

# 下瘀血湯이 1차배양된 人體子宮筋腫細胞에 미치는 영향

김한균<sup>1</sup> · 조용걸<sup>1,4</sup> · 조미정<sup>1</sup> · 최선미<sup>3</sup> · 박숙자<sup>1,2</sup> · 김미려<sup>1,2</sup> · 권영규<sup>1,2</sup> · 김상찬<sup>1,2\*</sup>

1: 대구한의대학교 한의과대학, 2: 한방신약개발연구팀(BK21), 3: 한국한의학연구원, 4: 연변대학교 의과대학

## Growth Inhibition of Human Uterine Leiomyoma Cells Using Haeohyul-tang

Han Kyun Kim<sup>1</sup>, Rong jie Zhao<sup>1,4</sup>, Mi Jeong Jo<sup>1</sup>, Sun Mi Choi<sup>3</sup>, Sook Jahr Park<sup>1,2</sup>, Mi Ryeo Kim<sup>1,2</sup>, Young Kyu Kwon<sup>1,2</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2\*</sup>

1: College of Oriental Medicine, 2: Development Team for The New Drug of Oriental Medicine (BK21 Program) Daegu Haany University, 3: Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 4: College of Medicine, Yanbian University, Jilin, China

Uterine leiomyoma is the most common tumor in the female genital tract. Although the tumor is benign, it is a matter of paramount importance since it often causes profuse menstrual bleeding, pressure symptoms and infertility. Nevertheless, the etiology and pathophysiology of this abnormality remain poorly understood. The traditional definitive treatment for uterine leiomyomas is hysterectomy and, even today, symptomatic leiomyomas are the leading cause of hysterectomy in Korea. Clearly, the development of a safe, effective, and nonsurgical method of treatment for leiomyoma would be of great benefit to many women. This study demonstrated growth inhibition of uterine leiomyoma cells using Haeohyultang (HT). When human leiomyoma cells were treated with Haeohyultang, cells showed dose-dependent growth inhibitory effect. Cell growth was inhibited by over 40% as determined by both cell counts and MTS assay. Reduction of cellular viability as a consequence of exposure to Haeohyultang resulted from induction of apoptosis, as assessed by DNA fragmentation, PARP cleavage, caspase 9 and caspase 3 assay. Flow cytometry analysis with uterine leiomyoma cells demonstrated sub G1 cell cycle arrest after treatment with drug Haeohyultang. But, the expression levels of p27 and p21 were not changed in Haeohyultang treated cells compared with control. However, the expression levels of cIAP1 were reduced by Haeohyultang compared with control. This reduction of cIAP1 data means activation of the caspase family, and then induction of PARP cleavage and apoptosis. These results suggest that Haeohyultang may be potential therapeutic approach in the clinical management of uterine leiomyoma.

Key words : Uterine leiomyoma, Haeohyultang, Apoptosis

### 서 론

자궁 근종은 양성 종양으로 자궁의 평활근에서 발생하며, 여성의 3분의 1에서 발생하는 흔한 질병이다. 이 질환의 20~50%에서 부정 질출혈, 골반통, 압박통, 불임과 자연유산 등의 다양한 증상을 일으킨다<sup>1)</sup>. 자궁 근종의 일반적인 치료는 자궁 적출술이며, 지금까지도 국내외를 통해 자궁 적출술의 가장 많은 원인은 자궁筋腫이다<sup>2,3)</sup>. 자궁筋腫의 원인 및 發生過程에 대하여 명확하게 糾明하지 못한 狀態이며<sup>4,6)</sup>, 治療方法 또한 보편화된 藥物療

은 없는 실정이다. 따라서 患者의 症狀과 年齡 및 腫瘍의 크기에 따라 차이가 있으나 자궁摘出術의 手術療法이나 호르몬療法에 依存하는 경우가 대부분이다<sup>1,4,5,7-11)</sup>.

韓醫學에서는 腹腔內에서 發生하는 腫瘍疾患을 積聚, 癥瘕, 瘕癥, 痞塊, 腸覃, 石瘕, 血蟲 등으로 分類하고 있으며<sup>5,12-18)</sup> 이 중에서 癥瘕, 石瘕, 血蟲 등의 病證을 자궁筋腫과 類似하다고 認識하고 있다<sup>4,12,13)</sup>. 韓醫學에서는 女性의 生殖器官인 자궁 및 卵巢와 그 周圍에 發生하는 腫塊를 瘕瘕라 通稱하는데<sup>4,13,19,20)</sup> 자궁內膜炎, 자궁筋腫, 卵巢囊腫, 絨毛性腫瘍, 자궁肉腫, 자궁癌 등을 포괄하는 개념이다<sup>12,21,22)</sup>. 原因은 氣滯, 瘀血, 濕痰 등이며 治法은 行氣導滯, 活血化瘀, 理氣化痰하여야 하므로<sup>23)</sup> 大七氣湯<sup>24)</sup>, 桂枝茯苓丸<sup>25)</sup>, 開鬱二陳湯<sup>26)</sup>, 下瘀血湯<sup>27)</sup> 등이 사용되어 왔다.

