

원 저

桂枝茯苓丸의 HeLa Cell 增殖抑制와 死滅效果

황덕상, 조정훈, 장준복, 이경섭
경희대학교 한의과대학 한방부인과

Inhibitory Effects of *Gaejibokryunghwan* on Cell Proliferation in HeLa Cells

Deok-Sang Hwang, Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objectives : This study was conducted to investigate the inhibitory effects of *Gaejibokryunghwan* on cell proliferation in HeLa cells.

Methods : Human uterine cervical carcinoma HeLa cells were cultured in the 1%, 5% and 10% concentration of *Gaejibokryunghwan* extract solution. All three were cultured for 24 hours, 48 hours and 72 hours each, to examine the inhibitory effects of *Gaejibokryunghwan*. Afterwards, we drew out the effect of *Gaejibokryunghwan* extract solution by making 5 analysis. First analysis was to measure the proliferation rate of cells. Second was FACS analysis. Third was to estimate the activity of caspase-3. Fourth, we used XTT assay to analyze the activation of cells. And lastly, a molecular biological method was used to determine activation of MAP kinase in the HeLa cells.

Results : After 24, 48 and 72 hours cultivation, the proliferation of HeLa cells showed the dose-dependent decrease in all *Gaejibokryunghwan* extract solution groups compared to the control group. In the FACS analysis, *Gaejibokryunghwan* extract solution groups showed increased caspase expression compared to the control group, except for the group for 48 and 72 hours in 1% concentrate. Caspase-3 activities were increased in all, except the group cultured for 24 hours in 5% concentrate and the groups cultured for 48 hours in 1% and 5% concentrate. In the XTT study, 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution groups showed increase compared to the control group, but other *Gaejibokryunghwan* extract solution containing groups showed significant decrease compared to the control after 24, 48 and 72 hours of cultivation. The expressions of MAP kinase were decreased in all *Gaejibokryunghwan* extract solution containing groups compared to the control group after 24, 48 and 72 hours of cultivation.

Conclusions : From this study, we could suggest that *Gaejibokryunghwan* be available to the inhibition of proliferation of human cervical carcinoma cell line, HeLa cells in vitro.

Key Words: *Gaejibokryunghwan*, HeLa cell, caspase-3, MAP kinase

緒 論

子宮頸部癌은 死亡率과 發病率의 감소에도 불구하고 여전히 높은 死亡率을 보이는 암 중 하나로¹⁾, 1999년부터 2001년까지 우리나라 암발생 통계에 따르면, 35~64세 여성에서 乳房癌, 胃癌 다음으로 높게 보고되었다²⁾. 子宮頸部癌 發病의 危險因子는

· 접수 : 2005년 7월 25일 · 논문심사 : 2005년 10월 23일
· 채택 : 2005년 11월 23일
· 교신저자 : 황덕상, 서울 강남구 대치동 994-5 강남경희한방병원
(Tel:02-3457-9172, Fax:02-3457-9100, E-mail: deoksang@komet.net)

Table 1. Components of *Gaejibokryunghwan* Extract.

韓藥名	生藥名	學名	含量(g)
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume.	3.0
茯苓	<i>Hoelen</i>	<i>Poria cocos</i> Wolf.	3.0
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	<i>Paeonia Suffruticosa</i> ANDR.	3.0
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	<i>Prunus persica</i> Batsch.	3.0
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	<i>Paeonia albiflora</i> Palls.	3.0

Table 2. Inhibitory Effect on Cell Proliferation in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa Cell Line In Vitro

Subjects	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 hr	48 hr	72 hr
Control (n=3)	1	2.0 \pm 0.00 ^{1a2)}	4.67 \pm 0.58 ^a	10.33 \pm 1.15 ^a
Sample 1 (n=3)	1	1.33 \pm 0.58 ^{a,b}	0.57 \pm 0.38 ^b	0.07 \pm 0.05 ^b
Sample 2 (n=3)	1	0.23 \pm 0.23 ^b	0.13 \pm 0.06 ^b	0.02 \pm 0.01 ^b
Sample 3 (n=3)	1	0.10 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.01 ^c	0.01 \pm 0.00 ^b
<i>p</i> -value ³⁾		<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <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

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

이른 상관계, 여러 명의 성관계자, 흡연, 多産 및 낮은 경제적 상황 등으로 알려져 있다³⁾. 子宮頸部癌의 증상은 陰道出血, 膾分泌物增加, 貧血, 淋巴節腫大, 體重減少 및 疲勞 등으로 나타난다⁴⁾.

子宮頸部癌은 韓醫學의 崩漏, 帶下, 癥瘕, 血蠱 등의 범주에 속하는데^{4,5)}, 그 중 癥瘕와 가장 유사하다. 癥瘕의 원인은 氣滯, 濕痰 및 瘀血 등으로 구분되고, 그 원인에 따라 大七氣湯, 開鬱二陳湯, 桂枝茯苓丸 등의 처방이 이용된다⁴⁾.

