

Resveratrol에 의한 자궁근종세포의 성장억제 효과

계명대학교 의과대학 동산의료원 산부인과학교실

강보영·조치흠·김숙현·신소진·권상훈·박준철·이정호·김종인·차순도·윤성도

Growth Inhibitory Effect of Resveratrol on Uterine Leiomyoma Cells

Bo Young Kang, M.D., Chi Heum Cho, M.D., Sook Hyun Kim, M.D., So Jin Shin, M.D., Sang Hoon Kwon, M.D.,
Joon Cheol Park, M.D., Jeong Ho Rhee, M.D., Jong In Kim, M.D., Soon Do Cha, M.D., Sung Do Yoon, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keimyung university, Daegu, Korea

Objective: To examine the effect of resveratrol on cell proliferation and cell cycle progression in the human uterine leiomyoma cells.

Methods: MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] reduction assay was carried out to determine the viability of human uterine leiomyoma cells. Western blot analysis was done using anti pRB, anti- p21cip1/waf1, anti- p53, anti- cyclin E, anti CDK2 antibodies to detect the presence and expression of these proteins in treatment with resveratrol. DNA fragmentation assay was done to find the rate of apoptosis. Cell cycle analysis for resveratrol treated in human uterine leiomyoma cells was done by FACS (fluorescence-activated cell sorter) analysis.

Results: Resveratrol induced growth inhibition in a dose dependent manner, treatment with 100 μ M/L resveratrol blocked 30% cell growth. From Western blot analysis it revealed resveratrol induced the expression of p53 increasing. Caspase pathway was activated and cleavage of PARP was occurred. Apoptosis took place but in a reduced manner. FACS results showed that resveratrol increased the percentage of cells in sub G1 phase.

Conclusion: Resveratrol, a dietary phytoalexin, inhibited cell proliferation and induced cell cycle arrest at sub G1 by enhancing the production of p53. These results indicate that resveratrol will be a promising agent chemopreventives or therapeutics against human uterine leiomyoma cells.

Key Words: Uterine leiomyoma cells, Resveratrol, Apoptosis

서 론

자궁근종은 여성 생식기에서 발생하는 가장 흔한 양성 질환으로서 일반적으로 근종 (myoma) 또는 평활근종 (leiomyoma)이라 불리고 있다. 이 양성 종양은 가임

연령 여성의 20%에서 존재하고, 40세 이상의 여성에서는 40-50%가 발견된다.^{1,2} 자궁근종의 원인은 현재까지 그 원인이 정확하게 알려져 있지 않으나, 자궁 평활근내에 있는 하나의 신생세포 (neoplastic cell)에서부터 기인한다고 알려져 있다.³ 이외에 가족적 경향도 있고, 임신 중에는 크기가 커지고 폐경 후에는 크기가 줄어드는 형태를 보이므로 여성호르몬의 영향을 받는 것으로 알려져 있으나 이것이 주된 원인이라 말할 수는 없다. 우리나라에서 시행되는 전자궁적출술의 45%는 자궁근종을 적응증으로 시술되고 있다.⁴ 미국에서는 연간

접수일 : 2006. 3. 11.
교신저자 : 윤성도
E-mail: ysd7505@dsmc.or.kr

* 이 연구는 계명대학교 동산의료원 산부인과 동산회 기금으로 이루어 졌음.

