大韓韓方腫瘍學會誌
J. of Kor. Oriental Oncology
Vol.9, No.1, 2003

鬱金이 胃癌細胞에 미치는 影響

조유경 · 윤상협 · 김병우 · 김진성 · 류기원 · 류봉하

경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Effects of Curcuma longa L.on Human Stomach Cancer Cells

Yu-Kyung Cho, Song-Ryub Yoon, Beong-Woo Kim, Jin-Sung Kim, Ki-Won Ryu, Bong-Ha Ryu

Dept. of the 3rd Internal Mdicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objective: We are aimed to identify anti-tumor effects of Curcuma longa L. on the stomach cancer cells through molecular biologic methods.

Material & Methods: We used AGS as human stomach cancer cells obtained from American Type Culture Collection. The boiled extract of Curcuma longa L. 5㎕ (Sample Ⅰ), 10㎕(Sample Ⅱ) was treated to cultural media(㎖) for 0, 6, 12, 24, 48 hours. We measured the killing effect on stomach cancer cells through Trypan blue exclusion test and the suppressive effect on viability of stomach cancer cells via MTT assay. For identification of its anticancer mechanism, the revelation of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax which are genes related to apoptosis using the quantitative RT-PCR, change of mitochondria membrane permeability and membrane potential via flow cytometry, the cycle of cell mitosis, caspase cleavage and annexin V staining were examined.

Result:

1. showed significant killing effeect on stomach cancer cells than the control group with a time(6 hours later) and density dependent manner, which was statistical significance.
2. Extract of Curcuma longa L. showed suppressive effect on viability of stomach cancer cells that each test groups had more suppressive effects on viability of stomach cancer cells than the control group with a time(6 hours later), which was statistical significance.($p<0.05$)
3. In the test about the revelation of genes related to apoptosis, the revelation of Bcl-2 and Bcl-XL

교신저자 : 류봉하, 서울시 동대문구 회기동 1 경희의료원 한방병원 비계내과
E-mail: rbongh@khu.ac.kr Tel: 02-958-9137

decreased with a density manner which was statistical significance. but the revelation of Bax was not changed with statistical significance.

4. Extract of Curcuma longa L. caused apoptosis by decreasing the absorbance of mitochondria with statistical significance, and also induced apoptosis by decreasing the membrane potential of mitochondria.
5. Extract of Curcuma longa L. destructed the cell cycle of cell mitosos.
6. Cell apoptosis was induced by extract of Curcuma longa L. certificated by method of caspase cleavage and annexin V staining.

Conclusion: This experiment showed that Curcuma longa L. has anti-tumor effect with statistical significance. This is in vitro experiment and basic experiment on Curcuma longa L.. We hope more progressive researchs on Curcuma longa L. will go on and its anti-tumor effects will be more practically identified.

I. 緖 論

胃癌의 世界的 趨勢는 그 發生 頻度와 死亡率이 모두 減少하고 있으나 우리 나라에서는 遺傳的 要因과 食生活을 包含한 環境的 要因으로 인하여 아직도 가장 흔한 癌으로 중요한 死亡原因이다.[1] 2002년 대한위암학회는 우리나라의 臟器別 癌 發生 頻度를 보면 胃癌은 남성의 경우 24.5% , 여성의 경우 15.8%를 차지하고 있으며 전체 癌 發生의 20.8%를 차지한다[2]고 보고하였다.

胃癌에 대한 治療法으로는 外科的 手術療法, 抗癌化學療法, 放射線療法, 免役療法, 遺傳子療法 등이 알려져 있고[3,4] 최근에는 腫瘍免疫學, 바이러스 腫瘍學, 細胞生物學, 分子生物學 등의 발달에 힘입어 多樣한 抗癌劑들이 연구되고 있다. 手術療法과 放射線療法이 局所的인 病巢에는 有意하나 轉移된 경우 여전히 抗癌化學療法에 의존하고 있고 치료에 한계가 있다. 또한 현재의 化學療法은 抗癌劑가 癌細胞 외에 正常的인 細胞의 DNA 損傷을 招來하여 成長을 妨害하는 副作用으로 인해 免役機能低下, 造血障碍, 遺傳子 損傷 등을 야기한다. 이에 따라 副作用을 減少시키면서 癌細胞에 대한 特異的 毒性을 나타내는 抗癌劑를 合性物質이 아닌 天然物質에서 開發하려는 노력이 시도되고 있다.[5]

韓醫學에서는 胃癌이라는 명칭은 없으나 胃癌에 關聯된 用語로는 脾積, 伏梁, 胃脘癰, 噎膈, 反胃, 心下痞 등의 病症에서 類似性을 찾을 수 있으며, '朝食暮吐' '心之積' '伏梁' 등도 유사하다는 견해가 있다.[6] 治法은 크게 溫陽과 疏氣의 治法을 强調하고 있으며 活血祛瘀, 健脾理氣, 化痰軟堅 등의 治法이 活用되었다.[6]

韓醫學界에서도 抗癌治療의 限界를 극복하기 위한 노력으로 각종 韓藥劑와 複合方들에 대한 實驗을 통하여 抗癌效果와 免役增進, 抗癌劑의 副作用抑制, 抗癌劑와의 併用療法 등에 관한 硏究들을 進行해 오고 있다.

鬱金은 活血祛瘀藥 혹은 通氣藥으로 分類되기도 하는[7,8] 生薑科에 속하는 多年生 宿根草本인 鬱金의 뿌리를 건조한 것이다. 性味는 凉

無毒而辛苦하며 心肝肺膽經으로 入하여 行氣化瘀 淸心解鬱 利膽退黃 하여 治經閉通經 胸腹脹痛 刺痛 熱病神昏 癲癎發作 黃疸尿赤 諸出血에 사용한다.[9]

이러한 鬱金의 效能을 糾明하는 韓醫學的 硏究로는 鬱金의 基源[10] 및 新生血管抑制作用[11], 抗酸化作用[12], 肝損傷回復[13], 高脂血證에 미치는 영향[14] 등이 있다. 특히, 新生血管抑制作用은 癌細胞의 殺傷에 중요한 기전으로 이는 鬱金이 抗癌劑로서의 可能性을 시사한다고 할 수 있다.

이에 著者는 鬱金이 胃癌細胞에 미치는 影響을 알아보고자 胃癌細胞株(AGS)에 鬱金을 藥物處理한 후 形態學的 變化와 trypan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷效果를 測定, MTT assay를 시행하여 胃癌細胞의 增殖抑制效果를 測定하고 定量的 RT-PCR을 이용하여 細胞의 增殖 및 apoptosis 와 관계있는 遺傳子의 發顯에 미치는 效果를 觀察, 미토콘드리아 막투과도 및 막전위변화, Caspase cleavage assay, Annexin V staining 등으로 細胞死의 과정을 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實　驗

1. 材料

1) 藥材

本 實驗에 사용한 藥材는 慶熙醫療院 韓方病院 藥劑科(原産地:越南)에서 購入, 精選한 後 사용하였다. 試藥은 특별히 明示가 없는 한 Sigma. MO에 製品을 신청하여 使用하였다.

藥名	學名	生藥名
鬱金	Curcuma longa L.	Tuemeric

2) 檢液의 調劑

鬱金 5g을 蒸溜水 100㎖에 넣어 30분간 121℃에서 끓인 후 上層液을 取하여 0.2㎛ 크기의 syringe filter를 이용하여 濾過하여 檢液으로 하였다. 實驗에 사용될 때까지 檢液은 4℃에 冷藏保管하였다.

3) 胃癌細胞의 選定

이 實驗에 使用한 癌細胞는 國內 癌患者의 胃癌細胞인 SNU-1, SNU-5, SNU-16과 美國 American Type Culture Collection(ATCC, MD)에서 提供하는 AGS, Kato 등의 胃癌細胞 중 screen을 통하여 가장 적합한 細胞를 選定하였다. 이 중 AGS가 가장 적합한 細胞로 判明되었다.

2. 方法

1) 胃癌細胞의 培養

胃癌細胞株 AGS(ATCC, MD)를 10% fetal bovine serum(Life technology. CA), 1% broad-spectrum antibiotics(Life technology.CA)가 함유된 RPMI-1640(Life technology. CA) 培地를 이용하여 37℃, 5% CO_2 incubator(NAPCO, precision scientific Inc.)에서 培養하였다. 細胞의 回收는 0.1% trypsin-EDTA를 利用하여 37℃에서 5분간 處理한 후 回收하였다.

2) 藥物處理

鬱金 5g을 蒸溜水 100㎖에 넣어 30분간 121℃에서 끓인 후 上層液을 取하여 0.2㎛ 크기의 syringe filter로 濾過한 후 培地 ㎖당 5㎕(이하 Sample Ⅰ), 10㎕(이하 Sample Ⅱ)의 藥物을 각

각 0, 6, 12, 24, 48時間동안 投與하였다.

3) 胃癌細胞의 形態學的 變化 觀察

胃癌細胞에 鬱金檢液을 5㎕/㎖와 10㎕/㎖씩 注入하고 24時間 經過 후 各各 細胞와 細胞核의 形態學的 變化를 inverted microscope 하에서 觀察하였다.

4) 胃癌細胞의 殺傷效果 測定(Trypan blue exclusion test)[15,16]

Trypan blue exclusion test는 細胞를 回收한 후 10^6/㎖의 濃度로 細胞液을 만든 후 細胞液, HBSS(Hanker's balanced salt solution), 0.4% tryphan blue를 각각 0.5㎖, 0.3㎖, 0.2㎖의 比率로 섞은 후 5분간 放置한 후 10분 이내에 푸르게 染色된 細胞의 比率을 inverted microscope下에서 測定하였다. 본 實驗은 3회에 걸쳐 시행하였다.

5) 胃癌細胞의 增殖抑制效果 測定[17]

胃癌細胞 增殖抑制效果를 檢證하기 위하여 MTT assay를 施行하였다.

본 實驗은 3回에 걸쳐 施行되었다.

(1) MTT 溶液製作 및 處理

MTT(3-{4,5-Dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyltetrazolium bromide)5㎎ /㎖ 을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 調節한 후 0.22㎛ filter로 濾過하여 MTT stock solution을 만들었다. 그리고 10㎕ MTT를 100㎕의 cell suspension에 추가하였다.

