

Original Article / 원저

인진과 황련 추출물의 췌장암 세포주 MIA PaCa-2에 대한 세포사멸 효과

주현아 · 배현진 · 황충연
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실

Apoptotic Effect of ARTEMISIAE CAPILLARIS HERBA and COPTIDIS RHIZOMA Extracts on MIA PaCa-2 Cells

Hyun-A Joo · Hyeon-Jin Bae · Chung-Yeon Hwang

Won-Kwang University Oriental medicine Ophthalmology Otolaryngology Dermatology

Abstract

Purpose : The purpose of this study is to investigate the effect of ARTEMISIAE CAPILLARIS HERBA and COPTIDIS RHIZOMA Extracts on cell death in pancreatic cancer cells.

Method : Human-derived pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2 cells were treated by Prescription A with various concentrations and the cytotoxicity was determined by MTT assay. To investigate the effects of Prescription A on pancreatic cancer cells, the staining of Annexin V/PI, cell cycle arrest, nuclear chromatin condensation and the production of reactive oxygen species (ROS) were examined. The effect of Prescription A's effective components, ARTEMISIAE CAPILLARIS HERBA and COPTIDIS RHIZOMA Extracts on cell death were also observed.

Results : The viability of MIA PaCa-2 cells treated with Prescription A were decreased in a dose dependent manner. Prescription A induced cell death in MIA PaCa-2 cells as shown by result of Annexin V/PI double staining, chromatin condensation and cell cycle arrest. In addition, production of ROS was increased by Prescription A treatment, suggesting that ROS induced by Prescription A mediated cell death. Furthermore, Prescription A's effective components, ARTEMISIAE CAPILLARIS HERBA and COPTIDIS RHIZOMA Extracts were also induced apoptosis of MIA PaCa-2 cells through ROS production.

© 2014 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusion : These results suggest that Prescription A's effective components, ARTEMISIAE CAPILLARIS HERBA and COPTIDIS RHIZOMA Extracts induced death of MIA PaCa-2 through ROS production.

Key words : ARTEMISIAE CAPILLARIS HERBA; COPTIDIS RHIZOMA; Prescription A; pancreatic cancer; MIA PaCa-2; death; apoptosis; ROS

I. 緒 論

췌장암은 발생빈도는 높지 않으나 사망률이 높아 발생수와 사망수가 대체로 일치하여 5년 생존율이 8%로 보고되며 특히 2년 생존율이 10% 내외에 불과한 예후가 극히 불량한 암이다^{1,2)}. 현재 완치를 기대할 수 있는 유일한 방법은 수술적 치료이지만, 대부분의 췌장암 환자는 진행된 상태에서 발견되어 수술적 제거를 받지 못하는 경우가 많다. 이는 췌장암을 의심할 수 있는 상복부 통증, 폐쇄성 황달, 체중감소, 위기능 장애 등의 증상이 이미 암이 진행된 상태에서 주로 나타나고, 암세포의 파급이 빠르며, 췌장에 국한된 조기 췌장암의 발견을 위한 민감한 검진방법이 아직까지 없기 때문이다^{1,3,4)}.

또한 근치적 절제술 후 재발률은 80~90%에 이르는데, 췌장암은 특징적으로 후복막조직으로 침윤하는 경우가 빈번하고 림프절 전이가 많기 때문에 국소 재발이 50~80%나 될 정도로 예후가 불량하다⁵⁾. 이러한 불량한 예후의 한계점을 극복하고 절제가 불가능한 췌장암 환자에서 예후를 향상시키려는 목적으로 보조적 치료의 필요성이 절실히 요구되고 있다. 유일하게 생존율과 임상증상의 개선을 유도한다고 알려진 gemcitabine의 경우에도 5-fluorouracil (FU)와 비교 연구에서 한 달 남짓의 연장을 가져올 뿐으로 이러한 현실은 새로운 약물의 출현을 필요로 하는 실정이다^{1,5)}.

한의학에서 췌장암은 黃疸⁶⁻¹²⁾, 伏梁^{7-9,11,12)}, 腹痛^{8,11,12)}, 癥積⁶⁾, 癥瘕^{7,9,10)}, 積聚^{7,9,10)}, 痞塊^{7,11,12)}, 結胸⁷⁾

교신저자 : Chung-Yeon Hwang

Won-Kwang University Kwang-Ju Oriental Medical Hospital Ophthalmology Otolaryngology Dermatology (Tel : 062-670-6434, E-mail: hwangida@wonkwang.ac.kr)

• 접수 2014/10/14 • 수정 2014/11/5 • 채택 2014/11/12

등의 범주에 속하며, 그 주요 病因病機로는 七情內傷, 飲食不節하여 肝脾損傷, 臟腑失和, 濕濁阻遏, 氣血瘀滯가 日久하여 형성된 것이다⁸⁾. 치료는 주로 健脾和胃, 清熱利濕, 理氣活血, 軟堅消癥이 원칙으로 음금에 해당하는 curcumin¹³⁾이나 꾸지뽕잎 추출물¹⁴⁾, 황백물 추출물¹⁵⁾ 외에도 扶正抗癆湯¹⁶⁾, 八珍抗癆丹¹⁷⁾ 등의 췌장암에 대한 항암효과가 보고되고 있다⁸⁾. 또한 茵陳蒿湯의 사람 간암 세포주인 Hep G2에 대한 항암효과와 황련에 들어있는 berberine이 구강암에서 세포사멸을 유도한다고 보고되고 있다^{18,19)}.

이를 바탕으로 서적들을 조사하여 저자는 우선 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 세포에 영향을 미칠 것으로 예상되는 처방 4가지(Prescription A²⁰⁾, B²¹⁾, C²²⁾, D²³⁾)를 선택한 후 유의한 결과를 나타내었던 Prescription A의 MIA PaCa-2 세포에 대한 생존율 및 apoptosis에 관여하는 reactive oxygen species (ROS)의 활성을 관찰하여 유의한 결과를 얻었다. 또한 이 유의한 처방을 구성하는 약물들이 약제별로 MIA PaCa-2 세포에 대해 미치는 영향을 조사한 결과 인진(Artemisiae capillaris Herba)과 황련(Coptidis Rhizoma)이 MIA PaCa-2 세포에 대하여 유효한 효과를 보여주었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 한약재는 음니허브(영천, 경북, 대한민국)에서 구입 후 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 精選하여 사용하였다.

2) 세포주

Human-derived pancreatic adenocarcinoma cell line인 MIA PaCa-2와 pancreatic acinar cell인 266-6은 한국세포주은행(서울, 대한민국)으로부터 분양받아 사용하였다.

3) 시약

Fetal bovine serum (FBS), DMEM medium, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (NY, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 MTT, Annexin V detection kit, DAPI, DCF-DA, n-acetyl cystein (NAC) 등은 Sigma (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

한약재를 3차 증류수 1 L에 넣고 2 시간 30 분 동

안 전탕한 액을 -80℃에서 동결 건조시켜 얻어진 분말을 3차 증류수에 녹여서 filter로 여과하여 사용하였다.

2) 세포배양

5% CO₂, 37℃ incubator 조건하에서 10% FBS와 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 배양하였으며 2일 마다 100 mm dish에 분주하였다.

3) MTT Assay

MIA PaCa-2 세포와 266-6 세포의 생존율은 밀집 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 세포들을 DMEM 배지에서 2 × 10⁵ cells/well의 밀도로 현탁하여 농도별로 약물을 처리하였다. 배양 후 5 mg/ml의 농도로 MTT 용액을 첨가하고 다시 30 분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO 200 μl를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 해액(解液)을 96-well plate에 loading하여 spectrophotometer

Table 1. Components and Yield rate of Prescription A, B, C, D

	Components (g)	Powder(g)	Yield Rate (%)
Prescription A ²⁰⁾	Artemisiae capillaris Herba 30, Gentianae Radix 15, Coptidis Rhizoma 6, Gleditsiae Spina 2	11.2	21.13
Prescription B ²¹⁾	Chelidonii Herba 30, Euonymi Rmulus 30	10.8	18
Prescription C ²²⁾	Coicis Semen 30, Sparganii Rhizoma 15, Zedoariae Rhizoma 15, Scutellariae barbatae Herba 15	13.6	18.13
Prescription D ²³⁾	Taraxaci Herba 40, Hedyotis diffusae Herba 40, Salviae miltiorrhizae Radix 30, Coicis Semen 30, Paeoniae Radix Rubra 15	23.69	15.28

Table 2. Yield rate of Prescription A's components

Components (g)	Powder (g)	Yield Rate (%)
Artemisiae capillaris Herba 100	11.36	11.36
Gentianae Radix 100	15.69	15.69
Coptidis Rhizoma 100	13.62	13.62
Gleditsiae Spina 100	17.63	17.63

(Molecular devices, Palo Alto, USA)를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다. [즉, $\text{viability}(\%) = 100 \times (\text{absorbance of treated sample})/(\text{absorbance of control})$]

4) FACS analysis

① Annexin V and PI

Annexin V와 PI의 발현은 Annexin V detection kit으로 확인하였다. MIA PaCa-2 세포에 Prescription A를 농도별로 처리하여 24 시간 배양한 후, 부착된 세포를 trypsin으로 처리하고 회수하여, PBS (Phosphate buffered saline pH 7.4)로 1회 세척하였다. Binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) 85 μl 에 세포를 부유시킨 후 10 μl 의 Annexin V-FITC와 PI-PE로 15분간 암반응 시켰다. Binding buffer를 300 μl 를 첨가하여 flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, USA)로 분석하였다.

