

# A549 폐암 세포주에 대한 葶藶大棗瀉肺湯 및 葶藶湯의 Apoptosis 효과

유병길 · 김명동<sup>1</sup> · 황태준<sup>1</sup> · 유영민 · 이선구\*

상지대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 상지대학교 한의과대학 생리학교실

## Apoptotic Effects of *Junglyeokdaejosape-tang* and *Junglyeok-tang* on A549 lung Cancer Cells

Byeong Gil Yu, Myung Dong Kim<sup>1</sup>, Tae Jun Hwang<sup>1</sup>, Yeong Min Yoo, Seon Goo Lee\*

*Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Sangji University,*

*1: Department of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Sangji University*

Lung cancer is one of the common malignant tumors in the world. It occurs more increasingly due to the serious air pollution, heavy smoking, exposure to ionized radiation, pollution with heavy metal, and owing to well advanced diagnostic skill, etc. Also lung cancer has the limitation of medical care because metastasis is already shown up in more than half cases when it is first detected through medical examination. Although it is treated with chemoradiation, the rate of deaths from lung cancer is high as well, because blood has a lot of toxicity which give side effects. So it has a low rate of cure. So, the ways of various treatment is being researched to raise the rate of cure and decrease the side effects recently, and one of the results is inducing apoptosis which makes use of molecularbiologic diagnosis of lung cancer's cell and using oriental medicine drugs. The purpose of this study is whether apoptosis would happen on the human lung carcinoma cell by treated with *Jeonglyeokdaejosapye-tang*, *Jeonglyeok-tang*. *Jeonglyeokdaejosapye-tang* and *Jeonglyeok-tang* has been prescribed for cough, chest pain, and many other similar cases. Cough and chest pain is shown in early lung cancer. That is why we used these prescriptions. Apoptosis happend on the human lung carcinoma A549 cells treated with *Jeonglyeokdaejosapye-tang*, *Jeonglyeok-tang*. The concentration-dependent inhibition of cell viability was observed and apoptosis was confirmed by DNA fragmentation. Bcl-2 and COX-2 mRNA expression decreased, but Bax mRNA expression increased, so it was identified with the case of indomethacin known to enhance apoptotic DNA fragmentation. Also expression of the p21, p53, cyclin E, cyclin D1, cytochrome c, caspase-3, and caspase-9 protein increased and the activity of caspase-3 increased, as well. Last, fragmentation of the PARP was shown. The previous and present results indicated that apoptosis of A549 cells by above-mentioned drugs is associated with the blockage of G1/S progression.

Key words : *Jeonglyeokdaejosapye-tang*, *Jeonglyeok-tang*, human lung carcinoma A549(human lung carcinoma cell), apoptosis, PARP, Bcl-2, COX-2, caspass, cyclin, p21, p53

### 서 론

세계보건기구(WHO)가 오는 2020년까지 전 세계적으로 매년 1,500만명의 새로운 중앙환자가 발생할 것<sup>1)</sup>이라고 예측할 정

도로 중앙은 지구상에서 가장 심각한 질환중 하나이며, 특히 선진국의 경우, 폐암이 남녀 공히 암 사망률 1위를 차지하고 있으며, 국내의 경우도 매년 지속적으로 증가하는 경향을 보여주고 있다<sup>2)</sup>.

\* 교신저자 : 이선구, 원주시 우산동 660번지 상지대학교 한의과대학

· E-mail : returnto@sangji.ac.kr, · Tel : 033-730-0664

· 접수 : 2005/07/27 · 수정 : 2005/08/30 · 채택 : 2005/09/28

폐암의 치료법은 크게 외과적 절제술, 방사선요법, 화학요법, 내분비요법, 면역요법이 사용되고 있으며, 최근에는 분자생물학기법, 하이브리도마법 등을 이용한 중앙 관련 항원에 대한

항체 생산으로 종양의 진단 및 치료가 실시된다<sup>3)</sup>. 외과적 절제술과 방사선 요법은 화학요법과 더불어 상용되고 있으나 전신적으로 전이된 종양에는 부적절하며<sup>4)</sup>, 화학요법은 암세포의 DNA, RNA의 미세구조와 그 기능을 장애하는 방법으로 전신적 전이에 적용할 수 있지만 심한 식도염, leukoence-phalopathy, 호중구감소증, 설사와 같은 부작용을 유발하는 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 내분비요법은 유암, 전립선암의 경우처럼 hormone 생성기관을 절제하는 절제술과 estrogen, androgens, progestins, 부신피질 호르몬, 갑상선 호르몬 등의 호르몬을 투여하는 특수호르몬요법<sup>6)</sup>이 있으며, 면역요법은 암세포에 대해서도 일반적인 항원과 같이 면역반응이 관계한다고 생각되므로 숙주의防禦기전을 증강시키는 방법<sup>6)</sup>이나 아직 폐암의 완치와 생존기간 연장 등 그 결과가 만족스럽지 못하다.

폐암은 조직학적으로 소세포폐암과 비소세포 폐암으로 대별되며 환자의 약 80%를 차지하는 비소세포 폐암의 경우 근치적 절제술이 완치를 위한 치료법이지만 진단 당시 절제가 가능한 국한성 병변을 보이는 경우는 20%미만으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 이미 환자 반수 이상에서 전신전이기가 있어 절제술이 불가능하며 항암요법, 방사선요법을 병행하더라도 효과적인 생존기간을 연장시키지 못하며 혈액학적 독성이 심하여 부작용을 유발하기에 최근 암세포의 분자생물학적 특성을 이용한 생물학적 치료법<sup>8)</sup> 등의 대체의학 연구 필요성이 대두되고 있다. 국내에서도 전통적인 한약재와 다양한 천연추출물들을 이용한 항암제 연구가 활발히 진행되고 있어 이를 바탕으로 현재 임상 시험 중인 약재도 있다<sup>9)</sup>. 폐암은 기침, 지속적인胸痛, 喘鳴, 짧은 호흡, 반복되는肺炎, 氣管支炎, 咯痰, 血痰, 애성(hoarseness) 및 림프선 비대, 뼈의 통증을 증상으로 나타내며<sup>9)</sup> 이는 韓醫學 病名으로는 肺癰, 肺脹, 肺積, 肺疽, 肺痿, 咳嗽, 咳血, 痰飲, 胸痺, 喘證, 溢飲, 支飲, 息賁, 胸痛, 勞咳에 해당된다<sup>10)</sup>.

