

清肝解鬱湯과 十六味流氣飲의 유방암에 대한 항암, 항염 효능 연구

¹월야한의원, ²동신대학교 한의과대학 한방재활의학과교실
³동신대학교 한의과대학 한방부인과교실
류효경¹, 정민재², 조성희³

ABSTRACT

Research on the Anti-Breast Cancer and Anti-Inflammatory Effects of *Chungganhaewool-tang* and *Shipyekmiyeugi-eum*

Hyo-Kyung Ryu¹, Min-Jae Jung², Seong-Hee Cho³

¹Wolya Korean Medical Clinic

²Dept. of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine,
Dong-shin University

³Dept. of Korean Gynecology and Obstetrics, College of Korean Medicine,
Dong-Shin University

Objectives: The purpose of this study is to evaluate anti-breast cancer and anti-inflammatory effects of *Chungganhaewool-tang* and *Shipyekmiyeugi-eum*.

Methods: MDA-MB-231 cells were used to measure cytotoxicity, Reactive oxygen species (ROS) production, protein expression amounts of Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl), Cytochrome C, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-9, Poly ADP-ribose polymerase (PARP), Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), Heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD (P) H Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) to evaluate the anti-breast cancer effects of *Chungganhaewool-tang* (CHT) and *Shipyekmiyeugi-eum* (SYE), and THP-1 cells, differentiated into macrophage and induced inflammation with Lipopolysaccharide (LPS), were used to measure production amounts of ROS, Nitric oxide (NO), and protein expression amounts of Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Cyclooxygenase (COX-2), Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) and Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) to evaluate the anti-inflammatory effects of CHT and SYE.

Results: CHT and SYE reduced MDA-MB-231 cell counts, increased protein expression of Bax and Cytochrome C, and decreased protein expression of Bcl-2, Bcl-xl. The protein expression amounts of Caspase-3, 7, and 9 decreased, but amounts of the active form, cleaved Caspase-3, 7, and 9, increased. In addition, PARP protein expression decreased, the amount of PARP protein in the cleaved form increased, and the amount of protein expressions of Nrf2 and HO-1 decreased, but NQO1 showed no significant difference. In THP-1 cells CHT and SYE reduced ROS and NO, and reduced protein expressions of iNOS, COX-2, IL-1, and TNF- α , but only SYE groups reduced IL-6.

Conclusions: This study suggests that CHT and SYE have potential to be used as treatments for breast cancer.

Key Words: *Chungganhaewool-tang*, *Shipyekmiyeugi-eum*, Breast Cancer

I. 서 론

유방암은 전 세계적으로 여성에게 발생 빈도가 높은 종양이며¹⁾ 한국 역시 짧은 기간에 발생률이 급격히 증가하여 2018년 한국 여성에게 발생한 암 중 1위로 보고되었다²⁾. 유방암의 치료는 외과적 수술과 함께 전신요법인 항암화학요법과 방사선 치료요법 등을 병합하여 시행한다^{3,4)}. 다양한 유방암 치료법들이 지속적인 연구 속에 발전을 이루며 도입이 되고 있으나³⁾ 여전히 환자들에게는 심혈관계 질환, 폐 질환⁵⁾, 조기폐경, 골수기능장애, 말초신경병증⁶⁾과 같은 부작용의 위험이 있다. 다수의 환자들이 오심구토, 식욕부진, 탈모⁶⁾, 피로와 통증을 경험하며 이러한 부작용들로 인해 환자들은 삶의 질 저하를 경험하고 이는 치료에도 부정적인 영향을 미친다^{7,8)}. 때문에 독성이 적은 항암제의 개발을 위한 연구는 계속되고 있으며 천연물의 활용에도 관심이 높아지고 있다⁹⁻¹⁴⁾.

한의학에서의 ‘乳巖’, ‘乳癰’, ‘吹乳’, ‘乳癖’, ‘乳痰’, ‘乳中結核’, ‘乳勞’, ‘石癰’, ‘番花奶’, ‘妳巖’ 등은 유방 종괴를 의미하며 그 중 乳巖이 현재의 유방암과 가장 부합한다고 볼 수 있다¹⁵⁾.

淸肝解鬱湯은 乳房硬結로 脹痛하는 것을 淸肝治法과 解鬱治法으로 다스리는 처방이며 十六味流氣飲은 十六種 藥物로 구성된 처방으로 氣滯를 流氣시켜 妳巖 즉 乳岩을 다스리는 처방이다¹⁶⁾. 淸肝解鬱湯은 유선염 환자에 대한 증례보고¹⁷⁾, 十六味流氣飲은 갑상선 기능에 미치는 영향과^{18,19)} 면역 활성화에 의한 유방암 생장 억제²⁰⁾에 관한 보고가 있으나 두 처방 모

두 apoptosis를 통한 유방암 세포의 증식 억제 및 항염증 효능 관련 인자와 기전에 대한 실험적 연구는 미비하다.

이에 淸肝解鬱湯 (*Chungganhaewool-tang*, CHT)과 十六味流氣飲 (*Shipyekmiyeugi-eum*, SYE)의 유방암 세포 사멸 효능 및 암세포의 발생과 성장을 촉진시키는 염증관련 물질²¹⁾에 대한 억제 효능과 이와 관련된 인자들의 단백질 발현량을 통해 그 기전을 규명하고자 인간 유래 유방암 세포주 MDA-MB-231 세포와 인간 유래 단핵구 세포주 THP-1 세포로 *in vitro* 연구를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 료

본 연구에 사용된 淸肝解鬱湯 (*Chungganhaewool-tang*, CHT)과 十六味流氣飲 (*Shipyekmiyeugi-eum*, SYE)의 처방 구성은 《東醫寶鑑》²²⁾을 기준으로 약재는 한약재 유통업체인 (주)옴니허브에서 검수된 한약재를 구입하여 사용하였으며, 각 처방의 구성은 아래와 같다(Table 1, 2).

Table 1. The Prescription of CHT

Herbal name	Pharmacognostic name	Weight (g)
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	4
貝母	<i>Fritillariae Thunbergii Bulbus</i>	2.8
赤茯苓	<i>Poria Sclerotium</i>	2.8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	2.8
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	2.8
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2.8
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	2
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	2
牡丹皮	<i>Moutan Cortex Radicis</i>	2
陳皮	<i>Citri Unshius Pericarpium</i>	2
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	2
Total amount		34

Table 2. The Prescription of SYE

Herbal name	Pharmacognostic name	Weight (g)
紫蘇葉	<i>Perillae Herba</i>	6
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	2
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	2
白芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	2
防風	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	2
烏藥	<i>Linderae Radix</i>	2
檳榔	<i>Arecae Semen</i>	2
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	2
枳殼	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	2
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	2
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	1.2
Total amount		31.2

2) 시 약

본 연구에는 RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA solution(Welgene, Korea), lipopolysaccharide(LPS), trypan blue, formaldehyde, 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate(DCF-DA), protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail 2, phosphatase inhibitor cocktail 3, phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)(Sigma-Aldrich, U.S.A.), 4',6-Diamidino-2-Phenylindole(DAPI), pierce™ BCA protein assay Kit, RIPA lysis and extraction buffer(Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), bovine serum albumin (BSA)(Gendepot, U.S.A.), miracle-star™ western blot detection system(Intron Biotechnology, Korea), primary antibody (Cell Signaling Technology, U.S.A.), secondary antibody(Jackson Immunoresearch, U.S.A.), nitric oxide plus detection kit(Intronbio, Korea) 등을 사용하였다.

3) 기 기

본 연구에는 extraction mantle(Misung Scientific, Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), freeze dryer(ilShinbiobase, Korea), CO₂ incubator, autoclave, deep-freezer(Sanyo, Japan), clean bench, vortex mixer, centrifuge, ice-maker(Vision scientific, Korea), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), luminex(Millipore, U.S.A.), micro plate reader (Molecular Devices, U.S.A.), fluorescence microscope(Leica Microsystems, Germany), flow cytometry system(Becton, Dickinson and Company, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

각각 10첩 분량의 CHT(340 g)와 SYE

(412 g)에 5 ℓ의 증류수를 넣어서 100℃에서 3시간 추출하였으며, 여과지를 사용하여 추출물을 여과하였다. 여과된 추출물은 rotary vacuum evaporator를 사용하여 감압농축하고 freeze dryer를 사용하여 동결건조를 진행하였다. 동결건조 완료 후, CHT는 102.17 g(수득률 : 30.05%), SYE는 110.12 g(수득률 : 26.73%)의 분말을 얻었으며, -20℃에 보관하면서 실험 당일 소분하고 증류수에 용해시켜 사용하였다.

2) 항암 효능 평가

(1) 세포 배양

인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하여 사용하였으며, 10%의 FBS가 추가된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂의 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. 세포의 계대 배양은 2-3일 주기로 진행하였다.

(2) 세포 생존율 측정

MDA-MB-231 세포는 48 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 배양하였으며, 24시간 후, CHT와 SYE를 0.5, 1, 2, 4 mg/ml의 농도로 처리하고 다시 24시간 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 배양액 100 μl당 10 μl의 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

(3) DAPI 염색

MDA-MB-231 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 배양하였으며, 24시간 후, CHT와 SYE를 0.5, 1, 2, 4 mg/ml의 농도로 처리하여 다시

24시간 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 원심분리하여 얻은 세포는 Phosphate Buffer Saline(PBS)로 세척하고 4% formaldehyde로 고정하였다. 고정한 세포는 300 nM의 DAPI solution을 이용하여 암실에서 3분간 반응시키고 다시 PBS로 세척하여 fluorescence microscope를 이용하여 세포를 관찰하였다.

(4) DCF-DA assay

MDA-MB-231 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 배양하였으며, 24시간 후, CHT와 SYE를 0.5, 1, 2, 4 mg/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 원심분리하여 얻은 세포는 차가운 PBS로 세척한 뒤, 10 uM의 DCF-DA를 이용하여 세포배양기에서 15분간 반응시키고 다시 차가운 PBS로 세척하여 남아있는 DCF-DA를 제거하였다. 이 후, flow cytometry system을 통해 ROS 생성량을 분석하였다.

