

울금이 MDA-MB-231 세포 및 DMBA로 유발된 흰쥐의 유방암에 미치는 영향

동신대학교 한의과대학 부인과교실
양동선, 양승정

ABSTRACT

Effects of *Curcuma longa L.* on MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells and DMBA-induced Breast Cancer in Rats

Dong-Seon Yang, Seung-Jeong Yang
Dept. of Korean Gynecology, Dong-Shin University

Objectives: Breast cancer is the most common cancer among women and has rapidly increasing rate annually. At present, western cancer therapies by surgery, radiation, and anticancer drug have not been fully effective. So many interests are given to herbal medicine on cancer treatment recently.

This study was designed to investigate the effects of *Curcuma longa L.* (CL) on MDA-MB-231 human breast cancer cells and DMBA-induced breast cancer in rats.

Methods: In this experiment, MDA-MB-231 cells were cultured in cell culture plates. 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml of CL extract were tested for their anti-proliferative effects on MDA-MB-231 cells by MMT assay. And we induced breast cancer in rats. The changes in tumor's weight, and the effects on proliferations of splenocyte and thymocyte were investigated.

Results: CL showed anti-proliferative effects on MDA-MB-231 cells in proportion to concentration of the CL. DMBA-induced breast cancer in rats, tumor's weight of the rat was not statistically significant, but showed a tendency to be reduced in the groups treated with CL. Proliferation rate of the rat's splenocyte and thymocyte increased in proportion to CL. In breast cancer tissue, expression of ER- α was weakened proportionately to the concentration of the CL.

Conclusions: These data suggest that CL can prevent the proliferation of breast cancer, then CL is useful to treat patient with breast cancer.

Key Words: *Curcuma longa L.*, Breast cancer, MDA-MB-231 cell, ER- α

I. 서론

유방암은 서양에서 가장 흔한 여성암으로 우리나라에서도 그 발생빈도가 매년 증가하여, 최근 10년간 여성암 유병율에서 갑상선암 다음으로 2위를 차지하고 있다¹⁾. 처음의 증상은 무통의 작은 덩어리, 두껍거나 움푹 들어간 피부, 유두가 퇴축되는 경우 등의 자가 검진에서 대부분 발견되고 병변이 발달함에 따라 유두에서 분비물이 나오며, 아프고 께양화되어 액와선으로 확대된다²⁾.

한의학에서는 유방암이라는 명칭은 없으나 乳巖³⁾, 石癰⁴⁾ 등의 병증에서 유사성을 찾을 수 있다. 유방종괴가 주증상이고 不痛, 不痒, 不赤하며 혹 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體倦瘦, 月經不調 등의 증상이 나타난다^{3,5)}. 病因은 七情所傷과 外感, 痰飲, 氣血虧損 등이 있고^{3,5)}, 疏肝理氣, 軟堅散結 및 滋補肝腎, 活血化瘀 등의 治法으로 치료한다⁶⁾.

양방에서 외과적 절제술, 방사선요법, 화학요법, 호르몬요법 등의 치료법 개발로 사망률은 감소하였으나⁷⁾ 대부분의 항암제가 독성과 부작용이 크고, 전이와 재발의 위험도 크므로 부작용은 적으면서 암의 치료효과가 큰 한의학적인 약물 치료방법이 필요한 실정이다.

울금은 活血祛瘀藥으로 분류되는 생강과에 속하는 다년생 宿根草本인 울금의 뿌리를 건조한 것으로 性味는 寒而辛苦하며 活血止痛, 行氣解鬱, 清心涼血, 疎肝利膽하는 효능이 있어 胸腹脇肋諸痛, 婦女痛經, 經閉, 癥瘕結塊, 熱病身昏, 癲狂, 驚癇, 吐血, 衄血, 血淋, 砂淋, 黃疸 등의 치료에 쓰인다⁸⁾.

이러한 울금의 효능을 규명하는 한의학적 연구로는 울금의 항산화작용⁹⁾, 항균작용¹⁰⁾, 혈관생성억제¹¹⁾, 위암세포에 미치는 영향¹²⁾ 등이 있다. 특히, 최근에는 폐암, 자궁암, 신경교종 및 전립선암에 대한 세포자살을 유도한다¹³⁾는 연구가 발표되어 울금의 항암제로서의 가능성을 강하게 시사하고 있다.

이에 저자는 울금이 유방암에 미치는 영향을 알아보고자 울금의 투여에 따른 인간 유방암세포 MDA-MB-231 cell의 증식율을 관찰하고, 흰 쥐에 실험용 발암물질인 DMBA로 유방암을 유발시켜 체중 및 고형암의 무게 변화와, 흰 쥐의 비장세포, 흉선세포 증식율을 관찰하였으며, 에스트로겐 수용체 알파(estrogen receptor- α , ER- α)의 발현을 면역조직학적으로 관찰하고, 혈청 및 혈액검사를 실시하였다. 그리고 이러한 실험들을 통해 얻은 소기의 성과가 있어 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 동 물

동물은 7주령 된 암컷 Sprague-Dawley (SD) 계열의 흰쥐를 사용하였고, 이들을 전문 동물 업체(샘타코, 한국)에서 구매한 후 항온항습 장치가 구비된 사육장에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서(실내온도 24±2°C, 습도 55±5%, 12시간 명암주기), 1주일간의 적응 시간을 둔 후 실험에 사용하였다.

2) 세포주

울금에 대한 유방암세포 증식율을 알

아보기 위하여 MDA-MB-231 세포를 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며 세포 배양은 RPMI-1640 배지에 5% fetal bovine serum, 1% streptomycin/penicillin을 첨가하여 사용하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 dash를 덮으면 PBS(pH 7.4)로 세포층을 씻어낸 후 trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양 하였고 배지는 2.5일 주기로 교환하였다.

3) 약 재

본 실험에 사용된 울금(*Curcuma longa L.*)은 생강과에 속하는 다년생 宿根草本인 울금의 뿌리를 건조한 것으로 동신대학교 순천한방병원에서 정선하여 사용하였다.