張의 《金匱要略》에 의하면 ‘肺癰, 喘不得臥, 葶藶大棗瀉肺湯主之’라 하였고<sup>11)</sup> 《普濟方》에서는 정력탕을 ‘治肺癰咳嗽上喘氣急不得臥涕唾稠粘胸膈不利’<sup>12)</sup>라 하여 肺癰에 사용한 기록이 있으며 肺癰의 主症인 咳嗽, 喘이 현대의 肺癌과 유사한 증상으로 보아 정력대조사폐탕(葶藶大棗瀉肺湯, Jeonglyeokdaejosapye-tang, Tinglidazaoxiefei-tang : 이하 JDST라 함)과 정력탕(葶藶湯, Jeonglyeok-tang, Tingli-tang : 이하 JT라 함)을 폐암세포에 처리하여 cell cytotoxicity와 apoptosis를 유도하는 유전자 및 효소의 활성도를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 암세포의 준비

본 실험에 사용한 암세포는 A549(KCLB 10185) human lung carcinoma cell로서 한국세포주은행으로부터 분양받아 5 % CO<sub>2</sub>와 95 % air의 배양기(존샘, 한국)에서 37 °C를 유지하며 배양하였다. 배양된 세포는 매일 위상차 현미경(HUND, Germany)을 통하여 관찰하고 주 1-3회의 계대배양을 하면서 적정하게 성장

시켜 사용하였다.

#### 2) 배지

기본배지는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 3.7 g/l sodium bicarbonate (Shinyopure Chemicals Co, Japan), penicillin G (100,000 Units/ml, Sigma, USA) 1 ml, streptomycin (100 mg/ml, Sigma, USA) 1 ml, fungizone (Gibco, USA) 4 ml을 첨가하여 혼합한 뒤, bottle top filter (Corning, USA)로 멸균하여 사용하였다. FBS(Gibco, USA)는 56 °C의 항온수조에서 30분간 inactivation시킨 후 사용하였다. 혼합배지는 RPMI 1640 기본배지에 FBS를 10 % 첨가하여 사용하였으며, 암세포 배양 전반에 사용하였다.

#### 3) 한약재 전탕액 제조

실험에 사용된 JDST과 JT은 각기 金匱要略과 普濟方을 기준으로 하였으며 상지대학교 한의과대학 본초학교실에서 精選한 것을 사용하였다. JDST 10첩 분량 70 g(Table 1)을 1000 cc의 물과 함께 3000 cc의 둥근 플라스크에 넣어 3시간 전탕하였고, 전탕 후 16겹의 거여즈로 두 번 걸렀다. 이후 -70 °C의 동결건조기(Biocryos, 한국)에서 48시간동안 동결건조하여 건조분말 9.59 g(수득율 13.7 %)을 얻었다. JT 10첩 분량 120 g(Table 2)을 1000 cc의 물과 함께 3000 cc의 둥근 플라스크에 넣어 3시간 전탕하였고, 전탕 후 16겹의 거여즈로 두 번 걸렀다. 이후 -70 °C의 동결건조기(Biocryos, 한국)에서 48시간동안 동결건조하여 건조분말 27.21 g(수득율 22.67 %)을 얻었다.

Table 1. Prescription of JDST<sup>12)</sup>

Herbal name	Pharmaceutical Name	Amount(g)
葶藶子	LEPIDII SEMEN	3.0
大棗	JUJUBAE FRUCTUS	4.0
Total amount		7.0

Table 2. Prescription of JT<sup>13)</sup>

Herbal name	Pharmaceutical Name	Amount(g)
葶藶子	LEPIDII SEMEN	4.0
桑白皮	MORI CORTEX	4.0
大棗	JUJUBAE FRUCTUS	4.0
Total amount		12.0

## 2. 방법

### 1) A549 폐암세포주 배양 및 세포생존율측정

A549 인체 유래 폐암세포주를 한국세포주은행에서 구입한 뒤, RPMI1640 (GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2×10<sup>5</sup> cells를 넣어 배양한 후 동결건조시킨 한약재의 엑스제를 각 0.02, 0.2, 1, 2, 4, 6, 8 mg/ml 농도로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5 % crystal violet(in 20% methanol)을 300 μl/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 μl 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후

570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

2) DNA fragmentation

처리한 배양세포를 얼음으로 차게한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700  $\mu$ l의 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45 분간 항온 시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 lysis를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 x g로 20 분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol 로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40  $\mu$ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)로 용해시키고, 200  $\mu$ g/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 1시간 항온시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light하에서 사진을 찍었다.

3) RT-PCR

RT-PCR용 primer는 Bioneer(한국)로 부터 구입하였다. RNA 실험에 사용되는 모든 완충용액은 0.1 % diethyl pyrocabonate(DEPC, Sigma)를 처리하여 사용하였으며, 모든 초자기구는 200  $^{\circ}$ C에서 24시간 가열 처리한 후 사용하였다.

(1) Total RNA 분리

1 $\times$ 10<sup>7</sup> 세포에 1 ml의 RNazol을 첨가하여 완전히 균질한 후 얼음에 15분간 방치하였다. 그리고 4  $^{\circ}$ C의 원심분리기로 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 분리된 상층액은 새로운 tube 에 옮긴 다음, 100 % ethyl alcohol를 500  $\mu$ l 첨가한후 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet을 0.1 % DEPC로 처리된 70% ethyl alcohol로 3번 세척하였다. 말린 pellet은 50  $\mu$ l의 RNase-free water를 이용하여 녹였다.

RNA 정량은 spectrophotometer(U-2000, HITACHI, Japan)를 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 추출된 Total RNA의 농도 및 순도를 계산하였다.

(2) RT(Reverse transcription)

RT-PCR을 위하여 배양세포에서 추출한 각각 1  $\mu$ g의 total RNA를 주형으로 하여 oligo dt primer(Bioneer, Korea)를 10 pmol씩 첨가한 후 여기에 PCR 완충용액, reverse transcriptase 20 U, RNasin 10 U 그리고 2 mM dNTP를 첨가하였다. 그리고 RNA-free water로 최종부피를 20  $\mu$ l가 되도록 조정후 57 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리 후 cDNA을 만들었으며 차후 실험에 사용하기 위하여 -20  $^{\circ}$ C냉동고에 보관하였다.