② PI (propidium iodide)

세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 PI로 DNA를 염색한 후에 flow cytometry를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. MIA PaCa-2 세포에 Prescription A를 처리하여 24 시간 배양 후 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척 후, 세포를 에탄올에 넣어 고정시킨 후, 세포는 PI 용액(0.1 % Triton X-100, 20 $\mu\text{g/ml}$ PI, 200 $\mu\text{g/ml}$ RNase) 600 μl 로 20분 반응하였다. Flow cytometry를 통해 DNA 용적히스토그램을 얻고 sub G1기의 세포수 백분율을 구하여 세포주기를 분석하였다.

③ DCF-DA (dichlorofluorescein diacetate)

약제에 의한 세포 내 활성화 산소의 생성을 측

정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포내 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. MIA PaCa-2 세포에 약제를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하기 전에 10 μM DCF-DA를 처리하여 37 $^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 배양하였다. 배양한 세포는 PBS로 세척하여 1 % trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고 다시 PBS로 세척하여 flow cytometry로 형광을 측정하였다. 정보의 분석은 Cell Quest software (BD Biosciences, San Jose, USA)를 이용하였다.

5) Fluorescence microscopy method

① DAPI

MIA PaCa-2 세포에 Prescription A를 처리하여 24시간 배양 후 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척 후, 세포를 4% 포름알데하이드에 넣어 고정시킨 후, 세포는 DAPI (0.5 mg/ml)로 5분 반응하였다. 그 후, Fluorescence microscopy로 관찰하였다.

3. 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D. 로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 Student's *t*-test 혹은 ANOVA에 준하였고, 사후 검정은 post hoc으로 시행하였다. *p*-value가 0.05 혹은 0.001 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다

III. 결과

1. Prescription A, B, C, D가 MIA PaCa-2 cell에 미치는 생존율 감소 및 MIA PaCa-2 cell과 266-6 cell에서 증식억제의 차이

Prescription A, B, C, D가 췌장암 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MIA PaCa-2 세포에 Prescription A, B, C, D를 농도 의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 그 결과 Prescription A, B, C, D 중 Prescription A가 0.1 mg/ml 투여군(99.16 ± 0.65), 0.5 mg/ml 투여군(86.31 ± 0.68), 1 mg/ml 투여군(58.55 ± 1.46)의 순으로 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1A). 또한 MIA PaCa-2 세포에 작용하는 Prescription A가 췌장 선방세포주인 266-6 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Prescription A를 농도 의존적으로 266-6 세포에 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 계산하였다.

그 결과 Prescription A는 췌장의 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서 췌장암 세포에서만 농도 의존적으로 세포 증식을 억제 하였다(Fig. 1B).

2. Prescription A가 MIA PaCa-2 cell에서 Annexin V와 PI의 staining에 미치는 영향

Prescription A가 MIA PaCa-2 세포에 대한 apoptosis인지 necrosis인지를 알아보기 위하여 Annexin V와 PI의 염색을 이용하여 조사하였다. MIA PaCa-2 세포에 Prescription A를 24 시간 동안 농도별로 처리하여 배양한 후 세포를 순수하게 분리하여 10 μ l의 Annexin V-FITC와 PI-PE로 15분간 암반응시켰다. 이후 flow cytometer로 분석하였다.

그 결과 Prescription A는 농도 의존적으로 Annexin V의 염색양이 증가하였고 PI의 염색양은 변화하지 않았다(Fig. 2). 이는 Annexin V는 positive 상태이면서 PI는 negative 상태인 early apoptosis 단계를 의미하는 것으로 Prescription A는 농도 의존적으로 early apoptosis되는 MIA PaCa-2 세포를 유의 있게 증가시킴을 알 수 있다.

3. Prescription A가 MIA PaCa-2 cell에서 세포 주기에 미치는 영향

Prescription A가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis를 유발함에 따라서 cell cycle arrest에 영향을 주는 지 알아보았다. Prescription A를 MIA PaCa-2 세포

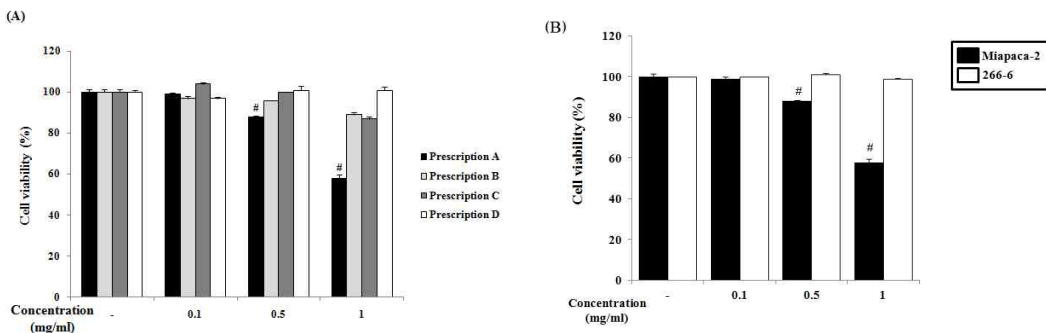


Fig. 1. The cytotoxic effects of Prescription A, B, C, D on MIA PaCa-2 and pancreatic acinar cell line, 266-6.

(A) MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Prescription A, B, C, and D as indicated concentration for 24 hrs, (B) MIA PaCa-2 cells and 266-6 cells were incubated with or without Prescription A as indicated concentration for 24 hrs, Cell viability was measured by MIT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments, #*p*<.001 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

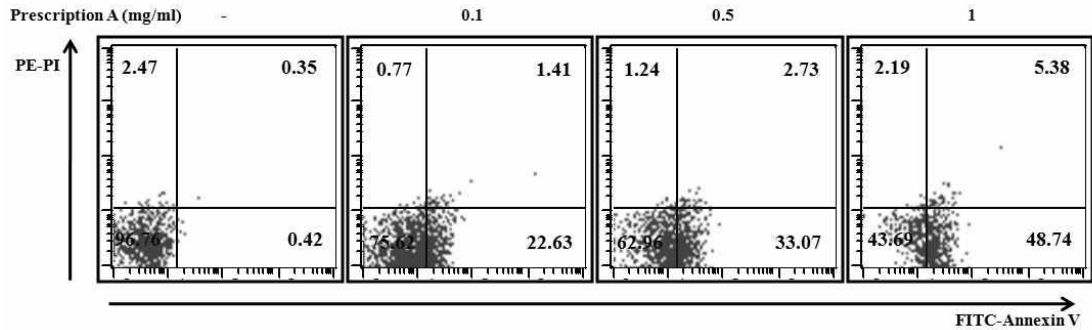


Fig. 2. The effects of Prescription A on Annexin V/PI expression in MIA PaCa-2 cells.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Prescription A as indicated concentration for 24 hrs and stained with Annexin V/PI. The cells were measured by flow cytometry analysis as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. The similar results were obtained from three additional experiments.