(5) 단백질 발현량 측정

시료 및 약물을 처리한 세포는 protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II, III가 포함된 RIPA buffer로 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였으며, sample loading buffer와 섞어 95℃에서 5분간 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 10% acrylamide gel을 통해 SDS-PAGE하여 크기별로 분리하였고, PVDF membrane에 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane을 3% BSA에 담가서 상온에서 2시간 반응시켰다. TBS-T buffer를 이용하여 세척한 뒤 primary antibody를 넣어 4℃에서 16시간 반응시켰다. 다시 3회 세척 후 secondary antibody를 넣

어 상온에서 1시간 반응시켰으며, 다시 세척하고 ECL solution을 통해 단백질을 발색시켰다. 이후, chemidoc fusion FX를 통해 단백질 발현량을 분석하였다.

3) 항염증 효능 평가

(1) 세포 배양

인간 유래 단핵구 세포주인 THP-1 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하여 사용하였으며, 10%의 FBS가 추가된 RPMI-1640 배지를 사용해 37°C, 5% CO₂ 조건이 유지되는 세포배양기로 배양하였다. 세포의 계대 배양은 2-3일 주기로 진행하였다.

(2) 세포 생존율 측정

THP-1 세포는 48 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하고 100 ng/ml의 PMA로 24시간 동안 분화시킨 후, CHT와 SYE를 50, 100, 200, 400, 600 µg/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 배양액 100 µl 당 10 µl의 EZ-Cytox 용액을 첨가해 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

(3) DCF-DA assay

THP-1 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하고 100 ng/ml의 PMA로 24시간 동안 분화시킨 후, CHT와 SYE를 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하고 1 µg/ml의 LPS를 추가한 뒤 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 원심분리하여 얻은 세포는 차가운 PBS로 세척한 후, 10 µM의 DCF-DA를 이용해 세포배양기로 15분간 반응시키고 다시 차가운 PBS로 세척하여 남아있는 DCF-DA를 제거하였다. 이 후, flow cytometry

system을 통해 ROS 생성량을 분석하였다.

(4) Nitric oxide 생성량 측정

THP-1 세포는 48 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하고 100 ng/ml의 PMA로 24시간 동안 분화시킨 후, CHT와 SYE를 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하고 1 µg/ml의 LPS를 추가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 뒤 N1 buffer 100 µl를 추가하고 상온에서 10분 반응시켰으며, 반응 후 N2 buffer 100 µl를 추가하여 상온에서 10분 반응시켰다. 반응 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 단백질 발현량 측정

THP-1 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하고 100 ng/ml의 PMA로 24시간 동안 분화시킨 후, CHT와 SYE를 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하고 1 µg/ml의 LPS를 추가한 뒤 다시 24시간 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후, 원심분리하여 얻은 세포는 protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II, III가 포함된 RIPA buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였으며, sample loading buffer와 섞어 95°C에서 5분간 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 10% acrylamide gel을 통해 SDS-PAGE하여 크기별로 분리하였고, PVDF membrane에 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane을 3% BSA에 담가 상온에서 2시간 반응시켰다. TBS-T buffer를 이용하여 세척하고 primary antibody를 넣어 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 다시 3회 세척하고 secondary antibody를 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰

으며, 다시 세척하고 ECL solution을 통해 단백질을 발색시켰다. 이후, chemidoc fusion FX를 통해 단백질 발현량을 분석하였다.

3. 통계처리

연구 결과는 mean±standard error of mean으로 나타내었으며, SPSS Statistics Version 21.0(IBM, U.S.A.)을 이용하였으며, 먼저 두 그룹 간의 통계적 비교는 independent sample t-test를 사용하여 수행하였고 이후 Tukey's HSD test를 통해 유의수준 0.05로 설정하여 유의성을 검정

하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 의 3가지 유의수준으로 나누어 표기하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 항암 효능평가

1) 세포생존율

세포생존율을 측정된 결과, CHT는 1 mg/ml, SYE는 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 암세포 생장의 억제가 나타났다(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)(Fig. 1).

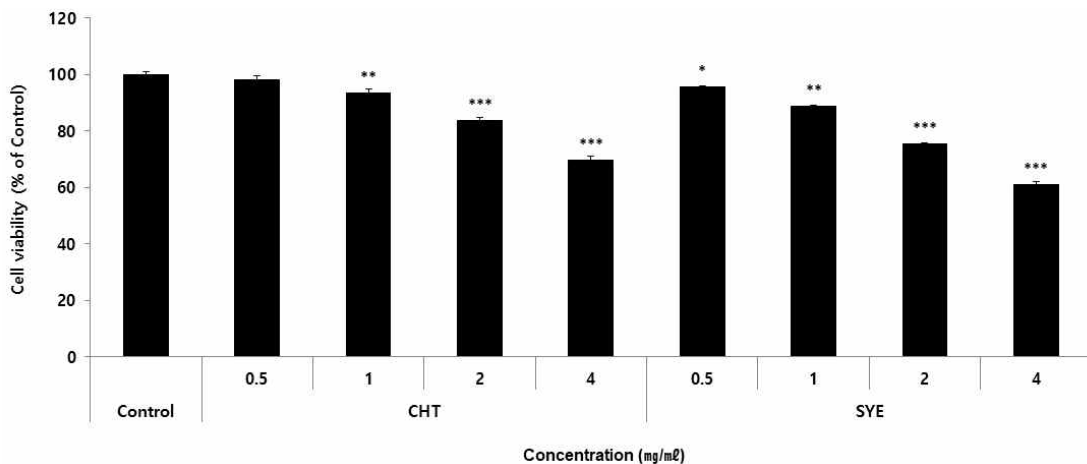


Fig. 1. Cell viabilities of CHT and SYE in MDA-MB-231 cells.

MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. Treated cells were reacted by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using micro plate reader. Cell viabilities were calculated as percentage relative to the control. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

2) DAPI stain

DAPI stain을 진행한 결과, 세포독성 결과와 유사하게 CHT와 SYE는 대조군에 비해 암세포의 사멸이 나타났음을 확인하였다(Fig. 2).

3) ROS 생성량

ROS 생성량을 측정된 결과, CHT는 2 mg/ml, SYE는 1 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 증가가 나타났다(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)(Fig. 3).

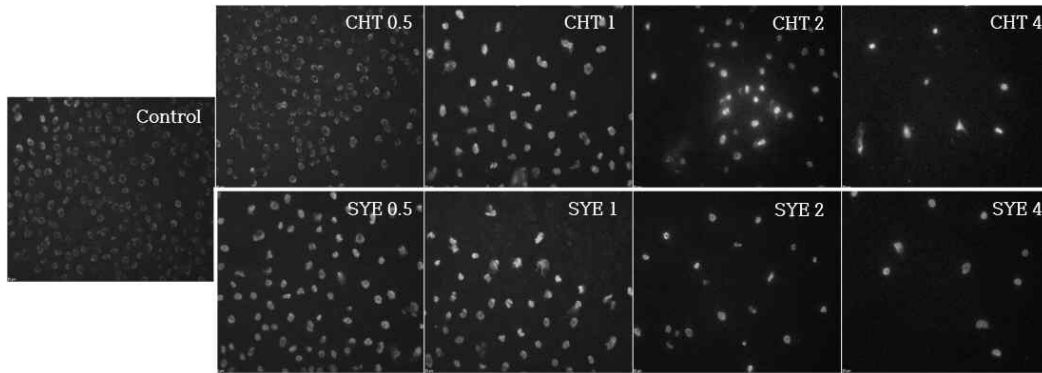


Fig. 2. Effects of CHT and SYE on DAPI staining in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The DAPI stain image was measured using a fluorescence microscope ($\times 200$).

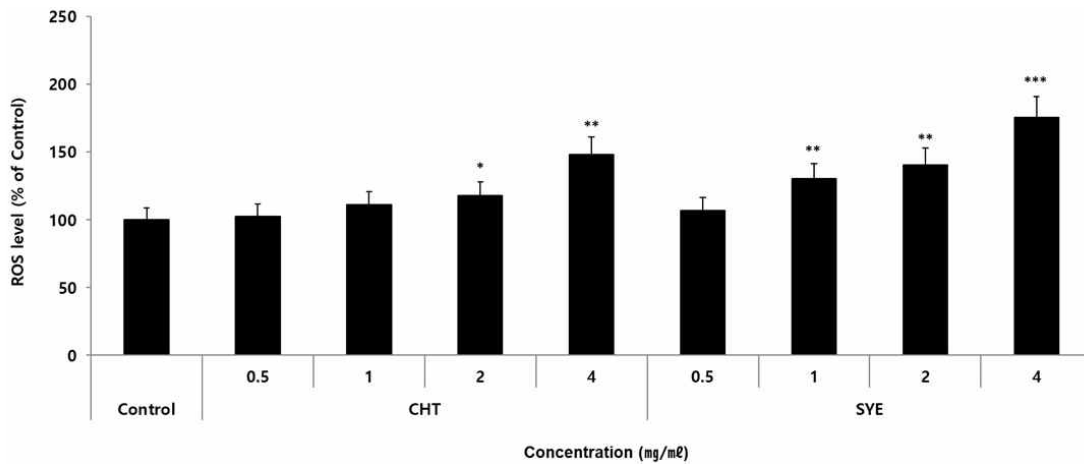


Fig. 3. Effects of CHT and SYE on ROS level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The ROS level were measured using a DCF-DA assay and flow cytometry system. Results were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

4) 단백질 발현량

(1) Bax

Bax 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT와 SYE는 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 증가가 나타났다(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)(Fig. 4).

(2) Bcl-2

Bcl-2 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT는 4 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났으며, SYE는 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$)(Fig. 5).

