

HL-60 백혈병 세포의 세포고사에 미치는 樗根白皮의 효과

정영목 · 박신기 · 이 준 · 김영목 · 윤용갑¹ · 김원신¹ · 한동민¹ · 안원근² · 윤유식³ · 전병훈*

원광대학교 한의과대학, 1: 자연과학대학, 2: 경북대학교 자연과학대학, 3: 한국한의학연구원

Effect of *Ailanthi Cortex* on the Apoptosis and Cell Cycle of HL-60 Leukemia Cell Line

Young Mok Jeong, Sin Ki Park, Jeong Ho Kang, Jun Lee, Young Mok Kim, Yong Gab Yun, Won Sin Kim¹, Dong Min Han¹, Won Gun An², Yoo Sik Yoon³, Byung Hun Jeon*

College of Oriental Medicine, 1: College of Natural Science, Wonkwang University, 2: College of Natural Science, Kyungbuk University, 3: Laboratory of Cancer Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Ailanthus altissima has been used to settle an upset stomach, to alleviate a fever, and as an insecticide. We reported that the water extract of *A. altissima* induced apoptotic cell death in HL-60 human leukemia cell line. Here, we showed the dose-dependent inhibitions of cell viability by the extract, as measured by cell morphology. The cell cycle control genes are considered to play important roles in tumorigenesis. The purpose of the present study is also to investigate the effect of *A. altissima* on cell cycle progression and its molecular mechanism in the cells. The level of p21 protein was increased after treatment of the extract, whereas both Bcl-2 and Bax protein levels were not changed. These results suggest that *A. altissima* induces apoptotic cell death via p21-dependent signaling pathway in HL-60 human leukemia cell line which delete wild type p53. G1 checkpoint related gene products tested (cyclin D3, cyclin dependent kinase 4, retinoblastoma, E2F1) were decreased in their protein levels in a dose-dependent manner after treatment of the extract. Taken together, these results indicate that the increase of apoptotic cell death by *A. altissima* may be due to the inhibition of cell cycle in HL-60 human leukemia cell line

Key words : *Ailanthi Cortex*, apoptosis, cell cycle, HL-60

서 론

樗根白皮는 苦木科(소태나무과; Simaroubaceae)에 속하는 낙엽교목인 가증나무 (혹은 가죽나무, *Ailanthus altissima* Swingle) 및 동속의 근연식물의 樹皮와 根皮를 제거한 樹皮와 根皮를 건조한 것으로서⁵⁴⁾, 다른 약명으로는 樗皮, 風眼草로 불리운다. 중국원산으로 우리 나라에 들여와 전국 각지의 해발 100~400m 지역 촌락부근에 심고 있는 귀화식물이다. 한의학에서 性은 寒無毒하며 味苦하며, 燥濕, 清熱, 殺蟲의 효과를 나타내므로, 止瀉, 止血의 목적으로 血崩, 產後出血, 腸風瀉血, 胃積痰 등을 치료하는데 사용하였다⁵⁵⁾. 민간에서도 이질과 대하증, 치질, 고초열, 설사를 멈추게 하는 지사제, 살충제 등의 목적으로 사용되었다^{54,55)}.

백혈병은 조혈계의 악성 질환인 혈액암으로, 백혈구를 생산하는 조직인 골수 또는 림프관계에서 발생한 암세포, 즉 백혈병세포가 비정상적으로 증식하여 모든 장기에 침윤하면서 다시 증식하여 일어나는 질환이다¹³⁾. 오늘날 백혈병의 발생 빈도가 점점 증가하는 추세이므로 인류의 건강증진 및 생명연장을 위하여 백혈병에 대한 기초적인 연구와 항암 물질의 개발이 지속적으로 이루어지고 있다. 그러나 최근에 사용되고 있는 화학요법의 항암제들은 독성이 강하여 간장과 신장 기능의 장애, 약물의 축적에 의한 독성작용, 조절작용 장애 등 부작용이 발생하는 문제점이 있다¹⁴⁾. 그러므로 정상세포에는 아무런 독성을 미치지 않으면서 암세포만을 특이적으로 공격하여 파괴하는 항암제의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 천연물질을 이용한 새로운 항암제의 개발 가능성을 입증하기 위한 실험 보고들이 증가하고 있다¹⁵⁾. 樗根白皮의 성분에 대해서는 수피, 종자, 잎으로부터 merosin, ailanthone, amarolide, quassin, ailantholide, chaparrinone,

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-1, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : omdjhb@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6843

· 접수 : 2003/03/31 · 수정 : 2003/05/30 · 채택 : 2003/07/15

shinjuglycoside 등이 분리, 보고되었다¹⁶⁾. 이들 성분의 생리활성에 관한 연구로는 tar의 항근작용¹⁷⁾, glaucarubinone과 ailanthone 등의 항아메바작용 및 항말라리아 작용¹⁸⁾, 메탄올추출물의 간기능에 관한 것¹⁹⁾들이 있으나 항암활성 및 그 신호기전에 관한 연구가 최근에 보고된 바있다²⁰⁾.

이에 저자는 栲根白皮의 백혈병에 대한 항암 효과와 기전을 究明하기 위하여 栲根白皮추출물을 이용하여 급성림프성백혈병 세포주인 HL-60 T 임파구의 세포고사 유도 및 세포주기 억제 기전에 대하여 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

栲根白皮 200 g을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 2,000 ml를 넣은 후 3 시간 동안 가열, 추출하고 침전물을 3M 여과지를 이용하여 3 회 여과하였다. 이 여과액을 회전감압증발기에서 감압, 농축하였다. 농축된 용액을 -70℃ 냉동기에서 12 시간 동안 방치하고, 30 시간 동안 동결건조기로 동결 건조하여 10%의 수율(收率)인 20 g의 분말을 얻었다.

2. 세포배양

사람 유래의 급성백혈병 세포주인 HL-60은 미국세포주 은행인 ATCC (The American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아, 실험실에서 37℃, 5% CO₂ 공급 조건을 갖춘 Sanyo 회사 배양기에서 배양하였다. 부유성인 HL-60 세포의 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56℃ 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 포함하고, 1% 항생제 (100units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)와 배지 1 L당 NaHCO₃ 2 g을 첨가하여 제조하였다.

3. 세포고사유도

세포들은 plastic culture dish에서 배양되었고, 4×10⁵ cells/ml 정도의 세포 수를 가진 배양 배지에 栲根白皮 추출물을 투여하였다. HL-60 세포들은 여러 농도(100, 150, 200, 250, 300 µg/ml)의 추출물로 24 시간 동안 처리되었다. 栲根白皮분말은 4℃에 저장되었고 사용 직전에 50 mg/ml 농도로 만든 후 실험에 필요한 농도로 배양배지에 희석하여 사용하였다. 세포고사는 아래에 기재된 세포 성장률의 비교, 세포 형태의 변화 및 PARP 단백질의 가수분해 패턴을 비교하여 결정하였다.