(A)

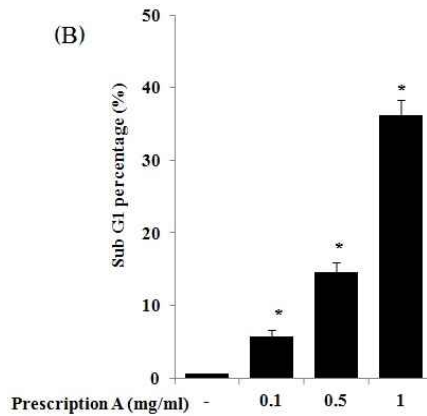
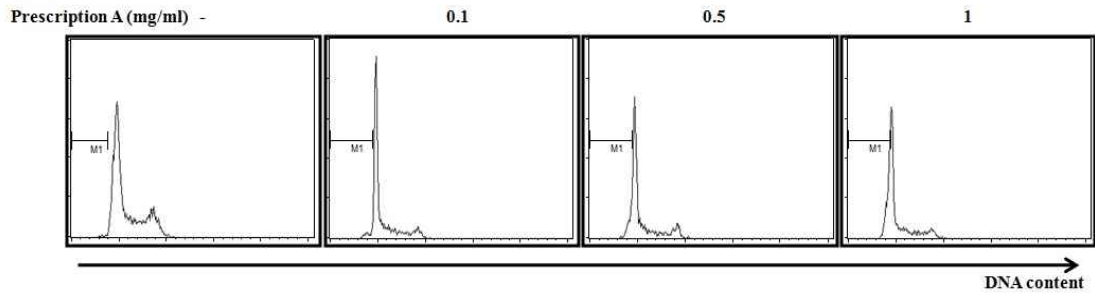


Fig. 3. The effects of Prescription A on cell cycle arrest in MIA PaCa-2 cells.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Prescription A as indicated concentration for 24 hrs and stained with PI. (A) The number of sub G1 phase cell was measured by flow cytometry analysis, (B) And the percentage of sub G1 phase cell number was expressed in graph, Data are means of three independent experiments, * $p < .05$: in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

에 24 시간 처리한 후 순수한 세포를 얻어 세포를 고정시키고, 고정 후 PI로 염색하여 cell cycle을 측정하였다. Prescription A를 처리한 군에서는 그렇지 않은 군에 비해서 sub-G1 구간이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A and B). 이는 Prescription A가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis를 유발하여 cell cycle arrest에 영향을 주어 proliferation을 억제하였음을 알 수 있다.

4. Prescription A가 MIA PaCa-2 cell에서 nuclear morphology에 미치는 영향

Apoptosis에서는 세포질과 nuclear chromatin이 응축되는데 Prescription A가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis를 유도함을 확인하기 위해서 세포내 핵의

변화를 관찰하였다. Prescription A를 MIA PaCa-2 세포와 24시간 동안 배양하여 세포의 핵을 DAPI로 염색한 후 그 모양을 관찰하였다(Fig. 4A). 그 결과 Prescription A를 처리한 군에서는 핵의 응축이 농도 의존적으로 진하게 일어났다(Fig. 4B). 이는 Prescription A가 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis를 유발함을 보여준다.

5. Prescription A가 MIA PaCa-2 cell에서 ROS 생성에 미치는 영향

Prescription A가 유발하는 apoptosis가 세포내의 ROS 발생 증가와 연관이 있는지 알아보기 위해 ROS를 측정하였다. Apoptosis를 유도하기 위해서 ROS의 활성이 중요한 요인으로 작용한다고 알려져 있다.

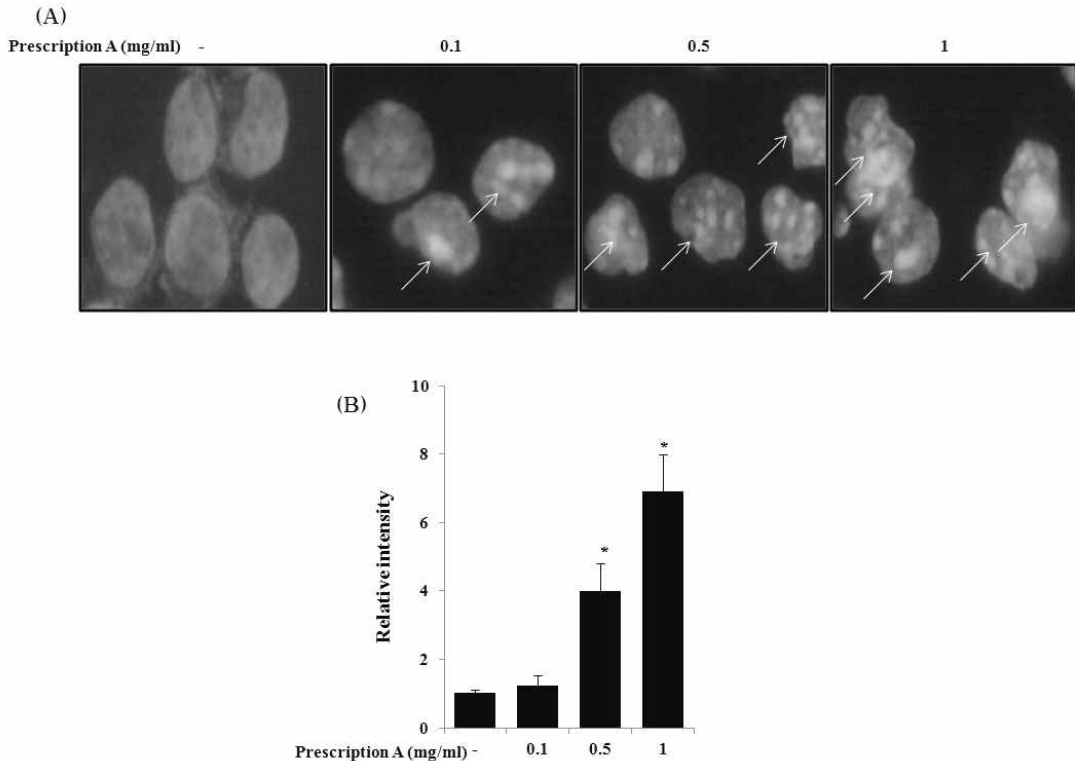


Fig. 4. The nuclear morphology of MIA PaCa-2 cells treated with Prescription A.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Prescription A as indicated concentrations for 24 hrs and stained with DAPI. (A) The morphological change of nuclear chromatin observed by fluorescent microscopy as described in materials and methods. (B) And the relative intensity of fluorescence was expressed in graph. Data are means of three independent experiments. * $p < .05$: in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

Prescription A를 24시간 동안 MIA PaCa-2 세포와 배양한 뒤, 세포를 순수하게 분리하여 DCF-DA 염색 후 ROS의 변화를 flow cytometer로 분석하였다. 그 결과 Prescription A는 농도 의존적으로 ROS의 발현을 증가시켰다(Fig. 5A and B).

또한 Prescription A에 의한 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis 발생이 ROS를 매개로 함을 알아보기 위하여, ROS scavenger인 NAC를 처리하여 세포사멸에 변화가 있는지를 측정하였다. ROS scavenger인 NAC를 1시간 전에 전처리 하고 Prescription A를 24시간 동안 MIA PaCa-2 세포와 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과 ROS 억제시 Prescription A로

인해 일어난 세포사멸이 거의 회복되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 5C). 이는 Prescription A가 유도한 ROS가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 유의한 작용을 한다는 것을 보여준다.

6. Prescription A의 약제별 MIA PaCa-2 cell에 미치는 생존율 감소

Prescription A를 구성하는 약재 4가지 중에서 어떤 약재가 MIA PaCa-2 세포의 생존율에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 MIA PaCa-2 세포에 *Artemisiae capillaris* Herba, *Gentianae* Radix,