4) 시약 및 기기

유방암 유발을 위해 사용된 7,12-dimethyl benzanthracene(DMBA)와 corn oil, Canada balsam은 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. phosphate buffered saline (PBS, 바이오세상, 한국), lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA), ER- α (SantaCruz, USA), DAB(Zymed Lab, USA), Urethane (중외제약, 한국) 등의 시약이 사용되었고, 측정과 시료의 조제를 위해 전자저울 (PAG214, OHAUS, USA), Fuji Dri-Chem 4000i(Fujifilm, Japan), EDTA bottle 0.5 ml(Minicollect tube, Greiner bio-one, Austria), 전자동 혈구분석기 Hemavet 950 (Drew scientific Inc, U.S.A.), 원심 분리기 (Vision, 한국), 감압농축기(EYELA, Japan), 동결건조기(Ilshin, 한국) 등이 사용되었다.

2. 방 법

1) 울금 시료의 제조 및 투여

울금 75 g을 증류수 1,500 ml를 이용하여 100°C에서 4시간 추출한 다음, 원심분

리 후 찌꺼기를 제거한 상층액을 모아 감압농축기를 이용하여 농축한 후, 동결 건조기를 이용하여 동결 건조하였다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말은 5.6 g으로 수득율은 7.47%였으며, 이를 증류수에 희석하여 2개의 실험군에 각각 500 mg/kg과 1000 mg/kg 농도로 투여하였다.

2) 유방암 세포 증식을 측정

울금시료의 투여가 유방암 세포 증식에 미치는 영향 측정은 MTT assay 방법을 이용하였다. MDA-MB-231 cell을 96 well plate에 5×10^3 cells/well의 농도로 분주하여 배양기에서 37°C, 5% CO₂를 유지하며 24시간 동안 pre-incubation 시킨 후 농도별(0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml)로 울금시료를 첨가한 후 Ez-cytox 15 μ l를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 2시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 450 nm에서 측정하였다.

3) 유방암 유발

DMBA 10 mg을 corn oil 2 ml에 녹여 oral zonde를 통하여 3일 간격으로 3회 구강투여하였다. 투여 후 유방암 종괴가 만져지는지 지속적으로 관찰하여 종괴가 관찰된 날부터 시약을 투여하였다.

4) 실험군 분류

약물 투여 기간은 4주 동안 진행하였다.

정상군(normal group)은 유방암을 유발하지 않고 증류수를 투여한 군이고, 대조군(control group)은 유방암을 유발시킨 후 증류수를 투여한 군이며, CL-A 군(*Curcuma longa L.-A*)은 유방암을 유발시킨 후 울금으로 제조된 시료를 500 mg/kg의 농도로 투여하였으며, CL-B 군(*Curcuma longa L.-B*)은 유방암을 유발시킨 후 울금 시료를 1000 mg/kg의 농

도로 투여한 군으로 설정한 후 실험을 진행하였다. 각각의 개체 수는 정상군과 대조군은 각각 6마리였고, CL-A 군과 CL-B 군은 각각 7마리였다.

5) 체중의 측정

DMBA를 투여하여 유방암 유발시킨 후 실험기간 동안의 변화된 체중을 측정하기 위하여 1주일 간격으로 전자저울을 이용하여 측정하였다.

6) 종괴의 적출 및 무게측정

DMBA 투여로 인한 고형암 종괴의 무게 및 조직학적 검사를 위해 흰쥐를 희생시킨 다음 종괴를 축진하여 부위를 확인한 후 체내에 있는 종괴를 모두 적출하여 전자저울을 이용하여 무게를 측정 후 면역조직학적 검사를 위해 PBS 용액에 저장하였다.

7) 비장 및 흉선세포 증식을 측정

흰쥐의 비장세포 및 흉선세포 증식은 측정은 실험이 종료된 다음 흰쥐를 희생시켜 비장과 흉선에서 각각 splenocyte 및 thymocyte를 Wysocki¹⁴⁾ 및 Mizel 등¹⁵⁾의 방법에 의하여 분리하여 각각의 증식을 측정하였다. 이들 세포를 적출한 다음 분쇄하여 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.0×10^6 cells/ml 농도로 접종한 다음 이들 세포에 비장세포에는 LPS 5 µg/ml, 흉선세포에는 Concanvalin-A 5 µg/ml 첨가한 후 Ez-cytox 15 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 2시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

8) 면역조직학적 검사

유방암 종괴에서의 ER-α의 발현을 알아보기 위해 면역조직화학 반응 검사를 실시하였다. 제작된 슬라이드에 탈 파라

핀 과정을 거친 후 면역조직화학염색을 위한 비 특이적 반응을 제거하기 위하여 30% Tris-EDTA에서 microwave에 10분간 끓인 후 20분간 냉각시켰다. 그 이후 전처리 과정으로 3% hydrogen peroxidase를 10분간 사용하여 내재성 peroxidase의 활성을 차단하였다. 이후 15%의 blocking serum을 첨가한 PBS 혼합용액을 사용하여 조직 내부에 1차 항체 용액이 잘 흡수되도록 하였다. 0.01M PBS로 5분씩 3번 세척하고, 유방암 조직에서 ER-α의 1차 항체를 각각 1 : 100 으로 PBS에 희석하여 4°C에서 over night하여 반응시킨 후 PBS 세척 후 universal Anti-body에 60분 동안 반응시켰다. 다시 조직을 0.01M PBS로 5분씩 3회 세척한 후 streptavidin에 30분간 실온에서 반응시킨 이후, PBS로 세척과정을 거쳐 10분간 DAB로 발색을 실시하였다. 다시, PBS로 10분씩 3회, 증류수로 10분씩 3회 세척한 후 조직을 슬라이드에 올려 Hematoxyline 대조 염색을 실시한 다음 흐르는 물에 세척하고 80%, 90%, 100% 에탄올에 각각 10분간 적용하여 탈수 하였고, 100% xylene에 2회 10분간 조직을 처리하여 투명화 과정을 거친 후 Canada balsam으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다.

면역조직화학 반응의 평가는 염색이 완료된 슬라이드를 광학 현미경으로 관찰하여 종양세포의 세포질이 적갈색으로 염색된 범위를 반정량적 방법(semiquantitative manner)으로 구분하여 음성반응 (-), 약한 염색성을 보인 경우 경도의 양성반응 (+), 중등도의 염색성을 보인 경우 중등도의 양성반응 (++), 강한 염색성을 보인 경우 강한 양성반응 (+++)으로 등급을 정하여 평가하였다.

