

## 천련자 메탄을 추출물이 Bcl-2 발현 억제를 통해 유방암 세포의 자멸사에 미치는 영향

대구한의대학교 한의과대학 한방부인과학교실

윤우경, 김동철

### ABSTRACT

#### *Toosendan Fructus* Induces Apoptotic Cell Death in MCF-7 Cell, Via the Inhibition of Bcl-2 Expression

Woo-Kyeong Yoon, Dong-Chul Kim

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

**Purpose:** The research is to investigate the effect of TFE on apoptosis of human-derived breast cancer cells, to find out the relationship with apoptosis.

**Methods:** Human-derived breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 cells were treated by TFE with various concentration. The inducement effect of TFE on cell apoptosis was observed with MTT assay and the relationship between the treatment and apoptosis was investigated with FACS analysis, TUNEL assay and DNA laddering assay and the change in the protein levels of PARP and caspase-3 activities were also observed. The release of cytochrome-*c* was observed to find out the pathway of apoptosis induced by TFE.

**Results:** The cell apoptosis was significantly induced in MCF-7 cells treated with TFE in concentration-dependent and time-dependent manner. It was verified by FACS analysis, TUNEL assay, DNA laddering assay that cell-death was caused not by necrosis but by apoptosis. The activity of PARP and caspase were increased concentration-dependently. The release of cytochrome-*c* was decreased in proportion to the concentration of the fruit extract. It therefore demonstrated that mitochondria were involved in apoptosis induced by TFE. The appearance of Bcl-2 protein was decreased concentration-dependently.

**Conclusion:** The treatment by TFE induced apoptosis of human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7. It seems likely that cell-death was caused by apoptosis and mitochondria were involved in it. The mechanism of protein change causing apoptosis seems related to the inhibition of Bcl-2 protein, the promotion of inversion from cytochrome-*c* into cytosol, the activation of caspase and the promotion of PARP cleavage.

**Key Words:** *Toosendan Fructus*, apoptosis, caspase-3, Bcl-2, cytochrome-*c*, human breast adenocarcinoma

## I. 緒 論

유방암은 세계적으로 가장 빈번한 여성의 사망원인 질환 중의 하나이며, 매년 약 100만명 이상의 환자가 발생한다<sup>1)</sup>. 우리나라에서도 유방암은 여성암 중 자궁암, 위암 다음으로 많은 비중을 차지하고 있다<sup>1)</sup>. 특히, 유방암은 2002년 새로 발생한 암환자 중에서 증가율이 가장 높아, 1995년과 비교하면 166%의 급격한 증가세를 보이고 있으며, 또한 사망자수에 있어서도 급격한 증가세를 보이고 있다<sup>2)</sup>.

유방암과 유사한 한의학적 질환으로는 石癰<sup>3)</sup>, 乳巖<sup>4)</sup>, 奶巖<sup>5)</sup>, 番花奶<sup>6)</sup>, 妳巖<sup>7)</sup> 등이 있다. 증상으로는 乳房腫塊, 不痛, 不痒, 不赤하고, 或 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體倦瘦, 月經不調 등이 나타나기도 하며<sup>4,8)</sup>, 病因으로 肝鬱氣滯<sup>4)</sup>, 憂怒抑鬱<sup>9)</sup>, 憂鬱傷肝<sup>10)</sup>, 思慮傷肝<sup>10)</sup> 등의 七情所傷과, 이것이 오래되어 氣血損傷<sup>4)</sup>, 衝任失調<sup>4)</sup> 되어 장부기능이 실조된 것으로 볼 수 있다. 치료로는 초기에 肝氣鬱結로 인한 때는 疏氣行血, 疏肝解鬱 하는 처방을 이용하였고<sup>10)</sup>, 氣血虧損할 때는 大補氣血하는 처방을 이용하였다<sup>4)</sup>.

유방암에 관해 국내 연구 발표된 단일 약재로는, 鬼箭羽<sup>11)</sup>, 黃芩<sup>12)</sup>, 半枝蓮<sup>13)</sup>, 槲寄生<sup>14)</sup>, 三稜<sup>15)</sup>, 탕약으로는 抗癌丹<sup>16)</sup>, 加味雙和湯<sup>17)</sup>, 清肝解鬱湯<sup>18)</sup>, 歸朮破癥湯<sup>19)</sup>, 活絡交靈丹<sup>20)</sup>, 益氣養榮湯<sup>21)</sup>, 橘葉散變方<sup>22)</sup> 등이 있으며, 蜂毒 藥鍼液<sup>23)</sup>을 이용한 연구도 보고되고 있다.

川棟子(*Toosendan Fructus*)는 苦寒有小毒하며, 肝胃小腸經으로 入하고, 胸脇痛, 脘腹脹痛, 疝痛, 蟲積腹痛을 치료한다<sup>24)</sup>. 현재까지 천련자에 대한 연구로는,

주로 천련자의 毒性에 관한 연구<sup>25)</sup> 및 천련자가 肝膽에 미치는 영향에 대한 약리학적 연구<sup>26,27)</sup> 및 전립선에 미치는 영향<sup>28)</sup> 등이 보고된 바 있으나 천련자에 대한 항암 효과와 기전 연구는 부족한 편이다.

이에 본 연구자는 천련자를 인간유래 breast adenocarcinoma cell line인 MCF-7 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재 료

DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium)과 fetal calf serum은 BioWhittaker (Walkersville, MD, USA)와 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)와 기타 다른 reagent는 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 천련자 추출물의 제조

천련자 추출물(*Toosendan Fructus Extract*, TFE)은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입한 천련자(*Toosendan Fructus*) 200g을 1 L의 메탄올에 72시간 추출한 후에 여과농축하여 동결건조하였다. 천련자의 최종 수율은 7.34%이었으며 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)에 녹여 0.2 μm filter (Millipore Corporation,

Bedford, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

### 3. 세포배양

인간 유래 breast adenocarcinoma cell line인 MCF-7 cell은 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로 부터 구입하였으며, 10% fetal calf serum, 50 units/ml penicillin과 50 mg/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 37°C의 온도와 5%의 CO<sub>2</sub>가 유지되는 환경에서 배양하였다. 1×10<sup>6</sup> cells 개의 MCF-7 cells을 10 cm<sup>2</sup> plastic dish에 24시간 배양하여 (80% 이상의 confluence를 유지), 24시간 배지를 고갈한 뒤, MCF-7 cells에 지정된 시간동안 TFE를 농도별로 처리하였다.

