

## 토사자 추출물이 MCF-7 유방암 세포의 세포자멸사에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실  
김지현, 정은혜, 유동열

### ABSTRACT

#### Effects of *Cuscutae Semen* Water Extract on Apoptosis of MCF-7 Human Breast Cancer Cells

Ji-Hyun Kim, Eun-Hye Jung, Dong-Youl Yoo  
Dept. of Oriental Cynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University,  
Graduate School, Dae-Jeon University

**Objectives:** This study aimed to evaluate the effects of *Cuscutae Semen* water extract (CS) on MCF-7 human breast cancer cells.

**Methods:** To clarify the results, we cultivated MCF-7 cells in cell culture plates. And then we extracted each of 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml CS, gave it to MCF-7 cell. After these process we performed MTT assay to elucidate the ability of apoptosis. The result of mRNA was analyzed by RT-PCR.

**Results:** Each of concentrated extracts CS decreased the survival rate of MCF-7 cells. CS decreased Bcl-2 which is known as a blocking cell apoptosis. Bax, caspase-3, P21 and RIP-1 that accelerate apoptogenic activity factors increased by CS. CS did not change the condition of caspase-8, caspase-9, P53 factors on MCF-7 cells. Furthermore caspase-8, caspase-9, P53 factors on MCF-7 cells does not make it more active but turn it on.

**Conclusions:** According to the above results, we could suggest that CS can occur the apoptosis on MCF-7 cells.

**Key Words:** *Cuscutae Semen*, Breast Cancer, Apoptosis, MCF-7 Cell, Bcl-2, Bax, Caspase-3, P21, RIP-1

## I. 서 론

유방암은 여성에서 발병하는 대표적인 질환으로 여성호르몬제 복용, 비만 등이 원인으로 의심되고 있지만 확실한 원인이 제시되지 못한 암으로 우리나라에서는 주로 40-55세 사이에 나타난다<sup>1)</sup>. 주된 치료 방법으로는 유방 절제술, 방사선 치료 및 항암제 투여 등이 있으나, 기존의 항암제의 경우 환자가 겪는 부작용이 심하여 지속적인 투여가 힘들기 때문에 부작용이 적은 새로운 항암제의 개발이 필요한 실정이다<sup>2)</sup>.

乳巖, 乳癰, 吹乳, 乳癆, 乳中結核, 乳癰, 乳痰 등의 질환은 한의학적으로 유방종괴를 뜻하며<sup>3)</sup>, 그 중 乳巖은 초기에는 통증이 없고, 가려운 증상이 없으며, 붉어지지 않다가 후기에는 궤양통과 血水가 흐르는 증상이 발현된다. 이는 乳頭陷凹, 혈성유두분비, 피부의 등피양변화, dimpling sign 등의 증상을 나타내는 현대의 유방암과 비슷하다<sup>4)</sup>.

토사자(*Cuscutae Semen*)는 성미가 甘辛·平하고 微溫한 새삼의 씨로서 補腎益精, 養肝明目, 益脾止瀉, 安胎調經<sup>5)</sup> 등의 효능이 있어서 한의학적으로 腎陽不足으로 인한 勃起不全, 肝腎不足으로 인한 시력저하, 脾腎陽虛로 인한 溏便 설사, 腎虛의 胎漏 등의 치료에 응용되어 왔다<sup>6)</sup>.

최근 토사자에 관한 연구로는 파골세포 억제제를 통한 항골다공증 효과<sup>7)</sup>, 자발성 고혈압의 혈압을 강하하는 효과<sup>8)</sup> 등이 있다. 토사자의 주성분으로는 lutein, teraxanthin,  $\beta$ -carotene, vitamin A 등이 알려져 있는데<sup>9)</sup>, 이 중 lutein은 전립선암과 구강 상피암을 억제하는 것으로 보고되었고<sup>10-12)</sup>, carotenoid류는 항산화작용을 통하여 암을 억제하는 중요한 식이물질로 알려져 있다<sup>13,14)</sup>.