下瘀血湯은 <金匱要略><sup>27)</sup>에 처음 收錄된 處方으로 破血下瘀

\* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247

· 접수 : 2006/12/29 · 수정 : 2007/01/20 · 채택 : 2007/02/05

하는 效能이 있어 產後에 乾血이 內結되어 臍下에 腹痛이 일어나는 것과 血瘀로 經水不利된 症狀에 사용되고 있으나, 婦人血氣不調, 經候不調 및 經閉不通 等の 婦人科 疾患에도 使用된다. 瘀癥의 治療에 대하여 김<sup>28)</sup> 등은 桂枝茯苓丸을, 백<sup>29)</sup> 등은 七製香附丸을 報告하였으나, 下瘀血湯이 子宮筋腫細胞의 死滅에 미치는 影響에 관한 研究는 거의 없는 실정이다.

또한, 근종 제거술은 51%에서 재발의 위험이 있으며<sup>30)</sup>, 30~40대 여성의 40%정도가 이 질환을 가지고 있고, 현재 시행하고 있는 자궁적출술의 적응증이 된다<sup>31)</sup>. 반면에 患者들은 수술법 이외에 약물요법을 원하는 경우가 많으므로, 子宮筋腫의 비수술요법의 개발은 매우 시급한 실정이며, 비수술적요법인 약물요법에서 그 대안을 찾고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

계명대학교 동산의료원 산부인과학 교실에서 子宮筋腫으로 수술 받은 10명의 환자에서 수술시 신선한 자궁 근종과 자궁근조직을 채취하여 실험 시까지 -70 °C에서 냉동 보관하였다. 조직의 채취는 患者의 동의와 윤리 위원회에 통과한 지침서에 준해서 시행하였다. 이외에 1차 조직배양을 위해 수술시 신선한 조직을 얻어 子宮筋腫細胞를 일차 배양하여 실험 재료로 사용하였다. 실험에 쓰인 下瘀血湯의 처방 구성은 大黃二兩 桃仁二十個 蘆蟲二十枚<sup>27)</sup>로 구성되었다.

### 2. 일차세포의 배양

정상 자궁 평활근 조직과 자궁 근종 조직을 수술 후 얻어 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단 한 후 15 ml 튜브에 옮겨 1000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 절단한 조직에 HEPES (25 mmol/L), penicillin (200 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), collagenase type IV (1.5 mg/ml), DNase (0.2 mg/ml)를 HBSS에 넣고 37°C 수조에서 3~4시간 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일 세포로 분리한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate-buffered saline(PBS)으로 씻어서 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum(FBS)이 든 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 양성 및 음성 결과에 따라 근육 세포인지를 확인하였다.

### 3. MTS(Tritiated thymidine incorporation) 분석

96 well plate에 정상 자궁 근과 자궁 근종세포를 multi pipet을 사용하여 4×10<sup>3</sup>/well로 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 다음 下瘀血湯을 처리한 후 MTS 측정시, One Solution Reagent를 실온에 90분 또는 37 °C에 10분간 방치하였다. 각

well 당 들어있는 media를 200 µl multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 suspension 된 후 well 당 100 µl가 되도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 µl 넣고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였다. 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 생존 세포수의 산정

자궁근종세포를 60 mm tissue culture dish 에 2×10<sup>5</sup>cell/dish로 cell seeding 한다. 24시간 배양시킨 후 下瘀血湯을 농도별로 투여하였다. 24~48시간 배양시킨 세포를 PBS로 세척후, 1×trypsin-EDTA로 resuspension 시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 세척하여 resuspension 시킨 후, cell suspension 20 µl 와 동량의 trypan blue solution을 혼합하여 1분간 두었다. Hemacytometer 상에서 살아있는 세포만 계산하였다 (3회 반복 실시).