### 4. MTT 세포생존율 측정

96 well plate의 well당 5×10<sup>4</sup>개의 MCF-7 cells을 배양하여 confluency가 80%이상인 경우, 24시간 배지를 고갈한 다음, TFE를 농도별(0.03-0.30 mg/ml), 시간별(24, 48 h)로 처리하여, TFE의 세포생존율을 측정하였다. 세포배양 후 생존한 세포를 0.5 mg/ml의 MTT로 처리한 후, 4시간 incubation하였다. 그 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals에 200 µl의 DMSO를 가하여 용해하였다. 흡광도는 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. 세포생존율은 어떠한 처리도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다. [즉, viability (% control) = 100 x (absorbance of treated sample)/(absorbance

of control)]

### 5. Flow cytometric analysis

붉은색 형광염색약인 propidium iodide (PI)와 초록색 형광염색약인 FITC annexin V (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 apoptotic cell을 분석하였다. 1×10<sup>6</sup>개의 cells를 10 cm<sup>2</sup> plastic plate에 깔고 70-80%의 confluence를 유지하였다. 먼저 cells에 24시간 배지 고갈을 하고, 다음 24시간 동안 TFE를 농도별로 처리하였다. 부착된 cells를 trypsin으로 처리하여 회수하였고 부유 cells과 trypsin처리 cells는 모두 70% ethanol로 resuspension하여 -20°C에서 overnight하여 고정시켰다. 고정된 cell은 1×10<sup>6</sup>개/ml의 농도로 PBS에 suspension시킨 후, FITC annexin V와 PI를 처리하여 얼음위에서 20분간 반응시켜 flow cytometer (Particle Analysis System, Partec GmbH, Münster, Germany)로 분석하였다.

### 6. TUNEL assay

MCF-7 cell을 4 well chamber slide에 well당 1×10<sup>5</sup>개의 농도가 되게 배양하고 TFE를 농도별로 24시간 처리하였다. Cell은 PBS로 2회 washing한 후에 4% paraformaldehyde로 고정하여 Tunel (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) assay에 사용하였다. Tunel assay는 *In Situ* cell death detection kit-POD (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 kit에 포함된 protocol에 맞춰 분석하였다. 즉, paraformaldehyde로 고정된 cell을 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하여 blocking시키고 0.1%

triton X-100/0.1% sodium citrate로 permeabilisation 상태로 만든 후에 TdT-enzyme이 처리된 용액으로 labeling하였다. PBS로 2회 washing한 후에 converter-peroxidase(POD)로 37°C에서 30분간 처리하고 DAB로 발색하여 light microscope로 관찰하였다.

### 7. DNA laddering assay

Cell은 회수하여 PBS로 2회 washing한 후,  $5 \times 10^6$ 개의 cell을 PBS 200  $\mu$ l로 suspension시켰다. DNA laddering assay는 DNA purification kits (Nucleogen, Seoul, Korea)를 사용하여 agarose gel electrophoresis를 실시하여 분석하였다. 즉,  $5 \times 10^6$ 개/200  $\mu$ l PBS로 준비된 cell에 proteinase K(100  $\mu$ g/ml)와 RNase A(20  $\mu$ g/ml)를 첨가하고 kit에서 제공되는 lysis buffer를 사용하여 56°C에서 10분간 반응시켰다. 400  $\mu$ l의 순수 ethanol을 가하여 vortexing한 후, kit에서 제공되는 protocol에 따라 filtering과 washing 과정을 반복하여 genomic DNA를 회수하였다. DNA 전기영동은 1.8% agarose gel을 사용하여 50 V에서 1시간 동안 전개시켰으며 ethidium bromide(0.5  $\mu$ g/ml)로 염색하여 band를 확인하였다.

### 8. Poly-ADP Ribose Polymerase(PARP) cleavage

세포핵추출은 Kim 등<sup>29)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 즉, cell을 ice-cold PBS로 2회 세척한 후 PBS를 가하여 수거한 다음 microtubes에 보관하였다. 그 후 cells을 2,000 $\times$ g에서 5분간 원심분리하고, 10 mM의 HEPES (pH 7.9), 10 mM의 KCl, 0.1 mM의 EDTA, 0.5%의 Nonidet

P-40, 1 mM의 DTT와 0.5 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유한 저장액의 buffer를 가하여 세포를 rupture시켰다. Cells lysates를 얼음위에 10분간 방치한 다음 7,200 $\times$ g로 5분간 4°C에서 원심분리 하였다. Crude nuclei를 함유한 pellets에 20 mM의 HEPES (pH 7.9), 400 mM의 NaCl, 1 mM의 EDTA, 10 mM의 DTT와 1 mM의 PMSF를 함유한 추출 buffer를 50  $\mu$ l를 가하여 현탁시킨 후, 얼음에 30분간 방치하였다. 그 후 15,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리한 후, nuclear fractions를 함유한 상층액을 얻었다. Nuclear fractions 50  $\mu$ g을 7.5% SDS-polyacrylamide gels을 사용하여 분해시키고, nitrocellulose membranes에 이전하였다. 이 membranes을 5%의 BSA를 함유한 PBS tween으로 4°C에서 overnight하여 blocking하였다. 그 후 anti-PARP antibody (1:2000)로 실온에서 배양하였다. 발색은 immunoblot analysis에서 기술한 방법으로 하였다.

### 9. Caspase-3 activity

Caspase-3 activation은 procaspase-3로부터 proteolytic processing에 의해 cleaved된 p17, p12절편을 만들어 낸다. 따라서 cleaved caspase-3 sandwich ELISA kit(Cell signaling, MA, USA)를 사용하여 caspase-3의 activity를 측정하였다. Kit에 제공되는 cell lysis buffer를 이용하여 cell을 분쇄하여 15,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 cell lysates (상층액)를 준비하였다. Cell lysates로부터 cleaved caspase-3는 제품에 첨부된 protocol에 맞게 ELISA법으로 분석하였다.

## 10. Cell lysates의 준비

Cells은 10 mM의 Tris (pH 7.4), 100 mM의 NaCl, 30 mM의 sodium pyrophosphate, 1 mM의 EGTA, 0.5%의 Triton X-100, 10%의 glycerol, 1 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride와 100  $\mu$ M의 sodium orthovanadate를 함유한 buffer로 녹였다. Cell lysates는 매 5분마다 vortexing하면서 30분간 얼음에 방치한 후, 15,000 $\times$ g에서 15 분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 상등액을 취하여 total cell lysates로 사용하였다.

## 11. Immunoblot analysis

SDS-PAGE전기영동과 immunoblot analyses는 Kim 등의 방법<sup>28)</sup>에 따라 시행하였다. 단백질을 12% gel에 전기영동으로 분리하고, 이것을 nitrocellulose paper로 이전하였다. Nitrocellulose paper에 Bad, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Actin (Zymed Laboratory, San Francisco, CA, USA), caspase-9, caspase-3 (Pharmingen, San Diego, CA, USA)등의 antibody를 가하여 배양하였다. 면역반응성 단백질은 ECL chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 발색하였다.

