대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.23 NO.3 : 038-055 (2010)

四物湯加味方의 항암효과에 대한 실험적 연구

[1]동국대학교 대학원 한의학과 한방부인과교실, [2]동국대학교 바이오시스템대학 생명과학과
정재중[1], 구선영[2], 임새롬[2], 성정석[2], 김동일[1]

ABSTRACT

Anti-cancer Effects of *Samultang-Gami* on HeLa, HepG2, AGS Cells

Jae-Joong Jung[1], Sun-Young Goo[2], Sae-Rom Lim[2], Jung-Suk Sung[2], Dong-Il Kim[1]
[1]Dept. of OB & GY, Graduate school of Oriental Medicine, Dong-Guk Univ.
[2]Dept. of Life Science, Dong-Guk Univ.

Purpose: This study was designed to find out the anti-cancer effects of *Samultang-Gami* which was composed of *Rehmanniae Radix(RR), Angelicae Gigantis Radix(AGR), Cnidii Rhizoma(CR), Paeoniae Radix(PR), Cortex Moutan Radicis(CMR), Hedyotis Diffusa(HD)* and *Caesalpinia Sappan* on HeLa, HepG2 and AGS cells.

Methods: Various cancer cell lines including HeLa, HepG2 and AGS cells, were used. In vitro anti-cancer effects were measured by MTT assay using cancer cell lines treated with various concentrations of 70% ethanol extract of *Samultang-Gami*. Expression of cell cycle arrest mediators including Bax, Bcl-2, p53 and DARP-1 proteins were measured by Western blot analysis.

Results:
1. *Samultang-Gami* decreased the viability of HeLa and HepG cells in a dose-dependent manner.
2. *AGR, CMR, PR* and *HD* decreased the viability of HeLa, HepG2 and AGS cells.
3. We could observe that the decreased Bax and Bcl-2 expression level and the increased PARP-1 expression level by *Samultang-Gami* extracts treated in HeLa cells.
4. We could observe that the decreased Bcl-2 expression level and the increased Bax, p53 and PARP-1 expression level by *RR* extracts treated in HeLa cells. and also could observe that the reduction of the protein level of Bcl-2, p53 and PARP-1 and the increase of the protein level of Bax by *PR* in HeLa cells.
5. We could observe that the increased p53 expression level, the decreased PARP-1's that and the unchanged Bax and Bcl-2's that by *Samultang-Gami* extracts treated in HepG2 cells.
6. We could observe that the reduced Bcl-2 expression level by each of *RR* extracts and *PR* extracts in HepG2 cells.
7. The treatment of *Samultang-Gami* in AGS cells didn't have any effect on the expression level of Bax, Bcl-2, p53 and PARP-1 .
8. We could observe that the increased p53 and PARP-1 expression level by each of *CR, RR* and *PR* extracts in AGS cells.

Conclusion: Taken together, we suggest that *Samultang-Gami* exhibits cytotoxic effects on HeLa, HepG2 and AGS cells, causing apoptosis. The results showed that *Samultang-Gami* may do so by regulating the expression of specific target molecules that promote efficient apoptotic cell death in a dose-dependent manner.

Key Words: *Samultang-Gami*, HeLa, HepG2, AGS, Apoptosis, Bax, Bcl-2, p53, PARP-1, anti-cancer.

교신저자(김동일) : 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 한방여성의학과
전화 : 031-961-9060 이메일 : obgykdi@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

2008년 통계청 통계결과에 따르면 암은 우리나라 사망원인 중 28%로 1위를 차지하고 있다. 특히 60대는 암이 전체 사망자의 42.1%를 차지하고, 매년 그 비중이 증가추세에 있다[1]. 미국에서는 심장병에 이어 암이 두 번째로 흔한 사망원인이다[2]. 그러나 정부와 유관기관에서의 연구와 과학기술의 발전, 암 조기 진단의 발전과 암 예방 사업으로 우리나라의 경우, 암 진단 후 5년 생존율이 1993~1995년의 41.2%에서 2003~2007년의 57.1%로 현저히 증가하였다[1].

이렇듯 지난 수십 년간 암을 정복하려는 노력으로 다양한 화학요법, 수술요법, 방사선 요법 등의 암 치료법이 개발되었지만, 인구의 노령화와 산업화로 인한 환경파괴 및 오염물질의 증가및 잘못된 식이습관으로 인해 암의 발생억제와 근원적 치료에 대해서는 임상적 한계에 부딪히고 있는 실정이다[3]. 또한 현재 널리 사용되고 있는 항암제는 대부분 합성 물질들로 부작용이 심각한 문제로 대두되고 있으며, 이로 인해 최근에는 부작용이 적으면서 유효한 천연 항암제의 개발을 위하여 천연물을 대상으로 예방 및 치료물질의 검색과 개발에 대한 노력이 활발히 전개되고 있다[4,5].

이에 저자는 부작용이 적고 안정적인 암 치료제 개발을 위한 연구의 일환으로 調益營衛, 滋養血의 대표적인 처방인 四物湯을 기본으로 하되, 方中의 熟地黃을 生地黃으로 대체하고, 牧丹皮, 白花蛇舌草, 蘇木을 가미한 四物湯加味方을 구성하여, 생쥐 배아섬유아세포(MEF cells)에 四物湯加味方 추출액을 처리하여 세포의 생존율을 조사하고, 인간 자궁경부암 세포주(HeLa cells), 인간 간암 세포주(HepG2 cells), 인간 위암 세포주(AGS cells)에 이 처방의 추출액을 처리하여 각 세포의 생존율, Bax, Bcl-2, p53, PARP-1 발현량을 조사하였다. 이러한 일련의 연구를 통해 유의한 결과를 얻었기에 이 논문을 통하여 발표하고자 한다.

Ⅱ. 연구 방법

1. 재료 및 추출물의 제조

四物湯加味方 구성약물은 生地黃(SJH) 當歸(DK) 白芍藥(BJY) 川芎(CK) 蘇木(SM) 牧丹皮(MDP) 白花蛇舌草(BSC)로써 각각 옴니허브(서울, 한국)를 통하여 구입하여 정선하여 사용하였고 한 첩의 용량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Samultang-Gami*

Herbal Name	Scientific Name	Amount (g)
生地黃	*Rehmanniae Radix*	8
當 歸	*Angelicae Gigantis Radix*	4
川 芎	*Cnidii Rhizoma*	4
白芍藥	*Paeoniae Radix*	4
牧丹皮	*Cortex Moutan Radicis*	3
白花蛇舌草	*Hedyotis Diffusa*	8
蘇 木	*Caesalpinia Sappan*	3
Total amount		34

fluorescent mounting medium (DakoCytomation, CA)를 제외한, 4′-6-

diamidino-2-phenylindole(DAPI),[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide](MTT), dimethylsulfoxide (DMSO) 및 모든 화학약품은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

에탄올 추출물(ethanol extract)은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에 시료의 10배에 해당하는 70% ethanol을 넣고 70℃의 수욕상에서 3시간 동안 추출한 후 추출액을 filter paper (Whatman No. 5)로 여과하였다. 남은 잔사를 위와 같은 방법으로 2회 더 추출하여 모은 각 추출액을 감압농축하여, 동결건조기(freeze dryer, Ilshin Lab Co., LTD, Korea)로 동결건조하여 시료로 사용하였다. 四物湯加味方 추출물 ×1는 100㎎/㎖ 농도로 추출하였으며, 각 실험에 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포와 세포배양

실험에 사용된 세포주는 MEF cells, HeLa cells, HepG2 cells, AGS cells로 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, USA)에서 분양받았다. MEF 세포는 10% FBS와 1× penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(PAA, Austria)에서 배양하였다. AGS cells는 10% FBS, 1× penicillin/streptomycin, 1mM Sodium pyruvate, 4.5g/L glucose가 포함된 RPMI1640(Welgene, Korea)배지에서 배양하였고, HepG2, HeLa cell은 10% FBS, 1× penicillin/streptomycin, 1mM Sodium pyruvate가 포함 된 MEM(Welgene, Korea) 배지에서 배양하였다. 배양 시 온도는 37℃를 유지하고 5% CO_2와 95% 공기를 공급하였다.

