

益母草가 자궁근종세포의 증식억제와 Apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

대구한의대학교 한의학과대학 부인과교실
이수진, 김동철, 백승희

ABSTRACT

The effect of *Leonurus sibiricus* on the proliferation inhibition of human uterine leiomyoma cell and expression of gene related cell apoptosis

Soojin Lee, Dongchul Kim, Seunghee Beak

Dept. of gynecology, College of Oriental Medicine, Daeguhaany University

Purpose : This study was aimed to investigate the inhibitory effect of *Leonurus sibiricus* on the proliferation of human uterine leiomyoma cells and the expression of gene related the mechanism of cell apoptosis

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

Results : *Leonurus sibiricus* significantly inhibited the proliferation of uterine leiomyoma cell in a dose-dependent and time dependent manner. Fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis indicated that *Leonurus sibiricus* induced G1 cell cycle arrest. *Leonurus sibiricus* enhanced the expression of p27 and p53 with cell cycle arrest.

Conclusion : These findings suggest that *Leonurus sibiricus* is a candidate agent for the treatment of uterine leiomyoma. p27, p53¹ may play an important role in *Leonurus sibiricus*-induced cell cycle arrest and cell growth inhibition.

Key words : uterine leiomyoma, cell apoptosis, *Leonurus sibiricus*

I. 緒 論

자궁근종은 부인과 영역에서 가장 흔한 양성종양의 하나로, 특히 30~45세의 여성에서 호발하는 질환으로 근종의 상태에 따라 무증상에서부터 하복부종괴감, 부정자궁출혈, 만성골반통증, 뇨증상 등의 증상을 동반한다(1-3).

한의학 고전에서는 자궁근종이란 병명을 찾아볼 수 없지만, 증상을 고려해 볼 때 崩漏, 月經過多, 痛經, 癥瘕 등의 병증과 관련지어 인식할 수 있으며, 특히 이⁴⁾의 고찰에 의하면 血癥에 포함시킬 수 있다^{1,4)}.

서양의학에서는 현재까지도 이 질환의 발생 원인에 대해서 정확히 규명하지 못하고 있고, 연령, 인종, 유전적 요인 및 호르몬이 관여되고 있다고 보고 있으며, 여성의 난소기능이 활발할 때 잘 발생하고 폐경기 이후에는 기존하는 근종이 위축되는 경향이 있는 것으로 보아 estrogen의존성 종양으로 추측하고 있을 뿐이다¹⁻²⁾. 최근에는 인슐린유사 성장인자(Insulin-like growth factor, IGF-I/IGF-II)와의 관련성에 대한 연구⁵⁻⁹⁾가 보고되고 있지만 자궁근종의 발생과 성장기전에 대한 명확한 규명이 되어있지 않다.

자궁근종의 치료법은 증상이 없으면서 임신 12주째의 자궁크기 이하의 경우는 6개월마다 정기검진을 하는 관찰요법을 하고, 증상이 있는 경우에는 자궁근핵적출술이나 전자궁적출술과 같은 수술요법을 하는 것이 대부분이다. 그러나 단순 자궁적출만으로도 여성으로서의 건강한 느낌의 장애, 조기폐경 증상, 난소기능저하 등이 나타난다^{1,2,10)}. 따라서 최근에는

자궁동맥색전술¹¹⁾, 고주파자궁근종용해술¹²⁾ 같은 보존적 치료법과 함께 progesterone, GnRH-agonist 등의 호르몬 요법이 시도되고 있으나 그 치료의 효과와 부작용 등의 한계를 갖고 있다^{10,13)}.

자궁근종이 자궁근종세포에 의한 실질성 병변이므로, 한의학에서는 이를 瘀血과 痰濕으로 인식하고 行氣化瘀 혹은 祛瘀燥濕散結하여 腫塊를 없애는 것을 우선으로 하고 있다.⁴⁾

益母草는 活血調經, 祛瘀生新, 利水退腫의 작용이 있어 月經不調, 痛經, 經閉, 惡露不盡 등 月經病에 주로 사용되고 있는 婦科經產의 要藥이다¹⁴⁻⁵⁾.