## 12. Cytosolic fraction에서 cytochrome-c analysis

MCF-7 cell은 PBS로 2회 washing 한 후, lysis buffer (250 mM sucrose, 20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitors)에 resuspension시켰다. 얼음 위에서 20분간 incubation 한 후, Dounce homogenizer

(Wheaton, Millville, NJ)를 사용하여 세포를 homogenization (15 strokes)시켰다. Homogenates는 1,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 15,000 $\times$ g에서 20분간 더 원심분리하였고 회수된 cytosolic fraction (상등액)을 cytochrome-c 분석에 사용하였다. Cytosolic fractions 20  $\mu$ g을 12.5% SDS-polyacrylamide gels을 사용하여 전개시키고, nitrocellulose membranes에 이전하였다. 이 membranes을 5%의 BSA를 함유한 PBS tween으로 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 blocking하였다. 그 후 anti-cytochrome-c antibody (1:2000)로 실온에서 배양하였다. 발색은 immunoblot analysis에서 기술한 방법으로 하였다.

## 13. Statistical analysis

실험결과는 mean  $\pm$  S.D.로 나타내었으며, student t-test 통계처리방법으로 유의성을 검정하였다. 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다. 통계 프로그램은 spss 11.0을 사용하였다.

# III. 結 果

## 1. 천련자가 MCF-7 cell의 세포생존율에 미치는 영향

다른 농도에서의 천련자추출물(TFE)이 MCF-7 cell의 생존율에 미치는 영향을 분석하기 위하여, MCF-7 cell에 24시간 배지고갈을 한 후, TFE를 0.03-3.0 mg/ml의 농도로 24-48시간 처치하였다. 그 결과 대조군은 0 h에서  $1.0000 \pm 0.0524$ , 24 h에서  $1.4720 \pm 0.0376$ , 48 h에서  $1.9725 \pm 0.0873$ 으로 시간의 경과에 따른 세포의 증식을 나타내었다. 그러나 TFE 0.03 mg/ml을

처리한 경우는 24 h에서  $0.6039 \pm 0.0575$ , 48 h에서  $0.0835 \pm 0.0063$ 으로 유의하게 감소하였다( $P < 0.01$ ). TFE 0.10 mg/ml을 처리한 경우에는 24 h에서  $0.2674 \pm 0.0154$ , 48 h에서  $0.0729 \pm 0.0016$ 으로 유의하게 감소

했으며( $P < 0.01$ ), TFE 0.30 mg/ml을 처리한 경우에는 24 h에서  $0.2086 \pm 0.0247$ , 48 h에서  $0.0710 \pm 0.0029$ 로 유의하게 감소하였다( $P < 0.01$ ).

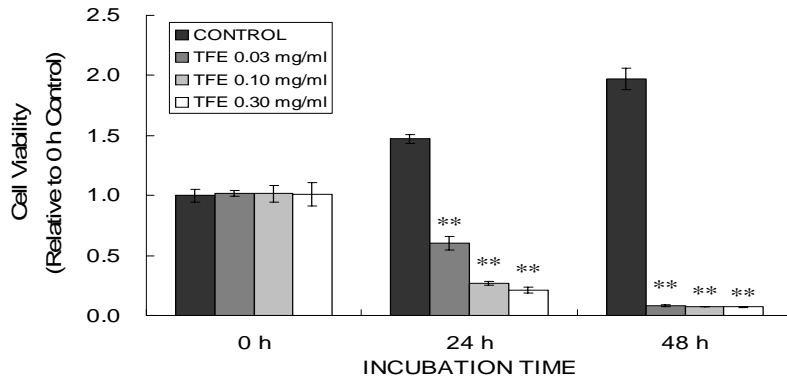


Fig. 1. The effects of TFE on the changes of cell viability. MCF-7 cells were exposed to TFE (0.03-0.30 mg/ml) for 24-48 h. Cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with eight separate experiments. significance was compared with untreated control at the same treated time,  $**P < 0.01$ , (TFE; *Toosendan Fructus Extract*)

## 2. 천련자가 MCF-7 cell의 cell membrane 변화에 미치는 영향

TFE가 0.03-0.30 mg/ml의 농도에서 24, 48 h에서 유도한 세포사멸에 의한 것인지를 알아보기 위해서, 붉은색 형광염색약인 PI와 초록색 형광염색약인 FITC annexin V를 사용하여 apoptotic cell을 분석하였다. FACS analysis결과 TFE의 농도가 증가할수록 세포외막으로 돌출된 PS와 결합한 FITC annexin V의 증가로 세포사멸의 분율이 각각의 농도에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.01$ )(Fig. 2).

TFE가 MCF-7 cell을 0.03-0.30 mg/ml의 농도에서 유도한 세포사멸을 세포의 형태학적 특징인 condensed nuclei를 관찰하기 위하여 TUNEL assay를 실시하였다.

대조군에서는 TUNEL stain에 양성인 MCF-7세포가 많이 나타나지 않았으나, TFE를 처리한 경우에는 TUNEL stain에 양성인 세포가 농도에 따라 증가하였다(Fig. 3). DNA laddering 실험에서도 TFE의 농도 의존적으로 DNA의 fragmentation이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