9) 채혈 및 검사

각 군의 흰쥐를 상기의 방법대로 투여를 마친 후, 희생시키기 12시간 전에 절식시켰다. Urethane을 복강주사하여 마취시킨 후 혈청 및 혈액 검사를 위하여 심장 천자를 통해 채혈한 다음 상온에서 30분 방치한 후 3,000 rpm에서 30분 원심 분리하여 혈청을 얻었다.

얻어진 혈청을 Fuji Dri-Chem 4000i을 이용하여 GOT, GPT, LDH, albumin, BUN, creatinine 수치를 측정하였고, 채혈한 혈액을 EDTA bottle minicollect tube 0.5 ml에 넣은 후 전자동 혈구분석기 Hemavet 950을 사용하여 WBC, RBC, Hb, PLT을 분석하였다.

10) 통계처리

수합된 데이터의 통계처리 방법으로는 SPSS for windows(version 12)를 활용하였다. 군이 3개 이상인 것은 ANOVA로 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방법을 시행하였고, 2개의 군간의 비교는 independent sample t-test를 사용하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. 성 적

1) 유방암 세포(MDA-MB-231) 증식율에 미치는 영향

CL 투여가 유방암 세포인 MDA-MB-231의 증식율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 MDA-MB-231 세포에 농도별로 CL을 투여한 후 세포 증식율을 측정하였다. 측정값은 0 mg/ml 투여군을 기준 값으

로 백분율로 표시하였으며, 측정결과 CL 투여 농도에 비례하여 MDA-MB-231 세포의 증식을 유의하게 억제하는 것이 관찰되었다(P<0.01)(Fig. 1).

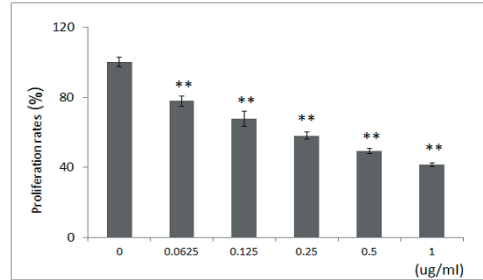


Fig. 1. Effects of CL on Proliferation Rates of MDA-MB-231 Cells *in Vitro*. MDA-MB-231 cells were attached 96-well plate, and added CL as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, proliferation rates were measured using MTT methods. Values are represented as mean±SD. ** : Statistically significance compared with 0 mg/ml group (P<0.01).

2. 유방암 유발 전 실험군 간의 동질성 검정

DMBA를 경구투여하여 유방암을 유발시키기 전 각각의 실험군에 속한 흰쥐들의 체중을 측정하고, 동질성 검증을 실시하여 동질한 집단임을 확인하였다 (Table 1).

3. 체중 변화에 미치는 영향

유방암 유발을 위해 DMBA를 1회 투여한 시점에서부터 매주 체중을 측정하여 비교하였다. 총 13주에 걸쳐 체중 변화를 관찰한 결과 꾸준히 증가하다가 희생 전 절식한 까닭에 마지막 주에서 감소하는 경향을 보였으며, 각 시기별로 군간에서 체중의 유의한 통계적 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 1. Test of Homogeneity of Variances

Charaterist CL	Normal group (n=6)	Control group (n=6)	CL-A group (n=7)	CL-B group (n=7)	F	p
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD		
Body weight (g)	168.7±8.71	176.0±3.01	176.3±4.06	172.3±5.95	2.801	.064

F : F-value

$$F = \frac{\text{explained variance}}{\text{unplained variance}}$$

p : p-value, significance probability

Table 2. The Changes of Body Weight in Rats

Group Week	Normal	Control	CL-A	CL-B
0	168.67±8.71	176.00±3.10	176.29±4.35	172.14±4.06
1	190.50±6.92	190.50±5.89	192.00±9.61	184.14±4.56
2	211.33±10.80	207.17±21.67	209.86±10.06	200.00±5.48
3	223.50±16.81	210.17±22.09	223.00±14.81	206.57±19.92
4	228.67±16.95	226.00±8.81	222.86±27.79	218.86±8.78
5	258.67±31.26	239.86±15.03	236.29±20.54	233.86±12.26
6	260.00±31.16	248.17±25.35	252.00±15.64	239.71±12.59
7	267.83±28.60	255.00±18.14	259.57±14.12	246.57±10.11
8	280.17±25.14	259.50±17.28	268.86±20.91	248.86±8.13
9	284.83±25.85	266.00±18.09	270.14±15.12	251.86±9.04
10	290.33±27.79	268.83±23.48	281.86±20.10	257.86±8.65
11	311.17±41.90	271.33±23.53	281.14±21.13	267.86±9.74
12	284.50±33.52	267.83±19.64	262.00±19.33	254.86±9.74

Normal : naive group, Control : saline administered to rats, CL-A : CL 500 mg/kg administered to rats, CL-B : CL 1,000 mg/kg administered to rats. Values are represented as mean±SD. Normal and control groups data were expressed as mean±SD. CL-A and CL-B groups data were expressed as mean±SD.

4. 암유발 흰쥐의 유방암종괴 무게에 미치는 영향

DMBA 투여 후 약 7주 후부터 육안적으로 종괴가 관찰되기 시작하였으며, 이후 6주에 걸쳐 control 군은 saline을 CL-A 군은 CL 시료를 500 mg/kg 농도로, CL-B 군은 1,000 mg/kg 농도로 투여하였다. 실험이 끝난 후 흰쥐를 희생시켜 종괴를 적출한 후 이를 전자저울을 이용하여 무게를 측정된 결과 control 군에 비해 CL-A 군과 CL-B 군에서 종괴

의 무게가 감소된 경향이 보였으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

5. 흰쥐의 비장세포 증식율에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 흰쥐에서 비장을 적출한 후 비장세포를 분리하여 MTT 방법을 활용하여 비장세포 증식율을 측정하였으며, 측정값은 LPS (-) normal 군을 기준하여 백분율로 표시하였다. 배양촉진제인 LPS를 처리하지 않은 LPS (-)에서의 CL-A 군과 CL-B 군과 LPS

를 처리한 LPS (+)에서는 CL-A 군과 CL-B 군 모두에서 통계적으로 유의하게 비장세포가 증가되었음을 확인할 수 있었다($P < 0.01$, $P < 0.05$) (Fig. 3).