최근 益母草에 대한 실험적 연구로는 흰쥐 대퇴동맥의 혈관경련에 미치는 영향¹⁹⁾, 홍화와 익모초가 CCl₄로 손상된 흰쥐의 간에 미치는 영향²⁰⁾, 家兔의 간장장애 및 고혈당에 미치는 영향²¹⁾ 등이 보고되어 있으며, 한편 자궁근종에 관한 실험적 연구로는 少腹逐瘀湯²²⁾, 鷄血藤²³⁾, 香附子²⁴⁾, 失笑散²⁵⁾, 桂枝茯苓丸²⁶⁾, 膈下逐瘀湯²⁷⁾, 蟠蔥散²⁸⁾, 五積散²⁹⁾ 등의 자궁근종세포의 증식억제와 유전자 활성화에 미치는 영향에 대한 보고가 있으나, 益母草가 자궁근종세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 婦科經產의 要藥인 益母草의 活血祛瘀의 효능이 자궁근종의 치료에 유효할 것으로 생각되어 益母草의 자궁근종세포에 대한 증식억제 효과, 세포주기 분석, 세포주기관련 유전자의 발현에 미치는 효과, 세포자멸사와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하여 유의한 결과를 얻었다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 藥材

脣形科(꿀풀과; Labiatae)에 속한 일년생 또는 이년생 초본인 익모초 (*Leonurus sibiricus* L.)는 대구한의대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을精選하여 사용하였다.

2) 檢液의 調製

실험에 사용된 약재는 일체의 가공이나 修治를 하지 않는 상태에서 사용하였으며, 益母草 80 g에 1차 증류수 1300 ml를 첨가한 후 2시간 30분 동안 증탕하여 검액 300 ml를 추출하였다. 추출한 검액을 100 ml가 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 한 뒤, -70°C 이하에서 24시간 이상 defreeze한 후 96시간 동안 완전히 동결 건조시켜 7.26 g의 粉末을 얻어 3차 증류수에 0.1 g/ml 농도로 용해시킨 후 상층 액을 0.2 μ m filter(Nalgene, USA)로 걸러서 실험을 실시하였다.

2. 實驗方法

1) 子宮筋腫 細胞의 일차 배양

자궁근종을 가진 환자의 전자궁적출술시에 자궁근종의 중심에서 가장자리로 향해 1/3 지점 부위를 수술 후 채취하였으며, 정상 자궁 조직은 근종에 인접한 정상 조직을 채취하였으며, 자궁근종의 선택은 자궁의 크기가 임신 12주 이상, 이차적 변성이 없는 부위를 선택하였다. 환자의 나이는 35~45세 사이의 환자로 하였으며 적출한 자궁의 자궁내막주기는 총 10예 중 증식기가 5예, 분비기가 5예로 하였다. 일차배양은 가능한 신선

한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단 한 후 15 ml 튜브에 옮겨 1000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액은 제거하였다. 이어 절단한 조직에 HEPES (25mM/L), penicillin (200 U/ml), streptomycin (200 μ g/ml), collagenase type IV (1.5 mg/ml), DNase (0.2 mg/ml)를 HBSS에 넣고 37°C 수조에서 3~4시간 동안 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일세포로 분리한 후 2000 rpm에서 다시 5분간 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다.

2) 자궁근종세포의 증식억제 검사 (MTS assay)

자궁근종 세포를 multi pipet을 사용하여 96 well plate에 4×10^3 개로 분주하였다. 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 시약을 처리하고 MTS 측정 시, one solution reagent(-20°C에 보관)를 실온에 90분 또는 37°C에 10분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media 200 μ l multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 부유된 후 well 당 100 μ l 보유하도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 μ l 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였으며 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를

광현미경으로 觀察하였다.

(5) DNA 分析

96-well plate에 10^6 cell을 넣고 24시간 동안 5% CO₂ 培養器에서 培養하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 적당한 濃度の 虎杖根 추출물을 처리하고 24시간 培養한 후 trypsin을 처리하여 細胞를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 細胞를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하고 -20°C에 16시간 이상 넣어두었다. 4°C에서 800 x g로 5분간 원심분리하여 에탄올을 완전히 제거한 후 20 μ l의 lysis buffer (2 mM EDTA, 100 mM Tris · Cl (8.0), 0.8% SDS)를 넣은 다음 2 μ l 50 mg/ml RNase A를 넣고 혼합하였다. 37°C에서 최소한 30분간 培養한 후 10 μ l의 Proteinase K를 넣어 50°C에서 최소한 1시간 30분 培養하였다. 8 μ l의 4x DNA loading buffer를 넣은 후 1.8% SeaKem agarose gel에서 TBE buffer로 sample을 50 Volt로 running하여 DNA를 분리시켰다.