150,000-175,000명의 환자가 자궁근종 때문에 자궁적출술을 시행하고 있다.⁵ 그러나 수술에 따른 합병증이나 마취에 따른 합병증 또한 간과할 수 없는 사실이다. 그러나 가임기 여성에서는 임신과 관련하여 자궁절제술보다는 약물 치료나 보존적 치료를 원하고 있다.⁶ 그러므로 자궁근종의 원인을 밝히고 이 원인을 근본적으로 치유하여 모든 여성에서 전자궁절제술이라는 수술적 치료보다는 약제 개발을 통한 비수술적 치료의 접근이 이루어진다면 획기적인 치료법이 될 것이다. 지금까지 사용하는 약물 치료로서 여성호르몬 생성을 일시적으로 감소시키는 GnRH (Gonadotropin releasing hormone) 효능제 투여가 시행되고 있으나, 근종의 크기를 일시적으로 줄이는 데는 성공했지만 약제 투여 중단 후에는 근종이 다시 커지므로 완전한 치료는 되지 못하고 있다.⁷ 이에 연구자는 포도껍질에서 나온 자연추출물로 암화과정의 진행을 방지하며, 또한 chemopreventive 약제로 알려져 있는 resveratrol을 일차배양한 자궁근종세포에 투여한 후 미치는 영향을 분석하여 상관관계를 알아보고자 이 연구를 계획하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본원에서 자궁근종으로 수술 받은 10예의 환자에서 수술시 신선한 자궁근종과 자궁 근 조직을 채취하여 자궁근종과 정상 자궁근 세포를 1차 조직배양 하였으며, 여분의 조직은 잔여 실험을 위해 -78℃에서 냉동 보관하였다. 조직의 채취는 환자의 동의와 윤리 위원회에 통과한 지침서에 준해서 시행하였다.

2. 방법

1) 일차 세포 배양

정상 자궁 평활근 조직과 자궁근종 조직을 수술 후 얻어 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS) 상에서 잘게 절단한 후 15 mL 튜브에

옮겨 1000 rpm에서 3분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거하였다. 절단한 조직에 HEPES (25 mmol/L), penicillin (200 U/mL), streptomycin (200 µg/mL), collagenase type IV (1.5 mg/mL), DNase (0.2 mg/mL)를 HBSS에 넣고 37℃ 수조에서 3-4시간 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일 세포로 분리한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate buffer solution (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24-48 시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 양성 및 음성 결과에 따라 근육 세포인지를 확인하였다.

2) MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] 분석

자궁근종 세포와 정상 자궁 근 세포에 resveratrol을 투여하여 세포 생존에 미치는 영향을 보기 위해, 96 well plate에 정상 자궁 근과 자궁 근종세포를 multi pipet을 사용하여 4×10³/well로 분주하였다. 배양기에 24시간 배양 후 resveratrol을 농도별로 처리 한 후 MTS 측정 시, One Solution Reagent를 실온에 90분 또는 37℃에 10분간 방치하였다. 각 well 당 들어있는 media 200 µL multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 suspension된 후 well 당 100 µL 되도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 µL 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에 배양한 후 1-4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였다. 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Western blot analysis

자궁근종 세포에서 resveratrol 투여 후 세포 주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분

쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mmol/L Tris-Cl [pH 7.4], 5 mmol/L EDTA [pH 8.0], 130 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 mol/L phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계 (Du[®] 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 Nitrocellulose paper (Immobilon, Milipore Co., USA)로 전기이동 (electrotransfer)를 시행하였다. 전기 이동된 막을 blocking용액에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. 세포 주기회로에 관여하는 단백질의 발현 정도를 보기 위해 일차항체인 p27, p53, p21, cyclin E, cyclin D1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)과 세포자멸사에 관여하는 단백질 일차 항체인 pRB, pro-caspase3, PARP (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 1 : 1,000으로 희석하여 실온에 3시간 동안 반응시킨 후 1×TBS-T 용액(20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruze Biotechnology Inc., USA)를 1: 1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응 시켜 항체를 결합시킨다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

4) DNA fragmentation analysis

세포자멸사를 확인하기 위해 자궁근종 세포에 resveratrol을 농도별로 처리한 후 10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 0.5% Triton X-100이 든 완충액을 얼음에 30분간 용해시켰다. 용해된 용해질을 충분히 혼합 한 후 10,000 rpm으로 20분

