

八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용처리시 나타나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 關한 작용기전 研究

이병구, 문 구, 문석재, 원진희, 조정연, 박상구, 송봉길, 박래길*

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실, 원광대학교 의과대학 미생물학교실*

Study on Synergistic Anti-tumor Effect of Combination with Adriamycin and *Palginhonhapwhajucwhan*

Byung-Gu Lee, Gu Moon, Seok-Jae Moon, Jin-Hee Won, Jung-Yun Cho
Sang-Gu Park, Bong-Gil Song, Rae-Gil Park*

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Hospital, Won-kwang Univ.
Dept. of Microbiology, College of Oriental Medicine Hospital, Won-kwang Univ.

Objective : This study was designed to evaluate the synergistic effect on cytotoxicity of combination with adriamycin and *Palginhonhapwhajucwhan*, a traditional prescription for cancer treatment in oriental medicine, in Chang, HL-60, Hep-3B and Alexander cells.

Methods : We observed cell viability in Chang, HL-60, Hep-3B, and Alexander cells by crystal violet staining. Those cells were treated with various concentrations of adriamycin alone, *Palginhonhapwhajucwhan* alone and combination of two medications for 10 hr. On condition of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin alone, 15.6 $\mu\text{g/ml}$ *Paljintanghapwhajucwhan* alone and combination of two medications, at first, we observed colony forming of Chang and HL-60 cells. Second, we observed DNA fragmentation by agarose electrophoresis in Chang, HL-60, Hep-3B and Alexander cells. Third, we measured the catalytic activation of caspase-1, 2, 3, 6, 8, and 9 protease in Chang cells and caspase-3 protease in Chang, HL-60, Hep-3B and Alexander cells by using fluorogenic substrate. Finally, we isolated mRNA of Fas in Chang, HL-60, Hep-3B and Alexander cells and observed that Fas gene was amplified by RT-PCR

Results : 1. The combination of adriamycin and *Palginhonhapwhajucwhan* synergistically augmented the cytotoxicity of Chang and HL-60 cells whereas did not in Hep-3B and Alexander cells.

2. Cotreatment of two drugs also markedly inhibited the colony forming ability both in Chang and HL-60 cells.

3. The cytotoxicity of these medicatons was revealed as apoptosis characterized by high molecular wight DNA fragmentaton.

4. The apoptotic cytotoxicity was mediated by activation of caspase-3 protease in Chang cells.

5. Synergistic increase in apoptotic cytotoxicity by combination of two medications was dependent on the expression of Fas in cancer cells.

Conclusions : Combination of adriamycin and *Palginhonhapwhajucwhan* significantly augmented apoptotic cytotoxicity of Fas-positive cells such as Chang and HL-60 cells via actication of apoptosis signaling pathway.

Key Word : adriamycin, *Palginhonhapwhajucwhan*, apoptotic cytotoxicity, Fas

I. 緒 論

癌이란 人體內 조직의 자율적인 과잉 성장이며 이것은 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 대해서 파괴적인 것으로 아직도 그 發生原因과 기전이 명확히 밝혀져 있지

않고 있다¹⁾.

韓醫學에서 癌에 대한 기록은 殷墟의 胛骨文에서 '瘤'라하여 처음 나타나며, 癌이라는 용어는 宋代 《衛劑寶書》에서 최초로 기록하고 있는데, 積聚, 癥瘕, 疝癰, 癭瘤, 石癰, 石疽 등을 현재의 癌의 범주에 포함시킬 수 있다²⁾.

癌의 治療방법을 보면, 한의학에서는 正氣補陽을 爲主로 하면서 清熱解鬱法, 軟堅散結法 및 活血化瘀法 등을 널리 사용하고 있고³⁾, 西醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法와 遺傳子療法 등을 사용하고 있다⁴⁾. 그러나 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法와 遺傳子療法 등이 癌腫에 따른 感受性的 차이, 치료 후 부작용이

따르는 등 많은 問題點을 안고 있어 副作用이 輕微하고 抗腫瘍 效果가 우수한 새로운 天然產物의 개발에 관심을 갖고 있는 실정이다³⁾.

八珍湯合化積丸은 補氣利氣, 活血祛瘀, 軟堅消腫 등의 效能에 따라 腫塊日益增大堅硬, 按之痛甚, 痛有定處, 面色晦暗, 肌膚甲錯, 全身乾黃消瘦 등을 치료하는 처방으로 癌治療 원칙중 攻補兼施에 부합되도록 立方된 癌治療劑이다³⁾.

항암치료제 Adriamycin은 doxorubicin으로 잘 알려져 있는 intercalating agents로 항암작용을 발휘한다⁶⁾. Adriamycin은 급성백혈병, 악성림프종 그리고 다양한 종류의 고형암(solid tumors)의 치료에 이용되고 있다. Ant-racycline계열 항암제인 Adriamycin의 항암작용은 기본적으로 두가지 기전에 의존한다고 알려져 있다. 첫째는 Adriamycin에 의하여 산소자유기(oxygen free radicals)가 생성되어 이것이 세포독성의 원인이 된다⁷⁾. 또 다른 기전은 Adriamycin이 DNA에 intercalation으로 결합해서 암세포의 증식에 필요한 새로운 DNA 합성을 방해한다는 것이다. 그러나 수많은 항암 화학요법 치료제와 마찬가지로 Adriamycin의 정상세포나 조직에 대한 독성이 암환자의 치료시에 문제점으로 부각되어 있는데, 특히 심근세포에 대한 급성 및 만성 독성이 주요한 부작용으로 알려져 있다⁸⁾.

최근에 화학요법제, 호르몬 및 여러 종류의 biologicals 등의 항암 치료제제의 암세포독성의 기전이 세포고사(Apoptosis)라고 제시되고 있다⁹⁾. 세포고사 신호전달계는 "Death domain (DD)" 이라는 세포막 수용체인 Fas (CD95 혹은 Ap-1)과 TNF receptor family에 의하여 매개되는 신호는 세포

내 여러 신호전달분자와 기능적 및 물리적으로 상호 연결되어 있다. Death domain을 가진 수용체는 cysteine 아미노산 부분만을 절단하는 caspase family cysteine protease에 기능적으로 연결되어 세포고사 과정에 대단히 중요한 소기관으로써 ATP생성, Cytochrome C release 및 미토콘드리아막에 부착된 Bcl2 family 단백질의 역할이 세포의 운명을 결정한다¹⁰⁾.