토사자의 항산화 작용 및 항암효과에 대한 연구 중에서 김<sup>15)</sup>은 새삼과 실새삼이 항산화 작용이 있다고 보고하였으며, 도<sup>16)</sup>는 토사자가 stress에서 초기 반응을 일으키는 Bax 및 GSK-3 $\beta$ 의 발현량의 감소 및 차단 효과로 Reactive oxygen species (ROS)에 의한 apoptosis 방어 작용이 생긴다고 보고하였다.

이에 암을 억제하는 성분이 함유되어 있으면서, 항산화 작용과 항암작용이 보고된 토사자가 유방암 치료에도 효과적일 것으로 사료되어, 토사자가 유방암 세포주인 MCF-7의 생존율 및 세포의 자멸에 관여하는 Bcl-2, Bax, caspase류, p21, p53 및 신호전달에 관여하는 RIP-1, survivin의 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실 험

### 1. 재 료

#### 1) 세포주

본 실험에 사용한 유방암세포는 MCF-7 세포주로 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 세포배양에 사용한 RPMI1640, FBS(fetal bovine serum), penicillin/streptomycin은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였다. 일반적인 시약은 Sigma chemical Co.(USA)에서 구입하였다.

#### 2) 약 재

본 연구에 사용한 토사자는 나눔제약(Korea)에서 구입하여 정선하여 사용하였다.

#### 3) 시료의 추출

토사자 80 g을 잘게 분쇄하여 시료와 증류수를 1:40 비율로 3시간 열수 추출한다음, 3000 rpm으로 20분간 원심분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 filtering

하여 부유 성분을 걸러낸 후 동결건조(9.8 g, *Cuscutae Semen* water extract, 이하 CS라 함)한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 10 mg/ml의 농도로 녹여 stock solution을 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 암세포의 배양

유방암세포 MCF-7 세포는 RPMI1640 배지에 5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 배양접시를 덮었을 때, PBS(PH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양 하였고 배지는 2~3 일 마다 교환하였다.

2) MTT assay에 의한 세포 생존율 분석  
유방암세포의 생존율은 MTT assay를 이용해 분석 하였다. 세포를 96 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/ml로 분주한 후, 24시간

동안 배양시킨 다음 추출물을 농도별로 48시간 처리하였다. 이후 각 well에 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 배양시켰으며, 이후 상층액을 제거하고 DMSO를 첨가, 보라색 formazan을 용해시켜 ELISA-reader(Molecular Devices, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정 결과는 정상대조군을 100%로 하여 세포생존율을 백분율(%)로 비교하여 나타내었다.

3) RT-PCR에 의한 mRNA 발현 분석  
유전자 발현의 변화를 관찰하기 위해 추출물을 농도별로 처리한 유방암세포로부터 RNAisol PLUS reagent(TAKARA Bio Inc, japan)을 이용해 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA로부터 표적 유전자의 mRNA를 역전사시켜 cDNA를 합성하고, SYBR premix EX Taq(TAKARA bio Inc, Japan)을 이용해 SYBR-Green based quantitative real time PCR을 수행 하였다. 실험에 사용된 primer는 아래와 같다(Table 1).

Table 1. Primers

beta actin	sense	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
	antisense	GGTACCACCATGTACCCAGG
Bcl-2	sense	GCCTTTGTGGAAGTGTACGGC
	antisense	GGCAGTAAATAGCTGATTCGACGTT
Bax	sense	GCGAGTGTCTCAAGCGCATC
	antisense	CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGAA
caspase-3	sense	ATGGAGAACAACACTGAAAACCTCA
	antisense	GCTGTTTACAAGACCCACGTGG
caspase-8	sense	GCCTGCTGAAGATAATCAACGACTAT
	antisense	TTGATGATCAGACAGTATCCCCG
caspase-9	sense	TGGCTTCGTTTCTGCGAACTA
	antisense	GTTACTGCCAGGGGACTCGTC
P21	sense	CTC AGA GGA GGC GCC ATG
	antisense	GGG CGG ATT AGG GCT TCC
P53	sense	GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC
	antisense	CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG
RIP1	sense	TTTTGCACAGCAAAGACCTTACG
	antisense	AGCTGCTCAGAAGGTTCGATCC
survivin	sense	GCATGGGTGCCCCGACGTTG
	antisense	GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA

### 3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다. p<0.05인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

## III. 결 과

### 1. MCF-7 세포 생존율에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 토사자 추출물(CS)이 세포 생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 각각 세포 생존율을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 1).

