

天南星이 HeLa cell의 增殖抑制와 apoptosis에 미치는 影響

경희대학교 한의과대학 부인과학교실

배우진, 조정훈, 장준복, 이경섭

ABSTRACT

Inhibitory effects of Arisaematis rhizoma (天南星) on cell proliferation in HeLa cell

Woo Jin Bae, Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-sub Lee
Dept. of Oriental Gynecology, college of Oriental Medicine,
Kyung Hee University

Purpose : This study was undertaken to evaluate the inhibitory effects of Arisaematis rhizoma on the cell proliferation in HeLa cells.

Methods : The cultured cell after treatment in the different duration in 24, 48, 72 hours with solution of 1%, 5%, 10% Arisaematis rhizoma was quantified by trypan blue exclusin method. The control group was treated with 2% FBS in the different duration in 24, 48, 72 hours. We examined DNA of activated caspase by FACS analysis, caspase-3 activity, DNA fragmentation by DNA laddering, activity of HeLa Cells by the XTT assay, activity of MAP kinase by RT-PCR analysis.

Results : After 72 hours culture, the growth activities of 1%, 5%, 10% Arisaematis rhizoma-treated Hela cell were significantly reduced with control group, respectively. After 24 hours culture, the ratio of cells showing caspase activity by FACS analysis were increased in 1%, 5%, 10% Arisaematis rhizoma-treated Hela cell. It were also increased in 48 hours culture of 10% and 72 hours culture of 5%, 10% Arisaematis rhizoma-treated Hela cell. In 24, 48 and 72 hours culture, DNA fragmentations of 5%, 10% Arisaematis rhizoma-treated Hela cell were obviously observed. These results meant that Arisaematis rhizoma induces apoptosis of HeLa cells. It was supported by increased caspase-3 activity and decreased MAP kinase activity according to time periods and concentrations of Arisaematis rhizoma solution.

Conclusion : The study shows that Arisaematis rhizoma has inhibitory effect on cell proliferation and induction capacity of apoptosis of human cervical carcinoma cell line, HeLa cells, in vitro. These results suggest that Arisaematis rhizoma should be useful for treatment of human cervical carcinoma.

Key Words : Arisaematis rhizoma, human cervical carcinoma, HeLa cell, cell proliferation, DNA fragmentation, caspase, MAP kinase

I. 緒 論

한국 여성에서 子宮頸部癌은 가장 빈도가 높은 여성 생식기의 대표적 악성종양으로¹⁾ 발병원인은 정확히 알려져 있지 않으나 早婚, 지나친 性生活, human papilloma virus (HPV) 感染 등이 유력하다. 임상 증상은 폐경 후나 성교 후 간헐적 질 출혈, 악취가 나는 질 분비물, 골반통, 요통, 요로 증상, 빈혈, 임파절 종대, 피로감, 체중감소 등이 있고, 환처에는 궤양, 괴사 및 큰 버섯모양의 종괴가 발생하며, 말기에는 감염 부위의 출혈, 요독증, 악액질 등으로 사망하게 된다¹⁻³⁾.

子宮頸部癌의 치료방법으로는 수술 요법, 방사선 요법, 항암 화학요법 등²⁾이 있으나 만성 방사선 대장염 등의 후유증을 야기할 수 있으므로⁴⁾ 인체에 무해하면서도 효과적인 치료법의 개발이 요구되고 있다.

韓醫學에서 子宮頸部癌은 증상적으로는 崩漏, 帶下, 血蠱, 五色帶下 등의 범주에 속하며^{2,5-7)} 질병개념으로는 癥瘕⁸⁾ 및 癰疽⁹⁾와 유사하다. 특히 癰疽는 氣血이 留滯不行하여 蓄毒, 膿成而潰하는 外科疾患⁹⁾으로, 外感六淫, 七情內傷, 內生痰飲 등의 원인으로 氣血이 막혀 잘 순환하지 못하고 뭉쳐서 발생하므로 托裏, 疏通 및 行營衛의 三法으로 치료한다¹⁰⁾.

韓藥 處方을 이용한 子宮頸部癌 치료 효능 연구로는 香稜丸¹¹⁾, 小腹逐瘀湯¹²⁾, 桂枝茯苓丸¹³⁾, 半枝蓮¹⁴⁾, 六合湯¹⁵⁾, 濟川煎¹⁶⁾, 柴胡疎肝散加味方¹⁷⁾, 七濟香附丸¹⁸⁾, 逍遙散加減¹⁹⁾, 斑玄丸²⁰⁾, 歸朮破癥湯²¹⁾, 乾漆散²²⁾, 荊蓬煎丸²³⁾, 加味礬石散²⁴⁾ 등이 있다.

天南星은 溫化寒痰藥으로 化痰散結의 효능이 뛰어나 腫양질환에 많이 配伍되며^{26,27)} 임상에서는 국소의 부위에 외치하는 방법과 내복하는 방법을 겸하여 사용되고 있다²⁸⁾. 天南星의 항암작용에 대해서는 D-mannitol의 항암활성이 밝혀져 있으며, in vitro 실험에서 농도별 HeLa cell 억제 작용이 일부 밝혀져 있으나²⁸⁾, 농도에 따른 시간별 세포활성의 관찰, 세포사멸 신호전달효소인 caspase 유전자 발현에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 著者는 天南星이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖抑制과 apoptosis에 미치는 影響을 알아보고자 농도별 天南星 檢液이 처리된 배양액에서 HeLa cell을 배양하여 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 MAP kinase 發顯 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 藥 材

天南星은 天南星科(Araceae)에 속한 多年生 草本인 天南星(Arisaema amurense MAX. var. Serratum NAKAI)의 등근 塊莖으로 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입하여 사용하였다.