그 중 瘀血로 인한 癥瘕의 대표적 처방인 桂枝茯苓丸은 張⁶⁾의 <金匱要略>에 최초로 수록되어, 임신부의 癥病, 痛經, 產後惡露停滯 및 胎衣不下 등의 증상을 치료한다고 하였다⁷⁾.

실험적으로 桂枝茯苓丸은 양성종양인 子宮筋腫 細胞增殖 억제 효과가 보고되었고⁸⁾, 子宮頸部癌

細胞 成長抑制와 MAP kinase 活性 감소효과⁹⁾, mitochondria transmembrane potential의 붕괴 유발, caspase-3과 caspase-9의 活性化 및 endoplasmic reticulum stress-pathway를 통한 apoptosis 유발효과¹⁰⁾가 보고되어 각종 子宮腫瘍에 有效한 것으로 보고되었다.

그러나, 桂枝茯苓丸의 농도별 처치가 HeLa cell의 apoptosis에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없어, 이에 著者は 相異한 농도의 桂枝茯苓丸 檢液을 HeLa cell에 처리한 후 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3의 活性, 細胞活性 및 MAP kinase 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Table 3. Activated Caspase Expression in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa Cell by FACS Analysis

Subjects	% of HeLa cells with activated caspase expression after culturing for		
	24hr	48hr	72hr
Control	22.44	9.46	8.31
Sample 1	25.47	4.16	7.03
Sample 2	76.11	15.24	45.21
Sample 3	72.74	18.41	39.24

Control : Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Table 4. Caspase-3 Activity in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa Cell

Subjects	Caspase-3 activity of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control	0.0846	0.0901	0.1088
Sample 1	0.0888	0.0727	0.1227
Sample 2	0.0596	0.0854	0.1241
Sample 3	0.1007	0.1132	0.1569

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

이 실험에서 사용한 桂枝茯苓丸은 (주)제일약품의 桂枝茯苓丸 製劑 (상품명 淸月)를 구입하여 사용하였고, 淸月 7.5g 중에는 다음 比率로 혼합생약의 건조 엑스가 함유되었다 (Table 1).

2) 細胞培養

子宮頸部癌 細胞株인 HeLa cell line을 ATCC社 (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, RPMI 1640 media (Sigma, USA)

를 기본 배지로 하여 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA; 이하 FBS)와 1% penicillin/streptomycin (Sigma, USA)을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 배양기 (Forma, USA)에 배양하였다.

Phosphate buffered saline (Gibco, USA; 이하 PBS)로 細胞를 세척한 후 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, USA)를 처리하여 배양기로부터 분리하고 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 이렇게 분리한 細胞를 1:10의 比率로 繼代培養하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造와 實驗群 設定

100ml의 증류수에 桂枝茯苓丸 製劑 1g, 5g 및 10g을 용해한 후 0.45 μm filter (Gelma, Germany)로 여과하여 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液을 製造한 후 실험에 사용하였다.

實驗群은 2% FBS와 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液을 첨가한 培養液을 사용하였고, 對照群은 2% FBS만이 첨가된 培養液을 사용하였다.

2) 細胞增殖 測定

24-well plate dish (Nunc, Denmark)에 HeLa cell 1 × 10⁵개를 접종하여 24시간 동안 배양한 후, 농도별로 桂枝茯苓丸 檢液을 처리하여 24, 48 및 72시간 배양한 후에 trypan blue (Sigma, USA)로 염색하여 細胞增殖을 측정하였다.

3) 流細胞 分析

농도별로 桂枝茯苓丸 檢液을 처리한 HeLa cell을

Table 5. XTT Activity in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa Cell

Subjects	XTT proliferation of HeLa cells after culturing for		
	24 hr	48 hr	72 hr
Control (n=3)	0.45±0.121 ^{ad)}	0.69±0.05 ^a	0.68±0.07 ^a
Sample 1 (n=3)	0.47±0.18 ^a	0.60±0.15 ^a	0.78±0.13 ^a
Sample 2 (n=3)	0.10±0.03 ^b	0.10±0.01 ^b	0.24±0.12 ^b
Sample 3 (n=3)	0.08±0.01 ^b	0.09±0.01 ^b	0.11±0.00 ^b
<i>p</i> -value ³⁾	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <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

Sample 1 : Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solutionSample 2 : Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solutionSample 3 : Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

trypsin으로 처리, 분리한 후 이를 원심분리하여 1 ml PBS 용액에 resuspension하였다. 여기에 intracellular caspase detection kit인 ApoStat antibody를 10 µl 가하여 30분간 37 °C 배양기에서 배양한 후 PBS로 세척하였다. 이를 0.5 ml PBS 용액에 녹인 후 BD FACS vantage (Becton & Dickinson, USA)로 분석하였다.

