

U-937 세포에서 導赤承氣湯 추출물 중 부탄올 분획에 의한 Apoptosis 유도

박평범 · 정한솔 · 김 호 · 진재호 · 정상훈 · 한 웅 · 이문원¹ · 이광규*

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 우석대학교 한의과대학 해부학교실

Apoptosis Induced by n-butanol Fraction of DoJeokSeungKi-Tang Extracts in U-937 Cells

Pyeong Beom Park, Han Sol Jeong, Ho Kim, Jae Ho Jin, Sang Hun Jeong, Ung Han,
Moon Won Lee¹, Kwang Gyu Lee*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
1: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University

To investigate the anti-cancer effects of n-butanol fraction of DoJeokSeungKi-Tang extracts(nBFD) in U-937 cells. MTT assay was used to determine U-937 cells proliferation. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Bcl-xL anti-apoptotic protein and caspase-3, p53 pro-apoptotic protein were examined by Western blot analysis. nBFD inhibited the proliferation of U-937 cells in a dose-dependent manner. The cells treated with nBFD showed a typical apoptotic process by increasing sub-G1 peak. nBFD reduced uptake of 3,3'dihexyloxacarbocyanine iodide(DiOC₆) a fluorochrome which incorporates into cells dependent upon their mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$). nBFD induced in U-937 cells apoptosis mainly via increasing sub-G1 peak, regulation of Bcl-xL, caspase-3 and p53 protein.

Key words : mitochondrial transmenbrane potential, RT-PCR

서 론

세포의 증식 및 분화는 세포와 세포와 기질과의 작용에 영향을 주는 여러 성장인자와 호르몬 등의 상호작용에 의해 조절되며^{1,2)}, 이렇게 조화롭게 구성된 조절기전에 이상이 생기면 세포의 증식 및 분화기전에 불균형이 나타나 암이 발생하게 된다³⁾.

한의학 문헌에서 암이라는 용어는 宋代의 東軒居士가 지은 《衛濟寶書》⁴⁾에서 최초로 기록되었으나, 《黃帝內經》에는 “腸覃”, “石瘕”, “膈中” 등 악성종양의 증후에 대한 기록이 있으며⁵⁾, 《難經》의 “積聚”, 《諸病原候論》의 “癰瘕”, “石瘕” 및 後世의 “失榮”, “石疽”, “腎岩” 등은 胃腸管, 子宮, 肝, 脾臟 등 腸器의 肿瘤를 표현하고 있다^{6,7)}.

역대 醫家들은 대부분 그 원인을 濕痰瘀滯에 두고 있는데 가령 《靈樞·百病始生篇》⁸⁾에서는 “汁沫與血相搏 則并合凝聚不得散 而積成矣”라 하였고, 《丹溪心法》⁹⁾에서는 “凡人上中下

有塊者, 多是痰”이라 하였다. 또한 악성종양과 毒邪는 관련이 있는데 《中藏經》¹⁰⁾에서는 “夫癰疽瘡腫之所作也, 皆五臟六腑蓄毒不流則生矣”라 하였다. 郁¹¹⁾은 外感六淫, 內傷七情, 飲食不節 및 邪毒 등으로 개체의 장부기능이 실조되어 氣滯血瘀, 濁聚痰結, 熱毒蘊結, 經絡瘀阻 등의 기전으로 종괴가 형성되고 변화되며, 이러한 변화가 서로 교착되면서 氣機不通을 초래하여 암이 발생하는 것으로 인식하였고, 치료방법으로는 扶正培本法, 祛邪法, 扶正祛邪法 등을 사용하였다^{12,13)}.

한의학에서의 암 치료는 정기의 항병능력을 증진시키는 방법을 강조하나, 치료효과가 완만하고 병소부위를 제거하기 어려우며 암세포 살해능력이 강하지 않은 등의 결점이 있다. 그래서 인체의 면역력을 강화시키는 동시에 암세포에 대한 직접적인 치료효과를 강화하여, 서양의학의 수술요법, 화학요법, 방사선요법의 부작용을 최소화하려는 연구가 시도되고 있다¹⁴⁾.