2) 細胞培養

子宮頸部癌 세포주인 HeLa cell line을 ATCC社 (USA)로부터 구입하였다. RPMI 1640 media (Sigma, USA)를 기본 배지로 하고, 10% fetal bovine serum

(Hyclone, USA, 이후 FBS)와 1% penicilin/streptomycin 용액 (Sigma, USA)을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기 (Forma, USA)에서 HeLa cell을 배양하였다. Phosphate Buffered Saline (Gibco, USA, 이하 PBS)로 세포를 세척하고 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, USA)를 처리하여 분리한 후 1500 rpm에 5분간 원심분리 하였다. 이렇게 분리한 세포를 1:10의 비율로 繼代培養 하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造

天南星 100 g에 1.5 ℓ의 증류수를 가한 후 1시간 30분 동안 중탕하여 추출액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 0.45 μm filter (Gelma, Germany)로 여과하여 天南星 檢液을 製造한 후 실험에 사용하였다.

2) 實驗群 設定

대조군은 2% FBS만이 첨가된 배양액을 사용하였고, 실험군은 2% FBS와 1%, 5% 및 10% 농도의 天南星 檢液을 첨가한 배양액을 사용하였다.

3) 細胞增殖 測定

24-well culture plate dish (Nunc, Denmark)에 HeLa cell 1×10⁵개를 접종하여 24시간 동안 배양하고, 농도별 天南星 檢液을 처리하여 24, 48, 72시간 배양한 후에 trypan blue (Sigma, USA)로 염색하여 細胞增殖를 측정하였다.

4) 流細胞 分析

농도별 天南星 檢液을 처리한 HeLa cell을 trypsin으로 처리하여 분리한 후 이를 원심분리 하여 다시 1 ml PBS 용액에 resuspension 하였다. 여기에

intracellular caspase detection kit인 ApoStat antibody 10 μl를 처리하고 배양기에서 30분간 37 °C로 배양한 후 PBS로 씻어내었다. 이를 0.5 ml PBS 용액에 녹인 후 BD FACS vantage (Becton & Dickinson, USA)로 분석하였다.

5) Caspase-3 活性 測定

세포사멸에 핵심적인 역할을 하는 caspase-3의 활성을 측정하기 위해 caspase-3 ELISA kit (R&D system, USA)를 이용하였다. 농도별 天南星 檢液을 처리한 HeLa cell을 1,000 rpm에서 4분간 원심분리한 후, 100 μl의 lysis buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 2~4 mg/ml의 농도로 50 μl가 되게 하여 96-well flat plate에 분주하고, 여기에 50 μl의 2X running buffer와 1% DTT solution을 첨가하였다. 5 μl의 caspase-3 colorimetric substrate를 넣은 후 37 °C에서 2시간 동안 반응시켜 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6) DNA fragmentation 測定

농도별 天南星 檢液을 처리한 HeLa cell을 수거하여 triton-X 100 (Sigma, USA)을 첨가한 lysis buffer 1 ml로 분쇄하였다. 이를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액만 취한 후 10 μl의 5 M NaCl과 2-propanol을 첨가하여 DNA를 응축한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 DNA를 추출하였다. 추출 DNA를 2% agarose gel에 70 V로 1시간 30분 동안 전기영동 하여 세포사멸에 의하여 유도되는 DNA fragmentation을 관찰하였다.

7) 細胞活性 測定

96-well culture plate에 5×10³개의 HeLa cell을 접종한 후 24시간 동안 배양한 후 농도별 天南星 檢液으로 처리하여 24, 48, 72시간동안 배양하였다. 이후 2,3-Bis (2-methoxy4-nitro-5sulfophenyl)-2H tetrazolium-carboxanilide inner salt (JBI, Korea, 이하 XTT)와 phenazine methosulfate (JBI, Korea, 이하 PMS)를 배양액의 20%가 되도록 첨가한 후 4시간동안 처리하였다. XTT와 PMS 처리 후 450 nm 파장의 spectrophotometer (Beckman, Germany)를 사용하여 XTT tetrazolium ring 분해 산물인 formazan crystal의 흡광도로 細胞活性을 측정하였다.

8) MAP Kinase 活性 測定

농도별 天南星 檢液을 처리한 HeLa cell을 trypsin/EDTA로 분리하였다. 이를 PBS로 세척 후 TRIZOL reagent 1 ml를 처리하여 세포를 분쇄한 후, chloroform (Sigma, USA) 200 μ l를 첨가하여 ice에서 10분간 배양하였다. 이것을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 취하고 여기에 2-propanol 500 μ l를 첨가하여 13,000 rpm에서 다시 10분간 원심분리 하여 RNA를 응축하였다. 응축된 RNA를 70% 에탄올로 세척 후 건조시켜 20 μ l의 DEPC-DW에 녹였다.

추출한 RNA 1 μ g을 이용하여 SUPSCRIPT II cDNA synthesis kit로 cDNA를 합성하였다. cDNA template 1 μ l, internal marker인 GAPDH의 forward 와 reverse primer 각각 10 pmol 및 Taq polimerase 1 unit를 첨가한 후 93 $^{\circ}$ C 30 초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 PCR을 30 cycle 수행하였다. 세포 성장인자 marker인 MAP kinase도 동일한 방법으

로 수행하였으며 annealing 온도만 58 $^{\circ}$ C로 하였다.

PCR product를 1% agarose gel에 100V로 30분간 전기영동 하여 UV transiluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다. MAP kinase cDNA 분석을 위한 sequence는 GAPDH 5' primer (5'-accacagtccatgccatcac-3')와 GAPDH 3' primer (5'-tccaccacctgtgtgta-3')를 사용하여 PCR 정량을 실시하였다.

9) 統計處理

통계는 SPSS ver 8.0을 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고, 유의한 ($p < 0.05$) 것으로 판단될 경우 Tukey's B 법으로 multiple comparison test를 실시하였다.