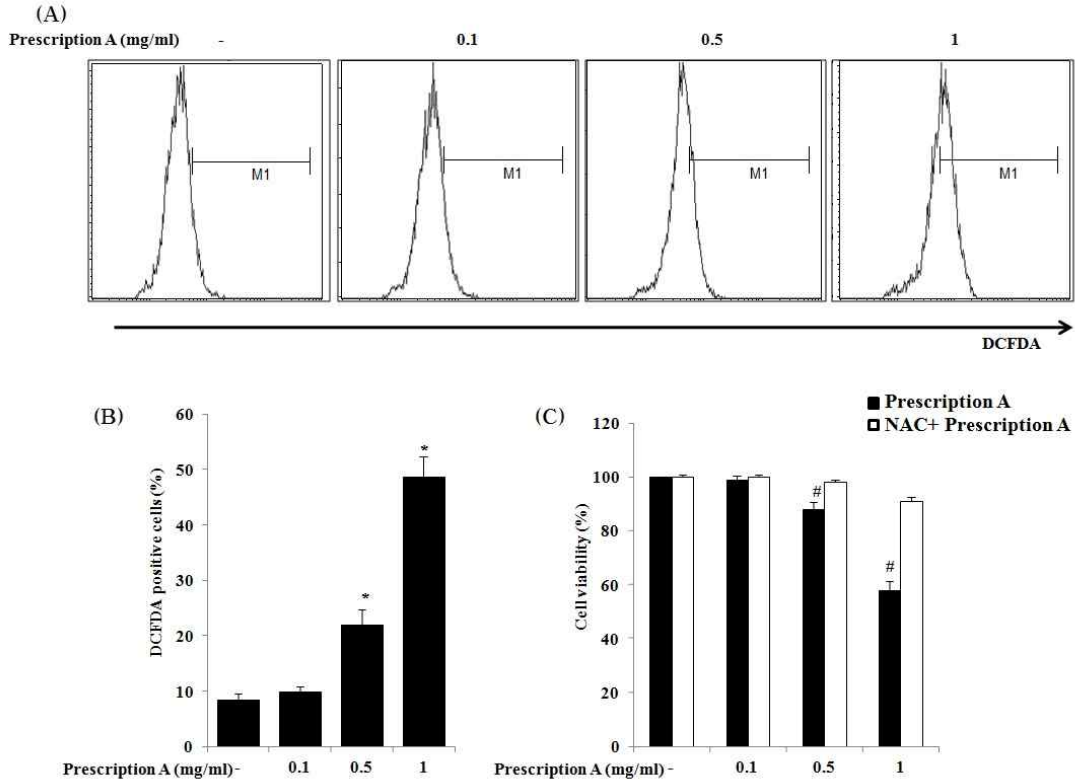


Fig. 5. The effects of Prescription A on ROS production in MIA PaCa-2 cells.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Prescription A as indicated concentration for 24 hrs and stained with DCF-DA. (A) The number of DCF-DA positive cells was measured by flow cytometry analysis. (B) The percentage of DCF-DA positive cells number was expressed in graph. (C) MIA PaCa-2 cells were pre-treated with or without NAC for 1 hr, and incubated with or without Prescription A for 24 hrs. NAC(10 mM) was used as ROS scavenger. Cell viability was measured by MIT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. * $p < .05$, # $p < .001$: in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

Coptidis Rhizoma, Gleditsiae Spina를 각각 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, Artemisiae capillaris Herba를 투여한 군과 Coptidis Rhizoma를 투여한 군에서 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다(Fig. 6).

7. Artemisiae capillaris Herba가 MIA PaCa-2 cell에서 ROS 생성에 미치는 영향

Prescription A 중 Artemisiae capillaris Herba가 유발하는 apoptosis가 세포내의 ROS 발생 증가와 연관이 있는지 알아보기 위해 ROS를 측정하였다.

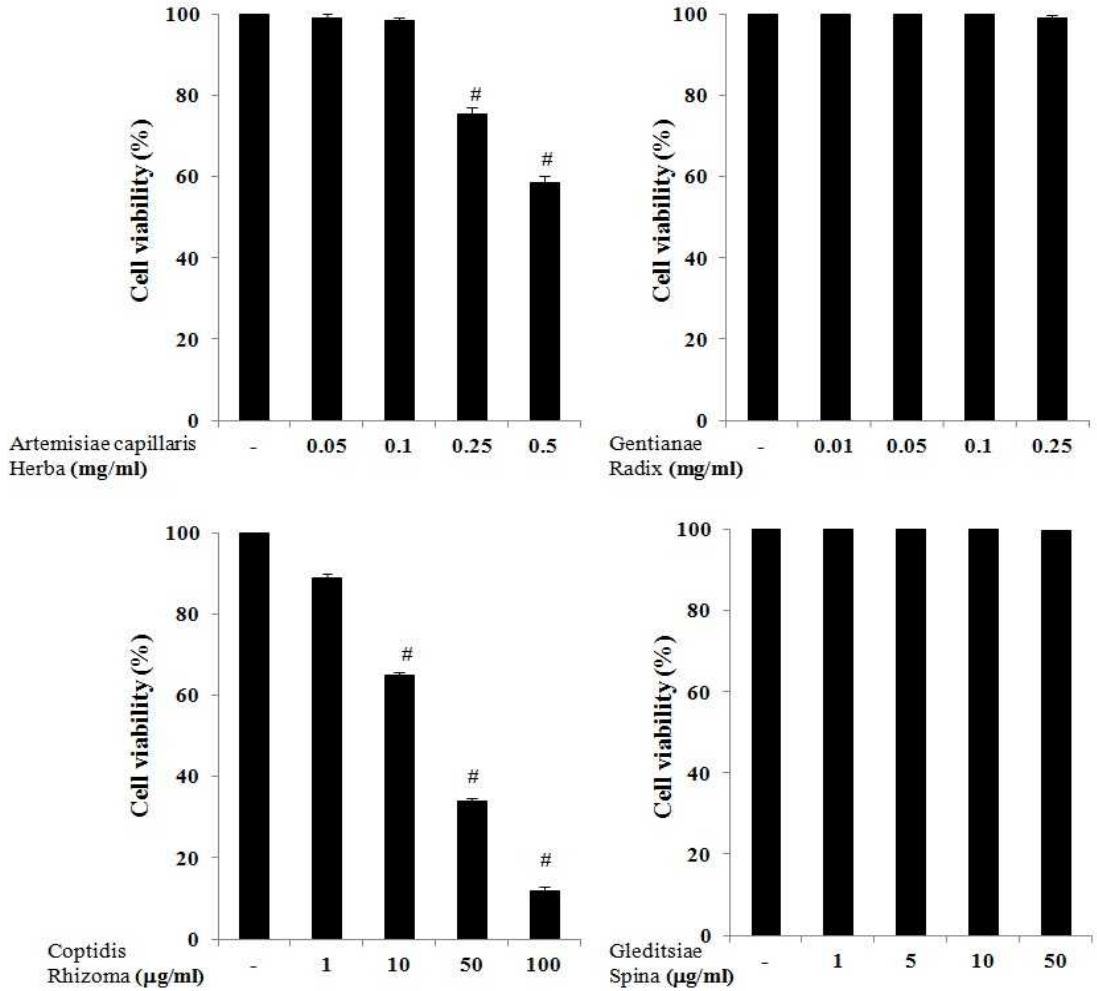


Fig. 6. The cytotoxic effects of Artemisiae capillaris Herba, Gentianae Radix, Coptidis Rhizoma and Gleditsiae Spina on MIA PaCa-2 cells.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Artemisiae capillaris Herba, Gentianae Radix, Coptidis Rhizoma and Gleditsiae Spina as indicated concentration for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. [#] $p < .001$: in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

*Artemisiae capillaris Herba*를 24시간 동안 MIA PaCa-2 세포와 배양한 뒤 세포를 순수하게 분리하여 DCF-DA 염색후 ROS의 변화를 flow cytometer로 분석하였다. 이를 통해 *Artemisiae capillaris Herba*는 농도 의존적으로 ROS의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 7A). 또한 ROS 억제시 세포사멸에 변화가 있는지 알아보기 위해 NAC를 처리하여 apoptosis에 변화가 있는지를 측정하였다. 그 결과 ROS 억제시 *Artemisiae capillaris Herba*로 인한 세포사멸이 거의 회복되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 7B). 이는 Prescription A를 구성하는 약물 중 *Artemisiae capillaris Herba*가 유도한 ROS가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 주요한 작용을 함을 보여 준다.

와 배양한 뒤 세포를 순수하게 분리하여 DCF-DA 염색후 ROS의 변화를 flow cytometer로 분석하였다. 그 결과 *Coptidis Rhizoma*는 ROS 발현을 증가시킴을 알 수 있었으며(Fig. 8A), 또한 NAC를 처리하여 ROS 억제시 *Coptidis Rhizoma*로 인한 세포사멸이 거의 회복되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 8B). 이는 Prescription A를 구성하는 약물 중 *Artemisiae capillaris Herba*와 더불어 *Coptidis Rhizoma* 역시 *Coptidis Rhizoma*가 유도한 ROS가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 주요한 작용을 함을 알 수 있었다.