더욱이 최근 채소나 생약이 함유하고 있는 천연물이 항산화의 효능이 있는 것으로 보고되면서 기능성 식품으로서의 존재가치를 더해가는 추세에 있으며 이 중 몇몇 물질들은 항암효과가

* 교신저자 : 이광규, 전북 원주군 삼례읍 후정리 490 우석대학교 한의과대학

· E-mail : kwangl@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1562

· 접수 : 2006/03/02 · 수정 : 2006/05/08 · 채택 : 2006/05/25

있는 것으로 인정되고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾.

導赤承氣湯은 淸末 吳瑭의 《溫病條辨》¹⁸⁾에서 陽明溫病 중 “下之不通, 左尺牢堅, 小便赤痛, 時煩渴甚” 증에 쓰이는 것으로 기록되어 있다. 정 등¹⁹⁾은 導赤承氣湯 를 추출물이 여러 백혈병 세포주에 대한 항암효과가 있는 것으로 보고하였다.

이에 저자는 導赤承氣湯 중 구체적으로 어떤 물질이 항암능력을 보유하고 있는지 관찰하기 위해 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄으로 용매분획한 추출물을 가지고 여러 가지 apoptosis 기전을 실험하여 그 중 부탄을 분획에서 유의성 있는 apoptosis 유도효과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재의 추출

본 실험에 사용한 導赤承氣湯의 구성은 《溫病條辨》¹⁸⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 한방병원에서 정선해서 사용하였고, 처방구성은 Table 1과 같고 추출방법은 Fig. 1과 같다.

Table 1. Contents of Dojeokseungki-Tang.

韓藥名	生藥名	重量(g)
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	11.25
生地黃	Rehmanniae Radix	18.75
生大黃	Rhei Radix et Rhizoma	11.25
黃連	Coptidis Rhizoma	7.50
黃柏	Phellodendri Cortex	7.50
芒硝	Natrii Sulfas	3.75
總量		60.00

Table 2. Dojeokseungki-Tang extracts by Solvent Separation.

導赤承氣湯		
시료무게	1.0kg	
추출용매	MeOH : H ₂ O 20	30.12g
추출시간	4시간	
추출온도	80°C	
	CHCl ₃ fraction	3.71g
	EtOAc fraction	7.22g
	n-BuOH fraction	18.36g

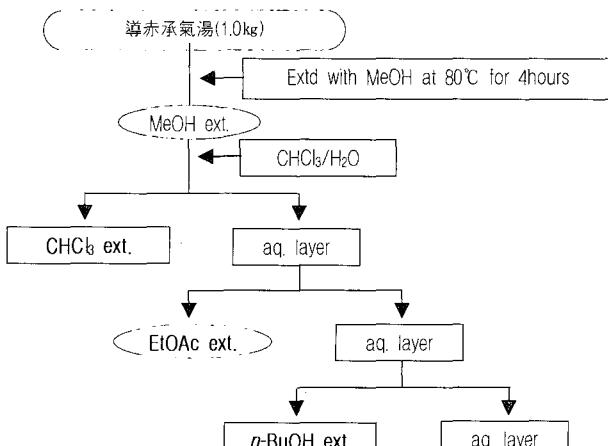


Fig. 1. Schematic diagram of solvent fraction from Dojeokseungki-Tang.

2) 세포배양

한국세포주은행(KCLB)에서 분양받은 U-937 세포(human histiocytic lymphoma cell)는 RPMI-1640 media에 10% fetal bovine serum을 첨가하여 습윤한 상태의 CO₂ incubator에서 5% CO₂ 농도를 유지한 채 배양하였다.

3) 시약 및 환체

실험에 사용한 시약은 RPMI-1640 media, FBS(GIBCOBRL, Grand island, USA), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide(PI), TEMED, prestained SDS-PAGE standard, sodium dodecyl sulfate(Bio-Rad, Hercules, USA), Trizol reagent(Life Technologies®, Grand island, USA), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(Sigma, St. Louis, MO, USA), PVDF membrane(Bio-Rad, Hercules, USA), ECL kit(General Biosystem, Korea) 및 기타 시약은 세포배양용 특급시약을 사용하였다. 사용한 항체는 Anti-rabbit Bcl-2 antibody(Santacruz Inc. Delaware Avenue, USA), Monoclonal human anti-Bcl-xL antibody, Monoclonal anti-human Caspase-3 antibody(i상 R&D system, Minneapolis, MN, USA), Anti-rabbit p53 antibody(Cell Signaling Beverly, MA, USA)를 사용하였다. 사용기구로는 culture flask(Nunc), 96well microplate(Costar), micrometer(Mitutoyo), ELISA reader(Molecular Devices, Versa Max), laser flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), centrifuge(Hamnil-Mega 17R), CO₂ incubator(SHEL LAB, USA), freeze dryer(Ilsin lab, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포생존율 측정(MTT assay)