(2) 酵素反應과 免疫螢光測定

MTT stock solution에 cell suspension을 添加한 狀態로 37℃에서 3時間 放置하여 보라색 formazan crystals가 形成된 후 absolute isopropanol에 녹아있는 100㎕ 0.04M HCl을넣어보라색formazan crystals가完全히溶解된후 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) reader(E-max, Molecular device, USA)를 이용하여 540nm의 波長에서 吸光度(O.D.,optical density)를 測定하였다.

6) 胃癌細胞의 apoptosis와 聯關된 遺傳子의 發顯에 대한 效果 測定[18-20]

胃癌細胞의 增殖 및 apoptosis와 聯關된 遺傳子의 發顯에 미치는 影響을 檢證하기 위하여 quantitative RT-PCR을 施行하였다.

(1) RNA 抽出

각각의 檢液이 投與된 胃癌細胞를 回收하여 遠心分離한 후 solution D(250g guanidine isothiocyanate in 293㎖ water, 0.75M sodium citrate 17.6㎖, 10% sarkosyl 26.4㎖, 0.1M 2-mercaptoethanol) 200㎕, 2M sodium acetate, pH 4.2, 20㎕ , water-saturated phenol 200㎕ , chloroform-isoamyl alcohol(49:1) 40㎕를 넣은 후 20분간 얼음에 보관하였다. 20분 후 12,000g에서 10분간 遠心分離한 후 上層液을 回收 同量의 isopropanol을 넣은 후 -20℃에서 12時間 동안 보관하였다. 다음날 다시 12,000g, 20분간 遠心分離한후 上層液을 버리고 ethanol 200㎕를 넣어 RNA를 洗滌한다. 洗滌한 RNA를 spectrophotometer를 利用하여 定量하였다.

(2) cDNA 合成

5x reverse transcription buffer (Gibco BRL, MD) 4㎕, 25mM $MgCl_2$ 4㎕, 10mM dNTP mixture 2㎕, RNase inhibitor (Promega, WI) 0.5㎕, AMV Reversetranscriptase (8U/㎕) (Gibco BRL. MD) 2㎕, Oligo-dT (0.5㎍/㎕) 1㎕, RNA 1㎍ (1㎍/㎕), H_2O 5.5㎕의 試料를 混合한 후 42℃

C에서 30분간 反應시켜 cDNA를 製作하였다. 製作된 cDNA는 連鎖重合反應의 敏感度를 높이기 위하여 1:4로 稀釋하였다.

(3) RT-PCR

GAPDH primer(sense; 5'-atgtctcagagcaaccgggag-3', antisense; 5'-tttccgactgaagagtgagc-3')에 대하여 다음의 過程을 施行하였다.

① 滅菌된 0.5㎖ microtube에 다음의 試料를 混合하였다.

sterile H_2O	30㎕
10x PCR amplification buffer	10
mixture of dNTP, each at a concentration of 1.25 mM	16㎕
GAPDH primer(in 5㎕ of H_2O)	10p moles
template cDNA(up to 1㎕)	
H_2O to a final volume of 100㎕	

② 試料混合物을 5분간 94℃에서 加熱하여 DNA를 denaturation하였다.

③ 0.5㎕ of Taq DNA polymerase(5 units/㎕)를 添加하였다.

④ 100㎕ of light mineral oil를 넣었다.

⑤ 다음의 條件으로 PCR反應을 施行하였다.

Primer	GAPDH
Denaturation	45sec at 94℃
Annealing	30sec at 58℃
Polymerization	45sec at 72℃
Cycle	36cycle

(4) 電氣泳動 및 定量化

PCR product 10㎕를 2% agarose gel에 loading하여 80V에서 20분간 電氣泳動을 施行한 뒤 다시 ethidium bromide solution에서 10분 동안 染色한 후 UV transillum inator로 觀察하였다. 이를 Gel-doc system(Bio-Rad, CA)과 densitometry를 利用하여 定量化(Quantitation)하였다.

위 結果를 바탕으로 band의 밝기에 따라 template cDNA의 量을 增減하여 相對的으로 cDNA의 量을 同一하게 調節하였다. 이후 Bcl-2 primer(sense; 5'-actctgctcagtttcgccct-3', antisense; 5'-ttgtggctcagataggcac-3'), Bax primer(sense; 5'-atggacgggtccggggagca-3', antisense; 5'-tgttactgtccagttcgtcc-3'), Bcl-XL primer(sense; 5'-atgtctcagagcaaccgg-3', antisense; 5'-tctttccgactgaagagtg-3')를 使用하여 각각 다음의 條件으로 PCR 反應과 電氣泳動을 施行하여 gel-doc system(Bio-Rad, CA)과 densitometry를 利用하여 定量化(quantitation)한 후, 定量한 값을 GAPDH에 대한 값으로 나누어 각 遺傳子의 發顯 程度를 比較하였다. 이 實驗의 結果는 3회 反復하여 平均値로 나타냈다.

7) Mitochondria 膜透過度 및 膜電位 變化 測定[21]

細胞 培養 배지에 100㎛M의 rhodamine 123을 넣은 후 30분간 37℃ CO_2 incubator에 保管하였다. 이후 PBS로 3회 洗滌한 후 flow cytometry로 螢光을 測定하였다.

8) 胃癌細胞 週期測定 (cell cycle analysis)[22]

細胞를 10cm dish에 80%의 confluence가 되

Primer	Denaturation	Annealing	Polymerization	Cycle
Bcl-2	30sec at 94℃	45sec at 57℃	45sec at 72℃	35Cycle
Bax	30sec at 94℃	45sec at 57℃	45sec at 72℃	36Cycle
Bcl-XL	30sec at 94℃	45sec at 55℃	60sec at 72℃	38Cycle

도록 분주한 후 apoptosis assay 절반농도의 藥物을 處理한 후 12時間 뒤에 細胞를 回收하여 PBS에 洗滌한 후, 70% ethanol로 4℃에서 2시간동안 固定시키고 다시 PBS로 5분간 3번씩 洗滌해 준 후 100ug/ml 의 RNAse A와 50ug/ml 의 propidium iodide(Sigma P 4170)를 細胞에 넣어주고 4℃ 암실에서 1시간 동안 염색한다. 이것을 flow cytometer(유세포 분석기)로 측정해서 細胞週期를 분석하였다.

9) Caspase cleavage assay[23]

培養中인 細胞에 1ml당 5ul, 10ul의 鬱金 處理하고 24時間 후에 細胞를 回收한다. 대조군으로는 鬱金을 처리하지 않은 細胞를 사용하여 回收한 대조군과 실험군 세포에 lysis buffer (50mM HEPES, pH7.4, 100mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1mM DTT, 0.1mM EDTA)를 넣고 4 ℃에서 5분간 방치한후 13000rpm으로 10분간 遠心分離하여 上層液을 얻었다. 이 上層液을 20ul씩 96well plate에 분주하고 caspase 3, caspase 9 substrate와 섞어준 후 405nm의 파장에서 吸光度를 測定하였다.

10) Annexin V staining[24]

적정한 濃度의 藥物로 處理된 胃癌細胞를 回收한 후 PBS로 洗滌한다. Annexin binding buffer (0.1 M Hepes /NaOH (pH 7.4), 1.4M NaCl, 25mM $CaCl_2$. The solution was 0.2μm sterile filtered)로 1회 洗滌한 후 Annexin V-FITC로 染色한다. 다시 Annexin binding buffer로 洗滌한 후 flow cytometry로 測定하였다.

본 實驗에서는 annexin V가 染色되어 apoptosis가 일어났는지의 여부를 형광현미경과 flowcytometer (유세포분석기)로 測定하였다.

3. 統計處理

각 藥物의 藥效 持續 時間의 有意性 檢定은 paired student's t-test로 統計處理하였으며, $p<0.05$를 有意性있는 結果로 判斷하였다.

Ⅲ. 成　　績

1. 胃癌細胞의 形態學的 所見

胃癌細胞에 鬱金을 각각 5$\mu l/ml$(Sample Ⅰ)와 10$\mu l/ml$(Sample Ⅱ) 농도로 投與하고 24時間 經過 後 胃癌細胞를 核染色(DAPI법)하여 胃癌細

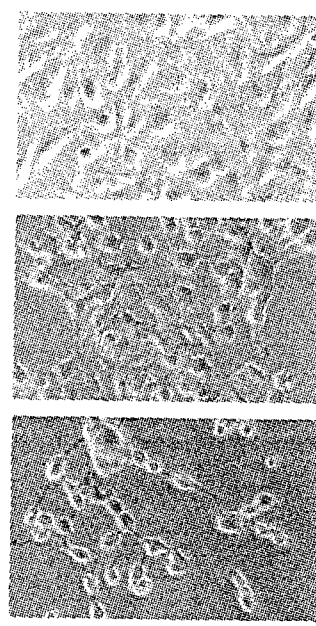

Fig. 1. Morphological changes of stomach cancer cells.

Sample Ⅰ : AGS stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5$\mu l/ml$ after 24hrs

Sample Ⅱ : AGS stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10$\mu l/ml$ after 24hrs

胞의 形態學的 變化를 inverted microscope下에서 觀察하여 그 結果를 Fig.1에 나타내었다.

對照群의 경우 胃癌細胞가 附着性 細胞이기 때문에 세포 배양 plate에 세포가 온전한 모양으로 부착되어 있으나 檢藥으로 처리한 Sample Ⅰ과 SampleⅡ는 모두 세포가 손상을 입어 둥그란 모양으로 오그라들며 plate에서 떨어져 나와 부유되면서 죽어가고 있었다. 細胞殺傷效果는 鬱金의 농도에 비례하여 Sample Ⅰ에 비하여 SampleⅡ에서 현저하게 나타났다.(Fig. 1)

2. 胃癌細胞 殺傷效果

胃癌細胞의 殺傷效果를 時間의 變化에 따라 測定하기 위해서 trypan blue exclusion test를 시행하였다. 細胞를 회수한 후 $10^6/ml$의 농도로 細胞液을 만든 후 細胞液, HBSS, 0.4% trypan blue를 각각 0.5 ml, 0.3 ml, 0.2 ml의 비율로 섞은 후 5분간 放置한 후 10분 이내에 푸르게 染色된 細胞의 비율을 Inverted microscope하에서 測定하였다. 對照群과 實驗群에서 dead cells의 개수를 %로 換算하여 나타내었다.