8. *Coptidis Rhizoma*가 MIA PaCa-2 cell에서 ROS 생성에 미치는 영향

Prescription A를 구성하는 약물 중 *Artemisiae capillaris Herba*와 마찬가지로 세포 생존율에 영향을 미친 *Coptidis Rhizoma* 또한 ROS를 측정하였다. *Coptidis Rhizoma*를 24시간 동안 MIA PaCa-2 세포

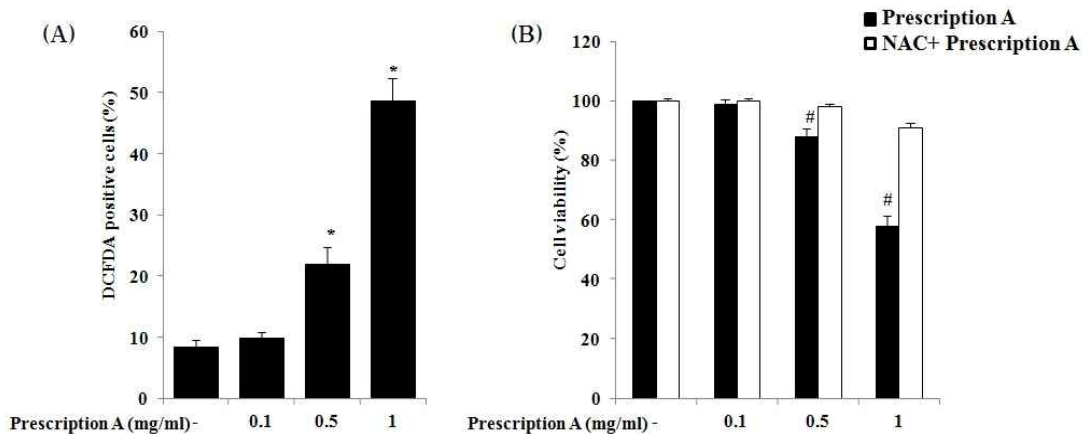


Fig. 7. The effects of *Artemisiae capillaris Herba* on ROS production in MIA PaCa-2 cells.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without *Artemisiae capillaris Herba* as indicated concentration for 24 hrs and stained with DCF-DA. (A) The percentage of DCF-DA positive cells number was expressed in graph, (B) MIA PaCa-2 cells were pre-treated with or without NAC for 1 hr, and incubated with or without *Artemisiae capillaris Herba* for 24 hrs. Cell viability was measured by MIT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. * $p < .05$, # $p < .001$: in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

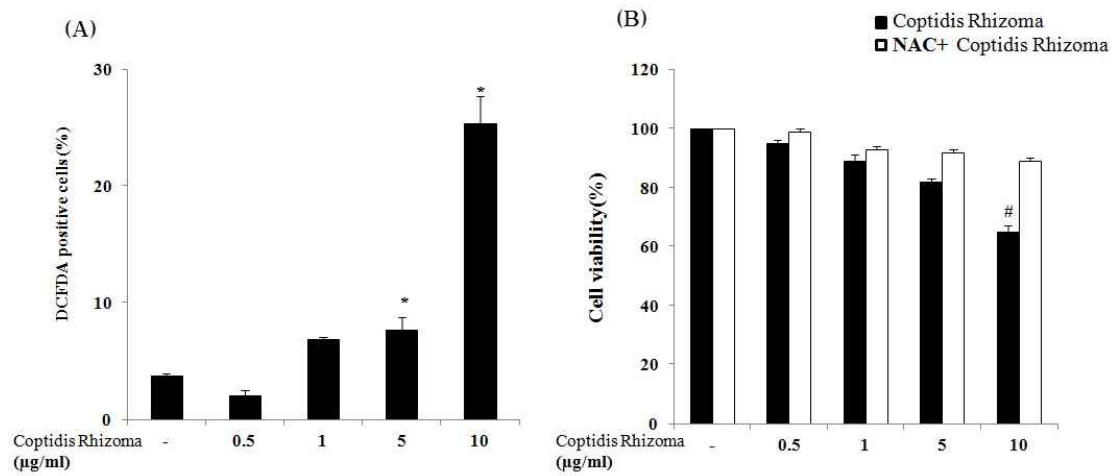


Fig. 8. The effects of Coptidis Rhizoma on ROS production in MIA PaCa-2 cells.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Coptidis Rhizoma as indicated concentration for 24 hrs and stained with DCF-DA. (A) The percentage of DCF-DA positive cells number was expressed in graph. (B) MIA PaCa-2 cells were pre-treated with or without NAC for 1 hr, and incubated with or without Coptidis Rhizoma for 24 hrs. Cell viability was measured by MIT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments, * $p < .05$, # $p < .001$: in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

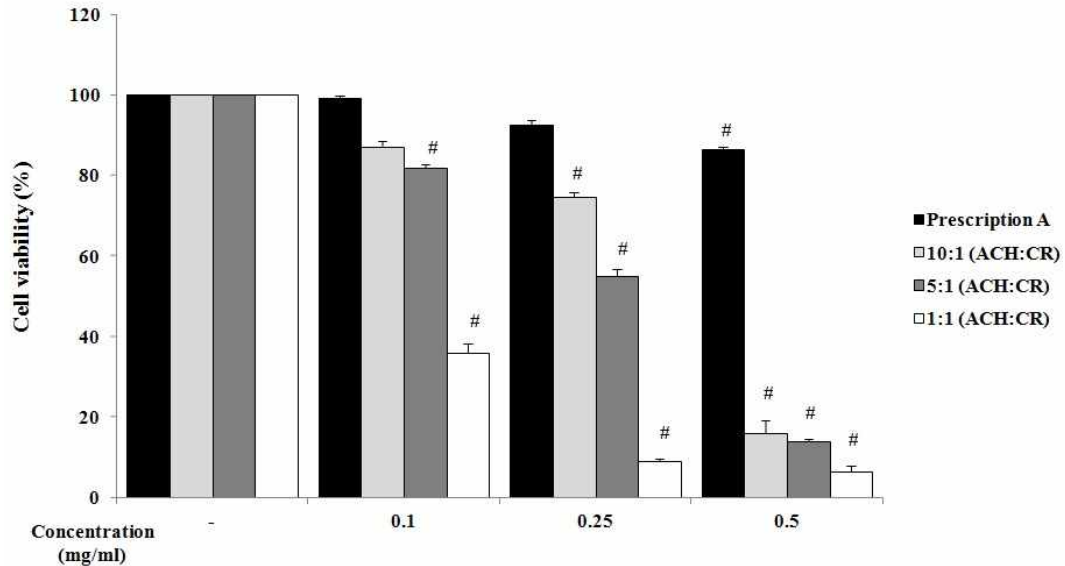


Fig. 9. The cytotoxic effects depend on combination ratio of Artemisiae capillaris Herba (ACH) and Coptidis Rhizoma (CR) in MIA PaCa-2 cells.

MIA PaCa-2 cells were incubated with or without Prescription A, 10:1 (ACH:CR), 5:1 (ACH:CR), and 1:1 (ACH:CR) as indicated concentration for 24 hrs. Cell viability was measured by MIT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments, # $p < .001$: in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

9. Artemisiae capillaris Herba와 Coptidis Rhizoma의 배율별 MIA PaCa-2 cell에 미치는 생존율 감소

Artemisiae capillaris Herba와 Coptidis Rhizoma가 Prescription A의 주요한 효능을 보이는 약제임에 착안하여, Prescription A의 농도별 생존율과 Artemisiae capillaris Herba와 Coptidis Rhizoma의 혼합비율이 각각 10:1, 5:1, 1:1인 경우를 비교하여 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 Artemisiae capillaris Herba 대비 Coptidis Rhizoma의 비율이 증가할수록 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다(Fig. 9). 특히 기준치방 대비, Artemisiae capillaris Herba 및 Coptidis Rhizoma 만을 처리한 그룹에서 더 유효한 세포 사멸효과를 보인 것은 Artemisiae capillaris Herba 및 Coptidis Rhizoma 외의 약물은 MIA PaCa-2 세포 사멸을 억제하는 효과를 보인 것으로도 보인다. 이는 Artemisiae capillaris Herba와 Coptidis Rhizoma가 단미 및 혼합제제로 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 유효함을 보여준다.

IV. 고 찰

최근 암 진단과 치료에 많은 발전이 있었으나 전 세계적으로 발생률이 증가하고 있는 췌장암은 조기 진단과 치료가 어려워 불량한 예후를 보이는 질환이다²⁴⁾.

췌장암의 위험군으로는 고령, 흡인, 남자, 흡연, 만성 췌장염이나 오래 지속된 당뇨병 등이 잘 알려져 있으며, 유발하는 원인으로는 화학물질, 바이러스 감염, 고칼로리 식이, 과도한 포화지방산의 섭취, 알코올 섭취, 유전 소인 등이 관련한다^{1,25-28)}. 진단은 복부 초음파, 복부 전산화단층촬영, 내시경 역행췌담관조영술, 내시경 초음파검사 및 다양한 종양 표지자가 이용되고 있음에도 불구하고 췌장암이 조기에 발견되는 경우는 드물다²⁹⁾.