세포고사 신호전달계의 또 다른 특징의 하나는 세포가 어떤 위협적인 스트레스 조건에 놓이면, 특별한 종류의 단백질의 기능변화 혹은 유전자 발현을 통하여 세포의 생사를 결정한다는 것이다. C-jun N-terminal kinase(JNK) 혹은 Stress-activated protein kinase (SAP kinase)라 알려진 Mitogen-activated protein kinase(MAP kinase)의 subfamily가 이런 기능을 담당한다. MAP kinase는 serine/theornine protein kinase로써 ErK, JNK 및 p38 subfamil로 구분되는 Protein family로써 세포 증식, 분화 및 사멸에 대한 세포내 신호를 전달한다¹¹⁾.

전통적으로 癌治療에 사용되어온 한약제중에서 이러한 세포고사 신호전달계를 활성화시킬 수 있는 처방, 단일 제제 혹은 구성 성분을 규명하는 연구는 癌治療에 대단히 유용하다. 그래서 본 연구에서는 항암치료제인 Adriamycin의 세포독성이 없는 농도에서도 암치료의 효능을 높이고자 하는 일련의 연구과정에서 도출된 八珍湯合化積丸의 세포고사 신호전달계에 미치는 영향을 조사하였다. Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리에 의한 세포고사 신호전달계의 활성화를 Fas, Fas-L, FADD, Capase family cysteine protease-1, 2, 3, 6, 8, 9의 기능 분석을 조사하여 유의

한 연구 성과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 藥材

八珍湯合化積丸의 處方內容은 潘敏求의 中華腫瘤治療大成³⁾에 依據하였으며, 本 實驗에 使用한 藥材는 圓光大學校全州韓方病院에서 購入하여 嚴選한 것을 使用하였다.

1貼의 分量은 다음과 같다.

(Table 1.)

2) 檢液調製

實驗에 使用된 藥材는 에탄올용매를 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 먼저 에탄올추출물은 八珍湯合化積丸 100g을 에탄올 1 l 와 함께 플라스크에 넣어 하루동안 우려나오도록 방치한 다음 거즈로 濾過하고 3200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(Rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥시킨 것을 試料로 使用하였다. 이 八珍湯合化積丸 에탄올추출물을 이하 Herb extract라 부른다.

2. 方法

1) Chang 肝細胞柱 培養

사람의 간세포로부터 유래된 肝細胞柱인 chang (ATCC, CCL-13)는 CO₂ 세포배양기에서 (37℃, 5% CO₂) 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 RPMI-1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있

Table 1. Prescription of Paljintanghapwhajucwhan

韓藥名	生藥名	學名	重量(g)
人參	<i>Radix ginseng</i>	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	12
茯苓	<i>Poria</i>	<i>Poria cocos</i> Wolf	12
生地黃	<i>Rhizoma rehmanniae</i>	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch	12
鱉甲(醋)	<i>Carapax amydae</i>	<i>Trionyx sinensis</i> Wiengmann	12
穿山甲	<i>Squama manitis</i>	<i>Manis pentadactyla</i> L	12
白朮	<i>Rhizoma atractylodia macrocephalae</i>	<i>Atractylodes maceocephala</i> Koidz	10
當歸	<i>Radix angelicae gigantis</i>	<i>Angelica sinensis</i> Diels	10
赤芍藥	<i>Radix paeoniae rubra</i>	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	10
三稜	<i>Rhizoma scirpi</i>	<i>Scirpus flaviatilis</i> A. Gray	10
蓬朮	<i>Rhizoma curcumae zedoariae</i>	<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc	10
香附子	<i>Rhizoma cyperi</i>	<i>Cyperus rotundus</i> L	10
乳香	<i>Mastix</i>	<i>Boswellia carterii</i> Birdw	10
川芎	<i>Rhizoma cnidii</i>	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort	9
甘草	<i>Radix glycyrrhizae</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	6
Total			145

는 세포에 한약제를 처리한 뒤 세포의 아포토시스 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다. 이 chang 세포는 hela marker를 가지고 있는 암세포이며 nude mouse에 이식시 종양을 형성한다.

2) 細胞 viability 測定

세포의 활성도는 crystal violet staining 방법¹²⁾을 이용하였다. 세포배양판 (24-well plate)에 세포를 1×10^5 씩 1ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 8시간 이상 CO₂ 세포배양기안에서 방치시켜 부착시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 한약제 등을 처리한 다음 crystal violet staining 용액 (0.5% crystal violet (w/v), 30%(v/v) ethanol, 3% formaldehyde)을 200 μ l 씩 넣고 상온에서 10분간 염색시킨 후 흐르는 물에 세척한다. 염색정도는 1ml의 1% SDS 용액으로 3시간 동안 교반기에서 반응시켜 녹인 후 ELISA reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한 HL-60의 세포생존율은 MTT assay 방법을

이용하였다¹²⁾. 세포배양판 (24-well plate)에 세포를 1×10^5 씩 1ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 실험에 필요한 각 조건의 한약제 등을 처리한 다음, MTT를 최종농도가 100 μ g/ml이 되도록 넣어주었다. 생존율의 판정은 MTT 처리 후 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 μ l의 10% SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24시간 동안 37°C 5% CO₂ 세포배양기에서 방치하여 녹인 다음, ELISA reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

3) 종양세포의 콜로니 형성억제실험 (Colony forming assay)

Adriamycin 및 八珍湯合化積丸 추출물이 종양세포의 transforming efficiency 억제능력을 측정기 위해 semi-solid double layer agarose 법을 이용하여 colony forming assay를 시행하였다. 0.5% agarose, 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지 1ml 씩을 35x 10mm plastic petri dish에 분주하여