## 3. 천련자가 MCF-7 cell의 DNA 분절에 미치는 영향

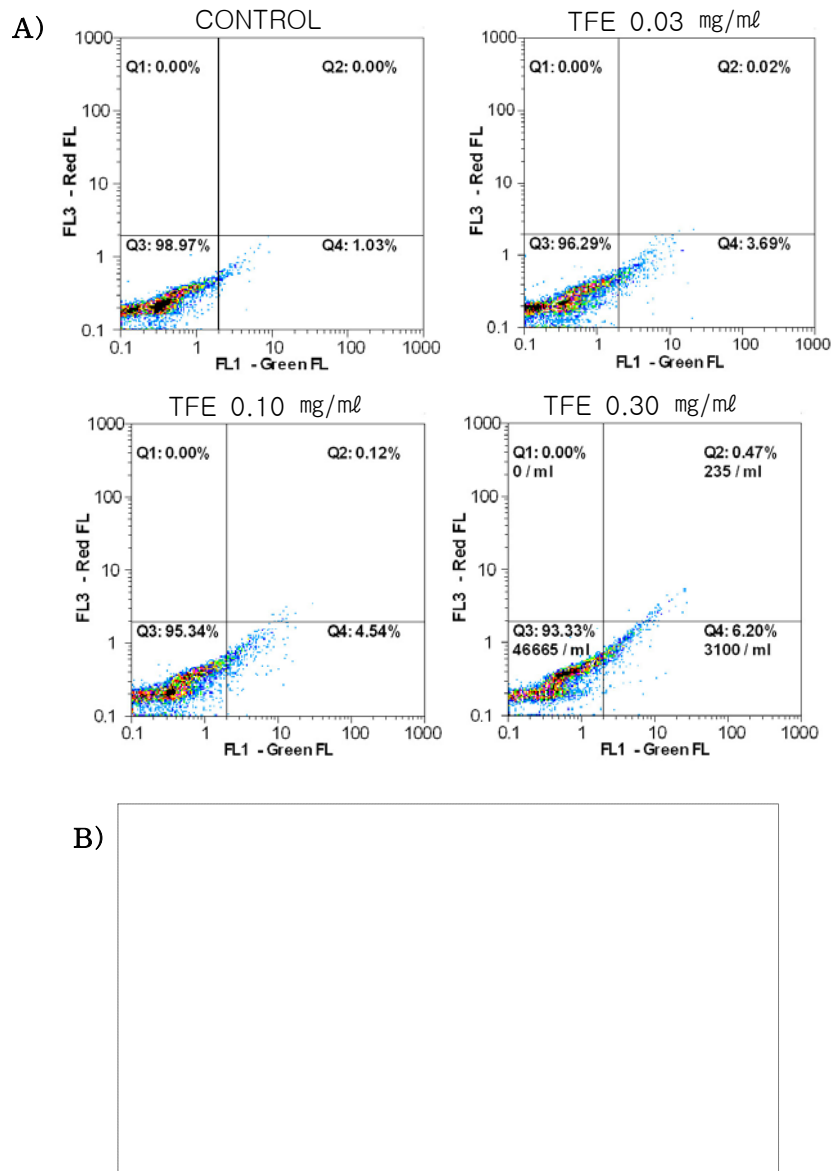


Fig. 2. Flow cytometric profile of green versus red fluorescence of MCF-7 cells stained with FITC Annexin V and PI.

MCF-7 cells were treated with TFE for 24 h. The population was separated into three groups: live cells showing only a low level of fluorescence, apoptotic cells showing green fluorescence and necrotic cells showing both red and green fluorescence (A), and the fold increase of apoptotic death cell was calculated (B). Data represent the mean  $\pm$  SD of six separate experiments. \*\*Significant at  $P < 0.01$  compared with vehicle treated. (TFE; *Toosendan Fructus* Extract)

### 3. 천련자가 MCF-7 cell의 DNA 분절에 미치는 영향

TFE가 MCF-7 cell을 0.03-0.30 mg/ml

의 농도에서 유도한 세포자멸사를 세포의 형태학적 특징인 condensed nuclei를 관찰하기 위하여 TUNEL assay를 실시

하였다.

대조군에서는 TUNEL stain에 양성인 MCF-7세포가 많이 나타나지 않았으나, TFE를 처치한 경우에는 TUNEL stain에 양성인 세포가 농도에 따라 증가하였

다(Fig. 3). DNA laddering 실험에서도 TFE의 농도 의존적으로 DNA의 fragmentation이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

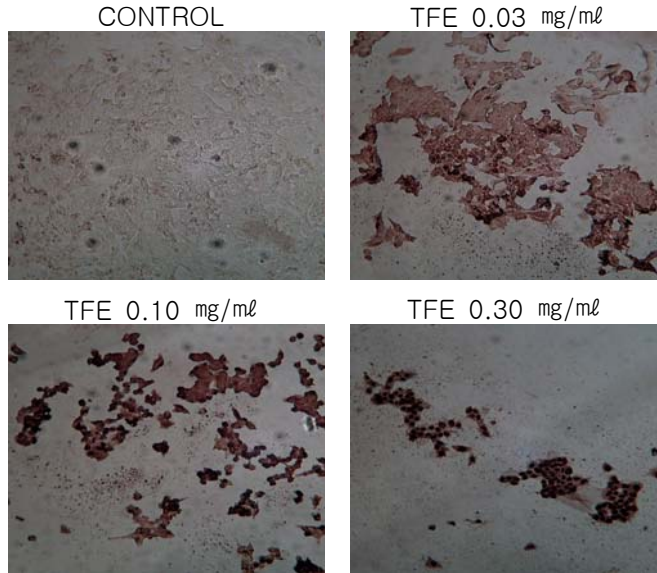


Fig. 3. TUNEL assay of TFE-treated MCF-7 cells  
MCF-7 cells treated with 0.03-0.30 mg/ml of TFE for 24 h. The TUNEL assay confirms that the TFE treatment induces apoptotic cell death. The dark violet spots are condensed nuclei. (TFE; *Toosendan Fructus Extract*)

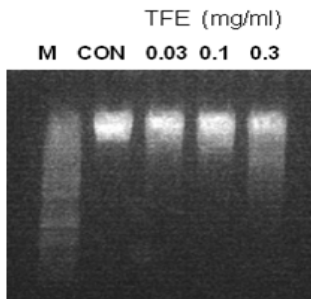


Fig. 4. DNA Laddering of MCF-7 cells exposed to TFE  
TFE induces internucleosomal DNA fragmentation. MCF-7 cells treated with TFE for 24 h. M is the maker of size. CON is untreated control. (TFE; *Toosendan Fructus Extract*)

#### 및 Caspase에 미치는 영향.

Flow cytometric analysis와 DNA laddering으로 확인된 TFE의 세포사멸 유도 결과와 관련하여, 세포내 apoptosis 관련 단백질중의 하나인 핵내의 PARP의 변화를 핵분획에서 관찰하였다.

본 실험에서는 농도가 증가할수록 cleaved PARP가 유의하게 증가함을 보여 주었고 (Fig. 5A), procaspase가 감소하는 것을 보여 주었다(Fig. 5B). Cleaved caspase-3 kit를 사용하여 caspase-3의 활성형을 측정된 결과에서도 TFE 농도 의존적으로 활성이 증가되었다(Fig. 5C).