(6) 細胞週期 分析

96-well plate에 10^6 cell을 넣고 24 시간 5% CO₂ 培養器에서 培養하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 적당한 濃度の 약품을 처리한 후 24 시간 培養한 다음 trypsin을 처리하여 細胞를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 細胞를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하였다. 300 x g로 5분간 원심분리 한 후 침전물에 1ml의 PBS를 넣어 300 x g로 5분간 원심분리로 水洗처리하고 다시 한 번 PBS로 수세하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 μ l의 PI 염색약

(0.1% Triton X-100, 200 μ g/ml RNase A, 20 μ g/ml propidium iodide in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 15 분간 培養하였다. Flow cytometry (Beckton Dickinson社)로 cell fluorescence를 측정하여 細胞週期를 분석하였다.

(7) Mitochondria membrane potential 測定

Mitochondria의 membrane potential 變化는 Rh123으로 염색하고 난 뒤 flow cytometry에 의해 결정하였다. 96-well plate에 10^6 cell을 넣고 24 시간 5% CO₂ 培養器에서 培養하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 적당한 濃度の 虎杖根을 처리하고 24시간 培養한 후 trypsin을 처리하여 細胞를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 細胞를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30 분간 고정하였다. 300 x g로 5분간 원심분리 한 후 침전물에 1ml의 PBS를 넣어 300 x g로 5분간 원심분리로 수세처리하고 다시 한 번 PBS로 수세하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 μ l의 Rh123 염색약 (5 μ g/ml rhodamine 123 in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 30분간 培養하였다. 細胞를 PBS로 수세한 후 FACS Calibur로 cell fluorescence를 측정하였다.

III. 結 果

1. ME-180 細胞에 대한 成長抑制 效果

虎杖根 추출액을 다양한 濃度(0, 0.63, 1.25, 2.5 mg/ml)로 처리한 결과, 48시간 후 虎杖根 추출액 1.25 mg/ml 존재하에서 약 60%의 細胞가 枯死하였고 虎杖根 濃度の 增加에 따라 세포생존율이 점차 減少됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 이 結果는 虎杖根이 ME-180 細胞에 대해 濃度와 시간에 따라 細

胞成長을 抑制함을 나타낸다. 아울러 ME-180 細胞에 대해 虎杖根 추출액 1mg/ml 을 처리한 후 그 형태를 광학현미경으로 觀察하였다. 虎杖根 추출액을 처리하지 않은 細胞群에서는 대부분 크고 둥글거나 다각형의 細胞形을 나타내었으나 虎杖根 추출액을 처리한 細胞群에서는 細胞들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있는 형태를 나타내었다.

Concentration of Pc (mg/ml)	Cell Viability
0	100
0.63	88.1 ± 12.7
1.25	41.7 ± 3.1
2.5	36.7 ± 2.5

Data are expressed as means +standard deviation. Data were analyzed for statistical significance by Student's t-test. P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Fig. 1. Growth-inhibitory effect of *Polygonum cuspidatum*(Pc) extract on ME-180 cells.

ME-180 cells were incubated with various concentrations of Pc for 48 hrs and cytotoxicity was measured by MTT assay.

2. ME-180 細胞에 대한 apoptosis 效果

虎杖根 추출액 1 mg/ml 존재하에서 48시간만에 일어나는 형태적 變化를 AcOr/EtBr 와 PI로 염색하고 조사한 결과, ME-180 細胞는 apoptosis가 일어난 細胞에서 觀察되는 특징적인 축소된 細胞, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies를 나타내었다.

3. DNA fragmentation 分析

虎杖根 추출액 1.5 mg/ml을 처리한 후 48시간 만에 ME-180 細胞에서 분리한 genomic DNA(Fig. 2, lane 2)는 대조군(Fig.

2, lane 1)에 비해 뉴클레오솜 크기의 DNA 가 낮은 비율이나마 형성되었다. 이로 미뤄 볼 때 虎杖根에 의한 DNA fragmentation 유도효과는 그리 높지 않은 것으로 여겨진다.