응고될 때까지 실온에 방치하여 bottom layer agar층을 만들었다. 한편 시험관내에 배양시킨 종양세포를 1×10^5 cells/ml로 넣고 Adriamycin 및 八珍湯合化積丸 추출물을 처리 후 배양기에서 2시간 배양하였다. 이후 원심분리하여 상층액은 버리고 세포를 잘 부유시킨 후 0.3% agarose, 10% FBS를 함유한 RPMI-1640배지를 2×10^4 cells/ml 되도록 조정하여 넣어준 후 이미 응고된 0.5% bottom layer agar 층위에 증층하였다. 그후 CO₂ 배양기에서 50개의 세포로 구성되는 colony의 형성여부를 4일 동안 관찰하면서 4일째에 colony수를 판정하였다. 각각의 한약제 처리 농도하에서의 결과판정은 무처리 대조군(media)의 colony수를 100%로 약제에 반응시킨 종양세포주의 colony수를 산출하였다. 각군의 colony수는 군당 4개의 petridish의 colony수의 평균치를 이용하여 평가하였다.

4) DNA추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위해

genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Co, Medison, WI)를 이용하여 추출하였다. 먼저 한약제가 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNAase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer (Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 OD 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 µg을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

5) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

약제가 처리된 세포를(2×10^6 cells) 4°C에서 15분 동안 lysing buffer (1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA법으로 정량하여 assay buffer (100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석시킨 후, 형광표지된 기질과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 측정하였다.

6) PARP cleavage 측정

배양된 Chang 및 HL-60 세포에 Adriamycin 및 八珍湯合化積丸 추출물을 일정 시간 처리후에 채취하여, cold Hank's balanced salt solution (HBSS)로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 RIPA 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2 X sample buffer와 섞어 100°C에서 3분간 끓인 후, 10% Sodium Dodesyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking buffer (10% skim milk)로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. PARP에 대한 항체 (Boehringer Mannheim Co, Germany)를 0.05% (V/V)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered sample saline (TBST)에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (Amersham, England)는 TBST로 1:1,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence kit (ECL kit: Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

7) RT-PCR

Qiagen RNeasy kit을 이용하여 분리한 2µg의 RNA를 65°C에서 5분간 가열하고 급히 식힌 후, 0.2µg의 oligo(dT)₁₈, 20 U RNase inhibitor와 10mM dNTP와 AMV reverse transcrip-

ptase을 RT buffer와 함께 가하고, 40°C, 30분; 90°C, 5분; 처리하고 Taq polymerase로 100pmole의 Fas primers로 넣어준 후 30cycle PCR을 시행한 후 1.2% agarose gel에서 관찰하였다.

III. 實驗成績

1. Adriamycin 및 八珍湯合化積丸이 간암 및 백혈병 세포주의 생존률에 미치는 影響

항암 화학요법제인 adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리의 암세포 세포독성에 대한 상승(synergistic)효과를 알아보기 위하여 인간 간암 세포주인 Chang 세포에 adriamycin 0.4, 0.5 및 1 µg/ml와 다양한 농도의 八珍湯合化積丸을 동시에 10시간 처리한 후 세포생존율을 crystal violet 염색법으로 조사하였다(Table 2). Adriamycin 단독처리는 농도의존적으로 세포독성을 나타내어 adriamycin 1 µg/ml에서 생존율은 83%로 감소하였다. 八珍湯合化積丸 자체도 125 µg/ml 이상의 농도에서는 세포독성이 86%, 250 µg/ml 농도에서는 76.3%의 세포생존율을 나타냈다. 두 약물의 병용처리는 Chang세포의 세포독성에 대한 감수성을 증가시켜서 adriamycin 0.5 µg/ml의 단독처리군의 89%, 八珍湯合化積丸 15.6 µg/ml의 단독처리군의 98%에 비교하여 세포독성이 현저히 증가된 64%의 세포생존율을 보였다. 이러한 adriamycin과 八珍湯合化積丸의 세포독성에 대한 병용처리의 상승효과는 두 약물의 다양한 농도 조합에서도 관찰되었다.

Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 세포독성에 대한 상승효과의 시간의존적 효과를 확인하기 위하여 단독처리시 세

Table 2. The Synergistic Effects of Combination of Adriamycin and *Paljintanghapwhajucwhan* in Cytotoxicity of Chang cells

ADR($\mu\text{g/ml}$)	Herb($\mu\text{g/ml}$)					
	Cont.	15.6	31.25	62.5	125	250
Cont.	100	98	97.6	95.4	86	76.3
0.4	93	85	78.2	44.21	25	8.7
0.5	89	64	67.3	38.9	20.6	8.3
1	83	58	56.1	29.6	16	6.1

Cells were Treated with various concentrations of adriamycin alone, *Paljintanghapwhajucwhan* alone and combination of two medications for 10 hr. Then, the viability of cells was represented as means of three independent experiments.

Table 3. The Synergistic Effects of Combination of Adriamycin and *Paljintanghapwhajucwhan* in Cytotoxicity of HL-60 cells.

ADR($\mu\text{g/ml}$)	Herb($\mu\text{g/ml}$)					
	Cont.	2.5	5	10	20	40
Cont.	100	97	95.4	89	84.9	82.3
0.4	87.5	85.4	76	63.4	58.2	45.1
0.5	81.1	79.3	69.4	60.9	53.7	44.6
1	77.3	72	64.5	55.4	44.3	41

Cells were treated with various concentrations of adriamycin alone, *Paljintanghapwhajucwhan* alone and combination of two medications for the indicated periods. Then, the viability of cells was represented as means of three independent experiments.

Table 4. The Synergistic Effects of Combination of Adriamycin and *Paljintanghapwhajucwhan* in Cytotoxicity of Hep-3B cells.

ADR($\mu\text{g/ml}$)	Herb($\mu\text{g/ml}$)					
	Cont.	15.6	31.2	62.5	125	250
Cont.	100	95.6	84.5	79.6	75	68.7
0.4	95.8	94.7	82.2	75.3	61.9	59.5
0.5	87.4	86.4	78.1	64.8	60.4	58.1
1	78.1	75.4	74.2	62.4	59.1	56.3

Cells were treated with various concentrations of adriamycin alone, *Paljintanghapwhajucwhan* alone and combination of two medications for the indicated periods. Then, the viability of cells was represented as means of three independent experiments.