實驗結果 Sample Ⅰ에서는 0時間, 6時間, 12時間, 24時間, 36時間의 dead cells의 比率이 각각 1.3%, 33.3%, 44.7%, 63.7% 및 79.3%로 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 높아지는 傾向을 보였으며 모두에서 統計學的 有意性을 나타내었다.

Sample Ⅱ에서도 0時間, 12時間, 24時間, 36時間 및 48時間의 dead cells의 比率이 각각 1.7%, 46.0%, 61.7%, 79.7% 및 90.7%로 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 높아지는 傾向을 보였으며 모두에서 統計學的 有意性을 나타내었다.

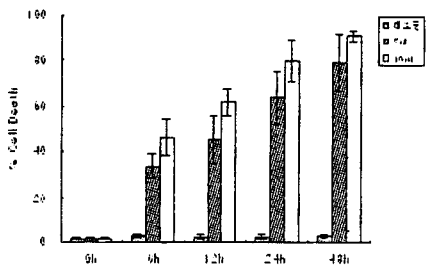

Fig. 2. Trypan blue exclusion analysis on dead cells of stomach cancer cells induced by Curcuma longa L..

Control : stomach cancer cells not treated.
Sample Ⅰ: stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5$\mu l/ml$.
Sample Ⅱ: stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10$\mu l/ml$.

Table I. Trypan Blue Exclusion Analysis on Dead Cells of Stomach Cancer Cells Induced by Curcuma longa L.

Group	Dead Cells(%)				
	0h	6h	12h	24h	48h
Control	1.7±0.6a	2.7±0.6	2.3±0.6	2.3±1.5	2.7±0.6
Sample Ⅰ	1.3±0.6	33.3±5.0*	44.7±10.4*	63.7±11.5*	79.3±12.5*
Sample Ⅱ	1.7±0.6	46.0±7.9*	61.7±5.7*	79.7±8.7*	90.7±2.5*

a: Mean ± S.D.
* : Statistically significant compared with control data(* : $p<0.05$)
Control : Stomach cancer cells not treated.
Sample Ⅰ : Stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5$\mu l/ml$.
Sample Ⅱ : Stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10$\mu l/ml$.

이 結果로 보아 鬱金은 藥物處理後 6시간 經過時부터 統計的으로 意味있는 殺傷效果를 보였으며 時間의 經過에 따라 더 강한 殺傷效果가 있으며, Sample Ⅰ에 비하여 Sample Ⅱ에서 보다 뚜렷한 效果를 보임으로서 濃度 依存的 效果가 있음을 알 수 있었다(Table Ⅰ, Fig. 2).

3. 胃癌細胞 增殖抑制效果 測定

10㎕ MTT stock solution (MTT 5㎎/㎖ in PBS, pH 7.5)을 100㎕ 의 cell suspension (106/㎖)에 넣은 후 37°C에서 3時間 放置한 다음 100㎕의 0.04M HCl in isopropanol을 넣은 후 잘 混合한 후 곧 ELISA reader를 利用하여 570nm의 波長에서 吸光度를 測定하였다.

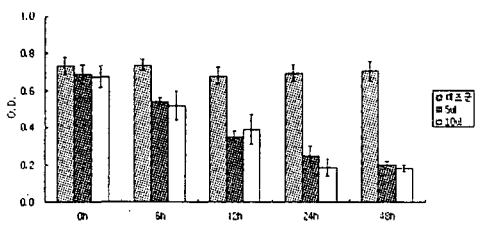

Fig. 3. Effects of Curcuma longa L. on human stomach cancer cells growth using MTT assay.

Control : stomach cancer cells not treated.
Sample Ⅰ: stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.
Sample Ⅱ: stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

Optical density(O.D)가 Sample Ⅰ에서는 對照群과 比較하여 6時間, 12時間, 24時間, 36時間에 각각 0.54, 0.35, 0.24, 0.20 으로 抑制效果를 나타내었고, Sample Ⅱ에서는 각각 0.52, 0.39, 0.18, 0.18 의 抑制效果를 나타내었다. 따라서 Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ는 모두 有意性있는 癌細胞 增殖抑制效果를 나타내었지만 鬱金의 농도에는 胃癌細胞의 增殖抑制效果가 影響을 받지 않는 것으로 나타났다.

이 結果로 보아 鬱金의 胃癌細胞 增殖抑制效果는 시간의 경과에 따라 유의성 있게 증가함을 알 수 있다(Table Ⅱ, Fig. 3).

4. 胃癌細胞의 Apoptosis와 聯關된 遺傳子 發顯에 미치는 效果

鬱金의 胃癌細胞 殺傷效果에 관한 기전을 알기 위해서 細胞死滅을 유도하는 遺傳子의 發顯을 조사하였다. 對照群과 鬱金을 投與한 對照群 사이에 quantitative RT-PCR을 시행하였다. 細胞의 遺傳子 發顯에 있어서 중요한 役割을

Table Ⅱ. Effects of Curcuma longa L. on the Cellular Viability of Stomach Cancer Cells

Group	O.D.(Optical Density)				
	0h	6h	12h	24h	48h
Control	0.73±0.05a	0.74±0.03	0.68±0.04	0.69±0.05	0.70±0.05
Sample Ⅰ	0.69±0.05	0.54±0.02*	0.35±0.03*	0.24±0.06*	0.20±0.02*
Sample Ⅱ	0.67±0.06	0.52±0.08*	0.39±0.08*	0.18±0.05*	0.18±0.02*

a: Mean ± S.D.
* : Statistically significant compared with control data(* : p<0.05)
Control : Stomach cancer cells not treated.
Sample Ⅰ : Stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.
Sample Ⅱ : Stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

하는 RNA를 抽出하고 이것을 利用, cDNA를 合成하고 primer를 製作하여 PCR 反應을 施行하였고, 만들어진 PCR product를 전기영동을 거쳐 densitometry를 施行하였다. apoptosis와 關聯이 있는 bcl-2, bcl-XL, bax遺傳子 등의 發顯에 있어서 그 結果를 Table Ⅲ에 나타내었다.

Bcl-2 遺傳子의 發顯率은 對照群에서는 0.79로 나타났고 Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ에서 各各 0.39, 0.41로 나타나 bcl-2 遺傳子의 發顯에 有意性있게 抑制되었다. bcl-XL 遺傳子의 發顯率은 對照群에서는 0.76으로 나타났고 Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ에서 各各 0.66, 0.45로 나타나 bcl-XL 遺傳子의 發顯도 有意性있게 抑制되었다. Bax 遺傳子의 發顯率은 對照群에서는 0.51로 나타났고 Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ에서 각각 0.63, 0.49로 나타나 bax 遺傳子의 發顯에 有意性있는 變化가 없었다.

이 結果로 보아 鬱金은 胃癌細胞의 apoptosis를 억제하는 bcl-2, bcl-XL遺傳子의 發顯에 有意性있는 影響을 미쳐 細胞死滅을 誘發하는 效果가 인정되었다(Table Ⅲ, Fig. 4).

Table Ⅲ. Effects of Curcuma longa L. on Gene Levelation in Human Stomach Cancer Cells by RT-PCR

Group	Gene Revelation		
	Bcl-2/ GAPDH	Bcl-XL/ GAPDH	Bax/ GAPDH
Control	0.79	0.76	0.51
Sample Ⅰ	0.48*	0.63*	0.54
Sample Ⅱ	0.41*	0.45*	0.51

* : Statistically significant compared with control data(* : $p<0.05$)

Control : Stomach cancer cells not treated.

Sample Ⅰ : Stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.

Sample Ⅱ : Stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

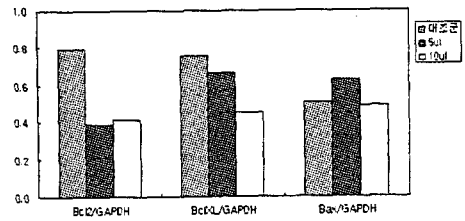

Fig. 4. Effects of Curcuma longa L. on gene revelation in human stomach cancer cells by RT-PCR.

Control : stomach cancer cells not treated.

Sample Ⅰ : stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.

Sample Ⅱ : stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

5. Mitochondria 膜透過度 및 膜電位 變化에 대한 效果

Mitochondria Permeability Transition Pore(MPTP)는 apoptosis의 과정에 있어서 決定的 役割을 하는 것으로 알려져 있다.[19]

Mitochondria가 膨脹하게 되었을 때 빛을 쪼이면 投射되는 量은 늘어나고 吸光되는 量은 은 줄어든다.

본 실험에서 Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ에서 모두 吸光度가 감소하는 것으로 관찰되어 鬱金이 癌細胞내 mitochondria의 膜透過度에 影響을 미쳐 膨脹을 誘導하는 것으로 나타났다(Table Ⅳ).

그래프상의 가로축 높은 쪽으로 갈수록 膜電位度가 높은 것이며, 對照群에 비하여 Sample Ⅰ과 sample Ⅱ 에서는 時間이 지날수록 膜電位度가 낮아짐을 볼 수 있었다.

이 結果로 보아 鬱金處理群에서 對照群에 비하여 螢光度로써 測定한 mitochondria의 膜電位 결과에서도 Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ에서 用量에 比例하여 mitochondria의 膜電位를 감소시킴으로써 細胞死滅을 誘導하는 것으로 나타났다

Table IV. Effect of Curcuma longa L. on Change of Mitochondria Membrane Permeability (permeability transition)

Group	O.D.(Optical Density)				Ratio
	1st	2nd	3th	Mean	
Control	0.65	0.72	0.69	0.69	1.00
Sample Ⅰ	0.23	0.34	0.27	0.28*	0.41
Sample Ⅱ	0.28	0.39	0.32	0.30*	0.43

* : Statistically significant compared with control data(* : $p<0.01$)

Control : Stomach Cancer Cells Not Treated.

Sample Ⅰ : Stomach Cancer Cells Treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.

Sample Ⅱ : Stomach Cancer Cells Treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

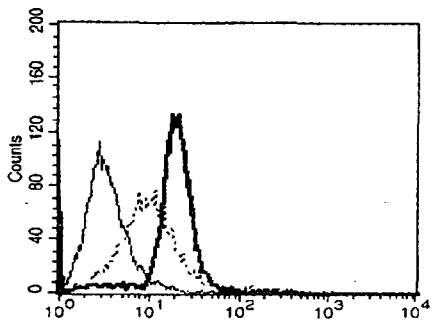

Fig. 5. Effects of Curcuma longa L. on the membrane potential of mitochondria of stomach cancer cells.