간 원심분리 하였다. 상층액에 분절된 DNA를 동일한 양의 neutral phenol: chloroform: isoamyl alcohol mixture (25: 24: 1)로 추출한 뒤, 0.1 µg/mL ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

5) FACS (fluorescence-activated cell sorter)에 의한 세포주기 분석

자궁근종 세포를 60 mm tissue culture dish에 3×10^5 cells/dish로 cell seeding 하였다. 배양기에 24시간 배양 후 resveratrol을 용량별로 투여하였다. 24-48시간 배양시킨 세포를 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 재부유 시킨 뒤, 1.5 mL tube에 옮겼다. 1000 rpm 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1 mL 넣고 재부유시킨 후, 4°C에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 PBS 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma Chemical Co., USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma Chemical Co., USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/mL, propidium iodide (Sigma Chemical Co., USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색하였다. 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

결 과

1. Resveratrol의 자궁근종세포에 대한 24시간 농도별 세포생존율

일차 배양된 자궁근종세포에 resveratrol을 농도별로 처리한 결과 24시간 후 100 µM의 농도에서 30%의 증식 억제 효과를 보였으며 5 µM의 농도에서는 일시적으로 세포 증식이 보였으나 20 µM 이후에는 농도가 증가할 수록 증식억제 효과가 증가하였다 (Fig. 1A). 정상자궁근 세포에서는 100 µM의 농도에서도 5% 이하의 증식

억제가 있었으나, 자궁근종 세포와 비교해서는 생존세포가 많이 관찰되었다 (Fig. 1B).

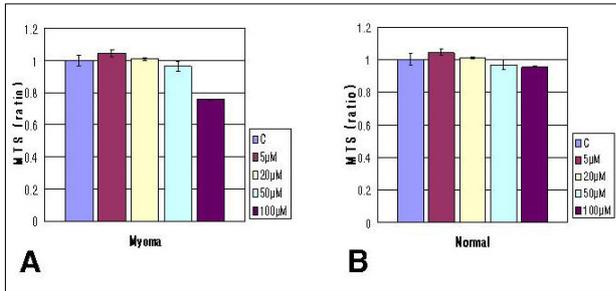


Fig. 1. Growth inhibition in uterine leiomyoma (A) and normal myometrial (B) cells treated for 24 hrs with various concentrations of resveratrol. Cell viability was measured using Cell Titer cell Proliferation Assay and expressed as% of control culture conditions.

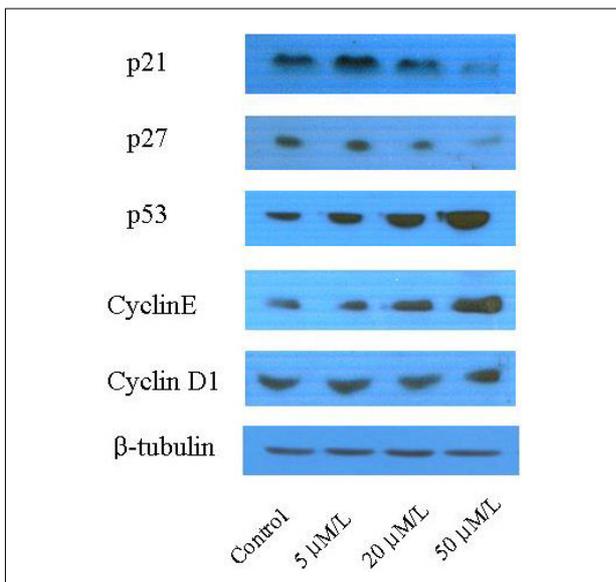


Fig. 2. Effect of resveratrol on cell cycle related genes. β-tubulin was shown as an internal control.

2. Resveratrol의 p27, p53, p21 및 cyclin E, cyclin D1 유전자에 대한 효과

자궁근종세포에 resveratrol을 5, 20, 50 μM의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기에 관계하는 유전자 발

현을 관찰한 결과, p53 유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으나 p27, p21 단백질의 발현은 농도에 비례하여 감소하였으며, cyclin E의 발현증가가 있었으나, cyclin D1의 발현 변화는 없었다 (Fig. 2).