2) 세포 활성도 측정

세포활성도(cell viability)는 MTT 분석법으로 측정하였다. MEF cells는 4.0 × 10^4 cells/mL로, HeLa, HepG2, AGS cells는 각각 5.0 × 10^4 cells/mL로 96-well 배양접시에 분주하고 24시간 동안 배양하였다.

MEF cells에 24시간 동안 PBS를 처리한 Control군을 설정하고, 四物湯加味方 개별약물(0.1, 0.5, 1. 5 ㎎/㎖)을 처리한 것과 四物湯加味方(×1000, ×500, ×100, ×50, ×10)을 처리한 것을 각각 실험군으로 설정하여 개별 실험을 진행하였다.

AGS, HepG2, HeLa cells는 24시간 동안 PBS를 처리한 대조군, 四物湯加味方 약재 처리한 실험군으로 나누어 四物湯加味方의 암세포주 손상여부와 정도를 알아보았다.

세포를 PBS(Welgene, Korea)로 2회 세척하고 MTT 용액(5 ㎎/㎖) 10 ㎕첨가하여 37℃ 배양기에서 3시간 동안 두었다. 배지를 제거하고 DMSO를 200 ㎕첨가했다. 10분 간 배양기에 둔 후, microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Western blot analysis

48시간 동안 四物湯加味方 처리를 한 HeLa cell을 배양하고 PBS로 세척한 다음, mammalian cell lysis buffer인 RIPA buffer(50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 1% Nonidet P-40, protease inhibitors(1 ug/mL leupeptin, 1 ug/mL aprotinin, and 1 mM PMSF)로 resuspension하고 ice상에서 30분 동안 incubation 한 다음 centrifuge(16200rpm,

4℃, 20분)을 하여 세포파쇄액을 만들었다. 세포파쇄액의 단백질을 Bradford protein assay를 통해 정량하고, 단백질을 lane 당 60 ug으로 표준화하고, 10% SDS-PAGE gel에서 분리한 다음, 이동완충용액(transfer buffer; 39 mM glycine, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, and 20% methanol)를 사용하여 PVDF membrane에 옮겼다. Transfer된 membrane을 1% skim milk로 blocking시킨 다음, Protein detection system인 SNAP i.d를 이용하여 Bax(primary antibody)(Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA) 1:1500으로 10분씩 2번 반응시키고, 1 × TBST(20 mM Tris-HCl(pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 3회 세척한 다음, mouse anti-rabbit IgG-HRP(secondary antibody 1:1500)(Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA)도 10분씩 2회 반응시키고 난 후 1 × TBST (20 mM Tris-HCl(pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 3회 세척 한 다음 enhanced chemilumine-scence (ECL)로 발색시키고 X-ray film으로 감광하여 시각화하였다. 그 다음, 단백질 band의 농도를 Image Quant software (Amersham Biosciences, UK)를 사용하여 각각의 四物湯加味方, 川芎, 生地黃, 白芍藥에서의 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1을 정량하였다.

4) Statistical analysis

실험 결과는 Mean±SD값으로 나타내었으며, 본 실험에서 얻은 결과를 one-way ANOVA Tukey's test(GraphPad Prism)로 분석하여 p값을 구하였다. 대조군을 각 실험군에 비교하여 $p<0.05$일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1) 四物湯加味方 개별 약재 처리 농도에 따른 MEF cells의 생존율

四物湯加味方의 안전성을 확인하기 위해 먼저 四物湯加味方의 개별 약물 안전성을 알아보기 위하여 MEF cells에 각 약재의 70% ethanol 추출물을 처리하여, 세포의 활성도를 알아 볼 수 있는 MTT assay를 시행하였다.

生地黃은 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 cell viability가 증가하는 것을 보였고 실험군의 모든 농도에서 대조군에 비해 높은 cell viability를 보였으며, 川芎 또한 0.1, 0.5, 1㎎/㎖ 농도의 실험군에서 대조군에 비해 높은 cell viability를 보였고, 5㎎/㎖ 농도의 실험군에서도 대조군에 비해 cell viability 감소폭이 크지 않았다. 白芍藥 牧丹皮 白花蛇舌草도 0.1, 0.5, 1㎎/㎖ 농도에서 cell viability가 대조군에 비해 증가하거나 소폭 감소하였고, 5㎎/㎖ 농도에서는 대조군에 비해 50%이하로 감소하였다. 當歸의 경우 0.5㎎/㎖ 농도에서부터 cell viability가 급격히 감소하였고, 蘇木은 결과 확인이 어려웠다(Fig. 1).

2) 四物湯加味方 처리 농도에 따른 MEF cells의 생존율

四物湯加味方의 안전성을 확인하기 위해 MEF cells에 四物湯加味方 70% ethanol 추출물 ×1 100㎎/㎖를 기준으로 ×1000, ×500, ×100, ×50, ×10농도로 희석 처리하여, MTT assay를 시행하였다.

각각의 농도로 24시간 유지 후 확인한 결과 ×1000, ×500 농도에서 안전성이 확인되었다(Fig. 2).

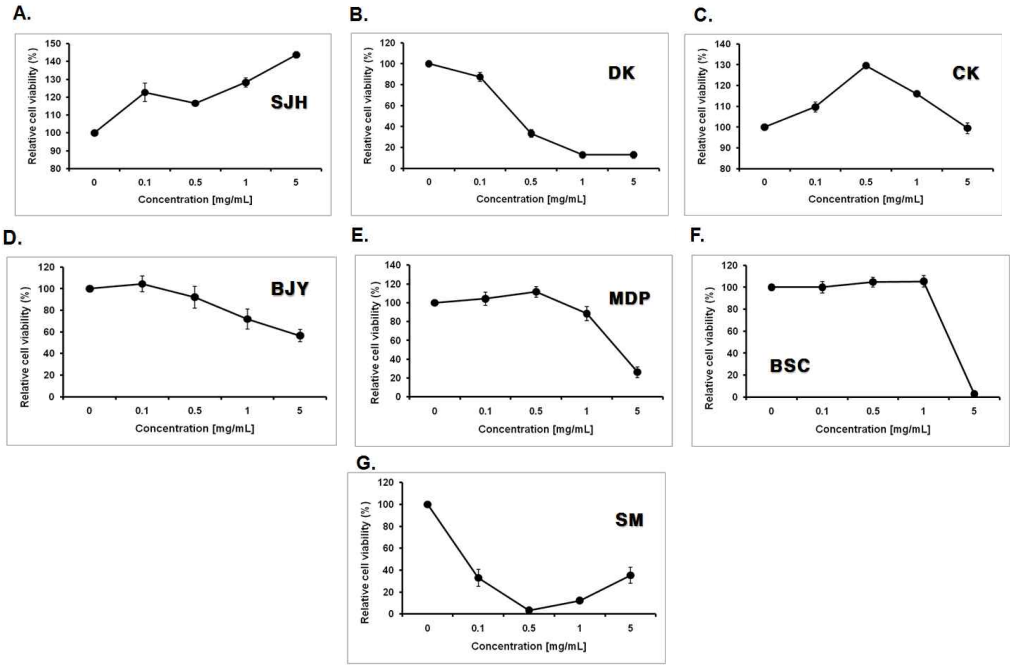


Fig. 1. The Effects of 7 Medicinal Herbs Extracts on Viability of MEF Cells Determined by MTT Assay.
MEF wild-type cells were treated with various concentrations(0.1, 0.5, 1, 5 ㎎/㎖) of 70% ethanol extracts of 7 medicinal herbs for 24 hr. Results are expressed as the mean + S.D. of three independent experiments.