4. 항체

Monoclonal anti-PARP 항체는 Calbiochem (San Diego, CA, USA) 회사로부터 구입하였고, monoclonal anti-cyclin D1, bcl-2, Bax, caspase-3, β-catenin, p21, and monoclonal anti-E2F1 항체와 polyclonal anti-CDK4, polyclonal anti-RB 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. Peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin과

peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 이차 항체는 Amersham Life Sciences (Cleveland, OH, USA) 회사로부터 구입하였다.

5. Trypan Blue 측정법

세포 증식에 대한 栲根白皮추출물의 영향을 알아보기 위하여 HL-60 세포를 24-well plate에 배양한 후 추출물을 100, 150, 200, 250, 300 µg/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 그 후 각 표본들의 세포를 tube에 모았으며, 동일 용량의 trypan blue 용액을 tube에 첨가한 후 부드럽게 섞고 3 분간 방치하였다. 살아 있는 세포의 수는 혈구 측정기로 계수 하였다.

6. MTT 측정법

생존한 암세포들의 효소활성을 측정하는 것으로 세포를 96-well plate에 배양한 후 栲根白皮추출물을 trypan blue 실험과 동일한 조건으로 처리하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도로 저장된 MTT 용액 20 µl를 첨가하고 3 시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT 용액이 포함된 배양액을 제거하고 각 well 당 0.1% isopropanol 150 µl를 첨가하여 30 분 간 더 배양 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3회의 서로 다른 실험 결과를 종합하여 평균값과 표준편차 값을 그림으로 나타내었다.

7. 형태학적 변화 조사

HL-60 세포를 각 well당 1×10⁵개씩 넣고 24 시간 경과 후 栲根白皮추출물을 농도별로 첨가하여 24 시간 동안 배양하였으며, 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 100 배율 하에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

8. DNA 분절화 양상 조사

세포를 PBS 용액으로 세척한 후 원심분리기를 이용하여 순수 세포만을 모았다. DNAzol reagent 1 ml을 넣고 pipetting하여 세포 pellet을 분쇄하였다. 그 후 10,000g, 4℃에서 10 분 간 원심 분리하여 상층액을 다른 tube에 옮기고 pellet은 버렸다. Lysate에 100% 에탄올 0.5ml을 첨가하여 여러 번 흔들어서 DNA를 침전시켰다. 3 분 후 DNA pellet만 남기고 상층액을 제거하고 DNA precipitate를 95% 에탄올 1 ml에 두 번 세척하고 5-15 분 정도 실온에서 air dry 시켰다. DNA를 Tris-EDTA buffer를 이용하여 녹인 후 분광광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm의 optical density (OD)값을 측정하여 DNA를 정량하였다. 10 µg의 DNA 표본들을 10 µg/ml 농도의 ethidium bromide를 포함한 1.0% agarose gel로 2 시간 정도 전기영동 시켰으며 ultraviolet light에서 DNA 절편들을 관찰하였다.

9. DNA 합성

[methyl-3H]-thymidine 합성량의 측정은 DNA 합성의 지표로 사용되는 방법이다. 약 1×10⁶개의 HL60 세포를 96 well 마이크로 플레이트에 넣어 농도별·시간별로 栲根白皮추출물을 투여

하였다. 추출물을 투여한 후 4 시간 후에 [methyl-3H]-thymidine 을 첨가하였다. 세포배양액에서 [methyl-3H]-thymidine 의 최종 농도는 well 당 0.48 μCi 가 되도록 하였다. thymidine의 합성량은 scintillation counter를 이용하여 측정하였다. DNA의 합성량은 대조군의 100% 합성률에 비례하여 결정하였다.

10. caspase-3 활성 측정

Caspase-3의 활성은 fluorometric assay kit(R&D Systems Inc., Mineapolis, MN)로 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 즉 5×10^6 개의 세포를 수집하여 50 μl 의 lysis buffer로 세포를 용해 하고, fluorochromic caspase 기질과 함께 incubation하였다. 1 시간 배양한 후 spectrofluorometer를 이용하여 excitation 400 nm와 emission 550 nm에서 형광량을 측정하였다.

11. Western Blot Analysis

실험에 이용된 세포를 15 ml tube에 모은 후, 냉장 보관하였던 phosphate- buffered saline (PBS)로 2~3 번 씻고 2000 rpm에서 3 분 간 원심 분리하였다. 상청액을 없앤 후 cell pellet에 EBC lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM sodium chloride, 0.5% Nonidet P-40)를 넣고 20분간 얼음 위에 놓아두면서 5 분 마다 vortexing 하였다. Lysates를 13,000 rpm에서 15 분 동안 원심 분리한 후 상청액만을 취하여 다른 tube에 옮겼다. 단백질 농도는 Bio-Rad회사의 Bradford 방법에 준하여 측정하였으며, 표준 단백질로 bovin serum albumin (BSA)를 사용하였다. 각 실험군마다 동일량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 이용하여 분리하였으며, 젤 상에 있는 모든 단백질은 nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Corp.)으로 옮겨졌다. Membrane들은 0.5% Tween-20을 포함한 TNT buffer (Tris-NaCl-Tween 20)를 이용하여 만들어진 5% nonfat milk 용액에 넣어서 전처리 하였다. Nonfat milk 용액에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 만들어져 있는 PARP, cyclin D1, RB 및 E2F1 일차 항체를 1 시간 동안 실온에서 membrane에 처리하였다. Membrane들을 TNT buffer에 의해 10 분 간격으로 3번 세척하였고, 일차 항체에 적합한 이차 항체를 이용하여 1 시간 동안 실온에서 membrane을 반응시켰다. 다시 Membrane들을 TNT buffer로 세척한 후 enhanced chemiluminescence reagent (Amersham)을 이용하여 2 분 간 반응시킨 후, X-ray필름을 이용하여 반응의 강도를 확인하였다.

12. 통계처리

실험결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SE)로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

결 과

1. 槲根白皮추출물이 백혈병 HL-60 세포의 세포생존율에 미치는 영향

사람의 백혈병 세포주인 HL-60의 세포고사에 대한 槲根白皮추출물의 효과를 알아보기 위하여 槲根白皮추출물을 100, 150,

200, 250, 및 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24 시간 동안 세포를 배양하였다. Trypan blue 용액으로 세포 생존율 변화를 측정한 결과, 槲根白皮추출물은 처리농도의 존적으로 HL-60 세포의 생존율을 급격히 감소시키면서 세포사멸을 증가시켰다(Fig. 1A). 즉, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 저농도에서는 대조군에 비교하여 85%의 생존율을 보였지만, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도에서는 10%의 생존율을 보여주었다. MTT assay의 경우에도 위의 실험 결과와 매우 유사한 경향을 보여 주었다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 저농도에서는 대조군에 비교하여 88%의 세포생존율을 보였으며, 150, 200, 250 및 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험군에서도 각각 58, 40, 24 및 19%의 세포사멸이 일어났음을 보여주었다(Fig. 1B). 다소 고농도의 처리군에서 trypan blue 용액으로 측정된 결과와 비교하여 세포증식의 감소현상이 약간 작게 나타난 것은 실험 방법상의 차이점에 기인한 것으로 보인다.