(3) PCR

Reverse transcripton으로부터 얻은 cDNA 2  $\mu$ l를 dNTP mixture 200  $\mu$ M, gene specific primer 300 nM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, reaction buffer(10 mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25  $^{\circ}$ C], 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), Taq polymerase 2 U을 잘 섞어 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하여 PCR에 사용하였다. PCR 반응은 thermocycler(Hybaidd, UK)에서 94 $^{\circ}$ C/2min(1회), 94 $^{\circ}$ C/1min(1회), annealing(1회) 그리고 72 $^{\circ}$ C/1min(1회)를 40회 반복하였고

마지막 신장반응을 72 $^{\circ}$ C에서 1회 수행하였다. 사용된 primer는 Table 3과 같다.

Table 3. Primer for Reverse transcription polymerase chain reaction

Target mRNA	Primer Sequence (5'→3')	Annealing Temperature
Bcl-2	forward CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C	52 $^{\circ}$ C
	reverse AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT	
COX-1	forward TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT	65 $^{\circ}$ C
	reverse GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC	
COX-2	forward TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT	52 $^{\circ}$ C
	reverse AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT	
BAX	forward GTG CAC CAA GGT GCC GGA AC	54 $^{\circ}$ C
	reverse TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA	
Cyclophilin	forward ACC CCA CCG TGT TCT TCG AC	53 $^{\circ}$ C
	reverse CAT TTG CCA TGG ACA AGA TG	

(4) Gel electrophoresis

PCR products를 확인하기 위하여 ethidium bromide(0.5 mg/ml)가 포함된 agarose(2 %)를 TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer (pH 8.3)에 녹여 사용하였으며, 시료 5  $\mu$ l와 3  $\mu$ l loading buffer를 gel에 주입하여 100 V로 30분간 전기영동하였다. 전기영동 끝난 gel을 UV transilluminator (Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기 (Polaroid H-3, USA)을 사용하여 자외선 조명하에서 촬영하였다.

4) Western blot 분석

(1) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1 $\times$ 10<sup>7</sup>의 세포 당 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1 % SDS) 100  $\mu$ l로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 그 후 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

(2) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준 곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1  $\mu$ g/ $\mu$ l)를 0, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu$ g/ $\mu$ l에 BCA 용액 100  $\mu$ l를 첨가하여 20분간 37  $^{\circ}$ C에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2  $\mu$ l와 BCA 용액 100  $\mu$ l을 섞은 뒤 20분간 37  $^{\circ}$ C에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

(3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100  $\mu$ g를 caspase-3와 cytochrome C를 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 Bcl-2(Santa Cruz, USA), Bax(Santa Cruz, USA), COX-2(Santa Cruz, USA), p21(Santa Cruz, USA), p53(Santa Cruz, USA), cyclin E(Santa Cruz, USA),

cyclin D1(Santa Cruz, USA), caspase-3(PharMingen, USA), caspase-9(PharMingen, USA), PARP(PharMingen, USA), cytochrome c(PharMingen, USA), actin(Santa Cruz, USA)의 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Fugi X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

5) Caspase-3 activity 측정

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10<sup>7</sup>의 세포 당 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % SDS) 100 μl로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브에 옮긴 다음 단백질농도를 측정하여 약 1mg의 단백질과 caspase-3 기질인 DEVD-cho (Calbiochem, USA)를 200 μM 농도로 150 μl와 10 mM DTT 10 μl를 넣고 30분, 1시간, 2시간 측정한 후 효소활성을 측정하였다. 이때의 단위는 absorbance/mg protein/hour로 사용하였다.

실험결과

1. JDST의 A549 human lung carcinoma cell에 대한 세포독성

JDST가 폐암세포에 직접적으로 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 A549세포에 동결건조시킨 JDST Ex제를 0.02부터 8mg 까지 농도별로 처리하여 24시간 경과후 세포생존율을 검사하였다(Table 4). 검사결과 대조군에 비하여 모든 실험군에서 세포생존율이 감소하였으며 6, 8mg에서 현저히 감소함을 보여주었다.

Table 4. A549 Human Lung Carcinoma Cell Viability after 24hrs Exposure with JDST.

Division(mg/ml)	% Viability	Mean	Standard deviation
Control		100.00	8.48
0.02		103.05	4.06
0.2		108.12	4.24
1		93.36	4.02
2		86.13	0.38
4		82.02	1.87
6		34.09	1.85
8		32.19	1.33

2. JT의 A549 human lung carcinoma cell에 대한 세포독성

JT가 폐암세포에 직접적으로 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 A549세포에 동결건조시킨 JT Ex제를 0.02부터 8mg까지 농도별로 처리하여 24시간 경과후 세포생존율을 검사하였다(Table 5). 검사결과 대조군에 비하여 모든 실험군에서 세포생존율이 감소하였으며 8mg에서 현저히 감소함을 보여주었다.

Table 5. A549 Human Lung Carcinoma Cell Viability after 24hrs Exposure with JT.

Division(mg/ml)	% Viability	Mean	Standard deviation
Control		100.00	9.19
0.02		74.27	3.46
0.2		66.44	3.66
1		57.09	7.55
2		54.44	4.82
4		51.71	3.34
6		62.30	0.97
8		22.24	0.37

3. DNA fragmentation

세포가 사멸하는 양상을 알아보기 위하여 제일 적당한 농도라도 생각되는 6 mg을 세포에 처리 한 다음 세포의 DNA fragmentation을 조사하였다(Fig. 1). 검사 결과 처리하지 않은 세포에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았으나 한약재 6mg을 처리한 세포에서는 모두 DNA fragmentation이 일어남을 확인하였다.