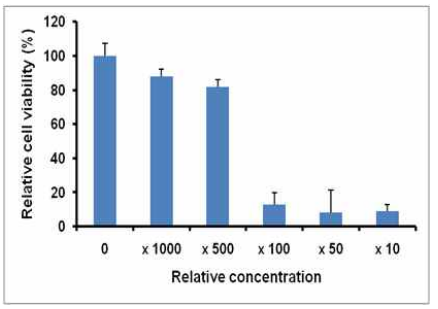


Fig. 2. The Dose-dependent Cytotoxicity Effect of *Samultang-Gami* against MEF Cells Determined by MTT Assay.
MEF cells (4×10^4 cells per well) were treated for 24 hr with various concentrations of *Samultang-Gami* extracts [×1000, ×500, ×100, ×50, ×10.(×1=100㎎/㎖)]. Results are expressed as the mean + S.D. of three independent experiments.

2. 四物湯加味方의 암세포 억제효능

1) HeLa, HepG2, AGS cells의 四物湯加味方 처리 농도에 따른 생존율

四物湯加味方의 항암효과를 알아보기 위하여 암세포주 HeLa, HepG2, AGS cells에 四物湯加味方을 처리하여 세포의 생존율을 알아볼 수 있는 MTT assay를 시행하였다. 四物湯加味方을 ×1000, ×500, ×100, ×50, ×10 농도로 처리한 후 24시간, 48시간, 72시간 후 관찰하였다. HeLa, HepG2 세포에서는 ×100, ×50, ×10 농도에서 세포의 생존율이 감소하는 것을 뚜렷하게 관찰 할 수 있었고, AGS 세포에서는 ×100, ×50농도에서 생존율이 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

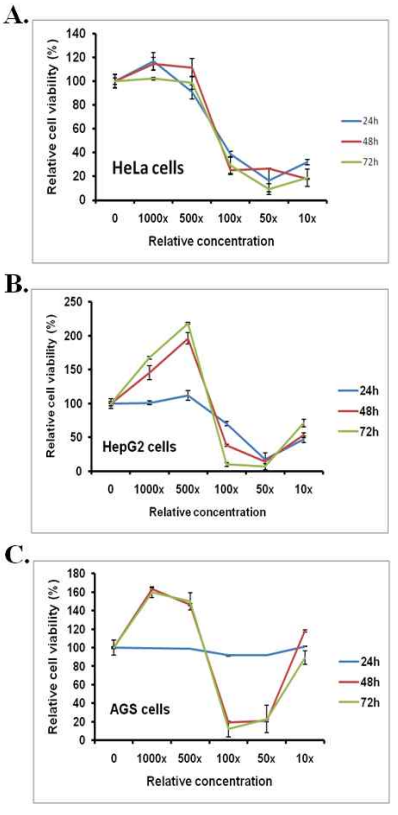


Fig. 3. The Effects of *Samultang-Gami* on The Viability of HeLa, HepG2, AGS Cells Determined by MTT Assay.
Cells were treated with various concentrations (x1000, x500, x100, x50, x10) of *Samultang-Gami* extracts for 24 h, 48 h, 72 h. Results are expressed as the mean + S.D. of three independent experiments.
(A) HeLa cells. (B) HepG2 cells. (C) AGS cells.

2) HeLa cells의 四物湯加味方 개별 약재 처리 후 생존율

HeLa cells에 대한 四物湯加味方 구성 약재의 활성 억제 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 시행한 결과 當歸, 白芍藥, 牧丹皮, 白花蛇舌草에서 농도가 증가함에 따라 세포활성도가 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

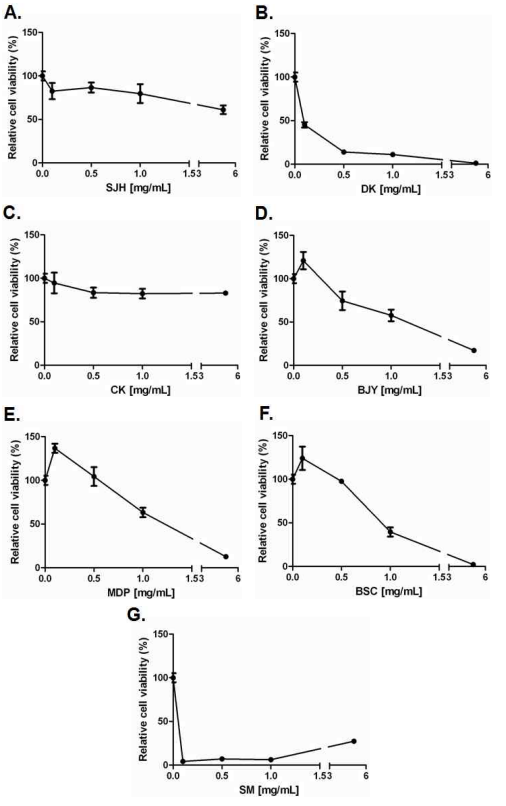


Fig. 4. The Effects of 7 Medicinal Herbs Extracts on The Viability of HeLa Cells Determined by MTT Assay.
HeLa cells were treated with various concentrations(0.1, 0.5, 1, 5 ㎎/㎖) of 7 Medicinal Herbs Extracts for 24 h, 48 h, 72 h. This Figures show only 48h. Results are expressed as the mean + S.D. of three independent experiments.
(A) SJH. (B) DK. (C) CK. (D) BJY. (E) MDP. (F) BSC. (G) SM.

3) HepG2 cells의 四物湯加味方 개별 약재 처리 후 생존율

HepG2 cells에 대한 四物湯加味方 구성 약재의 활성 억제 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 시행한 결과 白芍藥, 白花蛇舌草가 농도 의존적으로 활성을 억제하는 것이 관찰되었으나 當歸, 牧丹皮는 5㎎/㎖의 농도에서만 유의한 생존율 감소를 보였다(Fig. 5).

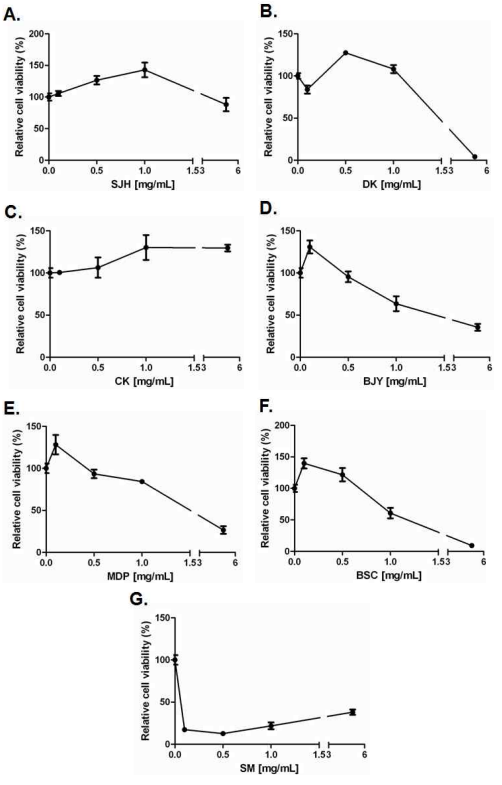


Fig. 5. The Effects of 7 Medicinal Herbs Extracts on The Viability of HepG2 Cells Determined by MTT Assay.
HepG2 cells were treated with various concentrations(0.1, 0.5, 1, 5 ㎎/㎖) of 7 Medicinal Herbs Extracts for 24 h, 48 h, 72 h. This Figures show only 48h. Results are expressed as the mean + S.D. of three independent experiments.
(A) SJH. (B) DK. (C) CK. (D) BJY. (E) MDP. (F) BSC. (G) SM.