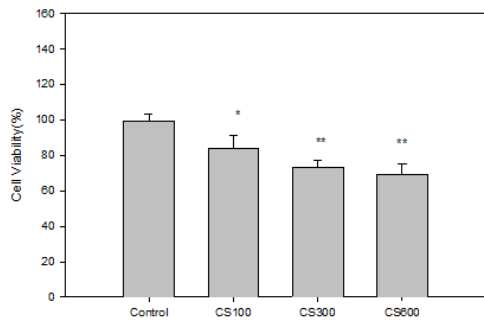


Fig. 1. Effects of CS on Cell Viability of MCF-7 Cell.

Control : vehicle  
 CS100 : 100 µg/ml CS(*Cuscutae Semen* water extracts)  
 CS300 : 300 µg/ml CS  
 CS600 : 600 µg/ml CS  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.  
 \*\* : p<0.01 vs Control  
 \* : p<0.05 vs Control

### 2. Bcl-2 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 Bcl-2 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 Bcl-2 유전자의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 2).

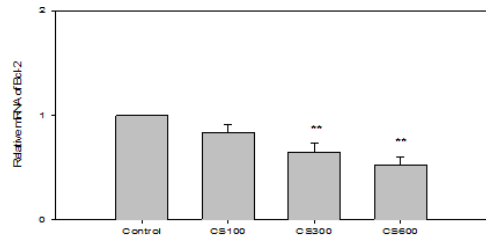


Fig. 2. Effects of CS on the Expression of Bcl-2 in MCF-7.

Control : vehicle  
 CS100 : 100 µg/ml CS  
 CS300 : 300 µg/ml CS  
 CS600 : 600 µg/ml CS  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.  
 \*\* : p<0.01 vs Control

### 3. Bax 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 Bax 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 Bax 유전자의 발현을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 3).

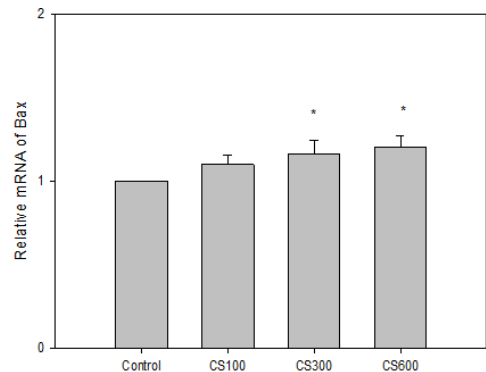


Fig. 3. Effects of CS on the Expression of Bax in MCF-7.

Control : vehicle  
 CS100 : 100 µg/ml CS  
 CS300 : 300 µg/ml CS  
 CS600 : 600 µg/ml CS  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.  
 \* : p<0.05 vs Control

### 4. Caspase-3 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 caspase-3 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100

µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 모두 caspase-3 유전자의 발현을 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 증가시켰다(Fig. 4).

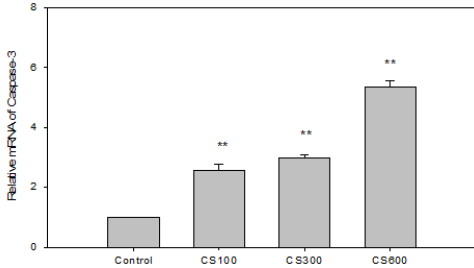


Fig. 4. Effects of CS on the Expression of Caspase-3 in MCF-7.