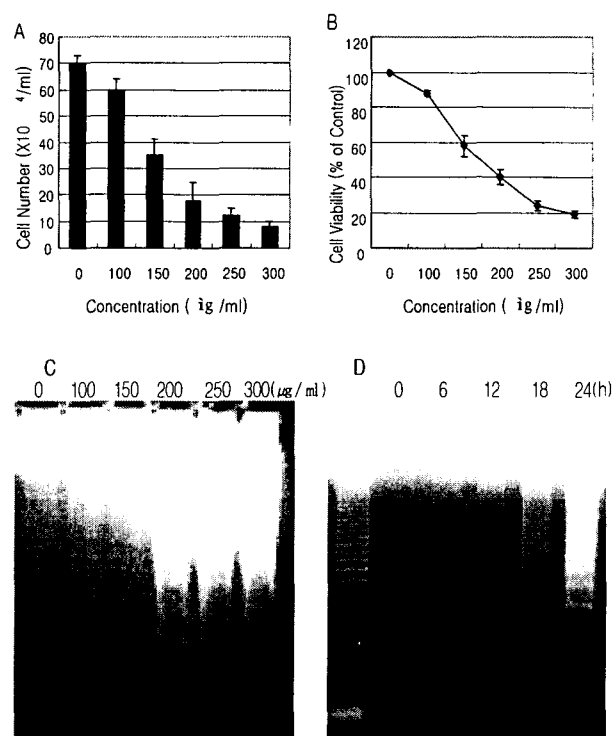


Fig. 1. Induction of concentration-dependent cell death in HL-60 cells by water extract of *Ailanthus altissima*(AAWE). Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 100, 150, 200, 250, and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of AAWE. (A) Cells were harvested into 1.5 ml eppendorf tube and resuspended in 1 ml PBS. Same volume of trypan blue was then added and gently mixed. After 2 min, cells were counted using hemacytometer. (B) Cell viability by MTT assay was measured as described in Materials and Methods. Results were expressed as the means \pm S.D. of three experiments and presented as a total cell numbers (A) or a percentage of control values (B). (C) and (D) are DNA fragmentation analysis. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 100, 150, 200, 250, and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of AAWE and incubated for 0 to 24 hours with 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer.

2. 槲根白皮추출물이 HL-60 세포 핵의 형태학적 변화에 미치는 영향

槲根白皮추출물에 노출된 HL-60 세포의 증식이 감소한 이유 세포고사에 기인하는 것인지를 알아보기 위하여 세포들의 배양 배지에 槲根白皮추출물을 50-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 여러 농도별로

24 시간 동안 처리하여 세포를 배양한 후 형태학적 변화를 위상 차현미경으로 대조군과 비교하여 관찰하였다. 그 결과 대조군에서는 세포모양에 아무런 변화가 없었으나 槲根白皮추출물에 노출된 세포에서 세포막 외부 용기의 돌출현상을 볼 수 있었으며, 처리 농도가 높아질수록 세포의 밀도는 대조군에 비해 점차 감소하였으며 세포막 용기의 돌출현상을 가진 세포 수는 점점 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 槲根白皮추출물이 HL-60 세포의 성장을 억제시키면서 세포고사를 유도하는 것으로 보여진다.

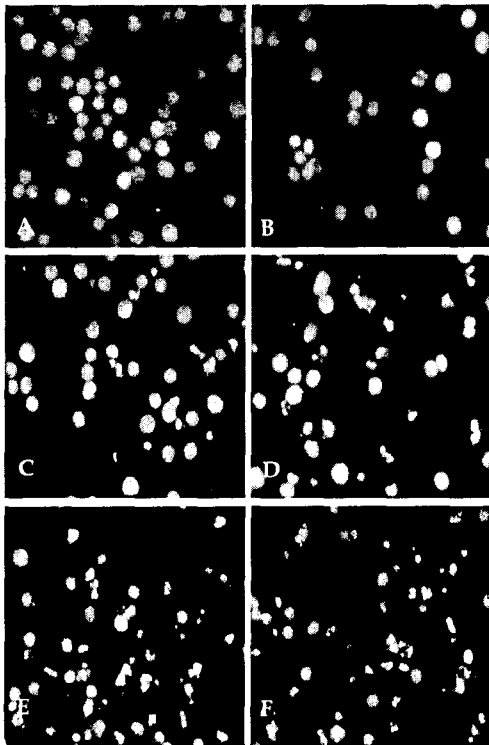


Fig. 2. Induction of morphologic changes characteristics of apoptosis by AWE in HL60 cells. (A) Cells of AWE-untreated control group; round and regular shape of cells, (B) AWE 50 $\mu\text{g/ml}$ treated cells showed to undergo apoptosis in some cells as shown by their characteristically shrunken and intensely fluorescent nuclei (arrowheads). (C) AWE 100 $\mu\text{g/ml}$ treated cells displayed the typical morphology of nuclei. (D) AWE 150 $\mu\text{g/ml}$ treated cells, showed more apoptotic cells and exhibited membrane blebbing when compared with control cells (E) AWE 200 $\mu\text{g/ml}$ treated cells; most of cells showed apoptotic shape (F) AWE 300 $\mu\text{g/ml}$ treated cells; all cells were destroyed with apoptotic characteristic.

3. 槲根白皮추출물이 세포고사를 유도한 HL-60 세포에서 PARP 단백질 가수분해 및 caspase-3 활성화에 미치는 영향

많은 종류의 세포성 단백질들이 세포고사가 진행되는 동안에 활성화된 caspase에 의해 가수분해 현상이 일어나고 있으며, 현재까지 알려진 caspase-3 효소의 기질들을 살펴보면 DNA 수선기능을 가진 PARP를 비롯하여 RB, actin, lamin, fodrin, presenilin 등 다양하다²¹⁻²³. 본 실험은 槲根白皮추출물을 처리하여 세포고사를 유도한 HL-60 세포에서 PARP 단백질 분해 양상과 caspase-3 활성화의 양상을 조사하기 위하여 추출물을 그림 3과 같이 농도별로 처리하고 24 시간 동안 세포를 배양하였다. 그 결

과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서는 116 kDa의 완전한 PARP 단백질이 감소하였으나 85 kDa 크기의 분해된 절편은 검출되지 않았다. 그러나 추출물의 처리 농도가 높을수록 PARP 단백질 가수분해 정도는 증가하여 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 85 kDa의 절편을 볼 수 있었고 그 양도 또한 점점 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 관점에서 볼 때 PARP 단백질의 가수분해 현상은 caspase-3 활성화의 가장 주요한 증거 중의 하나이며 槲根白皮추출물 처리에 의한 HL-60 세포고사 현상이 일어남을 보여준다.