III. 結果

1. 細胞增殖에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 2.00배, 5% 檢液群이 1.33배, 10% 檢液群이 1.33배로 측정되어 대조군의 2.00배에 비하여 유의한 차이가 없었다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 3.67배, 5% 檢液群이 3.33배, 10% 檢液群이 3.67배로 측정되어 대조군의 4.67배에 비하여 유의한 차이가 없었다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群이 4.33배, 5% 檢液群이 5.00배, 10% 檢液群이 5.67배로 측정되어 대조군의 10.33배에 비하여 유의한 增殖抑制 ($p < 0.05$)를 나타내었다 (Table I, Fig. 1, Fig. 2).

Table I. Inhibitory Effect on Cell Proliferation in Arisaematis Rhizoma-treated HeLa Cell In Vitro

	Initial concentration of HeLa cells ($\times 10^5$ cell/cm ²)	No. ($\times 10^5$ cell/cm ²) of HeLa cells after culturing for		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs
Control (n = 3)	1	2.00 \pm 0.00 ¹⁾	4.67 \pm 0.58	10.33 \pm 1.15 ^{a,2)}
Sample 1 (n = 3)	1	2.00 \pm 0.00	3.67 \pm 0.58	4.33 \pm 0.58 ^b
Sample 2 (n = 3)	1	1.33 \pm 0.58	3.33 \pm 0.58	5.00 \pm 0.00 ^b
Sample 3 (n = 3)	1	1.33 \pm 0.58	3.67 \pm 0.58	5.67 \pm 0.58 ^b
p-value ³⁾				p<0.05

1: Mean \pm standard deviation

2: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey's B multiple comparison.

3: Statistical significances were tested by ANOVA.

Control: Group with 2% FBS only

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Arisaematis rhizoma solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Arisaematis rhizoma solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Arisaematis rhizoma solution

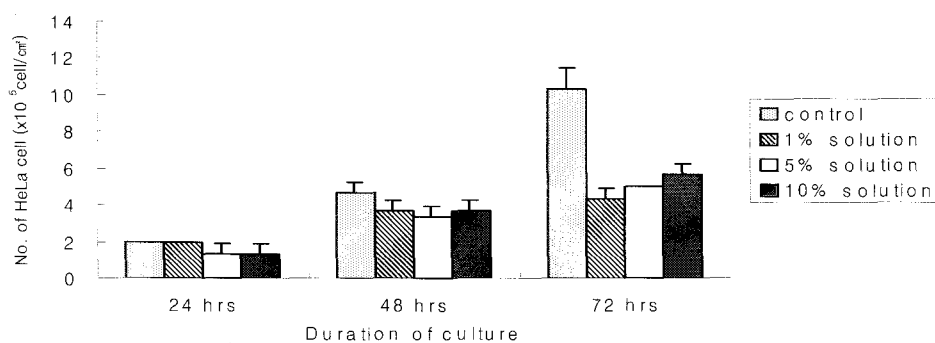


Fig. 1. Inhibitory effect on cell proliferation in Arisaematis rhizoma-treated HeLa cell in vitro

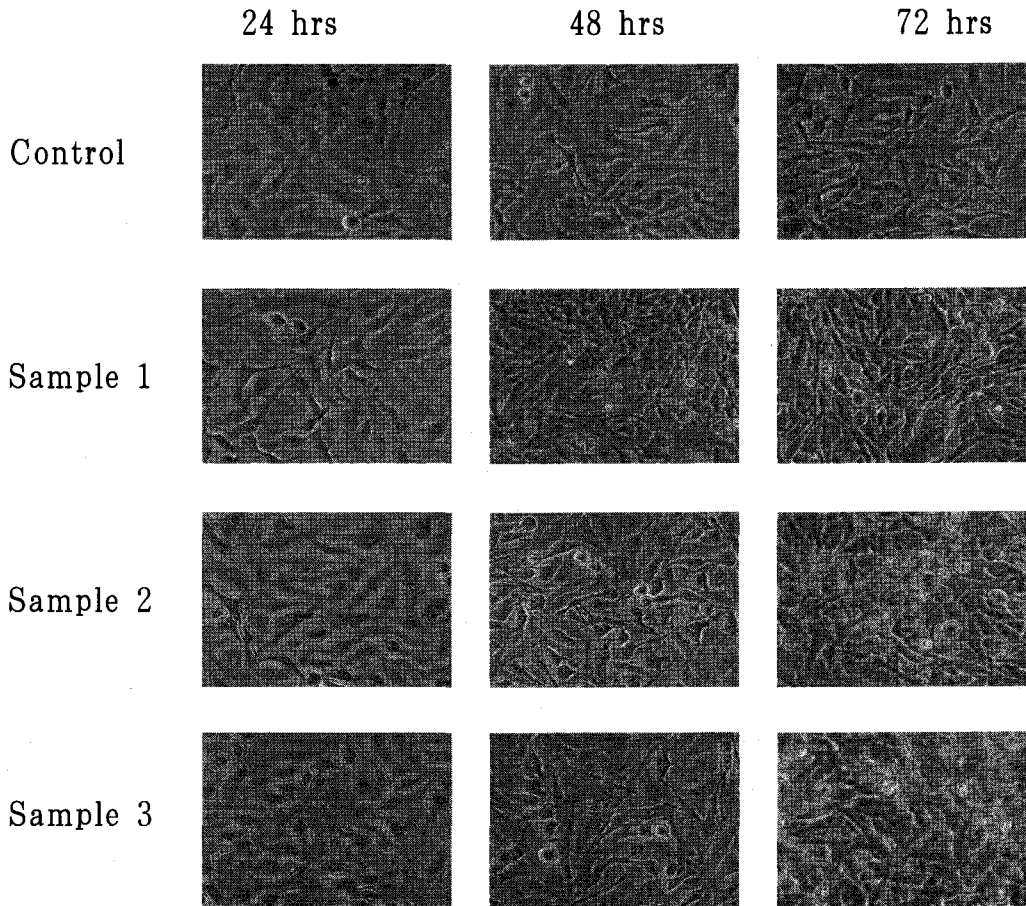


Fig. 2. Configurations of HeLa cells treated with different concentrated Arisaematis rhizoma solution

2. 流細胞 分析에 미치는 영향

24시간 배양 후 caspase 활성세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 22.44%로 측정되었다. 天南星 檢液群의 경우 1%, 5%, 10% 檢液群 각각 59.94%, 53.54%, 39.98%로 측정되어 대조군에 비하여 모두 증가하였다.