Bold : stomach cancer cells not treated.

Dot : stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.

Thin : ctomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

(Fig. 5).

6. 胃癌細胞 週期에 미치는 效果

鬱金의 殺傷效果기전을 알아보기 위해 Propidium iodide(PI)로 세포주기를 분석하였다. PI 는 DNA binding dye로서 PI 로 染色된 細胞를 유세포분석기로 測定하게 되면 각 細胞의 DNA 량을 測定하여 각각의 G1, S, G2, M phase의 특징적인 peak를 알 수 있게 된다.[21]

본 實驗에서 대조군에서는 보통의 癌細胞와 같이 2개의 peak를 보이는 반면, Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ에서는 모두 peak 가 사라지고 그래프의 가로축 왼쪽이 두껍게 나타났다. 이러한 現狀은 세포내 DNA 가 깨져서 나타나는 현상으로 鬱金의 毒性으로 細胞週期가 정지되는 것이 아니라 DNA 가 깨져서 胃癌細胞에 대한 毒性을 나타냄을 알 수 있다(Fig. 6).

7. Caspase cleavage assay

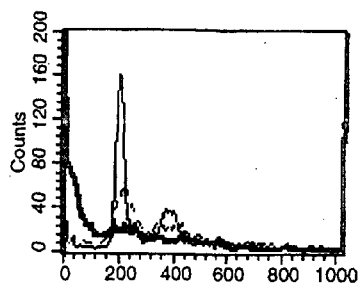

Fig. 6. Effects of Curcuma longa L. on the cycle of apoptosis of stomach cancer cells.

Bold : stomach cancer cells not treated.

Dot : stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.

Thin : ctomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

細胞死의 기전 중 하나인 細胞內 caspase 活性化로 인한 蛋白質破壞의 정도를 알아보기 위하여 caspase 3과 caspase 9의 活性度를 測定하였다.

實驗結果 대조군에서는 caspase3, 9 모두 活性化되지 않았으나 鬱金을 處理한 實驗群에서는 caspase 3, 9 모두 活性化되었으며 Sample Ⅰ에서보다 Sample Ⅱ에서 더 活性化 되었다.

이 結果로 보아 鬱金에 의한 細胞死滅效果는 鬱金의 毒性으로 細胞內 caspase 가 活性化되어 일어나는 것이며 이 효과는 鬱金의 濃度에 比例하여 나타남을 알 수 있었다(Fig. 7).

8. Annexin V staining

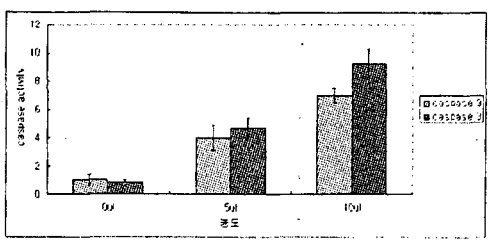

Fig. 7. Effects of Curcuma longa L. on apoptosis in human stomach cancer cells by Caspase assay.

Control : stomach cancer cells not treated.
Sample Ⅰ : stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖.
Sample Ⅱ : stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖.

鬱金에 의한 胃癌細胞의 死滅이 Apoptosis임을 알아보기 위해 Annexin V staining을 하였다. Annexin V 는 細胞膜에 存在하는 phosphatidylserin과 結合하는 蛋白質로써 細胞에 apoptosis 가 일어나면 細胞膜內에 存在하던 phosphatidylserin이 細胞外膜으로 이동하여 注入된 Annexin V 항체와 結合하여 細胞에 apoptosis가 일어났음을 알 수 있게 된다. 또한 phosphatidylserin이 細胞內膜에서 細胞外膜으로 이동하는 變化는 apoptosis과정 중 초기단계에 일어나는 변화로서 본 實驗에서는 鬱金을 處理하고 12시간 經過後 測定하였다.

胃癌細胞에 鬱金을 處理하고 12시간후 細胞를 回收하여 Annexin V로 染色한 후 형광현미경으로 觀察한 結果 AnnexinV 와 結合된 phosphatidylserin이 초록색으로 관찰되었다. 대조군에서는 phosphatidylserin이 細胞膜內에 存在하여 대부분 染色되지 않았으나 Sample Ⅰ과 sample Ⅱ에서는 선명한 초록색이 觀察되며 鬱金의 濃度가 진할수록 더욱 뚜렷하였다(Fig. 8).

현미경적 변화를 확인하기 위하여 染色한 細胞를 유세포측정기로 분석한 결과 대조군에 비

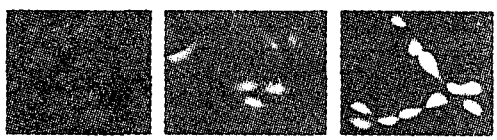

Fig. 8. Morphological changes of stomach cancer cells by annexin V staining.

Sample Ⅰ : AGS stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5㎕/㎖ after 24hrs
Sample Ⅱ : AGS stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10㎕/㎖ after 24hrs

해 鬱金으로 處理한 細胞에서 apoptosis가 더 많이 진행되어 그래프의 가로축 오른 쪽으로 더 많이 이동되고 있음을 알 수 있으며 Sample Ⅰ에서보다 sample Ⅱ에서 더 많은 위치이동을 볼 수 있으며 이는 濃度에 比例하여 殺傷效果가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 9).

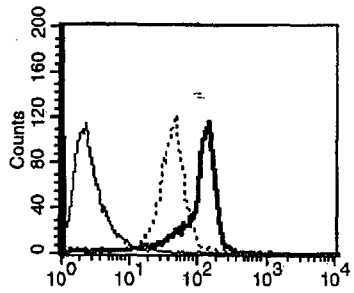

Fig. 9. Effects of Curcuma longa L. on the cycle of apoptosis of stomach cancer cells.

Bold : stomach cancer cells not treated.
Dot : stomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 5$\mu l/ml$.
Thin : ctomach cancer cells treated with Curcuma longa L. 10$\mu l/ml$.

IV. 考　察

癌은 惡性腫瘍을 指稱하는 것으로 組織의 自律的인 過剩 成長이며, 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 대해 破壞的인 것이라고 정의된다.[25] 이는 個體를 構成하는 正常細胞가 여러 가지 자극에 의하여 遺傳子의 形質變換이 發生하고 그 결과 細胞의 形態學, 生物學, 物理學, 免疫學的 行動이 변한 變形細胞가 遺傳的으로 대를 이어 無節制한 增殖을 함으로서 形成된 變形細胞의 集團을 말하는 것으로 全身性 疾患으로 局部에서 浸潤成長을 하거나 다른 部位로 擴散과 轉移를 일으켜 正常的인 組織器官을 破壞할 뿐만 아니라 壓迫, 硬阻, 感染, 出血 등을 惹起하며, 宿主에게 一連의 代射障碍와 營養障碍 등을 일으켜 抗病力을 弱化시켜 대부분 死亡에 이르게 한다.[25-30] 이러한 癌의 發生기전은 크게 2가지로 설명될 수 있는데 하나는 癌遺傳子를 비롯한 여러 가지 成長因子들의 非調節的 發顯에 의한 과다한 細胞分裂이며 다른 하나는 過剩한 細胞 또는 이상이 있는 細胞를 제거하는 세포의 자연사(自己殺害能, apoptosis) 조절기전의 이상이라고 볼 수 있다.[26]

胃癌의 일반적인 原因은 食餌的 要因, 環境的 要因, 遺傳的 要因, 先行前驅病變 등으로 區分할 수 있으며 初期症狀은 뚜렷하지 않아서 전혀 아무런 症狀을 못 느끼는 경우도 있지만, 주로 食慾不振, 體重減消, 消化不良, 食後의 心窩部膨滿感, 貧血, 衰弱 등이 나타날 수 있고, 胃癌이 進行되는 과정에서 惡心, 嘔吐, 胃脘痛, 嚥下困難, 嘔血, 黑糞 등이 나타날 수 있다.[31,32]

胃癌의 診斷은 症狀이 있을 때 檢査하여 診斷하는 경우와 症狀은 없으나 檢診시 診斷되는 경우가 있는데, 보통은 放射線撮影과 胃內視鏡 및 胃內視鏡下生檢을 施行함으로써 診斷이 可能하다. 그러나, 우리나라에서는 아직 早期 診斷으로 찾아내지 못하고 癌이 進行된 후에야 診斷이 可能한 境遇가 많은 실정이며 실제 診斷당시 完治가 可能한 切除律은 40% 以下이다.[33-36]

胃癌에 대한 治療法으로는 外科的 手術療法, 抗癌藥物療法, 放射線療法, 免疫療法, 遺傳子療法 등이 알려져 있다. 胃癌의 治療成敗는 어느 정도 早期에 治療를 했는가에 左右되는데 일단 癌이 발견되면 一次的으로 根治的 手術療法이 考慮되며, 手術이후 微細轉移 및 殘留癌細胞의 可能性 때문에 根治的 切除手術이라고 믿는 경우에도 가능한 빨리 免疫療法과 化學療法을 施行하는 集合的 治療가 原則이다.[37] 그러나 手術療法은 早期 治療時에는 完治 可能性이 있지만 末期나 轉移되어 再發한 癌에 대해서는 적용이 어렵고, 放射線療法은 局部治療方法의 하나로서 癌細胞에 대한 消滅 또는 抑制效果가 뛰어난 동시에 正常細胞를 無分別하게 破壞하는 短點을 갖고 있다.[38,39] 그 외에 免疫

療法도 腫瘍의 크기와 일부 要因에 의해 作用이 遮斷된 경우가 있어 限界가 있다.[40] 따라서 현시점에서는 抗癌化學療法이 癌治療 方法 중 가장 重要한 核心을 이루고 있다.