### 5. Western blot analysis

下瘀血湯을 투여한 후 세포에서 세포주기 회로에 관계하는 유전자와 細胞自滅死에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.4), 5 mM EDTA(pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% Triton X-100), 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계(Du® 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 Nitrocellulose paper (Immobilon, Milipore Co., USA)로 전기이동 (electrotransfer)를 시행하였다. 전기이동된 막을 blocking용액 (5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)인 p27, p21, p53, caspase 3, caspase 9, PARP, cIAP1, cIAP2, 그리고 Bcl2를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1 × TBS-T 용액 (20mmol/L Tris, 137mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20)으로 nitrocellulose membrane을 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차항체인 goat polyclonal IgG (santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응 시켜 항체를 결합시켰다. 1 × TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

### 6. FACS (fluorescence-activated cell sorter)에 의한 세포주기 분석

子宮筋腫細胞를 60 mm tissue culture dish에 3×10<sup>5</sup> cells/dish로 cell seeding 하였다. 배양기에 24시간배양 후 下瘀

血湯을 용량별로 투여 하였다. 24~48시간 배양시킨 세포를 PBS로 세척 후, 1 × trypsin-EDTA로 재부유 시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 재부유시킨 뒤, 1.5 ml tube에 옮겼다. 1000 rpm 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1 ml 넣고 재부유 시킨 후, 4℃에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm으로 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 PBS로 세척한 후, Trisodium citrate (Sigma, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5mg/ml, propidium iodide (Sigma, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4℃에서 염색하였다. 類細胞分析機를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

### 7. DNA fragmentation 분석

子宮筋腫細胞에 下瘀血湯을 농도별로 처치한 다음, 수거된 cell에 10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 0.5% Triton X-100이 든 완충액을 넣어 30분간 용해시켰다. 용해된 용해질을 충분히 혼합한 후 10,000 rpm 20분간 원심분리하였다. 상층액에 분절된 DNA를 동일 양의 neutral phenol : chloroform : isoamyl alcohol mixture (25 : 24 : 1)로 추출한 뒤, 0.1 µg/ml ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 子宮筋腫 일차배양細胞에 下瘀血湯 투여 후 세포증식 억제

일차배양 자궁 근종細胞에 下瘀血湯을 농도별로 투여한 24시간 후의 細胞 증식에 대한 억제작용은 농도가 증가할수록 억제 작용이 증가하였으며, 300 µg/ml에서는 40%의 증식 억제를 보였다 (Fig. 1).

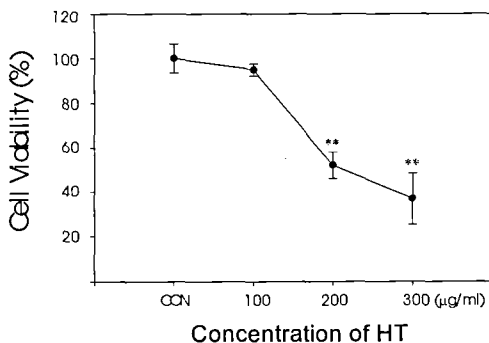


Fig. 1. Dose dependent effect of Haeohyul-tang (HT) on growth inhibition in the human leiomyoma cells. The cell viability was measured indicated concentration. Control cells were incubated with DMSO alone. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (significant as compared to control, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01).

### 2. 下瘀血湯에 의한 細胞自滅死 및 細胞週期分析

下瘀血湯에 의한 증식억제를 세포주기분석을 類細胞分析機로 시행하였다. 각 농도에 대한 반응에서 대조군이 1.50%이나

300 µg/ml 농도에서 9.77%의 sub G1기의 지연이 확인되어 細胞自滅死의 양적 증거를 확인하였고, 농도별로 투여하여 농도 증가에 따른 sub G1의 연장이 증가됨을 확인하였다 (Fig. 2).

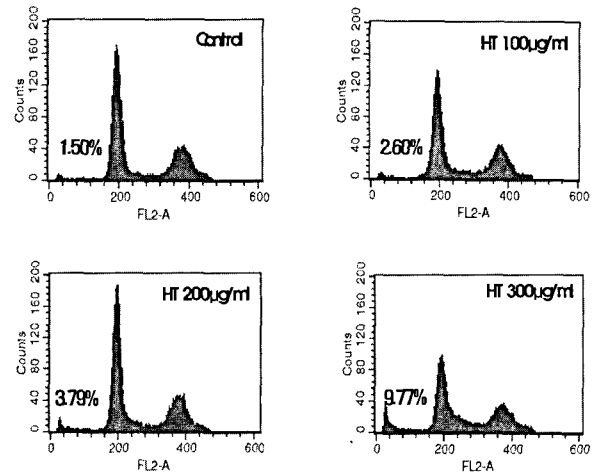


Fig. 2. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Haeohyul-tang (HT). Cell cycle profile were analyzed by FACS analysis. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

또 다른 細胞自滅死의 증거를 확인하기위해 DNA fragmentation 분석하였으며, 그 결과 대조군에 비해 下瘀血湯 투여군에서 농도가 증가할수록 DNA의 분절이 증가되는 細胞自滅死의 증거를 확보하였다 (Fig. 3).