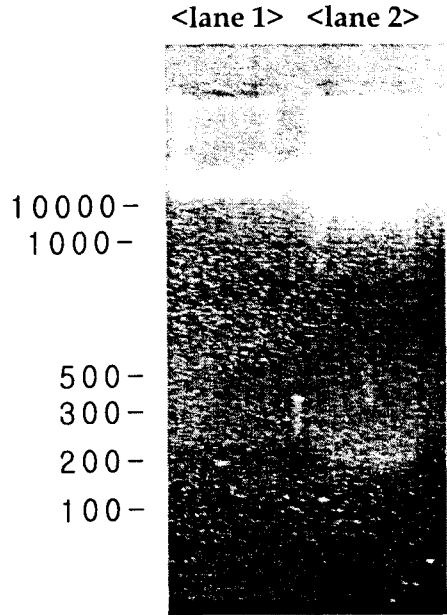


Fig. 2. Pc-induced DNA fragmentation analysis in ME-180 cells.

ME-180 cells were cultured in the presence of Pc for 48 hr, and genomic DNA was extracted and separated by 1.8% agarose gel. lane 1; 0 mg/ml Pc, and lane 2; 1.5 mg/ml Pc. Left numbers indicate the size of DNA in base pairs.

4. 細胞週期 分析

虎杖根 추출액 1 mg/ml을 처리하여 24시간 培養한 후 cell cycle 분포를 flow cytometer로 분석하였다(Fig. 3). 虎杖根을 처리하지 않은 細胞群(control)에서는 apoptosis를 일으킨 細胞, 즉 M1의 비율이 0.23%에 불과하였으나 虎杖根을 처리한 細胞群에서는 7.91%로 增加함을 觀察할 수 있었다.

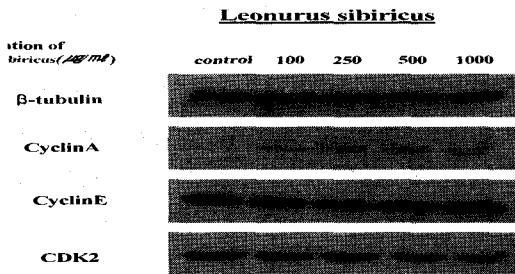


Fig. 3. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Leonurus sibiricus*. Effect of *Leonurus sibiricus* on Cyclin A, Cyclin E, CDK2 in uterine leiomyoma cells. *Leonurus sibiricus* enhanced the expression of Cyclin A. β -tubulin was used as internal control.

4. 益母草가 p53, p21, p27 및 pro-caspase 3의 발현에 미치는 영향

자궁근종세포에 益母草 검액을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리하고 24시간 후 발현을 관찰한 결과, 농도가 높을수록 p53과 p27의 발현이 증가하였으며 p21과 pro-caspase 3의 발현은 변화가 없었다(Fig. 4).

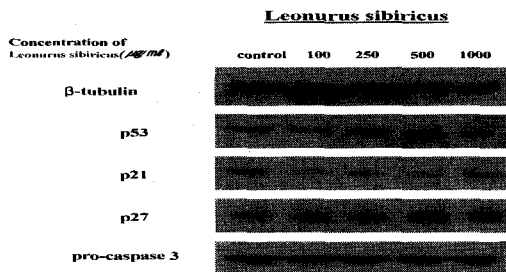


Fig. 4. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of *Leonurus sibiricus*. Effect of *Leonurus sibiricus* on p53, p21, p27, pro-caspase3 in uterine leiomyoma cells. *Leonurus sibiricus* enhanced the expression of p27 and p53. β -tubulin was used as internal control.

5. 益母草의 세포자멸사 유도효과

자궁근종세포에 益母草 검액을 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리하고 24시간 후 DNA fragmentation을 분석한 결과, 대조군에 비하여 益母草의 농도가 증가할수록 DNA의 분절현상이 증가하는 경향이 있으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

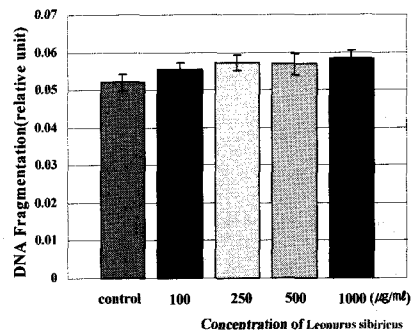


Fig. 5. Bars show to analyze fragmentation of genomic DNA, cells were treated for 24hrs with control and *Leonurus sibiricus*.