48시간 배양 후 caspase 활성세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 9.46%로

측정되었다. 天南星 檢液群의 경우 10% 檢液群에서 28.65%로 측정되어 대조군에 비하여 증가하였다.

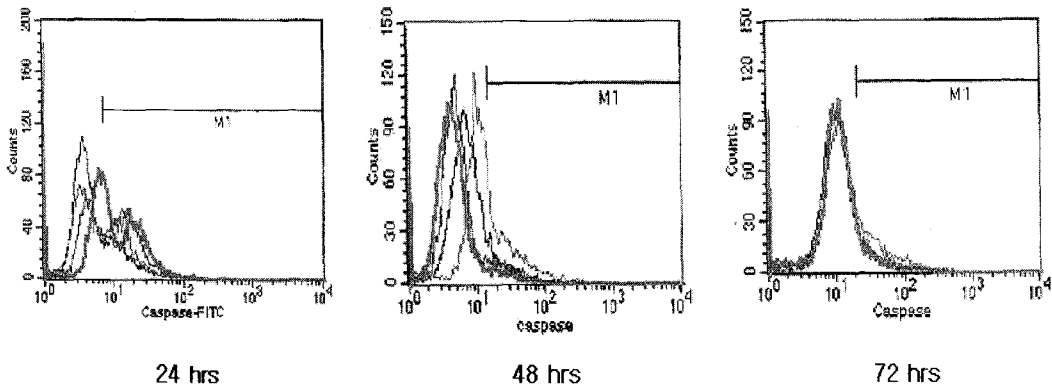
72시간 배양 후 caspase 활성세포의 비율을 조사한 결과 대조군은 8.31%로

측정되었다. 天南星 檢液群의 경우 5%, 10% 檢液群에서 각각 10.00%, 19.14%로 측정되어 대조군에 비하여 증가하였다 (Table II, Fig. 3).

Table II. Activated Caspase Expression in Arisaematis Rhizoma-treated HeLa Cell by FACS Analysis

	% of HeLa cells with activated caspase expression after culturing for		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Control	22.44	9.46	8.31
Sample 1	59.94	4.47	7.72
Sample 2	53.54	6.95	10.00
Sample 3	39.98	28.65	19.14

Control: Group with 2% FBS only
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Arisaematis rhizoma solution
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Arisaematis rhizoma solution
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Arisaematis rhizoma solution



Black : control, Green : 1% solution, Red : 5% solution, Blue : 10% solution
 Fig. 3. FACS analysis in Arisaematis rhizoma-treated HeLa cell

3. Caspase-3 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 活性도를 조사한 결과 대조군은 0.062로 측정되었다. 1%, 5%, 10% 天南星 檢液群에서 각각 0.079, 0.085, 0.064로 측정되어 대조군에 비하여 모두 증가하였다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 活性도는 대조군에서 0.063으로 측정되

었다. 1%와 5% 天南星 檢液群은 각각 0.078과 0.072으로 측정되어 대조군에 비하여 증가하였다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 活性도는 대조군에서 0.075로 측정되었고 1%, 5%, 10% 天南星 檢液群에서 각각 0.050, 0.068, 0.055로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다 (Table III, Fig. 4).

Table III. Caspase-3 Activity in Arisaematis rhizoma-treated HeLa Cell

	Caspase-3 activity of HeLa cells after culturing for		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Control	0.062	0.063	0.075
Sample 1	0.079	0.078	0.050
Sample 2	0.085	0.072	0.068
Sample 3	0.064	0.062	0.055

Control: Group with 2% FBS only

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Arisaematis rhizoma solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Arisaematis rhizoma solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Arisaematis rhizoma solution

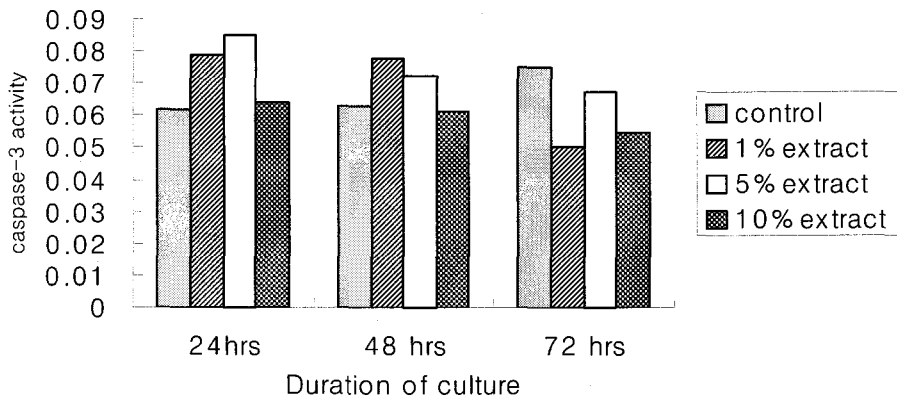


Fig. 4. Caspase-3 activity in Arisaematis rhizoma-treated HeLa cell

4. DNA fragmentation에 미치는 影響

농도별 天南星 檢液 처리 후 HeLa cell의 DNA fragmentation은 5%와 10%군에서 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 모두 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 5).