Control : vehicle  
 CS100 : 100 µg/ml CS  
 CS300 : 300 µg/ml CS  
 CS600 : 600 µg/ml CS  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.  
 \*\*:  $p < 0.01$  vs Control

### 5. Caspase-8 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 caspase-8 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 모두 caspase-8 유전자의 발현에 영향을 주지 않았다(Fig. 5).

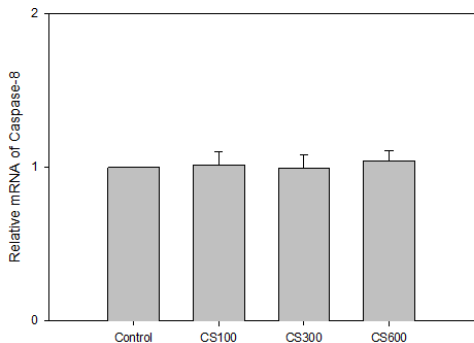


Fig. 5. Effects of CS on the Expression of Caspase-8 in MCF-7.

Control : vehicle  
 CS100 : 100 µg/ml CS  
 CS300 : 300 µg/ml CS  
 CS600 : 600 µg/ml CS  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

### 6. Caspase-9 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 caspase-9 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 모두 caspase-9 유전자의 발현에 영향을 주지 않았다(Fig. 6).

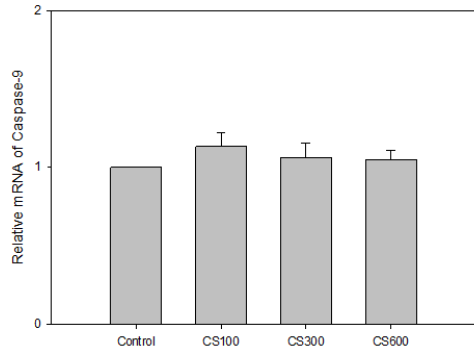


Fig. 6. Effects of CS on the Expression of Caspase-9 in MCF-7.

Control : vehicle  
 CS100 : 100 µg/ml CS  
 CS300 : 300 µg/ml CS  
 CS600 : 600 µg/ml CS  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

### 7. P21 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 P21 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 모두 P21 유전자의 발현을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 7).

### 8. P53 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 P53 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 모두 P53 유전자의 발현에 영향을 주지 않았다(Fig. 8).

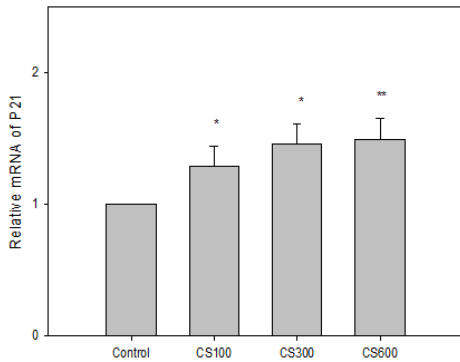


Fig. 7. Effects of CS on the Expression of P21 in MCF-7.

Control : vehicle

CS100 : 100 µg/ml CS

CS300 : 300 µg/ml CS

CS600 : 600 µg/ml CS

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

\*\* : p<0.01 vs Control

\* : p<0.05 vs Control

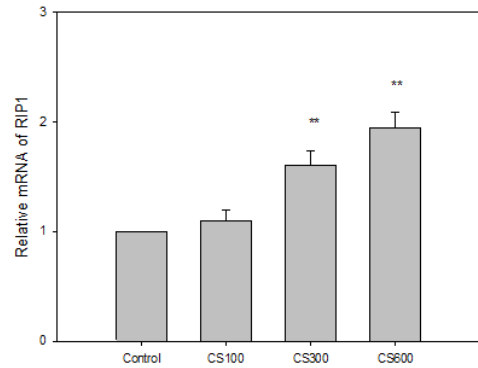


Fig. 9. Effects of CS on the Expression of RIP-1 in MCF-7.