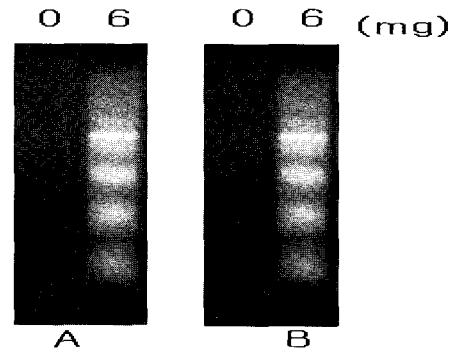


Fig. 1. DNA fragmentations of A549 human lung carcinoma cell treated with the oriental medicine drugs. Cells were incubated with the oriental medicine drugs. And then DNA solutions acquired in the cell lysis were performed electrophoresis described in Materials and Methods. A)A549 human lung carcinoma cell with JDST B)A549 human lung carcinoma cell with JT

4. JDST가 Bcl-2와 COX의 mRNA에 미치는 영향

JDST 처리로 인한 세포사멸이 apoptosis와 관계있는지 확인하기 위하여 Bcl-2, Bax와 COX-2를 RT-PCR하였다(Fig. 2). 검사 결과 0, 1, 6 mg을 처리하였을 때 농도에 따라 Bcl-2와 COX-2는 감소하였고, Bax는 증가하여 indomethacin과 동일한 양상을 보였다.

5. JT가 Bcl-2와 COX의 mRNA에 미치는 영향

JT 처리로 인한 세포사멸이 apoptosis와 관계있는지 확인하기 위하여 Bcl-2, Bax와 COX-2를 RT-PCR하였다(Fig. 3). 검사 결과 0, 1, 6 mg을 처리하였을 때 농도에 따라 Bcl-2와 COX-2는 감소하였고, Bax는 증가하여 indomethacin과 동일한 양상을 보였다.

6. Bcl-2와 COX protein의 발현

한약재 처리로 인한 apoptosis 유도가 전사수준에서 억제됨을 확인한 후 다시 단백질 수준에서도 억제됨을 확인하기 위하여

여 Western blot을 시행하였다(Fig. 4). 검사 결과 단백질수준에서도 Bcl-2, COX-2는 감소하였고 Bax는 증가함을 확인할 수 있었다.

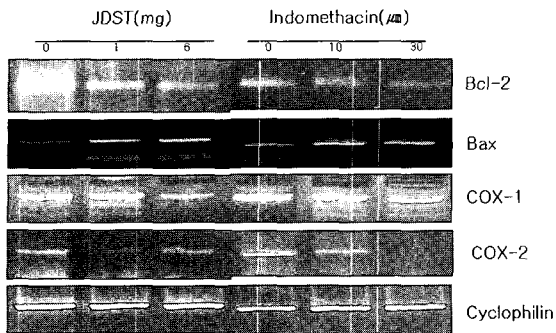


Fig. 2. Inhibition of Bcl-2 and COX-2 mRNA expression by the JDST in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the JDST and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in *Materials and Methods*. Cyclophilin was used as a house-keeping control gene.

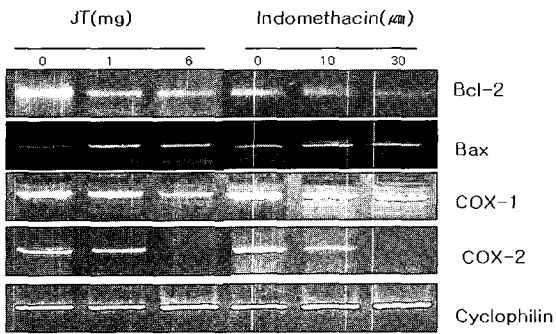


Fig. 3. Inhibition of Bcl-2 and COX-2 mRNA expression by the JT in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the JT and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in *Materials and Methods*. Cyclophilin was used as a house-keeping control gene.

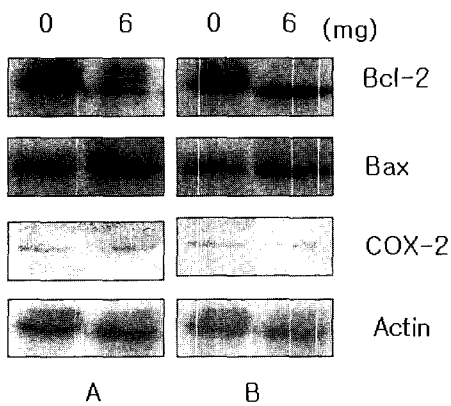


Fig. 4. Expression of Bcl-2 and COX-2 proteins by the oriental medicine drugs in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the oriental medicine drugs, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in *Materials and Methods*. The Action was used as a house-keeping control gene. A)A549 human lung carcinoma cell with JDST B)A549 human lung carcinoma cell with JT

7. p21, p53, cyclin E과 cyclin D1 proteins의 발현

JDST와 JT가 COX-2를 조절하여 세포성장을 억제함을 확인

하였고 이를 재차 확인하기 위하여 p21, p53, cyclin E 및 cyclin D1를 Western blot 분석을 통하여 확인하였다(Fig. 5). 검사결과 한약재를 처리한 모든 군에서 p21, p53, cyclin E, cyclin D1의 발현이 증가되었다.

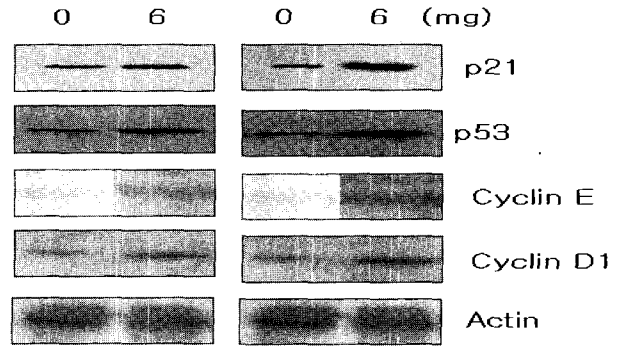


Fig. 5. Expression of p21, p53, cyclin E, and cyclin D1 proteins by the oriental medicine drugs in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the oriental medicine drugs, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in *Materials and Methods*. The Action was used as a house-keeping control gene. A)A549 human lung carcinoma cell with Jeonglyeokdaejosapye-tang B)A549 human lung carcinoma cell with Jeonglyeok-tang

8. JDST가 A549 human lung carcinoma cell의 caspase, cytochrome c 및 PARP에 미치는 영향

Apoptosis에 의한 세포사멸을 확실히 규명하기 위하여 JDST 처리후 caspase-3 enzyme, caspase-9 enzyme, cytochrome c 방출, PARP fragmentation을 Western blot 분석으로 확인하였다(Fig. 6). Western blot을 통하여 caspase-3, caspase-9, cytochrome c의 방출을 확인하였으며 JDST 6mg을 처리하였을 때 caspase-3 enzyme activity가 시간이 경과함에 따라 대조군에 비해 증가하였다. 이로써 PARP이 fragmentation이 일어나 DNA가 fragmentation이 일어남을 확인할 수 있었다.