4) Caspase-3 活性測定

Caspase-3 活性을 측정하기 위해 caspase-3 ELISA kit (R&D system, USA)를 이용하였다. 농도별로 桂枝茯苓丸 檢液을 처리한 HeLa cell을 1,000 rpm에서 4분간 원심분리한 후, 100 µl의 lysis buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 2~4 mg/ml의 농도로 50 µl가 되게 하여 96-well flat plate에 분주하고, 50 µl의 2X running buffer와 1% DTT

solution을 가했다. 5 µl의 caspase-3 colorimetric substrate를 넣은 후 37 °C에서 2시간 동안 반응시켜 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5) 細胞活性測定

96-well plate에 HeLa cell 5×10³개를 접종하고 24 시간 동안 배양한 후 농도별로 桂枝茯苓丸 檢液을 처리하여 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다. 이후 2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5sulfophenyl)-2H tetrazolium-carboxanilide inner salt (JBI, Korea, 이하 XTT)와 phenazine methosulfate (JBI, Korea, 이하 PMS)를培養液의 20%가 되게 하여 4시간 동안 HeLa cell에 처리하였다. 細胞活性은 XTT와 PMS 처리 후 450 nm 파장의 spectrophotometer (Beckman, Germany)를 사용하여 XTT tetrazolium ring 분해 산물인 formazan crystal의 optical density로 측정하였다.

6) MAP kinase 活性測定

농도별로 桂枝茯苓丸 檢液을 처리한 HeLa cell을 trypsin/EDTA로 분리하였다. 이를 PBS로 세척하고 TRIZOL 1 ml를 처리하여 細胞를 분쇄한 후, chloroform (Sigma, USA) 200 µl를 첨가하여 ice에서 10분간 배양하였다. 이를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 취한 후 2-propanol 500 µl를 첨가하고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA를 응축하였다. 응축된 RNA를 70% 에탄올로 세척 후 건조시켜 20 µl의 DEPC-DW에 녹였다.

추출한 RNA 1 µg을 이용하여 SUPSCRIPT II cDNA synthesis kit로 cDNA를 합성하였다. cDNA template 1 µl, internal marker인 GAPDH의 forward와 reverse primer 각각 10 pmol 및 Taq polymerase 1 unit을 가한 후 93 °C 30초, 55 °C 30초 및 72 °C 1분으로 PCR을 30 cycle 수행하였다. 細胞 성장인자 marker인 MAP kinase도 동일한 방법으로 PCR을 수행하였으며 annealing 온도는 58 °C로 하였다.

각 PCR product를 1% agarose gel에 100 V로 30분간 전기영동한 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다. MAP kinase cDNA 분석을 위한 sequence는 GAPDH 5' primer (5'-accacagctccatgccatcac-3')와 GAPDH 3' primer (5'-tccaccacct-

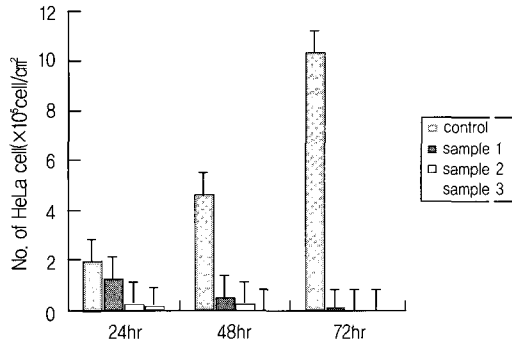


Fig. 1. Inhibitory effect on cell proliferation in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa cell in vitro

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

gttgctga-3')를 사용하여 PCR 정량을 실시하였다.

7) 統計處理

통계는 SPSS ver 11.5를 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고, 유의한 ($p < 0.05$) 것으로 판단될 경우 Tukey's B법으로 multiple comparison test를 실시하였다.

1. 細胞增殖에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群의 경우 1.33배로 對照群의 2.00배에 비하여 감소하였으나 유의한 차이는 없었고, 5% 檢液群과 10% 檢液群이 각각 0.23배와 0.11배로 對照群에 비하여 유의한 增殖抑制 ($p < 0.05$)를 나타내었다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群의 경우 0.57배, 5% 檢液群의 경우 0.13배 및 10%

結 果

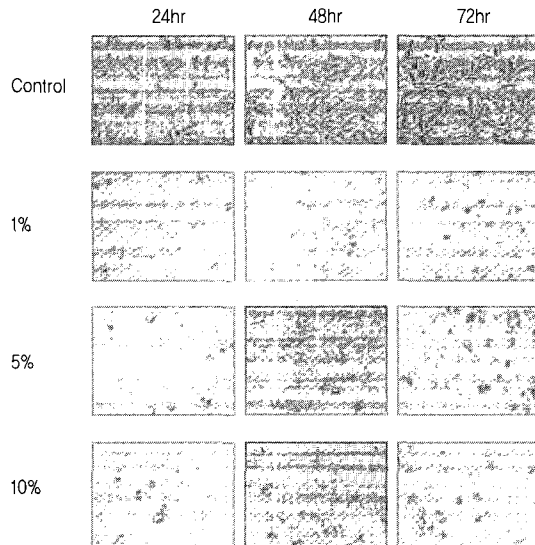


Fig. 2. Configurations of HeLa cells treated with different concentrated *Gaejibokryunghwan* extract solution