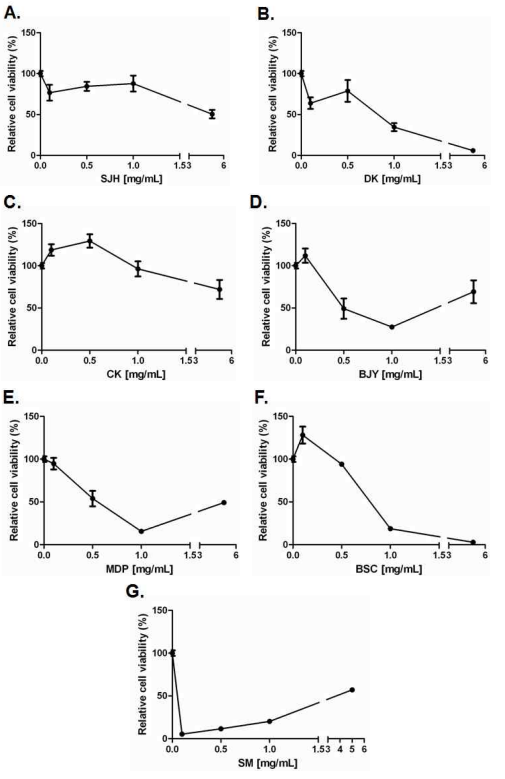


Fig. 6. The Effects of 7 Medicinal Herbs Extracts on The Viability of AGS Cells Determined by MTT Assay.
AGS cells were treated with various concentrations(0.1, 0.5, 1, 5 ㎎/㎖) of 7 Medicinal Herbs Extracts for 24 h, 48 h, 72 h. This Figures show only 48h. Results are expressed as the mean + S.D. of three independent experiments.
(A) SJH. (B) DK. (C) CK. (D) BJY. (E) MDP. (F) BSC. (G) SM

4) AGS cells의 四物湯加味方 개별 약재 처리 후 생존율

AGS cells에 대한 四物湯加味方 구성 약재의 활성 억제 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 시행한 결과 當歸, 牧丹皮, 白花蛇舌草에서 세포활성도가 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

5) 四物湯加味方과 川芎, 生地黃, 白芍藥이 HeLa cells의 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1 발현에 미치는 영향

四物湯加味方을 처리한 실험군이 대조군에 비해 Bax protein 발현량이 감소되고, 川芎, 生地黃, 白芍藥에서는 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 7).

anti-apoptosis 작용을 하는 Bcl-2의 발현량을 보면 四物湯加味方 처리한 실험군에서 대조군에 비해 감소된 수치를

보이고, 특히 개별약재에서는 生地黃, 白芍藥의 발현량이 매우 감소하였다.

p53에서는 四物湯加味方 처리한 실험군은 대조군과 비슷한 수치를 보였고, 白芍藥에서만 특이적으로 감소된 수치를 보였다.

PARP-1는 四物湯加味方과 生地黃에서 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 8).

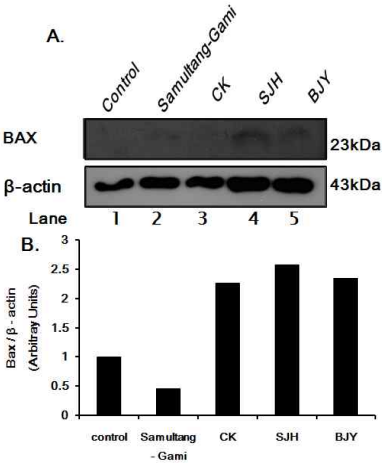


Fig. 7. The Effect of *Samultang-Gami* extracts on Bax in HeLa cells.
(A) Cells were harvested at 48 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 60 ug protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with Bax antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, X100 *Samultang-Gami*; Lane 3, 1㎎/㎖ CK; Lane 4, 1㎎/㎖ SJH; Lane 5, 1㎎/㎖ BJY.
(B) Graphical representation of the data shown in (A)

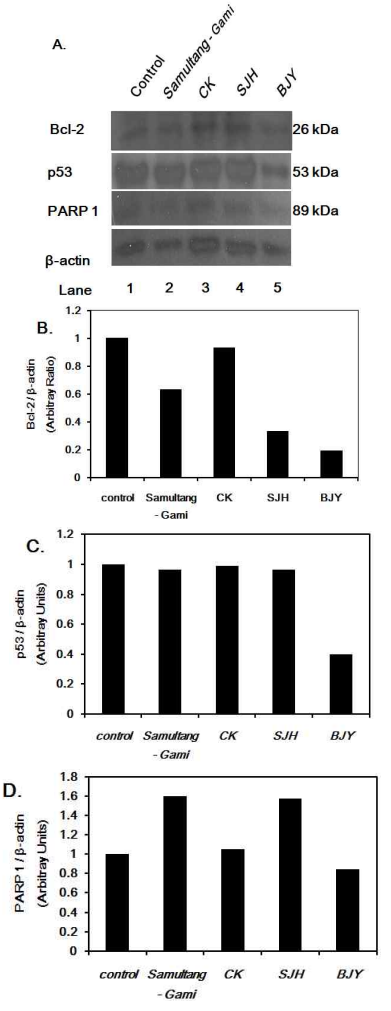


Fig. 8. The Effects of *Samultang-Gami* extracts on Bcl-2, p53 and PARP-1 in HeLa cells
(A) Cells were harvested at 48 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 60 ug protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with Bax antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, X100 *Samultang-Gami*; Lane 3, 1㎎/㎖ CK; Lane 4, 1㎎/㎖ SJH; Lane 5, 1㎎/㎖ BJY. The effect of *Gami-Samultang* extracts on Bcl-2(anti-apoptosis protein) (B), p53 (tumor supressor protein) (C) and PARP1(Apoptosis -regulating protein) (D) in HeLa cells.
(B), (C), (D) is graphical representation of the data shown in (A).

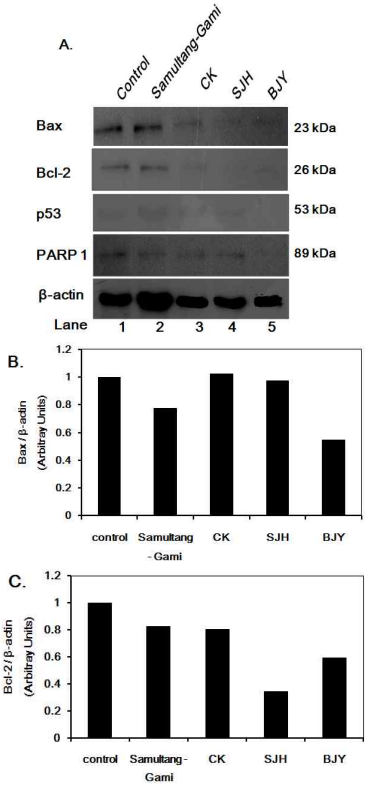
6) 四物湯加味方과 川芎, 生地黃, 白芍藥이 HepG2 cells의 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1 발현에 미치는 영향

Bax 발현량은 대조군에 비해 白芍藥은 감소되었으나, 그 외 실험군은 큰 차이를 보이지는 않았다.

Bcl-2 발현량은 대조군에 비해 실험군 모두 감소되었으며, 특히 生地黃, 白芍藥은 매우 낮은 수치를 보였다.

p53 발현량은 대조군에 비해 四物湯加味方 처리군에서 증가되었고, 개별 약물은 대조군에 비해 감소되었다.

PARP-1 발현량은 대조군에 비해 四物湯加味方, 川芎, 生地黃, 白芍藥 처리군 모두 감소되었다(Fig. 9).