Control : vehicle

CS100 : 100 µg/ml CS

CS300 : 300 µg/ml CS

CS600 : 600 µg/ml CS

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

\*\* : p<0.01 vs Control

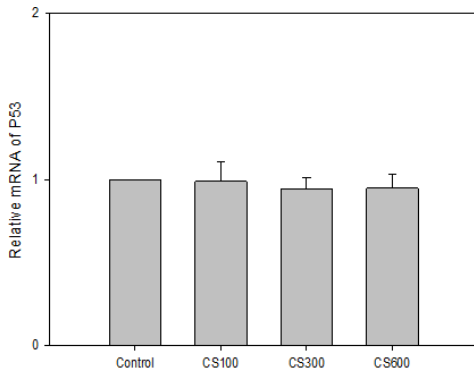


Fig. 8. Effects of CS on the Expression of P53 in MCF-7.

Control : vehicle

CS100 : 100 µg/ml CS

CS300 : 300 µg/ml CS

CS600 : 600 µg/ml CS

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

### 9. RIP-1 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 RIP-1 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 각각 RIP-1 유전자의 발현을 유의성 있게(p<0.01) 증가시켰다(Fig. 9).

### 10. Survivin 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에서 CS가 Survivin 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml의 농도에서 모두 survivin 유전자의 발현에 영향을 주지 않았다(Fig. 10).

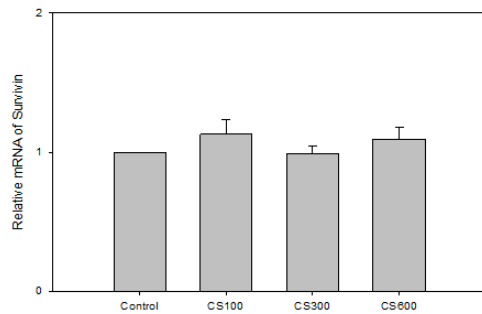


Fig. 10. Effects of CS on the Expression of Survivin in MCF-7.

Control : vehicle

CS100 : 100 µg/ml CS

CS300 : 300 µg/ml CS

CS600 : 600 µg/ml CS

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

## IV. 고 찰

유방암은 매년 약 100만명 이상의 환자가 발생하며, 세계적으로 가장 빈번한 여성의 사망원인 질환이다. 또한 우리나라에서 자궁암과 위암 다음으로 많은 비중을 차지하는 암이다<sup>17)</sup>. 유방암은 유전적 소인이 있거나, 과거병력이 있는 경우, 장기간 에스트로겐에 노출된 경우, 경구피임약 복용, 지방섭취의 증가로 인한 비만 등이 원인이 될 수 있고, 40대 이후의 여자에게 많이 나타나는 편이다<sup>18)</sup>.

현대의 유방암은 한의학적으로는 ‘乳巖’과 가장 가깝다고 볼 수 있고, 乳巖, 乳癰, 吹乳, 乳癆, 乳中結核, 乳癖, 乳痰 등과 유사하여 그 진단과 치료방법을 참고할 수 있다. 원인으로는 肝氣鬱滯, 憂怒抑鬱, 憂鬱傷肝 및 思慮傷肝 등의 七情所傷이 선행 요인이자 주요인이고, 이것이 오래되거나 血氣枯槁와 房勞로 正氣不足, 氣血損傷 및 衝任失調 등으로 나타나는 장부기능의 실조가 발병원인이 된다. 기본 치료 방법은 疏氣行血之法으로 하되 초기에 肝氣鬱結은 疏氣行血, 疏肝解鬱하고, 氣血虧損할 때는 大補氣血해야 한다<sup>1)</sup>.

토사자(*Cuscutae Semen*)는 메꽃과(旋花科, Convolvulaceae)에 속한 一年生 寄生本草인 갯실새삼(菟絲子) *Cuscuta chinensis* Lamark 및 동속 근연식물의 성숙한 종자이다. 동속 근연식물로는 새삼(大菟絲子)과 실새삼(南方菟絲子) 등이 있다. 性은 溫하고, 味는 辛甘하고, 肝, 腎, 脾經으로 歸經된다. 주요 효능은 補肝腎, 益精髓, 明目, 止瀉이고, 腰膝酸痛, 遺精, 消渴, 尿有餘瀝, 脾虛泄瀉, 目暗 등의 질환을 치료

하는데 쓰인다<sup>19)</sup>.