3. Resveratrol의 pro-caspase 3와 PARP 유전자에 대한 효과

자궁근종세포에 resveratrol을 5, 20, 50 μM의 농도로 처리하고 24시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3, PARP, 및 pRB 유전자의 발현을 측정된 결과, resveratrol의 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소가 관찰되었으며, PARP는 농도가 증가할수록 발현이 감소하며 PARP cleavage는 농도가 증가할수록 발현이 증가됨을 관찰하였고, pRB의 탈인산화가 일어나는 것을 확인하였다 (Fig. 3A).

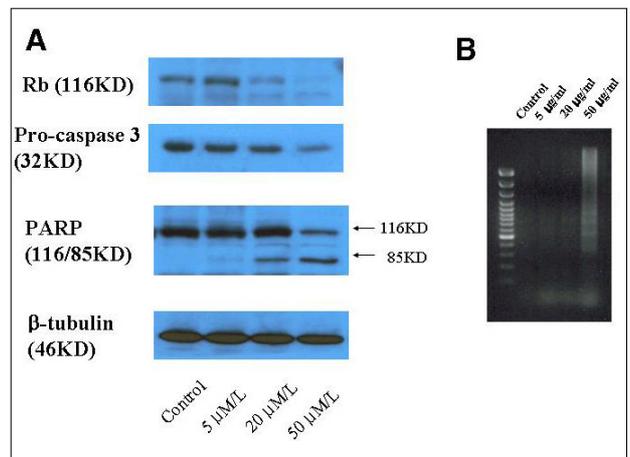


Fig. 3. Effect of resveratrol on caspase activation and PARP cleavage (A) and DNA fragmentation (B). β-tubulin was shown as an internal control.

4. Resveratrol의 세포자멸사 유도 효과

자궁근종세포에 resveratrol을 5, 20, 50 μM/L의 농도로 처리하고 24시간 후 DNA fragmentation을 분석한 결과, 대조군에 비하여 resveratrol의 농도가 증가할

수록 DNA의 분절현상이 증가함을 관찰하였다 (Fig. 3B).

5. Resveratrol이 cell cycle에 미치는 효과

자궁근종세포에 resveratrol을 5, 20, 50 $\mu\text{M/L}$ 의 농도로 처리하고 24시간 후 세포주기를 분석한 결과, 대조군과 비교하여 resveratrol의 농도가 증가할수록 sub G1 주기의 지연 증가가 확인되어 세포자멸사의 양적 증거를 확인하였다 (Fig. 4).

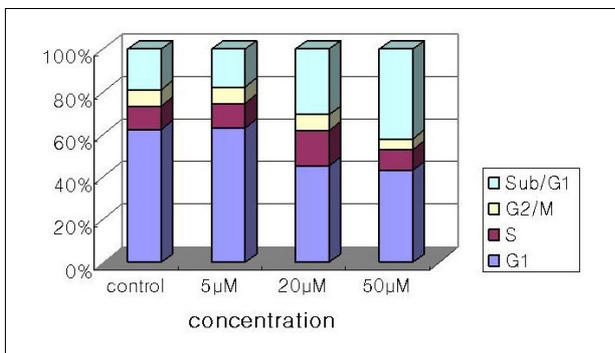


Fig. 4. Effect of a resveratrol on cell cycle profile. After treatment with 5, 20, 50 $\mu\text{M/L}$ resveratrol or DMSO only treatment for 0 or 24 hrs, uterine leiomyoma cells were collected, fixed, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