계대배양한 U-937 세포의 세포부유액을 조제(1×10^6 cells/well)하고 導赤承氣湯 부탄을 분획(1~100μg/ml, n-butanol fraction of DoJeokSeungKi-Tang extracts; 이하 nBFD라 칭함)을 가하여 48시간 동안 37°C의 CO₂ 배양기(5%-CO₂, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20μl를 각 well에 첨가하고, 0.1N HCl에 녹인 10% SDS 100μl로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570nm에서 측정한 후 미처리군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다.

2) 단백질 정량 및 Western blot analysis²⁰⁾

배양된 U-937 세포에 nBFD를 1, 10, 100μg/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후 수집하여 PBS로 washing하고 lysis buffer(50mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 100μg/ml PMSF, 10μg/ml leupeptin, 1% NP-40)를 사용하여 30분가량 얼음에 둔 다음 pipetting으로 용해시키고 원심분리를 이용하여 상층액을 얻어서 Bradford reagent를 이용하여 단백질을 정량하였고²¹⁾, 전체 lysate 30μg/lane을 기준으로 12% SDS-PAGE gel에 loading하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질들은 PVDF membrane으로 230mA에서 1시간 동안 transfer되었고, 5% skim milk를 이용하여 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체는 anti-rabbit caspase-3

monoclonal antibody, anti-rabbit bcl-xL antibody, anti-rabbit p53 antibody를 각각 1:1000, 1:1000, 1:500으로 3% BSA in PBS에 희석, 4°C에서 overnight 하여 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-goat IgG를 1:10000으로 5% skim milk에 희석하여, 실온에서 1시간 동안 반응시키고 ECL을 이용하여 band를 확인하였다.

3) Propidium Iodide(PI) 염색에 의한 DNA 함량 분석

Nicoletti 등의 방법²²⁾으로 계대배양 중인 U-937 세포에 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 nBFD를 첨가한 후, 24시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정($\times 3$ 회, 1,500rpm, 5분)한 후, 침전시킨 세포분획에 PI($10\mu\text{g}/\text{ml}$)를 $20\mu\text{l}/1 \times 10^6\text{cells}$ 의 농도로 염색(4°C , 30분간 반응)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation: 488nm, emission: 620nm)를 이용해서 DNA fragmentation(sub-G1 peak)을 정량하였다.

4) Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$) 측정

계대배양 중인 U-937 세포에 1, 10 및 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 nBFD를 첨가하여 24시간 동안 배양하고, 세포를 수집하여 세정($\times 3$ 회, 1,500rpm, 5분)한 후, $1 \times 10^6\text{cells}/\text{well}$ 이 되도록 세포를 조정해서 원심분리(250g, 10분)하고 침전시킨 세포분획에 DiOC₆(최종농도: 40nM)로 염색시켜 37°C 에서 15분간 반응시킨 다음 laser flow cytometer(excitation: 488nm, emission: 525nm)에서 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)을 측정하였다²³⁾.

5) 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다²⁴⁾.

결과

1. 세포생존율에 미치는 효과

계대배양한 백혈병세포주인 U-937 세포에 1, 10 및 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 nBFD를 첨가해서 48시간 동안 배양하고, MTT assay로 세포생존율을 측정한 결과, 미처리군을 100%로 하였을 때, 10 및 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도투여군에서 각각 $89.5 \pm 11.8\%$, $57.3 \pm 13.6\%$ 로 증식을 억제하였다(Table 3).

Table 3. Effect of nBFD on the proliferation of cultured U-937 cells.

Dose($\mu\text{g}/\text{ml}$)	viability(%)
0	100 ± 0.5
1	113.8 ± 3.6
10	89.5 ± 11.8
100	$57.3 \pm 13.6^*$

nBFD(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was treated with cultured U-937 cells, and incubated for 48hours, and the cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570nm with a microplate reader. *: Significantly different from control group($p < 0.05$).