전립선암과 구강 상피암 세포를 억제하는 lutein<sup>10-12)</sup>은 carotenoid 계열이면서 다른 carotenoid류인 lycopene, zeaxanthin과 함께 강력한 항산화제로 알려져 있다<sup>20)</sup>. 토사자 안에 함유된 또 다른 항산화물질인  $\beta$ -carotene 성분은<sup>13,14)</sup> 비타민 A의 전구체로서, 활성산소가 과산화 작용을 하여 세포막과 유전자를 손상시켜 암세포가 유발되는 것을 막는다<sup>21)</sup>.

또한 토사자의 항산화 작용 및 항암효과에 대한 연구로, 김<sup>15)</sup>은 새삼과 실새삼을 비교하여 내인성 항산화물질중 catalase와 superoxide dismutase가 토사자 투여군이 대조군보다 유의성 있게 증가하였고 보고 하였으며, 도<sup>16)</sup>는 stress에서 초기 반응을 일으키는 Bax 및 GSK-3 $\beta$ 의 발현량의 감소 및 차단 효과로 ROS에 의한 apoptosis 방어 작용이 생긴다고 보고하였다.

따라서, 암을 억제하는 성분이 함유되어 있으면서, 항산화 작용과 항암작용이 보고된 토사자가 유방암 치료에도 효과적일 것으로 사료되어 실험에 착수 하였다.

암 세포를 억제하는 생리학적 기전으로는 암세포 증식을 억제하거나 비정상적으로 증식하는 암세포의 사멸을 촉진하는 과정으로 이루어져 있다. 이 중 세포사멸은 계획된 세포의 죽음으로 정상적인 생리과정을 통해 유발되어 세포의 항상성을 유지한다. 이 과정은 단백질 및 핵산의 분해과정을 포함하는데, 암의 경우 세포사멸을 촉진하는 유전자 또는 세포사멸을 억제하는 유전자의 변형으로 정상적인 세포사멸은 잘 일어나지 않는 것으로 알려져 있다. 세포 사멸에 관여하는 대표적 유전자로는 Bcl-2 계열의 유전

자가 알려져 있으며, 이들은 세포의 내막이나 미토콘드리아의 외막에 존재하여 cytochrome C와 caspase 계열의 효소 및 산화적 스트레스를 억제하는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase와 catalase을 조절하여 세포사멸과정을 일으킨다<sup>22)</sup>.

토사자 추출물(CS)이 유방암 세포를 억제하여 항암효과가 있는지 알아보기 위하여, 유방암 세포주인 MCF-7의 생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml 농도에서 유의적인 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1).

CS가 세포사멸을 조절하는 Bcl-2 계열의 단백질발현에 미치는 영향을 평가하였다. Bcl-2 계열의 단백질은 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 계열과 세포사멸을 촉진하는 Bax 계열로 나뉜다. 세포 사멸을 억제하는 Bcl-2 서브패밀리 계열로는 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w등이 있으며, 세포 사멸을 촉진하는 Bax 서브패밀리 계열로는 Bax, Bak, Bok 등이 존재한다<sup>23)</sup>. 이들은 미토콘드리아 막전위를 변화시켜 형성된 통로를 통하여 방출되는 cytochrome C에 의해 활성화되는 caspase 계열의 효소작용을 조절하여 세포 사멸기전을 조절한다<sup>24)</sup>. 그러나, 반대로 작용하여 항상성을 나타내는 이들은 Bcl-2와 Bax 단백질 비율이 작아질수록 세포사멸은 증가하게 된다<sup>25)</sup>. 실험 결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml 농도에서 Bcl-2 단백질의 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 2). 이는 CS가 단백질 사멸을 억제하는 작용을 조절하여 세포사멸을 촉진하는 것으로 판단된다.