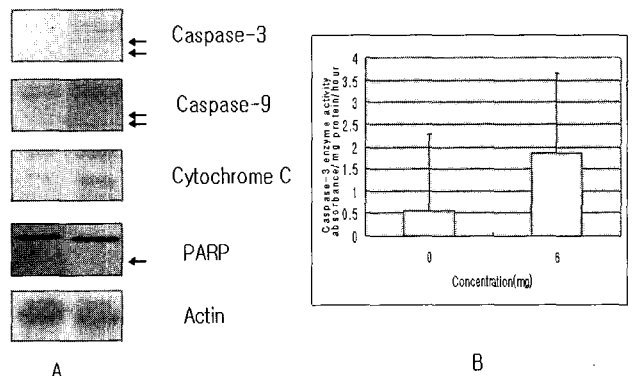


Fig. 6. Apoptotic effects of JDST on proteins of A549 human lung carcinoma cells. A)Expression of caspase-3, 9, and cytochrome C proteins by the JDST in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the oriental medicine drugs, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in *Materials and Methods*. The Action was used as a house-keeping control gene. B)The caspase-3 enzyme activity of A549 human lung carcinoma cell with the JDST. The extracted proteins were mixed DEVD-cho and then the activityof caspase-3 enzyme were measured on 30mins, 1hr, and 2hrs.

9. JT가 A549 human lung carcinoma cell의 caspase, cytochrome c 및 PARP에 미치는 영향

Apoptosis에 의한 세포사멸을 확실히 규명하기 위하여 JT 처리 후 caspase-3 enzyme, caspase-9 enzyme, cytochrome c 방출, PARP fragmentation을 Western blot 분석으로 확인하였다 (Fig. 7). Western blot을 통하여 caspase-3, caspase-9, cytochrome c의 방출을 확인하였으며 JT 6mg을 처리하였을 때 caspase-3 enzyme activity가 시간이 경과함에 따라 대조군에 비해 증가하였다. 이로써 PARP이 fragmentation이 일어나 DNA가 fragmentation이 일어남을 확인할 수 있었다.

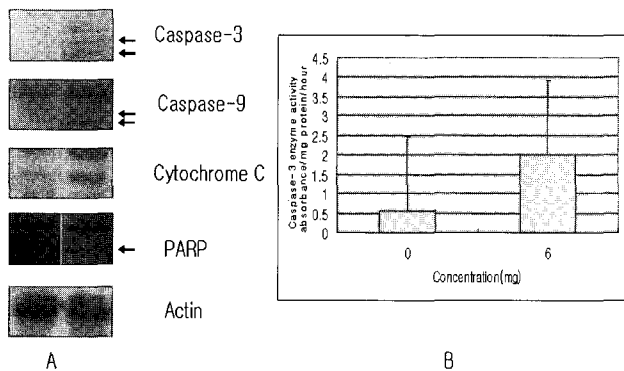


Fig. 7. Apoptotic effects of JT on proteins of A549 human lung carcinoma cells. A) Expression of caspase-3, 9, and cytochrome C proteins by the JT in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with the oriental medicine drugs, and then the proteins were isolated and performed western-blot using the Antigen-Antibody reactions described in Materials and Methods. The Actin was used as a house-keeping control gene. B) The caspase-3 enzyme activity of A549 human lung carcinoma cell with the JT. The extracted proteins were mixed DEVD-cho and then the activity of caspase-3 enzyme were measured on 30mins, 1hr, and 2hrs.

## 고찰

폐암은 전 세계적으로 가장 흔한 악성 종양의 하나로 미국을 비롯한 선진국에서는 남녀 공히 암사망률 1위를 차지하고 있으며 국내에서도 최근 그 빈도 및 사망률이 급격히 증가하고 있는 실정이다. 일례로 2000년도 사망자료에 의하면 폐암으로 인한 경우는 미국은 73.4명(남자 10만명당), 일본은 52.1명(남자 10만명당) 우리나라의 경우는 24.4명이 사망을 했으며<sup>13)</sup> 이는 향후 중대한 보건 의료 문제로 대두될 것이다.

폐암의 원인은 흡연이 가장 크며 그 외 폐석면증, 전리방사선에의 노출, 니켈, 크롬 등의 중금속 오염 및 대기오염 등과 관련이 있고<sup>14)</sup> 그 증상으로는 기침, 지속적인胸痛,喘鳴, 짧은 호흡, 반복되는肺炎,氣管支炎,咯痰,血痰, 애성(hoarseness) 및 림프선 비대, 뼈의 통증이 나타나며 피로, 식욕부진, 체중감소를 일으킬 수 있다<sup>9)</sup>. 폐암은 조기 발견하여 수술하면 70%이상 완치될 수 있기에 폐암을 조기 발견하고자하는 노력이 일찍이 이루어졌으며 크게 흉부방사선 촬영, CT 촬영(Low dose spiral CT scan:LDCT), 객담 세포진 검사, autofluorescence bronchoscopy, new imaging techniques의 다섯 방면으로 연구가 진행되고 있다. 1970년대에 이루어진 연구에 의하면 정기적인 흉부 X-선 활

영 및 객담 세포진 검사를 통하여 폐암의 조기 발견율은 높일수 있지만 궁극적으로 사망률을 줄이지는 못한다고 하였다. 그러나, 최근 미국 국립암연구소(NCI)에서는 전립선, 폐, 대장, 난소암에 대한 조기발견에 대한 연구를 시행하기로 하였으며 이 연구에서 정기적인 흉부 X-선 촬영의 유용성에 대한 결론을 얻을 수 있을 것으로 기대된다<sup>15)</sup>. Low dose spiral CT scan(LDCT)를 통한 폐암의 조기발견 방법은 침습적, 비침습적 검사가 추가되면서 경제적 및 정신적 피해가 야기되는 것으로 보고되었으나<sup>16)</sup> 2002년 미국 국립암연구소(NCI)에서 이를 이용한 폐암조기발견의 유용성을 다시 검증할 예정이다<sup>17)</sup>.