그러나 胃癌의 治療에 사용되는 抗癌劑의 作用機轉은 주로 癌細胞의 DNA에 損傷을 招來하여 癌細胞의 細胞分裂을 遮斷하거나 細胞가 成長을 막는데 現在까지 開發된 抗癌劑의 가장 큰 短點은 抗癌劑의 非特異的 作用이라 할 수 있으며 이로 인해 化學療法은 매우 심각하거나 生命을 위협하는 毒性을 일으킨다.[41,42]

抗癌劑가 癌細胞뿐만 아니라 正常細胞까지도 毒性을 나타내어 腫瘍細胞를 死滅하는 同時에 骨髓造血機能을 抑制하고 消化器官 및 全身에 反應하여 副作用을 誘發하여 人體의 免疫機能을 降下시키는 問題點이 露出된다는 점에서 抗癌治療劑의 副作用을 減少시키면서 癌細胞에 대해 特異的 毒性을 나타내는 治療法의 開發이 要求되고 있으며 合成物質이 아닌 天然物質에서 開發하려는 勞力이 試圖되고 있다.[43,44]

韓醫學에서는 胃癌이라는 명칭은 없으나 胃癌에 關聯된 用語로는 脾積, 伏梁, 胃脘癰, 噎膈, 反胃, 心下痞 등의 病症에서 類似性을 찾을 수 있으며[45], '朝食暮吐' '心之積' '伏梁' 등도 유사하다는 견해가 있다.[6] 이들의 治法은 크게 溫陽과 疏氣의 治法을 强調하고 있으며 活血祛瘀, 建脾利氣, 化痰軟堅 등의 治法이 活用되었다.[46,47]

韓醫學的 病因病機를 살펴보게 되면 胃癌은 氣滯鬱結, 情志失調, 飮食不節, 脾胃虛寒, 氣滯血瘀로 因하여 發生하게 되며 辨證分型에 있어서는 肝胃不和, 胃熱傷陰, 脾胃虛寒, 瘀毒內阻, 脾虛痰濕, 氣血雙虧라 區分하여 治療의 基準으로 삼고 있다.[25] 이를 病期別로 나누어 보면 胃癌早期에는 肝氣鬱結, 脾胃陽虛證型이 많이 나타나고 中期에는 濕濁內生, 血瘀痰凝證型이 많이 나타나고 晩期胃癌에는 胃熱津傷, 氣血雙虧, 瘀毒內阻가 많이 나타난다고 하였다.[48,49]

胃癌의 治法은 益氣健脾, 滋陰養血, 養陰生津, 溫補腎陽, 滋補强壯 等의 扶正固本法, 行氣散結, 疏肝理氣, 攻堅破積消脹, 活血化瘀, 化痰通絡, 淸熱解毒 等의 祛邪法 및 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法이 活用된다.[50]

韓醫學界의 癌硏究動向은 抗癌效果가 인정되는 韓藥材와 韓藥處方을 對象으로 細胞毒性, 細胞分化, 抗癌藥物間의 相乘作用, 腫瘍免疫, 自己殺害能(Apoptosis), 抗癌濟와 放射線療法의 副作用減少 등에 관한 硏究가 수행되는 한편, 分子生物學, 遺傳子療法, 血管新生(Angiogenesis) 및 信號傳達體系 등의 硏究의 必要性이 대두되면서 이에 대한 硏究가 진행되고 있다.[44]

旣存의 抗癌에 대한 實驗論文은 韓藥의 抗癌作用, 免疫反應, 抗癌劑와의 倂用投與, 抗癌劑 副作用의 抑制 등이 큰 硏究 課題로 進行되고 있으며 藥物은 크게 單味와 複合劑로 나누어진다. 지금까지 韓醫學界에서 抗癌作用과 관련하여 實驗된 單味들은 주로 活血化瘀, 淸利濕熱, 化痰散結, 通絡止痛 등의 祛邪法의 범주에 포함되는 藥劑가 대부분인데 이에는 紫菀, 一枝黃花, 黃藥子, 白花蛇舌草, 半支蓮, 巴豆, 大黃, 敗將草, 猪苓, 穿山甲, 柳根皮, 洞風菜, 蒼耳草, 蘇葉 등이 있다.[52-54]

最近에는 分子生物學的인 方法으로 胃癌細胞에 대한 抗癌效能이 있는 藥物에 대한 實驗的硏究가 활발하게 이루어지고 있는데, 蛇梅,[56] 斑猫,[57,58] 木香, 車前草[59], 白花蛇舌草,[60] 卷柏, 黃藥子,[61] 山慈姑[62,63] 등의 單味 藥物들이 抗癌效能을 가지고 있음이 硏究되었으며 앞으로 胃癌의 治療率을 높이기 위하여 韓藥材의 有效成分糾明과 臨床適用이 필요한 實情이다.

鬱金은 活血去瘀藥으로 分類[9]되며 혹은 通

氣藥으로 分類7되기도 하는 生薑科에 속하는 多年生 宿根草本인 鬱金의 뿌리를 건조한 것으로 가을과 겨울에 莖葉이 萎萊한 후 採取하여 끓는 물에 넣어 삶거나 쪄서 건조한 것이다. 性味는 凉無毒而辛苦하며 心肝肺膽經으로 入하여 行氣化瘀 淸心解鬱 利膽退黃 하여 治經閉通經 胸腹脹痛 刺痛 熱病神昏 癲癎發作 黃疸尿赤諸出血 등에 사용하며 陰虛失血者와 氣滯瘀血이 없는자, 妊婦는 禁用한다.[9,64]

<新修本草>에서는 "味辛寒無毒, 治血積 下氣 生肌 止血 破惡血 治血淋 血尿 療金瘡"한다[65]고 하고, <本草綱目>에서는 "治血氣心腹痛 産後敗血冲心 失血癲癎"[66] 라 하였으며, <申氏本草> 에는 通經制로서 健胃 利膽 鎭痛작용을 하여 月經不調 經行困難 胸腹痛 脇痛 血氣諸痛 肝鬱脇痛 등에 常用하여 最近에는 胃潰瘍, 胃痙攣, 癌腫出血(肝癌 胃癌 肺癌 子宮癌 膀胱癌 直腸癌)에 사용하고 治氣中血滯로 食慾不振, 消化不良, 黃疸, 膽石, 鬱狂 등을 治하고 破血中之滯하여 吐衄 血尿 婦人逆經 敗血攻心 등을 治한다[9]고 하였다.

이러한 鬱金의 活血祛瘀, 通氣效能으로 볼 때 正常細胞에는 毒性이 없으면서도 胃癌細胞에 대한 抑制 및 殺傷效果가 기대되어 胃癌治療 藥物開發의 一環으로 本 硏究에 임하게 되었다.

鬱金의 胃癌細胞株에 대한 抗癌 效能을 硏究하기 위하여 胃癌細胞株(AGS)에 鬱金을 藥物處理한 후 trypan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷效果를 測定하였고, MTT assay를 施行하여 胃癌細胞의 增殖抑制效果를 測定하였으며, 定量的 RT-PCR을 利用하여 細胞의 增殖 및 apoptosis와 聯關이 있는 遺傳子에 미치는 效果를 觀察하고, mitochondria 膜透過度 및 膜電位 變化, 細胞週期, 세포내 caspase 활성화, Annexin V staining 등을 觀察하여 다음과 같은 成績을 얻어 그 意味를 分析해보고자 한다.

胃癌細胞에 鬱金을 각각 5㎕/㎖(Sample Ⅰ)와 10㎕/㎖(Sample Ⅱ) 농도로 投與하고 24時間 經過 後 胃癌細胞와 細胞核을 核染色(DAPI법)하여 胃癌細胞의 形態學的 變化를 inverted microscope下에서 觀察한 결과 藥物을 투여한 Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ 모두 세포가 손상을 입어 동그란 모양으로 오그라들며 plate에서 떨어져 나와 부유되면서 죽어가고 있었으며, 세포가 죽어가는 樣相은 藥物의 농도에 비례하여 Sample Ⅰ에 비하여 Sample Ⅱ에서 더 많은 殺傷效果를 보임을 알 수 있었다.

胃癌細胞의 殺傷效果를 時間의 變化에 따라 測定하기 위해서 trypan blue exclusion test를 시행하였다. 본 實驗에서 使用한 trypan blue exclusion test는 細胞의 生存能力을 測定하는 方法으로 死滅되는 細胞만 染色되는 特徵을 利用하여 그 染色된 정도로 殺傷效果를 판단하는 것으로細胞를 회수한 후 dead cells의 개수를 %로 煥算하여 나타내었다.

實驗結果 Sample Ⅰ에서는 0時間, 6時間, 12時間, 24時間, 36時間의 dead cells의 比率이 각각 1.3%, 33.3%, 44.7%, 63.7% 및 79.3%로 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 높아지는 傾向을 보였으며 모두에서 統計學的 有意性을 나타내었고, Sample Ⅱ에서도 0時間, 12時間, 24時間, 36時間 및 48時間의 dead cells의 比率이 각각 1.7%, 46.0%, 61.7%, 79.7% 및 90.7%로 時間이 經過함에 따라 殺傷效果가 높아지는 傾向을 보였으며 모두에서 統計學的 有意性을 나타내었으며, Sample Ⅰ에 비하여 Sample Ⅱ에서 보다 뚜렷한 效果를 보임으로써 濃度 依存的 效果가 있음을 알 수 있었다.

癌細胞 增殖抑制效果를 分析하기 위해서 癌細胞를 培養器에서 培養하면서 다양한 濃度의 抗癌劑를 投與하여 細胞의 增殖정도를 알 수

있는 MTT assay를 통하여 抑制效果를 客觀的으로 分析하였다.

MTT assay는 細胞內 mitochondria의 tricarboxylic acid cycle에 關與하는 酵素인 succinate dehydrogenase에 의해 黃色의 MTT가 보라색의 formazan으로 變하는 정도를 比色 定量함으로써 抗癌劑의 感受性을 評價하는 方法이다. 따라서 細胞의 viability에 따라 MTT-formazan의 量이 달라지며 이를 適切한 溶媒에 作用시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 細胞의 生存能力을 測定한다.[16,17]

Optical density(O.D)가 鬱金 5㎕/㎖處理群(Sample Ⅰ)에서는 對照群과 比較하여 6時間, 12時間, 24時間, 36時間에 각각 0.54, 0.35, 0.24, 0.20 으로 抑制效果를 나타내었고, 鬱金 10㎕/㎖處理群(Sample Ⅱ)에서는 각각 0.52, 0.39, 0.18, 0.18 의 抑制效果를 나타내었다. 이 結果로 보아 鬱金은 胃癌細胞의 Mitochondria의 탈수소효소작용을 억제시키고 그 세포의 viability를 감소시켜 細胞殺傷效果을 보이며 이는 시간의 경과에 따라 有意性 있게 증가함을 알 수 있으며 鬱金의 농도에는 影響을 받지 않는 것으로 나타났다.