#### 4. 천련자가 MCF-7 cell의 PARP 분할



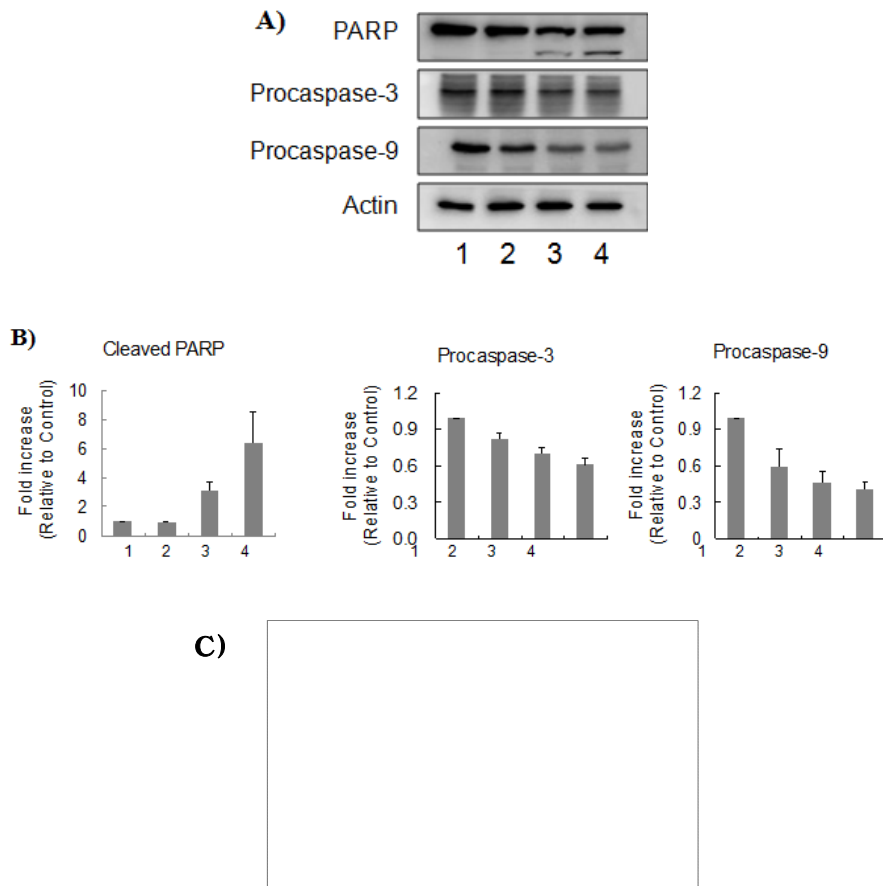


Fig. 5. The effects of TFE on the levels of proteins associated with apoptosis. MCF-7 cells were exposed to TFE (0.03-0.30 mg/ml), for 24 h. PARP was immunoblotted using the PARP antibodies in the nuclear fractions and procaspase-3 and -9 were immunoblotted in total cell lysate. Actin was used as a loading control (A). The density of proteins was calculated using densitometer (B). Cleaved caspase-3 was detected by sandwich ELISA kit of cleaved caspase-3 (C). The 1 is control, 2 is 0.03 mg/ml of TFE, 3 is 0.10 mg/ml of TFE, and 4 is 0.30 mg/ml of TFE. (TFE; *Toosendan Fructus* Extract)

### 5. 천련자가 MCF-7 cell의 pro/anti-apoptotic protein에 미치는 영향.

TFE가 유도하는 세포자멸사에 관여하는 protein을 알아보기 위하여, pro-apoptotic protein인 Bad, Bax, anti-apoptotic protein인 Bcl-2, Bcl-XL<sup>30,31</sup>의 발현을 total lysate로 분석하였다.

실험결과 TFE는 pro-apoptotic protein인 Bad와 Bax의 발현에는 영향을 미치지 않았으며, anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현을 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. Bcl-XL의 발현은 대조군에 비해 감소했으나 유의한 수준의 결과는 나타나지 않았다(Fig. 6).

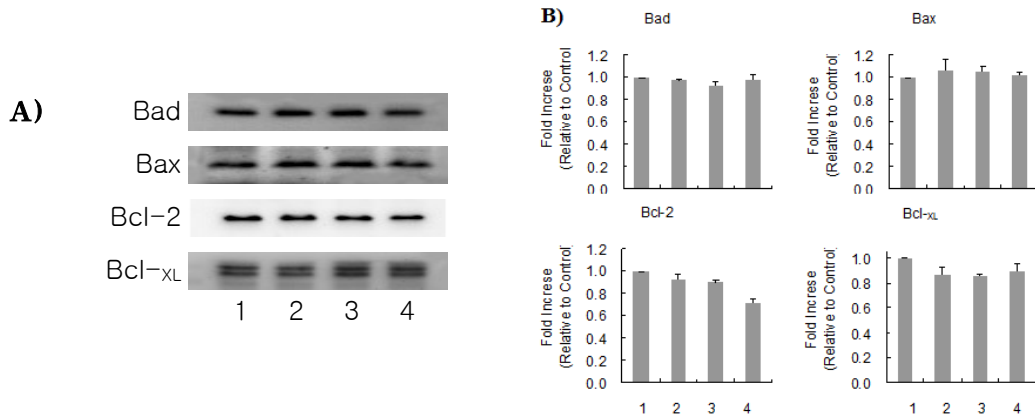


Fig. 6. The effects of TFE on the levels of pro/anti-apoptotic proteins. MCF-7 cells were exposed to TFE (0.03–0.30 mg/ml), for 24 h. Bcl-2, Bcl-xL, Bax and Bad proteins were immunoblotted using the respective antibodies in the total lysate. Bad is a loading control (a). The density of proteins was calculated using densitometer (b). The 1 is control, 2 is 0.03 mg/ml of TFE, 3 is 0.10 mg/ml of TFE, and 4 is 0.30 mg/ml of TFE. (TFE; *Toosendan Fructus Extract*)

**6. 천련자가 MCF-7 cell의 cytochrome-c에 미치는 영향.**

TFE가 Bcl-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시킨 것과 관련하여 미토콘드리아를 제거한 cytosolic fraction에서 cytochrome-c의 발현을 분석하였다.

대조군에서는 세포질내에 cytochrome-c의 양이 적었으나, TFE를 0.30mg/ml을 처치한 경우는 세포질내의 cytochrome-c가 2배 이상 증가하였다(Fig. 7).

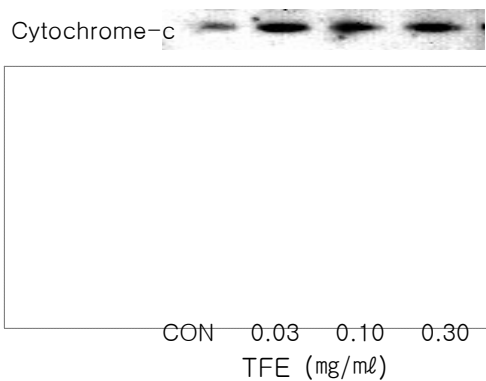


Fig. 7. The effects of TFE on the levels of cytochrome-c protein associated with

apoptosis.