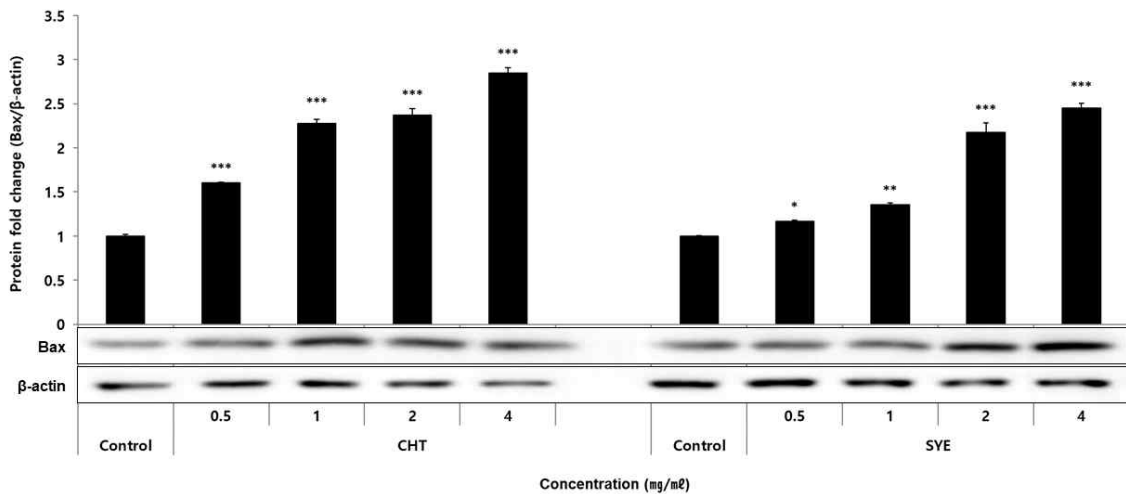


Fig. 4. Effects of CHT and SYE on Bax protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$ compared to control).

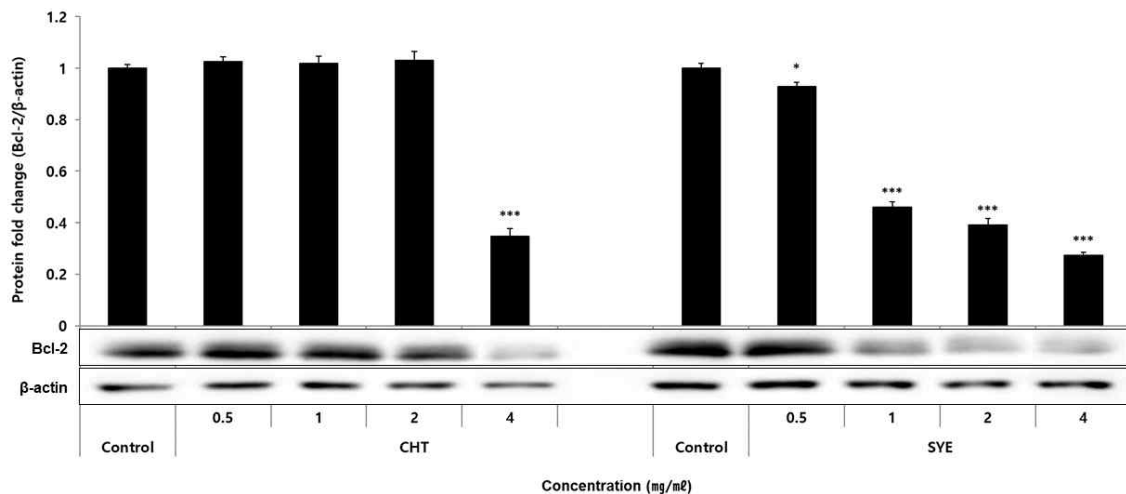


Fig. 5. Effects of CHT and SYE on Bcl-2 protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * ; $p < 0.05$, *** ; $p < 0.001$ compared to control).

(3) Bcl-xl

Bcl-xl 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT와 SYE는 4 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다(* ; $p < 0.05$, *** ; $p < 0.001$)(Fig. 6).

(4) Cytochrome C

Cytochrome C 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT는 0.5 mg/ml, SYE는 1 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 증가가 나타났다(* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$)(Fig. 7).

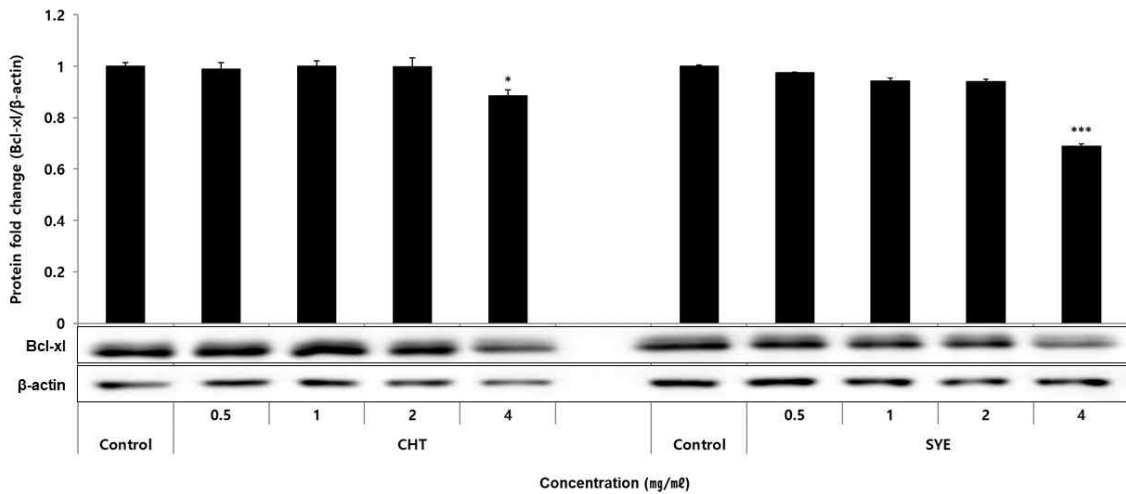


Fig. 6. Effects of CHT and SYE on Bcl-xl protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * : p<0.05, *** : p<0.001 compared to control).

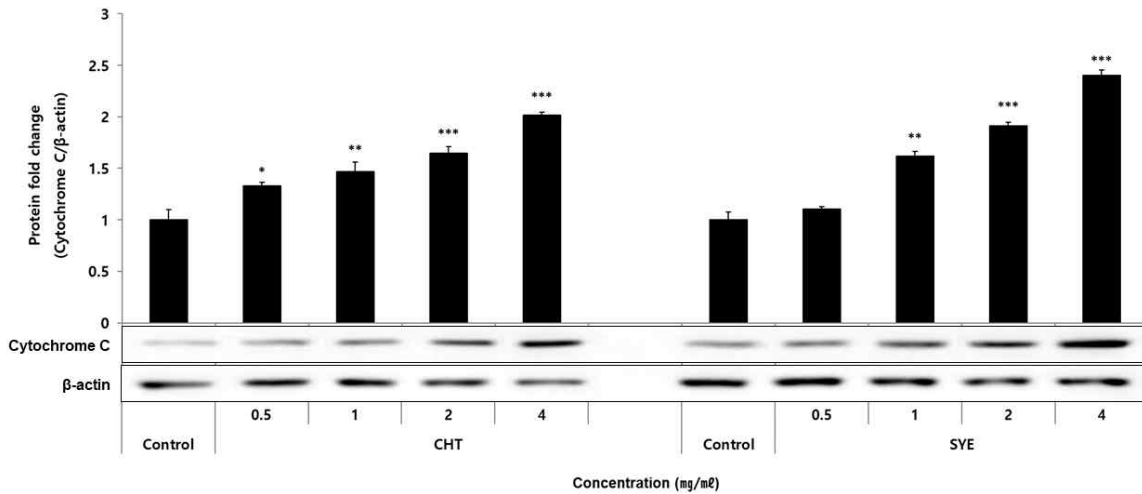


Fig. 7. Effects of CHT and SYE on Cytochrome C protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

(5) Caspase-3

Cleaved Caspase-3 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT와 SYE는 2 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 증가가 나타났다(*** : p<0.001)(Fig. 8).

(6) Caspase-7

Cleaved Caspase-7 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT와 SYE는 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 증가가 나타났다(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001)(Fig. 9).

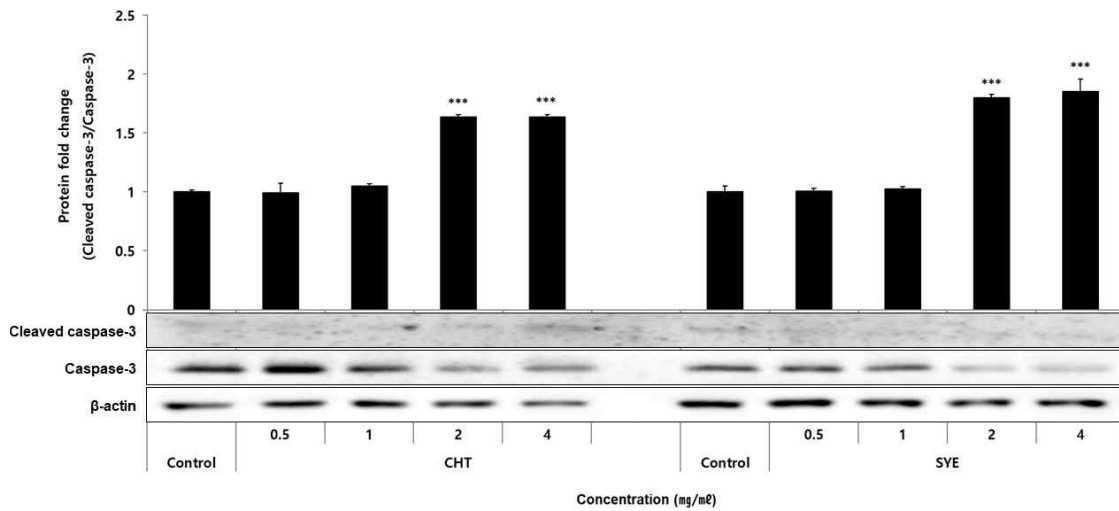


Fig. 8. Effects of CHT and SYE on Caspase-3 protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$ compared to control).