IV. 考 察

자궁근종은 자궁에 발생하는 가장 흔한 양성종양으로 가임기 여성의 30% 이상에서 볼 수 있고, 그 중 40~50%는 무증상으로 존재하나 20~40%는 복부 압박감, 비정상 질출혈, 월경과다, 월경통, 성교통, 유산 심지어 불임 등의 증상이 나타날 수 있다. 또한 빈번하고 과다한 질 출혈로 부득이 수술이 필요한 경우 수술전에 빈혈을 교정해야만 할 때도 있다.

발생 원인은 아직 확실하지 않으나 자궁근내의 단일근세포로부터 발생한다는 일부 연구보고가 있다. 그러나 임신중에는 빠르게 성장하고 폐경 후에는 소멸되

거나 위축된다는 점 등으로 난포호르몬이 관여하는 것으로 알려져 GnRH analogue의 약물요법으로 치료하는 방법이 보고되고 있다. 예전의 자궁근종의 치료가 전자궁적출술이나 자궁근종절제술 등의 수술요법이었으나 최근에는 수술의 난이도 감소와 수술시 출혈 등의 합병증을 줄이기 위한 전처치뿐만 아니라 비수술적 약물요법으로도 치료할 수 있다는 기대감이 증가하고 있다.¹³⁾ 게다가 자궁은 여성 정체성의 상징으로서 자궁제거로 인한 상실감은 수술 후에도 오랜기간 다양한 신체적 정신적 손상을 초래하고 성생활에 직접적인 영향을 주게 되므로, 개인의 삶의 질에 영향을 주게 된다³⁰⁾. 따라서 자궁동맥색전술¹¹⁾, 고주파자궁근종용해술¹²⁾ 같은 보존적 치료법과 함께 Progesterone, GnRH-agonist 등의 호르몬 요법이 시도되고 있으나 그 치료의 효과와 부작용 등의 한계를 갖고 있다^{1,2,13)}.

한의학에서는 복강내에 발생하는 종양을 積聚, 癥瘕, 痰癥, 痞塊, 腸覃, 石瘕, 血蠱 등의 범주에서 다루고 있으며³¹⁻²⁾, 이 중 여성의 생식기 및 그 주위에 발생하는 종양질환을 총칭하여 癥瘕라 한다³²⁻⁵⁾. 張景岳의 《景岳全書 婦人規 癥瘕類》³⁶⁾에서는 세부적으로 論證, 血癥, 食癥, 氣癥 등으로 분류하여 설명하고 있으며, 血癥을 여성의 복부에서 생길 수 있는 종괴성 질환을 포괄하는 것으로 보는데, 여기에는 자궁종괴, 난소종괴, 염증성 종괴, 자궁외 임신 등이 포함된다⁴⁾.

한방 치료는 기본적으로 비수술적 요법에 해당한다. 자궁근종은 자궁근종세포에 의한 실질성의 병변이므로 한의학에서는 氣滯血瘀 또는 痰濕壅聚로 인식

하고 行氣化瘀 혹은 祛瘀燥濕散結하여 腫塊를 없애는 것을 우선한다. 최근에는 치료시기에 따른 주기요법을 활용하여 비월경기에는 消癥에, 월경기에는 止血에 더 치중하고 있다. 비월경기에는 氣滯血瘀, 寒濕凝滯에 따라 膈下逐瘀湯, 桂枝茯苓丸 등을 활용한다. 반면 월경기에는 氣虛血瘀, 瘀熱交阻, 陰虛內熱에 따라 固本止崩湯, 逐瘀止血湯, 固經丸 등을 활용한다^{1,4)}.

본 논문의 실험에 사용된 益母草는 脣形科(꽃풀과; Labiatae)에 속한 일년생 또는 이년생 초본인 익모초 *Leonurus sibiricus L.*의 地上部를 건조한 것으로, 여름철에 莖葉이 무성하고 꽃이 피기 전에 채취하여 晒乾하였다. 그 성분은 leonurine, stachydrine, leonuridine, leonurinine 등 많은 alkaloid와 안식향산, 다량의 염화칼슘, lauric acid, linolenic acid, oleic acid, sterol, vitamin A, rutin 등의 flavonoid를 함유 한다¹⁴⁾.