포독성 정도가 미비한 adriamycin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 과 八珍湯合化積丸 15.6 $\mu\text{g/ml}$ 을 단독 그리고 병용으로 다양한 시간 동안 Chang 세포주에 처리한 다음에 세포생존율을 crystal violet 염색법으로 조사하였다.

이러한 두 약물의 병용요법에 의한 세포독성의 상승효과가 특정 세포에 특이적인지 여부를 확인하기 위하여 백혈

구 암세포주인 HL-60 세포에 Adriamycin 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 단독처리, 八珍湯合化積丸 10 $\mu\text{g/ml}$ 단독처리 혹은 두 약물의 병용처리 후에 10시간 동안 세포생존율을 조사하였다(Table 3). HL-60 세포주에서도 Chang 세포주와 유사하게 adriamycin 혹은 八珍湯合化積丸 단독처리 군에서는 처리 10시간 이후에도 유의한 세포생존을 변화를 확인 할 수 없었다.

그러나 두 약물의 병용처리시 시간 의존적으로 HL-60 세포의 생존율은 시간 의존적으로 감소하여 10시간 후에는 약 60%이상 감소하였다.

다양한 종류의 간암 세포주에 대한 adriamycin과 八珍湯合化積丸의 세포독성 상승효과를 확인하기 위하여 간암 세포주인 Hep-3B와 Alexander세포주에서 adriamycin과 八珍湯合化積丸을 단독 혹은 병용으로 처리한 이후에 세포독성을 crystal violet 염색방법으로 조사하였다. Table 4의 결과와 같이 Hep-3B 세포주에서 adriamycin 단독 처리시 세포독성은 농도 의존적으로 증가하여 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 78%이었으며, 八珍湯合化積丸 단독처리도 농도 의존적인 세포독성을 나타내어 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 89% 정도의 세포생존율을 나타냈다. 그러나 adriamycin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 과 八珍湯合化積丸 31.2 $\mu\text{g/ml}$ 의 병용처리군의 Hep-3B 세포생존율은 각각 약제의 단독처리군과 유의한 차이가 나타나지 않았다. 또 다른 간암 세포주인 Alexander 세포에서도 adriamycin 단독처리와 八珍湯合化積丸 단독 처리시에 각각 농도 의존적으로 세포독성이 관찰되었으나, 이들 약제의 병용처리에 의한 adriamycin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 과 八珍湯合化積丸 15.6 $\mu\text{g/ml}$ 의 병용에 의한 세포독성의 상승효과는 관찰되지 않았다(Table 5). 이상의 결과는 adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용에 의한 세포독성 상승효과가 분명하게 구체화되지 않은 세포의 어떤 특성과 관련하여, Chang 세포나 HL-60 세포와는 다르게 Hep-3B 세포 및 Alexander 세포에서는 병용처리에 의한 세포독성 상승효과를 관찰할 수 없었다.

(Table 2, Table 3, Table 4, Table 5.)

Table 5. The Synergistic Effects of Combination of Adriamycin and *Paljintanghapwhajucwhan* in Cytotoxicity of Alexander cells.

ADR($\mu\text{g/ml}$) \diagdown Herb($\mu\text{g/ml}$)	Herb($\mu\text{g/ml}$)					
	Cont.	15.6	31.2	62.5	125	250
Cont.	100	95.5	86.3	78.6	70.4	67.7
0.4	96.5	94.2	84.6	77.6	64.8	60.5
0.5	80.6	75.8	72.1	73.3	62	59.1
1	79.1	70.5	68.3	62	59	55.3

Cells were treated with various concentrations of adriamycin alone, *Paljintanghapwhajucwhan* alone and combination of two medications for the indicated periods. Then, the viability of cells was represented as means of three independent experiments.

2. Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리가 Chang 및 HL-60 세포주의 colony 형성에 미치는 影響

Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용으로 인한 세포독성 상승효과가 간암 세포주인 Chang 세포와 백혈병 세포주인 HL60 세포의 colony forming에 미치는 효과를 조사하였다. Colony 형성 검사를 위한 배지는 RPMI 1640 medium에 0.5% 멸균 agarose를 부가한 하층과 여기에 멸균 agarose의 농도만 0.3%로 바꾸어준 상층의 배지 구성에 adriamycin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 八珍湯合化積丸 15.6 $\mu\text{g/ml}$ 을 단독 혹은 병용으로 부가한 semi-solid한 상태로 준비하여 1×10^5 Chang 및 Alexander 세포주를 분주하였다. Chang 세포는 분주 4일 후에 colony 형성 정도를 관찰하였다(Fig. 1). Adriamycin 혹은 八珍湯合化積丸을 단독으로 함유한 배지에서 Chang 세포의 colony 형성 정도는 정상 대조군에 비교하여 약간의 수적 감소는 관찰할 수 있었으나 현저히 차이가 있는 양상은 아니었다(Fig. 1B 및 C). 그러나 adriamycin과 八珍湯合化積丸을 동시에 함유한 배지에서 Chang 세포의 colony 형성은 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1D).

이와 동일한 실험 조건에서 HL-60

세포의 colony 형성에 대한 adriamycin과 八珍湯合化積丸 병용효과를 조사하였다(Fig. 2). HL-60 세포는 1×10^5 세포를 분주한 3일 후에 colony 형성 정도를 관찰하였다. Adriamycin은 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 八珍湯合化積丸은 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 colony 형성 검사 배지에 부가하였다. Adriamycin 혹은 八珍湯合化積丸을 단독으로 함유한 배지에서 HL-60 세포의 colony 형성 양상은 정상 대조군과 유사하였으나(Fig. 2B 및 C) 두 약물을 동시에 함유하고 있는 배지에서 HL-60 세포의 colony 형성은 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2D). 또한 adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용에 의한 세포독성의 상승효과가 없는 Hep-3B 및 Alexander 세포주에서는 이들 두 약물의 단독 혹은 병용이 colony 형성에 유의한 변화를 나타내지 않았다. 이상의 결과는 adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용으로 인한 세포독성 상승효과가 있는 암세포주 Chang 및 HL-60 세포주에서 이들 약제의 병용은 colony 형성도 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, Fig 2).

3. Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리가 Chang 및 HL-60 세포주의 세포고사기전 (apoptosis or necrosis) 규명

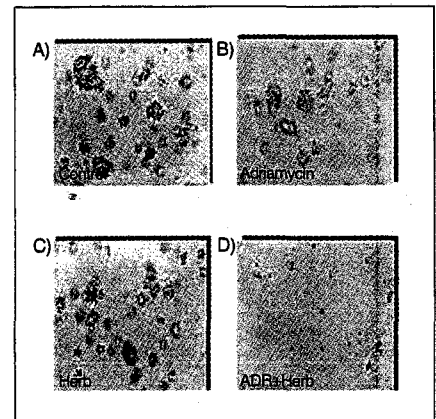


Fig. 1. Combination of Adriamycin and *Paljintanghapwhajucwhan* inhibited the Colony Forming of Chang Cells. Cells were plated into MEM agarose Containing Media only (A), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Adriamycin alone (B), 15.6 $\mu\text{g/ml}$ *Paljintanghapwhajucwhan* alone (C), and Combination of two Medications (D) for 4 Days. Colony Forming was observed under Light Microscope.

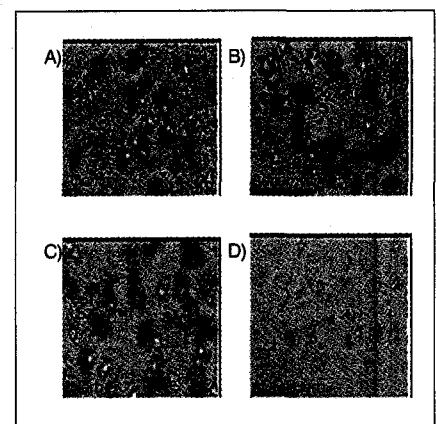


Fig. 2. Combination of adriamycin and *Paljintanghapwhajucwhan* inhibited the Colony Forming of HL-60 Cells. Cells were plated into MEM agarose containing media only (A), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Adriamycin alone (B), 10 $\mu\text{g/ml}$ *Paljintanghapwhajucwhan* alone (C), and Combination of two Medications (D) for 4 days. Colony Forming was observed under Light Microscope.

Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용에 의한 암세포에서의 세포독성이 세포고사 기전에 의한 것임을 확인하기 위

하여 Chang, HL-60, Hep-3B, 그리고 Alexander 세포주에서 세포고사 현상을 확인하였다. Adriamycin 0.5ug/ml 단독, 八珍湯合化積丸 15.6ug/ml 단독 그리고 두 약제를 병용처리한 10시간 이후에 각 세포주로부터 genomic DNA를 분리하여 1.5% agarose 전기영동상에서 40분 동안 분리하여 DNA의 분절현상을 관찰하였다. Chang 세포주에서는 Adriamycin 단독 처리군에서는 DNA의 분명한 분절이나 DNA 분쇄에 의한 smearing 현상이 관찰되지 않았다. 八珍湯合化積丸 단독 처리군에서도 처리 8시간 실험군에서도 세포고사의 특징적인 DNA의 분절 혹은 분쇄 현상이 존재하지 않았으나, 처리 10시간 실험군에서는 DNA 분쇄에 의한 smearing 현상이 관찰되었다(Fig. 3A). 그러나 두 약제의 병용 처리군에서는 처리 2시간 이후부터 DNA 분쇄에 의한 smearing 현상이 관찰되었다.

HL-60, Hep-3B, 및 Alexnader 세포주에서 Adriamycin 0.5ug/ml 그리고 八珍湯合化積丸 15.6-32.5ug/ml을 단독 혹은 병용 처리한 후에 각각의 세포에서 genomic DNA를 분리하여 전기영동으로 분절 혹은 분쇄현상을 관찰하였다(Fig. 3B). HL-60 세포에서는 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용 처리군에서만 DNA 분쇄에 의한 smearing 현상이 관찰되었으며, 각각 약제의 단독 처리군에서는 세포고사의 증거인 DNA 손상이 관찰되지 않았다. 또한 Hep-3B 및 Alexander 세포주에서는 Adriamycin 단독, 八珍湯合化積丸 단독 그리고 병용 처리군의 모든 실험군에서 DNA 손상 현상이 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 Chang 및 HL-60 세포에서 관찰되는 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용에 의한 세포독성

의 증가현상은 이들 약제에 의하여 세포고사가 초래되었다고 판단된다(Fig. 3).

4. Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리에 의한 Chang 세포주 세포고사시 caspase family cysteine protease의 활성 조사

Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용에 의한 세포독성의 상승효과가 세포고사 이전에 의함을 확인 할 수 있었기에 세포고사 신호전달기전의 중요한 신호전달분자인 caspase family cysteine protease-1, 2, 3, 6, 8, 및 9의 효소적 활성을 조사하였다. Adriamycin 0.5ug/ml 단독, 八珍湯合化積丸 15.6ug/ml 단독, 그리고 두 약제를 병용처리 한 10시간 이후에 다양한 시간대 별로 Chang 세포를 채집하여 분쇄한 세포부유액에서 단백질 농도를 정량한 후 세포질내의 caspase 단백질을 각각 caspase의 biosubstrates을 이용하여 이들 기질의 분해정도를 Fluorospectrometer로 측정하였다. Caspase-3의 활성은 Adriamycin 단독 처리시 처리 8시간 후에 5배 정도의 활성 증가가 관찰되었으나 八珍湯合化積丸 단독 처리군은 유의한 변화가 없었다. 두 약제를 병용 처리한 실험군에서는 처리 4시간 후 caspase-3 효소 활성이 4.7배, 6시간 후 11.7배, 8시간 후 13배, 그리고 10시간 후 약 16배의 증가를 관찰 할 수 있었다(Table 6). 그러나 Caspase-1, 2, 6, 8, 및 9의 효소적 활성은 Adriamycin 단독, 八珍湯合化積丸 단독, 그리고 두 약제의 병용처리군 모두에서 처리 10시간 이후까지 유의한 변화를 관찰 할 수 없었다.