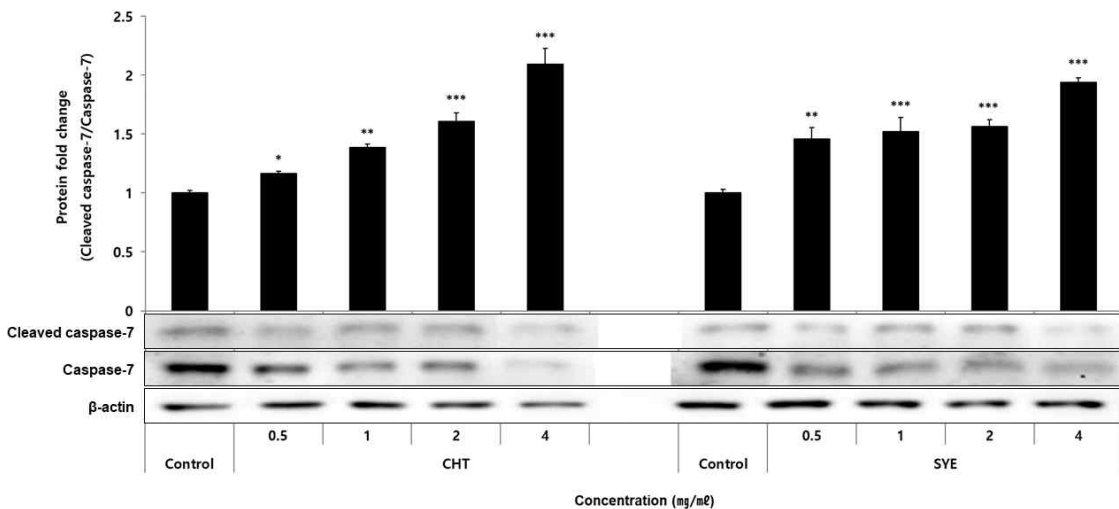


Fig. 9. Effects of CHT and SYE on Caspase-7 protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

(7) Caspase-9

Cleaved Caspase-9 단백질 발현량을 측정 한 결과, CHT는 1 mg/ml, SYE는 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 증가가 나타났다(** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$)(Fig. 10).

(8) PARP

Cleaved PARP 단백질 발현량을 측정 한 결과, CHT와 SYE는 1 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 증가가 나타났다(*** ; $p < 0.001$)(Fig. 11).

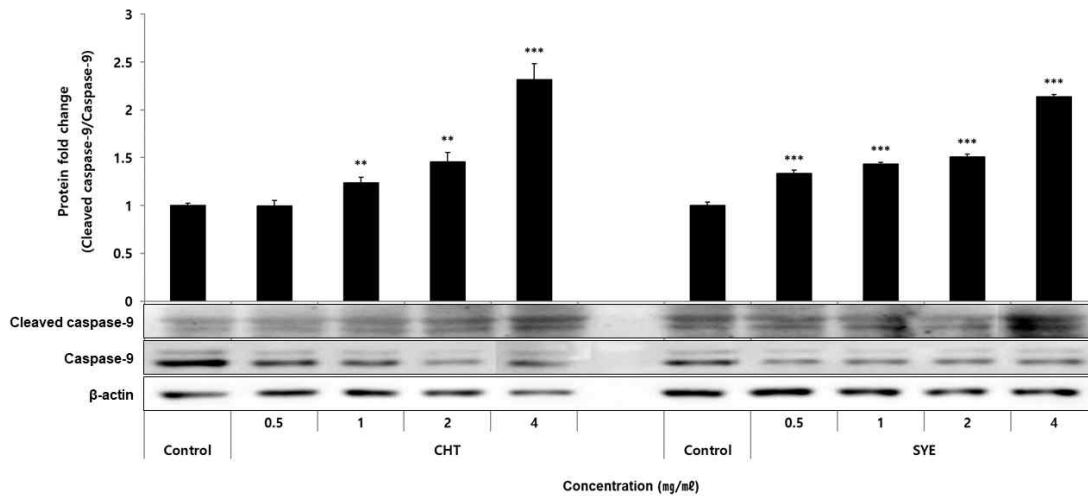


Fig. 10. Effects of CHT and SYE on Caspase-9 protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

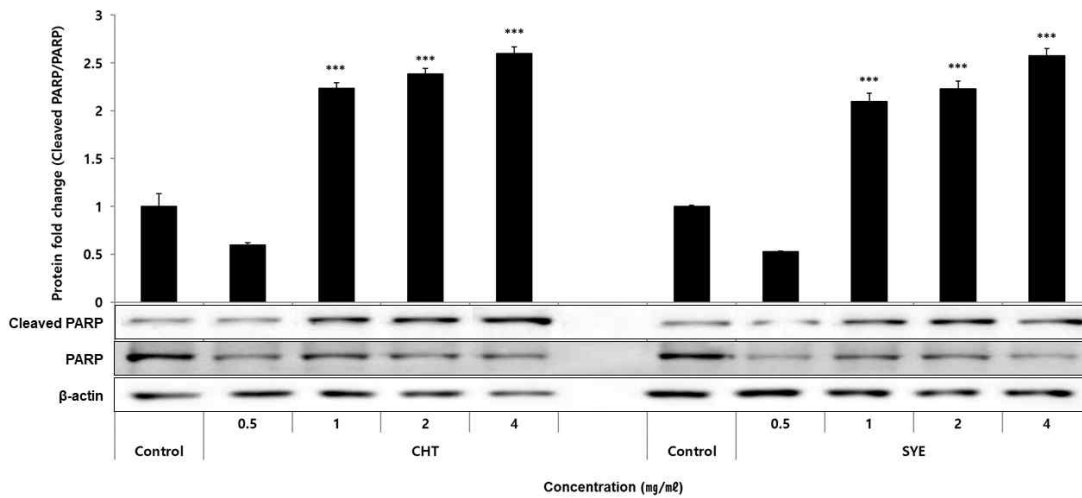


Fig. 11. Effects of CHT and SYE on PARP protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$ compared to control).

(9) Nrf2

Nrf2 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT는 1 mg/ml, SYE는 2 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)(Fig. 12).

(10) HO-1

HO-1 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT는 4 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났으며, SYE는 1 mg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)(Fig. 13).

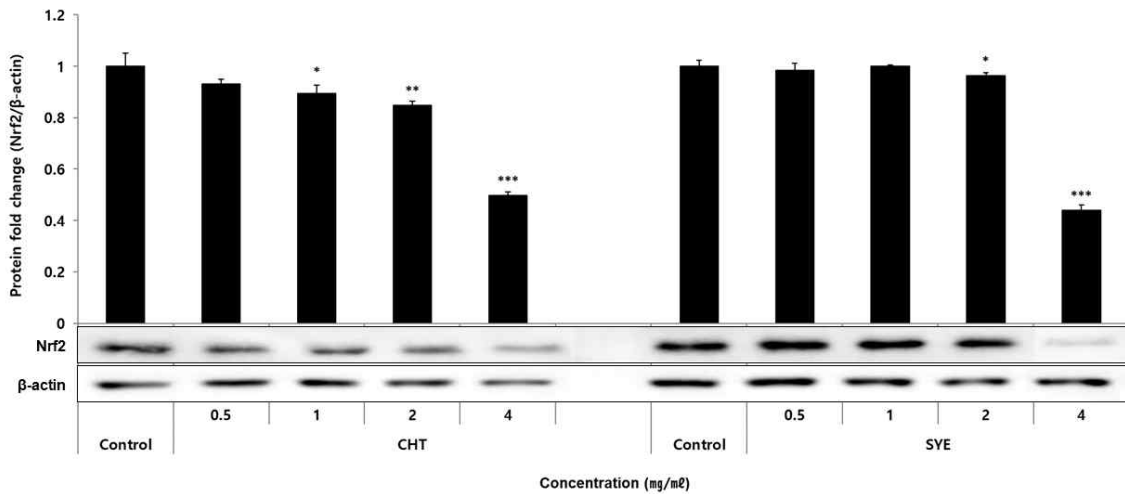


Fig. 12. Effects of CHT and SYE on Nrf2 protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

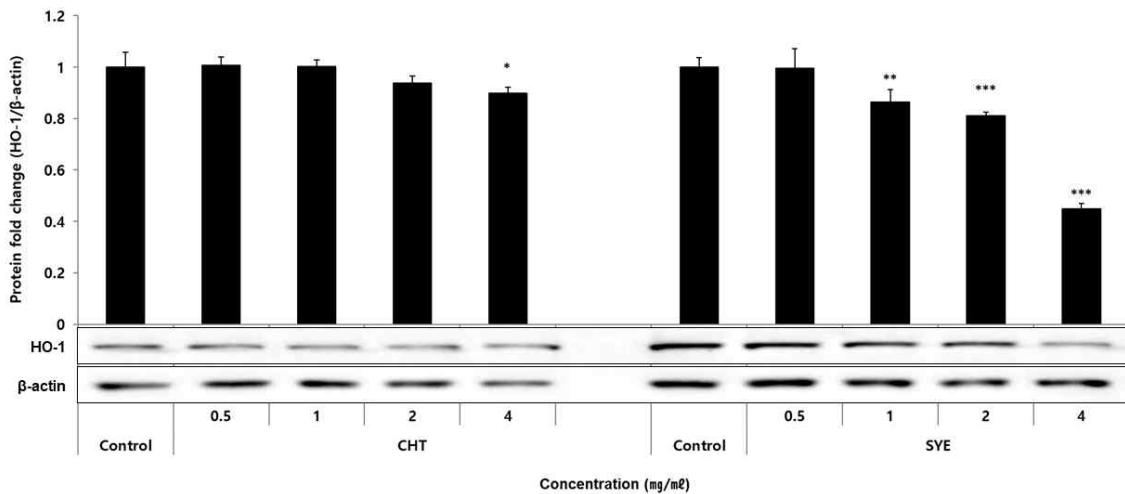


Fig. 13. Effects of CHT and SYE on HO-1 protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

(11) NQO1
NQO1 단백질 발현량을 측정된 결과,

CHT와 SYE는 모든 농도에서 대조군에 비해 차이가 나타나지 않았다(Fig. 14).