益母草는 神農本草經 時代부터 사용된 약재로 婦人仙藥³⁷⁾, 經產良藥³⁸⁾ 등으로 칭해졌으며, 그 性味는 辛苦涼하고 歸經은 心包經과 肝經으로 入하여 活血, 祛瘀, 調經, 消水의 효능을 가지고 月經不調, 胎漏難產, 胞衣不下, 崩中漏下, 產後血暈, 瘀血腹痛, 痛經, 經閉, 惡露不盡, 胎死腹中, 子宮整復, 尿血, 打撲傷, 水腫尿少 등^{14,37-42)}을 치료하는 약물이다.

실험적 연구로는 자궁평활근에 대한 수축작용이 주로 보고되어 있고, 반면에 장관평활근에 대해서는 이완작용이 보고되었다¹⁶⁻⁸⁾.

이에 저자는 전술한 효능을 가진 益母草가 자궁근종에 유효한 효력이 있을 것으로 생각되어 자궁근종을 가진 환자로

부터 적출된 자궁근종을 일차배양하여 자궁근종세포의 증식억제효과, 세포주기 관련 유전자의 발현에 미치는 효과, 세포주기 분석, 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향에 대하여 연구하여 유의한 결과를 얻었다.

먼저 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 益母草 검액을 子宮筋腫 세포에 투여하고, 대조군으로 비침가군을 설정한 뒤 24, 48, 72 시간별 경과를 관찰한 후 세포를 회수하여 생존세포수를 측정한 결과, 농도가 증가할수록 시간이 지날수록 자궁근종세포의 증식이 억제되는 것을 관찰할 수 있었고, 24시간 후의 증식억제효과는 대조군에서는 생존율이 100%인 반면 益母草 검액 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 증식 억제 효과가 나타났다(Fig 1).

진핵세포의 세포주기는 DNA 합성의 조절 시기에 따라 합성전기(G1 phase), 합성기(S phase), 합성후기(G2 phase), 유사분열기(M phase)로 나눌 수 있는데, 많은 종류의 세포에서 세포주기의 주요 조절점(control point)은 합성전기의 후반에 있어서 합성전기(G1 phase)에서 합성기(S phase)로의 진행을 통제하며, apoptosis가 일어나면 합성전기에서 합성기로 넘어가지 못하고, sub G1이라고 불리는 apoptosis 단계에 머물러 더 이상 발전하지 못하는 세포의 비율이 늘어난다⁴³⁻⁴⁴.

益母草가 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 효과를 확인하였으므로 益母草가 cell cycle에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁근종세포에 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 처리하고 24시간 후 유세포분석기를 이용하여 세포주기를

분석한 결과 S-phase의 감소, G1 phase의 연장으로 세포의 증식이 지연됨을 관찰하였다(Fig. 2).

G1/S phase에서 특정하게 작용을 나타내는 G1 cyclin으로는 type A, D, E 등이 있으며 cyclin E는 G1 phase 말기에 발현되어 CDK2(cyclin dependent kinase)와 결합하여 G1/S phase 전이기에 CDK2의 활성도가 최고조에 달하도록 도와, G1/S 전이에 필수적인 인자이다⁴³⁻⁴⁴.

세포의 주기를 정확히 조절하기 위해서 세포는 cyclin이나 CDK같은 positive regulator이외에도 CDKI(cyclin dependent kinase inhibitor)들은 가지고 있으며 이들은 cyclin-CDK 복합체의 CDK 활성을 저해하여 세포주기를 조절하는 negative regulator로서 필수적인 인자들로 알려져 있는데 한 종류는 p27, p57, p21 등이며 다른 한 종류는 p15, p16, p18, p19, p20 등이다⁴³⁻⁴⁴.

CDKI 중에서 p27은 세포내에서 항상 일정량으로 발현되고 있는것으로 p27은 cyclin 혹은 cyclin-CDK 복합체와 결합할 수 있는데 특히 cyclin E-CDK2복합체에 결합하여 CDK의 활성을 저해하며 G1/S phase의 정지(arrest)를 유발하게 됨으로써 apoptosis를 유도하게 된다⁴⁵⁻⁶.

p53 유전자의 발현은 많은 종류의 세포에서 apoptosis에 관여하고 있다. p53은 손상받은 DNA를 지닌 세포로 하여금 분열을 하지 못하도록 세포주기를 중단시킨다는 관점에서 볼 때, genome의 방패역할을 한다 하겠다. 만약 심각한 DNA 손상을 입은 세포가, 다음 세포분열 주기로 들어가기 전에 DNA가 복구되지 못하면 p53은 apoptosis를 유발하며

G1/S phase 진행에 있어서 G1 checkpoint의 조정자 역할을 한다. 또한 p53은 CDKI 중 하나인 p21의 생성을 유도하게 되며 p21은 CDK와 결합하여 G1 phase arrest를 유도하고, 세포는 손상된 DNA의 복구를 하게 된다. 이때 만약 손상된 DNA의 복구가 실패한 경우에는 p53에 의하여 세포는 apoptosis 과정을 거쳐 사망에 이르게 되며 비정상적인 세포의 증식을 차단하는 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾.