현재 폐암의 치료법으로는 제한기 소세포폐암의 경우 화학요법과 방사선치료의 병합요법(chemoradiation)<sup>18)</sup>을 사용하고 있으나 심한 식도염의 발생이 빈번하고 환자의 불편함이 문제시 되고 있으며 뇌전이 발생빈도를 줄이기 위한 prophylactic cranial irradiation(PCI)는 생존율을 5.4%정도 향상시키는 것으로 보고되었으나<sup>19)</sup> leukoencephalopathy와 같은 후유증을 유발할 수 있어 c-kit의 과발현을 이용한 생물학적 치료법이 연구중이다. 전체 폐암의 80%를 차지하는 비소세포암은 외과적 절제술과 절제가 불가능한 경우 화학요법과 방사선 치료를 병행하고 있으나 치료의 독성과 환자의 활동도 및 나이 등을 고려해야 하며 실제 생존율 향상에 어느 정도 기여하는가 문제시되고 있다. 최근 비소세포암의 경우, HER-2/neu39와 EGFR의 발현<sup>20)</sup>이 증가되는 점을 이용하여 항체를 병행한 치료법이 연구중이며 farnesyl protein transferase 억제제, matrix metalloproteinase 억제제, signal transduction modulator인 bryostatin, antiangiogenesis제인 BAY12-9566, anti-VEGF, dend replacement therapy(Ad-p53)의 임상시험이 진행 중에 있으나 백혈구 감소, 빈혈, 혈소판 감소증, 골수기능이 저하되는 혈액학적 독성과 경도의 오심 및 구토 탈모, 고열, 설사, 손발의 저림 등의 부작용과 생존기간의 연장 등 아직 그 결과가 만족스럽지 못한 실정이다<sup>5,21)</sup>.

이러한 폐암의 예방법의 문제점 및 치료율 저조 및 부작용 문제로 인하여 기존 치료법을 대체할 수 있는 치료법이 연구 중이며 분자생물학적 접근 외에도 전통적인 한약재와 다양한 천연 추출물들을 이용한 항암제 개발이 활발히 진행되는 중이다<sup>2)</sup>. 또한, 화학요법이나 방사선요법으로 발생하는 현훈,乏力 등의 전신증상과 오심구토, 식욕부진, 복통, 설사의 위장장애, 골수조혈 장애, 장기의 중독, 신경염, 폐경, 탈모, 피부변화의 부작용을 健脾和胃, 滋補肝腎, 補氣養血, 生津潤燥, 清熱解毒시키는 한약으로 경감시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>22,23)</sup>.

葶藶大棗瀉肺湯(JDST)는 葶藶子和 大棗로 구성되었으며 葶藶湯(JT)는 葶藶大棗瀉肺湯에 桑根白皮가 첨가되어 구성되었으며 각 處方의 구성약재의 본초학적 意義는 다음과 같다. 葶藶子는 大適, 大室, 丁歷, 葦蒿로 불리며 十字花科에 속한 다당덩이의 成熟한 種子를 건조한 것으로 性은 寒無毒하고 味는 辛苦하며 肺, 膀胱經으로 歸經하여 瀉肺平喘, 利水消腫하는 效能이 있어 痰涎壅肺, 喘咳痰多, 胸脇脹滿, 不得平臥, 胸腹水腫, 小便不利를 다스린다. 大棗는 乾棗, 美棗, 紅棗로 불리며 갈매나무과에 속한 대추의 성숙한 果實을 乾燥한 것으로 性은 溫無毒하고 味는 甘

하며 脾, 胃經으로 歸經하여 補脾和胃, 益氣生津, 調營衛, 解藥毒하는 效能이 있어 胃虛食少, 脾弱便溏, 氣血津液不足, 營衛不和, 心悸怔忡, 婦人臍躁를 다스린다. 桑白皮는 桑根白皮라고도 불리며 뽕나무과에 속한 뽕나무의 根皮를 건조한 것으로 性은 寒無毒하고 味는 甘하며 肺經으로 歸經하여 瀉肺平喘, 利水消腫의 效能이 있어 肺熱咳嗽, 水腫脹滿尿少, 面目肌膚浮腫을 다스린다<sup>24</sup>. 본 실험에서는 JDST와 JT가 폐암세포의 apoptosis 유도 실험을 하였으며 검사항목으로는 세포독성실험, DNA fragmentation, COX-1, COX-2, Bcl-2, Bax, p53, p21waf1/cip1, caspase-3, caspase-9 enzyme, cyclin D1과 E를 측정하였다. JDST와 JT가 폐암세포에 직접적으로 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 A549세포에 동결 건조시킨 Ex제를 농도별로 처리한 결과, 대조군에 비하여 세포생존율이 감소하였으며 이는 DNA fragmentation을 확인한 결과 apoptosis 과정을 거침을 확인하였다. Apoptosis는 생체내에서 세포가 죽게 되는 기전 중 하나로 정상세포의 순환시 자발적으로 일어나는 세포의 자살행위로서 세포의 항상성을 유지한다는 면에서 생리적 및 화학적인 손상에 의한 세포사멸인 necrosis와 구별되며<sup>25</sup>, 세포생물학의 중요 연구 분야이다. Apoptosis에 관여하는 유전자는 다양하며 그중 Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-1, Ced-9, LMW5-HL, BHRF1 등이 apoptosis를 억제하고 Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs, Bik 등은 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되었다<sup>26</sup>. 이중 Bcl-2와 Bax는 서로 dimer를 형성하면서 만일 Bax가 주종단백질로 heterodimer를 만들면 apoptosis를 촉진시키고 Bcl-2가 주종을 이루면 apoptosis를 억제시키는 것으로 설명되는데 이 기전은 mitochondria에서 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspases 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 효소활성을 조절하여 apoptosis 유발에 관여하는 것으로 보고되었다<sup>27</sup>.

COX-1은 인체의 항상성을 유지하는 기능을 수행하며 COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다. 일례를 들면 COX-2와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 다양한 암세포에서 높은 수준으로 발현되고 있으며 실험적으로 이들의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 것으로 보고되었다<sup>28</sup>. JDST와 JT 처리로 인한 세포사멸이 apoptosis와 관계있는지 확인하기 위하여 Bcl-2와 Bax를 RT-PCR하였으며 그 결과 한약재를 0, 1, 6mg 처리하였을 때 모든 군에서 농도에 따라 Bcl-2는 감소하였고, Bax는 증가하였으며 COX-2도 감소하는 모습을 보여 주었다. 이는 apoptotic DNA 분절을 유도하는 것으로 알려진 NSAIDs 약물 중 하나인 indomethacin<sup>29</sup> 과 같은 양상을 보여 세포사멸이 apoptosis와 연관성이 있었다.