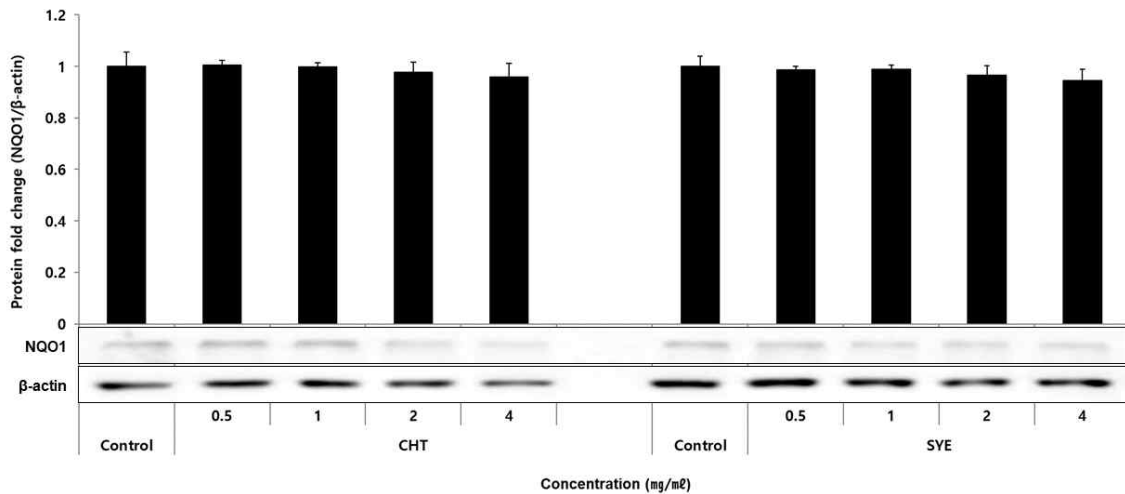


Fig. 14. Effects of CHT and SYE on NQO1 protein expression level in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated by 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml of CHT or SYE for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments.

2. 항염증 효능평가

1) 세포생존율

세포생존율 측정 결과, CHT과 SYE는 600 µg/ml 이상의 농도에서 세포에 대한 유의한 독성이 나타나 이후 실험에서 400 µg/ml 농도까지 진행하였다(*** ; p<0.001)

(Fig. 15).

2) ROS 생성량

ROS 생성량 측정 결과, CHT는 100 µg/ml, SYE는 50 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(** ; p<0.01, *** ; p<0.001)(Fig. 16).

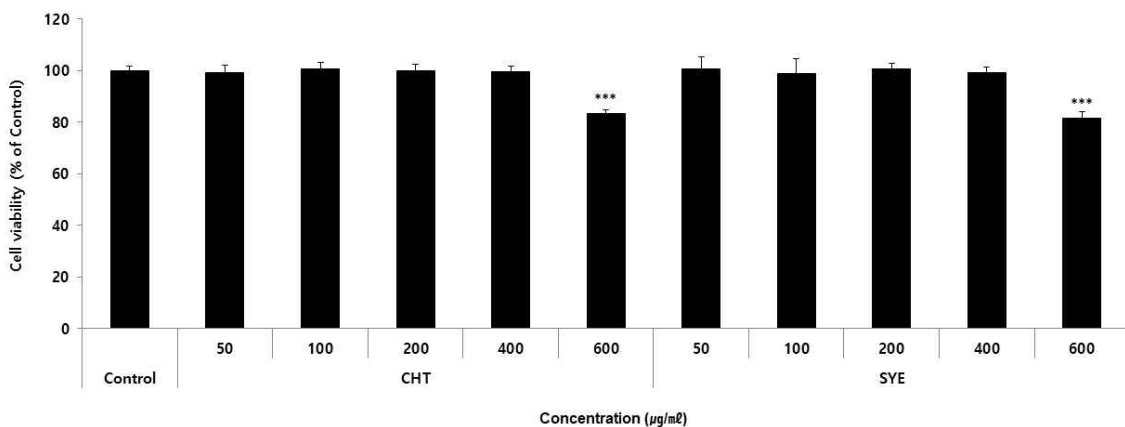


Fig. 15. Cell viabilities of CHT and SYE in THP-1 cells.

PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, 40 and 600 µg/ml of CHT or SYE for 24 h. Treated cells were reacted by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance were measured at 450 nm using micro plate reader. Cell viabilities were calculated as percentage relative to the control. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, *** ; p<0.001 compared to control).

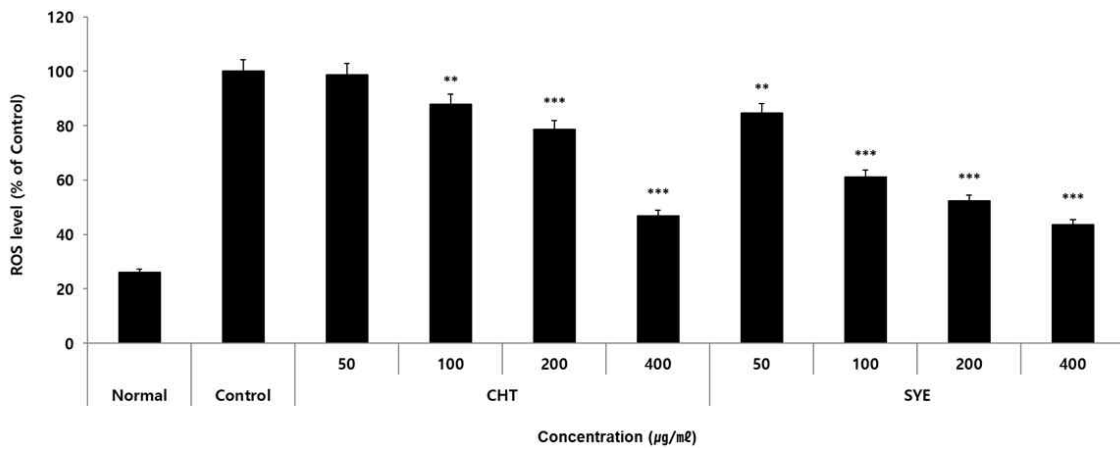


Fig. 16. Effects of CHT and SYE on ROS level in THP-1 cells. PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, and 400 µg/ml of CHT or SYE add 1 µg/ml LPS for 24 h. The ROS levels were measured using a DCF-DA assay and flow cytometry system. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

3) Nitric oxide 생성량

Nitric oxide 생성량을 측정한 결과, CHT는 100 µg/ml, SYE는 50 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(*** : p<0.001)(Fig. 17).

4) 단백질 발현량

(1) iNOS

iNOS 단백질 발현량을 측정한 결과, CHT는 200 µg/ml, SYE는 100 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001)(Fig. 18).

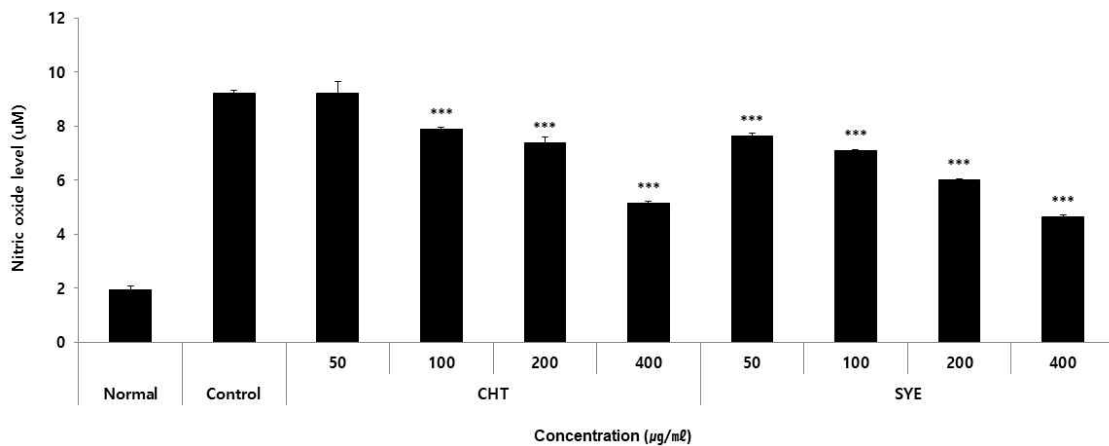


Fig. 17. Effects of CHT and SYE on Nitric oxide level in THP-1 cells. PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, and 400 µg/ml of CHT or SYE add 1 µg/ml LPS for 24 h. The nitric oxide levels were measured using a ELISA kit and micro plate reader. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, *** : p<0.001 compared to control).

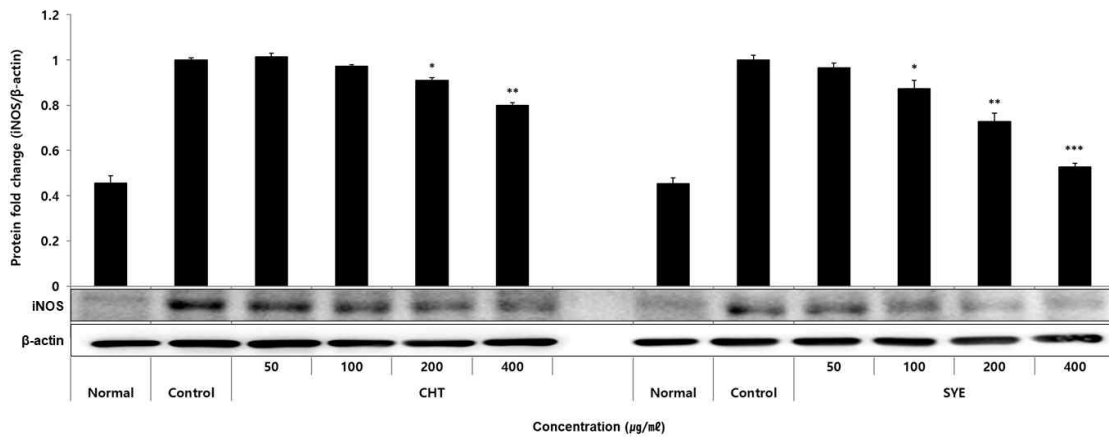


Fig. 18. Effects of CHT and SYE on iNOS protein expression level in THP-1 cells. PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, and 400 μg/ml of CHT or SYE add 1 μg/ml LPS for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001 compared to control).