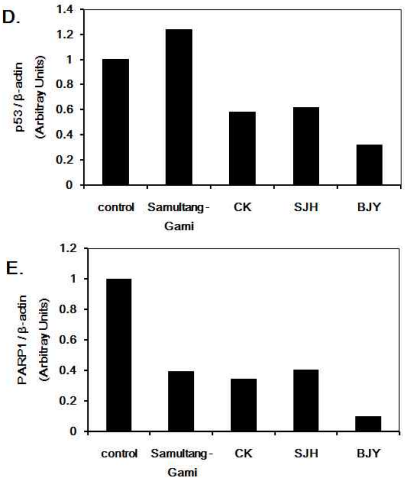


Fig. 9. The Effect of *Samultang-Gami* extracts on Bax, Bcl-2, p53 and PARP-1 in HepG2 cells.
(A) Cells were harvested at 48 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 60 ug protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with Bax antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, X100 *Samultang-Gami*; Lane 3, 1㎎/㎖ CK; Lane 4, 1㎎/㎖ SJH; Lane 5, 1㎎/㎖ BJY. The effect of *Samultang-Gami* extracts on Bax(pro-apoptosis) (B), Bcl-2 (anti-apoptosis protein) (C), p53 (tumor supressor protein) (D), PARP 1(Apoptosis-regulating protein) (E) in HepG2 cells.
(B), (C), (D), (E) is graphical representation of the data shown in (A).

7) 四物湯加味方과 川芎, 生地黃, 白芍藥이 AGS cells의 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1 발현에 미치는 영향

AGS cells에 대한 실험에서 四物湯加味方을 처리한 실험군은 모두 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

川芎, 生地黃, 白芍藥에 대한 개별 실험에서는 川芎, 生地黃은 대조군에 비해 Bax와 Bcl-2가 유사하게 증가된 양상을 보였고, 白芍藥은 Bax 발현량이 다소 감소되었다.

p53, PARP-1에는 3종 약재 모두 대조군에 비해 증가되었다(Fig. 10).

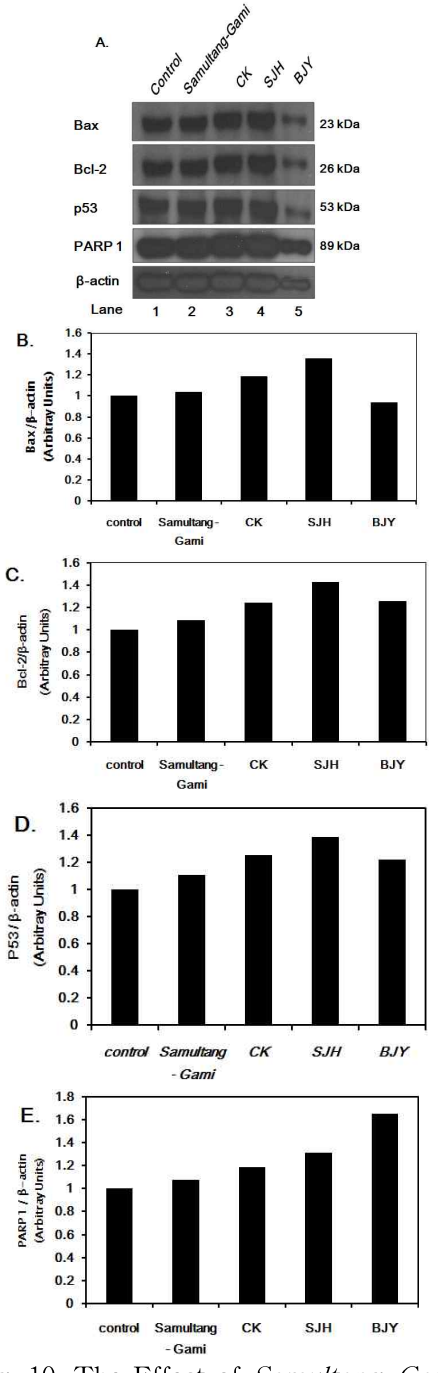


Fig. 10. The Effect of *Samultang-Gami* extracts on Bax, Bcl-2, p53 and PARP-1 in AGS cells.
(A) Cells were harvested at 48 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 60 ug protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with Bax antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, X100 *Samultang-Gami*; Lane 3, 1㎎/㎖ CK; Lane 4, 1㎎/㎖ SJH; Lane 5, 1㎎/㎖ BJY. The effect of *Samultang-Gami* extracts on Bax(pro-apoptosis) (B), Bcl-2 (anti-apoptosis protein) (C), p53 (tumor supressor protein) (D), PARP 1(Apoptosis-regulating protein) (E) in AGS cells.
(B), (C), (D), (E) is graphical representation of the data shown in (A).

Ⅳ. 고 찰

의학의 발달에 따라 암에 대한 치료법도 지속적으로 발전하고 있음에도 불구하고 그에 따른 치료 효과 개선 정도는 다른 질병의 치료법과 비교하여 보면 아직 미흡하여 낮은 치료율을 보임에 따라 전 세계적으로 보완대체의학에 대한 관심이 증가하고 있다.

미국의 연구에서는, 1980년대 이후 약 54%의 암환자가 한방요법을 포함한 보완대체의학을 이용하고 있다고 보고하였고[6], 2007년 국내 한 병원에서 위암환자를 대상으로 시행한 연구에서는 약 41%의 환자가 한방요법을 포함한 보완대체의학을 이용하고 있거나 이용한 경험이 있다고 보고 하였다[7]. 이를 보면 암치료 분야에 있어서 한의학의 기여도가 증가할 것으로 생각된다.

그러나 현재까지 실제 현황은 그렇지 못한데, 2005년에 발표된 연구 보고[8]에 따르면 우리나라 암환자 중 대체·보완요법을 이용한 경험이 있는 경우는 75.0%로

조사가 되었으나 대체・보완요법 이용자를 미국 National Center for Complementary Alternative Medicine의 범주로 나누어 볼 때 '한의사처방 외 한방민간요법'이 28.7%로 가장 높고, '심신조정요법'이 17.8%, '식이영양식품' 17.6%를 차지하였다. 이에 비해 '한의사 처방 요법'은 6.6%에 불과하였다. 즉 암환자들이 대체・보완요법으로서 한방에 대한 선호도는 높으나 실제 한의사 처방에 의한 관리를 받는 비율이 높지 않음을 알 수 있다. 이러한 상황에서 암치료에 대한 한의학의 기여도를 높이기 위해서는 한약의 객관화된 효과를 입증하고 알리기 위한 실험들이 필요할 것으로 생각되어 이의 일환으로 본 연구를 시작하게 되었다.

본 연구에 사용된 사물탕과 개별약제에 대해 살펴보면, 四物湯은 宋代 陳師文의《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 처방으로 "調益營衛 滋養血 治衛任虛損 月經不調……"라 하여 血虛 및 血不和로 發하는 諸證을 治한다 하였다. 當歸, 川芎, 白芍藥, 熟地黃으로 구성되고 當歸는 養血, 補血, 行血 등의 효능이 있어 一切 血證에 응용하는 補血, 養陰藥으로 血中의 主藥이 된다. 川芎은 順氣, 行血의 要藥으로 血中의 氣藥이 되며, 白芍藥은 瀉肝, 安脾緩中, 去水의 要藥으로 補血, 養血, 婦人一切病 등에 유효한 補血 및 養陰藥이다. 熟地黃은 補腎壯水의 陰虧, 虛損에 응용되는 補血養陰藥이다.

熟地黃은 南北朝 시기 宋代(AD 4C 경)의 雷斅의《雷公炮炙論》에 최초로 명시되었으며, 그 이후 熟地黃의 제법이 널리 성행되어 生地黃, 乾地黃, 熟地黃으로 나뉘어 사용되었다.《神農本草經》에 최초로 生地黃에 대하여 수록되어 있으며 熟地黃과 그 기원 식물이 같고 면역반응에서 유사한 효과를 나타내며[9,10], 항암 및 항산화에 대한 다수의 논문[11-13]이 있어 본 실험에서는 熟地黃을 生地黃으로 대체하였다.