Caspase-3 cysteine protease 효소의

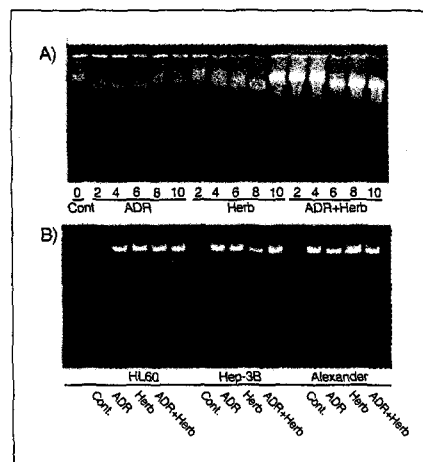


Fig. 3. Combination of Adriamycin and Palginhohhapwhajucwhan induced the High Molecular Weight DNA Fragmentation in Chang Cells(A). Cells were cotreated with 0.5 ug/ml Adriamycin and 15.6 ug/ml Palginhohhapwhajucwhan for the Indicated Periods. Then, Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% Agarose Gel Electrophoresis. DNA in Gel was stained with Ethidium Bromide and visualized under UV light. Other Types of Cells such as HL-60, Hep-3B, and Alexander Cells were cotreated with Two Medications and Genomic DNA was extracted and visualized (B).

활성변화와 세포생존율과의 관계를 확인하기 위하여 Chang, HL-60, Hep-3B, 그리고 Alexander 세포주에서 Adriamycin 단독, 八珍湯合化積丸 단독, 그리고 두 약제의 병용처리 실험군에서 caspase-3 protease의 효소적 활성을 조사하였다(Fig. 4). Chang 및 HL-60 세포주에서 Adriamycin 및 八珍湯合化積丸을 단독 처리한 실험군에는 caspase-3 protease의 효소적 활성에 유의한 변화가 없었으나, 이들 두 약제를 병용 처리한 실험군에서는 caspase-3 protease의 활성이 정상 대조군에 비교하여 16배 이상 증가하였다. 그러나 Hep-3B 및 Alexander 세포주에서는 Adriamycin 단독, 八珍湯合

Table 6. The Catalytic Activation of Caspase-3 Protease of Combination Adriamycin and *Palginhonhapwhajucwhan* in Chang Cells

Time(hr)	Cont.	2	5	6	8	10
ADR	1	1.19	1.53	2.52	5.04	3.15
Herb	1	1.47	1.83	1.81	1.98	2.07
ADR+Herb	1	2.04	4.68	11.67	13.13	15.9

Cells were treated with 0.5 ug/ml adriamycin alone, 15.6 ug/ml *Palginhonhapwhajucwhan* alone, and combination of two medications for 10 hr. Then, cells lysates were used to carry out to measure the enzymatic activation of caspase-3 protease by using fluorogenic substrate. The data was one of three independent experiments.

化積丸 단독, 그리고 두 약제 병용처리 실험군 모두에서 caspase-3 protease 활성의 유의한 변화는 관찰 할 수 없었다. 이상의 결과는 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리에 의한 세포독성의 상승효과가 관찰된 Chang 및 HL-60 세포주에서는 세포고사 신호전달분자인 caspase-3 protease 활성의 현저한 증가가 있었으나 두 약제에 의한 세포독성에 저항성을 나타내는 Hep-3B 및 Alexander 세포주에서는 caspase-3 protease의 활성변화가 없음을 확인 할 수 있었다 (Table 6, Fig. 4).

5. Fas 유전자의 RT-PCR

Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용 처리에 의한 세포고사 기능의 향진이 세포막 Fas 수용체의 존재 여부와 관계있는 지를 확인하기 위하여 Chang, HL-60, Hep-3B 그리고 Alexander 세포주에서 mRNA를 분리하여 Fas sequence primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. Fig. 5에서와 같이 Chang 및 HL-60 세포주에서는 대략 1Kb의 Fas 수용체 DNA가 증폭되었으나 Hep-3B 및 Alexander 세포주에서는 Fas band가 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리에 의해서 세포독성이 증가된 두 세포주 즉 Chang 및 HL-60 세포주의 세포고사 기전에 Fas

수용체가 중요하다는 사실을 시사하는 바이다(Fig. 5).

IV. 考 察

韓醫學의인 癌의 發生原因으로는 外因·內因·不內外因이 모두 적용될 수 있다. 《內經》¹³⁾에서는 虛邪·憂怒·飲食不節·起居不常·用力過度·邪氣·寒熱相搏 등으로 보았고, 《諸病源候論》¹⁴⁾에서는 臟腑의 氣가 虛弱하거나 循環이 不利하여 發生한다고 설명하였으며, 《景岳全書》¹⁵⁾에서는 風寒 등의 外感之邪가 人體를 侵襲하여 鬱結되면 積이 發生한다고 하였다. 醫家들의 說을 종합해 보면 癌의 發生原因으로 外感六淫, 內傷七情, 飲食不節 및 邪氣 등으로 정리할 수 있는데, 이들이 人體의 正氣虛와 복합적으로 작용한다고 볼 수 있다. 이 중에서 특히 正氣의 虛弱은 疾病의 發生發展의 關鍵이 되는 것으로 外在環境의 各種 發病因子가 人體를 侵犯하는 것은 단지 發病의 條件이며 人體의 體質狀態와 臟腑組織機能의 虛弱 및 그것의 疾病에 대한 防禦 鬭爭 恢復力의 強弱은 疾病 發生發展의 關鍵이 되는데 《內經》¹³⁾에서는 이를 “正氣存內 邪不可干”라 하여 그 중요성을 강조하고 있다^{16,17)}. 癌의 治療는 正氣와 衛氣를 強化하여 宿主의 抗癌能力을 增強시키는 扶正培本法과, 祛邪하되 人體의 正氣를 補益하며 正氣를 損傷시