最近 抗癌劑가 腫瘍細胞를 죽이는 方法 중에서 自己計劃 細胞死(programmed cell death, apoptosis)를 誘導한다는 硏究가 활발히 進行되고 있다.

Apoptosis는 不必要한 細胞를 除去하는 機作으로 多細胞 生物의 發生過程과 恒常性 維持에 重要한 役割을 한다. 生體構造의 形成, 不必要한 構造의 除去, 非正常的이거나 害가 되는 細胞의 除去, 細胞數의 調節 등이 apoptosis를 통해 일어난다. 外部作用에 의해 일어나는 細胞의 죽음인 necrosis에서는 죽는 細胞는 부피가 커지면서 결국에는 細胞가 터지고, 밖으로 噴出된 細胞質에 의해 炎症反應을 일으키는 반면, apoptosis에서는 細胞부피의 縮小, 細胞膜突出, membrane-bound apoptotic body 形成, 核의 染色質 濃縮, DNA 斷片化 등이 일어나고, 죽은 細胞는 이웃細胞의 大食作用에 의해 사라지게 된다. Apoptosis는 細胞의 增殖을 일으키는 mitosis와 相互牽制하여 필요한 만큼의 細胞數를 維持하게 된다.[68,69] 胎兒發生, 器官形成, 細胞媒介 免疫, 호르몬에 의한 組織退化, 腫瘍細胞의 退化 등 많은 分野에서 自己計劃 細胞死가 일어나고 있으며, 이러한 過程을 통해 生體는 不必要한 細胞를 除去하고 全體的인 恒常性을 維持할 수 있다. 또한 人爲的인 抗癌劑 投與로 인한 癌細胞의 破壞過程에서도 역시 觀察할 수 있다. 現在 抗癌劑로 널리 使用되는 藥劑 중에서 adriamycin, vinblastin, bleomycin, cis-platinum 등이 腫瘍細胞에서 自己計劃 細胞死를 誘導하는 代表的인 藥劑로 알려져 있다.[70]

이러한 細胞의 自己計劃 細胞死에는 여러 種類의 蛋白質 및 遺傳子가 關與하는데 代表的인 遺傳子로는 Bcl-2, Bax, Bcl-XL, fas, FAD, CPP32, bak 등이 있다. 이들 遺傳子는 細胞의 죽음에 깊이 關與하고 있으며 한 例로서 Bcl-2 遺傳子의 경우에 이 遺傳子가 多量으로 表現될 경우 細胞는 여러 種類의 有害한 刺戟으로부터 强力하게 抵抗할 수 있는 能力을 얻게 된다. 腫瘍細胞가 이런 遺傳子의 發顯을 통해 抗癌劑의 攻擊으로부터 抵抗하면서 持續的으로 分裂·增殖할 수 있는 것이다. 一部의 抗癌劑의 경우 이러한 遺傳子의 發顯을 抑制하거나 또는 細胞에서 죽음을 促進하는 遺傳子를 誘發함으로서 抗癌效果를 發揮할 수 있다.[68,71-73]

Bcl-2 遺傳子는 B細胞 淋巴腫 形成에서 發見되는 癌遺傳子로서 蛋白質 産物은 미토콘드리아 膜과 內形質世網 그리고 核膜에서 發現된다. 現在 Bcl-2 系列 蛋白質은 크게 細胞死滅을 誘導하는 蛋白質과 細胞死滅을 抑制하는 蛋白

質로 區分할 수 있다. 細胞死滅을 誘導하는 Bcl-2 系列蛋白質에는 Bax, Bid, Bak, Bad 등이 있으며 細胞死滅을 抑制하는 Bcl-2 系列蛋白質에는 Bcl-2, Bcl-XL 등이 있다. Bcl-2 蛋白質의 作用機轉은 아직 확실히 밝혀져 있지는 않지만 過度하게 發顯이 增加될 경우 細胞에서 細胞死滅을 遮斷하여 細胞가 오래 동안 죽지 않고 生存하게 함으로서 癌細胞로 移行할 수 있는 기회가 增加되어 결국 腫瘍이 發生하리라고 생각된다. 따라서 Bcl-2 遺傳子의 發顯은 腫瘍의 進行과도 密接한 關係가 있어 이들이 過度하게 發顯될 경우 患者의 豫後가 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 現在는 實驗室的으로 進行되고 있지만 Bcl-2의 發顯을 抑制함으로서 腫瘍의 治療效果를 極大化시키려는 硏究가 매우 활발히 進行되고 있는 바, 이들의 發顯에 影響을 미치는 抗癌劑의 開發 및 發掘은 매우 重要한 過程이라 할 수 있다. 이러한 側面에서 볼 때 이들 遺傳子의 過度한 發顯 및 發顯 抑制는 癌細胞의 生存과 密接한 聯關이 있으며 抗癌劑가 이들 遺傳子의 發顯에 미치는 影響에 관한 硏究는 매우 重要하다고 할 수 있다.[68,73]

이 硏究에서는 鬱金이 의해 이러한 遺傳子들 중 어떤 遺傳子의 發顯이 抑制 또는 促進되는지를 quantitative RT-PCR(reverse transcription - polymerase chain reaction) 方法을 利用하여 測定함으로서 遺傳子의 變化에 대한 이 藥劑의 作用機轉을 살펴보았다. 이 方法은 特定 DNA 斷片을 試驗管內에서 重合酵素를 利用하여 增幅시키는 方法을 말하는데 이의 原理는 다음과 같다. 이 과정은 3단계로 나눌 수 있는데, 제 1 단계는 變性過程으로 溫度를 94-96℃으로 높여 特定 dsDNA를 變性시켜 ssDNA로 만드는 과정이고, 제 2단계는 結合過程으로 溫度를 낮추어 (55-72℃까지) primer들이 target DNA의 3′ 끝부분에 附着하도록 하는 과정이다. 이후 제 3단계는 延長過程으로 溫度를 72℃로 올려 Taq polymerase로 하여금 target DNA의 나머지 부분을 合成하게 한다. 현재는 이 3단계의 과정을 自動的으로 進行시켜 주는 裝置 즉, thermocycler가 開發되어 利用되고 있다. 이러한 과정을 反復함으로써 特定 DNA를 增幅시킬 수 있는데, 이 cycle 한 번마다 特定 DNA는 2배씩 增加하므로 30회를 反復시켰다면 理論上 230배로 增幅된다. 이렇게 增幅시킨 target DNA는 電氣泳動이나 DNA probe를 利用하여 檢出하게 된다.[18,68]

定量的 RT-PCR을 利用하여 抗癌 關聯 遺傳子의 定量的 mRNA 發顯을 分析한 結果 apoptosis를 억제하는 Bcl-2과 Bcl-XL의 發顯이 濃度에 比例하여 有意性있게 減少하였으나, apoptosis를 유도하는 Bax의 發顯에 대해서는 有意한 變化가 觀察되지 않았다. 그러므로, 鬱金은 apoptosis를 유도하는 Bax보다는 apoptosis를 억제하는 Bcl-2과 Bcl-XL의 發顯에 影響을 주어 apoptosis를 誘發한다고 볼 수 있다.

酸素呼吸을 하는 모든 細胞에 들어 있는 Mitochondria의 주된 機能은 산소의 存在하에서 呼吸基質을 酸化시켜 에너지(ATP)를 生産하는 것으로 細胞의 種類에 따라 수천 개가 들어 있는 경우도 있다. Mitochondria의 膜係는 電子傳達係와 酸化的 燐酸化反應에 關係되는 여러 가지 酵素가 排列되어 있어서 ATP 生成이 效率的으로 이루어질 수 있게 되어 있으며 이 膜電位는 細胞外 電位를 基準으로 해서 細胞內 電位를 測定한 것이다.[74]

Mitochondria는 apoptosis나 細胞壞死의 始作에 있어서 決定的인 役割者로서 細胞質內로 cytochrome c를 放出함으로써 細胞를 不可逆的으로 죽음에 이르게 할 수 있다. 이 과정에 있어서의 주된 役割者는 MPTP인데, 이는 正常的인 代射媒介에 關係된 蛋白質뿐만 아니라

apoptosis를 調節하는 蛋白質을 含有하고 있는 多蛋白 複合體로 1.5kDa이하의 分子에 대해서 透過性을 가지며, 基質內 Ca^{2+}의 增加된 狀況에서 mitochondria 內膜으로 열린다.[75] 이 MPTP의 開放은 apoptosis를 誘發하는 mitochondria 基質要素의 滲透壓的 膨脹을 惹起하고 이어서 mitochondria 外膜이 破壞되어 cytochrome c의 非特異的 流出을 惹起한다. 또한 mitochondria의 膜電位에도 影響을 줌으로써 cytochrome c의 非特異的 流出을 惹起하여 細胞死滅을 誘導한다고 알려져 있다.[76]

본 실험에서 對照群과 比較하여 鬱金煎湯液 5㎕/㎖와 10㎕/㎖에서 모두 吸光度가 有意性있게 減少하는 것으로 觀察되어 癌細胞내 mitochondria 膜透過度에 影響을 미쳐 膨脹을 誘導하는 것으로 나타났다. 또한 螢光度로써 測定한 mitochondria의 膜電位 결과에서도 對照群과 比較하여 鬱金煎湯液 5㎕/㎖와 10㎕/㎖에서 用量의 增加에 比例하여 mitochondria의 膜電位를 減少시킴으로써 細胞死滅을 誘導하는 것으로 나타났다.

細胞의 자기 복제 과정은 細胞週期라는 복잡한 조절과정을 進行, 反復하는 것으로 이 細胞週期는 네가지의 phase로 나누어진다. 染色體의 複製가 일어나는 S phase, 染色體의 凝縮과 分離가 일어나는 M phase, M phase와 S phase사이에 존재하는 G1 phase, S phase 와 M phase사이에 존재하는 G2 phase 로 구분된다. 이 細胞週期는 外部環境과 細胞의 狀態에 따라 調節되며 複雜하고 多樣한 分子들의 發顯과 活性에 依存하여 이루어 진다.[68]

鬱金의 殺傷效果기전을 알아보기 위해 propidium iodide(PI)로 細胞週期를 분석하였다. PI 는 DNA binding dye로서 PI 로 染色된 細胞를 유세포분석기로 測定하게 되면 각 細胞의 DNA양을 測定하여 각각의 G1, S, G2, M phase의 특징적인 peak를 알 수 있게 된다.