Fig. 3. DNA fragmentation of Uterine leiomyoma cells exposed to Haeohyul-tang. To analyze fragmentation of genomic DNA, cells were treated for 24 hr with control and indicated concentration of Haeohyul-tang.

### 3. 下瘀血湯에 의한 세포증식 억제의 작용기전

子宮筋腫細胞에 下瘀血湯을 투여한 후 caspase 9의 발현이 증가하였고, 이에 따라 PARP의 분절이 증가하였으나, caspase 3의 발현은 감소하였다 (Fig. 4). 이러한 data는 下瘀血湯이 caspase 9 경로를 통한 細胞自滅死을 유도한다는 것을 의미한다. p27과 p21유전자의 발현 분석에서 p21에서는 증감이 확인되지 않았으며, p27은 300µg/ml에서 감소하였다 (Fig. 5). 또 Bcl-2, cIAP1, cIAP2유전자와 p53유전자 발현 변화에 있어서는 cIAP1에서 下瘀血湯 투여 후의 발현이 감소하였다 (Fig. 6).

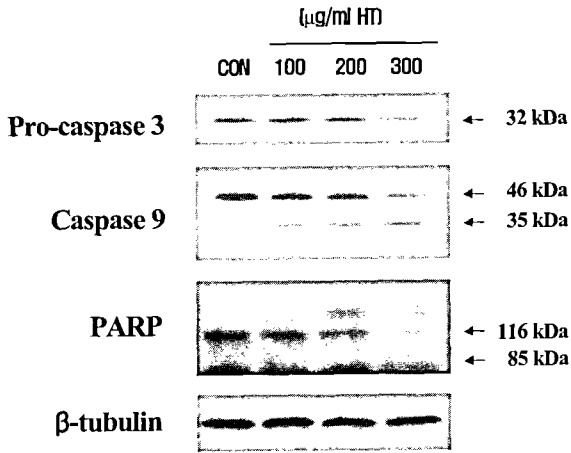


Fig. 4. Effect of Haeohyul-tang on caspase-3, caspase-9 and PARP protein in uterine leiomyoma cells. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Haeohyul-tang (HT). Beta tubulin was used as internal control.

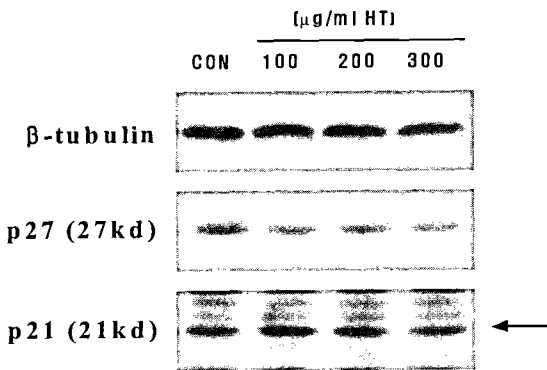


Fig. 5. Effect of Haeohyul-tang on p27 and p21 protein in uterine leiomyoma cells. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Haeohyul-tang (HT). Beta tubulin was used as internal control.

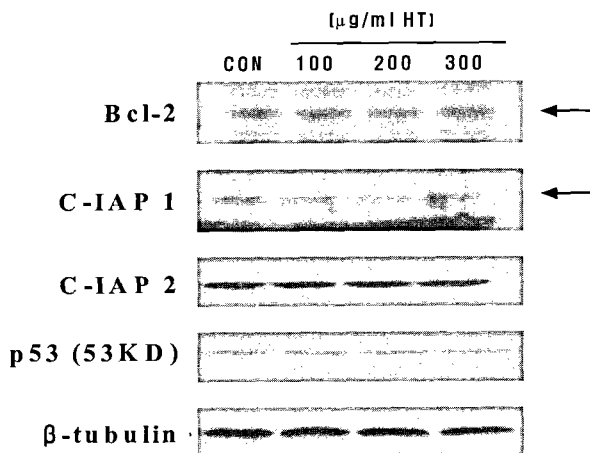


Fig. 6. Effect of Haeohyul-tang on Bcl-2, cIAP1, cIAP2 and p53 protein in uterine leiomyoma cells. Uterine leiomyoma cells were treated with indicated concentrations of Haeohyul-tang (HT). Beta tubulin was used as internal control.