蘇木은 行血祛瘀와 消腫止痛의 效能이 있어 産後腰痛, 經閉, 跌打損傷 등을 치료한다 하였으며[14], 항산화 효과와 위암, 폐암 세포주에 대한 세포독성 효과 및 항염 효과 등을 보고한 연구가 있다[15-19].

白花蛇舌草는 性이 寒, 平, 無毒하며 味는 甘, 苦하고 淸熱解毒, 利濕, 通淋, 消癰 등의 효능이 있으며[20], 최근 소화기암, 자궁암 및 각종 암을 치료하는 항암제로 응용되고 있으며, 항암효과에 관한 다수의 실험이 실시되어 그 효과가 입증되고 있다[21-24].

牧丹皮은 味는 辛, 苦하고 性은 微寒하며 淸熱凉血, 活血行瘀 등의 효능이 있고[15], 항산화에 관한 다수의 실험 논문들이 발표되었다[25-29].

이를 토대로 調益營衛 滋養血의 대표적인 처방인 四物湯에서 熟地黃을 生地黃으로 대체하고, 항암효과와 항산화 효과가 규명된 白花蛇舌草, 蘇木, 牧丹皮를 가미하여 四物湯加味方 처방을 구성하였다.

韓醫學에서 癌의 범주에 속하는 것은 積聚・癥瘕・反胃・瘻瘤・石疽・石癰 등으로[30-32], 원인은 瘀血, 憂思忿怒의 情緖로 인한 氣鬱血瘀, 飮食不節로 인한 宿滯食積, 酒色亂用으로 인한 陰不足 陽有餘 등에 의하여 氣血이 不循됨으로써 經絡과 血脈이 阻滯되어 氣聚血凝으로 腫塊가 형성된다고 하였다[32-34].

積聚는 六鬱과 七情所傷 등으로 氣血

이 허약해졌을 때, 飮食過多로 인하여 胃腸이 脹滿하면 胃腸의 絡脈이 傷하여 瘀血이 內溢된 瘀血이 腸外部로 溢出하여 腸外部에 있던 寒冷한 津液과 相搏하면 幷台凝聚하여 積聚가 形成되는 것이다. 그리하여 積聚는 대체적으로 病情에 따라 初病은 實證이 많고, 久病은 虛證이 많다. 積聚는 癥瘕와 동일한 질환으로 腹內에 結塊가 있고 脹하거나 통증이 있는 것이며, 현대의학적으로는 장기능문란, 기능성 장폐색, 간비종대, 복강종류, 장결핵, 신하수 등과 관련이 있을 것으로 인식하고 있다[35,36].

한의학에서 암치료는 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 인체 抗病능력을 증진시키는 扶正培本法과 淸熱解毒, 活血化瘀, 化痰消瘀, 理氣消腫 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 적절히 배합시켜 正氣補養을 위주로 破積·活血·解鬱·行氣·補血 등의 治法을 활용하는 扶正祛邪法을 응용하고 있다[22,23,37,38].

암은 조직의 과잉적 성장에 의한 질환으로, 정상조직의 일정한 세포 밀도 유지에 중요한 apoptosis 장애가 종양발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[21,39,40]. Apoptosis는 세포사멸의 한 형태로서 Programmed cell death라 말할 수 있고 세포질의 농축, DNA의 분절을 특징으로 하며, 정상발달, 기관형성, 면역기능 조직의 성장 등에서 세포를 제거하는 기능을 한다.[41-43]. 과거에는 여러 항암제에 의한 세포사망이 단순히 유전자 수준에서의 독성에 의한 것으로 알려져 왔으나, 여러 연구에 의해서 apoptosis에 의한 것으로 알려져, 항암요법에 의한 apoptosis 유도 및 관련 유전자를 연구하여 궁극적으로 선택적이고 효과적인 암세포의 사멸을 통해 암치료율을 높이는 것을 목적으로 하는 많은 연구가 이루어지고 있다[44,45].

이에 저자는 四物湯加味方에 인간 암세포주인 HeLa cells, HepG2 cells, AGS cells를 사용하여 四物湯加味方 추출물이 직접적으로 암세포 주에서 세포자멸을 일으키고 세포 죽음을 초래 할 수 있는지를 규명하여 항암효과를 밝히고자 실험을 실시하였다.

四物湯加味方의 안전성 확인을 위해 먼저 개별 약재별로 MEF 세포를 이용하여 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 세포 대사의 활발함에 따른 cell viability를 측정할 수 있는 방법이다.

生地黃은 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 cell viability가 증가하는 것을 보였고 실험군의 모든 농도에서 대조군에 비해 높은 cell viability를 보였으며, 川芎 또한 0.1, 0.5, 1㎎/㎖ 농도의 실험군에서 대조군에 비해 높은 cell viability를 보였고, 5㎎/㎖농도의 실험군에서도 대조군에 비해 cell viability 감소폭이 크지 않아 MEF 세포에 뛰어난 안전성이 있음을 확인할 수 있었다. 白芍藥, 牧丹皮, 白花蛇舌草도 0.1, 0.5, 1㎎/㎖농도에서 안전성을 확인할 수 있었고 5㎎/㎖농도에서 cell viability가 50%이하로 감소하였으나, 전체적으로 안전성이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 當歸의 경우 0.5㎎/㎖농도에서부터 cell viability가 급격히 감소하여 본 실험에서는 안전성을 확인할 수 없었으며, 蘇木의 경우는 약재 자체의 색상으로 인해 세포가 염색되어 본 실험으로는 안전성을 확인 할 수 없었다.

四物湯加味方의 안전성을 확인하기 위해 개별 약재와 동일하게 MEF 세포를 이용하여 MTT assay를 시행한 결과 ×1000, ×500 농도에서 안전성을 보였는데, 이를 통해 四物湯加味方이 정상 세포주에서의 안전성을 간접적으로 확인할 수 있었다.

四物湯加味方 추출물이 HeLa, HepG2, AGS 세포에 직접적으로 치사작용을 일으키는지 알아보기 위하여 각각의 추출물을 ×1000, ×500, ×100, ×50, ×10농도로 처리하여 24, 48, 72시간 후 관찰한 결과 48시간 후 관찰한 실험에서 HeLa, HepG2 세포에서는 ×100, ×50, ×10 농도에서 세포의 생존율이 급격히 감소하는 것을 뚜렷하게 관찰 할 수 있었고, AGS 세포에서는 ×100, ×50농도에서 생존율이 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 四物湯加味方의 암세포주인 HeLa, HepG2, AGS 세포에 대한 치사작용이 있음을 알 수 있었다. 그러나 AGS 세포 실험군에서 가장 고농도인 ×10농도에서는 오히려 대조군에 비해 높은 생존율을 보였으나 본 실험에서는 그 원인을 밝히기 어려웠다.

四物湯加味方 개별 약재의 HeLa, HepG2, AGS 세포 억제 작용을 알아보기 위해 각 약재 추출물을 0.1, 0.5, 1, 5 ㎎/㎖ 농도로 실험한 결과 當歸, 牧丹皮, 白芍藥, 白花蛇舌草가 암세포의 생존율을 감소시키는 것으로 관찰 되었다.