고 찰

자궁근종은 여성 생식기에서 발생한 가장 흔한 양성 종양 중의 하나이지만, 지금까지 이용된 치료는 수술적 방법이 주로 이용되어 왔다. 그 외에 혈관 색전술 등 비수술적, 비침습적 방법이 모색되어 왔으며 약물 치료로서 사용되는 GnRH 효능제는 단기간의 효과를 얻는데 그칠 뿐 아니라, 약제투여 중단 시 재발하게 되는 단점이 있으며, 장기간 사용 시 폐경을 유도하여 6개월 이상 사용은 불가능하다.⁸ 그러므로 장기간 사용하거나 부작용 없이 사용할 수 있는 약제의 개발이 절실하다. 현재 외국에서는 다양한 각도에서 자궁근종의 약물 치료를

개발하고 있으나 아직까지는 우수한 치료법이 없다. 자궁근종이 호르몬과 관계한다고 생각하여 progesterone receptor blocker인 RU-486을 세포주 수준에서 검사하여 효과가 있다는 보고가 있으나⁹ 이것도 장기간의 효과에 대해서는 검증되지 않았다. 음식을 포함한 생활 습관과 자궁근종의 발생과는 밀접한 관계를 보이고 있는 것으로 나타나고 있다. 운동선수를 대상으로 시행한 조사에서는 자궁근종의 유병율이 감소한다고 보고하였으며,¹⁰ 근종의 크기가 10 cm 이상으로 수술로 확인된 연구에서, 붉은 고기 (red meat)와 햄을 주로 섭취한 군에서는 2배 이상의 증가 요인이 있었으며, 반대로 채식을 주로 취한 군에서는 약 50%의 발생 감소를 보고하였다.¹¹ 최근의 보고에서는 흡연과 카페인의 섭취와 위험인자와의 상관관계는 없으며, 주로 맥주를 많이 섭취하는 군에서 위험도가 증가하는 것으로 보고하였다.¹² 이러한 것과 관계하여 최근에 많이 연구되고 있는 chemopreventive 약제인 resveratrol의 자궁근종 예방이나 치료에 효과적이지를 본 연구에서는 알아보고자 하였다.

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene)은 포도 껍질, 붉은 포도주, 땅콩 등에 많으며, 암화 과정의 진행을 방지하는 역할과 암 세포에 작용하여 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁶ 또한 동물 실험에서도 항암 효과의 입증은 보여 주었다.¹⁷

먼저 resveratrol에 의한 자궁근종세포의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 배양된 자궁근종세포에 투여하여 농도가 높아질수록 증식억제 효과가 증가되는 것이 관찰되었으며, 정상자궁근 세포에서는 자궁근종과 비교하여 증식 억제 작용이 미약하여 정상에서는 많은 독성을 가지지 않은 것을 확인하였다. 또한 resveratrol은 우리가 일상으로 섭취하는 음식물에 존재하는 것으로 정상 세포에서는 독성이 약하다는 것이 보편적으로 알려져 있어, 이후의 실험은 주로 자궁근종 세포에서만 시행하였다. 세포생존을 분석을 통해 resveratrol이 자궁근종 세포의 성장 억제에 관여한다는 것을 알았다. 일반적으로 세포 성장 억제의 기전을 보기 위해 세포주기 분석을 시행하며, 이에 따른 세포주기 관련 단백질의 발현과

세포자멸사의 여부를 분석하므로, 본 실험에서는 유세포 분석기를 통해 세포주기에 따른 분석을 시행하여 세포자멸사를 의미하는 sub G1기의 연장을 확인하였으며, 암 억제 유전자인 p53과 Rb 활성화와 세포자멸사를 DNA 분절을 통해 확인하였다. 세포의 성장 및 분화의 조절은 세포가 정상적으로 자라는데 필수적이며 이 과정이 어떤 원인에 의하여 손상되면 정상세포는 비정상적인 세포주기를 거치게 된다. 이에 근거하여 resveratrol이 세포주기의 각 단계에 관계할 것이라는 가정 하에 세포주기에 관여하는 단백질의 발현을 살펴본 결과 p53의 과 발현은 농도 의존성으로 관찰되었으나, p21과 p27의 발현은 오히려 감소되는 것을 보였다. 일반적으로 p53의 downstream에 영향을 받는 p21과 p27의 발현증가가 예측되었으나¹⁸ 이와는 다르게 발현의 감소를 보였으며, 하부에 영향을 받는 cyclin E의 증가 소견을 보였으나 cyclin D1의 변화는 보이지 않은 것으로 보아 향후 이 변화에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 그러나 전립선암에서는 p53에 비의존성으로 p21 단백질의 발현도 보고하고 있어 세포의 종류마다 다른 양상을 보인 것을 알 수 있었다.¹⁹