게다가 췌장암은 항암화학요법에 제대로 반응하지 않는 대표적인 종양이어서 반응률이 20%에 미치지 못하고, 반응 지속 기간은 3~6개월 정도에 불과한 현실은 치료효과 개선을 위한 다양한 약물 요법이 필요하다³⁾.

한의학에서 췌장암은 七情內傷, 飲食不節하여 肝脾損傷, 臟腑失和, 濕濁阻遏, 氣血瘀滯가日久하여 형성된 것으로 보고 치료는 주로 健脾和胃, 清熱利濕, 理氣活血, 軟堅消癥을 원칙으로 한다⁸⁾.

이를 바탕으로 저자는 健脾和胃, 清熱利濕, 理氣活血, 軟堅消癥에 유효한 방제를 Prescription A(茵陳 30g, 龍膽草 15g, 黃連 6g, 皂角刺 2g)²⁰⁾, Prescription B(白屈菜 30g, 鬼箭羽 30g)²¹⁾, Prescription C(生薏苡仁 30g, 三棱 15g, 蓬莪朮 15g, 半枝蓮 15g)²²⁾, Prescription D(蒲公英 40g, 白花蛇舌草 40g, 丹蔘 30g, 薏苡仁 30g, 赤芍藥 15g)²³⁾로 선정하였다. 그 후 유의한 결과를 나타내었던 Prescription A의 약물 중 인진(Artemisiae capillaris Herba)과 황련(Coptidis Rhizoma)이 MIA PaCa-2 세포에 미치는 영향을 연구해 보고자 하였다.

간암 세포에 대한 항암효과가 보고되고 있는 Artemisiae capillaris Herba는 사철쑥의 幼嫩莖葉으로 性味는 苦, 微寒하고 清利濕熱, 退黃疸의 효능이 있어 濕熱의 熏蒸으로 인한 黃疸, 身目黃色鮮明, 發熱, 小便短赤 또는 發黃 등의 병증을 다스리는 要藥으로 주성분은 coumarin, chlorogenic acid, caffeic acid, essential oil이다^{18,30,31)}. Artemisiae capillaris Herba는 담즙분비를 촉진시키고 간장해에 보호효과를 나타내고 간세포의 괴사를 저해하는 등의 간기능에 대한 효과, 지질저하, 관상동맥 확장 및 피브린 용해 효과, 혈압저하효과, 항미생물 효과, 해열, 진통 및 항염증 효과가 보고되었다³²⁾. Coptidis Rhizoma는 苦寒한 性味로 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒 등의 효능이 있으며 주성분은 berberine으로 腸胃의 濕熱로 인한 嘔吐, 瀉痢, 痔瘡, 心火亢盛, 煩躁不眠, 火毒癰瘍, 耳目腫痛, 口舌生瘡 등의 병증을 치료한다^{30,31)}. 또한

항염증작용, 항균작용, 항말라리아 작용 등의 약리 작용이 실험을 통해 확인되었다³²⁾. 특히 berberine은 구강암, 유방암, 전립선 암에 대한 항암효능이 보고되고 있다^{19,33,34)}.

암을 치료하기 위한 여러 가지 방법 중에서 암세포의 죽음을 유발시키는 것이 효율적인 치료방법으로 대두되고 있다³⁵⁾. 이러한 암세포의 죽음은 감염이나 조직 손상에 의하여 발생하는 비정상적인 과정인 세포괴사(necrosis)와 프로그램된 세포 죽음의 한 기전으로 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 따른 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 개체의 생존을 위한 손상된 세포들의 제거를 위한 중요 방어기전인 세포사멸(apoptosis)로 구별될 수 있다³⁶⁻⁴⁰⁾. 그러므로 apoptosis의 균형은 개체 유지에 중요한 역할을 하지만 apoptosis 과정이 실패하게 되면 암을 유발할 수 있어서 최근에는 apoptosis 과정을 통하여 비정상적인 세포나 암세포를 제거하는 치료제 개발이 중요시되고 있다^{41,42)}. 또한 apoptosis의 정도를 정량적으로 측정함으로써 항암화학 치료제의 투여전 감수성 지표로 이용하는 연구들도 시행되었다⁴³⁻⁴⁵⁾.

이에 저자는 췌장암 세포주 MIA PaCa-2 세포에 있어서 Prescription A의 항암효과와 그 기전을 실험적으로 알아보고 Prescription A에서 주요한 작용을 한 약물인 *Artemisiae capillaris Herba*와 *Coptidis Rhizoma*가 MIA PaCa-2 세포에서 어떻게 apoptosis를 유발하는지에 대하여 연구하였다.

먼저 유효한 영향을 나타낼 것으로 예상되는 Prescription A, B, C, D의 MIA PaCa-2 세포에 미치는 생존율의 영향에 대해 알아보았다. MIA PaCa-2 세포에 Prescription A, B, C, D를 각각 0.1, 0.5, 1mg/ml로 처리하여 24시간 후에 세포 증식을 관찰한 결과 Prescription A 만이 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1A). 또한 정상 세포에 대한 독성 여부를 파악하기 위해 췌장 선방 세포주인 266-6 세포에 대한 증식 억제를 측정 한 결과 Prescription A는 췌장의 정상세포에는 영향

을 미치지 않으면서 MIA PaCa-2 세포에서만 농도 의존적으로 세포증식을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 1B).

다음으로 이러한 생존율 및 증식율의 감소가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 Annexin V/PI의 발현 여부, cell cycle arrest, chromatin condensation 등을 측정지표로 사용하였다. Apoptosis의 특징으로는 세포질 및 염색질의 응축, DNA 단편화, 세포 표면에 phosphatidylserine의 발현 및 세포막의 수포화 현상 등과 같은 형태적 또는 생태학적 변화를 동반한다^{36,37,46)}. 여기에서 세포막의 변화는 세포가 완전히 파괴되기 전 탐식세포에 의해 인지되어 처리되도록 하는 결정적인 과정으로 그 변화 중 한 가지가 세포막 내측에 위치하는 phosphatidylserine (PS)이 세포막 바깥쪽으로 전위되며, 이것이 표적으로 작용하여 식작용을 일으킨다^{47,48)}. 전위된 PS는 Ca²⁺ 의존성 인지질 결합 특성을 가지고 있는 단백질인 Annexin V와 높은 친화력을 가지고 결합하므로 이를 early apoptosis의 지표로 사용될 수 있으나 Annexin V는 apoptosis 세포와 necrosis 세포에 모두 결합할 수 있으므로 이것을 구분하기 위해 핵속의 DNA에 intercalation되는 PI를 동시에 염색한다. Propidium iodide (PI)는 세포괴사에 의해 손상된 세포막을 통과하여 세포핵에 대한 표지자로서 핵을 염색시키므로 세포막 파괴 여부를 확인함으로써 apoptosis와 necrosis를 구분할 수 있다^{45,49,50)}. Flow cytometry를 이용하여 전위된 PS와 결합하는 Annexin V와 PI의 이중 염색으로 necrosis 및 apoptosis의 감별 측정이 가능하다⁵¹⁻⁵⁴⁾. 이러한 Annexin V/PI의 이중형광염색에서 Annexin V와 PI가 모두 negative인 상태는 정상 세포이며, Annexin V만이 단독 positive이고 PI는 negative인 상태는 apoptosis의 초기 단계로 이미 apoptosis signal로 진입된 세포를 의미한다. Annexin V와 PI가 모두 positive인 경우는 완전히 죽은 세포로 세포막까지 파괴되어 핵이 노출된 상태인 late apoptosis 또는

ncrosis를 의미하며, Annexin V는 negative이고 PI는 positive인 상태는 apoptosis가 아니라 외부의 심한 충격으로 죽은 necrosis 단계를 의미하며 세포막의 PS 노출이 없는 것이 특징이다⁴⁹⁾.

본 연구에서 Prescription A는 농도 의존적으로 Annexin V의 염색양이 증가하였고 PI의 염색양은 변화하지 않았다(Fig. 2). 이는 Annexin V는 positive 상태이면서 PI는 negative 상태인 early apoptosis 단계를 의미하는 것으로 Prescription A는 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포에 대해 early apoptosis를 유도시킨다고 볼 수 있다.

Cell cycle analysis에서 apoptosis가 일어나는 동안에는 calcium and magnesium dependent nuclease들이 활성화되어 DNA를 절단하게 되고, 이로 인해 잘려진 작은 DNA 절편들은 PBS와 같은 washing buffer에 녹아 나와 washing 단계에서 제거되게 된다. 그러므로 apoptosis가 일어난 세포를 정량적인 DNA-binding dye인 PI를 사용하여 염색해 보면 apoptosis에 의한 DNA fragmentation 현상에 의해 세포내에 존재하는 DNA 양이 줄어들어 histogram에서 G0/G1기의 세포들보다 더 왼쪽에 나타나게 되는데 이것을 sub-G1이라고 한다⁵⁵⁾.