2. Apoptosis 유관 단백질 발현

계대배양한 U-937 세포에 nBFD를 농도별로 처리한 후 단백질을 추출하여 western blotting을 통해 apoptosis를 유도하거나 억제하는 단백질의 발현을 관찰한 결과, apoptosis를 억제하는 단백질로 알려진 bcl-xL의 발현이 농도의존적으로 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, apoptosis를 유발하는 중요한 단백

질인 caspase-3와 p53 단백질의 발현은 농도의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

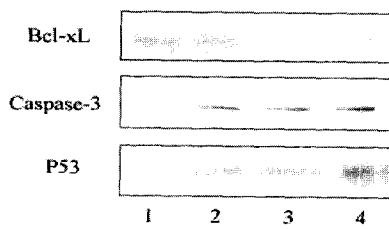


Fig. 2. Western blot analysis of Bcl-xL, Caspase-3, p53. The cells were treated with nBFD for 24hours, and lysates were collected for immunoblotting analysis. Total protein were isolated from untreated cells(lane 1) and cells treated with $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 2), $10\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 3), or $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 4) for 24hours.

3. Sub-G1 peak

nBFD를 농도별로 24시간 동안 처리한 U-937 세포를 PI로 염색하여 유세포분석기로 세포주기의 분포도를 분석한 결과 미처리군과 비교하여 각 농도처리군에서 apoptosis를 나타내는 sub-G1 peak가 증가하였으며, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있는 증가를 보였다(Table 4).

Table 4. Effect of nBFD on the apoptosis of cultured U-937 cells.

Dose($\mu\text{g}/\text{ml}$)	DNA Fragmentation(%)
0	26.7 ± 2.7
1	28.7 ± 2.3
10	35.3 ± 2.9
100	$40.7 \pm 0.9^*$

nBFD(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was treated to cultured U-937 cells, and incubated for 24hours, and cells were collected and the sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. *: Significantly different from control group ($p < 0.05$).

4. Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)

nBFD를 농도별로 24시간 동안 처리한 U-937 세포를 DiOC₆로 염색하여 유세포분석기로 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)을 분석한 결과 미처리군에 비해 농도의존적으로 membrane potential이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

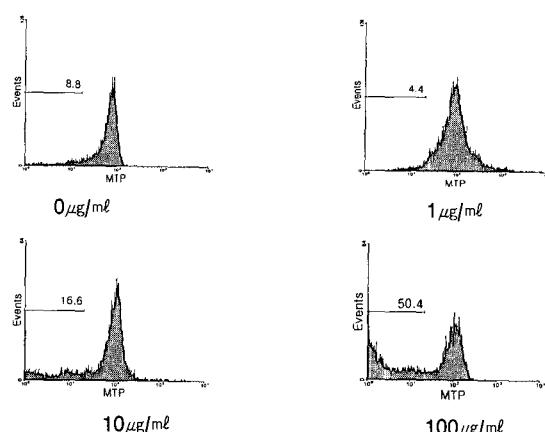


Fig. 3. Alteration of $\Delta\Psi\text{m}$ induced by nBFD. Determination of DiOC₆ incorporation into untreated U-937 cells or treated with nBFD(1, 10, $100\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hours. Cells were stained with DiOC₆ in the presence of a buffer containing either 140mM NaCl or 140mM KCl.

고 찰

종양이란 개체를 구성하는 정상세포가 여러 종류의 자극에 의해 유전자의 형질이 전환되고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 면역학적 행동이 변한 변형 세포가 유전적으로 대를 이어 조절할 수 없이 증식하여 형성된 세포의 집단, 즉 새로이 생긴腫塊를 뜻한다. 암이 발생하는 빈도는 지역, 인종, 생활양식에 따라 크게 다르나 일반적으로 인구 10만명당 연간 300-400명 정도가 되며, 악성종양이 발생하는 빈도는 증가 추세를 보여 사망원인 중 순환기질환 다음으로 2위이며, 현대의학의 암진단과 치료법을 다 동원해도 암환자의 약 반수는 결국 암으로 사망하는 것이 현재의 실상이다²⁵⁾.