Resveratrol 투여로 세포자멸사에 이르는 경로를 알아보기 위해 세포자멸사 관련 단백질의 발현을 조사한 결과, caspase 3의 활성이 일어나고 PARP의 분절이 일어나는 것을 확인하여 caspase 경로를 통해 세포자멸사가 일어나는 것을 확인하였고, 암 억제 유전자 중의 하나인 pRb의 탈 인산화가 일어나므로 Rb의 활성이 관찰되므로 이런 경로를 통해 세포성장 억제에 관여함을 유추해 볼 수 있었다. Caspase들은 항상 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질을 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase 중 caspase 3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 caspase 3는 세포내의 여러 종류의 기질 단백을 절단한다.²⁰ Caspase에 의하여 선택적으로 절단되는 다양한 죽음기질이 알려져 있으며 그 중 PARP단백질은 DNA 회복과정에 관계되는 핵 내에 존재하는 효소 중의 하나인데 이는 활성화된 caspase 3에 의하여 DNA 결합 부위로부터 절단되며 이러한

PARP의 특이적인 단백 분해 효소의 절단은 세포자멸사의 생화학적인 특징으로 간주된다. 그러므로 resveratrol에 의한 세포자멸사가 일어나는 통로는 caspase 3를 활성화시키는 것을 알 수 있었다. 세포자멸사의 증거를 보기 위해 DNA fragmentation을 분석한 결과, 대조군에 비하여 resveratrol의 농도가 증가할수록 DNA의 분절 현상이 증가함을 관찰하여 resveratrol에 의한 증식억제 효과가 세포자멸사에 의한 것임을 확인하였다. 또한 resveratrol이 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁근종 세포에 resveratrol을 투여 후 유세포 분석기를 이용하여 세포주기를 분석하여 대조군보다 resveratrol 투여 군에서 sub G1기의 지연이 증가되는 것을 확인하여 세포자멸사의 양적증거를 확인하였다. 이러한 결과는 resveratrol이 자궁근종 세포의 증식억제 효과가 있으며 이는 세포자멸사에 이르게 하고, 세포주기 상에서 sub G1 phase 지연을 일으켜서 일어나며 여기에는 p53, pRb 등의 암 억제 유전자가 관계되어 있음을 확인하였다.

이상으로 resveratrol이 세포주기와 세포자멸사와 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 자궁근종세포의 증식억제에 관여하는 것을 증명하였으며, 향후 자궁근종의 치료나 예방에 있어서 효과적인 대체 치료 약물의 가능성이 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Zaloudek CJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. In: Kurman RJ, editor. Blaustein's pathology of the female genital tract. 4th ed. New York: Springer-verlag; 1994. p.484-94.
2. Hendrickson MR, Kempson RL. Pure mesenchymal neoplasms of the uterine corpus. In: Fox H and Ellis M, editors. Obstetrical and gynecological pathology. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995. p.542-73.
3. Townsend DE, Sparkes RS, Baluda MC, McClelland G. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Obstet gynecol 1970; 107: 1169-73.
4. 신영우, 변영진, 나영호, 김창학, 권순욱. 복식 전자공적출술에 관한 임상 통계적 고찰. 대한산부회지 1985; 28: 90.
5. Gambone JC, Reiter RC, Lench JB, Moore JG. The impact of a quality assurance process on the frequency and confirmation rate of hysterectomy. Am J Obstet Gynecol 1990; 63: 545-50.