자세히 보면 HeLa 세포에서 當歸, 牧丹皮, 白芍藥, 白花蛇舌草가 농도 의존적으로 생존율을 감소시키는 것이 관찰되었고, HepG2 세포에서는 白芍藥, 白花蛇舌草가 농도 의존적으로 생존율을 감소시키는 것이 관찰되었으나 當歸, 牧丹皮는 5㎎/㎖의 농도에서만 유의한 생존율 감소를 보였다. AGS 세포의 경우는 대체적으로 當歸, 牧丹皮, 白花蛇舌草를 처리한 군이 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율을 감소시키는 경향을 보였으나, 그 중 牧丹皮, 白花蛇舌草의 경우 실험군 중 최고 농도인 5㎎/㎖에서는 저농도에 비해 생존율이 다소 증가하는 양상을 보였다. 蘇木은 자체의 색상으로 인하여 세포가 염색되어 모든 실험군에서 정확한 결과를 알기 어려웠다.

四物湯加味方과 개별 약재의 세포사멸 효과가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위해 四物湯加味方과 개별 약재를 HeLa, HepG2, AGS cells에 처리한 후 cell viability를 측정한 실험결과를 토대로 四物湯加味方 개별 약재 중 viability가 좋았던 川芎, 生地黃과 viability가 좋지 않았던 白芍藥을 선택하여, Bax, Bcl-2, p53, PARP-1을 Western blot으로 protein level을 비교해 보았다.

Bax는 apoptosis를 통한 세포자멸을 촉진시키는데 관여하는 단백질이며, Bcl-2는 Bax와는 반대로 apoptosis를 억제하는데 관여하는 단백질이다[46,47]. 또한 Bcl-2는 림프종과 밀접하게 관련된 유전자로서 다른 암유전자와는 달리 세포 증식에는 관여하지 않고 세포자멸사의 억제기능에 관여하고 있으며, Bcl-2에 의한 apoptosis 방지 기전에는 산화환원 상태 조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase protease 활성, 미토콘드리아 막전위, DNA 분절화, 스트레스 연관 MAP kinase 등이 관련되어 있다. Bcl-2 family protein은 다양한 경로의 apoptosis에 관련됨을 증명하는 연구 결과가 최근 많이 발표된 바 있다[47,48]. Bcl-2는 암세포에서 발현량

이 증가되어 있으며 이의 발현을 암의 positive marker로 간주하는 보고도 있다[48,49].

p53은 평소 그 수치가 낮지만 세포가 손상을 입는 경우 활성화 되어 그 수치가 증가하는 것으로 알려져 있다[50]. p53은 정상세포의 세포질에 소량 존재하는 암 억제 유전자(tumor suppressor gene)이다. 이는 DNA 손상 시 농도와 기능이 증가되고 세포질에서 세포핵으로 이동되면서 apoptosis를 유발하는 Bax, IGF-BP-3, p21, WAF1/Cipl, GADD45, mdm2 등의 유전자를 활성화시켜서 apoptosis가 일어나게 한다.

PARP는 caspase-6과 caspase-3의 기질로 apoptosis 관찰 시 주요한 단백질로 연구된 바 있다. PARP cleavage는 caspase-3의 활성을 간접적으로 보여줄 수 있다. 세포고사 신호전달계의 하부 경로에 해당하는 PARP의 분절은 세포고사의 특징으로 나타나고 있다. 자극에 의해 손상된 DNA의 회복은 PARP의 분절로 인하여 저해됨으로서 genomic DNA의 분절이 규칙적으로 일어나게 된다[46].

HeLa cells에서 四物湯加味方 처리 실험군은 Bax와 Bcl-2 모두 발현량이 대조군에 비해 감소되었고, p53은 대조군과 비슷한 수치를 보였고, PARP-1은 대조군에 비해 증가하였다. 이를 보면 四物湯加味方의 HeLa cells에 대한 억제효과는 Bax와 Bcl-2의 균형에서 Bcl-2의 억제를 통해 apoptosis를 진행한다고 볼 수도 있으며, tumor supressor인 p53이 관여하는 apoptosis 기전과는 관계가 낮으나, PARP-1 발현량이 증가된 것으로 四物湯加味方에 의한 HeLa cells 생존율 감소가 PARP-1 pathway를 통해 이루어지는 것으로 생각된다.

HeLa cells에 대한 川芎, 生地黃, 白芍藥의 실험에서 生地黃이 대조군에 비해 Bax 발현량은 증가하고, Bcl-2 발현량은 크게 감소하였으며, p53, PARP-1은 증가하여, MTT assay에서의 HeLa cells에 대한 억제 효과가 크지 않았으나, apoptosis를 유발하는 효과는 높은 것으로 생각된다. 또한 Bcl-2에 대한 실험에서 白芍藥의 발현량이 매우 감소된 것으로 보아 白芍藥이 Bcl-2에 의한 세포자멸 억제를 억제하는 기전으로 HeLa cells의 viavility를 감소시키는 것으로 생각된다.

HepG2 cells에서 四物湯加味方 처리 실험군은 mitochondria pathway에서 중요한 비중을 차지하는 Bax, Bcl-2가 대조군에 비해 발현량의 변화가 없어서 별도의 경로를 경유할 것으로 생각되며, p53은 증가하고 PARP-1은 감소한 것으로 보아, 四物湯加味方은 p53이 관여하여 apoptosis를 유발시키나 PARP-1 pathway와의 연관성은 낮은 것으로 생각된다.

HepG2 cells에 대한 川芎, 生地黃, 白芍藥의 실험 결과를 보면 Bcl-2에서 生地黃, 白芍藥의 발현량이 대조군에 비해 현저히 감소하여 Bcl-2를 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

AGS cells에서 四物湯加味方을 처리한 군은 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보여주지 못하여, 四物湯加味方의 AGS cells 생존율 감소에 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1의 apoptosis pathway는 관여하지 않는 것으로 생각된다.

AGS cells에서 川芎, 生地黃, 白芍藥에 대한 실험에서는 Bax, Bcl-2가 개별약재별로 비슷한 수준으로 측정되는 양상을 보여 Bax, Bcl-2의 상호작용으로 일어나

는 apoptosis와는 관련성이 낮을 것으로 생각되며, 3종의 개별 약재 모두 각 p53, PARP-1 발현량이 대조군보다 증가하였는데, p53의 발현과 PARP-1 pathway를 통한 apoptosis발생과 연관성이 있을 것으로 생각된다.

이상의 실험을 통하여 四物湯加味方이 HeLa, HepG2, AGS cells에서 항암효과가 있음을 확인하고 apoptosis를 발생시키는 기전을 찾아보았다. 개별 약재의 실험 중 當歸, 牧丹皮, 白芍藥, 白花蛇舌草가 본 연구에 사용된 HeLa, HepG2, AGS cells에서 암세포 생존 억제 효과가 있음이 다시 확인되었다. 이 실험 결과를 통해 한의학적 암치료에 四物湯加味方의 사용이 적합할 것으로 추정되고, 임상적으로 자궁암이 쉽게 전이되는 간의 암세포에 대한 항암효과가 입증되었으므로 자궁암 초기의 전이 예방과 말기 암환자에 대한 다수의 장기에 대한 항암효과를 기대하고 임상에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