## 고찰

자궁 근종은 여성 생식기에서 발생하는 가장 흔한 양성 질환으로서 일반적으로 근종(myoma) 또는 평활근종(leiomyoma)

이라 불리고 있다. 지금까지 사용하는 약물적 치료는 GnRH agonist 투여로 호르몬 생성을 일시적으로 감소시키는 치료로, 근종의 크기를 일시적으로 줄이는 데는 성공했지만 약제 투여 중단 후에는 근종이 다시 커지므로 완전한 치료는 되지 못하고 있다<sup>32)</sup>. 현재 외국에서는 다양한 각도에서 자궁 근종의 약물 치료를 개발하고 있으나 아직까지 그 결실이 이루어지지 않고 있다. 자궁筋腫이 호르몬과 관계한다고 생각하여 progesterone receptor blocker 인 RU-486을 세포주 수준에서 치료하여 효과가 있다는 보고가<sup>33)</sup> 있으나 이것도 장기간의 효과에 대해서는 검증되지 않았다. 이외에 폐섬유증의 치료제로 시험하고 있는 항섬유제인 pirfenidon을 이용하여 근종의 세포 증식 및 collagen 생성을 억제하였다는 보고도 있다<sup>34)</sup>. Nowak<sup>35)</sup>은 성장인자가 근종 세포의 증식 및 collagen이나 혈관 등을 자극하여 자궁 근종이 증식한다고 생각하고 이런 성장 인자를 차단함으로써 치료의 약제로서의 가능성을 연구하고 있다. 또한 유전적인 연구도 진행되어 근종의 40%에서 염색체 이상을 동반하고 이것이 자매간이나 수직으로 영향을 받는 인자에 대한 연구도 행해지고 있다<sup>36)</sup>. 이외에 GnRH antagonist, angiogenesis inhibitor에 관한 연구가 활발히 진행되고 있고, 임신을 원하는 여성에게서 국소적인 유전자 치료가 가능한지를 활발히 연구하고 있다.

지금까지 잘 알려진 자궁근종의 유전학적 이상소견으로 에스트로젠과 황체호르몬 수용체의 증가<sup>31,37)</sup> Bcl-2단백의 증가<sup>38)</sup> 등이 있다. 이들은 자궁근종의 발생과 성장에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있는데, 특히 에스트로젠은 자궁근종의 성장에 중요한 인자로 알려져 있으며 Bcl-2는 細胞自滅死를 억제하는 유전자로 이 역시 근종의 성장에 관여할 것으로 알려져 있으며, 이 인자는 또한 황체호르몬에 의해 발현이 증가된다. 그 외에 transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>39)</sup>, heparin-binding growth factors<sup>40)</sup>, Insulin-like growth factors<sup>41)</sup> 등이 자궁근종의 원인 인자로 관계할 것으로 보고 되었다. 또한 최근에 Baek<sup>42)</sup> 등은 자궁근종에서 cyclin G1의 발현이 증가되었다고 보고하였으며, 이러한 세포주기에 관여하는 유전자의 과발현이 자궁근종의 발생에 중요한 인자로 작용할 것으로 보고하였다. 또한 대장암 세포주에서도 cyclin G1의 과발현이 세포 성장을 촉진하여 세포 성장에 중요한 역할을 할 것으로 보고하였다<sup>43)</sup>. 이러한 자궁근종 관련 유전자를 이용한 유전자 치료법은 세포주를 이용한 생체의 실험단계에 있으며 아직 인체에는 적용되지 않고 있다. 자궁筋腫은 可妊期 女性の 25%를 차지하고 있으며 30~45歲 女性에서 好發하는 陽性腫瘍으로 有色人種 특히 黑人에게 많이 나타난다<sup>10,44)</sup>. 자궁筋腫의 原因으로는 遺傳的인 要因으로 보거나, 에스트로젠과 관련지어 생각하고 있으나 아직 明確한 原因은 糾明되어 있지 않다<sup>11)</sup>.

韓醫學에서는 腹腔內에서 發生하는 腫瘍疾患을 積聚, 癥瘕, 痰癖, 痞塊, 腸覃, 石瘕, 血蠱 등으로 分類하고 있으며<sup>4,5)</sup> 이 중에서 癥瘕는 女性 腫瘍疾患을 總稱하는 것이며 石瘕, 血蠱 등의 病證은 子宮筋腫과 類似하다고 인식하고 있다<sup>4,12,13)</sup>.

癥瘕에 대하여 <中藏經><sup>45)</sup>에서는 “積聚癥瘕雜蟲者 皆五臟六腑 眞氣失弱 邪氣遂而生焉. 癥者系於氣 瘕者系於血. 瘕有勞氣

冷熱虛實燥濕 藥鬼憂之十二名 瘕有青黃燥血脂孤蛇口之八名”이라 하였고, <巢氏諸病源候論><sup>46)</sup>에서는 “瘕瘕者皆由寒溫不調 飲食不化與藏氣相搏結所生也. 其病不動者 直名為瘕 若病雖有結瘕而可推移者名為瘕瘕 瘕者假也 謂虛假可動也”라 하였으며, <醫宗金鑑><sup>47)</sup>에서는 “五積六聚分臟腑 七瘕八瘕氣血凝, 瘕積不動有定處 瘕聚推移無定形”이라 하였고, <東醫寶鑑><sup>48)</sup>에서는 “六鬱為積 聚瘕瘕瘕之本 瘕者微也 腹中堅硬按之應手曰瘕, 瘕者假也 腹中手硬而忽聚忽散無有常處”라고 하였다.