Table 6. MAP Kinase Activity in Gaejibokryunghwan-treated HeLa Cell

Subjects	MAP kinase activity (density CNT/ $\beta\pm$) of HeLa cells after culturing for		
	24hr	48hr	72hr
Control	72522	71083	70753
Sample 1	39812	27846	30766
Sample 2	28195	28737	28052
Sample 3	29081	27503	24630

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

檢液群의 경우 0.01배로 모두 對照群의 4.67배에 비하여 유의한 增殖抑制 ($p < 0.05$)를 나타내었으며, 10% 檢液群의 경우 1%와 5% 檢液群에 비하여 유의한 增殖抑制 ($p < 0.05$)를 나타내었다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 細胞增殖은 1% 檢液群의 경우 0.07배, 5% 檢液群의 경우 0.02배 및 10% 檢液群의 경우 0.01배로 對照群의 10.33배에 비하여 유의한 增殖抑制 ($p < 0.05$)를 나타내었다 (Table II, Fig. 1, 2).

2. 流細胞 分析 結果

24시간 배양 후 caspase 遺傳子 活性 細胞의 比率는 對照群이 22.44%로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液群에서는 각각 25.47%, 76.11% 및 72.74%로 측정되어 對照群에 비하여 모두 증가하

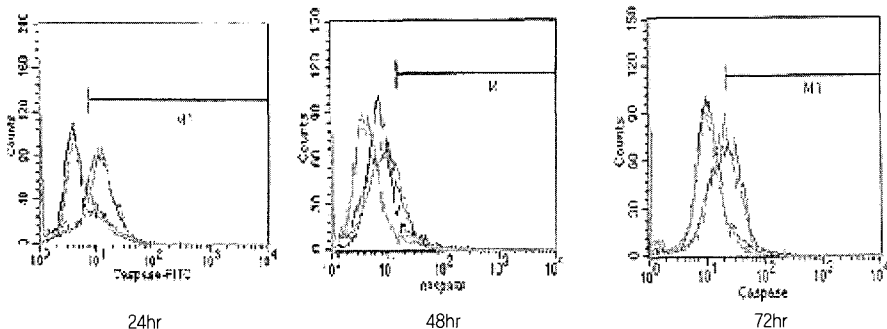
였다.

48시간 배양 후 caspase 遺傳子 活性 細胞의 比率는 對照群이 9.46%로 측정되었다. 5%와 10% 桂枝茯苓丸 檢液群에서는 각각 15.24%와 18.41%로 측정되어 對照群에 비하여 증가하였다.

72시간 배양 후 caspase 遺傳子 活性 細胞의 比率는 對照群이 8.31%로 측정되었다. 5%와 10% 桂枝茯苓丸 檢液群에서는 각각 45.21%와 39.24%로 측정되어 對照群에 비하여 증가하였다 (Table III, Fig. 3).

3. Caspase-3 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 caspase-3 活性度는 對照群에서 0.0846으로 측정되었다. 1%와 10% 桂枝茯苓丸 檢液群은 각각 0.0888와 0.1007로 측정되어 對照群에 비하여 증가하였다.



Black : control, Green : sample 1, Red : sample 2, Blue : sample 3

Fig. 3. FACS analysis in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa cell

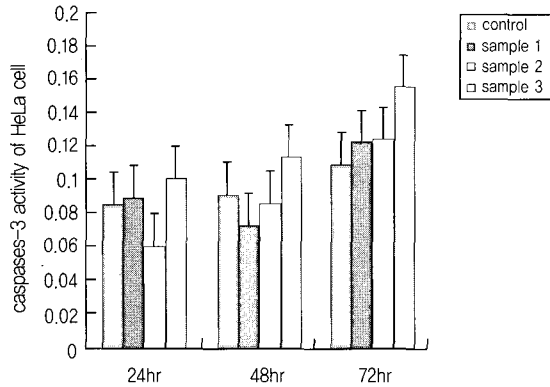


Fig. 4. Caspase-3 activity in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa cell

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

48시간 배양후 HeLa cell의 caspase-3 活性度는 對照群에서 0.0901으로 측정되었다. 10% 桂枝茯苓丸 檢液群은 0.1132로 측정되어 對照群에 비하여 증가하였다.

72시간 배양후 HeLa cell의 caspase-3 活性度는 對照群에서 0.1088으로 측정되었다. 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液群은 각각 0.1227, 0.1241 및 0.1569으로 측정되어 對照群에 비하여 모두 증가하

였다 (Table IV, Fig. 4).

4. 細胞活性에 미치는 影響

細胞活性度를 XTT assay로 확인한 결과, 24시간 배양 후 對照群의 HeLa cell의 細胞活性度는 0.45 ± 0.12 로 측정되었다. 5%와 10% 桂枝茯苓丸 檢液群은 각각 0.10 ± 0.03 와 0.08 ± 0.01 로 측정되어 對照群에 비해 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 나타내었다.