세포 분열 과정에 있어 DNA의 정보가 RNA에 전사된 다음 이에 의하여 단백질이 합성되는 과정을 거치게 되므로 이상과 같이 한약재 처리로 인한 apoptosis 유도가 전사수준에서 억제됨을 확인한 후 다시 단백질 수준에서도 억제됨을 확인하기 위하여 western blot을 시행한 결과 한약재를 처리한 모든 군의 경우 단백질수준에서도 Bcl-2, COX-2는 감소하였고 Bax는 증가함을 재차 확인할 수 있었다.

세포의 수명은 시간이 아닌 분열횟수에 의해 결정되어 지며 정해진 횟수의 세포분열이 끝나면 더 이상 분열할 수 없는 상태, 즉 세포노화상태(senescence)가 되는데 암세포의 경우는 여기에 해당되지 않는다. 이러한 세포분열은 포유동물의 경우 cyclins에 의해 조절되는데 cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 조절하여 각각 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성을 위한 양성 조절자<sup>30</sup>로서의 역할을 수행한다. D-type cyclin은 Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 이루며 retinoblastoma protein(pRb)의 인산화 조절과 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성조절에 중요한 전사인자 E2Fs의 활성을 조절하고<sup>31</sup> cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할<sup>32</sup>을 담당하고 있다. 한편 Cdk는 크게 INK4와 CIP/KIP family의 두가지 Cdk inhibitor에 의하여 활성이 억제되어진다<sup>33</sup>. DNA 손상에 의한 p53의 발현 증가는 세포주기상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서<sup>34</sup> CIP/KIP family에 속하는 p21 및 p27을 조절을 하는 것으로 알려져 있다<sup>35</sup>. p21은 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 proliferating-cell nuclear antigen(PCNA) 과도 결합을 하여 DNA replication을 억제함<sup>36</sup>이 밝혀졌다.

JDST와 JT가 암세포성장을 억제할 수 있는지를 알아보기 위하여 cyclin E 및 cyclin D1를 측정하였고 DNA 손상여부를 확인하기 위하여 p21 및 p53를 Western blot 분석하였다. Cyclin E 및 cyclin D1의 발현이 증가된 것으로 보아 세포주기상 G1기에서 S기로의 전이가 촉진된 것으로 보여지며 p21의 발현이 증가된 것은 G1기에서 세포 증식이나 DNA 복제가 억제되는 모습을 예측할 수 있다. 또한 p53의 발현이 증가된 것으로 보아 G1기에서의 세포증식이 억제되고 Bax를 활성화하며 Bcl-2의 발현을 억제하여 정상적인 DNA 복제와 세포 증식이 이루어지지 못하고 S기로 넘어 가 apoptosis가 유도된 것으로 추정할 수 있다.

Caspase라고 명명된 ICE/CED-like protease family도 apoptosis 유발에 중요한 역할을 수행하는데 이들은 세포내에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 형태인 32kDa의 proenzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 활성화된 17kDa 및 19kDa 분자량을 가지는 cystein-related protease로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여 한다<sup>37</sup>. 또한, PARP는 특정 내, 외부 신호전달에 의하여 세포내에서 apoptosis가 일어나면 116kDa의 분자량을 가지는 이들이 85kDa 크기의 단편으로 분해되는 것으로 알려져 있으며<sup>38</sup> apoptosis 과정중 caspase의 활성에 의해 단백질의 분해가 일어나면 DNA repair나 genomic stability의 유지 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어 진다<sup>39</sup>.

JDST와 JT 6mg 처리하였을 때 cytochrome c의 방출이 있었으며 caspase-3 enzyme activity가 증가 하였고, 이 때 western blot을 실시한 결과 활성화된 밴드를 확인할 수 있었다. 또한 caspase-9 enzyme 역시 활성화되었으며, PARP이 fragmentation이 일어남을 확인할 수 있었다. 이는 cytochrome c 유리로 인하여 caspase 효소의 발현과 활성이 증가되어 apoptosis 과정이 유

도되면서 PARP의 fragmentation이 일어나는 것으로 보여진다.

이를 종합하여 보면 葶藶大棗瀉肺湯과 葶藶湯은 A549 human lung carcinoma cell에 직접적인 독성이 있으며 이 과정은 p53의 발현이 증가되어 세포주기상 G1기의 세포 증식과 apoptosis를 억제하는 Bcl-2 gene의 발현을 억제시키고 BAX를 과발현시킴으로서 apoptosis 과정을 유도하며 이 신호로 COX-2의 발현이 억제되고 cytochrome c가 유리되어 caspase-3, 9를 활성화시켜 세포내 단백질을 분해시키고 PARP의 fragmentation을 유도함으로써 정상적인 DNA repair 과정을 억제함으로써 apoptosis를 유도한다고 할수 있다. 한편, p53과 p21의 발현이 증가되어 G1기에서의 세포증식이 억제되는 동시에 cyclin D1, E의 발현이 증가되어 세포가 G1기에서 충분히 증식하지 못하고 불완전한 상태로 S기로 넘어가고 DNA replication을 억제하는 p21의 과발현과 DNA repair나 genomic stability를 담당하는 PARP의 기능이 상실됨으로서 apoptosis가 유도된다. 이러한 결과를 바탕으로 葶藶大棗瀉肺湯과 葶藶湯은 폐암세포의 apoptosis를 유도함이 밝혀졌으나 생체 투여시의 용량 및 방법과 그에 따른 부작용 여부에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

본 실험에서는 葶藶大棗瀉肺湯과 葶藶湯이 A549 human lung carcinoma 세포의 apoptosis 유도에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

폐암세포에 직접적으로 미치는 세포독성을 측정한 결과, 전체적으로 대조군에 비하여 세포생존율이 감소하였으며 JDST는 6, 8 mg에서, JT는 8 mg에서 현저히 감소하였다. 모든 군에서 DNA fragmentation이 나타났다. mRNA와 protein의 경우, 모든 군에서 Bcl-2와 COX-2는 감소하였고 Bax는 증가하였다. 모든 군에서 p21, p53, cyclin D1, cyclin E protein의 발현이 증가하였다. 모든 군에서 cytochrome c의 유리를 확인할 수 있었으며 caspase-3, 9 효소의 활성화와 PARP fragmentation을 확인하였다.