石瘕에 대하여서는 <黃帝內經><sup>49)</sup>水脹編에서 胞中에서 發生하며 寒氣가 子門에 留客하여 子門이 閉塞되면 鬱血이 胞中에 留積하여 妊娠한 狀態와 類似하다고 설명한 이래 <東醫寶鑑><sup>48)</sup>에서는 “石瘕者胞中損傷瘀血結成久則堅硬如石 乃先感寒氣而後血壅所致”라고 하였고, 孫<sup>50)</sup>은 女子에서만 發生된다 하였으며 血蟲에 대하여는 “血蟲即瘕瘕之甚者 腹肚堅硬如石”이라고 하여 女性腫瘍 疾患 中 子宮筋腫을 石瘕와 血蟲로 認識하고 있다.

下瘀血湯은 張仲景의 <金匱要略><sup>27)</sup> 중 婦人產後病脈證治第二十一에 실린 處方으로 문헌을 살펴보면 “產後腹痛 法當以枳實芍藥散 假令不愈者 此為腹中有乾血著臍下 宜下瘀血湯主之”라고 하였고 證治는 產後瘀熱內結胞宮의 腹痛<sup>27)</sup>이라고 하였다. 所謂 乾血이라는 것은 多爲瘀血久積化熱하여 發灼血乾而形成된 것이다. 이러한 瘀血이 胞宮에 內結하여 腹痛을 일으키는 것을 子宮筋腫의 韓醫學의 개념으로 보았다.

下瘀血湯을 구성하는 藥物들의 效能을 살펴보면 大黃은 逐瘀經痛하는 效能이 있어 瘀血經閉, 積滯腹中痛에, 桃仁은 破血祛瘀하면서 潤燥滑腸하는 作用이 있어 瘀血阻滯腹痛, 積聚血滯作痛에, 蔗蟲은 破血逐瘀하는 效能이 있어 瘀血經閉, 瘕瘕痞塊에 사용된다<sup>51)</sup>. 血液은 人體를 營養하는 重要한 物質로 正常的인 狀態에서는 脈管內를 쉬지 않고 循環하여 五臟六腑와 四肢百骸에 榮養을 供給하여 주지만 이와 같은 循環이 어떤 原因에 의하여 造成과 血行에 障礙를 가져오고 속에 瘀血이 停滯하게 되거나 또는 離經妄行하고 虧損不足하게 되는 등 血分에 病變을 造成하게 되므로, 破血去瘀法은 蓄血과 瘀血證에 適用하는 方法으로 經閉와 經痛, 瘀積包塊, 外傷瘀腫 그리고 瘀血이 胸脇에 內停되어 疼痛한 症 및 腫腫初期, 產後에 惡露가 不行하는 등의 症狀를 治療한다<sup>52)</sup>. <金匱要略><sup>27)</sup>에 나오는 下瘀血湯은 大黃 桃仁 蔗蟲으로 構成되어 있으며 破血下瘀하는 效能이 있어 產後에 乾血이 內結되어 臍下에 腹痛이 일어나는 것과 血瘀로 經水不利된 症狀를 治療한다.

이상을 종합하여 보면 下瘀血湯은 破血祛瘀 逐瘀經痛 하는 藥物로 構成되어 있어 婦人疾患에 應用될 수 있으리라고 思料된다.

본 연구에서는 下瘀血湯을 농도별로 투여하여 子宮筋腫細胞에 미치는 영향을 평가하였다. 우선 약제 투여후의 세포증식에 미치는 영향은 농도가 증가할수록 세포증식 억제제가 많이 일어났으며, 300µg/ml에서는 60%의 증식억제를 보였다. 이러한 증식억제가 細胞自滅死로 유도된 것인지를 DNA fragmentation 분석을 통해 약제 투여 후에 분절이 일어나는 細胞自滅死를 확인하였으며, 類細胞分析機를 이용한 세포주기회로 분석에서 subG1기의 연장을 확인하였다. 그러므로 下瘀血湯은 G1기의 연장을 초래하