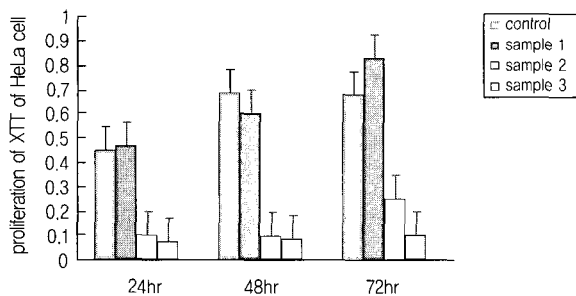


Fig. 5. XTT activity in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa cells

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

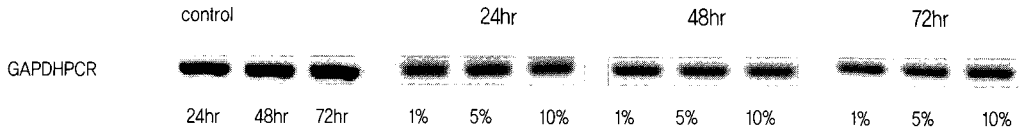


Fig. 6. GAPDH analysis for quantitative PCR

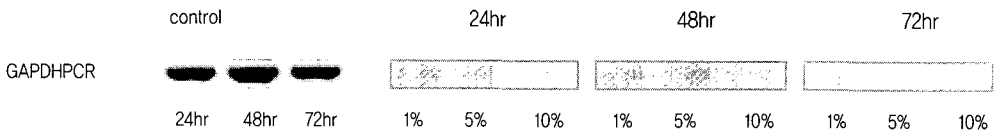


Fig. 7. MAP kinase activity of HeLa cell treated with *Gaejibokryunghwan* extract solution

48시간 배양 후 對照群의 HeLa cell의 細胞活性度는 0.69 ± 0.05 로 측정되었다. 5%와 10% 桂枝茯苓丸 檢液群은 각각 0.10 ± 0.01 와 0.09 ± 0.01 로 측정되어 對照群에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 나타내었다

72시간 배양 후 對照群의 HeLa cell의 細胞活性度는 0.68 ± 0.07 로 측정되었다. 5%와 10% 桂枝茯苓丸 檢液群은 각각 0.25 ± 0.12 와 0.10 ± 0.00 로 측정되어 對照群에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 나타내었다 (Table V, Fig. 5).

5. MAP kinase 活性에 미치는 影響

24시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 活性度를 조사한 결과 對照群은 72522 CNT/mm^2 로 측정되었고, 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液群의 MAP kinase 活性도는 각각 39812 CNT/mm^2 , 28195 CNT/mm^2 및 29081 CNT/mm^2 로 측정되었다.

48시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 活性度를 조사한 결과 對照群은 71083 CNT/mm^2 로 측정되었고, 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液群의 MAP kinase 活性도는 각각 27846 CNT/mm^2 , 28737 CNT/mm^2 및 27503 CNT/mm^2 로 측정되었다.

72시간 배양 후 HeLa cell의 MAP kinase 活性度를 조사한 결과 對照群은 70753 CNT/mm^2 로 측정되었고, 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液群의 MAP kinase 活性도는 각각 30766 CNT/mm^2 , 28052 CNT/mm^2 및 24630 CNT/mm^2 로 측정되었다 (Table VI, Fig. 6-8).

考 察

癥瘕는 여성의 생식기관에 발생하는 腫塊를 通稱하는데⁴⁾, 그 원인은 氣滯, 瘀血 및 濕痰 등이다¹¹⁾. 따라서 癥瘕의 治療에는 活血祛瘀, 清熱解毒, 化痰軟堅, 扶正祛邪 등의 治療방법이 사용되었고, 複合處方으로 歸朮破癥湯과 加味歸朮破癥湯¹²⁾, 斑玄丸¹³⁾, 加味礬石丸¹⁴⁾, 荊蓬煎丸料¹⁵⁾, 濟川煎¹⁶⁾, 六合湯¹⁷⁾, 香稜丸¹⁸⁾, 桂枝茯苓丸⁹⁾ 등과, 單味材로 人蔘¹⁹⁾, 半枝蓮²⁰⁾, 鬼箭羽²¹⁾, 표고버섯²²⁾, 烏梅²³⁾ 등의 연구가 이루어져 왔다. 이 중 瘀血로 인한 癥瘕의 治療에는 桂枝茯苓丸이 대표적인 처방이다.

張⁹⁾의 <金匱要略>에 최초로 수록된 桂枝茯苓丸은 桂枝, 桃仁, 牡丹皮, 芍藥 및 茯苓으로 구성된다. 桂枝는 發汗解肌, 溫經通脈하고, 桃仁은 活血祛瘀, 潤腸通便하며, 牡丹皮는 清熱涼血, 活血散瘀하

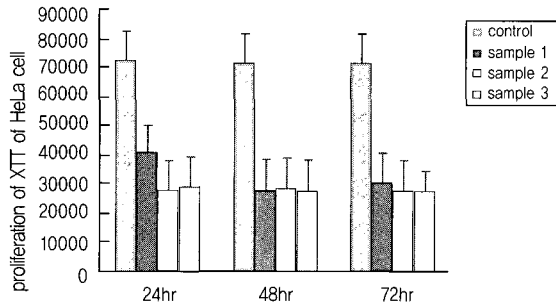


Fig. 8. MAP kinase activity in *Gaejibokryunghwan*-treated HeLa cell

Control: Group with 2% FBS

Sample 1: Group with 2% FBS and 1% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 2: Group with 2% FBS and 5% *Gaejibokryunghwan* extract solution

Sample 3: Group with 2% FBS and 10% *Gaejibokryunghwan* extract solution

고,芍藥은 養血柔肝,緩中止痛하며,茯苓은 利水滲濕,健脾寧心하여,桂枝茯苓丸은 活血祛瘀,理氣止痛,破瘀消癥 등의 治療效果가 있다²⁴⁾.