이상의 결과에서 葶藶大棗瀉肺湯과 葶藶湯이 A549 human lung carcinoma cell에 직접적인 독성이 나타났으며 이 과정에서 p53, p21, Bax의 발현과 caspase의 활성도가 증가되고 Bcl-2가 억제되는 등의 과정을 통하여 apoptosis가 유도되었다. cyclin D1, E protein의 증가로 보아 G1기에서의 세포의 충분한 증식이 이루어지지 못하고 S기로 넘어가며 DNA replication을 억제하는 p21의 과발현과 DNA repair나 genomic stability를 담당하는 PARP의 기능이 상실됨으로 인하여 최종적으로 apoptosis가 유도되는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. WHO. Cancer, WHO, <http://www.who.int/cancer/en/>, 2004.
2. 강연이, 김태임, 박종오, 김성훈, 박종대, 김동희. 韓醫學의 抗腫瘍 免疫治療에 관한 연구-1990년 이후 발표된 실험논문들을 중심으로, 동의생리병리학회지 17(1):1-24, 2003.

3. 조완규. 腫瘍學, 서울, 서울대학교 출판부, pp 91-92, 1990.
4. 이문호. 內科學, 서울, 금강출판사, pp 2466-2478, 1979.
5. 조근제. 폐암의 치료방법, 대한내과학회지, 62(6):600-607, 2002.
6. 田炳旭 외. 癌에 대한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 관한 考察, 대한한방중양학회지 1(1):34-87, 1995.
7. Ginsberg, R.J., Vokes, E.E., Raben, A. Non-small cell lung cancer. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer: Principles and practice of oncology, 5th edit, Philadelphia: Lippincott-Raven, pp 858-911, 1997.
8. 서울대학교 천연물과학연구소. 신동약 개발사업 연구기획 최종보고서. pp 378-382, 1992.
9. 한용철. 임상호흡기학, 서울, 일조각, p 137, 1995.
10. 김성훈, 박경식, 유시용 : 생약복합제제 길경탕 및 가미길경탕의 항암효과(제 2보). 생약학회지 27(1):42-46, 1996.
11. 김정범 편저. 金匱要略辨釋, 서울, 韓醫文化社, p 196. 2000.
12. 朱 楠 등 編. 普濟方, 中國醫學大系 Vol. 24. 도서출판 鼎談. pp 443-448.
13. 통계청. 2000년 사망원인통계결과. 2001.
14. 박재갑. 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판부, pp 392-394, 1994.
15. 김영환. 폐암의 조기발견, 대한내과학회지 65(1):4-9, 2003.
16. Bach, P.B., Kelley, M.J., Tate, R.V., McCrory, D.C. Screening for lung cancer: a review of the current literature, Chest 123, pp 72S-82S, 2003.
17. Smith, R.A., Cokkinides, V., Eyre, H.J. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. CA cancer J. Clin. 53, pp 27-43, 2003.
18. Pignon, J.P., Arriagada, R., Ihde, D.C., Johnson, D.H., Perry, M.C., Souhami, R.L., Brodin, O., Joss, R.A., Kies, M.S., Lebeau, B, et al. A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer, N. Engl. J. Med. 327(23):1618-1624, 1992.
19. Auperin, A., Arriagada, R., Pignon, J.P., Le Pechoux, C., Gregor, A., Stephens, R.J., Kristjansen, P.E., Johnson, B.E., Ueoka, H., Wagner, H., Aisner, J. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. N. Engl. J. Med. 341(7):476-484, 1999.
20. Kris, M.G., Natale, R.B., Herbst, R.S., Lynch, T.J., Prager, D., Belani, C.P., Schiller, J.H., Kelly, K., Spiridonidis, C., Albain, K.S., Brahmer, J.R., Sandler, A., Crawford, J., Lutzker, S.G., Lilenbaum, R., Helms, L., Wolf, M., Averbuch, S., Ochs, J., Kay, A. A phase II trial of ZD1839('Iressa') in advanced non-small cell lung cancer(NSCLC) patients who had failed platinum-and docetaxel-based regimens(IDEAL 2). Proceeding of ASCO 21, p 292a, 2002(abstr 1166).
21. 조용선, 김시영, 김정희, 윤희중, 조경삼. 진행성 비소세포 폐암에서 Etoposide, Ifosfamide Cisplatin(VIP) 복합요법의 효



- 과, J. Korean Cancer Assoc. 32(1):86-92, 2000.
22. 김동희 외. 抗癌劑 및 放射線 副作用에 대한 韓方療法, 동의 병리학회지 9, pp 240-249, 1994.
  23. 林鈞華 외. 中藥 및 中藥 · 방사선 · 화학 결합요법으로 원발성 간암 수술후 잔류와 재발을 치료함, 한글판 중의, p 46, 1994.
  24. 강병수, 고운채, 김선희, 노승현, 안병준, 신민교, 안덕균, 이상인, 이영중, 이강희, 주영승. 本草學, 서울, pp 484-486, 542-543, 1991.
  25. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. Cell Biol. Int. 17, pp 461-476, 1993.
  26. 김하원. 번역학사전, 서울, 서울시립대학교출판부, pp 37-39, 2001.
  27. Roose, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature 391, pp 496-499, 1998.
  28. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. Mutat. Res. pp 480-481, 243-268, 2001.
  29. Hidenobu, K., Hirotsugu, K., Hiroshi, S., Kunio, S. Reactive oxygen species are involved in the apoptosis induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured gastric cells. European Journal of Pharmacology 383, pp 331-337, 1999.
  30. Brandeis, M., Hunt, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. EMBO J. 15. pp 5280-5289, 1996.
  31. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 14, pp 2066-2076, 1994.
  32. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science 257, pp 1689-1694, 1992.
  33. Elledge, S.J., Harper, J.W. CDK inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. Curr. Opin. Cell Biol. 6, pp 847-852, 1994.
  34. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80, pp 293-299, 1995.
  35. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75, pp 805-816, 1993.
  36. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366, pp 701-704, 1993.
  37. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275, pp 1132-1136, 1997.
  38. 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, pp 3976-3985, 1993.
  39. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell 81, pp 801-809, 1995.