이와는 별도로 Bax는 CS에 의해 발현이 촉진되었다(Fig. 3). 이로부터, CS는 Bcl-2 계열 단백질의 유전자 발현을 조절하여

MCF-7 세포의 사멸을 촉진하는 것으로 판단된다.

Bcl-2 계열 단백질의 작용으로 형성된 통로를 통해 유출된 cytochrome C에 의해 활성화되는 caspase 계열의 효소로 인해 세포단백질과 핵산을 분해되고 세포 사멸이 진행된다. Caspase는 현재 11종이 알려져 있는데, 세포사멸 과정에 caspase-3, caspase-8, caspase-9이 특히 중요한 역할을 하는 것으로는 알려져 있다<sup>26)</sup>.

실험결과, CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml 농도에서 caspase-3의 유전자 발현을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 4). 그러나 CS는 caspase-8, caspase-9의 유전자 발현에는 영향을 주지 못했다(Fig. 5, 6)

Caspase 활성을 조절하는 인자인 survivin은 caspase-3 또는 caspase-7을 저해하는 인자로 알려져 있다<sup>27)</sup>. 실험결과, CS는 survivin의 발현을 증가시킨 것으로 나타났다(Fig. 10). 이는 CS가 survivin 발현 증가를 통해 caspase-3 또는 caspase-7의 활성을 억제할 수 있으므로 세포사멸을 저해하는 반응이 나타날 것으로 추정된다. 이러한 결과는 위의 실험(Fig. 4)과 상반된 결과를 나타내는 것으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이와는 별도로 세포사멸을 유도하는 기전으로는 tumor necrosis factor receptor (TNFR)을 통한 신호전달과정이 있다. TNFR1은 외부로부터 전달된 신호에 의해 활성화되어 TNFR-associated death domain (TRADD)와 결합하고 이들은 receptor interacting protein-1(RIP-1)이나 TNFR associated receptor-2(TRAF-2)와 결합하여 caspase-2를 활성화 시키거나, activator protein-1(AP-1)을 활성화하여 세포사멸을 촉진한다<sup>27,28)</sup>. 따라서, 일련의 과정에



관여하는 단백질의 발현을 촉진하거나 활성을 증가시키면, 세포사멸 기전을 통한 암세포의 사멸을 유도할 수 있다. 실제로 실험에서 CS는 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml 농도에서 RIP-1의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 9).

이와는 별도로 세포 주기를 조절하여 세포사멸에 관여하는 인자로는 p21과 p53 등이 보고되었다. p21은 cyclinE가 CdK2와 결합을 저해하여, 활성화된 CdK에 의해 일어나는 전사 및 세포주기가 억제된다. 또한, cyclinA와 CdK2의 결합을 저해하여 이들의 복합체가 E2F의 작용을 억제하게 한다<sup>29,30</sup>. 따라서, p21의 발현 증가는 CdK의 작용을 억제하여 세포주기를 저해하여 세포사멸이 촉진된다. 한편 대표적인 암세포 사멸 촉진인자인 p53은 p21을 활성화하여 전사인자의 활성을 저해하며, 세포주기를 억제 통하여 세포사멸을 유도한다. 실험결과, CS는 p53의 발현에 영향을 주지 못했으나, p21의 발현은 증가시켰다. 따라서, CS는 암세포 주기를 조절하여 세포를 사멸하는 것으로 판단된다(Fig. 7, 8).

이상의 결과, CS는 MCF-7 세포의 생존율을 억제하였으며, Bcl-2 발현억제와 Bax 발현촉진을 통한 caspase류의 활성화 및 caspase-3 발현을 증가시키고, RIP-1의 발현 증가에 의한 세포사멸 그리고 p21의 발현증가를 통한 세포주기조절 억제로 인한 암세포사멸을 촉진하는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구는 토사자 추출물(CS)이 유방암

에 미치는 영향을 알아보기 위해, 유방암 세포주인 MCF-7 세포의 생존율과 세포 생존 및 사멸에 관련된 인자들의 유전자 발현을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CS는 MCF-7 세포의 생존율을 억제하였다.
2. CS는 MCF-7 세포의 Bcl-2 유전자 발현을 억제하였다.
3. CS는 MCF-7 세포의 Bax 유전자 발현을 증가시켰다.
4. CS는 MCF-7 세포의 caspase-3 유전자 발현을 증가시켰다.
5. CS는 MCF-7 세포의 p21 유전자 발현을 증가시켰다.
6. CS는 MCF-7 세포의 RIP-1 유전자 발현을 증가시켰다.