桂枝茯苓丸을 이용한 임상연구로는 月經不調²⁵⁾, 卵巢囊腫²⁵⁾, 月經前症候群²⁶⁾, 打撲損傷²⁶⁾, 乳腺癌²⁶⁾, 更年期症候群²⁶⁾, 子宮內膜症²⁶⁾, 大腸疾病²⁶⁾, 慢性骨盤炎²⁵⁾, 卵巢癌²⁷⁾ 등이 있었으며, 실험 연구로는 子宮筋腫⁸⁾, 子宮癌細胞⁹⁾, 損傷된 肝疾患²⁸⁾, 高粘度血症²⁹⁾, 血栓症^{30,31)} 등에 관한 연구가 있다. 채¹⁰⁾는 桂枝茯苓丸이 子宮頸部癌의 HeLa cell의 apoptosis를 유발하는 기전에 대해서 endoplasmic reticulum stress-pathway와 mitochondria-dependent pathway가 중요한 역할을 한다는 연구결과를 발표하였으나, 桂枝茯苓丸의 농도별, 시간별 처치가 HeLa cell의 apoptosis에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 著者는 桂枝茯苓丸이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell에 미치는 影響을 알아보기 위해, 相異한 농도의 桂枝茯苓丸 檢液을 HeLa cell에 처리한 후 細胞增殖, 流細胞 分析, caspase-3의 活性, 細胞活性 및 MAP kinase 발현을 관찰하여 유의한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

桂枝茯苓丸 檢液이 子宮頸部癌 HeLa cell의 細

胞增殖에 미치는 影響을 관찰한 結果, 對照群과 비교하여 24시간, 48시간 및 72시간 배양 시 1%, 5% 및 10% 桂枝茯苓丸 檢液을 처리한 實驗群에서 細胞數가 유의하게 濃度 의존적으로 감소하여, 각 시간별 濃度 의존적으로 細胞成長率이 저하되어 細胞增殖이 抑制됨을 확인할 수 있다.

子宮頸部癌의 發癌過程은 子宮頸部上皮細胞의 수명이 연장되어 전체 細胞數가 增加하면 腫瘍으로 발전하게 되는데, 이 過程에 apoptosis의 減少가 밀접하게 관련 있다고 생각되고 있다³²⁾.

Apoptosis는 細胞死滅의 한 형태로 유전적으로 보존된 相關 遺傳子에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 細胞 죽음과정(programmed cell death)으로 직접적으로 독성이 있거나 물리적 상해 등 갑작스런 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정인 괴사(necrosis)와는 다른 것이다³³⁾. 이 과정은 형태적으로 細胞의 비중감소, 細胞膜의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 包囊을 형성하면서 食細胞 작용을 거치는 작용과 함께 진행된다^{34,35)}.

Necrosis와 달리 apoptosis는 그 진행과정을 遺傳子를 이용하여 조절하는 것이 가능하다. 그 대표적인 단백질분해효소가 Caspase이다³⁶⁾. 最近 活發히

進行되고 있는 여러 實驗研究에서는 apoptosis가 進行되는 細胞에서 여러 종류의 caspase 報告되고 있다. 그 중에서 caspase-3는 apoptosis가 일어나는 主要 經路로 인식되고 있으며, 어떤 種類의 刺戟에 의해 活性化되는 主要 pool로 알려져 왔다³⁷⁾.

농도별 桂枝茯苓丸 檢液이 HeLa cell의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 流細胞 分析을 이용하여 caspase 活性을 보이는 細胞의 比率를 측정하였다. 流細胞 分析이란 액체 속에서 부유하는 細胞나 생물학적 입자의 물리, 화학적 특성을 이용하여 細胞의 크기, 내부조성, 표면항원 등의 차이 또는 변화를 분석할 수 있는 방법이다^{38,39,40)}.

流細胞 分析 결과 24시간 배양 시, 1%, 5% 및 10% 檢液群 모두에서 對照群에 비해 caspase 遺傳子 活性을 보이는 細胞의 比率가 증가하였다. 48시간과 72시간 배양 시, 5%와 10% 檢液群에서는 對照群에 비해 caspase 遺傳子 活性을 보이는 細胞의 比率가 증가하였다. 桂枝茯苓丸의 효과는 배양시간에 따라 다르기는 하지만 5%이상의 농도에서 가장 효과가 있는 것으로 나타났다.