(2) COX-2

COX-2 단백질 발현량을 측정한 결과, CHT는 100 μg/ml, SYE는 50 μg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(* ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001)(Fig. 19).

(3) IL-1β

IL-1β 단백질 발현량을 측정한 결과, CHT와 SYE는 100 μg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(* ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001)(Fig. 20).

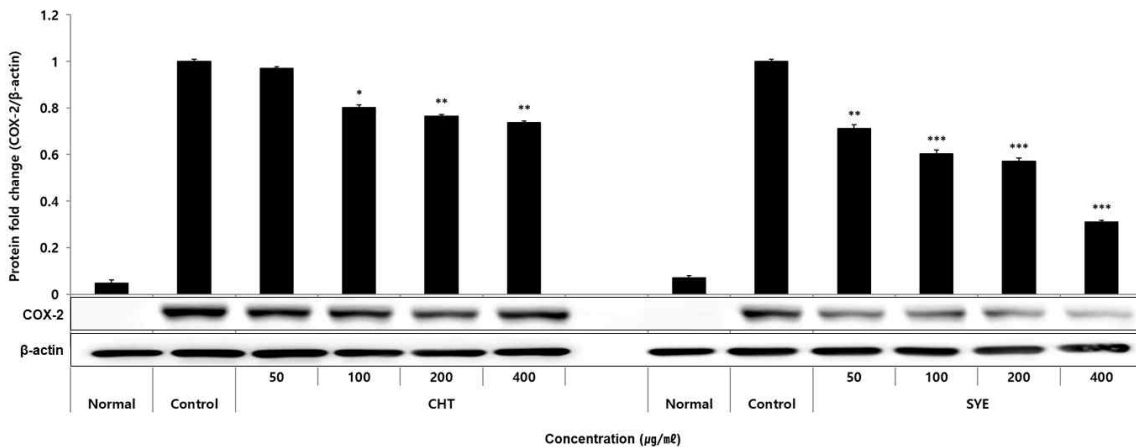


Fig. 19. Effects of CHT and SYE on COX-2 protein expression level in THP-1 cells. PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, and 400 μg/ml of CHT or SYE add 1 μg/ml LPS for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001 compared to control).

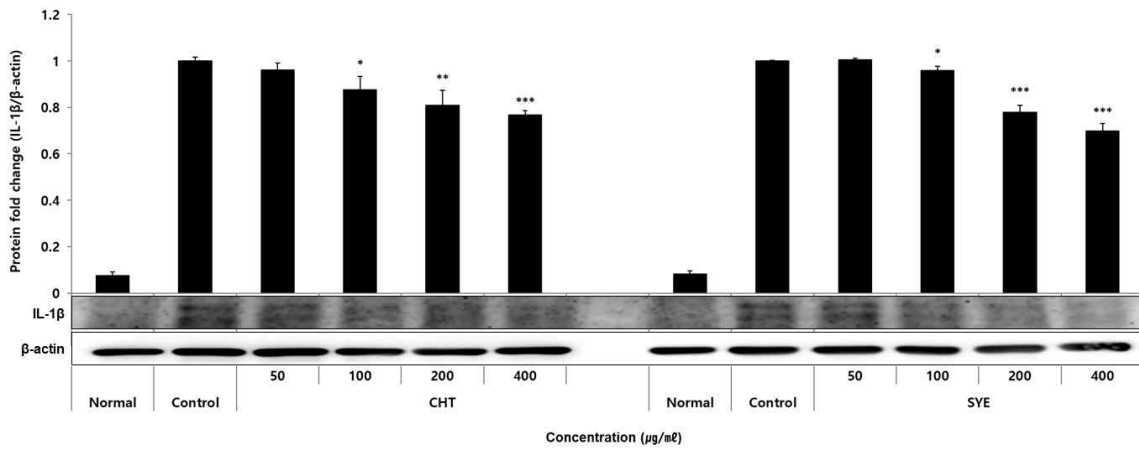


Fig. 20. Effects of CHT and SYE on IL-1β protein expression level in THP-1 cells. PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, and 400 μg/ml of CHT or SYE add 1 μg/ml LPS for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001 compared to control).

(4) IL-6

IL-6 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT는 대조군에 비해 차이가 나타나지 않았으며, SYE는 100 μg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의한 감소가 나타났다(*** ; p<0.001)(Fig. 21).

(5) TNF-α

TNF-α 단백질 발현량을 측정된 결과, CHT는 400 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났으며, SYE는 50 μg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다(* ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001)(Fig. 22).

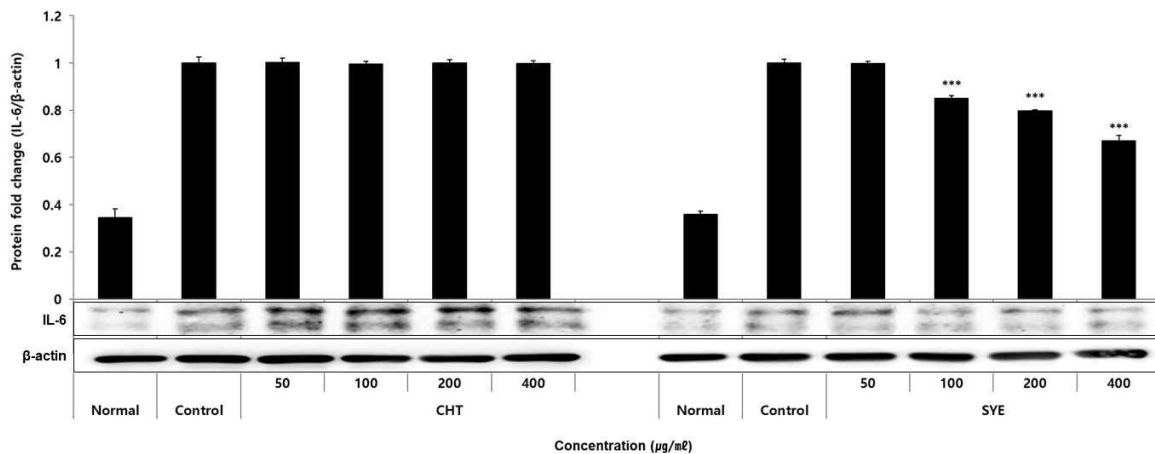


Fig. 21. Effects of CHT and SYE on IL-6 protein expression level in THP-1 cells. PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, and 400 μg/ml of CHT or SYE add 1 μg/ml LPS for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, *** ; p<0.001 compared to control).

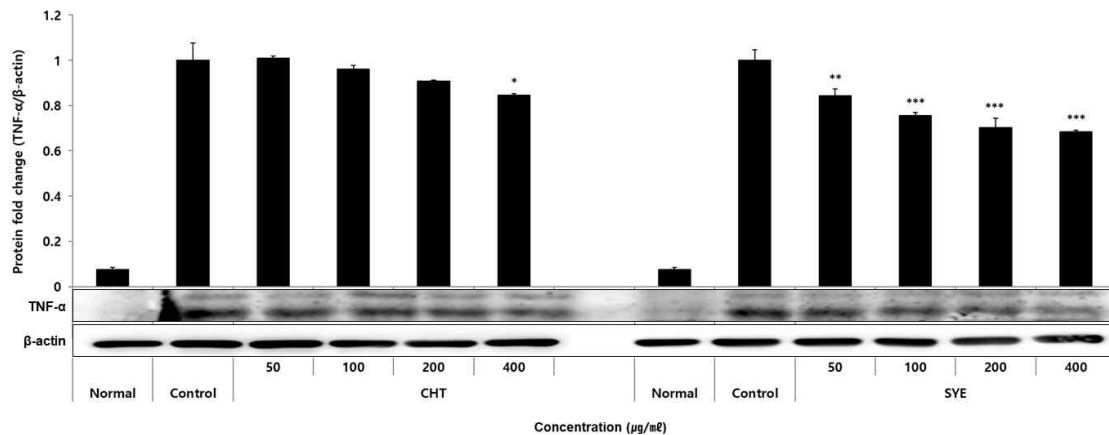


Fig. 22. Effects of CHT and SYE on TNF- α protein expression level in THP-1 cells. PMA-differentiated THP-1 cells were treated by 50, 100, 200, and 400 μ g/ml of CHT or SYE add 1 μ g/ml LPS for 24 h. The protein expression levels were measured using a western blotting. Results were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments (Significance of results, * ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001 compared to control).

IV. 고찰

정상적인 세포 주기를 벗어난 암세포는 성장 억제 기전을 회피하며 세포사멸에 대한 저항을 통해 부적절하고 지속적인 세포 증식을 보인다. 정상 세포와 다른 암세포만의 특성들은 유전인자의 불안정성과 함께 여러 기작의 발현을 가능하게 해주는 염증 환경을 토대로 조성된다. 암세포는 anti-apoptotic protein을 발현시키며 pro-apoptotic protein을 억제하고 변형시켜 apoptosis를 피하고 세포사멸 관련 인자에 대한 내성을 획득한다^{23,24}. 또한 암세포는 주변 환경의 세포들과 염증 물질의 매개로 광범위한 상호작용을 통해 성장과 증식에 유리한 염증성 종양 미세환경(tumor microenvironment)을 유발하고 면역세포가 암세포를 인지하여 제거하는 작용을 억제한다²⁵. 따라서 세포사멸과 관련된 인자의 조절을 통한 암세포내 apoptosis 유발 및 염증반응 조절 대한 연구는 암을 포함한 특정 질환의 치료

제 개발에 중요한 의의를 가질 수 있다.