서양의학에서의 암치료법으로는 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 있다²⁶⁾. 암치료의 성공 여부를 결정하는 것은 조기발견과 그에 따라 수술 혹은 방사선치료를 통해 국한된 암을 치료할 수 있는가의 여부인데, 불행히도 대부분의 암이 진단되는 시기에 이미 전이가 일어나 있기 때문에 수술이나 방사선요법 단독으로는 치료할 수 없다. 암의 화학요법에 있어서 그간 주요한 진보가 있어왔고, 지금은 약제를 효과적으로 조합하여 투여함으로써 급성 림프구성 백혈병, Hodgkin 질병, non-Hodgkin 림프종과 고환암에 걸린 많은 환자들을 치료할 수 있게 되었다. 그럼에도 폐암, 유방암, 결장암, 전립선암과 같은 흔한 성인의 암은 여전히 화학요법으로 치료되지 않는다²⁷⁾. 최근 한의학계에서는 한약이나 약침액을 대상으로 항암·항전이²⁸⁻²⁹⁾ 및 항암제 부작용 억제효과³⁰⁻³¹⁾ 등을 검토하는 많은 연구가 진행되고 있다.

한의학에서 암에 대한 기재는 宋代의 《衛濟寶書》⁴⁾에서 최초로 기술되었으며, 이전의 《黃帝內經》³²⁻³³⁾에서는 “腸覃”, “石瘕”, “息責”, “瘤病”, “伏梁”, “厥瘡”, “瘕聚” 등으로 기술되었다. 痞³⁴⁾는 “留結不散”이라 하여 氣血이 체내에 留結된 결과로 발생한다고 하였고, 葛³⁵⁾은 “돌과 같이 단단하며 통증이 극심하여 주야로 울 정도이며 치료하지 않으면 백일 내에 죽는다”고 하여 오늘날의 암과 유사한 증상을 기술하고 있다. 이 외 문헌에 나타난 종양의 범위에 드는 병증으로는 反胃, 噄膈, 積聚, 瘡塊, 癥瘕, 疰癧, 石瘤 등이 있다³⁶⁻³⁸⁾.

동서의학에 있어서 암의 원인을 종합해보면 外感六淫과 邪毒(화학적, 물리적, 바이러스성 발암인자) 등의 外因과 內傷七情의 内因, 그리고 飲食不節(유전, 연령, 인종, 지리학적 요인, 면역학적 요인, 개개인의 감수성 등)의 不內外인이 암발생의 중요한 인자로 인식되고 있다. 이러한 암의 병인병기에 관여하는 인자들은 서로 영향을 미치고 상호작용을 거쳐서 전체적인 암발생의 병리과정을 형성하게 된다³⁹⁻⁴⁰⁾.

한의학에서 암의 치료법으로는 清熱解毒, 活血祛瘀, 化痰軟堅, 行氣散結 등의 攻邪法과 健脾益氣, 健脾補腎, 益氣補血, 滋陰溫陽 등의 扶正法으로 대별하여 활용하고 있다⁴¹⁾.

導赤承氣湯은 《溫病條辨》¹⁸⁾에 수록된 처방으로 “陽明溫病, 下之不通, 左尺牢堅, 小便赤痛, 時煩渴甚” 증에 쓰인다고 기록되었다. 이는 溫病 중 下法을 썼는데도 대변이 통하지 않고 소

장의 熱이 盛하여 小便赤痛이 있을 때 사용하는 처방으로 정¹⁹⁾ 등은 다양한 백혈병세포주에 대한 항암효과도 보고하였다.

이에 저자는 항암효과를 보이는 것으로 보고된 導赤承氣湯을 용매분획하여 이 중에서 구체적으로 어떤 물질이 효과를 보이는지 알아보기 위하여 각 분획의 효능을 살펴본 결과 부탄을 분획에서 apoptosis를 유도하는 효능이 있음을 관찰하였다. 구체적으로 MTT assay에 의한 U-937 cells의 세포생존율, 유세포분석기를 이용한 sub-G1 peak 및 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$) 등을 측정함과 아울러 apoptosis와 관련된 단백질인 bcl-xL, caspase-3, p53의 발현을 western blotting을 실시함으로써 apoptosis 효과를 살펴보았다.

nBFD를 농도별로 처리한 U-937 세포에서 PI염색을 한 후 유세포분석기를 통한 sub-G1 peak를 정량한 결과 대부분의 농도에서 유의성 있게 apoptosis를 유도하고 있음이 관찰되었고, U-937 세포배양계에 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 nBFD를 첨가하여 apoptosis가 유도되었을 때에 $\Delta\Psi_m$ 의 감소가 일어나고 있는지를 검토한 결과, 대조군에 비하여 1, 10 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 모든 농도의 nBFD 첨가군에서 $\Delta\Psi_m$ 가 유의성 있게 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