위의 실험에서 세포주기 분석을 통하여 G1 phase arrest를 확인하였으며 세포주기와 관련한 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 자궁근종세포에 益母草를 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리하고 24시간 후 G1/S 단계에 관계하는 Cyclin A, Cyclin E, CDK2 및 p53, p21, p27, pro-caspase3에 대하여 western blot 분석을 통하여 조사한 결과, p53과 p27 유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 Cyclin A, Cyclin E, CDK2, p21 및 pro-caspase3의 발현은 변화가 없었다(Fig. 3,4).

또, 세포자멸사 유도효과를 관찰하기 위하여 DNA fragmentation을 실시한 결과, DNA의 절단정도가 농도가 증가할수록 증가하고 있으나 유의성 있는 증가는 없었다(Fig. 5).

위의 실험을 통하여 확인된 益母草의 자궁근종세포에 대한 효과는 세포주기의 연장을 통한 자궁근종세포의 증식을 억제하는 효과가 있으며 p27, p53 유전자의 증가로 G1 phase 연장을 유발하여 세포자멸사를 유도할 것으로 추측되나 pro-caspase 3의 변화와 DNA fragmentation의 효과가 나타나지 않아

세포자멸사 효과에 대한 연구는 향후 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

益母草가 자궁근종세포의 증식억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 益母草 검액을 농도별로 처리한 후 증식억제 효과와 세포주기 분석 및 세포주기관련 유전자 분석을 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 일차 배양된 자궁근종세포에 益母草를 처리한 결과, 24시간 후 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 증식 억제 효과가 나타났으며 100, 250, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 농도가 증가할수록 시간이 지날수록 증식이 억제되었다.
2. 益母草를 농도별로 처리하고 24시간 후 세포주기를 분석한 결과, S phase의 감소, G1 phase의 연장으로 세포의 증식이 지연되었다.
3. 益母草를 농도별로 처리하고 24시간 후 G1 단계에 관계하는 단백질 발현을 관찰한 결과, p27, p53 유전자는 발현이 증가하였으나 Cyclin A, Cyclin E, CDK2, p21 및 pro-caspase 3의 발현은 변화가 없었다.
4. 益母草 처리 후 세포자멸사의 특징인 DNA fragmentation이 처리 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.