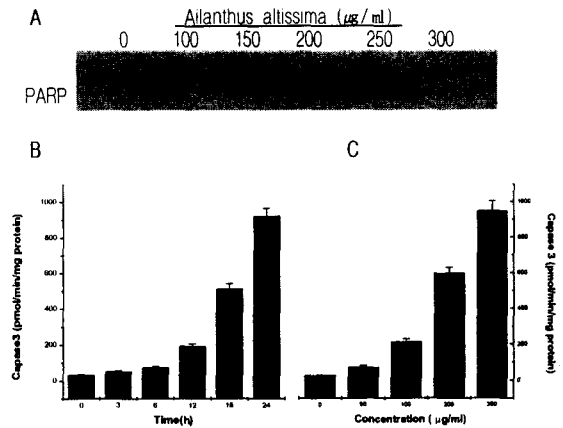


Fig. 3. (A) Induction of PARP cleavage during apoptosis of HL-60 cells induced by AWE. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 100, 150, 200, 250, and 300 $\mu\text{g/ml}$ of AWE. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on 7.5% SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose membrane, and the blots were probed for PARP. PARP 116 kDa and 85 kDa bands (closed and open triangles respectively) are shown. (B) Caspase-3 activation induced by AWE. The cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ for various time. (C) Cell were treated for 24 hours with various concentration. Data represent means \pm SD of triplicate experiments.

4. 槲根白皮추출물이 세포고사를 유도한 HL-60 세포에서 Cyclin D1 및 CDK4 단백질 발현에 미치는 영향

Cyclin D1은 CDK4 또는 CDK6와 결합하여 세포주기 중에서 특히, G1기에서 S기로 전이되도록 하는데 중요한 역할을 한다. 이 단백질들의 발현 수준을 알아보기 위하여 槲根白皮추출물의 농도를 100, 150, 200, 250 및 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. Western blot 분석 결과로 cyclin D1 단백질은 대조군에서 검출되지 않았으며, 槲根白皮추출물을 농도별로 처리한 실험군에서도 검출되지 않았다 (Fig. 4). 이러한 결과는 cyclin D1 단백질의 발현이 너무 적어 Western blot analysis로는 검출되지 않는 것으로 보이며, 槲根白皮추출물의 처리 농도에 의존하여 단백질 발현 수준이 감소하던지 또는 변화가 없음을 보여준다. CDK4는 D-type cyclin들과 복합체를 형성하여 세포주기의 G1기 동안에 세포 성장을 조절한다²⁴. 槲根白皮추출물 처리 후 HL-60 세포에서 CDK4 단백질 발현 수준을 조사해 본 결과 처리 농도가 높으면 높을수록 단백질 발현 수준이 감소하는 것을 보여 주었다(Fig 5). 이상의 결과에서 槲根白皮추출물이 HL-60 세포의 사멸을 촉진시키는 작용은 cyclin D1과 CDK4 단백질간의 복합체 형성을 억제시킴으로써 세포주기를 원활히 조절하지 못하여 일어남을 알 수 있다.

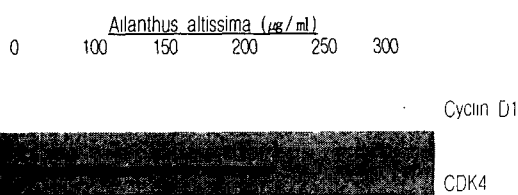


Fig. 4. Expression levels of cyclin D1 and CDK4 proteins during apoptosis of HL-60 cells induced by AAEW. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 100, 150, 200, 250, and 300 µg/ml of AAEW. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for cyclin D1 or CDK4.

Table 1. Effect of AAEW on the cell cycle distribution of HL60

Treatment (24 h)	G0/G1 (mean ± SD)	S (mean ± SD)	G2/M (mean ± SD)
control	46.5±3.3	33.4±3.5	17.7±2.2
AAEW 50 µg/ml	52.6±4.3	31.5±2.9	18.6±2.5
AAEW 100 µg/ml	59.2±4.5	29.2±3.5	14.8±2.3
AAEW 200 µg/ml	64.2±5.3	24.5±2.9	11.9±2.4
AAEW 300 µg/ml	69.8±6.4	17.7±3.6	9.8±1.7

Treatment (200 µg/ml)	G0/G1 (mean ± SD)	S (mean ± SD)	G2/M (mean ± SD)
6 hour	48.5±3.3	34.4±3.4	17.1±1.9
12 hour	52.7±3.2	32.5±2.9	16.5±1.6
18 hour	58.5±3.6	25.3±2.7	12.3±1.5
24 hour	64.5±5.3	23.7±2.5	11.2±2.3

DNA contents was measured on flow cytometry. Results were expressed as the percentage of cell in G0/G1, S and G2/M phase of total cells. Data represent mean of three independent experiments.

5. 槲根白皮추출물이 세포고사를 유도한 HL-60 세포에서 RB 및 E2F1 단백질 발현에 미치는 영향

RB 단백질은 세포주기의 G1기에서 전사인자인 E2F1과 결합하고 있다가 cyclin-CDK 복합체에 의해 인산화가 되면 E2F1을 유리시킨다.

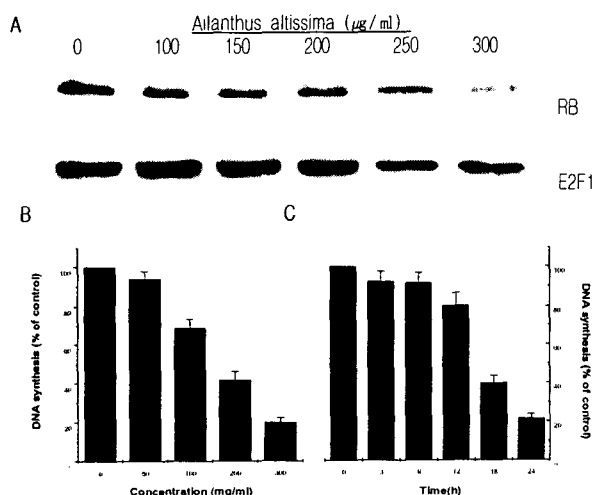


Fig. 5. (A)Decreases of RB and E2F1 protein levels during apoptosis of HL-60 cells induced by AAEW. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 100, 150, 200, 250, and 300 µg/ml of AAEW and incubated for 0 to 24 hours with 300 µg/ml. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for RB or E2F1. (B) DNA synthesis was measured by the method of [methyl-3H]-thymidine incorporation assay. The cells were treated for 24 hours, (C) treated with 200 µg/ml. Data represent means±SD of triplicate experiments.