Prescription A를 MIA PaCa-2 세포에 24 시간 처리한 후 순수한 세포를 얻어 세포를 고정시키고, 고정 후 PI로 염색하여 cell cycle을 측정하였을 때 Prescription A를 처리한 군에서는 그렇지 않은 군에 비해서 sub-G1 구간이 Prescription A 0.1 mg/ml 투여군(5.76 ± 0.12), 0.5 mg/ml 투여군(14.64 ± 1.20), 1 mg/ml 투여군(36.42 ± 2.66)의 순으로 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A and B). 이는 Prescription A가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis를 유발하여 cell cycle arrest에 영향을 주어 proliferation을 억제하였음을 알 수 있다.

또한 apoptosis가 유발되었을 때 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위해 Prescription A를 MIA PaCa-2 세포와 24시간 동안 배양하여 세포

의 핵을 DAPI로 염색한 후 그 모양을 관찰하였다(Fig. 4A). 그 결과 Prescription A를 처리한 군에서는 농도 의존적으로 세포의 밀도가 감소하였고, apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 chromatin condensation에 의한 apoptotic body의 형성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이는 Prescription A가 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis를 유발함을 보여준다.

이러한 Annexin V/PI의 발현 여부, cell cycle arrest, chromatin condensation의 결과들로 미루어 보아 Prescription A에 의한 MIA PaCa-2 세포의 생존율 및 증식율의 감소가 apoptosis에 의한 것으로 보여진다.

한편 ROS는 산소원자를 포함한 화학적으로 반응성 있는 분자로 반응성 있는 산소는 짝지어지지 않은 전자 때문에 매우 반응성이 있으며, 산소의 정상적인 대사작용에 의해서 자연스럽게 생기고 세포신호와 항상성에 중요한 역할을 한다⁵⁶⁾. UV, inflammatory cytokine, ionizing radiation, 다양한 항암활성 화합물이나 대사과정 중 미토콘드리아에 의해서도 생성되며, 생체에서는 ROS의 생성과 제거 사이에서 세포기능을 유지하면서도 여러 가지 자극에 의한 ROS의 과도한 생산은 산화 스트레스(oxidative stress)를 일으켜 cell cycle arrest와 apoptosis를 유도하는 핵심적인 역할을 한다⁵⁷⁻⁶⁰⁾.

이러한 ROS 발생 증가가 Prescription A에 의해 유발된 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis와 연관이 있는지를 알아보기 위하여 본 연구에서는 Prescription A를 24시간 동안 MIA PaCa-2 세포와 배양한 뒤, 세포를 순수하게 분리하여 DCF-DA 염색후 ROS의 변화를 flow cytometer로 분석하였다. 그 결과 Prescription A는 농도 의존적으로 ROS의 발현을 증가시켰다(Fig. 5A and B). 또한 Prescription A에 의한 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis 발생이 ROS를 매개로 함을 알아보기 위하여, ROS scavenger인 NAC를 1시간 전에 전처리 하고 Prescription A를 24시간

동안 MIA PaCa-2 세포와 배양한 후 세포 생존율을 측정할 결과 ROS 억제시 Prescription A로 인해 일어난 세포사멸이 거의 회복되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 5C). 이는 Prescription A가 유도한 ROS가 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 유의한 작용을 한다는 것을 보여준다.

이상의 결과를 종합하면 Prescription A는 ROS 생성을 유도하여 apoptosis를 일으킴으로써 MIA PaCa-2 세포에 대하여 항암 효과가 있음을 알 수 있다.

그렇다면 Prescription A를 구성하는 약재 4가지 중에서 어떤 약재가 MIA PaCa-2 세포의 생존율에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 MIA PaCa-2 세포에 *Artemisiae capillaris Herba*, *Gentianae Radix*, *Coptidis Rhizoma*, *Gleditsiae Spina*를 각각 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, *Artemisiae capillaris Herba*를 투여한 군과 *Coptidis Rhizoma*를 투여한 군에서 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다 (Fig. 6).

다음으로 이러한 생존율 및 증식율의 감소에 영향을 미친 *Artemisiae capillaris Herba*와 *Coptidis Rhizoma*가 ROS 발생 증가로 인한 apoptosis를 유발하는 것인지 확인하기 위하여 *Artemisiae capillaris Herba*와 *Coptidis Rhizoma*를 각각 24시간 동안 MIA PaCa-2 세포와 배양한 뒤 세포를 순수하게 분리하여 DCF-DA 염색후 ROS의 변화를 flow cytometer로 분석하였다. 이를 통해 *Artemisiae capillaris Herba*는 농도 의존적으로 ROS의 발현을 증가시킴을 알 수 있었으며 (Fig. 7A), *Coptidis Rhizoma* 또한 ROS 발현을 증가시킴을 알 수 있었다 (Fig. 8A). 또한 ROS 억제시 세포사멸에 변화가 있는지 알아보기 위해 NAC를 처리하여 apoptosis에 변화가 있는지를 측정하였는데, 그 결과 ROS 억제시 *Artemisiae capillaris Herba*로 인한 세포사멸이 거의 회복되어 있었고 (Fig. 7B), *Coptidis Rhizoma* 또한

세포사멸이 거의 회복되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 8B). 이는 Prescription A를 구성하는 약물 중 *Artemisiae capillaris Herba*와 더불어 *Coptidis Rhizoma*도 ROS 생성을 유도하여 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 주요한 작용을 함을 보여 준다.

더불어 *Artemisiae capillaris Herba*와 *Coptidis Rhizoma*가 Prescription A의 주요한 효능을 보이는 약제임에 착안하여, Prescription A의 농도별 생존율과 *Artemisiae capillaris Herba*와 *Coptidis Rhizoma*의 혼합비율이 각각 10:1, 5:1, 1:1인 경우를 비교하여 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 *Artemisiae capillaris Herba* 대비 *Coptidis Rhizoma*의 비율이 증가할수록 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다 (Fig. 9). 특히 기존처방 대비, *Artemisiae capillaris Herba* 및 *Coptidis Rhizoma*만을 처리한 그룹에서 더 유효한 세포 사멸효과를 보인 것은 *Artemisiae capillaris Herba* 및 *Coptidis Rhizoma* 외의 약물은 MIA PaCa-2 세포 사멸을 억제하는 효과를 보인 것으로도 보인다. 이는 *Artemisiae capillaris Herba*와 *Coptidis Rhizoma*가 단미 및 혼합계제로 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 유효함을 보여주며, *Coptidis Rhizoma*의 비율이 증가할수록 효과가 증대됨을 미루어 볼 때 *Artemisiae capillaris Herba*와 *Coptidis Rhizoma*의 각각 단미제제로써 apoptosis에 관한 추가적 실험이 앞으로 필요할 것으로 보인다.

V. 결론

Prescription A (*Artemisiae capillaris Herba* 30g, *Gentianae Radix* 15g, *Coptidis Rhizoma* 6g, *Gleditsiae Spina*)를 인간 유래 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 세포에 처리하여 이들의 apoptosis 과정을 MTT assay, FACS analysis, Fluorescence microscopy 등으로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Prescription A는 농도(0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml) 의존적으로 인간 유래 췌장암 세포주 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다.
2. Prescription A는 Annexin V/PI 이중형광염색에서 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포에 대해 early apoptosis를 유도시킨다.
3. Prescription A는 MIA PaCa-2 세포에서 sub-G1 구간을 농도 의존적으로 증가시켜 cell cycle arrest에 영향을 주어 proliferation을 억제하였다.
4. Prescription A는 MIA PaCa-2 세포에서 chromatin condensation에 의한 apoptotic body의 형성을 농도 의존적으로 증가시켰다.
5. Prescription A는 농도 의존적으로 ROS 생성을 증가시켰고 이는 apoptosis를 유도하였다.
6. Prescription A 중에서 Artemisiae capillaris Herba와 Coptidis Rhizoma는 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다.
7. Artemisiae capillaris Herba와 Coptidis Rhizoma는 각각 ROS 생성을 유도하여 MIA PaCa-2 세포의 apoptosis에 주요한 작용을 하였다.
8. Artemisiae capillaris Herba 대비 Coptidis Rhizoma의 비율이 증가할수록 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰다.