MCF-7 cells were exposed to TFE (0.03–0.30 mg/ml) for 24 h. Cytochrome-c was immunoblotted using the cytochrome-c antibody in the cytosolic fraction. The density of cytochrome-c was calculated using densitometer. (TFE; *Toosendan Fructus Extract*)

**IV. 考 察**

유방암은 세계적으로 가장 빈번한 여성의 사망원인 질환 중의 하나이며, 매년 약 100만명 이상의 환자가 발생한다<sup>1)</sup>. 최근 우리나라에서도 각종 암의 발생률이 증가하여 암으로 인한 사망률이 전체사망률의 24.4%를 차지하여 사망원인 1위를 차지하게 되었다<sup>1,32)</sup>. 우리나라에서의 유방암은 여성암 중 자궁암, 위암 다음으로 많은 비중을 차지하고 있다<sup>1)</sup>. 특히, 유방암은 2002년 새로 발생한 암환자 중에서 증가율이 가장 높아, 1995년과 비교하면 166%의 증가세를 나타내고 있다<sup>33)</sup>. 통계청 자료에 의하면, 1994년에

비해 2004년의 경우 여성인구 10만명 당 유방암으로 인한 사망자수가 3.8명에서 6.2명으로 급격하게 증가하는 추세인데, 이는 자궁암으로 인한 사망자 수가 6.8명에서 5.5명으로 줄어든 것에 비교하면, 사망자의 증가 추세가 급격함을 잘 나타내고 있다<sup>2)</sup>.

유방암과 유사한 한의학적 질환으로는 石癰<sup>3)</sup>, 乳巖<sup>4)</sup>, 奶巖<sup>5)</sup>, 番花奶<sup>6)</sup>, 姝巖<sup>7)</sup> 등이 있다. 증상으로는 乳房腫塊. 不痛, 不痒, 不赤하고, 或 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體倦瘦, 月經不調등이 나타나기도 하며<sup>4,8)</sup>, 病因으로 肝鬱氣滯<sup>4)</sup>, 憂怒抑鬱<sup>9)</sup>, 憂鬱傷肝<sup>10)</sup>, 思慮傷肝<sup>10)</sup>등의 七情所傷과, 이것이 오래되어 氣血損傷<sup>4)</sup>, 衝任失調<sup>4)</sup>되어 장부기능이 실조된 것으로 볼 수 있다. 치료로는 초기에 肝氣鬱結로 인한 때는 疏氣行血, 疏肝解鬱 하는 치법을 이용하였고<sup>10)</sup>, 氣血虧損할 때는 大補氣血하는 치법을 이용하였다<sup>4)</sup>.

유방암에 관해 국내 연구 발표된 단일 약재로는, 鬼箭羽<sup>11)</sup>, 黃芩<sup>12)</sup>, 半枝蓮<sup>13)</sup>, 槲寄生<sup>14)</sup>, 三稜<sup>15)</sup>, 糖약으로는 抗癌丹<sup>16)</sup>, 加味雙和湯<sup>17)</sup>, 清肝解鬱湯<sup>18)</sup>, 歸朮破癥湯<sup>19)</sup>, 活絡交靈丹<sup>20)</sup>, 益氣養榮湯<sup>21)</sup>, 橘葉散變方<sup>22)</sup>등이 있으며, 蜂毒 藥鍼液<sup>23)</sup>을 이용한 연구도 보고되고 있다.

천련자(*Toosendan Fructus*)는 멀구슬 나무과(Meliaceae)에 속한 낙엽관목인 천련(참멀구슬나무; *Melia toosendan* Sieber Zucc)의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 苦寒有小毒하며, 肝胃小腸經으로 入하며, 舒肝 行氣 止痛 驅蟲作用으로, 胸脇痛, 脘腹脹痛, 疝痛, 蟲積腹痛을 치료한다<sup>34)</sup>. 일반적으로, 川楝子是 玄胡索과 배합되어서는 金鈴子散 (『素問病機氣宜保命集』)을 이루어 肝氣鬱滯로 인한 胸

脇腹痛을 치료하며, 小茴香 木香 吳茱萸 등과 배합되어서는 導氣湯(『沈氏尊生書』)을 이루어 寒疝氣通을 치료한다<sup>24,34,35)</sup>. 천련자의 성분으로서는 (+)- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -pinene,  $\beta$ -sitosterol, eugenol 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다<sup>36)</sup>.

현재까지 천련자에 대한 연구로는, 서<sup>25)</sup>의 천련자의 毒性에 관한 연구와 천련자가 肝膽에 미치는 영향에 대한 약리학적 연구<sup>26,27)</sup> 및전립선에 미치는 영향<sup>28)</sup> 등이 보고되고 있다.

본 연구자는 천련자가 胃經으로도 入하며, 行氣 止痛하는 효능이 있으며, 胸脇痛 및 脘腹脹痛을 치료하는 것에 근거하여<sup>34)</sup>, 천련자를 인간유래 breast adenocarcinoma cell line인 MCF-7 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

Apoptosis는 외부인자의 자극이나, 내적인 변화에 의해서 원래 가지고 있던 세포사멸의 경로가 활성화되어 그 세포가 자발적으로 죽음으로써 개체의 항상성 유지와 손상된 세포의 제거를 효율적으로 수행하는 자발적이고 능동적인 죽음의 기전이다<sup>37)</sup>. 이러한 세포자멸사는 일련의 생화학적, 형태학적 특징을 가진 세포사의 과정으로<sup>38,39)</sup>, 세포의 발생, 분화, 성장 및 노화 등의 전 과정을 통하여 세포의 생존과 사멸은 균형을 이루며, 개체의 항상성을 유지하게 하는데, apoptosis가 여러 가지 원인에 의해 통제되지 못할 경우, cancer 등을 유발하기도 한다<sup>40-44)</sup>.

실제로 항암제,  $\gamma$ 선 조사, immunotherapy 등과 같이 종양세포를 살해하는 것들은 대다수 목적세포들을 apoptosis로 유도 매개하는 것이 밝혀져 있다<sup>45)</sup>. 즉, 종양

의 치료에서 중요목표중의 하나는 종양 세포에 특이적인 세포자멸사를 유도하는 것이고<sup>46-48)</sup>, 또한 많은 anticancer drug들은 apoptosis inducer로 작용한다<sup>49-51)</sup>.

이에 저자는 천련자가 인간유래 breast adenocarcinoma cell line인 MCF-7 cell의 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하고, 그와 관련된 단백질의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

먼저, 세포생존율 실험 결과 대조군은 0 h에서  $1.0000 \pm 0.0524$ , 24 h에서  $1.4720 \pm 0.0376$ , 48 h에서  $1.9725 \pm 0.0873$ 로 나타났다. 반면에 TFE 0.03 mg/ml을 처리한 경우는 24 h에서  $0.6039 \pm 0.0575$ , 48 h에서  $0.0835 \pm 0.0063$ , TFE 0.10 mg/ml을 처리한 경우에는 24 h에서  $0.2674 \pm 0.0154$ , 48 h에서  $0.0729 \pm 0.0016$ , TFE 0.30 mg/ml을 처리한 경우에는 24 h에서  $0.2086 \pm 0.0247$ , 48 h에서  $0.0710 \pm 0.0029$ 을 나타내었다 ( $P < 0.01$ ). 따라서 TFE는 농도 및 시간의존적으로 유의하게 세포사를 유도하는 것을 확인하였다.