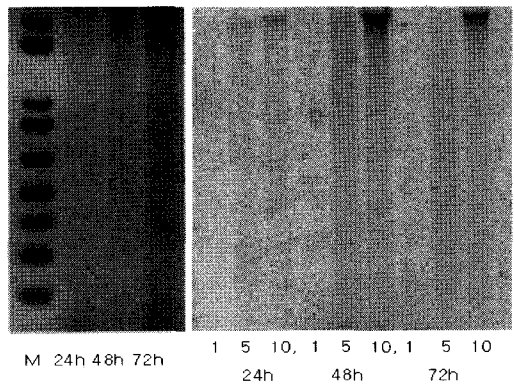


Fig. 5. DNA fragmentation of Arisaematis rhizoma-treated HeLa cell

5. 細胞活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 대조군의 세포활성도를 XTT assay로 확인한 결과 0.65 ± 0.16 으로 측정되었다. 1%와 5% 天南星 檢液群에서는 각각 0.57 ± 0.07 과 0.61 ± 0.06 으로 측정되어 대조군에 비하여 감소하였으나 유의한 차이는 없었고 10% 天南星 檢液群에서 0.84 ± 0.04 로 측정되어 대조군에 비하여 유의한 증가 ($p < 0.05$)를 나타내었다.

48시간 배양 후 대조군의 세포활성도는 0.78 ± 0.13 으로 측정되었다. 1%, 5%, 10% 天南星 檢液群에서 각각 0.72 ± 0.13 ,

0.74 ± 0.06 , 0.77 ± 0.13 으로 측정되어 대조군에 비하여 감소하였으나 유의한 차이는 없었다.

72시간 배양 후 대조군의 세포활성도는 0.77 ± 0.04 로 측정되었다. 1%와 10% 天南星 檢液群에서는 0.75 ± 0.09 와 0.64 ± 0.17 로 측정되어 대조군에 비하여 감소하였으나 유의한 차이는 없었고 5% 天南星 檢液群에서 0.82 ± 0.10 으로 측정되어 대조군에 비하여 유의한 증가 ($p < 0.05$)를 나타내었다 (Table IV, Fig. 6).

Table IV. XTT Activity in Arisaematis Rhizoma-treated HeLa Cell

	XTT activity of HeLa cells after culturing for		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Control(n=3)	$0.65 \pm 0.16^{1),a,2)}$	0.78 ± 0.13	$0.77 \pm 0.04^{a,b,2)}$
Sample 1(n=3)	0.57 ± 0.07^a	0.72 ± 0.13	$0.75 \pm 0.09^{a,b}$
Sample 2(n=3)	0.61 ± 0.06^a	0.74 ± 0.06	0.82 ± 0.10^b
Sample 3(n=3)	0.84 ± 0.04^b	0.77 ± 0.13	0.64 ± 0.17^a
p-value ³⁾	$p < 0.05$		$p < 0.05$

1: Mean±standard deviation

2: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey's B multiple comparison.

3: Statistical significances were tested by ANOVA.

Control: Group with 2% FBS only

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Arisaematis rhizoma solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Arisaematis rhizoma solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Arisaematis rhizoma solution

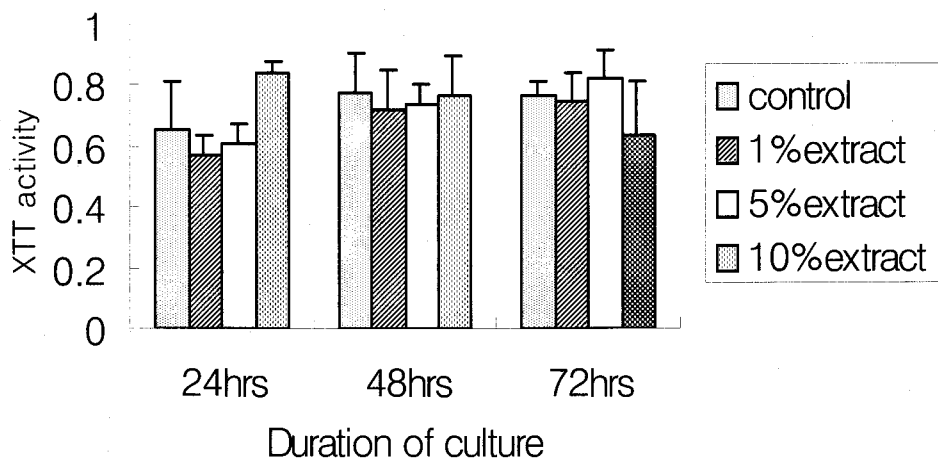


Fig. 6. XTT activity in Arisaematis rhizoma-treated HeLa cell

6. MAP kinase 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 72522 CNT/mml로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 天南星 檢液群의 MAP kinase 활성도는 각각 71382 CNT/mml, 66134 CNT/mml, 65607 CNT/mml로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 71083 CNT/mml로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 天南星 檢液群의 MAP kinase 활성

도는 각각 70344 CNT/mml, 62310 CNT/mml, 63000 CNT/mml로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 활성도를 조사한 결과 대조군은 70753 CNT/mml로 측정되었고, 1%, 5%, 10% 天南星 檢液群의 MAP kinase 활성도는 각각 68367 CNT/mml, 67205 CNT/mml, 61008 CNT/mml로 측정되어 대조군에 비하여 모두 감소하였다 (Fig. 7, Table V, Fig. 8).