이상의 실험 결과로 볼 때 Prescription A를 구성하는 약물 중 Artemisiae capillaris Herba와 Coptidis Rhizoma는 ROS 생성을 증가시켜 apoptosis를 유도함으로써 인간 유래 췌장암 세포주 MIA PaCa-2 세포에 유의한 효과를 나타냈음을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2012년 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Chung JB. Pancreatic cancer. Seoul:Koon Ja Publishing Inc. 2006;23, 131, 135, 142, 283-4, 287.
2. Cho JH. Recent Update of Molecular Targeted Therapy in Pancreatic Cancer. Korean J Gastroenterol. 2013;61(3):147-54.
3. Barkin JS, Goldstein JA. Diagnostic and therapeutic approach to pancreatic cancer. Biomed Pharmacother. 2000;54:400-9.
4. Sikora SS, Mital BR, Prasad KR, Das BK, Kaushik SP. Functional gastric impairment in carcinoma of the pancreas. Br J Surg 1995;82(8):1112-3.
5. Park JG, Bang YJ, Ha SH. Oncology. Seoul:Iljogak, 2012:317-8, 327-8, 330-1, 329.
6. Cho JG. Herbal Clinical Oncology. Daejeon:Ju Min Publishing Inc. 2005:503.
7. Chen Y, Cong Z. Tumor single prescription Daquan. Beijing:Chinese Medicine Publishing Inc. 1998:508.
8. Moon G, Jeong BH, Kim BJ. Cancer-Combined treatment of East and West 2. Iksan:Wonkwang University Publishing. 1999:356, 377.
9. Ling DQ. Zong liu bian bing zhuan fang zhi liao. Beijing:Ren min wei sheng Publishing Inc. 2000:245.
10. Hu XM. Chinese medicine secret recipe(2). Seoul:Hagyongsa. 1994:699.
11. Zheng YL, Han XW. Zhong xi yi zhong liu zhen liao da quan. Beijing:Zhongguo Zhong yi yao Publishing Inc. 1996:484.
12. Xia HD, Zhang LJ. Zhong liu bing zheng zhi

- jing yao, Beijing:Ke xue ji shu wen xian Publishing Inc, 1999:196.
13. Lee SH, Inhibitory Effect of Curcumin on the Growth of Human Pancreatic Cancer Cells(Capan1) in vitro, Graduate School of Ko Sin University Doctoral thesis, 2004.
 14. Kang YK, Choe JY, Lee EA, Jang HS, Lee JM, Park HL, Cytotoxic Effects of Leaves of Cudrania tricuspidata Bureau Extracts on Human Pancreatic Cancer Cells, The Journal of Korean society of cancer prevention, 2011;16(4):333-9.
 15. Lee IY, Apoptotic Effect of Phellodendri Cortex Water Extract on MIA PaCa-2 Cells, Graduate School of Won Kwang University Doctoral thesis, 2013.
 16. Kim H, Anti-cancer Effects of Bujeonghangamtang on Human Pancreatic Cancer Cell Line PANC-1, Graduate School of Won Kwang University Master's thesis, 2006.
 17. Baek DG, Effects of Paljinhangahm-dan on Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cell Line PANC-1, Graduate School of Won Kwang University Doctoral thesis, 2008.
 18. Yun HJ, Kim BW, Lee CH, Jung JH, Heo SK, Park WH, Park SD, Herbal medicine In-un-Ho-Tang as a potential anti-cancer drug by induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells, The Korea Journal of Herbology, 2007;22(3):27-37.
 19. Park JJ, Induction of apoptosis by berberine in KB human oral cancer cells, Graduate School of Cho Sun University Master's thesis, 2013.
 20. Zhang ZQ, Lin chuang zhong liu zong he zhi liao da quan, Beijing:Ao lin pi ke Publishing Inc, 1995:256.
 21. Li JG, Qu SB, Zhong yi zhong liu fang zhi da quan, Beijing:Ke xue ji shu wen xian Publishing Inc, 1994:336.
 22. Li PW, Zhong xi yi lin chuang zhong liu xue, Beijing:Zhongguo Zhong yi yao Publishing Inc, 1996:763.
 23. Pang GM, Zhong liu bing zui xin zhuan fang zhuan yao 816, Beijing:Xue yuan Publishing Inc, 2000:162.
 24. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ, Cancer statistics, 2003, CA Cancer J Clin, 2003;53:5-26.
 25. Lee SJ, Lee YC, Song SY, Chung JB, Kang JK, Park IS, Clinical Study on Pancreatic Cancer and Its Prognostic Factors, Korean J Gastroenterol, 1994;26(6):1010-20.
 26. Selverman DT, Schiffman M, Everhart J, et al, Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer, Br J Cancer, 1999;80:1830-7.
 27. Talamini G, Falconi M, Bassi C, et al, Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis, Am J Gastroenterol, 1999;94:1253-60.
 28. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Diabetes and the risk of pancreatic cancer, Italian Pancreatic Cancer Study Group, N Engl J Med, 1994;331:81-4.
 29. Park YS, Seo JH, Chung JB, Song SY, Hwang YW, Jang HJ, et al, Biliary Tract and Pancreas : Survival and Recurrence Pattern after Curative Resection of Pancreatic Cancer, Korean J Gastroenterol, 2001;38(4):276-83.

30. Sin MG. Clinical traditional herbalogy. Seoul:Yongnimisa. 1997:688-9, 402-4.
31. Chang MY. Kang ai ben cao. Seoul:Du jia. 1992:314, 376.
32. Herbal Pharmacology Textbook Compilation Committee. Herbal Pharmacology. Seoul:Sinil books. 2007:243-5, 605-7.
33. Kim S, Han J, Kim NY, Lee SK, Cho DH, Choi MY, Kim JS, Kim JH, Choe JH, Nam SJ, Lee JE. Effect of berberine on p53 expression by TPA in breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2012;27(1):210-5.
34. Hur JM, Kim D. Berberine Inhibited Radioresistant Effects and Enhanced Anti-Tumor Effects in the Irradiated-Human Prostate Cancer Cells. *Toxicol Res.* 2010;26(2):109-15.
35. Hwang WD, Im YK, Son BI, Park C, Park DI, Choe YH. Induction of Apoptosis by Ethanol Extract of *Scutellaria baicalensis* in Renal ell Carcinoma Caki-1 Cells. *Journal of Life Science.* 2013;23(4):518-28.
36. Han SI, Kim YS, Kim TH. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* 2008;41(1):1-10.
37. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(8):592-603.
38. Vilches Troya J. Understanding cell death: a challenge for biomedicine. *An R Acad Nac Med.* 2005;122(4):631-56.
39. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
40. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001;92(1):57-70.
41. Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and apoptosis. *Am J Surg.* 2006;191(4):517-26.
42. Park SE, Lee SY, Sin DY, Chung JW, Jin MH, Park SY, et al. Pro-apoptotic Effects of Platycodin D Isolated from *Platycodon grandiflorum* in Human Leukemia Cells. *Journal of Life Science.* 2013;23(3):389-98.
43. Filippini G, Balmelli T, Eppenberger H, Soldati G. Flow cytometric detection of p53 protein after incubation of a pre-B cell line with antitumor agents. *Cytometry.* 1999;35(3):267-73.
44. Havrilesky LJ, Elbendary A, Hurteau JA, Whitaker RS, Rodriguez GC, Berchuck A. Chemotherapy-induced apoptosis in epithelial ovarian cancers. *Obstet Gynecol.* 1995; 85(6):1007-10.
45. Gibb RK, Taylor DD, Wan T, O'Connor DM, Doering DL, Gerçel-Taylor C. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol.* 1997;65(1):13-22.
46. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(2):139-63.
47. Afford S, Randhawa S. Demystified: apoptosis. *Molecular pathology.* 2000;53(2):55-63.
48. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5): 1415-20.

49. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1):39-51.
50. Van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*. 1996;24(2):131-9.
51. Eray M, Mättö M, Kaartinen M, Andersson L, Pelkonen J. Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. *Cytometry*. 2001;43(2):134-42.
52. Ormerod MG. The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia*. 1998;12(7):1013-25.
53. Wilkins RC, Kutzner BC, Truong M, Sanchez-Dardon J, McLean JR. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. *Cytometry*. 2002;48(1):14-9.
54. Zamai L, Falcieri E, Marhefka G, Vitale M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry*. 1996;23(4):303-11.
55. Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A*. 2007;71(3):125-31.
56. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004;52:794-804.
57. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1109-15.
58. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):813-24.
59. Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol*. 2012;86(11):1649-65.
60. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(12):1875-84.