유방암은 한의학에서의 乳巖과 가장 관련이 깊다고 볼 수 있는데 병인으로는 肝氣鬱滯, 憂怒抑鬱, 思慮傷肝, 憂鬱傷肝 등이 오래되거나 血氣枯藁나 房勞로 인한 正氣不足, 氣血損傷, 衝任失調로 인한 臟腑機能失調, 風寒之氣 및 厚味濕熱之痰이 있다. 증상으로는 乳房腫塊, 不痛, 不痒, 不赤하며 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體倦瘦 月經不調 등이 동반되기도 한다. 疏氣行血의 치법을 기본으로 하되 肝氣鬱結이 원인일 경우는 초기에 疏肝解鬱, 疏氣行血하고 氣血虧損으로 인한 경우 大補氣血을 우선적으로 한다¹⁵.

淸肝解鬱湯은 當歸, 白朮, 貝母, 赤茯苓, 白芍藥, 熟地黃, 梔子, 人蔘, 柴胡, 牡丹皮, 陳皮, 川芎, 甘草로 이루어져 있으며 肝經鬱火로 傷血하여 생긴 乳房硬結 또는 腫潰하여 좀처럼 治癒되지 않는 것을 다스린다¹⁶.

十六味流氣飲은 蘇葉, 人蔘, 黃芪, 當歸, 川芎, 肉桂, 厚朴, 白芷, 防風, 烏藥, 檳榔, 白芍藥, 枳殼, 木香, 甘草, 桔梗으로 구성

되어 鬱怒傷肝, 思慮傷脾, 衝任二經失調 등에 의해 氣滯痰凝 혹은 氣滯血凝이 되어 發病한 乳岩의 氣滯를 流氣 시켜 다스리는 처방이다¹⁶⁾.

《東醫寶鑑·外形篇》에서 “婦人積傷憂怒, 乳房結核, 不痛不痒, 五七年後, 外腫紫黑, 內漸潰爛, 名曰乳巖, 滴盡氣血方死. 急用十六味流氣飲, 及單煮青皮湯. 虛者, 只用淸肝解鬱湯, 淸心靜養, 庶可苟延歲月”이라 하여 結核이 오래돼 생긴 癩巖에 두 처방의 활용을 언급하였고 “男子乳疾, 與婦人微異者. 女損肝胃, 男損肝腎. 蓋怒火房勞過度, 以致肝燥腎虛, 亦能結核, 或令腫痛. 宜十六味流氣飲·淸肝解鬱湯”라 언급하며 남녀 유방질환의 차이와 함께 두 처방을 남성의 유암에도 적용할 수 있음을 기술하고 있다²²⁾.

淸肝解鬱湯에 대한 연구로는 산후우울증과 유선염 합병증 환자에게 적용한 증례 보고가 있고¹⁷⁾ 十六味流氣飲은 갑상선 세포에서 DNA와 cAMP의 합성 및 MHC-class II의 발현 억제¹⁸⁾, T3, T4 억제 작용¹⁹⁾, 면역 활성을 통한 유방 종양 크기 감소 효능²⁰⁾ 등의 연구가 보고되어 있으며 두 처방 모두 유방암 세포의 apoptosis를 통한 증식 억제와 항염증 효능에 관련된 인자와 기전에 대한 실험적 연구는 미비하다.

따라서 본 연구에서는 淸肝解鬱湯 (*Chungganhaewool-tang*, CHT)과 十六味流氣飲 (*Shipyekmiyeugi-eum*, SYE) 추출물의 농도별 처리에 따른 유방암 세포의 apoptosis 관련 인자 및 대식세포로 분화시킨 후 LPS로 염증을 유발한 인간 단핵구 세포를 통한 염증 인자 측정 실험을 통해 그 기전을 알아보고 각 효능을 분석해 보았다.

CHT와 SYE는 농도 의존적으로 MDA-MB-231

세포의 수를 감소시켰다. DNA를 형광 염색하는 DAPI stain도 세포 독성 실험 결과와 유사하게 CHT와 SYE의 농도가 높아질수록 염색된 cell nucleus가 감소함을 가시적으로 확인할 수 있었으며 control 군의 균일하고 온전한 chromatin에 비해 CHT와 SYE 처리군은 cell nucleus morphology의 변화와 함께 높은 light intensity를 보이는 것을 통해 apoptosis가 일어나 nuclear chromatin의 condensation과 fragmentation, 투과성의 변화가 생겼음을 알 수 있었다^{26,27)}.

산화적인 스트레스는 세포사멸을 조절하는데 중추적인 역할을 한다. Reactive oxygen species(ROS)는 적절한 수준에서는 세포 증식에 도움이 되지만 과발생 시 세포의 DNA와 단백질을 손상시키고 apoptosis나 autophagy를 유발한다. 암세포는 세포사멸을 막기 위하여 항산화 기전을 활성화시켜 ROS에 의한 apoptosis를 억제한다. ROS로부터 세포를 보호하는 nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)는 손상된 DNA 복구 작용, 독성 화학물질과 산화 스트레스에 대한 광범위한 저항과 해독 작용을 하는 세포 보호반응 조절 전사인자로 Heme oxygenase-1(HO-1)이나 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1(NQO1)과 같은 항산화 효소를 활성화하여 항염증, 항산화 작용과 미토콘드리아 보호를 통한 apoptosis 억제 기능을 한다. Nrf2 경로 및 세포 보호 작용을 하는 하위 항산화 효소들은 정상 세포에서는 세포의 생존에 도움을 주지만 암세포에서는 암의 진행을 촉진하고 화학치료요법에 대한 내성을 강화시킨다. 따라서 암세포에서 ROS 발생 촉진과 Nrf2 억제는 apoptosis를 유발하므로 암 치료에 응용

할 수 있다²⁸⁻³⁰).

CHT와 SYE는 MDA-MB-231 세포에서 ROS를 농도 의존적으로 증가시켰다. 또한 western blot상 Nrf2와 HO-1의 단백질 발현량을 감소시켰고 NQO1은 control군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다.

Apoptosis에서 중심적인 역할을 하는 Caspase는 aspartate-specific cystein protease로 Caspase-8, 9와 같은 initiator Caspase와 effector Caspase인 Caspase-3, 6, 7의 활성화에 의해 apoptosis를 조절한다. Intrinsic pathway를 통한 apoptosis는 세포 손상, 산화적 스트레스, 각종 독성 물질 등에 의해 세포 내 손상 자극이 발생하면 anti-apoptotic protein인 B-cell lymphoma 2(Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl)에 결합해 있던 BH3 protein이 분리되어 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bax와 같은 pro-apoptotic protein에 결합하여 conformational change가 일어나 미토콘드리아의 외막에 통로를 만들어 Cytochrome C를 세포질 내로 방출시킨다. 방출된 Cytochrome C는 세포질 내에서 adaptor protein인 apoptotic protease activating factor-1(APAF-1)과 결합하게 되고 이 결합체는 다시 Caspase-9와 결합하여 apoptosome을 형성한다. 이 과정에서 활성화된 Caspase-9는 Caspase-3를 활성화하며 Caspase-3는 다른 Caspase를 활성화시켜 단계적으로 apoptosis를 일으키는 기전으로 작용하게 된다³¹⁻⁴).

Western blot 실험 결과 CHT와 SYE 처리군은 control군에 비해 MDA-MB-231 세포에서 Bax와 Cytochrome C의 단백질 발현을 농도 의존적으로 증가시켰고 Bcl-2, Bcl-xl의 단백질 발현을 감소시켰다. Caspase-3, 7, 9의 단백질 발현량은

농도의존적인 감소를 보였으나 active form인 cleaved Caspase-3, 7, 9의 단백질 발현량이 증가하였음을 관찰할 수 있었다. DNA의 손상을 복구하는 기능을 가진 핵 효소인 Poly ADP-ribose polymerase(PARP)는 apoptosis가 일어나면 cleaved Caspase-3에 의해 분절이 일어나 DNA 복구 기능을 상실한다³⁵). PARP는 CHT와 SYE에 의해 단백질 발현량이 농도 의존적으로 감소하였고, cleaved form의 PARP 단백질 양이 농도 의존적으로 증가하였다.

염증은 면역 시스템을 활성화시켜 종양의 성장을 제한하지만 한편 암의 발생과 악성으로 전환, 종양의 성장과 침습, 전이를 촉진한다³⁶). PMA처리를 통해 대식세포로 분화시킨 THP-1 세포에서 CHT와 SYE의 항염증 효능을 알아보기 위해 세포생존율을 측정된 결과 600 µg/ml 이상의 농도에서 세포에 대한 독성을 확인하고 그 이하의 농도에서 실험을 진행하였다.

ROS와 reactive nitrogen species(RNS)와 같은 염증매개체는 산화 스트레스를 일으켜 염증반응 각 단계에 전반적으로 작용하고 DNA 염기 서열을 변하게 하여 tumor suppressor genes를 억제하고 protooncogenes를 촉진해 신생혈관의 형성과 악성 종양을 유도한다³⁷). 실험결과 ROS와 Nitric oxide(NO)는 모두 CHT와 SYE에 의해 농도 의존적으로 생성량이 감소하였다.

Inducible nitric oxide synthase(iNOS)는 많은 양의 NO 생산을 지속적으로 촉진하는 효소이며 Cyclooxygenase-2(COX-2)는 arachidonic acid 대사의 주된 조절인자로 Prostaglandin(PGE)를 생산하고 염증반응을 매개 하는 효소로 두 효소는

혈관 신생 인자를 생성하며 증식과 분화, 침습과 전이, 세포사멸 억제작용을 통해 암의 진행에 관여한다^{38,39}). CHT와 SYE는 PMA처리를 통해 대식세포로 분화시킨 THP-1 세포에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량을 모든 군에서 농도 의존적으로 감소시켰다.

만성 염증 상태에서는 Interleukin-1 beta(IL-1 β), Interleukin-6(IL-6), Tumor necrosis factor-alpha(TNF- α)와 같은 pro-inflammatory cytokines의 분비로 염증성 전사인자가 활성화되고 다양한 염증 매개체를 유도해 iNOS, COX-2와 같은 효소의 발현이 증가한다. 지속적인 만성 염증 환경에서 IL-1, IL-6, TNF- α 는 종양을 유발하는 인자들의 발현을 조절한다. TNF- α 에 지속적으로 노출되면 암 세포의 발현과 증식이 촉진되어 암 발생의 가능성을 높인다. IL-1 β 는 여러 암에서 COX-2, iNOS의 발현을 유도해 암의 성장과 전이에 영향을 준다. IL-6는 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절단백으로 신생혈관 생성과 암의 증식, 진행을 촉진하고 암 억제유전자의 발현을 억제하며 세포 증식과 관련된 유전자를 과잉 발현시켜 암 발생을 유도하는 환경을 조성한다⁴⁰⁻²).