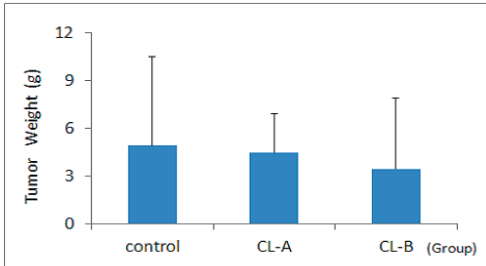


Fig. 2. Effects of CL on Weight of Solid Tumor in Tumor Bearing Rats. Control : saline administered to rats, CL-A : CL 500 mg/kg administered to rats, CL-B : CL 1,000 mg/kg administered to rats. Values are represented as mean±SD.

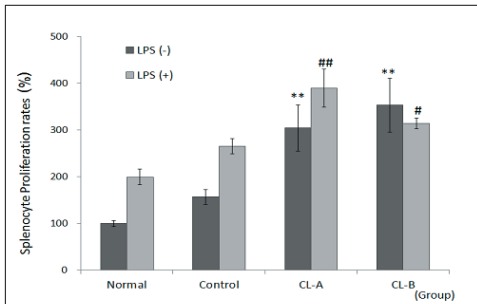


Fig. 3. Effects of CL on Proliferation Rates of Splenocyte in Rats.

Proliferation rates of splenocyte were measured using modified MTT method described in materials and methods. LPS (-) : without LPS group, LPS (+) : 5 μ g/ml of LPS treated control. Values are represented as mean±SD ($n = 6$).

** : Statistically significance compared with control LPS (-) group ($P < 0.01$).

: Statistically significance compared with control LPS (+) group (## : $P < 0.01$).

: Statistically significance compared with control LPS (+) group (# : $P < 0.05$).

6. 흰쥐의 흉선세포 증식율에 미치는 영향

모든 실험을 마친 후 흰쥐에서 흉선을

적출한 후 흉선세포를 분리하여 흉선세포 증식율을 측정하였으며, 측정값은 Con-A (-)normal 군을 기준하여 백분율로 표시하였다. Concanavalin-A를 처리하지 않은 Con-A (-)에서는 CL-B 군에서 유의하게 흉선세포가 증가되어 있음을 확인할 수 있었고($P < 0.01$), Concanavalin-A를 처리한 Con-A (+)에서는 CL-A 군과 CL-B 군 모두에서 통계적으로 유의하게 흉선세포가 증가되었음을 확인할 수 있었다($P < 0.05$, $P < 0.01$) (Table 3).

Table 3. Effects of CL on Proliferation Rates of Thymocyte in Rats

Group	Con-A(-) (%)	Con-A(+) (%)
Normal	100.00±6.51	199.48±16.77
Control	67.45±4.78	218.93±39.69
CL-A	78.60±7.60	298.03±48.90 [#]
CL-B	103.75±41.42 ^{**}	343.18±41.42 ^{##}

Normal : naive group, Control : saline administered to rats, CL-A : CL 500 mg/kg administered to rats, CL-B : CL 1,000 mg/kg administered to rats. Values are represented as mean±SD ($n = 6$).

** : Statistically significance compared with control Con-A (-) group ($P < 0.01$).

: Statistically significance compared with control Con-A (+) group (# : $P < 0.05$).

: Statistically significance compared with control Con-A (+) group (## : $P < 0.01$).

7. ER- α 에 대한 면역조직화학적 반응

유방암 조직을 ER- α 항체로 관찰한 결과 정상조직에서는 전혀 관찰되지 않았다. control 군에서는 뚜렷한 진한 갈색으로 핵이 양성으로 염색되었으나 CL-A와 CL-B 군에서는 control 군에 비해 약한 수준으로 적갈색의 미세 과립질이 유방암 조직에 응집되어 나타났으며, CL-A 군에 비해 CL-B 군에서 더 약한 수준으로 미세 과립질이 발현되어 나타난 것이 관찰되었다 (Fig. 4).

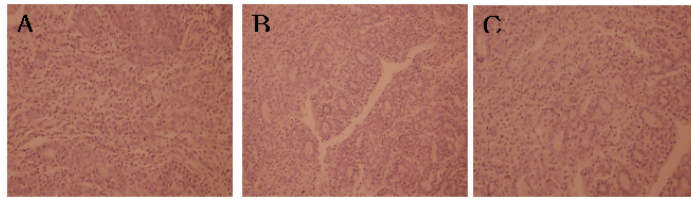


Fig. 4. Effects of CL on Immunohistochemical Changes of ER- α . Immunohistochemical stain for ER- α . A (top left) : control group, B (top right) : CL-A group, C (bottom left) : CL-B group. Positive staining for ER- α in the nuclei of breast cancer cells ($\times 200$).

8. 혈청내 간기능에 미치는 영향

모든 약물 투여가 끝난 후, 약물 투여로 인한 간기능의 변화를 관찰하기 위하여 흰쥐의 혈청을 얻은 후 GPT, GOT, LDH, albumin 수치를 측정하였다. normal 군

에 비해 GPT, GOT 항목에서 CL-B 군이 상승하는 경향이 있었으나 통계적으로 유의하지 않았고, LDH와 albumin 항목에서도 별다른 유의한 차이가 보이지 않았다(Fig. 5).