Apoptosis를 조절하는 분자생물학적인 기전에 대한 많은 정보가 *Caenorhabditis elegans*의 연구로부터 나왔다⁴²⁻⁴³⁾. *C. elegans*의 발생 과정에서 1090개의 세포 중 131개의 세포가 apoptosis 과정으로 소실되었는데 이 과정은 세 유전자에 의해 조절되어지며, CED3, CED4, CED9가 그것이다. CED3과 CED4는 apoptosis를 일으키는 유전자이고 CED9는 apoptosis를 억제하는 유전자이다. CED3 유전자를 클로닝한 결과, 포유류의 cystein protease인 ICE와 동일하다는 사실이 밝혀졌다⁴⁴⁾. Miura⁴⁵⁾ 등은 Rat-1 fibroblast에서 ICE와 CED3이 과발현 되었을 때 apoptosis를 유도함을 증명하였다. 또 많은 종양유전자와 종양억제유전자들의 산물이 apoptosis를 조절하는데 관여하는데, 그 중 종양억제유전자인 p53은 DNA의 상태를 감찰하고 DNA가 손상되었을 경우 세포주기를 촉진시키는 조절자로 알려진 cyclin-dependent kinases의 인산화를 막아주는 p21 단백의 발현을 유도시킴으로써 세포주기를 멈추게 한다⁴⁶⁾. 이렇게 세포주기가 멈춰진 상태에서는 DNA 복구기전이 활성화되며, 만일 DNA의 복구가 실패하게 되면 p53은 apoptosis를 유도하는 bax를 과발현시키고, 항apoptosis 작용을 하는 bcl-2 발현을 억제시킴으로써 apoptosis를 야기한다⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

이상의 내용을 종합하면, 導赤承氣湯의 부탄을 추출 분획은 U-937 백혈병 세포에 apoptosis를 유발하였다.

결 론

導赤承氣湯 부탄을 추출분획을 생쥐에 투여하고 U-937 세포의 apoptosis에 미치는 효과를 관찰한 결과는 다음과 같다.

導赤承氣湯 부탄을 추출분획은 계대배양한 U-937 세포의 증식을 억제시켰다. 導赤承氣湯 부탄을 추출분획은 계대배양한 U-937 세포에서 apoptosis를 억제하는 bcl-xL의 발현을 감소시켰고, apoptosis의 발생에 결정적인 caspase-3와 p53 단백질의 발현

을 증가시켰다. 導赤承氣湯 부탄을 추출분획은 계대배양한 U-937 세포에서 농도의존적으로 sub-G1 peak를 증가시킴으로써 apoptosis 유도효과를 나타내었다. 導赤承氣湯 부탄을 추출분획은 U-937 세포의 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$)을 감소시켰다.

이상의 실험 결과, 導赤承氣湯 부탄을 추출분획은 U-937 백혈병세포주에 대해 유의성 있게 apoptosis를 유도함으로써 항암 작용을 보였다.