여 細胞自滅死로 이끈다고 볼 수 있다. 또한 細胞自滅死와 관련된 단백질인 pro-caspase 9과, pro-caspase 3의 감소와 PARP의 분절을 확인할 수 있었으므로, caspase 9, caspase 3의 경로로 통한 細胞自滅死라고 볼 수 있다. 세포주기회로 분석에서 subG1기의 연장이 확인되어 p27과 p21 유전자를 분석하였으나, p21은 변화를 나타내지 않았고, p27은 오히려 감소하여 두 유전자는 G1 주기회로의 연장에는 관여되지 않음을 보여 주었다. 이외에 p53, Bcl-2, cIAP 유전자들을 분석하였으나 cIAP1에서만 감소를 나타내었고, p53, Bcl-2, cIAP2의 발현에는 차이를 보이지 않았다. 그러므로 下瘀血湯에 의한 子宮筋腫細胞의 증식억제는 cIAP1의 감소, caspase 9, caspase 3의 활성화, PARP분할 등이 작용을 하여 細胞自滅死로 이끈다고 볼 수 있다.

이상의 결과로 보아 下瘀血湯은 子宮筋腫細胞를 細胞自滅死로 이르게 하므로, 子宮筋腫의 약물치료를 위한 약제로서의 가능성을 보여주었다.

## 결론

下瘀血湯이 子宮筋腫에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 患者로부터 적출한 1차배양 子宮筋腫細胞에 下瘀血湯을 처치한 후 cell cycle과 apoptosis에 관련된 단백질 발현변화를 살펴본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

下瘀血湯은 300 µg/ml의 농도에서 細胞의 증식억제에 효과가 있음을 확인하였다. 下瘀血湯은 농도의존적으로 sub G1의 증가를 유도하였고, DNA의 분절화를 유도하였다. 下瘀血湯은 cIAP1, caspase 9, caspase 3, PARP의 경로를 통하여 子宮筋腫細胞를 apoptosis로 유도함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 下瘀血湯은 子宮筋腫細胞를 細胞自滅死로 이르게 하므로, 子宮筋腫의 약물치료를 위한 약제로서의 응용 가능성을 보여주었다.

## 감사의 글

This study was supported by a grant from the Oriental Medicine R&D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (B050035-AM0815-05N1-00020B).

## 참고문헌

1. Buttram, V.C., Reiter, R.C. Uterine leiomyomata : Etiology, symptomatology, and management. *Fertil. Steril.* 36: 433-445, 1981.
2. Gambone, J.C., Reiter, R.C., Lench, J.B., Moore, J.G. The impact of a quality assurance process on the frequency and confirmation rate of hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 63:545-550, 1990.
3. 신영우, 변영진, 나영호, 김창학, 권순욱. 복식 전자궁 적출술에 관한 임상 통계적 고찰. *대한산부학회지* 28:90, 1985.