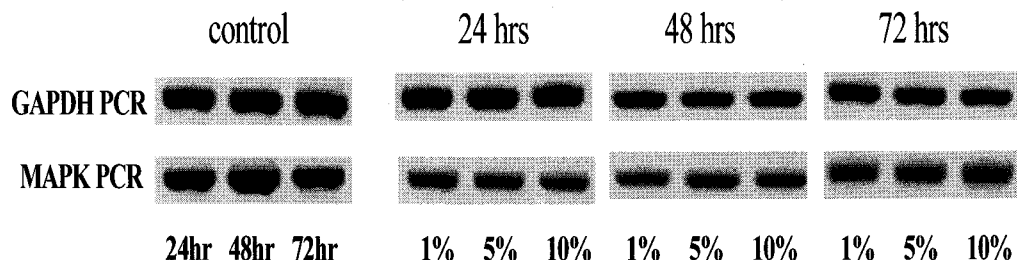


Fig. 7. MAP kinase activity in Arisaematis rhizoma-treated HeLa cell

Table V. MAP Kinase Activity in Arisaematis rhizoma-treated HeLa Cell

	Density of MAP kinase activity (CNT/mm ²) of HeLa cells after culturing for		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Control	72522	71083	70753
Sample 1	71382	70344	68367
Sample 2	66134	62310	67205
Sample 3	65607	63000	61008

Control: Group with 2% FBS only
 Sample 1: Group with 2% FBS and 1% Arisaematis rhizoma solution
 Sample 2: Group with 2% FBS and 5% Arisaematis rhizoma solution
 Sample 3: Group with 2% FBS and 10% Arisaematis rhizoma solution

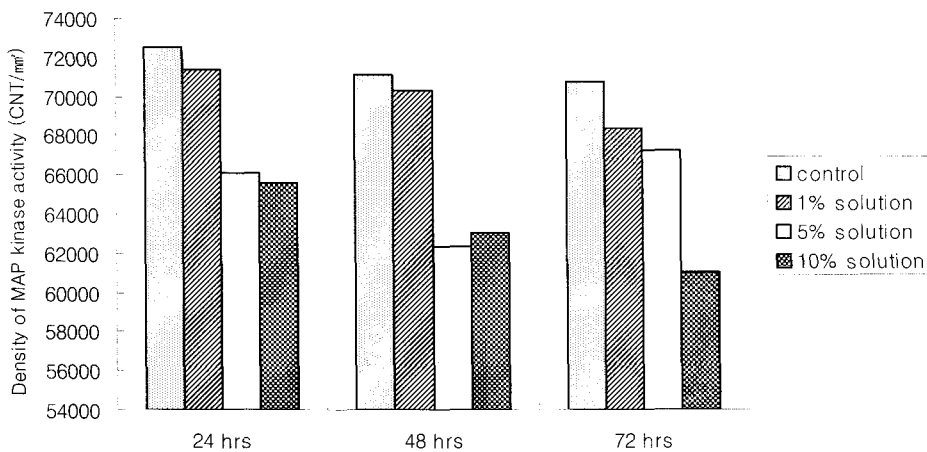


Fig. 8. MAP kinase activity in Arisaematis rhizoma-treated HeLa cell

IV. 考 察

子宮頸部癌은 여성 생식기의 악성종양 중에서 발생빈도가 가장 높으며, 대다수가 35~55세에 발병한다²⁹⁾. 최근에는 부인질환의 진단과 치료기술의 발달로 조기진단과 조기치료가 이루어지고 치료에 후 또한 크게 개선되고 있으나 아직까지

골반암종을 가진 여성들의 가장 흔한 사망원인이다²⁹⁻³¹⁾.

子宮頸部癌의 치료는 환자의 연령, 차 후 임신을 원하는 가의 여부, 병소의 정도, 범위 및 위치, 암의 임상적 진행병기에 따라 다르다³²⁾. 방사선 요법 및 화학요법은 불가피하게 주변 장기 및 조직의 손상을 유발할 수 있으므로 이차적 합병

증의 우려가 없는 치료방법의 모색이 필요하다³³⁾.

韓醫學에서 子宮頸部癌은 증상적으로는 崩漏, 帶下, 血蠱, 五色帶下 등의 범주에 속하며^{2,5-7)} 질병개념으로는 癥瘕⁸⁾ 및 癰疽⁹⁾와 유사하다.

癥瘕는 여성의 생식기인 자궁, 난관, 난소 및 그 주위에 호발하는 腫塊로서 腹中腫塊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 疼痛劇盛하는 증상이 있고^{5,34)} 外感寒邪, 七情所傷, 正氣虛, 傷食, 瘀血, 痰濕 등의 病因으로 유발되므로¹⁰⁾ 醫家에 따라 차이는 있으나 養正則積自除의 원칙하에 活血, 理氣, 導滯, 消痰의 방법을 사용한다³⁵⁻³⁹⁾.

癰疽는 氣血이 留滯不行하여 蓄毒, 膿成而潰하는 外科疾患으로^{9,34)} 外感六淫, 七情內傷, 內生痰飲 등의 원인으로 氣血이 막혀 잘 순환하지 못하고 뭉쳐서 발생하므로시기와 정도에 따라 散腫內消, 排膿斂毒, 去腐內塞, 生肌付痂하며 기혈순환을 돕기 위해 托裏, 疏通, 行營衛의 三法을 시행하는데 天南星은 외형이 단단한 癰疽에 내복약으로 사용되거나 배농시킬 목적으로 外用되었다¹⁰⁾.

天南星의 性味는 苦辛溫하고 有毒하여 주로 肝經, 肺經, 脾經으로 歸經한다²⁵⁾. 效能은 燥濕化痰, 去風止癩定驚, 消腫散結, 抗癌作用 등이 있고²⁶⁾, 특히 溫化寒痰藥으로 化痰散結의 효능이 뛰어나 중앙질환에 많이 配伍되며^{26,27)} 임상에서는 국소의 부위에 외치하는 방법과 내복하는 방법을 겸하여 사용되고 있다²⁸⁾. 天南星의 항암작용에 대해서는 D-mannitol의 항암활성이 밝혀져 있으며, in vitro 실험에서 농도별 HeLa cell

억제 작용이 일부 밝혀져 있으나²⁸⁾, 농도에 따른 시간별 세포활성의 관찰, 세포사멸 신호전달효소인 caspase 유전자 발현에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 著者は 天南星이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖抑制와 apoptosis에 미치는 影響을 알아보고자 농도별 天南星 檢液이 처리된 배양액에서 HeLa cell을 배양하여 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 MAP kinase 發顯 등을 관찰하였다.