다음으로는, 농도와 시간의 변화에 따른 세포의 죽음과 apoptosis와의 관련성을 관찰하기 위하여 MCF-7 cell에 TFE를 처리한 후 propidium iodide (PI)와 초록색 형광염색약인 FITC annexin V를 사용하여 cell의 membrane 변화를 FACS로 관찰하였다. 실험결과 TFE의 농도가 증가할수록 세포외막으로 돌출된 PS와 결합한 FITC annexin V는 증가하였다( $P < 0.01$ ). 이러한 결과는 TFE가 유도하는 세포사에는 세포사멸이 연관되어 있음을 나타내는 결과로 사료된다.

PS의 세포막외로의 돌출외에, 세포자멸사의 또 다른 특징의 하나인 DNA 분

절을 관찰하기 위하여 TUNEL assay와 DNA laddering assay를 실시하였다. 두가지의 확인 방법 모두, control보다 TFE를 처리한 경우에는 DNA의 분절이 증가하였다. 이러한 결과는 FACS analysis의 결과와 더불어 TFE가 MCF-7 cell을 세포자멸사로 유도한다는 것을 나타낸다.

FACS, TUNEL, DNA Laddering으로 확인된 TFE의 세포사멸유도 결과와 관련하여, 세포내 apoptosis 관련 단백질 중의 하나인 PARP 및 caspase-3의 변화를 관찰하였다. 일반적으로 apoptosis가 유도될 때에는 핵내에서 PARP의 분할이 일어나고, 이러한 PARP의 분할은 DNA fragmentation과 chromosome condensation을 유도하면서, 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>52)</sup>. 본 실험에서는 농도가 증가할수록 cleaved PARP가 증가함을 보여 주었다. 이러한 PARP의 분할을 촉진하는 상위단백질은 주로 caspase로서, 대부분의 apoptosis signaling pathway는 cysteine protease family인 caspase의 activation에 의한 결과이다<sup>53)</sup>. Caspase는 일반적으로 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들을 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 한다. 현재까지 알려진 caspase 중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있으며, 활성화된 caspase-3는 PARP의 cleavage에 관여한다<sup>54)</sup>. 본 연구에서도 TFE는 다른 세포자멸유도 물질<sup>29,55)</sup>과 마찬가지로 농도의존적으로 caspase-3의 활성을 증가시켰다.

한편, caspase-3는 extrinsic pathway (death ligand delivered to death receptor)와 intrinsic pathway(mitochondria assembly

of pro-apoptotic factors)의 두가지 경로에서 활성화 될 수 있으므로<sup>56)</sup>, capsaicin 유도 apoptosis가 mitochondria를 경유하는지를 밝히기 위하여 세포질에서의 cytochrome-c의 발현을 관찰하였다.

Cytochrome-c는 mitochondria에서 세포질로 분비되어 APAF-1과 caspase-9이 합쳐져 apoptosome<sup>57)</sup>을 구성하고, 이 apoptosome은 caspase를 활성화한다<sup>58)</sup>. 본 연구의 결과에서 cytochrome-c는 처리한 군이 실험군에 비하여 증가하였다. 이러한 결과는 TFE가 유도하는 apoptosis에는 mitochondria가 관여됨을 나타내는 결과이다.

일반적인 경우 mitochondria의 cytochrome-c는 Bcl-2, Bcl-XL에 의하여 cytosol로 release 되는 것이 억제되어 있지만, apoptosis 기작이 활성화되면, cytosol에서 14-3-3단백질과 결합되어 있던 Bad 단백질이 14-3-3단백질과 분리되고, 분리된 Bad 단백질은 mitochondria로 이동하여 Bax를 활성화하게 되고, Bax는 Bcl-XL을 억제하여, cytochrome-c의 방출을 증가시켜, apoptosis를 유도한다. 또 mitochondria로 전위된 Bad는 Bcl-2의 활성을 억제하여 cytochrome-c가 쉽게 cytosol로 유리되게 한다<sup>30,31)</sup>. TFE는 pro-apoptotic protein인 Bad와 Bax의 발현에는 영향을 미치지 않았으며, anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. Bcl-2는 미토콘드리아에 존재하며, Bcl-XL과 더불어 미토콘드리아로부터 cytochrome-c의 분비를 억제하여 세포자멸사를 억제하는 역할을 한다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면, 천련자 메탄올 추출물이 Bcl-2단백질을 억제하여, mitochondria를 경유하는 apoptosis

를 유도함으로써 유방암 치료에 유의한 효과를 보이는 것으로 사료된다. 그러나, 앞으로 유방암에 대한 천련자의 임상 적용 연구가 충분히 이루어져야 할 것이며, 천련자의 行氣止痛하는 효능을 고려하여, 유방암뿐만 아니라 다른 암종에 대한 천련자의 효과도 고려해 볼 필요성이 있다 하겠다.

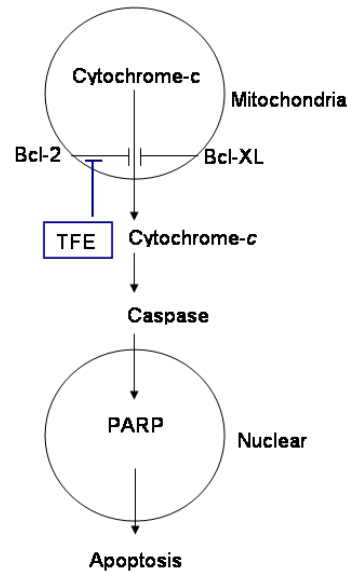


Fig. 8. TFE induces apoptosis via the inhibition of Bcl-2 expression.

## V. 結 論

천련자 (TFE)를 인간유래 breast adenocarcinoma cell line인 MCF-7 cell에 처치하여, 이들의 세포사멸과정을 MTT assay, Flow cytometric analysis, TUNEL assay, DNA laddering assay, ELISA kit, Immunoblot analysis 등으로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TFE는 시간(24-48 h) 및 농도(0.03-0.30

mg/ml) 의존적으로 유의하게 세포사를 유발하였다.

2. FACS, TUNEL, DNA laddering assay 결과, TFE는 농도 의존적으로 세포자멸사를 유도하였다.
3. TFE는 caspase의 활성을 증가시켰고, caspase의 하위인 nuclear fraction에서는 PARP의 분해를 증가시켰다.
4. TFE가 유도하는 세포자멸사는 Bcl-2의 발현감소와 이에 의한 cytochrome-c의 mitochondria부터 cytosol로의 분비에 기인한다.