4. 裒恩敬, 李京燮, 宋炳基. 子宮筋腫의 韓醫學의 接近. 大韓韓方婦人科學會誌 7(1):79-86, 1994.
5. 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 子宮筋腫의 治驗1例. 大韓韓醫學會誌 11(1):33-38, 1990.
6. 이종학. 자궁근종에 대한 임상적 및 병리학적 연구. 대한산부인과학회지 30:213-222, 1987.
7. 王曉萍. 婦產科病症治精要. 北京, 科學技術文獻出版社. pp 208-236, 1999.
8. 백원민. 자궁근종의 임상적 고찰. 대한산부인과학회지 26: 1047-1054, 1983.
9. 송계승. 자궁근종의 임상통계학적 관찰. 대한산부인과학회지 30:981-988, 1987.
10. Miller, N.F., Ludovici, P.P. Origin and development of uterine fibroids. Am. J. Obstet. Gynecol. 70:720, 1985.
11. Lipshultz, A. Experimental fibroids and the antifibromatogenic action of steroid hormones. JAMA 120:173, 1984.
12. 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 瘕瘕의 東西醫學的 考察. 大韓韓醫學會誌 7(1):84-88, 1986.
13. 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 瘕瘕患者에 對한 臨牀的 考察. 大韓韓方婦人科學會誌 4(1):23-27, 1991.
14. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울, 杏林出版社. pp 249-256, 1980.
15. 李京燮, 宋炳基. 瘕瘕 狀態에 關한 文獻的 考察. 서울, 東洋醫學研究室. pp 46-52, 1980.
16. 문구, 조성각. 積聚處方에 對한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌 1(2):315-329, 1996.
17. 王肯堂. 六科準繩. 서울, 大星文化社. pp 252-268, 1992.
18. 宋炳基. 邪客子門의 證治體系에 關한 考察. 서울, 醫林. pp 150, 1982.
19. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울, 杏林出版. pp 251, 254-256, 1992.
20. 金鍾桓. 子宮筋腫의 治療法에 關한 韓醫學的 考察. 大韓韓方婦人科學會誌 11(1):209-227, 1998.
21. 申鎮湜. 比較醫學的 側面에서 본 瘕瘕의 疾病에 關한 文獻的 考察. 東醫病理學會誌. 1:67-70, 1984.
22. 鄭奉天. 子宮筋腫의 治驗. 大田大學校論文集. 1(1):15-33, 1992.
23. 한의부인과학 편찬위원회. 韓醫婦人科學. 서울, 도서출판 정담. pp 303-313, 2002.
24. 許浚. 原本 東醫寶鑑. 서울, 南山堂. pp 490, 1991.
25. 張機. 金匱要略自學輔導. 서울, 中醫古籍出版社. pp 172, 173, 1988.
26. 萬全. 萬氏婦人科. 湖北, 湖北人民出版社. pp 10, 1983.
27. 李克光. 金匱要略譯釋. 上海, 上海科學技術出版社. pp 641, 1993.
28. 金眞喜, 白承燧. 桂枝茯苓丸이 子宮筋腫細胞의 成長억제와 MAP Kinase 活性에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 14(2):85-101, 2001.
29. 白承燧, 李京燮, 宋炳基. 七製香附丸이 子宮細胞株이 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 13(1):186-218, 2000.
30. Stewart, E.A., Faur, A. The future of fibroid therapy. Contemp. Obstet. Gynecol. 45:26-35, 2000.
31. Brandon, D.D., Erickson, T.E., Keenan, E.J., Strawn, E.Y., Novy, M.J., Burry, K.A., Warner, C., Clinton, G.M. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80:1876-1881, 1995.
32. West, C.P., Lumsden, M.A., Lawson, S., Williamson, J., Baird, D.T. Shrinkage of uterine fibroids during therapy with goserelin(Zoradex) : a lutenizing hormone-releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. Fertil. Steril. 48:45-51, 1987.
33. Murphy, A.A., Morales, A.J., Kettel, L.M., Yen, S.S. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestosterone RU486: dose-response effect. Fertil. Steril 64(1):187-190, 1995.
34. Lee, B.S., Marolin, S.B., Nowa, R.A. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibit leiomyoma cell proliferation and collagen production. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83:219-223, 1998.
35. Nowak, R.A. Novel therapeutic strategies for leiomyomas: targeting growth factors and their receptors. Environ. Health Perspect. 108 Suppl 5:849-853, 2000.
36. Lee, B.S., Nowak, R.A. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor-beta3(TGF beta 3) and altered responses to the atiproliferative effects of TGF beta. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86:913-920, 2001.
37. Sumitani, H., Shozu, M., Segawa, T., Murakami, K., Yang, H.J., Shimada, K., Inoue, M. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. Endocrinology 141:3852-3861, 2000.
38. Matuo, H., Maruo, T., Samoto, T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82:293-299, 1997.
39. Arici, A., Sozen, I. Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. Fertil. Steril. 73:1006-1011, 2000.
40. Klagsbrun, M., Dluz, S. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. J. Biol. Chem. 268: 18330-18334, 1993.
41. Strawn, Jr E.Y., Novy, M.J., Burry, K.A., Bethea, C.L. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. Am. J. Obstet. Gynecol. 172:1837-1844, 1995.
42. Niu, H., Simari, R.D., Zimmerman, E.M., et al. Nonviral

- vector-mediated thymidine kinase gene transfer and ganciclovir treatment in leiomyoma cells. *Obstet. Gynecol.* 91:735-740, 1998.
43. Baek, W., Kim, D., Jung, N., Cha, S., Bae, I., Cho, C., et al. Increased expression of cyclin G1 in leiomyoma compared with normal myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188: 634-639, 2003.
44. 대한산부인과학회. *부인과학(3판)*. 서울, 도서출판갈반서적. pp 473-488, 1991.
45. 華陀. *中藏經*. 서울, 成輔社. pp 4, 13, 1978.
46. 巢元方 著. 丁光迪 主編. *諸病源候論校註(下)*. 北京, 人民衛生出版社. pp 1107-1110, 1992.
47. 吳謙 等編. *醫宗金鑑下冊*. 北京, 人民衛生出版社. p 38, 1982.
48. 許浚. *東醫寶鑑*. 서울, 南山堂. pp 487, 490, 491, 1975.
49. 王冰 註. *黃帝內經*. 서울, 高文社. pp 75, 80, 112, 123, 147, 172, 281, 296, 353, 1971.
50. 孫思邈. *備急千金要方*. 北京, 人民衛生出版社. pp 59-62, 66, 211-215, 1982.
51. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. *본초학*. 서울, 영림사. pp 242-243, 423-424, 430-431, 1991.
52. 李尙仁, 金東傑, 李暎鍾, 盧昇鉉, 朱榮丞. *方劑學*. 서울, 永林社. pp 245-246, 1990.