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

參考文獻

1. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울:정담. 2001:305-10.
2. 대한산부인과학회. 부인과학 제3판. 서울:도서출판 칼빈서적. 1997:165-83.
3. 이란옥 등. 자궁근종에 대한 임상통계학적 관찰. 대한산부회지. 1994:37(11):2216-26.
4. 이태균. 자궁근종에 관한 고찰. 대한한방부인과학회지. 2003:16(1):164-9.
5. 김기철 등. 성선자극호르몬 유리호르몬 협동제로 전처치된 자궁근종 내 인슐린양 성장인자 및 그 결합단백의 양상에 관한 연구. 대한내분비학회지. 1997:12:364-75.
6. 김정구 등. 자궁근종조직내 인슐린유사 성장인자(IGF-Ia,IGF-Ib,IGF-II) 전령리보핵산 발현양상. 대한산부회지. 1999:42:777-83.
7. 김정구 등. 17 β -estadiol이 배양된 인간 자궁근종조직과 정상자궁근조직에서 인슐린 유사 성장인자들과 그 결합단백질들의 mRNA발현 및 인슐린 유사성장인자들의 분비에 미치는 영향. 대한산부회지. 1998:41:1575-85.
8. Kim JG et al. Decreased expression of mac25 mRNA in uterine leiomyomata compared with adjacent myometrium. Am J Reprod Immunol. 2000:43:53-7.
9. 임경실, 김정구. 자궁근종조직 및 정상자궁근조직에서 에스트로젠 수용체 알파, 베타 및 인슐린 유사 성장인자 결합단백질 관계 펩티드-1 전령리보핵산의 발현양상. 대한산부회지. 2002:45:391-7.
10. 조현희 등. 자궁적출술시 부속기절제 유무에 따른 성호르몬의 변화. 대한산부회지. 2001:44(12):2283-8.
11. 홍진화 등. 자궁동맥색전술을 이용한 자궁근종의 치료. 대한산부회지. 2004:47(3):481-6.
12. 조현희 등. 고주파 자궁근종용해술: 근종의 새로운 보존적 치료. 대한산부인과학회지. 2005:48(9):2166-71.
13. 도효신 등. 자궁근종의 약물치료(GnRH- agonist)에 대한 효용성에 관한 연구. 대한산부회지. 1998:41(1):67-75.
14. 전국한의대 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1998:422-3.
15. 金在佶. 원색천연약물대사전(상). 서울:남산당. 1997:171.
16. Kong, Y.C. and K.H. Ng. *Experientia*. 1974:30:1281.
17. Yeung, H.W. et al. *Cheng. Planta Medica Bd*. 1977:31:51-6.
18. 潘思源 등. 芫蔚子總碱和水蘇碱收縮離体小鼠子宮的比較. *中草藥*. 1998:29(10):687-8.
19. 정용발 등. 益母草 물추출물이 흰쥐 대퇴동맥의 혈관경련에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003:18(2):169-78.
20. 기성식 등. 紅花와 益母草가 CCl₄로 손상된 흰쥐의 간에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001:16(2):79-89.
21. 서화중 등. 益母草綠汁이 家兔의 간장장애 및 고혈당에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 1987:16(1):22-8.
22. 이영림, 백승희. 소복축어탕(少腹逐

- 療湯)이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):1-17.
23. 박영선 백승희. 鷄血藤의 Beta-sitosterol 성분이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사의 유도에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(1):181-91.
24. 김동철 등. 향부자가 자궁근종세포의 성장억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):18-33.
25. 백승희, 김동철. 失笑散이 자궁근종세포의 증식억제와 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):29-42.
26. 김진희, 백승희. 桂枝茯苓丸이 자궁근종세포의 성장억제와 MAP kinase 활성화에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2001;14(2):85-101.
27. 김소연, 백승희. 膈下逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식과 MAP Kinase 활성화 및 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(4):1-16.
28. 김윤근 등. 蟠蔥散이 자궁근종세포의 사멸과 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):34-44.
29. 전미혜 등. 五積散이 자궁근종세포의 사멸과 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):45-55.
30. Butts, p. Meeting the special needs of your hysterectomy. *Nursing*. Nov. 1979;40-7
31. 이경변, 송병기. 癥瘕病態에 관한 문헌적 고찰. 서울:동양의학연구원. 1980;5:46-50.
32. 송병기. 한방부인과학. 서울:행림출판사. 1978:249-57.
33. 배은경 등. 자궁근종의 한의학적 접근. 대한한방부인과학회지. 1994;7(1):79-86.
34. 김상우 등. 癥瘕환자에 대한 임상적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1991;4(1):23-8.
35. 이종화. 한방부인과임상진료. 서울:계축문화사. 1982:264-287,514-7.
36. 張景岳. 景岳全書. 서울:대성출판사. 1998:251-64,288.
37. 李梴. 醫學入門. 서울:대성문화사. 1989:210.
38. 汪昂. 本草備要. 서울:고문사. 1984:45.
39. 신길구. 申氏本草學. 서울:수문사. 1982:552-4.
40. 신재용. 方藥合編解說. 서울:성보사. 1998:549.
41. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:1917
42. 李時珍. 本草綱目. 서울:고문사. 1980:555-7.
43. 김승철. Cell cycle and Apoptosis. 이화여자대학교 의과대학 산부인과 교실 춘계심포지엄. 1998:23-42.
44. 서민호, 백원기. 세포주기조절과 apoptosis. 계명의대논문집. 1996;15(4):381-93.
45. Peters G. Stifled by inhibitions. *Nature*. 1994;371:204-5.
46. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclin D.

Cell. 1993;73:1059-65.
47. 김승철. Cell cycle and Apoptosis. 이

화여자대학교 의과대학 산부인과 교
실 춘계심포지엄. 1998:23-42.