유리된 E2F1은 S기에서 DNA 복제에 필요한 여러 유전자들을 합성하여 세포주기를 진행시킨다. 이처럼 세포주기 조절에 중요한 역할을 수행하는 유전자들의 변화를 살펴보기 위하여 槲根白皮추출물의 농도를 100, 150, 200, 250 및 300 µg/ml로 증가시키면서 HL-60 세포들의 배양배지에 24 시간 동안 처리하였다. 그 결과 100 µg/ml의 저농도에서 RB 단백질 발현 수준은 대조군에 비해서 다소 감소하였으며, 추출물의 처리 농도가 높을수록 단백질 발현의 감소비율이 점점 증가함을 볼 수 있었다(Fig 5). E2F1의 단백질 발현은 Western blot analysis의 결과, 100 µg/ml의 저농도에서는 대조군에 비하여 단백질 발현이 거의 감소되지 않았으나, 그 이후의 처리 농도에서는 槲根白皮추출물의 처리 농도에 의존적으로 단백질 발현이 점점 감소하는 현상이 나타났다(Fig. 5). 이러한 결과는 RB 단백질의 down-regulation 경향과 매우 유사함을 보여 주었다.

6. 槲根白皮추출물이 세포고사를 유도한 HL-60 세포에서 bcl-2, Bax, caspase-3, β-catenin 및 p21의 단백질 발현에 미치는 영향

Bcl-2는 세포고사를 억제시키는 유전자이며, Bax는 IL-3의 종손 세포에서 cytokine 결합에 의해서 유도되는 세포사멸을 촉진시키므로 Bcl-2 유전자와 상반되는 역할을 한다. 본 실험은 wild type-p53가 결합된 HL-60 세포들이 槲根白皮추출물에 노출되어 발생하는 세포고사가 Bcl-2 및 Bax와 관련성이 있는지를 알아보았다. 槲根白皮추출물 농도 및 시간 의존적으로 처리한 결과 대조군과 실험군의 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현정도에 차이점을 발견할 수 없었다(Fig. 6). 이는 HL-60 세포의 p53 결합이 원인이 되어, 세포고사가 일어나더라도 Bcl-2 및 Bax 유전자를 조절할 수 없었기 때문에 판단되고, 槲根白皮추출물로 유도되는 HL-60 세포고사에서는 이 두 유전자의 관련성은 없는 것으로 판단된다. 최근 연구 결과에 의하면 세포고사를 유도하는 대부분의 약물들이 시스테인 분해효소인 caspase family의 순차적인 신호 전달과 활성을 통해서 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. 특히, caspase-3는 효소학적으로 세포고사를 일으키는데 결정적인 역할을 수행하므로, 槲根白皮추출물의 처리로 발생하는 caspase-3 활성도의 변화를 조사하였다. 그 결과 caspase-3의 활성화된 형태인 17kDa 크기의 분자량이 농도 및 시간 의존적으로 더욱 증가함을 알 수 있었다. 또한 세포고사의 과정에서 많은 단백질들이 caspase들에 의해 분해되어지는데 특히 caspase-3의 기질로서 세포질 및 핵 단백질인 β-catenin들의 분해 양상을 대표적으로 조사하였다. β-catenin의 경우에도 농도 및 시간 의존적으로 완전한 크기의 92 kDa 단백질 양이 현저히 줄어들면서 분해됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 이런 결과로 볼 때 槲根白皮추출물 처리에 의한 HL-60의 세포고사에서 앞에서 언급한 PARP 및 beta-catenin 단백질들의 분해현상은 caspase-3 활성의 가장 주요한 증거 중의 하나이며 caspase 관련 신호기전에 의해서 세포고사의 현상이 일어남을 보여준다.

그리고 p21은 PCNA와 결합하여 DNA 복제를 억제하고, cyclin-cdk 복합체에 결합하여 이들 복합체의 활동을 억제함으로써 세포 주기를 정지시키거나 진행을 방해하여 결국에는 세포의

사멸을 초래한다. 梲根白皮추출물로 유도된 HL-60 세포의 세포고사에서 p21 단백질의 연관성을 알아본 결과 梲根白皮추출물의 처리 농도가 높을수록, 노출 시간이 길수록 그 발현양이 증가하였다(Fig. 6). 이는 梲根白皮에 노출된 HL-60 세포고사는 최소한 p21의 신호기전과 연관되어 있으며, 그 신호기전은 p53-independent pathway에 의해 이루어지는 것으로 생각된다.

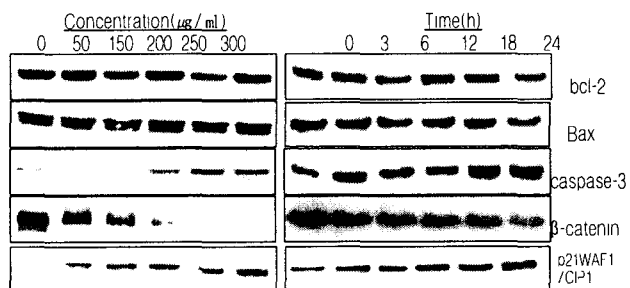


Fig. 6. The changes of expression pattern of bcl-2, Bax, caspase-3, β-catenin, and p21WAF1/CIP1 related with apoptosis induced by AAWF according to the concentration and exposure time to AAWF. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 100, 150, 200, 250, and 300 μg/ml of AAWF and incubated for 0 to 24 hours with 300 μg/ml. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for bcl-2, Bax, caspase-3, β-catenin, and p21WAF1/CIP1.

고찰

韓醫學에서 암의 치료는 환자의 正氣狀態 및 암화의 정도에 따라 크게 益氣養血, 健脾和胃, 健脾益氣, 溫補腎陽, 및 滋補肝腎 등 인체의 항병능력을 증진시키는 扶正法과 清熱解毒, 活血祛瘀, 理氣化血, 化痰利濕 및 以毒攻毒 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 배합한 扶正祛邪法 등이 활용되고 있다⁵⁶⁾. 본 연구는 소태나무과에 속하는 낙엽교목인 가중나무의 수피를 건조한 저근백피를 이용하여 백혈병 세포주인 Jurkat에 대한 항암효능을 검증하고자 하였다. 梲根白皮는 明代의 『本草綱目拾遺』에 山楂, 虎目등으로 기재 되어있으며⁵⁵⁾, 낙엽교목으로 높이가 20 m에 달하는 가중나무의 수피를 사용하는 약재이다. 한 다. 性은 寒無毒하며 味苦하여, 燥濕, 清熱, 殺蟲의 효과를 나타내므로, 止瀉, 止血의 목적으로 血崩, 產後出血, 腸風瀉血, 胃積痰 등을 치료하는데 사용하였다.⁵⁵⁾ 임상적으로 급성세균성이질, 아메바성이질, 혈변, 궤양성질환 및 장궁경부암등의 치료에 사용한다.⁵⁶⁾ 최근에는 백혈병의 치료에 유용한 한약물의 연구가 많이 이루어지고 있으며, 梲根白皮가 백혈병의 일부세포에 미치는 효과를 보고한 바 있다³⁻¹¹⁾. 한의학에서 백혈병이라는 병명에 대한 언급은 없지만, 주요 증상인 발열, 빈혈, 출혈, 간종대, 비장종대와 임파선종대 등의 증후로 볼 때 熱勞, 急勞, 虛勞, 血證, 溫病, 積聚, 痰核 등의 범주에 속한다고 볼 수 있다. 백혈병의 병인병기를 살펴보면 內因으로 勞倦, 飢飽不節, 房事過多, 七情所傷 등으로 肝, 脾, 心, 腎 등이 손상되어 발생하고, 外因으로는 毒邪(熱毒, 溫毒, 風毒 등)와 熱邪(溫熱, 濕熱, 痰熱, 毒熱 등)가 侵襲하여 熱毒蘊結하고 營分損傷하여 血이 動함으로써 발생한다고 파악하고 있다. 치료의 원칙은 扶正祛邪를 사용하는데, 증상에 따라 백