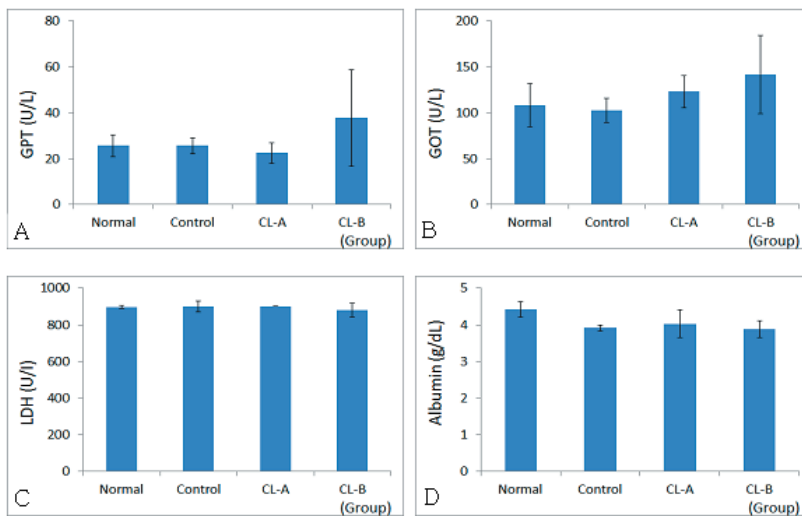


Fig. 5. Effects of CL on Levels of Liver Function Test in Rats. A (top left) : GPT, B (top right) : GOT, C (bottom left) : LDH, D (bottom right) : Albumin ; Normal : naive rats (n=6), Control : saline administered to rats (n=6), CL-A : CL 500 mg/kg administered to rats (n=7), CL-B : CL 1,000 mg/kg administered to rats (n=7). Values are represented as mean \pm SD.

9. 혈청내 신기능에 미치는 영향

모든 약물 투여가 끝난 후, 약물 투여로 인한 신기능의 변화를 관찰하기 위하여 흰쥐의 혈청을 얻은 후 creatinine과

BUN 수치를 측정하였고, normal 군에 비해 contol, CL-A, CL-B 군에서 다소 상승하는 경향이 있었으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 6).

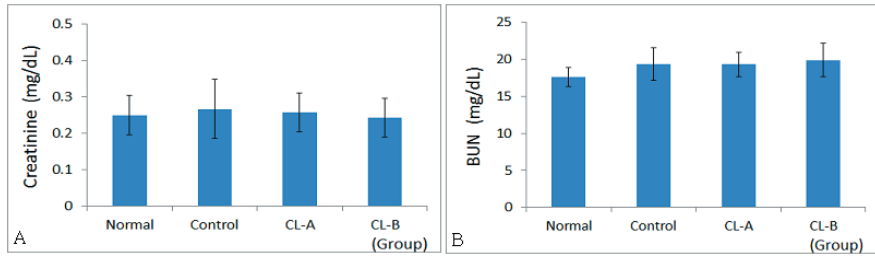


Fig. 6. Effects of CL on Levels of Renal Function Test in Rats. A (top) : Creatinine. B (bottom) : BUN ; Normal : naive rats (n=6), Control : saline administered to rats (n=6), CL-A : CL 500 mg/kg administered to rats (n=7), CL-B : CL 1,000 mg/kg administered to rats (n=7). Values are represented as mean±SD.

10. 혈중 CBC에 미치는 영향

올금시료 투여가 흰쥐의 CBC 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 WBC, RBC, hemoglobin(Hb), platelet를 측정

하였으며, WBC, RBC, Hb, platelet의 모든 항목 control 군에 비해 유의한 차이는 없었다(Fig. 7).

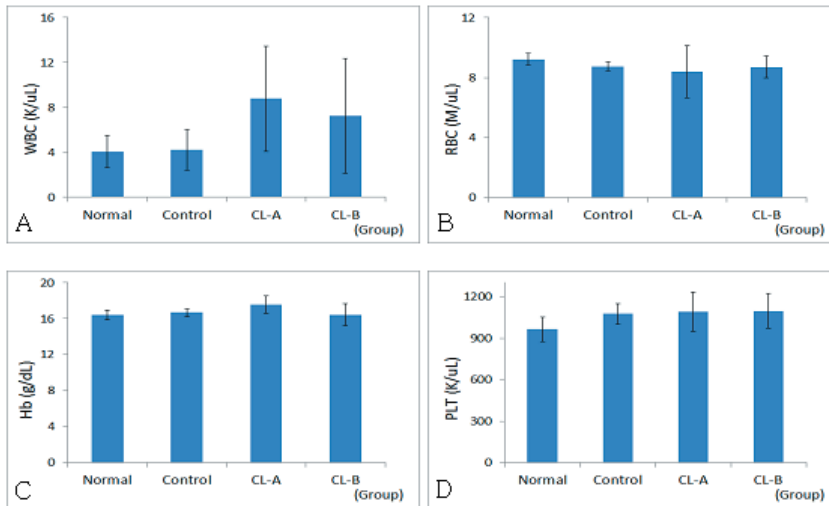


Fig. 7. Effects of CL on Levels of CBC in Rats. A (top left) : WBC, B (top right) : RBC, C (bottom left) : hemoglobin, D (bottom right) : platelet ; Normal : naive rats (n=6), Control : saline administered to rats (n=6), CL-A : CL 500 mg/kg administered to rats (n=7), CL-B : CL 1,000 mg/kg administered to rats (n=7). Values are represented as mean±SD.

III. 고찰

유방암은 유방조직의 악성 신생 종양을 말하는 것¹⁾으로 위험 요인으로는 확실한

유전학적인 기형, 유방암의 가족력, 미경산부, 이온 방사선 노출, 이른 초경과 늦은 폐경, 비만, 과도한 영양 및 지방 섭취, 음주와 흡연, 양성 유방 질환, 호르몬 치료

등이 있다^{2,16)}.

암종은 오른쪽보다는 왼쪽 유방에서 자주 발생하고 상외측 4분의 1 부위에 더 흔하며 확진은 주의 깊은 신체검사, 유방촬영술 및 생검에 의해 얻은 종양세포의 세포학 검사로 가능하다²⁾.

유방암을 치료하기 위해서는 수술, 항암 치료, 선행 항암 치료, 방사선 치료, 호르몬 치료를 환자의 상태에 따라 적절하게 시행한다. 외과적 치료로 유방 전절제술이나 부분 절제술(유방 보존술)을 하며, 과거엔 액와림프절을 무조건 제거하였으나 최근에는 감시 림프절 생검술을 통해 불필요한 림프절의 제거를 피하는 추세이다¹⁶⁾.

