

# 木香과 車前草가 胃癌細胞의 活性, 增殖, 自己殺 害能 및 세포주기관련 유전자 발현에 미치는 영향

오히라 · 고성규

## The Effects of Saussurea Radix and Plantaginis Herba on Cellular Viability, Proliferation, Apoptosis and Expression of Cell Cycle-related Genes in Gastric Cancer Cells

Hee-Rah Oh, Seong-Gyu Ko

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

**Objective :** This experimental study was carried out to evaluate the effects of Saussurea Radix and Plantaginis Herba on cellular viability, proliferation, apoptosis and expression of the cell cycle-related genes in cultured gastric cancer cells.

**Method :** MTT assay for analysis of cellular toxicity and the effect on suppression of cellular viability, [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay for evaluation of the effect on suppression of DNA replication, tryphan blue exclusion assay for measurement of induction of apoptosis and Quantitative RT-PCR for analysis of the effects on expression of cell cycle or apoptosis-related genes were performed.

**Results :** Antitumor activity of Saussurea Radix associated with inhibition of cell cycle progression and promotion of apoptosis caused by transcriptional regulation of p53, p21/Waf1 and the other related genes was observed.

**Key Word :** Saussurea Radix, Plantaginis Herba, cell cycle, apoptosis, genesGTP

# I. 서론

암에 의한 사망률이 최상위를 차지하고 그 비율이 점차 증가함에 따라 다양한 치료법들이 시도되어 왔으나, 궁극적인 해결에 이르지 못하고 있다.

현재까지 개발되어 사용되고 있는 항암제는 암세포 뿐 만 아니라, 정상적인 세포에도 독성을 나타내어 이로 인한 부작용을 극복하고자 최근에는 합성물질이 아닌 천연물질을 대상으로 항암제를 개발하려는 노력이 이루어지고 있다.

한의학계의 암 연구 동향은 항암효과가 인정되는 한약재와 한약처방을 대상으로 세포독성, 세포분화, 항암약물간의 상승작용, 종양면역, 자기살해능(apoptosis), 항암제와 방사선요법 부작용 감소 등에 관한 연구가 수행되는 한편, 분자생물학, 유전자요법(gene therapy), 혈관신생(angiogenesis) 및 신호전달체계(signal transduction pathway) 등의 연구의 필요성이 대두되면서 이에 대한 연구들이 진행되고 있는 실정이다<sup>1)</sup>.

암세포는 정상세포에 비해 크고 다양한 핵을 지니며, 주변세포에 상관없이 무제한적인 증식을 보인다. 암세포의 증식성은 항암제 개발의 주된 관건이 되었고, 최근 분자생물학적 차원에서 세포주기에 대한 기전이 세포주기 관련인자들의 발현과 더불어 차례로 구명되고 있다<sup>2)</sup>.

암의 발생은 세포증식(cell proliferation)과 세포사멸(cell death) 사이의 균형의 붕괴에 의하여 촉진됨이 잘 알려져 있다. 세포분열주기(cell division cycle)와 세포사멸 사이의 균형은 다양한 신호전달체계(signal transduction pathway)에 의하여 조절되며 최근 수년간 이에 관여하는 많은 유전자들이 발견되었다<sup>3,4)</sup>.

Apoptosis 또는 programmed cell death로 알려

진 능동적 세포사멸은 주로 세포생존을 유지시키는 필수적인 세포성장인자의 저하로 인한 생리적 세포손상 또는 DNA 손상과 같은 물리적 세포손상에 의하여 유발된다. 최근 p53, c-Myc, Bcl-2 등과 같은 발암유전자(oncogene) 또는 종양억제유전자(tumor suppressor gene)가 세포증식 및 자기살해능의 조절에 매우 중요한 역할을한다는 사실이 확인되었다<sup>5,9)</sup>. 이러한 관찰은 세포증식에 관여하는 유전자가 자기살해능의 억제 및 촉진에도 중요한 조절자로서 기능한다는 사실과 세포내의 자기살해능 신호전달체계가 발암유전자와 종양억제유전자 사이의 복잡한 연결망에 의해 구성됨을 시사하고 있다<sup>8)</sup>.

한의학에서 癌은 積聚의 범주에 속하는 것으로, 文 등<sup>10)</sup>은 積聚處方에 대한 문헌고찰에서 效能別로 理氣藥類, 溫熱藥類가 높은 사용빈도를 보이며, 약물로는 靑皮, 陳皮, 三稜, 木香, 蓬朮 등이 多用되고 있음을 보고한 바 있고, 이 가운데 木香은 각종 癌에서 높은 항암활성을 보이는 것으로 나타났다<sup>11,12)</sup>.