6. Buttram VC, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril* 1981; 36: 433-45.
7. West CP, Lumsden MA, Lawson S, Williamson J, Baird DT. Shrinkage of uterine fibroids during therapy with goserelin (Zoladex): A luteinizing hormone-releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. *Fertil Steril* 1987; 48: 45-51.
8. Stewart EA, Friedman AJ. Steroidal treatment of myomas: preoperative and long term medical therapy. *Semin Reprod Endocrinol* 1992; 10: 344-57.
9. Murphy AA, Morales AJ, Kettel LM, Yen SS. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestone RU486: dose-response effect. *Fertil Steril* 1995; 64: 187-90.
10. Wyshak G, Frisch RE, Albright TE, Albright NL, Schiff I. Lower prevalence of benign diseases of the breast and benign tumors of the reproductive system among former college athletes compared to nonathletes. *Br J Cancer* 1986; 54: 841-5.
11. Chiaffarino F, Parazzini F, La Vecchia C, Chatenoud L, Di Cintio E, Marciso S. Diet and uterine myomas. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 395-8.
12. Parazzini F, Negri E, La Vecchia C, Rabaiotti M, Luchini L, Villa A, et al. Uterine myomas and smoking. Results from an Italian study. *J Reprod Med* 1996; 41: 316-20.
13. Jang M, Cai L, Udeani Go, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-20.
14. Mgbonyebi O, Russo J, Russo IH. Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *Intern J Oncol* 1998; 12: 865-9.
15. Gautam SC, Xu YX, Dumaguin M, Janakiraman N, Chapman RA. Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: A prospective agent for ex vivo bone marrow purging. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 639-45.
16. Wolter F, Akoglu B, Clausnitzer A, Stein J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr* 2001; 131: 2197-203.
17. Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res* 2002; 62: 4945-54.
18. Xiangming C, Hokita A, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, et al. P21 expression is a prognostic factor in patients with p53-negative gastric cancer. *Cancer Lett* 2000; 148: 181-8.
19. Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER, Reddy GP. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res* 2002; 62: 2488-92.
20. Kamesaki H. Mechanism involved in chemotherapy induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 1998; 68: 29-43.

= 국문초록 =

목적: 자궁근종세포에 resveratrol을 투여한 후 세포에 미치는 영향을 분석하여 치료에 유용한지를 알아보고자 하였다.

연구 방법: 자궁근종으로 수술 받은 10명의 환자에서 자궁근종과 정상 자궁근 세포를 배양하였다. Resveratrol의 자궁근종 세포에 대한 세포생존율을 알아보기 위해 MTS 분석을 이용하였고, 세포 주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보기 위해 Western blot analysis를 시행하였다. 세포주기분석은 FACS를 이용하였다.

결과: 일차 배양된 자궁근종세포에 resveratrol을 농도별로 처리한 결과 24시간 후 100 µM/L의 농도에서 30%의 증식억제 효과를 보였으며 농도가 증가할수록 증식억제 효과가 증가하였다. p53 단백질은 농도가 증가할수록 발현이 증가하였고, resveratrol의 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소와 PARP cleavage가 증가됨을 관찰하였고, pRB의 탈 인산화가 일어나는 것을 확인하였다. Resveratrol의 농도가 증가할수록 DNA 분절의 증가와, sub G1 주기의 지연 증가가 확인되어 세포자멸사의 양적 증거를 확인하였다.

결론: 이상으로 resveratrol이 자궁근종세포의 증식억제에 효과가 있으며, 이는 세포자멸사에 이르게 하고 세포주기와 세포자멸사에 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 향후 자궁근종의 치료나 예방에 있어서 효과적인 대체 치료 약물의 가능성이 있다고 사료된다.

중심단어: 자궁근종세포, Resveratrol, 세포자멸사