현대의학의 발전으로 유방암의 사망률은 현저히 감소하였으나 여전히 높은 전이율과 재발률, 항암치료와 방사선 치료의 부작용 등으로 인해 환자들은 고통받고 있다. 이를 보완해줄 새로운 치료법이 절실히 요구되고 있으며, 유방암에 대한 한의학적 접근과 치료에 대한 연구가 필요하다.

한의학에서는 乳巖³⁾, 石癰⁴⁾, 奶巖¹⁷⁾, 番化奶¹⁸⁾ 등과 유사한데 그 중 乳巖에 대한 서술이 오늘날의 유방암에 대한 인식과 가장 유사하다고 볼 수 있다. 《婦人良方大全·瘡瘍門·乳癰乳巖方論》³⁾에서는 “初起內結小核, …血水滴瀝”라고 하여 초기에는 작은 핵이나 자라새끼, 바둑알만한 멍울이 맺혀있는데 붉지도 않고 아프지도 않다, 세월이 지나면서 점차 커져 바위와 같은 것이 무너져서 익은 석류와 같이 되거나, 안쪽이 깨양되어 깊은 동굴같고 혈액이 흘러나오기도 한다고 설명하여 오늘날 유방암의 증상과 비슷한 것을 알 수 있다. 또한 宋代

의 《瘡瘍經驗全書》¹⁹⁾에서는 “早治得生, 若不治, 內潰肉爛, 見五臟而死”라 하여 현대의학에서 강조하고 있는 조기 진단 및 치료의 중요성을 명확히 지적하였다.

乳巖의 病因은 주로 肝鬱氣滯³⁾, 憂怒抑鬱²⁰⁾, 憂鬱傷肝²¹⁾, 思慮傷脾²¹⁾ 등의 七情所傷과 이것이 오래되어서 氣血이 손상되고 衝任이 失調되어 臟腑機能이 失調³⁾된 것으로 볼 수 있다. 치료는 초기에 肝氣鬱結로 인한 때는 少氣行血, 疏肝解鬱하는 治法을 이용하였고²¹⁾, 오래되어 氣血虧損할 때에는 大補氣血하는 治法을 이용하였다³⁾.

유방암에 대한 문헌적 연구로는 유암의 병리²²⁾, 유방종괴²³⁾에 관한 문헌적 고찰을 통해 한의학에서 말하는 병증과 현대의학의 유방암의 상관성을 밝혔고, 임상적 연구로는 항암단²⁴⁾등을 사용해 유방암을 치료한 증례보고와 한방치료로 항암제 부작용을 감소시킨 증례보고²⁵⁾를 통해 한방치료가 유방암 자체의 치료 뿐 아니라 항암제의 부작용에도 효과가 있음을 밝혔다. 한약치료에 대한 실험적 연구로는 굴엽산변방²⁶⁾, 익기양영탕²⁷⁾등의 처방과 지모²⁸⁾, 황금²⁹⁾ 등의 약재가 유방암의 암세포성장 억제에 효과가 있다고 발표되었다. 이러한 연구의 연장선상에서 울금이 유방암에 어떤 효과가 있는지를 다루어보고자 이 실험을 기획하였다.

울금은 생강과(Zingiberaceae)의 울금속(Curcuma)에 속하는 다년생 식물로서 한약재, 향신료 및 식용으로 이용되고 있다. 본 실험에 사용된 울금은 가을과 겨울에 울금의 莖葉이 枯萎한 후 채취하여 鬚根과 泥沙를 제거하고 끓는 물에 넣어 삶거나 찌서 건조한 것이다⁸⁾. 性味

는 寒而辛苦하여 心·肝二經에 들어가고 겸하여 肺·膽經氣分에 들어가 行氣解鬱하고 또한 血分에 들어가 涼血消瘀하므로 血中の 氣藥이 된다. 活血止痛, 行氣解鬱, 清心涼血, 疎肝利膽하는 효능이 있어 胸腹脇肋諸痛, 婦女痛經, 經閉, 癥瘕結塊, 熱病身昏, 癲狂, 驚癇, 吐血, 衄血, 血淋, 砂淋, 黃疸 등의 치료에 쓰인다⁸⁾.

이러한 울금의 효능을 규명하는 연구로 항산화작용⁹⁾, 항균작용¹⁰⁾, 항염증작용³⁰⁾이 밝혀졌고 최근에는 암에 대한 연구가 활발하여 암세포 증식과 관련한 혈관신생 억제작용¹¹⁾, 폐암, 자궁암, 신경교종 및 전립선암에 대한 세포자살유도¹³⁾, 위암세포 증식 억제¹²⁾, 구강상피세포암 및 골육종 세포주에 대한 항암효과³¹⁾ 등이 보고되어 있다.

이러한 울금의 효능으로 볼때 유방암에 대한 치료효과 또한 기대되어 울금이 유방암에 미치는 영향을 알아보기 위하여 울금의 농도에 따른 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231의 증식율을 관찰하였고, DMBA로 유방암을 유발시킨 흰쥐의 체중 및 고형암의 무게 변화를 관찰하였으며, 면역세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 흰쥐의 비장세포, 흉선세포 증식율을 관찰했고, ER- α 의 발현을 면역조직화학적으로 관찰하였으며, 울금의 투여에 따른 안전성 여부를 검사하기 위하여 혈청검사 및 혈액검사를 실시하여 다음과 같은 성적을 얻어 그 의미를 분석해보고자 한다.

CL 투여가 유방암 세포인 MDA-MB-231의 증식율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 MDA-MB-231 세포에 농도별로 CL을 투여한 후 세포 증식율을 측정하고 측정값은 0 mg/ml 투여군(대조군)을 기준

값으로 백분율로 표시하였다. 인간 유방암세포에는 MCF-7과, MDA-MB-231, SK-BR-3 등이 있는데, 이 중 본 실험에서 사용한 MDA-MB-231은 매우 침윤적이고 전이적인 인간 유방암 세포주이다³²⁾. MDA-MB-231 세포의 증식율이 감소한다는 것은 유방암의 증식과 전이가 억제되었다는 것을 뜻한다. 측정결과 대조군은 100%, 0.0625 mg/ml에서는 77.85%, 0.125 mg/ml에서는 67.87%, 0.25 mg/ml에서는 58.00%, 0.5 mg/ml에서는 49.27%, 1 mg/ml에서는 41.52%로 CL 투여 농도에 비례하여 MDA-MB-231 세포의 증식이 줄어든 것이 관찰되었다(Fig. 1). 따라서 울금에는 유방암의 증식과 전이를 억제하는 효과가 있다고 추론해볼 수 있다.