또한, 민간에서 肝疾患과 癌치료에 多用하고 있는 車前草는, 위액분비와 위장관 운동조절작용, 항염작용, 항종양작용 등이 입증되었고<sup>13)</sup>, 최근에는 혈당저하작용과 간 손상 회복에 유의한 효능이 있음이 보고되었다<sup>14,15)</sup>.

이에, 본 연구에서는 木香과 車前草의 항암효과를 분자생물학적 관점에서 분석하기 위하여 위암세포주를 대상으로 각 약물이 세포활성, 증식, 자기살해능 등에 미치는 영향을 조사하였으며, 약물의 작용기전을 이해하기 위해 p53을 비롯한 다양한 종양관련 유전자들의 발현에 미치는 영향을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### (1) 약 재

본 실험에 사용한 木香과 車前草는 尙志大學 校 附屬韓方病院에서 嚴選한 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

Herbs	Scientific Name	Dose
木香(Saussurea Radix)	Saussurea lappa CLARKE	550g
車前草(Plantaginis Herba)	Plantago asiatica L.	550g

#### (2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 木香 550g과 車前草 550g을 각각 3차 증류수 4.8 l 로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 증탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1.Alpha/4, Germany)를 이용하여 木香 115.4g, 車前草 82.5g의 건조 추출물을 얻었다.

#### (3) 세포배양

인체 위암세포주 AGS는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하여 DMEM 배지 90%와 우태혈청(fetal bovine serum, FBS) 10% 혼합배지를 이용하여 5%의 CO<sub>2</sub> 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

#### (4) 배양세포에 대한 약물의 처리

동결 건조된 약물은 3차 증류수로 녹인 후 세포배양액을 이용하여 최종 처리농도로 희석하였으며 약 1×10<sup>5</sup>개의 배양 AGS 세포에 처리하였다. 세포증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해서는 각각의 약물을 24시간, 48시간, 72시

간 처리한 후 세포 수를 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. MTT assay를 비롯한 그 외의 실험을 위해서는 각각의 약물을 2×10<sup>4</sup> 개의 세포에 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 처리한 후 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 protein, DNA, RNA를 추출하였다.

### 2. 방 법

#### 1) MTT 반응실험

##### (1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5mg/ml을 PBS(phosphate buffered saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22µm의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1×10<sup>5</sup> 개의 세포를 포함하고 있는 100µl의 세포현탁액에 10µl의 MTT stock solution을 첨가하였다.

##### (2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 세포현탁액을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 보존한 후 100µl의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals를 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570nm에서 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) reader로 OD(optical density)를 측정하였다.

##### (3) 세포활성측정

3차 증류수를 이용하여 각각의 약물을 0.1µg/ml, 0.2µg/ml, 0.5µg/ml, 1.0µg/ml, 5.0µg/ml 농도로 희석한 후 1×10<sup>5</sup>개의 배양 AGS 세포에 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 처리하였고, ELISA를 이용하여 MTT assay를 시행하여 세포활성의 변화를 분석하였다. 세포활성의 측정은 2회에 걸쳐 반복 수행하였으며 그 평균치를 구하여 (Table 2)에 정리하였다.

## 2) 세포증식 분석

### (1) Cell counting by Hemocytometer

$1 \times 10^5$ 개의 AGS 세포에 각각의 약제를 24시간, 48시간, 72시간 처리한 후 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 세포 수를 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. 세포수는 실험을 2회 반복하여 그 평균값으로 하였다.

### (2) [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation Assay

세포의 DNA 복제에 미치는 약물의 영향을 조사하기 위하여 [ $^3\text{H}$ ]thymidine Incorporation Assay를 시행하였다. AGS 세포를  $2 \times 10^4$  cells/well로 24-well multiplates에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 무혈청 배지로 교환함과 동시에 약물을 농도별로 처리하였다. 약물처리 20시간 후에 1.0Ci/ml의 [ $^3\text{H}$ ]thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)를 4시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA 내로 융합된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

## 3) 자기살해능에 대한 분석

### 1) Trypan blue exclusion에 의한 검색

광학현미경을 이용한 자기살해능의 관찰을 위하여 trypan blue 염색을 시행하였다. 세포를 800rpm으로 원심분리하여 회수한 후 4℃의 PBS로  $1 \times 10^5$  cells/ml가 되도록 희석하였다. 0.5 ml의 희석 세포들을 slide에 흡착시킨 후 trypan blue 용액을 첨가하여 염색하였다. Trypan blue로 염색되는 세포를 광학현미경으로 관찰하여 그 수를 측정하였다.