四物湯加味方이 HeLa, HepG2, AGS cells의 생존율, Bax, Bcl-2, p53, PARP-1 발현에 미치는 영향에 대한 실험을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 四物湯加味方을 처리한 HeLa, HepG2 세포에서는 ×100, ×50, ×10 농도에서 세포의 생존율이 감소하는 것을 뚜렷하게 관찰 할 수 있었고, AGS 세포에서는 ×100, ×50농도에서 생존율이 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.
2. 四物湯加味方의 개별약제를 HeLa, HepG2, AGS cells에 처리한 결과 當歸, 牧丹皮, 白芍藥, 白花蛇舌草가 암세포의 생존율을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. HeLa cells에서는 當歸, 牧丹皮, 白芍藥, 白花蛇舌草가 HepG2 cells에서는 白芍藥, 白花蛇舌草가 농도의존적으로 감소시키는 것을 관찰할 수 있었고, AGS cells는 當歸, 牧丹皮, 白花蛇舌草 처리군에서 대체적으로 농도의 증가에 따른 생존율 감소 경향을 관찰할 수 있었다.
3. HeLa cells의 경우 四物湯加味方 처리 실험군은 Bax와 Bcl-2 모두 발현량이 대조군에 비해 감소하였고, p53은 비슷한 수치를 보였고, PARP-1은 증가하였다.
4. HeLa cells의 경우 生地黃은 대조군에 비해 Bax 발현량이 증가하고, Bcl-2는 크게 감소하였으며, p53, PARP-1은 증가되었다. 白芍藥은 Bax 발현량은 증가하고, Bcl-2는 매우 감소되었고, p53과 PARP-1도 낮은 수치를 보였다.
5. HepG2 cells의 경우 四物湯加味方 처리 실험군은 Bax, Bcl-2 발현량이 대조군과 변화가 없었고, p53은 대조군에 비해 증가하였고, PARP-1은 감소하였다.
6. HepG2 cells의 경우 生地黃, 白芍藥이 대조군에 비해 Bcl-2 발현량이 감소된 것을 확인할 수 있었다.
7. AGS cells에서 四物湯加味方 처리 실험군은 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보여주지 못했다.
8. AGS cells에서 川芎, 生地黃, 白芍藥이

대조군에 비해 p53, PARP-1 발현량이 증가하였다.

□ 투 고 일 : 2010년 7월 28일
□ 심 사 일 : 2010년 8월 3일
□ 심사완료일 : 2010년 8월 10일

참고문헌

1. 통계청. Available from : URL : http ://kostat.go.kr/.
2. Braunwald E. et al. Harrison's Principles of Internal medicine 16th edition. Seoul: MIP; 2006;69-75.
3. Lee JY, Ahn MS. Study on the Mutagenicity of Thermally Oxidized Safflower Oil. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2000;29:120-7.
4. Astrow AB. Rethinking cancer. Lancet. 1994;343:494-5.
5. Chung YT et al. Cytotoxic effects of actinomycin D, adramycin and puromycin in the development stage of early mouse embryos. J. Wonkwang Medical Sci. 1987;3:13-34.
6. Cassileth BR et al. Contemporary unorthodox treatments in cancer medicine. Annals of Internal Medicine. 1984;101:105-12.
7. 채병주 등. 위암 환자의 보완대체의학 이용 실태. 대한외과학회지. 2007;72(5) :369-78.
8. 장순복. 우리나라 암 환자가 이용하는 대체·보완요법 분류 및 비용분석. 보건복지부. 2005:22-5.
9. 김봉현 등. 지황의 법제와 포제법에 관한 문헌적 고찰. 동서의학. 2008;33(3) :25-47.
10. 황영명, 고병희, 송일병. 生地黃, 乾地黃, 熟地黃이 細胞性免疫反應 및 體液性免疫反應에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 1987;10:207-18.
11. 유호진, 우은란. 수종의 생약이 과산화수소에 의한 Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase(HPRT) 유전자 돌연변이 억제에 미치는 효과. 한국생약학회지. 2004;53(1):28-34.
12. 김주연 등. 생지황이 자궁경부암세포에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(1):69-80.
13. 김성범, 김경준. 생지황이 혈관신생, 세포생존 및 염증관련 단백질 발현에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2006;19(3):22-3.
14. 서형식. 청대와 생지황의 항염 및 항산화 효과에 대한 실험적 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(3) :104-10.
15. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사 2000: 385-7, 522-3.
16. Namikosi M, Saito T. Homoisoflavoids and related compound. IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids from caesalpinia sappan L. Chem. Pharm. Bull. 1987;35(9):3579-602.
17. Park KJ et al. Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines, Kor. J. Pharmacogn. 1987;28(4):233-8.
18. Kim YS et al. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. Kor. J. Pharmocogn. 1995; 26(3):265-72.

19. 문연자 등. A549 폐암세포주에 대한 蘇木 水抽出物의 세포고사 유도효과. 동의생리병리학회지. 2002;16(3):521-7.
20. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell 65. 1991:1097-8.
21. 常敏毅. 抗癌本草. 湖南城:湖南科學技術出版社. 1987:126-8.
22. 김성동. 白花蛇舌草로부터 분리한 ursolic acid의 자연살해효과와 항전이작용. 대전대학교한의학연구소논문집. 1997;5(2):523-33.
23. 송호준, 김대현. 白花蛇舌草 전탕액 투여가 마우스의 항종양 면역반응에 미치는 영향. 본초분과학회지. 1994;9(1):3-97.
24. 노훈정 등. 白花蛇舌草 메탄올 추출물의 항종양 효과 및 항암 기전에 관한 연구. 2000;6(1):81-97.
25. 부용출, 전체옥. 녹차와 목단피의 항산화 성분. J. Korean Agric Chem. Soc. 1993;36(5):326-31.
26. 권오근 등. 목단피 추출물의 항균 및 항산화 작용. Korean J. Postharvest SCL Technol. 1998;5(3):281-5.
27. 손무성 등. 목단피의 PC12 cell 항산화 효과와 관련 HO, MIF, COMT 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(4):905-13.
28. 김현희 등. 목단피의 PC12 cell 산화억제 효과 및 neuronal 유전자 발현 profile 분석에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):529-41.
29. 유진균 등. 목단피 물 추출물의 항산화 및 Tyrosinase 억제효과. 한국식품영양학회지. 2009;38(3):292-6.
30. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 上海:上海科學技術出版社. 1980:1-10.
31. 郁仁存. 中醫腫瘤學. 北京:北京科學出版社. 1983:1-11, 120-53.
32. 賈堃. 癌瘤中醫防治硏究. 陝西:陝西科學技術出版社. 1983:1-3.
33. 배원식. 암의 한・양방병용치료에 대한 보고. 대한한의학회지. 1986;7(2):53-7.
34. 李岩. 腫瘤學. 北京:人民衛生出版社. 1982:1-9.
35. 구본홍. 동의내과학. 부천:서원당. 1985:114-5.
36. 王顯明. 中醫內科辨證學. 北京:人民衛生出版社. 1984:531-2.
37. 邢雪梅. 抗癌中藥의 生物治療效能硏究近況. 한글판 中醫雜誌. 1994:85-90.
38. 이영찬, 전병훈. 파두를 가미한 사군자탕 및 사물탕의 항암효과에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 1994;9(1):79-100.
39. Allan DJ et al. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. J. Pathol. 1992;167:25-32.
40. Wyllie AH. Apoptosis(The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). Br. J. Cancer. 1993;67:205-8.
41. Middleton G, Reid LE, Harmon BV. Apoptosis in human thymus in sudden and delayed death. Pathology. 1994;26:81-9.
42. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: intergration of genetic, biochemical, and cellular indicators. J. Natl Cancer Inst. 1994;86:1286-96.

43. Hockenbery D. Definding apoptosis. Am J. Pathol. 1995;146:16-9.
44. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. Cancer cells. 1990;2:275-80.
45. Barry MA, Reynoids JE, Eastman A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells in associated with intracellular acidification. Cancer Res. 1993;53:2349-57.
46. Belizario JE, Lorite MJ, Tsdale MJ. Cleavage of caspase-1, -3, -6, -8, -9 substrates by protease in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia, Br J cancer. 2001;84(8):1135-40.
47. Takashi H et al. Heterodimerization of Bcl-2 and Bcl-X(L) with Bax and Bad in colorectal cancer, Acta Oncologica, 2000;39(4):495-500.
48. Tudor G et al. Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. Cell Death & Differentiation. 2000;7(6):574-86.
49. Kang M et al. Ki-67, p53 and Bcl-2 expression of serrated adenomas of the colon, Am J Surg Pathol. 1997;21(4):417-23.
50. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. Progress in Neurobiology. 2000;62:215-49.