유방암을 유발시키기 전 각각의 실험군에 속한 흰쥐들의 체중을 측정하여 동질성을 검증한 후(Table 1), DMBA를 1회 투여한 시점에서부터 매주 체중을 측정하여 체중의 변화를 살펴보았다. 그 결과 희생 전 절식시킨 마지막 주를 제외하고는 모든 군에서 꾸준히 증가하는 경향을 보였으며 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

울금이 암유발 흰쥐의 유방암종괴 무게에 미치는 영향을 알아보기 위해, 실험용 발암물질인 DMBA를 경구투여하여 유방암을 유발시킨 흰쥐의 고형암의 무게 변화를 관찰해보았다. DMBA 투여 후 약 7주 후부터 육안으로 종괴가 관찰되기 시작하였으며, 이후 6주에 걸쳐 control 군은 saline을 CL-A 군은 CL 시료를 500 mg/kg 농도로, CL-B 군은 1,000 mg/kg 농도로 투여하였다. 실험이 끝난 뒤 흰쥐를 희생시켜 종괴를 적출한 후 이를 전자저울을 이용하여 무게를 측정된 결과

normal 군은 100%, control 군은 157.01%, CL-A 군은 304.77%, CL-B 군은 353.26%로 control 군에 비해 CL-A 군과 CL-B 군에서 종괴의 무게가 적은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

울금의 투여에 따른 흰쥐의 비장세포, 흉선세포 증식율을 측정해보았는데, 이는 유방암에 따른 면역력의 저하에 울금이 미치는 영향을 알아보기 위한 것이다. 비장세포는 말초성 림프기관으로 백색수질에서 림프구를 생산하여 면역작용을 하고, 흉선세포는 중추성 림프기관으로 직접적인 면역반응은 일어나지 않지만 말초성 림프 기관들의 발육을 촉진하고 immature thymocytes를 T 림프구로 분화하여 혈액으로 배출하는 역할을 한다³³⁾. 모든 실험을 마친 흰쥐에서 비장과 흉선을 적출한 후 비장세포, 흉선세포를 분리하여 MTT 방법을 활용하여 그 증식율을 측정한 결과 농도가 증가함에 따라 비장세포, 흉선세포의 증식율이 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 3, Table 3). 이를 통해 울금이 비장세포, 흉선세포의 증식을 도와 면역력을 향상시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

체내에서 에스트로겐에 대한 생물학적인 반응은 특별히 높은 친화력을 갖는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)이 발현되는 세포에서 일어난다. ER은 호르몬 의존적 세포의 증식과, 분화 종양을 형성하는데 매우 중요한 전사조절 단백질패밀리이다³⁴⁾. 1960년대 ER이 처음으로 확인된 이래³⁵⁾ 오랫동안 이 수용체는 하나의 타입 형태로 존재하는 것으로 간주되어 왔으나, 1996년에 다른 타입의 ER이 흰 쥐에서 확인되었다³⁶⁾. 결과적으로 기존의 수용체를 ER- α , 나중의 1996

년에 발견된 수용체를 에스트로겐 수용체 베타(estrogen receptor- β , ER- β)라고 부르게 되었다³⁷⁾. 이러한 ER- α 와 ER- β 는 조직에 특이하게 발현된다. ER- α 는 난소나 자궁, 질, 유선과 같은 주요 암컷 생식기관에 발현되는 반면에, ER- β 는 정소나 전립선과 같은 수컷의 생식기관과 난소에서 각각 발현된다고 알려져 있다³⁸⁾. ER은 세포핵에 포진해 있으면서 에스트로겐 의존적 종양촉진유전자와 결합하여 암세포가 필요한 에너지를 공급하는 작용을 하므로³⁴⁾ ER이 차단되면 유방암의 증식이 억제되는 작용을 한다. 본 실험에서 유방암 조직을 ER- α 항체로 관찰한 결과 정상군에서는 전혀 관찰되지 않았으나 control 군에서는 뚜렷한 진한 갈색으로 핵이 양성으로 염색되었고 CL-A군에서 control 군에 비해 약한 수준으로 적갈색의 미세 과립질이 유방암 조직에 응집되어 나타났으며, CL-B 군에서는 더 약한 수준으로 미세 과립질이 발현되어 나타난 것이 관찰되었다(Fig. 4). 이를 통해 울금이 에스트로겐 수용체를 차단함으로써 유방암 세포주를 억제하는 것을 알 수 있다.

CL의 간독성 및 신독성, 염증반응 등을 알아보기 위하여 모든 약물 투여가 끝난 후 혈청 검사 및 혈액검사를 시행하였다. 혈청 및 혈액검사서 GPT, GOT, creatinine, BUN의 수치가 다소 상승하는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 암으로 인해 면역력 및 모든 신체 기능이 저하된 환자에게는 임상 적용시에 적은 양부터 투여한 후 환자의 상태를 고려하여 양을 점차 늘이는 등의 의사가 신중하게 투여하여야하며 차후에 울금의 안전성에 관한 연구가 더 필요하

다고 사료된다.