혈병의 초기나 중기에는 實證을 위주로 하되 本虛表實로 치료하고, 말기에는 虛證을 위주로 하되 標本俱虛로 보고 치료한다^{13, 29-34)}.

백혈병은 백혈구를 생산하는 조직인 골수 또는 림프내장계에 발생한 암세포, 즉 백혈병세포가 비정상적으로 증식하여 모든 장기에 침윤하여 다시 증식하는 동시에 말초혈액 중에도 나타나는 병이다. 급성과 만성질환으로 나누어지는 성인의 백혈병은 전체 암 중에서 약 10%를 차지하고 있으며, 조혈계를 침범하여 정상적인 혈구형성을 파괴하므로 백혈병 환자들은 호중구 감소증, 혈소판 감소증, 빈혈에 의한 감염, 출혈, 피로 등의 증상이 발생한다¹³⁾. 백혈병을 포함한 각종 암은 다양한 발생원인과 기전의 복잡성으로 인하여 분자생물학적·세포생물학적인 연구가 필요하다고 생각되며, 이러한 연구는 한의학에서 한약재를 이용한 항암치료와 그 기전에 대한 검증 및 새로운 한의학적 치료법의 개발을 위해서도 반드시 필요하다고 생각된다. 그러므로 본 연구는 천연물을 이용한 새로운 백혈병 치료제의 개발 가능성을 알아보기 위하여 梲根白皮추출물을 이용하여 급성백혈병 세포주인 HL-60 T 임파구에 대한 세포고사 유도효과를 관찰하고, 그 신호기전을 세포주기 관련 유전자를 대상으로 검증하였다.

Trypan blue 용액과 MTT 측정으로 HL-60 세포의 생존율 변화를 측정한 결과, 梲根白皮추출물은 처리 농도에 의존적으로 세포의 생존율을 감소시키면서 세포사멸을 점점 증가시켰다(Fig. 1). 또한 梲根白皮추출물에 노출된 HL-60 세포들의 외부 형태적인 특징을 현미경하에서 관찰한 결과 세포막 외부 용기의 돌출 현상과 사멸 소체(apoptotic body)를 배지 속에서 볼 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과들은 梲根白皮추출물이 HL-60 세포의 성장을 억제하고 세포고사를 유도하는 효과가 있음을 보여주었다. 이러한 세포의 죽음이 물리적인 세포괴사(necrosis)에 의한 것인지 생리적인 세포고사(apoptosis)에 의한 현상인지를 확인할 필요성이 있다. 일반적으로 다양한 종류의 외부 자극물질에 의해서 영향을 받은 세포들이 세포괴사와 세포사멸을 일으킬 때는 이를 구분 지을 수 있는 외부 형태학적인, 생화학적인 특징을 동반한다. 세포의 생리적 사멸은 세포의 크기가 축소되는 현상을 포함하여 세포막 용기가 돌출하고, 핵에서는 염색사 응축과 핵 분절 등의 변화가 동반된다³⁵⁾. 최근 연구에 의하면 세포사멸 유도물질들은 caspase family를 활성화시켜 세포고사를 초래한다고 보고하였다³⁶⁾. 그 중에서도 caspase-3라는 효소는 불활성화 상태로 존재하다가 세포사멸의 신호를 받아 활성화된 형태로 되어 세포내의 생존신호에 관련된 단백질을 분해하여 불활성화시키고 또한 세포골격단백질을 절단하여 구조적인 변화를 유발하여 세포사멸을 실행한다. 본 연구에서는 caspase-3의 기질 단백질로 잘 알려진 PARP의 분해 정도를 조사하기 위하여 HL-60 세포 배양배지에 梲根白皮추출물을 농도별로 처리하고 24 시간 동안 배양한 결과 116 kDa의 완전한 PARP 단백질이 85 kDa 크기의 절편으로 분해되는 양상이 유도되었다. 또한 추출물의 처리 농도가 높으면 높을수록 PARP 단백질의 분해 정도가 점점 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). Fig. 2의 결과와 더불어 이 결과는 백혈병 세포주인 HL-60이 梲根白皮추출물에 노출되어 일어나는 세포사멸은 세포괴사가 아니고 세포고사에 의한 것임을 보여주는 예이다.