일반적인 細胞의 경우 보통 2개의 突出部를 볼 수 있는데 2n의 DNA含量을 가진 G1 細胞와 4n의 DNA含量을 가진 G2/M기의 細胞들이며 S기 세포의 DNA함량은 2n과 4n사이로 2개의 突出部가 있게 된다.[77,78]

본 實驗에서 대조군에서는 보통의 癌細胞와 같이 2개의 peak를 보이는 반면, Sample Ⅰ과 Sample Ⅱ에서는 모두 peak 가 사라지고 그래프의 가로축 왼쪽이 두껍게 나타났다. 이러한 現狀은 鬱金의 胃癌細胞 殺傷效果가 細胞週期를 停止시키는 necrosis 에 의한 것이 아니라 세포내 DNA 가 깨져서 나타나는 Apoptosis에 의한 것임을 알 수 있다.

細胞들은 외부의 여러자극들의 변화에 의해 매우 민감하게 반응하며, 細胞死滅 신호전달과정을 작동하게 되는데 이를 유도하거나 조절할 수 있는 여러 인자들이 밝혀지고 있다. 즉, TNFR(tumer necrosis factor receptor), CD95/Fas/Apol, DR(death receptor)3, DR4, DR5, NGFR(nerve groth factor receptor) 와 같은 세포막 수용체와 이들의 ligand 들, p53, pRb, CDK inhibitor 와 같은 세포주기 조절인자들, calpain, caspase 와 같은 단백질분해효소들이 apoptosis 관련 세포신호전달 과정에 관여한다.[68]

이 중 단백질 분해효소군들인 caspase (CysteinproteASE cleaving after ASPartic acid)는 현재까지 14종 이상 발견되고 있으며 이들은 공통적으로 proenzyme 형태로 만들어지며 활성화 과정에서 단백질 분해과정을 통하여 pL(large subunit)와 pS(small subunit)로 절단되며 (pL/pS)2의 tetramer를 형성하여 활성화된다. 이들은 Mitochondria의 inmembrane space에 존재하는 cytochrome c 가 세포질로 방출되면 cytochrome c 가 dATP나 ATP 존재하에 Apaf1과 결합하게되며 그 결과 caspase-9 의 활성화

가 유도된다. caspase-9은 caspase-3등의 다른 caspase 들을 활성화시킴으로서 apoptosis를 유도하게 된다.[68,79]

細胞死의 기전 중 하나인 細胞內 caspase 活性化로 인한 蛋白質破壞의 정도를 알아보기 위하여 caspase 3과 caspase 9의 活性度를 測定하였다. caspase 는 일반적으로 약물 등에 의해 세포가 손상을 입을 경우 caspase 9가 먼저 활성화되고 이는 caspase 3을 활성화하여 활성화된 caspase 3이 핵안에서 세포사를 일으키게 된다.

實驗結果 대조군에서는 caspase3, 9 모두 活性化되지 않았으나 鬱金을 處理한 實驗群에서는 caspase 3, 9 모두 活性化되어 있으며 이 효과는 鬱金의 濃度에 比例하여 나타남을 알 수 있었다.

鬱金에 의한 胃癌細胞의 死滅이 apoptosis 임을 확인하기 위해 Annexin V staining을 하였다. Annexin V 는 細胞膜에 存在하는 phosphatidylserin과 結合하는 蛋白質로써 細胞에 apoptosis 가 일어나면 細胞膜內에 存在하던 phosphatidylserin이 細胞外膜으로 이동하여 注入된 Annexin V 항체와 結合하여 細胞에 apoptosis 가 일어났음을 알 수 있게 되며 phosphatidylserin이 細胞內膜에서 細胞外膜으로 이동하는 變化는 apoptosis과정 중 초기단계에 일어나는 변화이다.[80-83]

胃癌細胞에 鬱金을 處理하고 12시간후 細胞을 回收하여 Annexin V로 染色한 후 형광현미경으로 觀察한 結果 Annexin V 와 結合된 phosphatidylserin 이 초록색으로 관찰된다. 대조군에서는 phosphatidylserin이 細胞膜內에 存在하여 대부분 染色되지 않았으나 Sample Ⅰ과 sample Ⅱ에서는 선명한 초록색이 觀察되며 이는 鬱金의 濃度에 比例하여 殺傷效果가 增價함을 알 수 있었다.

以上의 實驗結果를 要約하여 보면, Tryhan blue exclusion test를 이용한 胃癌細胞 殺傷效果 측정에서 鬱金의 胃癌細胞에 대한 殺傷效果가 有意性있게 높아지는 것으로 나타났고, MTT assay를 利用한 胃癌細胞 增殖抑制效果 測定에서 鬱金의 胃癌細胞에 대한 增殖抑制效果가 有意性있게 增加하는 것으로 나타났고, quantitative RT-PCR을 利用한 實驗에서 胃癌細胞死滅을 억제하는 遺傳子인 Bcl-2과 Bcl-XL의 發顯을 有意性있게 減少시켰으며, Mitochondria의 膜透過度 및 膜電位를 減少시켜 細胞死滅을 誘導하는 것으로 나타났고, 細胞週期分析, 細胞內 Caspase 分析, Annexin V staining을 통한 蛋白質 破壞程度 등을 觀察하여 鬱金의 細胞死 유도에 대한 有意한 效課를 얻었다.

위의 實驗結果를 보아 鬱金은 胃癌 細胞에 대한 治療效果가 있는 것으로 評價할 수 있으며, 臨床的으로도 胃癌 治療에 활용할 수 있을 것으로 思料된다.

V. 結　論

胃癌細胞에 대한 鬱金의 效能을 糾明하기 위하여, 胃癌細胞에 檢液을 處理한 후 Trypan blue exclusion test를 통해 胃癌細胞 殺傷效果를, MTT assay를 施行하여 胃癌細胞의 增殖抑制效果를, apoptosis와 聯關이 있는 遺傳子의 發顯에 미치는 效果를, 미토콘드리아 膜透過度와 膜電位 變化를, 細胞週期分析을 통한 DNA에 미치는 影響을, 細胞內 Caspase 分析과Annexin V staining을 통한 蛋白質 破壞程度 등을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 胃癌細胞 殺傷效果는 濃度依存的으로 有意性($p<0.01$)있게 나타났다.
2. 胃癌細胞 增殖抑制效果는 經時的으로 有意

性($p<0.01$)있게 나타났다.

3. 遺傳子 發顯에 대한 效果는 Bcl-2과 Bcl-XL에서 有意性($p<0.01$)이 각각 認定되었고, Bax에 대해서는 認定되지 않았다.
4. 미토콘드리아의 膜透過度 및 膜電位는 有意性($p<0.01$)있게 減少하였다.
5. 細胞週期分析을 통하여 細胞增殖이 有意性($p<0.01$)있게 減少하였다.
6. 細胞內 caspase 活性化가 濃度依存的으로 有意性($p<0.01$)있게 나타났다.
7. Annexin V staining를 통하여 胃癌細胞의 死滅이 apoptosis 임이 認定되고 濃度依存的으로 殺傷效果가 有意性($p<0.01$)있게 增價하였다.

參考文獻

1. 이천환, 이선일, 류근원, 목영재. 위암의 시대적 변화. 한국암학회지. 2001;1(3):161-7.
2. 대한위암학회 정보전산 위원회. 전국 위암 등록사업결과 보고. 한국암학회지2002; 2(2) : 105-114.
3. 조완규. 消化器學. 서울: 서울대학교출판부; 1990, p32-6.
4. 서울대학교의과대학편. 腫瘍學. 서울대학교 출판부; 1998, p138, 149-53, 168, 182-4.
5. 김민영. 암의최신지견. 서울: 서울대학교 출판부; 1990, p307-319.
6. 최승훈. 東醫腫瘍學. 행림출판; 1995, p179-188.
7. 全國韓醫科大學 本草學敎授共著. 本草學. 서울: 永林社; 1991, p414-417.
8. 신편중약대사전(하). 대북; 신문광출판공사; 1990, p810-811.
9. 신길구. 신씨본초. 수문사; 1988, p523-524.
10. 이성우, 이상인. 울금와 강황의 기원에 관한 연구. 대한본초학회지 1987, p95-105.
11. 성희근, 최승훈, 안규석. 울금이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향. 대한병리 학회지 1999(2).
12. 박용기. 갈화와 울금 및, 고삼의 항산화작용에 관한 연구. 대한본초학회지 2001; 12(1) : 41-53.
13. 안영민. 울금약침이 백서의 간손상 회복에 미치는 영향. 침구과학회지 1998(12).
14. 박원환. 마취유무에 따른 장문 기문혈의 울금약침이 고지방성 식이로 인한 고지혈증 백서에 미치는 영향. 대한한방병리학회지 1999(2).
15. Jennifer M. Jones, Jack W.Anderson. Relative potencies of PAHs and PCBs based on the response of human cells. Environmental Toxicology and Pharmacology 1999(7):19-26.
16. 손윤희, 남경수. 포공영 에탄올 추출물이 발암개시에 미치는 영향. 대한암예방학회지 2002;7(1) : 13-18.
17. 정경석, 홍창걸, 문성하. MTT Assay를 이용한 위선암의 항암제 감수성 검사. 외과학회지 1995;49(4) : 479-483.
18. 정현채, 김정목, 송인성, 김정룡. 인체대장상피세포 및 대장점막에 발현된 여러 Cytokine 유전자의 정량분석을 통한 인체숙주 방어기전에 관한 연구-합성 RNA를 이용한 정량적 역전사 PCR의 응용. 대한내과학회지 1995;49(1) : 1-13.
19. 김정욱, 조준형, 문철, 허철행, 장세경. 위암의 DPC4 유전자 돌연변이. 대한암학회지 1999;31(1):1-8.
20. 김시영, 이종인, 문난모, 백남선. 위암환자에서 암배아성항원에 대한 역전사연쇄중

합효소반응검사를 이용한 복강내 유리암세포의진단. 대한암학회지 1999;31(1):24-30.