이상의 실험 결과로 볼 때, 천련자 메탄올 추출물은 Bcl-2단백질을 억제하여, mitochondria를 경유하는 apoptosis를 유도함으로써 유방암 치료에 유의한 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 7월 24일
- 심 사 일 : 2008년 7월 29일
- 심사완료일 : 2008년 8월 8일

## 參考文獻

1. Kim JD et al. Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett.* 1997;120(2):235-241.
2. 통계청. 보도자료. [http://www.nso.go.kr/newnso/notice/reportview.html/content\\_id=3343](http://www.nso.go.kr/newnso/notice/reportview.html/content_id=3343).

3. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울: 대성문화사. 1992;296.
4. 陳自明. 婦人良方大全. 서울: 정담. 1993; 24, 72.
5. 虞博. 醫學正傳. 서울: 정보사. 1986;310.
6. 朱櫛, 普濟方. 北京: 북경출판사. 1988 ;1-3.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사. 1999 ;691, 783, 1885.
8. 張介賓. 景岳全書. 상해: 상해과학기 술출판사. 1984;679.
9. 朱震亨. 丹溪心法附與. 서울: 대성문 화사 1993;585.
10. 陳實功. 外科正宗. 북경: 인민위생출 판사. 1964;144-145.
11. 박영수. SKBR3 유방암 세포주에 대 한 귀전우 메탄올 추출물의 성장억 제 및 항산화 효과. 동국대학교대학 원. 2004.
12. 용형순, 고성규. 황금의 유방암 세포 주에 대한 항암작용. 대한한방내과학 회지. 2004;25(3):451-460.
13. 권은정 등. 황련이 유방암에 미치는 영 향 에 관한 연구. 대한한방부인과 학회지. 1999;12(2):148-182.
14. 하정일, 정선형. 전이된 유방암 환 자 에 대한 미슬토를 사용한 면역요법의 임상례. 대한한방부인과학회지. 2001 ;14(3):209-217.
15. 정경아. 삼릉추출물의 인간 유방암 세 포 성장 억제 효과. 동신대학교 대학원. 2006.
16. 송기철 등. 항암단을 투여한 유방암 환 자 60예에 대한 임상보고. 대한한방 내과학회지. 2001;22(4):669-674.
17. 현동환 등. 가미쌍화탕의 유방암 발생 및 전이 억제에 대한 실험적 연구. 대

- 한동의병리학회지. 1997;11(2):108-112.
18. 서정민, 유동열. 淸肝解鬱湯이 소염, 진통, 면역세포 및 유방암 세포에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1997;10(2):69-84.
  19. 반혜란. 歸朮破癥湯 추출물의 인간 유방암 세포 MCF-7에 대한 성장 억제 효과. 동신대학교 대학원. 2006.
  20. 정지예, 양승정. 活絡交靈丹 추출물의 인간 유방암세포 MCF-7에 대한 성장 억제 효과. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):13-24.
  21. 이진아, 박경미, 조성희. 익기양영탕의 항산화 및 유방암 세포주 성장 억제에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):32-49.
  22. 조현정 등. 굴엽산 변방이 유방암 세포주 MCF-7 성장 억제에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):50-60.
  23. 여성원, 서정철, 최영현. 봉독약침액에 의한 인체 유방암 세포의 성장 억제 및 세포사에 관한 연구. 대한한방침구학회지. 2003;20(3):45-62.
  24. 전국한의대본초학교수. 본초학. 서울: 영림사. 1992;358-359.
  25. 서부일. 천련자의 독성에 관한 문헌적 고찰. 동서의학. 2002;27(4):39-46.
  26. 김부생, 최종원, 이정규. 천련자 추출물이 간기능에 미치는 영향(I). 생약학회지. 1993;24(1):63-68.
  27. 김부생 등. 천련자 성분이 간기능에 미치는 영향에 관한 연구(III). Melianone 과 28-deacetyl sendanin의 약물 대사 효소계 및 담즙분비에 미치는 영향. 생약학회지. 1996;27(1):47-52.
  28. 이규현. 천련자가 만성 비세균성 전립선염 Rat 모델에서 혈액 및 세포 조직의 변화에 미치는 영향. 대전대학교. 2006.
  29. Kim SC et al. Cytoprotective effects of Glycyrrhizae radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome-c mediated PARP cleavage). Toxicology. 2004;197(3):239-251.
  30. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. Nat Rev Cancer. 2003; 3(12):931-943.
  31. Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system. Nat Rev Neurosci. 2003;4(9):752-762.
  32. Annual report on the cause of death statistics. Korean National statistical office. 2001.
  33. 강진오. 유방암의 방사선 치료. 경희 의학회지. 2005;21(1):37.
  34. 서부일, 최호영. 임상한방본초학. 서울: 영림사. 2004;484-486.
  35. 한의과대학방제학교수. 방제학. 서울: 영림사. 1999;380-381, 389-390.
  36. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울: 신일상사. 2006;619-620.
  37. Geoffrey M. Cooper 저. 전국분자생물학교수 역. 세포학 (The Cell). 서울: 한우리. 2000;599-636.
  38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.
  39. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell. 2002;108(2):153-164.

40. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-348.
41. 김철현 등. 폐암 세포에서 proteasome inhibitor에 의한 apoptosis의 기전. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(4):403-414.
42. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(3):153-159.
43. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*. 2007;18(7):427-442.
44. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001;98(9):2603-2614.
45. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*. 2000;256(1):42-49.
46. Petak I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res*. 2001;7(2):95-106.
47. Holzman D. Apoptosis provides new targets for chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(16):1098-1100.
48. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993;14(2):133-151.
49. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 1996;406:119-124.
50. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am*. 1996;275(6):80-87.
51. 손윤희 등. 단삼 에탄올추출물이 유방암 예방 및 전이에 미치는 영향. *생약학회지*. 2007;38(1):62-66.
52. Soldani C., Scovassi AI. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*. 2002;7:321-328.
53. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-1316.
54. 정용근. 아폽토시스의 실행자 : caspase를 통하여. *유전 제2권*. 1998;106-128.
55. Kim SC, Cho MK, Kim SG. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. *Toxicol Lett*. 2003;144(3):325-336.
56. Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ*. 2002;9(1):3-5.
57. Haupt S et al. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*. 2003;116(20):4077-4085.
58. Phenix BN, Badley AD. Influence of mitochondrial control of apoptosis on the pathogenesis, complications and treatment of HIV infection. *Biochimie*. 2002;84(2-3):251-264.