암화 과정의 원인인자로는 세포 외부의 과다한 mitogen의 작용, 세포 내 암 유전자들의 비정상적 활성화에 의한 과다한 신호 전달, 혹은 종양바이러스의 감염에 의한 암 단백질들의 작용 등이 현재까지 알려져 있다. 특히, 세포주기를 조절하는 여러 인자들의 기능에 불균형이 초래된다면 과다한 세포분열이 초래되어 암화 과정에 접어들기도 한다는 보고가 있다³⁷⁾. 이와 같이 암 발생과 세포주기 조절과는 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되며, 그 기전을 더욱 깊이 설명하기 위해서는 분자생물학적 및 세포생물학적 수준에서의 연구가 필수적일 것이다. 암 세포와 정상적인 세포의 성장을 조절하는 기전이 최근 10년 동안 매우 상세하게 밝혀지고 있지만, 세포주기와 연관된 전사 조절, 단백질의 인산화, RNA와 단백질의 분해, 조절인자들의 구획화에 포함된 분자들에 대해서는 여전히 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구에서는 세포주기를 진행하는 요소 중 G1기와 관련된 유전자들의 단백질 발현 정도를 살펴보았다. 세포증식을 촉진하는 mitogen 인자들의 최종 표적 중의 하나가 D-type의 cyclin이며³⁸⁾, cyclin D의 발현이 촉진되어 일정량에 이르면 CDK4 혹은 CDK6와 결합하고, CDK activating kinase가 CDK의 threonine을 인산화시켜서 CDK가 활성을 띄게 된다. Western blot analysis의 결과 cyclin D1의 경우는 槲根白皮추출물에 의해서 감소 내지는 변화가 없는 것으로 나타났으며 CDK4는 처리 농도에 의존적으로 점점 감소하는 경향을 보여 주었다(Fig. 4). 비록 CDK4의 경우 kinase activity도 조사를 하여 그 활성이 떨어졌는지를 살펴봐야 할 것이지만 단백질 발현수준을 고려해 볼 때 이상의 결과는 cyclin과 CDK의 복합체 형성이 억제됨을 보여주었으며, 이로 인해 세포주기의 진행을 위한 RB단백질의 인산화를 촉진시키지 못하므로 결국에는 세포주기 자체를 방해하는 결과를 초래함을 알 수 있다. 만약 Cyclin D와 CDK가 복합체를 형성하면 RB의 인산화를 더욱 가속화시키고 이로 인해 RB는 불활성화되고 결국 RB에 의해 억제되어 있던 E2F1을 포함한 c-abl, E1F-1등의 전사인자들이 활성을 갖게되면서 세포주기의 S기로 이행을 하게 된다³⁹⁾. 그런데 槲根白皮추출물을 HL-60 세포에 농도별로 처리한 후 RB와 E2F1의 단백질 발현 수준을 측정한 결과 2 종류 모두 농도 의존별로 그 발현의 정도가 점점 줄어들었다(Fig 5). 이러한 결과는 RB의 인산화가 억제되고 RB 단백질 자체의 세포 내 수준도 적어져 교유의 기능을 수행하지 못함을 보여 준다. 또한 RB로부터 E2F1의 유리가 되지 못하고 E2F1 자체의 단백질 분해가 일어나 핵 내에서의 전사인자로서 기능이 소실되면서 세포주기가 정지되는 것을 알 수 있다. 이상의 결과들은 槲根白皮추출물에 노출된 HL-60 세포는 적어도 세포주기의 G1 checkpoint 관련 유전자의 변화에 의한 세포주기의 정지로 인해 결국 세포고사를 일으키게 되는 기전을 보여준다.

세포고사 관련 유전자로 잘 알려진 p53과 bcl-2는 직간접적으로 세포고사의 여러 가지 신호기전과 많은 관련이 되어 있다⁴⁰⁻⁴⁴⁾. 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치해 있는 bcl-2 단백질은 림프종양 세포에서 얻어진 것으로 세포고사를 억제하는 생리적인 기능이 밝혀졌다. 최근 연구에 의하면 p53이 세포고사가 진행되는 세포들에서 단백질 발현량이 증가하는 것으로 발

현되었으며^{45,46)}, 이 증가된 p53 단백질이 bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고 Bax의 단백질 발현량을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{46,47)}. 그런데 본 실험에서는 槲根白皮추출물에 노출된 HL-60 이 세포고사가 진행됨에도 불구하고 Bcl-2와 Bax 단백질 발현의 정도가 대조군에 비해서 차이가 없었다(Fig. 6). 이 현상은 백혈병 세포주인 HL-60이 wt p53가 결핍되어 있기 때문에 세포고사가 진행되는 동안에도 Bcl-2를 직접적으로 조절하지 못한 것으로 생각되며, 결국 槲根白皮추출물의 노출로 초래되는 HL-60 세포의 생리적 사멸은 p53과 무관한 다른 신호기전의 경로를 통하여 일어남을 의미한다. 많은 종류의 세포성 단백질들이 세포고사가 진행되는 동안 caspase들에 의해 분해되어지는 현상이 일어남을 보여주고 있으며, caspase-3 효소의 특정 기로 알려진 것은 PARP를 비롯하여 Rb, beta-catenin, actin, lamin, fodrin, PKA, presenilin 등 매우 다양하다^{42,48-51)}. 그러므로 caspase-3의 활성도와 caspase-3의 주요 기질로 알려진 핵 단백질인 PARP와 세포질 및 핵 단백질인 beta-catenin들의 분해 양상을 대표적으로 조사하였는데 그 결과 槲根白皮추출물로 유도되는 세포고사는 caspase-3의 활성과 β -catenin의 분해와 관련이 있는 것으로 여겨진다(Fig. 6). 槲根白皮추출물에 의해 유도된 세포고사의 경우 어떤 기질 단백질들이 가장 중요한 역할을 하는지는 차후 조사해 보아야 할 것이다. p21은 PCNA와 결합하여 DNA 복제를 억제하고, cyclin-cdk 복합체에 결합하여 이들 복합체의 활동을 억제함으로써 세포 주기를 정지시키거나 진행을 방해하여 결국에는 세포의 사멸을 초래한다^{45,52,53)}. 이러한 기능을 가진 p21 단백질은 암 억제 유전자인 p53에 의해 전사적으로 상승 조절되어 G1기에 발현량이 증가하기도 하며, 다른 여러 가지 신호에 의해서도 발현량이 증가하기도 한다. 본 실험에서는 槲根白皮추출물에 의해 유도되는 HL-60 세포고사가 p21의 신호기전과 관련이 있는지를 살펴 본 결과 槲根白皮추출물에 노출된 HL-60 세포고사는 최소한 p21의 신호기전과 연관되어 있으며(Fig. 6). HL-60 세포는 wt p53이 결핍되어 있기 때문에 그 신호기전은 p53-independent pathway에 의해 이루어지는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 槲根白皮추출물은 HL-60 세포의 세포고사를 유도하는 효과가 있고, 이러한 세포고사는 세포주기를 조절을 비롯한 여러 가지 신호기전과 관련이 있는 것으로 생각되며, 이들에 대한 더욱 깊은 연구는 백혈병 치료에 대한 한 의학적 치료법의 기전이해와 치료과정에 대한 더욱 과학적인 근거를 제공할 것이다.

결 론

본 연구는 槲根白皮의 항암 효과와 그 기전을 파악하기 위하여 급성백혈병 세포주인 HL-60 세포에 대한 槲根白皮추출물의 세포고사 유도 및 세포주기 억제 효과를 究明하기 위하여 HL-60 세포에 槲根白皮 추출물을 처리하여 세포생존율 및 DNA 분절 양상, 형태학적인 변화, caspase-3 활성 변화, PARP 및 β -catenin 단백질의 가수분해 현상, Bcl-2 및 Bax 단백질의 변화, cyclin D1, CDK4, RB, E2F1 및 p21 단백질의 발현수준의 변화를

관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 檮根白皮추출물은 HL-60 세포의 세포생존율을 시간 및 농도 의존적으로 감소시켰으며, DNA 분절을 농도 및 시간 의존적으로 증가시켰고, HL-60 세포의 세포막 파괴 및 외부 용기의 돌출 현상을 농도 의존적으로 증가시켜 세포고사의 형태학적 양상이 뚜렷하게 증가하였으며, HL-60 세포에서 caspase-3 활성을 시간 및 농도 의존적으로 증가시켰으며, 그에 따른 PARP 및 β -catenin 단백질의 가수분해를 농도 의존적으로 증가시켰다. 또 cyclin D1과 CDK4 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰고, RB 단백질과 E2F1 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며, Bcl-2 및 Bax 단백질의 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. 檮根白皮 추출물은 HL-60 세포에서 p21 단백질의 발현을 시간 및 농도 의존적으로 증가시켰다.

