51. 서울대의과대학 편, 종양학, 서울대학교출판부, 1990;23-8.
  52. 김태진 등, 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성, 대한부인종양학 포스코과학회지, 1999;10(2):138-47.
  53. Cohen JJ., Apoptosis, Immunol Today, 1993;14:126-30.
  54. Searle J., Kerr JF., Bishop CJ., Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, Pathol Annu. 17 Pt, 1982;2:229-59.
  55. 洪元植, 精校黃帝內經素問, 서울: 東洋醫學研究所, 1981;145,209,304.
  56. 華陀, 華陀神醫秘傳, 서울: 東醫輔, 1976;20.
  57. 孫思邈, 備急千金要方, 北京: 人民衛生出版社, 1982;211-4.
  58. 李梴, 懸吐醫學入門, 서울: 翰成社, 1983;680-2.
  59. 方廣編著, 丹溪心法附餘(下), 서울: 大星文化社, 1982;626-38.
  60. 郁仁存, 中醫腫瘍學上冊, 北京: 北京科學技術出版社, 1983;23-8.
  61. 中國中西醫結合研究會 中國中醫研究院 編, 惡性腫瘤中西醫結合研究的成就, 中西醫結合雜誌, 1988;8(2):57.
  62. 王勳臣 編, 醫林改錯, 서울: 一中社, 1992;66.
  63. 史定文 外 3인, 傷寒論自學補導, 北京: 中醫古籍出版社, 1985;70,540.
  64. 辛民教 : 本草學, 서울: 永林社, 1997;

- p. 172, 310, 365, 785, 786.
65. 金完熙, 崔達永, 臟腑辨證論治, 서울: 成輔社, 1985;p. 59, pp.371-375.
  66. 蔡仁植, 孟華燮 共譯, 國譯醫方集解, 서울: 大星文化社, 1984;pp. 276-278.
  67. Takahashi H., et al, Fas antigen modulates ultraviolet B-induced apoptosis of SVHK cells: sequential activation of caspase 8, 3, and 1 in the apoptotic process, *Exp Cell Res* 1999;242 (2):291-298.
  68. Chae HJ., et al, Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblast: possible role for ceramide, *Endocrinology* 2000;141(8):2904-2913.
  69. Perry DK., et al, Zinc is a potent inhibitor protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis, *J Biol Chem* 1997;272:18530-18533.
  70. Van Loo G., et al, The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet: Cell death and Differentiation Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy: Petak I, Houghton JA. *Pathol. Oncol. Res.* 2002;9(1):1031-1042.