이상의 실험결과를 보아 울금은 유방암세포 증식 억제효과가 있고, 면역세포인 비장세포, 흉선세포의 증식율을 높이는 효과가 있으며, 유방암 조직에서 ER- α 의 발현을 감소시키는 작용이 있는 것으로 평가할 수 있다. 고형암의 무게는 통계적 유의성은 없으나 감소되는 경향을 보였고 혈청 및 혈액검사 결과 GPT, GOT, creatinine과 BUN이 다소 상승하긴 하였으나 유의한 이상은 없었으므로 임상적으로 유방암 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 결 론

울금의 농도에 따른 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231의 증식율, DMBA로 유방암을 유발시킨 흰쥐의 체중 및 고형암의 무게, 흰쥐의 비장세포와 흉선세포 증식율, 유방암 조직에서 ER- α 의 발현, 울금 투여 후 혈청 및 혈액검사를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 울금 투여 농도에 비례하여 인간 유방암세포(MDA-MB-231 cell)의 증식이 억제 되었다.
2. DMBA로 유방암을 유발시킨 흰쥐의 고형암 무게는 울금을 투여한 군에서 감소된 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.
3. 울금 투여 농도에 비례하여 흰쥐의 비장세포와 흉선세포의 수를 증가시켰다.
4. 유방암 조직에서 ER- α 의 발현은 울금 투여 농도에 비례하여 약해졌다.

5. 혈청 및 혈액검사를 실시한 결과 GPT, GOT, creatinine과 BUN이 울금 투여에 의해 다소 상승하는 경향이 있었으나 유의성은 없었다.

따라서, 울금은 투여 농도에 비례하여 유방암세포의 증식이 억제되는 작용이 있으며 비장세포와 흉선세포의 증식율이 증가하여 면역력을 높이고, ER- α 의 발현을 감소시켰으므로, 임상에서 유방암의 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2013년 7월 26일
- 심 사 일 : 2013년 8월 7일
- 게재확정일 : 2013년 8월 19일

참고문헌

1. 보건복지부 중앙암등록본부. 국가암등록사업 연례 보고서(2009년 암 등록 통계). 2011:30.
2. Mosby 등. Mosby's medical, nursing & allied health dictionary. 6th. 서울: 현문사. 2002:264.
3. 陳自明. 婦人良方大全. 서울: 도서출판 정담. 1993:71.
4. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울: 대성문화사. 1992:296.
5. 張介賓. 景岳全書. 上海: 上海科學技術出版社. 1984:679.
6. 余桂清. 歷代中醫腫瘤案論選粹. 北京: 北京出版社. 1988:1-34.
7. 대한산부인과학회. 부인과학. 제3판. 서울: 칼빈서적. 1997:1299-301.
8. 全國韓醫科大學 本草學教授共著. 本草

- 學. 서울:영림사. 2005:455-6.
9. 박용기. 갈화와 울금 및 고삼의 항산화작용에 관한 연구. 대한본초학회지 2001;12(1):41-53.
 10. 유용욱 등. 메티실린에 저항을 보이는 S. aureus균(M·RSA)에 대한 울금의 항균활성. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):574-9.
 11. 성희근, 최승훈, 안규석. 울금이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향. 대한병리학회지. 1999;13(2):66-78.
 12. 조유경 등. 울금이 위암세포에 미치는 영향. 대한한방중양학회지. 2003;9(1):15-37.
 13. 박상현 등. 울금(鬱金)이 폐암(肺癌), 자궁암(子宮癌), 신경교종(神經膠腫) 및 전립선암(前立腺癌)에 대한 세포자살유도(細胞自殺誘導)에 미치는 영향(影響). 대한한방내과학회지. 2007;27(2):379-93.
 14. Wysocki, et al. "Planning" for lymphocytes : A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci. 1978;75(6):2844-8.
 15. Mizel, et al. : Regulation of lymphocyte-activating factor(LAF) production and secretion in P388D1 cells : identification of high molecular weight precursors of LAF. J Immunol Methods. 1979;122(6):2173-9.
 16. 노동영 등. 이젠 두렵지 않다 유방암. 서울:이젠미디어. 2012:22-3, 46-9.
 17. 虞搏. 醫學正傳. 서울:도서출판 정보사. 1986:310.
 18. 朱櫛. 普濟方(歷代中醫腫瘤案論選粹). 北京:北京出版社. 1988:1-34.
 19. 竇漢卿. 瘡瘍經驗全書(歷代中醫腫瘤案論選粹). 北京:北京出版社. 1988:1-34.
 20. 方廣. 丹溪心法附餘. 서울:대성문화사. 1993:585.
 21. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1964:144-5.
 22. 김정범, 안규석. 유암의 병리에 관한 문헌적 고찰. 동의병리학회지. 1994;9(1):189-207.
 23. 김정진 등. 유방종괴에 대한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1998;11(2):29-43.
 24. 송기철 등. 항암단을 투여한 유방암(乳房癌) 환자 60례에 대한 임상보고. 대한한방내과학회지. 2001;22(4):669-74.
 25. 박병록 등. 한방치료를 통해 Adriamycin /Cytoxan 및 Taxol 항암제 부작용이 감소한 유방암 환자 증례보고. 대한한방내과학회지. 2011;32(3):451-7.
 26. 조현정 등. 굴엽산변방이 유방암 세포주 MCF-7 성장 억제에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):50-60.
 27. 이진아 등. 익기양영탕의 항산화 및 유방암 세포주 성장 억제 효과에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):32-49.
 28. 김형우 등. 지모 추출물이 MCF-7 세포의 생존율에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2007;28(3):608-14.
 29. 용형순, 고성규. 황금의 유방암세포주에 대한 항암작용. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):451-60.
 30. Ammon HPT, Wahl MA. Pharmacology of Curcumin longa Planta. Medica. 1991:57:1-7.
 31. 김경진. 울금 추출물의 구강상피세포암 및 골육종 세포주에 대한 항암효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원. 2008.

32. Gillies RJ. Chronic Autophagy Is a Cellular Adaptation to Tumor Acidic pH Microenvironments. *Cancer research*. 2012;72(16):3938-47.
33. 고광욱 등. 면역학. 제1판. 서울대학교출판사. 1991:9-11.
34. 최정아 등. Quercetin 에 의한 유방암 세포의 세포주기 조절 기전. 대한암학회 학술대회 및 초록지. 2000.
35. Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *PNAS*. 1966;55(1):1574-81.
36. Kuiper GGJM, Enmark E. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS*. 1996;93(1):5925-30.
37. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Rev*. 1999;20(1):358-417.
38. 이은정 등. 암컷 마우스 생식기관의 형태에 미치는 에스트로겐 수용체 촉진제의 영향. *한국전자현미경학회지*. 2009; 39(4):301-9.