참고문헌

- Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28, 1976.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141, 1993.
- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. Carcinogen specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322:78-80, 1986.
- 余桂清. 歷代中醫腫瘤案論選釋. 北京: 北京出版社; pp 1-2, 1988.
- 楊維傑 主編. 癌症腫瘤醫論醫華精選. 藥華文化事業公司; pp 1-4, 1989.
- 李佩文. 如何正確選用抗癌中成藥. 中醫雜誌 9:46-48, 1989.
- 紀鈞, 曹杰. 中醫治癌經驗精華. 江蘇科學技術出版社; pp 6-7, 1998.
- 金達鎬, 李鍾聲. 注解補注黃帝內經靈樞. 서울: 醫聖堂; p 1174, 2001.
- 元·朱震亨 撰. 丹溪醫集. 人民衛生出版社; p 246, 1993.
- 漢·華陀 撰. 中藏經 卷中. 江蘇科學技術出版社; p 45, 1985.
- 郁仁存. 中醫腫瘤學. 上海: 上海科學技術出版社; pp 1-22, 41-44, 384-391, 1991.
- 儲水鑫. 惡性腫瘤中醫調理四法. 上海中醫藥雜誌 7:33-34, 1992.
- 趙建斌, 吳一純教授治療晚期惡性腫瘤的經驗. 陝西醫學 14:451-454, 1993.
- 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울: 행림출판; pp 142-143, 1995.
- Farr, D.R. Functional foods. *Cancer Lett* 114(1-2):59-63, 1997.
- Lim, Y.J., Lee, C.O., Hong, J., Kim, D.K., Im, K.S., Jung, J.H. Cytotoxic polyacetylenic alcohols from the marine sponge Petrosia species. *J Nat Prod* 64(12):1565-1567, 2001.
- Kitts, D.D., Wijewickreme, A.N., Hu, C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. *Mol Cell Biochem* 203(1-2):1-10, 2000.
- 吳鞠通. 溫病條辨. 北京: 中國中醫藥出版社; p 596, 1996.
- 박민철, 권진, 정한솔, 이광규. 導赤承氣湯의 白血病細胞의 Apoptosis에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 17(2):338-345, 2003.
- Burnette, W.N. "Western blotting" - Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 112:195-203, 1981.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G., Riccardi, C.A. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-279, 1991.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., Kroemer, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181:1661-1672, 1995.
- Dowdy, S., Weardon, S. Statistics for research. New York: Wiley; p 262, 1983.
- 大韓病理學會. 病理學. 高文社; p 179, 2001.
- 서울대학교의과대학. 腫瘍學. 서울: 서울대학교출판국; pp 1-3, 137, 203-204, 213-215, 225-234, 1989.
- 백운기, 흥경만 역. 암유전자. 월드사이언스; p 347, 2000.
- 李鳳雨. 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 실험적 연구. 大韓韓醫學會誌 15(1):245-263, 1994.
- 康坼林. 數種 韓藥材의 抗癌活性 研究. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集 3(2):315-321, 1995.
- 孫甲鎬 외. 柴胡 茵陳의 肝癌세포에 대한 抗癌活性 및 抗癌劑 와의 相乘效果. 大韓韓醫學會誌 16(2):414-432, 1995.
- 張代釗 외. 中醫藥對腫瘤放化療的增敏減毒作用. 中國中西結合雜誌 12(3):135-138, 1992.
- 河北醫學院. 靈樞經校釋. 人民衛生出版社; 上卷 pp 78, 219, 下卷 pp 37, 48, 142, 255, 326, 391, 1982.
- 王洪圖. 黃帝內經素問. 春秋出版社; pp 71, 237, 271, 1988.
- 巢元方. 諸病源候論. 臺北: 文化圖書有限公司; pp 1-17, 129, 1979.
- 葛洪. 脈後備急方. 北京: 人民衛生出版社; pp 203-210, 1987.
- 賈楂. 癌瘤防治研究. 서울: 成輔社; pp 25-28, 1984.
- 史宇廣 等. 當代名醫臨證精華. 肿瘤全集. 北京: 中醫古籍出版社; pp 1-25, 1992.
- 薛己. 薛氏醫案. 上海: 上海古籍出版社; p 315, 1980.
- 白明鉉, 金疼痛, 金聖勳. 癌과 痘血의 東西醫學의 相關性에 대한 研究. 大田大學校 韩醫學研究所 論文集 7(2), 1999.
- 中國中西醫結合研究會 中國中醫研究院. 惡性腫瘤中西醫結合的研究成就. 中西醫結合雜誌 8(2):57, 1988.
- 權昶賢, 金演鎮, 趙鍾寬. 國內에서 自生하는 抗癌效果가 있는 食物에 대한 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집 6(2), 1988.
- Hengartner, M.O., Horvitz, H.R. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4:581-586, 1994.
- Horvitz, H.R., Shaham, S., Hengartner, M.O. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 59:377-385, 1994.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R.

- The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1b converting enzyme. *Cell* 75:641-652, 1993.
45. Miura, M., Zhu, H., Hartwieg, E.A., Rotello, R., Yuan, J. Induction of apoptosis in fibroblasts by interleukin-1beta converting enzyme, a mammalian homolog of *C. elegans* cell death gene ced-3. *Cell* 75:653-660, 1993.
46. Harper, J.W., Adamo, 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* 75:805-816, 1993.
47. Lane, D.P. P53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16, 1992.
48. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299, 1995.
49. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799-1805, 1994.