이상의 연구 결과, 토사자 추출물(CS)은 유방암 세포주인 MCF-7 세포사멸에 관련된 유전자를 조절하여 유방암세포의 세포사멸을 촉진하는 것으로 나타났다.

□ 투 고 일 : 2014년 4월 23일

□ 심 사 일 : 2014년 4월 28일

□ 게재확정일 : 2014년 5월 8일

## 참고문헌

1. 대한한방부인과학회. 한방여성의학(하). 서울:의성당. 2012:393-9.
2. 강진오. 유방암의 방사선 치료. 경희의학. 2005;21(1):37-42.
3. 김정진 등. 유방종괴에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1998;12(4)

- :29-43.
4. 글로복스편집국. 부인과. 대구:글로복스. 2009:220.
  5. 윤성중, 이상인. 토사자에 대한 문헌적 고찰. 본초분과학회지. 1991;6(1):59-65.
  6. 이재복, 이병렬. 토사자 약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2001;18(3):94-104.
  7. Kim JY, Hwang GS. Effect of *Cuscuta japonica* on RANKL-stimulated osteoclastogenesis. J Ori Preven Med. 2010;14(2):77-89.
  8. 유윤조. 兎絲自煎湯液이 自然發證 高血壓 白鼠의 血壓에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2001;15(1):164-8.
  9. 강소신의학원편. 중약대사전(하). 상해:상해과학기술출판사. 1978:2006-3008.
  10. Gunasekera RS, et al. Lycopene and lutein inhibit proliferation in rat prostate carcinoma cells. Nutr Cancer. 2007;58(2):171-7.
  11. Cheng HC, et al. Carotenoids suppress proliferating cell nuclear antigen and cyclin D1 expression in oral carcinogenic models. J Nutr Biochem. 2007;18(10):667-75.
  12. Kwon YS, et al. Antioxidative constituents from the seeds of *Cuscuta shinensis*. Natural product sciences. 2000;6(3):135-8.
  13. Chen AY, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. Food Chem. 2013;138(4):2099-107.
  14. Tanaka T, et al. Cancer chemoprevention by carotenoids. Molecules. 2012;17(3):3202-42.
  15. 김봉수 등. 토사자류의 항산화작용에 대한 연구. 대한본초학회지. 1997;12(1):67-84.
  16. 도용호, 김동일. PC12 Cell에 대한 토사자의 안정성 및 항산화작용에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(3):121-34.
  17. 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):235-41.
  18. Hand D, et al. Hormonal therapies for early breast cancer: systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess. 2007;11(26):1-134.
  19. 전국한의과대학 본초학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2006:620-2.
  20. 김진명. Lutein의 항산화 기능에 관한 반응 속도론적 연구. 한국교원대학교 대학원. 2010:1-56.
  21. 박혜민. IPP 생합성 경로의 대사공학을 통한 대장균의  $\beta$ -carotene 생산성 향상. 경상대학교 대학원. 2007:1-61.
  22. Yin H, Zhu M. Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. Free Radic Res. 2012;46(8):959-74.
  23. Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. Exp Oncol. 2012;34(3):165-75.
  24. Kilbride SM, Prehn JH. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial

- function. *Oncogene*. 2013;32(22):2703-11.
25. Renault TT, et al. Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your friends close but your enemies closer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(1):64-7.
26. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ*. 2011;18(9):1441-9.
27. Cheung CH, et al. Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1453-62.
28. Thapa RJ, et al. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(33):3109-18.
29. Gunia S, et al. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. *J Clin Pathol*. 2012;65(3):232-6.
30. Nam EJ, Kim YT. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(6):1169-82.