21. Anthony Mathur, Ying Hong, Barbara K.Kemp. Evaluation of fluorescent dye for the detection of mitochondrial membrane potential change in cultured cardiomyocyte. Cardiovascular Research 2002;46:126-138.
22. Sang-Han Lee, Do-Kwon Kim, Young-Rok Seo, Kee-Min Woo Nickel(ll)-induced apoptosis and G2/M enrichment. Experimental and Molecular medicine 1998;30(3): 171-176.
23. Yun-Jung Choi, Jong-Wook Park, Ju-Hyung Woo, Young-Ho Kim. Failure to activate caspase 3 in phorbol ester-resistant leukemia cells is associated with resistanse to apoptotic cell death, Cancer Letters 2002;182 : 183-191.
24. Thierry Godard, Edwige Deslandes, Pierre Lebailly, Carole Vigreux. Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. Histochem Cell Bio 1999;12 : 155-161.
25. 조종관. 한방임상종양학. 대전: 주민출판사; 2001, p 400.
26. 박찬진, 류승환, 김인호, 백원기. 한국인 위암에서 Survivin 과 HIAP-1 유전자 발현. 대한위암학회지 2003;3(1) : 19-25.
27. 권영명, 김훈수, 박순직, 이진범, 임욱빈, 현재선. 최신 일반생물학. 서울: 교문사; 2000, p 6.
28. 공현식 외. 위암에 관한 문헌적 고찰. 대한한방내과학회지 1994 : 211-223.
29. 김상욱, 라기혁, 류창학. 위암에서 림프관 및 혈관 침윤의 임상적 가치.대한암학회지 1999;31(1):16-23.
30. 김수진, 조삼제 외. 한국인에서 유전성 위암의 발생빈도. 한국암학회지 2000;32(1) : 1-6.
31. Sanh-Ah Lee, Dae-hee Kang, Weon-seon Hong. Dietary Habit and Helicobacter pylori Infection in Early Gastric Cancer Patient, Cancer Research and Treathment 2002;34 (2):104-110.
32. 한상욱, 조용관, 정재연, 박현진. H. pylori Infection 감염과 위암발생 대한위암학회지 2002;2(2) : 73-80.
33. 유경호, 김형철, 백무준, 이문수. 위암환자에서 CD44의 임상적 의의. 대한암학회지 1999;31(5) :921-30.
34. 육정화, 김병식, 김용호, 서병선, 김환수, 오성태, 박건춘. 위암에서 종양표지자의 진단적 의의. 대한암학회지 1999;31(6) :1094-100.
35. 권성준. 위암의 종양표지자. 대한위암학회지 2002;2(4) :191-94.
36. 백현명, 권성준, 권오정, 정파종. 위암의 UICC 신규 병기분류법에 대한 평가. 대한암학회지 1999;31(1) :54-61.
37. 성기영, 박일영, 이도상, 김욱. 위암의 재발양상에 따른 혈관내피성장인자의 발현. 대한위암학회지 2002;2(4) :195-99.
38. 신종금, 신영도, 윤충, 주홍재. 조기위암에서 림프절전이 및 재발에 영향을 주는 위험인자 분석. 대한위암학회지 2001;1(2) :119-23.
39. 안정식, 방호윤, 이종인. 조기위암의 재발. 대한위암학회지. 2001;1(3) :180-86.
40. 김지복, 유항종, 서병조, 이주호. 위암의 면역화학수술요법. 대한위암학회지 2001;1

(1) :17-23.

41. 홍원선. 위암의 화학적 예방. 대한암예방학회지. 2002;5(2) :101-12.
42. Seung-Man Park, Chul-Hee Lee, Cho-Hyun Park. Reoperation Recurrent Gasreic Cancer. Cancer Research and Treatment 2001;33(6) :478-482.
43. 김동희, 김성훈. 항암제부작용에 대한 한방요법. 대전대학교 한의학연구소 한의학편 1994;12(1): 211-23.
44. 최성훈. 한의학계의 암연구동향과 연구전략에 관한 연구. 대한한의학회지 1998;19 (1) :470-99.
45. 황규동, 류기원. 열격 · 반위와 위암과의 상관성에 대한 문헌적 고찰. 대한한방종양학회지 1995;1(1) :129-40.
46. 尹誠佑, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 胃癌의 韓醫學 및 東西醫結合 治療에 관한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌 1996;2(1) :177-91.
47. 전병욱, 류봉하, 박동원, 류기원. 암종의 병인병리에 대한 문헌적 고찰. 대한한방종양학회지 1995;1(1) :83-102.
48. 徐永澈 外. 胃癌의 處方運用 및 化學療法 竝行治療에 관한 小考. 大韓韓方腫瘍學會誌 1997;3(1) :193-206.
49. 沈範相, 崔昇勳. 胃癌에서의 辨證分型에 關한 文獻的 考察. 東醫病理學會誌 1993;8권 :295-303.
50. 郁仁存. 腫瘤研究. 상해: 上海科學技術出版社 ;1991, p 117.
51. 金柄住, 文九. 胃癌의 東西醫學的 診治 槪況. 大韓韓醫學會誌 1996;17(2) :100-16.
52. 金賢兒 外. 韓藥을 利用한 抗癌 實驗研究의 傾向에 關한 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌 1998;4(1): 211~32
53. 常敏. 抗癌本草. 湖南: 湖南科學技術出版社 ; 1986, p 614-618
54. 常毅敏. 抗癌本草, 서울: 도서출판 바람과 물결 ; 1992 , p171-74, 195-97.
55. 한종현, 유광석, 강성용. 홍화가 인체의 암세포주에 미치는 영향. 대한한의학회지 1996;17(2) :303-10.
56. 홍상선, 류봉하, 류기원. 蛇梅가 胃癌細胞에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 석사논문, 2003.
57. 박재민. 斑猫분획성분의 胃癌細胞에 대한 사멸效果 및 작용기전에 관한 연구. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 2002.
58. 정우영, 김진성, 류봉하, 류기원. 四君子湯 및 四君子湯加斑猫가 胃癌細胞에 미치는 影響. 대한한방내과학회지 2001;22(4) :579-88.
59. 오희라, 고성규. 목향과 차전초가 위암세포의 활성, 증식, 자기살해능 및 세포주기관련 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방종양학회지 2001;7(1): 1-18.
60. 박상구, 이지현, 문구, 문석재, 원진희, 박래길. 백화사설초 메탄올 추출물에 의한 HL-60 세포고사과정에 있어서의 transcriptional factors 활성변화 연구. 대한한방종 양학회지 2000;6(1):67-80.
61. 김성희, 류봉하, 류기원, 윤상협, 김진성. 黃藥子의 胃癌細胞에 對한 抗癌 效能 檢索. 대한한방내과학회지 2002;23(1):99-106.
62. 김선량, 류봉하, 박동원, 류기원. 山慈菇가 위암세포에 미치는 영향. 대한한의학회지 2001;22(2):75-83.
63. 김진석, 류봉하, 류기원, 윤상협, 김진성. 四君子湯加山慈菇가 위암세포에 미치는 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. 대한한방내과학회지 2002;23(2):202-11.

64. 陳存仁. 中國藥學大典. 서울: 韓國自然醫學研究會 ; 1990, p242-43.
65. 안미과학기술출판사출판부. 신수본초. 안미성 ;1981, p244-45.
66. 이시진. 본초강목. 서울 : 의성당 ; 1986, p882-83.
67. 서정선. 20世紀末의 醫 · 生物學의 새로운 비전 apoptosis · 몸의 效率的 生存을 위한 細胞의 能動的 死亡기전. 서울: 醫學研究의 最新 動向; 1998, p30-2.
68. 이수재. Cell cycle, Cell death and Apoptosis. 대한핵의학회연수교육 2002;(23): 57-69
69. 강우성, 이장훈, 우홍정. 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 肝細胞活性, 細胞週期 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌 1999;20(1):91-105.
70. Mark C. Willingham : Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. The J. of Histochemistry & Cytochemistry 1999;47(9) :1101-1109.
71. 김경국, 김세웅, 고영배. 인체 위암조직에서 ras, P53, c-erbB2단백발현과 점액조직화확법에 의한 표현형 발현과의 상호관계에 대한 연구. 대한암학회지 1998;30(2) : 288-99.
72. 이상숙, 김상표, 손은주, 황미선, 손수상. 위암의 p53 종양억제 유전자의 변이. 대한암학회지 1998;30(6):1069-77.
73. Seok Hun Song, Sang Woon Kim, Sun Kyo Song. Expression of Multidrug Resistance-Related gene in Gastric Cancer Tissue and Normal Gastric Mucosal Tissue, Cancer Reaseach and Treatment 2001;33(4):302-08
74. Martin Crompton. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J. 1999;(341) :233-49.
75. Victor J. Thannickal, Barry L. Fanburg. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Phisiol Lung Mol Physiology 2000;279 :1005-28.
76. Paolo Bernardi, Luca Scrrano, Raffaele Colonna. Mitochondria and cell death. Eur. J. Biochem. 1999;264 :687-701.
77. Nam-Shik Ahn, Sung-Dae Cho, Ji-Win Jung, Se-Ran Yang. Ganoderma lucidum extract cell cycle arrest and Apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. 대한보건학종합학술대회 2002: 321-325.
78. 박민선, 김완섭, 김계영, 설지연. TNFα와 TGFβ에 의한 위암세포의 자연사 유도. 대한암학회지 1999;31(2):209-18.
79. Jongseok Lee, Jinyoung Hur, Pyeongjae Lee, Jayoung Kim. Dual Role of Inflammatory Stimuli in Activation-induced Cell Death of Mouse Microglial Cells. J. of Biological Chemistry 2001;276(35):356-65.
80. Jay Jaganathan, B.S., Joshua H.Petit, B.S.,Barbara E. Lazio. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand - mediated apoptosis in established and primary glioma cell lines. Neurosurg. Focus 2002;13(3): 1-11.
81. Kyung-Ho Park, Ja-Young Seol, Tae-You Kim, Chul-Gyu Yoo. An Adenovirus Expressing Mutant p27 showed More Potent Antitumor Effects Than Adenovirus-p27 Wild Type. Cancer Research 2001;61:6163-69.
82. Myeong-Heon Shin. Excretory-secretory product of newly excysted metacercariae of paragonimus westermani directly induces eosinophil apoptosis. The Korean Journal of

Parasitology 2000;38(1): 17-23.

83. Charlotta Movitz, Carola Sjolin, Claes Dahlgren. Cleavage of annexin I in human neutrophils is mediated by a membrane-localized metalloprotease. Biochemica et Biophysica Acta 1999;1416:101-08.