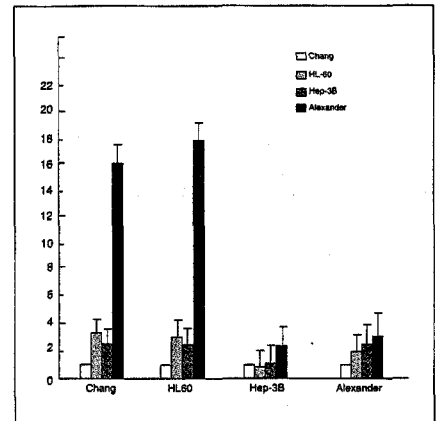


Fig. 4. Combination of Adriamycin and *Palginhonhapwhajucwhan* increased the Catalytic Activation of Caspase-3 Protease in Chang and HL-60 cells but not in Hep-3B and Alexander cells. The Enzymatic Activity of Caspase-3 was measured by the Method previously mentioned. The Data represented Means+S.D. of Triplicates.

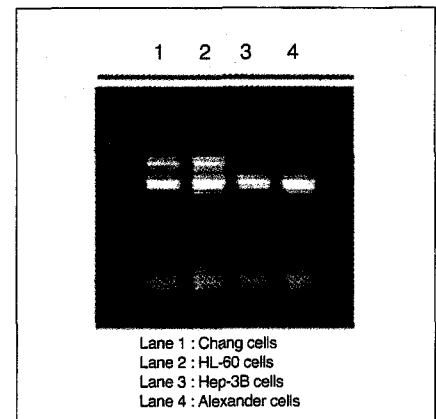


Fig. 5. mRNA of Fas was amplified in Chang and HL-60 cells by RT-PCR but not in Hep-3B and Alexander Cells. Total RNA of These Cells was isolated and Fas Gene was amplified by RT-PCR detailed in the Materials and Methods.

키지 않는 扶正祛邪法이 널리 사용되고 있는데^{18, 19)}, 특히 최근에는 한·양방을 결합한 치료법들이 점차로 시행되고 있으며, 본 논문에 사용한 八珍湯合化積丸은 이러한 扶正祛邪法에 충실한 처방으로 健脾益氣, 活血祛瘀, 軟堅消腫하는 治療效果를 갖고 있다.

八珍湯合化積丸의 구성약물중 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草는 補氣健脾하고 生地黃, 當歸, 赤芍藥, 川芎은 補肝腎하며 香附子, 乳香, 三稜, 蓬朮은 行氣破血 · 消積止痛 · 消腫하고, 天山甲은 活血通經 · 消腫排膿하고, 鱉甲은 滋陰潛陽 · 軟堅消結하는 효능을 지니고 있는데 이러한 약물들은 또한 면역기능향상이나 抗腫瘍효과를 구비하고 있다^{20, 21)}.

세포고사는 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요 기전²²⁾으로 인식되면서 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다²³⁾. 세포고사 기전의 이상은 암발생, 자가면역 질환의 발생, 퇴행성 질환 및 HIV에 의한 병리에 중요한 역할을 수행함이 보고되었다²⁴⁾. 특히 항암치료에 대한 내성(resistance) 발현이나 감수성(sensitivity) 저하 등도 세포고사 신호전달기전의 기능과 밀접한 관계가 있다. 최근 연구에 의하면 항암치료에 흔히 사용되는 많은 화학요법제들이 작용기전에 관계없이 다양한 암조직이나 세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀져 있다²⁵⁾. 이러한 이유로 항암치료의 효율성은 세포고사 기전의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 성공적인 암치료법의 개발을 위해서는 세포고사 현상에 대한 정확한 생화학적인 작용기전에 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다.

본 연구자는 洋, 韓方에서 사용되는 항암치료제 병용치료에 의한 항암치료 상승효과에 관한 치료법의 개발에 관심을 가지게 되었다. 특히, 본 연구에서는 현재 항암치료제로 가장 흔히 사용되고 있으면서도 지속적인 약물 사용에 의한 약물축적시 심각한 부작용인 심근독성으로 인한 심장질환을 유발²⁶⁾하는 Adriamycin과 병용 처방으로 암세포

독성을 높일 수 있는 韓方 處方중 八珍湯合化積丸을 연구대상 약물로 선정하고 이 둘의 병용처방시 암세포 세포독성의 작용기전을 밝히고자 하였다.

Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 세포독성에 대한 상승효과는 간암 세포주인 Chang 및 백혈병 세포주인 HL-60 세포에서는 농도 및 시간 의존적으로 관찰되었다(Table 2-3). 그러나 또 다른 종류의 간암 세포주인 Hep-3B 및 Alexander 세포에서 두 약제의 세포독성 상승효과는 없었다(Table 4-5). 이러한 차이는 Chang 및 HL-60 세포주는 Fas 수용체를 발현하고 있지만 Hep-3B 및 Alexander 세포주는 Fas 수용체를 발현하고 있지 않기 때문에 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처방에 의한 세포독성 신호를 전달하지 못했다고 판단되었다. 이 결과는 항암제인 Adriamycin의 암세포 살해기능이 세포고사기전에 의해서 매개된다는 여러 연구 결과와 일치하였으며 흥미로운 사실은 Adriamycin의 의한 세포독성의 작용을 八珍湯合化積丸이 강화시킨다는 것이었다. 이는 八珍湯合化積丸이 Fas 수용체를 발현한 암세포에서 항암 화학요법제인 Adriamycin에 대한 반응성(sensitivity)을 증대시켰다는 중요한 사실을 의미한다. 또한 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처방은 Fas 수용체를 발현한 Chang 및 HL-60 세포주에서 colony 형성 자체도 억제하였다(Fig. 1-2). 이 결과는 두 약제의 병용처방이 암세포의 전이도 억제할 수 있음을 의미하였다.

Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처방에 의한 세포독성이 세포고사 현상을 확인하였기에 그 작용기전의 하나인 caspase family cyateine protease의 활성화 여부를 조사하였다. 본 연구

결과에서 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처방은 Chang 세포주에서 caspase family protease 중에서 오직 caspase-3 protease 만을 활성화 시켰다(Table 6). 또한 Fas 수용체를 발현하면서 두 약제에 의한 세포독성 상승효과가 있는 Chang 및 HL-60 세포주에서는 caspase-3 활성이 현저히 증가하였으나 Fas수용체를 발현하지 않으면서 두 약제의 상승효과도 없는 Hep-3B 및 Alexander 세포주에서는 caspase-3 protease의 활성도 관찰되지 않았다(Fig. 4). Caspase-3 protease는 mammalian ced-3 homologue 로서 ICE 라고도 알려져 있으며 세포질에서는 proenzyme 형태로 존재한다. Proenzyme 형태의 caspase-3 protease는 caspase-8 및 9 같은 initiator caspase에 의하여 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환된다. 세포고사 과정에서 caspase-3 protease의 세포내 표적 인자로는 protein kinase C(PKC), lamin, 및 PARP 등이 알려져 있으며 endonuclease의 활성화도 caspase-3 protease의 활성화에 의존적이라고 알려져 있다²⁷⁾.

본 실험의 연구 결과는 Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처방에 의한 암세포 세포독성의 상승효과는 암세포 자체의 Fas 수용체 발현에 의존적이며 그 작용기전은 caspase-3 protease의 활성화에 기인함을 시사하고 있었다. 이상의 실험 결과는 고려할 충분한 과학적 가치가 있다고 사료된다.

V. 結 論

본 연구에서는 암치료제로서 가장 널리 사용되고 있으면서도, 약물축적시 심각한 심근 손상을 초래하는 Adriamycin-

cin과 韓方에서의 癌治療에 사용하는 八珍湯合化積丸의 병용처방에 대한 세포독성의 상승효능을 확인하고 그 세포고사 작용기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 두 약제의 병용 후에 세포생존율, colony 형성능, caspase family cysteine protease의 효소적 활성 등을 조사하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리시 암세포주 Chang 및 백혈병 HL-60 세포에서 세포독성의 상승효과가 관찰되었다. 이때 두 약제에 의한 세포독성은 colony 형성도 억제하였다.

2. Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리시 세포독성은 DNA 분쇄 및 분절 (fragmentation) 등이 관찰되는 세포고사에 의한 세포독성을 확인하였다.

3. Adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처리시 Chang 및 HL-60 세포주에서 caspase-3 protease의 활성이 현저히 증가하였으며, 이 효소적 활성은 세포내 표적인자인 PARP를 분해하여 85 kDa 분절을 관찰할 수 있었다.

4. Adriamycin과 八珍湯合化積丸에 의한 세포독성에 관한 암세포주의 반응성(sensitivity)은 이들 세포주의 Fas 발현 여부와 관계있음을 Fas 유전자 mRNA에 대한 RT-PCR 방법으로 확인하였다.

이상의 결과는 八珍湯合化積丸은 Adriamycin에 의한 암세포 세포고사를 상승시키는 효과가 있었으며, 이때 이 약제의 병용은 세포고사 신호전달계, caspase family cysteine protease가 관여함을 알 수 있었다. 또한 두 약제의 병용에 의한 세포독성은 Fas 수용체 발현에 의존적이었다.

VI. 參考文獻

1. 서울대학교 의과대학: 腫瘍學, 서울, 서울대학교출판부, pp.1,95,96,126, 1989.
2. 錢伯文: 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp.1-10, 1980.
3. 潘敏求 外: 中華腫瘤治療大成, 河北, 河北科學技術出版社, p.60, 1996.
4. Fish B: Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, *Cancer*, 54:2609, 1984.
5. Golub SH, Morton DL: Corelationship of in vitro and in vivo assays of immunocompetance in cancer patients. *Cancer Res.* 34:1722, 1984.
6. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 1977 Jul 8;197(4299):165-7)
7. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 1990;47(2):219-31)
8. Lee V, Randhawa AK, Singal PK. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am J Physiol* 1991 Oct;261(4 Pt 2):H989-95.
9. Cohen JJ. 1993. Apoptosis. *Immunol. Today* 14: 126-130.
10. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998 Aug 21;94(4):481-90.
11. Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, Haber DA. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell* 1999 May 28; 97(5):575-86.
12. Kim Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase 3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272:31138.
13. 王 冰: 黃帝內經, 서울, 高文社, 素問 p.91, 166, 229, 326, 靈樞 p.76, 88, 1977.
14. 巢元方: 諸病源候論, 北京, 人民衛生出版社, pp.105-109, 1982.
15. 張介賓: 景岳全書, 서울, 大星文化社, p.479, 1988.
16. 金昌種: 病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp.72-74, 1988.
17. 文濬典 외: 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.78-90, 1990.
18. 楊寶印: 癌症的中藥治療, 河北, 河北科學技術出版社, pp.4-24, 1992.
19. 厲 暢: 癌의 中藥治療, 서울, 東洋醫學 18(1): 56-63, 1992.
20. 李家康 外: 中醫腫瘤防治大全, 北京, 科學技術文獻出版社, p.599, 1994.
21. 劉春安 外: 抗癌中草藥大典, 湖北, 湖北科學技術出版社, pp.14, 33, 45, 100, 260, 340, 440, 638, 710, 752, 776, 1994.
22. Fadeel B, Henter JI, Orrenius S. Apoptosis required for maintenance of homeostasis: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by too little cell death *Lakartidningen* 2000 Mar 22;97(12):1395-400, 1402.
23. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. *Science* 1993; 262: 695-700. 57. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J. Patho* 1994; 173: 1-4. 58. Williams GT. Program med cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; 65: 1097-1098.
24. Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
25. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 1997; 41: 461.
26. Lampidis TJ, Henderson IC, Israel M, Canellos GP. Structural and functional effects of adriamycin on cardiac cells in vitro. *Cancer Res* 1980 Nov;40(11):3901-9.
27. Widmann C, Gibson S. 1998. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273(12):7141-7147.