CHT와 SYE는 PMA처리를 통해 대식세포로 분화시킨 THP-1 세포에서 IL-1 β , TNF- α 의 단백질 발현량을 농도 의존적으로 감소시켰으며 IL-6의 경우에는 SYE 처리군에서만 농도 의존적인 감소가 일어났다.

결과를 종합해 보면 CHT와 SYE는 유방암 세포에서 산화적 스트레스를 증가시켜 미토콘드리아를 경유하는 intrinsic pathway를 통해 Cytochrome C를 방출

해 apoptosis를 유도한다고 볼 수 있다. Caspase-3, 7, 9의 경우 활성화된 cleaved form의 단백질 발현량의 증가를 통해 apoptosis가 일어난 것을 확인할 수 있었으나 비활성화 상태의 Caspase의 단백질 발현량은 감소하였다. 비교적 apoptosis 초기에 작용하는 Caspase의 특성을 고려했을 때^{31,33}) apoptosis가 진행된 뒤 Caspase의 발현이 감소되었을 것으로 추측되며 추가적인 time course를 통한 확인이 필요할 것으로 보인다. 또한 Caspase 8과 BID를 포함한 인자들의 추가적 측정을 통해 CHT와 SYE의 extrinsic pathway를 경유하는 apoptosis 유발 여부를 확인해 볼 수 있을 것이다^{31,32}).

PMA처리를 통해 대식세포로 분화시킨 THP-1 세포에서 CHT와 SYE는 염증과 산화 관련 인자들을 감소시켜 염증 억제를 유도하는 것으로 보인다. CHT와 SYE는 염증을 억제하는 약물로 활용할 수 있을 것이며 향후 이를 토대로 tumor microenvironment를 조성해 tumor-associated 대식세포를 통한 종양 내부와 미세환경의 염증 세포와 염증 관련 인자의 측정 실험을 진행해 CHT와 SYE가 종양세포와 염증 환경간의 상호작용에 미치는 영향에 대해 더욱 자세하게 알아볼 수 있을 것이다.

암 치료의 목표는 정상 세포에는 손상을 입히지 않으며 암세포의 사멸을 유도하는 것임을 고려했을 때⁴³) 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포에서는 apoptosis 유발 및 ROS의 증가, PMA처리를 통해 대식세포로 분화시킨 인간 유래 단핵구 세포인 THP-1 세포에서에서는 항염 효과와 더불어 유방암 세포와는 반대로 ROS의 감소가 일어나는 것을 통해 CHT와

SYE는 암세포 사멸에 선택적으로 작용하는 약물로써 기능할 수 있을 것으로 보인다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 향후 淸肝解鬱湯과 十六味流氣飲 및 구성 약재들에 대한 추가적인 세포 실험과 충분한 임상 적용 연구를 통해 두 처방이 유방종양 질환에 다양한 활용이 가능할 것으로 사료된다.

V. 결 론

淸肝解鬱湯(CHT)과 十六味流氣飲(SYE)의 유방암 세포에서의 항암 효능과 항염증 효능을 알아보기 위하여, MDA-MB-231 세포와 THP-1 세포를 통해 관련 인자 측정 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결과를 확인하였다.

1. CHT는 1 mg/ml, SYE는 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 MDA-MB-231 세포의 증식을 유의하게 억제하였고 DAPI stain상 apoptosis를 유발하였음을 확인하였다.
2. CHT와 SYE는 MDA-MB-231 세포에서 ROS를 유의하게 증가시켰고 THP-1 세포에서 ROS를 유의하게 감소시켰다.
3. CHT와 SYE는 MDA-MB-231 세포에서 Bax, Cytochrome C, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-7, cleaved Caspase-9, cleaved PARP의 단백질 발현량을 유의하게 증가시켰으며 Bcl-2, Bcl-xl, Nrf2, HO-1의 단백질 발현량을 유의하게 감소시켰다.
4. MDA-MB-231 세포에서 NQO1의 단백질 발현량은 CHT와 SYE에 의한

유의한 차이를 보이지 않았다.

5. CHT와 SYE는 600 µg/ml 이상의 농도에서 THP-1 세포에 대한 독성이 나타났다.
6. CHT와 SYE는 THP-1 세포에서 NO 생성량과 iNOS, COX-2, IL-1β, TNF-α의 단백질 발현량을 유의하게 감소시켰으며 SYE만이 IL-6를 유의하게 감소시켰다.

□ Received : Apr 08, 2022

□ Revised : Apr 19, 2022

□ Accepted : Aug 26, 2022

References

1. Sung HA, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
2. Korea Central Cancer Registry. National Cancer Center. Annual report of cancer statistics in Korea in 2018. Ministry of Health and Welfare. 2020:22.
3. Park JG, Bang YJ, Ha SW. Oncology. Rev. ed. Seoul:Ilchokak. 2012:596-7, 606-44.
4. Jo HI. A general perspective on breast disease and training system for breast cancer specialists in Europe. Obstet Gynecol Sci. 2010;53(7):565-78.
5. Noh OK, et al. Probabilities of Pulmonary and Cardiac Complications and Radiographic Parameters in Breast Cancer Radiotherapy. Radiat Oncol J. 2010;28(1):23-31.

6. Smoot B, Wampler M, Topp KS. Breast Cancer Treatments and Complications: Implications for Rehabilitation. *Phys Ther J Policy Adm Leadersh.* 2009;27(3):16-26.
7. Kayl AE, Meyers CA. Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. *Curr Opin Gynecol Obstet.* 2006;18(1):24-8.
8. Dodd MJ, Miaskowski C, Paul SM. Symptom clusters and their effect on the functional status of patients with cancer. *Oncol Nurs Forum.* 2001;28(3):465-70.
9. Lee TB, Jub JH. Can Hinokitiol Kill Cancer Cells? Alternative Therapeutic Anticancer Agent via Autophagy and Apoptosis. *Korean J Clin Lab Sci.* 2019;51(2):221-34.
10. Oh HN, et al. Anticancer Effect of Paedoksans for Oral Squamous Cell Carcinoma and Malignant Pleural Mesothelioma. *Saengyak Hakhoe Chi.* 2017;48(3):213-8.
11. Cho SS, et al. Anticancer Activity and Chemical Composition of a Non-Polar Fraction from *Asiasari Radix et Rhizoma*. *Saengyak Hakhoe Chi.* 2020;51(4):264-9.
12. Nam KY, et al. Recent Progress in Research on Anticancer Activities of Ginsenoside-Rg3. *Saengyak Hakhoe Chi.* 2014;45(1):1-10.
13. Song JY, et al. Screening of Antineoplastic Immunomodulator from Herbal Medicines. *Yakhak Hoeji.* 1998;42(2):132-9.
14. Han DS, et al. Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal Plants (Part 10). The Growth-inhibitory Effect of *Taraxaci Herba* Extract Against Human Skin Melanoma Cells. *J. Toxicol. Pub. Health.* 1998;14(4):489-94.
15. The Society of Korean Medicine Obstetrics & Gynecology. *Korean Medicine Obstetrics and Gynecology (Vol 2).* 4th rev. ed. Seoul:Euiseongdang. 2021:459, 466-7.
16. Shin JY. (申載鏞). *Bangyakhappyeonhaesol (方藥合編解說).* Seoul:Shingwang-munhwasa. 1993:178-9.
17. Seo BI, Kim MJ. A clinical study on a patient with postpartum depression and acute mastitis. *Kor. J. Herbology.* 2003;18(1):145-8.
18. Yi JE, Kim BW. Effects of *Sipyukmiyuki-eum* on DNA Synthesis, cAMP Synthesis and MHC-class II Expression of FRTL-5 Thyroid Cells. *Korean J. Orient. Int. Med.* 2005;26(2):398-408.
19. Jeoung YH, Chae BY. Studies on Effects of *Sipyukmiyuki-eum* on the Hyperthyroidism. *The Journal of K.O.M.S.* 1988;9(2):98-108.
20. Jung YC, Park YS, Kim DC. *Shipyekmiyeugi-eum* Extracts Suppressed Tumor Growth through Immunomodulatory Effects on MCF-7. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology.* 2012; 25(3):40-60.
21. Allavena P, et al. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18(1):3-10.
22. Heo J(許浚). *Donguibogam(東醫寶鑑).*

- Seoul: Bubin-munhwasa. 2012:764-6.
23. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):485-95.
 24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: the Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
 25. Greten FR, Grivnickov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41.
 26. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech Histochem*. 1995;70(5):220-33.
 27. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*. 2008;44(3):200-4.
 28. Perillo B, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*. 2020;52(2):192-203.
 29. Loboda A, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(17):3221-47.
 30. Wong PK, et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1235-43.
 31. Hassan M, et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-23.
 32. Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest*. 2002;109(4):437-78.
 33. Renault TT, Dejean LM, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2. *Mech Ageing Dev*. 2017;161:201-10.
 34. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001;92(1):57-70.
 35. Boulares AH, et al. Role of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(33):22932-40.
 36. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2011;2:1-17.
 37. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Role in Inflammatory Disease and Progression to Cancer. *Biochem. J*. 1996;313:17-29.
 38. Shrihari TG. Inflammation Related Cancer - Highlights. *J Carcinog Mutagen*. 2016;7(3):2157-8.
 39. Chiarugi V, Magnelli L, Gallo O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med*. 1998;2(6):715-24.
 40. Sethi G, Sung BK, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*. 2008;13(13):5094-201.
 41. Guo YQ, et al. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(7):904-10.
 42. Laird BJ, et al. The Emerging Role of Interleukin 1 β (IL-1 β) in Cancer Cachexia. *Inflammation*. 2021;44(4):1223-8.
 43. Vaux DL, Gerl R. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):263-333.