이상의 결과로 볼 때 檮根白皮추출물은 급성백혈병 세포주 HL-60 세포의 세포고사 유도 효과가 있으며, 그 기전은 세포 주기의 억제와 연관성이 있는 것으로 생각된다. 따라서 檮根白皮는 백혈병을 치료하는데 유효하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 한방치료기술연구개발사업 (02-PJ9-PG1-0 CO05-0003)의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

- 江蘇新醫學院 편 : (원역)중약대사전, 서울, 정담, pp. 287-290, 1998.
- 上海中醫學院 編 : 中草藥學, 香港, 商務印書館香港分館, pp. 387-388, 1983.
- 高學敏 : 中藥學(下冊), 북경, 인민위생출판사, pp. 1131-1134, 2000.
- 康秉秀 외 : 本草學, 서울, 永林社, pp. 445-446, 1998.
- 한국생약학교수협회의 : 本草學, 서울, 아카데미서적, pp. 521-523, 2002.
- 郭蘭忠 : 現代實用中藥學, 북경, 人民衛生出版社, pp. 569-570, 2000.
- 董昆山 編著 : 現代臨床中藥學, 북경, 中國中醫藥出版社, pp. 554-555, 1998.
- 程劍華 : 抗癌植物藥及其驗方, 南昌, 江西科學技術出版社, pp. 411-413, 1998.
- 李尙仁 외 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp. 271-272, 1990.
- 김형균 외 : 한약의 약리, 서울, 고려의학, p. 300, 2000.
- 陸昌洙 외 : 漢藥의 藥理·成分·臨床應用, 서울, 癸丑文化社, pp. 616-618, 1021, 1982.
- 傳統醫學研究所 편 : 東洋醫學大辭典, 서울, 成輔社, p. 168, 2000.
- 문구, 정병학, 김병주 : 암 동서의 결합치료, 익산, 원광대학교 출판국, pp. 256-257, 461-462, 741-793, 1999.
- Ruddon, R. W. : Chemical carcinogenesis. In principles of drug action (3rd.), Churchill Livingstone, p.735, 1990.
- Ito, N., Shimura, K. : Studies on antitumor activity of traditional Chinese medicines. Jpn J. cancer Chemother., 12 : 2149, 1985.
- 保健社會部 : 大韓藥典外韓藥(生藥)規格集, 서울, 1984
- 江蘇新醫學院(中國) : 中藥大辭典, 제 1 판, 下冊, 상해과학기술회사, 上海, 1979.
- Tang, W., and Eisenbrand, G. : Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag, New York, 1992.
- 주화균, 노영수, 김신규. : 저근백피 Tar의 항균작용에 관한 연구. 경희약대논문집 12, 57, 1984.
- 김종, 최종원, 김혜경, 박수원, 이창규. : 저근백피 성분의 생리활성에 관한 연구 (I): 메탄올 추출물과 글로로포름 분획이 Epoxide 분해계에 미치는 영향. 생약학회지 25, 47, 1994.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., Poirier, G. G. : Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res., 53 : 3979-3985, 1993.
- An, B., Dou, Q. P. : Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. Cancer Res., 56 : 438-442, 1996.
- Hwang, S. G., Park, J. U., Lee, H. C., Joo, W. H., Cho, Y. K., Moon, J. Y. : Proteolysis of beta-catenin in apoptotic HL-60 cells. J. Life Sci., 10 : 57-63, 2000.
- Serrano, M., Hannon, G. J., Beach, D. : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature, 366 : 704-707, 1993.
- 安德均 : 原色 韓國本草圖鑑, 서울, 敎學社, p. 670, 1998.
- 전통의학연구소 編 : 본초약재도감, 서울, 성보사, p. 39, 1994.
- 金在佺, 肖培根 : 동양천연약물원색도감, 서울, 영림사, pp. 150-151, 1995.
- 趙學敏 : 本草綱目拾遺, 香港, 商務印書館香港分館, pp. 260-262, 1986.
- 劉京泰 : Cisplatin에 의한 뇌세포사멸에서 보중면역단의 방어효과, 원광대학교대학원석사논문, 2002.
- 具本淵 외 : 東醫內科學, 서울, 서원당, pp. 436-442, 1985.
- 禹弘楨 외 14명 : 간계내과학, 서울, 東洋醫學研究院, pp. 564-579, 1989.
- 최승훈 : 동의종양학, 서울, 행림출판사, pp. 245-249, 1995.
- 洪元植 : 現代中共의 癌治療, 서울, 영문사, pp. 230-241, 1982.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R. Cell death: the significance of cell death. Int. Rev. Cytol., 68 : 251-306, 1980.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell, 87 : 171, 1996.

36. Verma, I. M., Vogt, P. K. : Oncogene : 20 years later. *Genes Dev.*, 9 : 1289-1301, 1995.
37. Marx, J. : How cells cycle toward cancer. *Science*, 263 : 319-321, 1994.
38. Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., Pagano, M. : Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.*, 15 : 2612-2624, 1995.
39. Wang, J. Y., Knudsen, E. S., Welch, P. J. : The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv. Cancer Res.*, 64 : 25-85, 1994.
40. Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Sadio, T., and Green, D. R. : Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 270 : 6425-6428, 1995.
41. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87 : 171, 1996.
42. Hwang, S.-G., Park, J. U., Lee, H. C., Joo, W. H., Cho, Y.-K., and Moon, J.-Y. : Proteolysis of beta-catenin in apoptotic HL-60 cells. *Journal of Life Science*, 10 : 57-63, 2000.
43. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G. : Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 53 : 3979-3985, 1993.
44. Oltvai, Z. N., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74 : 609-619, 1993.
45. Grana, X., and Reddy, E. P. : Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, 11 : 211-219, 1995.
46. Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., and Stark, G. R. : The p53 network. *J. Biol. Chem.*, 273 : 1-4, 1998.
47. Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. : Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335 : 440-442, 1998.
48. Vaux, D. L. : Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 786, 1993.
49. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., and Currie, A. R. : Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68 : 251, 1980.
50. Wyllie, A. H. : Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues : an overview. *Cancer Meta. Rev.*, 11 : 95, 1992.
51. Casciola-Rosen, L. A., Miller, D. K., Anhat, G. J., and Rosen, A. : Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.*, 269 : 30757, 1994.
52. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. : A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 139 : 271, 1991.
53. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. J. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119 : 493, 1992.
54. 伸倍求 : 伸氏本草學, p.160, 161, 壽文社, 서울, 1981.
55. 江蘇新醫學院: 中藥大辭典, p.2587, 2588, 上海科學技術出版社, 上海, 1978.
56. 方約中. : 實用中醫內科學. 上海科學技術出版社, 上海, 1986.