天南星 檢液이 HeLa cell의 細胞增殖에 미치는 영향을 관찰한 결과 72시간 배양 후 모든 농도의 天南星 檢液에서 대조군에 비하여 유의한 증식억제 효과가 나타났으며 24시간, 48시간 배양한 군에서도 유의성은 없었으나 억제경향을 보였다.

Caspase cysteine protease cascade는 다양한 생리적인 모델의 세포사멸에서 거의 공통적으로 나타나는 신호전달효소라고 할 수 있다. Caspase는 다른 비활성의 효소와 pro-form의 caspase를 cleaving하여 활성화 시켜서 세포사멸을 일으킨다⁴⁰⁾. 평소 caspase는 세포내의 inhibitor에 의해 억제되어 있으나 세포사멸을 유발시킬 때는 inhibitor를 증가할 정도로 증가하며, 다양한 세포에서 자극의 종류에 관계없이 세포사멸이 진행시 caspase 3, 6, 8, 9 등의 효소가 pool을 형성한다고 알려져 있다⁴¹⁾.

天南星 檢液에 의한 세포사멸 유도정도를 확인하기 위해 caspase-3의 활성도를 보이는 세포의 비율을 FACS 분석으로 조사한 결과 24시간 배양 후 모든 농도의

天南星 檢液群이 대조군에 비하여 증가되었으나 48시간 배양 후 10%, 72시간 배양 후 5%, 10% 檢液群에서 대조군에 비하여 증가되어 지속적인 세포사멸 효과는 고농도군에서만 나타났다.

세포사멸에 주도적 역할을 담당하는 caspase-3의 활성도를 ELISA assay를 이용하여 측정된 결과 24시간 배양 후에 모든 天南星 檢液群에서 대조군에 비하여 증가하였으며 48시간 배양 후 1%와 5% 檢液群에서 대조군에 비하여 증가하였다.

DNA fragmentation은 세포사멸이 일어나면서 분비가 증가되는 endonuclease에 의해 nucleosome 단위로 fragmentation이 일어나게 됨으로써 관찰되어진다. 따라서 전기영동 후 gel 상에서 DNA ladder를 관찰할 수 있으며 이는 세포사멸을 관찰할 때 가장 흔히 사용되는 방법이다⁴²⁾. 이 실험의 결과 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 5%와 10% 天南星 檢液群에서 뚜렷하게 관찰되어 고농도 天南星의 子宮頸部癌 細胞 成長 抑制作用은 세포사멸과 관계가 있는 것으로 생각된다.

XTT 분석은 XTT와 PMS를 첨가하여 생세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 XTT의 tetrazolium ring이 분해되어 생성되는 formazan crystal의 흡광도를 사용하여 생세포의 수를 측정하는 방법이다⁴³⁾.

XTT로 분석한 細胞活性은 24시간 배양 후 1%와 5% 天南星 檢液群에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의한 차이는 없었고 10% 檢液群에서는 유의한 증가를 보였다. 48시간 배양 후 1%, 5%, 10% 天南星 檢液群에서 대조군에 비하

여 감소하였으나 유의한 차이는 없었고 72시간 배양 후 1%와 10% 檢液群에서 감소하였으나 유의한 차이가 없었고 5% 檢液群에서는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 HeLa cell의 활성 촉진을 의미하는데 다른 연구 결과와 상반되므로 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

MAP kinase는 세포의 성장, 증식, 분화, 특정 유전자 발현 및 세포사멸 등의 중요한 세포과정을 조절하는 기능을 수행한다⁴⁴⁾. MAP kinase의 활성도가 높다는 것은 세포내에서 대사활성을 비롯한 다양한 세포활동, 특히 세포배양 시에는 세포성장에 좋은 영향을 갖는다는 의미이고 반대로 활성도가 낮다는 것은 세포성장의 지연 또는 사멸되는 세포가 많다는 것을 의미하는 것으로 MAP kinase의 활성도에 반비례하여 해당 세포의 세포사멸율이 높아지게 된다. 따라서 MAP kinase 신호체계의 뚜렷한 억제능력을 가진 약물은 MAP kinase 신호전달체계를 deregulation하여 염증이나 암과 같은 상태를 치료하는데 유효한 것으로 평가된다⁴⁵⁾.

이 연구의 결과 MAP kinase 發顯은 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 모든 농도의 天南星 檢液群에서 대조군에 비하여 감소하여 세포성장의 억제 효과를 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 天南星은 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 증식을 억제시키고 caspase 활성세포와 caspase-3 활성을 증가시켰다. DNA fragmentation 관찰시 세포사멸을 확인할 수 있었고 XTT 분석 결과 일부의 경우 세포활성이 증가되기도 하였으나 MAP kinase 활성은

모든 경우 감소하였다. 따라서 天南星은 子宮頸部癌細胞에 대한 일정한 항암효과가 있음을 알 수 있으며 향후 효과적인 제형, 처방 및 독성에 대한 안정성 연구 등이 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

天南星이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖抑制와 apoptosis에 미치는 影響을 알아보고자 농도별 天南星 檢液이 처리된 배양액에서 HeLa cell을 배양하여 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3 活性, DNA fragmentation, 細胞活性 및 MAP kinase 發顯 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 細胞增殖은 72시간 배양 후 모든 농도의 檢液群에서 대조군에 비하여 유의하게 억제되었다.
2. 流細胞 分析은 24시간 배양 후 모든 농도의 檢液群과 48시간 배양 후 10%, 72시간 배양 후 5%와 10% 檢液群에서 대조군에 비하여 증가되었다.
3. Caspase-3 活性은 24시간 배양 후 모든 농도의 檢液群과 48시간 배양 후 1%와 5% 檢液群에서 대조군에 비하여 증가하였다.
4. DNA fragmentation은 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 5%와 10% 檢液群에서 뚜렷하게 관찰되었다.
5. XTT로 분석한 細胞活性은 24시간 배양 후 10% 檢液群과 72시간 배양 후 5% 檢液群에서 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다.
6. MAP kinase 發顯은 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 모든 농도의 檢液群에

서 대조군에 비하여 감소하였다.