Apoptosis 진행에 필요한 단백질인 caspase-3의 活性度를 caspase colorimetric ELISA assay로 측정한 결과, 24시간 배양 시 5% 檢液群과 48시간 배양 시 1%와 5% 檢液群을 제외한 檢液群에서 對照群과 비교하여 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 채¹⁰⁾의 연구에서 桂枝茯苓丸이 caspase-3와 caspase-9의 활동성을 증가시키는 결과와 일치하였다.

XTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 XTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 XTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 細胞의 增殖 또는 살아있는 細胞를 정확하게 측정할 수 있어서 중앙 생물학에서 필수적인 기법중의 하나이다.

HeLa cell의 細胞活性度의 예측지표인 XTT 活性度를 조사한 결과, 24시간, 48시간 및 72시간의 1% 檢液群에서 對照群에서 對照群과 차이가 없었으며, 그 외의 檢液群에서 對照群과 비교하여 XTT 活

性도가 유의하게 감소하는 결과가 관찰되어, 5%이상의 농도인 桂枝茯苓丸 檢液에서는 HeLa cell의 細胞活性도가 감소하는 것을 알 수 있었다.

Map kinase는 細胞의 成長, 分化, 發達, 死滅 등의 반응을 조절하는 과정에 작용하는 단백질 인산화 효소로, 細胞의 활동이 활발할 때는 Map kinase의 活性이 증가하고, 細胞 死滅 시에는 감소한다^{41,42)}. MAP kinase 신호전달 억제인자는 MAP kinase 신호전달체계를 통제하여 炎症, 癌을 治療하는데 有效하게 작용한다⁴³⁾. 桂枝茯苓丸이 이러한 MAP kinase 신호전달체계의 抑制因子로 作用하여 細胞 死滅을 유발하였는지 알아보기 위하여, 桂枝茯苓丸 檢液 처리된 HeLa cell의 RNA를 채취하여 PCR 정량을 통해 MAP kinase의 活性度를 측정하였다.

24시간, 48시간 및 72시간 배양 후 모든 농도의 桂枝茯苓丸 檢液群에서 對照群보다 MAP kinase 活性이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 桂枝茯苓丸이 MAP kinase 活性을 감소시켜 HeLa cell의 억제인자로 작용할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과, 桂枝茯苓丸은 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell의 增殖을 억제하고 apoptosis에 관여하는 caspase-3를 活性化하며, 細胞活性을 抑制하고, MAP kinase의 活性을 減少시키므로, 子宮頸部癌細胞의 成長을 抑制하고 死滅效果로 인해 抗癌作用을 일으킨다고 할 수 있다.

結 論

桂枝茯苓丸이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HeLa cell을 相異한 농도의 桂枝茯苓丸 檢液이 함유된 培養液 하에서 48시간 배양하여 HeLa cell의 細胞增殖과 流細胞 分析을 통한 caspase 遺傳子 活性, caspase-3의 活性, 細胞活性 抑制 및 배양된 細胞株에 대한 MAP kinase 발현 등을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 細胞增殖에 대한 桂枝茯苓丸 檢液의 효과는 對照群에 비해 모든 實驗群에서 농도 의존적으로

抑制되었다.

2. 流細胞 分析에 대한 桂枝茯苓丸 檢液의 효과는 48시간 1%와 72시간 1% 檢液群을 제외한 모든 實驗群에서 對照群에 비하여 증가하였다.

3. Caspase-3 活性度에 대한 桂枝茯苓丸 檢液의 효과는 24시간 5%와 48시간 1% 및 5% 檢液群을 제외한 모든 實驗群에서 對照群과 비하여 증가하였다.

4. 細胞活性度에 대한 桂枝茯苓丸 檢液의 효과는 1% 檢液群을 제외한 모든 實驗群에서 對照群에 비하여 유의하게 감소하였다.

5. MAP kinase activity에 대한 桂枝茯苓丸 檢液의 효과는 모든 實驗群에서 對照群에 비하여 감소하였다.

참고문헌

1. Rubin SC, Hoskins WJ. Cervical cancer and preinvasive neoplasia. Philadelphia: Lippincott Raven. 1996:2-9
2. 보건복지부. 우리나라 암발생 통계 요약집 (1999~2001). Available from:URL:http://www.mohw.go.kr/search/portal/common/download.jsp?filename=/data3/tmax/new_webhome/mohw_korea/upload/old/portal/databank/우리나라_암발생_통계_요약집(1999-2001)(2005년4월27일).doc&filename2=우리나라_암발생_통계_요약집(1999-2001)(2005년4월27일).doc
3. Berek JS. Novak's Gynecology (13th ed). Phildelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002;1199-1244
4. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學(上). 서울: 鼎談. 2002;304-307, 322-329
5. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울: 杏林出版社. 1992;249-257
6. 張仲景. 仲景全書. 서울. 大星出版社. 1989;427