- 투 고 일 : 2006년 07월 14일
- 심 사 일 : 2006년 08월 01일
- 심사완료일 : 2006년 08월 09일

參 考 文 獻

1. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 칼빈서적. 1997:980-1027
2. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學 上. 정담출판사. 2002:322-329
3. 潘鴻鵠. 中醫藥抗癌學. 中醫古籍出版社. 1998:201-214
4. 김주성 등. 자궁경부암의 방사선치료 후 방사선대장염 발생의 위험인자. 대한소화기학회지. 2002;40:247-54
5. 宋炳基. 韓方婦人科學. 杏林出版社. 1998:249-257
6. 문구, 정병학, 김병주. 암 - 동서의 결합치료 2. 원광대학교 출판국. 1999:379-421
7. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 행림출판. 1995:229-234
8. 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 癥瘕의 東西醫學的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1999;7(1):84-88
9. 任允卿 등. 癰疽灸法에 대한 문헌적 고찰. 大韓鍼灸學會誌. 1996;13(2):160-176
10. 許俊. 東醫寶鑑. 남산당. 1998:533-536
11. 유심근 등. 香稜丸이 子宮頸部癌細胞 (HeLa cell)의 apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004;17(2):11-26
12. 金敏娥, 白承嬉, 崔圭東. 小腹逐瘀湯

- 이 子宮細胞株의 成長抑制에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2000; 13(2):186-200
13. 金倫槿 등. 桂枝茯苓丸이 子宮癌細胞의 成長抑制와 MAP kinase 活性에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2002;15(1):31-43
14. 李允貞 등. 半枝蓮이 자궁암세포 (HeLa22918)의 성장억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1999; 12(1):185-196
15. 유심근 등. 六合湯이 자궁경부암세포 (HeLa cell)에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(3):128-146
16. 유심근 등. 濟川煎이 자궁경부암세포 (HeLa cell)에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(2):161-176
17. 조옥현 등. 柴胡疎肝散加味方이 자궁경부암세포(HeLa cell)에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004;17(4):101-111
18. 白承嬉, 李京燮, 宋炳基. 七濟香附丸이 子宮細胞株의 成長과 排卵 및 着床前胚發生에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2000;13(1):187-219
19. 任智永, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 逍遙散加減의 鎮痛, 消炎 및 女性癌細胞에 對한 實驗的 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 1997;10(1):63-72
20. 曹永斗 등. 斑玄丸과 항암제의 병용 투여가 자궁암세포(HeLa)에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1995; 8(1)49-62
21. 宋錫鎬, 宋炳基, 李京燮. 癥瘕에 應用되는 歸朮破癥湯과 加味歸朮破癥湯의 效能에 關한 研究. 경희의학. 1994; 10(1):26-40
22. 李俊成, 柳同烈. 乾漆散 煎湯液이 여성암 세포에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1997;10(2):201-221
23. 柳浩粉, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 荊蓬煎丸料가 여성암세포 및 마우스 면역세포에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1998;11(1):109-1298
24. 朴世敏, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 加味礬石丸의 鎮痛, 消炎 및 女性癌細胞에 對한 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 1997; 10(1):39-49
25. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 영림사. 1998;450-451
26. 한기광, 노승현. 天南星의 기원과 효능에 관한 문헌적 고찰. 本草分科學會誌. 1993;8(1):37-47
27. 常毅敏. 抗癌本草. 바람과 물결. 1992;92-96
28. 李京淳 등. 完譯中藥大辭典 9. 정담출판사. 1997;4091-4096
29. 劉敏如, 譚万信. 中醫產婦人科. 人民衛生出版社. 1986;151-154
30. 陳熠主 編. 世界傳統醫學腫瘤學. 科學出版社. 1999;204-13
31. 劉振華. 腫瘤豫後學. 科學技術文獻出版社. 1995;628-31
32. 최유덕. 새임상부인과학. 고려의학. 2001;501-43
33. 趙鍾寬. 韓方臨床腫瘍學. 周珉出版社 2001;799-818
34. 李熙祥, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 癥瘕의 治方에 對한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소논문집. 1998;6(2):417-435
35. 楊維傑. 黃帝內經素問譯. 성보사. 1980;664
36. 張介賓. 景岳全書. 상해과학기술출판사. 1984;407-410

37. 龔廷賢. 萬病回春. 醫聖堂. 1993:176-181
38. 吳謙. 醫宗金鑒. 대성문화사. 1983:452-454
39. 郭東烈, 金宰源. 醫林改錯評譯. 성보사. 1998:129-132
40. 양세훈 등. NCI-H1299 폐암 세포주에서 Caspase-3 Protease 활성을 통한 Sodium Salicylate(NaSal)의 세포고사. 결핵 및 호흡기질환. 2002; 53(5):485-496
41. Qu X, Qing L. Abrin Induces HeLa Cell Apoptosis by Cytochrome c Release and Caspase Activation. J. of Biochem and Mol Biol. 2004; 37(4):445-453
42. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. science. 1995; 267(5203):1445-1449
43. Vanfleteren JR et al. Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*. mechanisms of aging and development. 2002; 123:105-119
44. 최의주. Regulation of the stress activated MAP kinase. 제3회 한국응용약물학회 추계심포지움 1. 1995: 23-27
45. 최강열. MAPK Signaling Pathway and Cancer. 1998년도 대한암학회 추계심포지움 자료집. 1998:16-23