7. 謝世平, 封銀曼. 對《金匱 要略講義》桂枝茯苓丸條文的商榷. 河南中醫. 1994;14(2):73-74
8. 李仁浩, 張峻福, 李京燮 외. 桂枝茯苓丸이 자궁근종 세포의 증식 억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2002;15(2):12-24
9. 金倫槿, 金東哲, 白承禧 외. 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
10. Chae HJ, Keum KS, Ki n HR, Kim DS, Kim HM, Chae SW, Keum KS. Ge-jee-Bok-Ryung-Hwan induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. Life Sciencs. 2004;75:2997-3016
11. 金相佑, 李京燮, 宋炳基 외. 癥瘕患者에 對한 臨床的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1991;4(1):23-27
12. 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. 慶熙醫學. 1994;10(1):26-40
13. 曹永斗, 鄭鎮鴻, 柳同烈 외. 斑玄丸과 抗癌劑의 併用投與가 子宮癌細胞(HeLa)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1995;8(1):49-62
14. 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
15. 柳浩粉, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 荊蓬煎丸料가 女性癌細胞 및 마우스 免疫細胞에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1998;11(1):109-129
16. 박경미, 조한백, 유심근 외. 濟川煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(2):161-176
17. 박종문, 조한백, 유심근 외. 六合湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(3):128-146
18. 유심근, 박종규, 조한백 외. 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

19. Youn JY, Noh HT. The effects of Ginseng extract on the inhibition of DNA synthesis in HeLa cells treated with anticancer drugs. *Korean J Obstet Gynecol.* 1990;33(1):69-75
20. 李允貞, 金鐵虎, 金曠 一 외. 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
21. Kim CH. Effects of buthanol and methanol extracts from *Euonymus Alatus* on matrix metalloproteinase-9 in cervical epithelial carcinoma cells. *The Journal of Oriental Gynecology.* 2003;16(1):143-150
22. 박정민, 박재복, 신정임 외. 자궁경부암동물세포에서 표고버섯의 in vitro 및 in vivo 항암효과; apoptosis에 의한 종양세포주의 성장억제. *한국식품과학회지.* 2004;36(1):141-146
23. 정승은, 배지현. 간암 및 자궁암 세포주 증식에 미치는 오매 추출물의 영향. *한국영양학회지.* 2002;35(4):439-445
24. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울. 永林社. 1991;124-125, 193-195, 302-304, 423-424, 581-583
25. 陳玲珍. 桂枝茯苓丸의臨床應用. *遼寧中醫學院學報.* 2004;6(6):466
26. 曹惠雲. 桂枝茯苓丸在日本的研究與應用. *國外醫學中醫中藥分冊.* 2003;25(2):78-81
27. 王英, 高洪泉. 桂枝茯苓丸誘導卵巢癌HO8910細胞凋亡的研究. *牡丹江醫學院學報.* 2003;24(6):1-4
28. 申鎮滉, 安圭錫, 文濬典. 桂枝茯苓丸이 四鹽化炭素로 因한 白鼠肝損傷에 미치는 影響. *慶熙韓醫大論文集.* 1981;4:161-170
29. 李蕊來, 安圭錫, 崔昇勳. 桂枝茯苓丸과 그構成 藥物이 瘀血 病態에 미치는 影響. *慶熙韓醫大論文集.* 1996;19(2):39-67
30. 李仁浩, 李京燮, 宋炳基. 桂枝茯苓丸藥鍼이 Endotoxin으로 誘發된 흰쥐의 血栓症에 미치는 影響. *大韓韓方婦人科學會誌.* 2000;13(1):1-17
31. 韓承燮, 崔昇勳, 安圭錫. 桂枝茯苓丸이 瘀血病態模型에 미치는 影響. *大韓韓醫學會誌.* 1992;13(2):157-167
32. 김태진, 박종택, 심재욱 외. 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성. *대부종콜포회지.* 1999;10(2):138-147
33. Cooper GM, Hausman RE. *The cell: a molecular approach*(3rd edition). Washington: Sinauer Associates. 2004;580-590
34. Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem.* 1997;64(1):33-42
35. Chae HJ, Kim HM, Chae SW, Kang JS, Bang BG, Cho SB, Park RK, So HS, Kim YK, Kim HR. Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: possible role for Ceramide. *Endocrinology.* 2000;141(8):2904-2913
36. Takahashi H, Yamamoto AI, Nakamura S, Asano K, Kinouchi, Mizuka H. Fas antigen modulates ultraviolet B-induced apoptosis of SVHK cells: sequential activation of caspases 8, 3, and 1 in the apoptotic process. *Exp Cell Res.* 1999;249(2):291-298
37. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3: a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18530-18533
37. 조영주. Multiparameter flow cytometry의 응용. *Biochemistry News.* 1992;12(2):84-90
39. Martin JC, Swartzendruber DE. Time: a new parameter for kinetic measurements in flow cytometry. *Science.* 1980;207(4427):199-201

40. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48(10):1819-1827
41. Caffrey DR, O'Neill LA, Shields DC. The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *J Mol Evol.* 1999;49(5):567-582
42. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999;79(1):143-180
43. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature.* 2001;410(6824):37-40