## 4) 定量的 RT-PCR을 이용한 유전자 발현의 分析

### (1) Total cellular RNA의 추출

Total cellular RNA는 배양된 세포로부터 single-step method에 의해 추출하였다. RNA 추출을 위한 solution D는 GSS solution(250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6ml의 0.75M sodium citrate, 26.4ml의 10% sarkosyl 그리고 293ml의 3次 증류수)에 0.1M 농도의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 만들었다. 배양 후 회수된 세포들에 500  $\mu\text{l}$  solution D와 2M의 50  $\mu\text{l}$  sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 vortexing 하였다. 500  $\mu\text{l}$  water-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)을 혼합하여 20초간 vortexing한 후 15분간 얼음에서 방치하였고 20분간 15000rpm으로 원심분리한 후 상층액에 1000  $\mu\text{l}$  cold isopropanol을 혼합하여 -70℃에서 24시간동안 저장한 후 침전시켰다. RNA를 20분간 15000rpm으로 원심분리한 후 RNA pellets를 100% ethanol과 70% ethanol로 세척하였다. RNA는 30  $\mu\text{l}$ 의 RNase-free water에 용해시켰다. 추출된 RNA의 농도는 흡광도 260nm과 280nm에서 spectrophotometric measurement(Schimidzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 측정하였으며, OD(260/280)의 比率 1.0을 40 g/ml RNA로 세팅하여 농도를 결정하였다.

### (2) cDNA의 합성

추출된 1g의 RNA는 MoMuLV(Gibco)와 random hexamer primers를 사용하여 20  $\mu\text{l}$  cDNA로 역전사시켰다. 1  $\mu\text{g}$ 의 추출된 RNA를 2  $\mu\text{l}$ 의 reverse transcriptase buffer, 1  $\mu\text{l}$ 의 random hexamer(10pM), 1  $\mu\text{l}$ 의 MoMuLV-RT (10U/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$ 의 dNTP(10pM), 그리고 0.5  $\mu\text{l}$ 의 RNase inhibitor와 혼합하였다. 이 혼합물은 23℃에서

15분간, 42℃에서 1시간 그리고 95℃에서 5분간 배양하였다. 각각의 RNA로부터 얻어진 2개의 분리된 cDNA는 1:4 또는 1:8로 증류수에 희석하여 PCR 반응에 이용하였다.

### (3) RT-PCR 시행

유전자 발현에 대한 정량적 분석을 위하여 cycle numbers(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, and 42 cycles)를 증가시키면서 연속적으로 희석된 cDNAs (1:0, 1:2, 1:4, and 1:8)에 대한 PCR을 시행하였다. 각각의 cycle은 95℃로 1분간의

denaturation, 58~62℃로 45초간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간의 polymerization으로 구성하였다. 50µl의 PCR 반응에서 12.5~25ng의 cDNA는 26-34cycle을 시행하는 동안 housekeeping standard GAPDH을 포함한 모든 유전자들의 증폭이 대수적으로 증가함이 확인되었다 (Table 1). RT-PCR 産生物은 1시간동안 110V로 2% Agarose gels(FMC, Rockland, ME)를 이용하여 분리하였다. Agarose gels는 30분간 ethidium bromide(0.5g/ml of 1×TBE)로 염색한 후 15분간 1×TBE로 탈색하였다. PCR 産生

**Table 1.** Oligonucleotide Primers used for a Quantitative RT-PCR Analysis

Genes	Primer	Sequences (5' to 3')	Orientation
GAPDH	F	GAACGAGAGTCCGAGATTCG	Sense
	R	TTAGCACAGCATGACGATAT	Antisense
c-Jun	F	GGGCTACCACTCGTTTCATT	Sense
	R	GCTAACTTTAACCTGHACTG	Antisense
c-Fos	F	GACCCTATATGATTGTAAAG	Sense
	R	TTACTGACTCTGCTTTGATC	Antisense
c-Myc	F	AGTTTCCACGAGTCATGAGA	Sense
	R	CCATTTGCTACATTCCCATC	Antisense
Cyclin D1	F	GTTACCCGCTGCTACCTTGA	Sense
	R	TTAGCTCTCGATTGGATCTC	Antisense
p53	F	ACACATCGGCACCCTCGATC	Sense
	R	CACATCGGGATCGAGGACCT	Antisense
p21/Waf1	F	CCACGCTCGTATGCCAATCG	Sense
	R	GGTATCTATCTTACAGACGT	Antisense
p16/INK4a	F	GGCTGCTCTATCTCTACAAT	Sense
	R	CGAGACTCAGCATGGATCGA	Antisense
Bcl-2	F	AGGACTTATCGAGCTTAAAT	Sense
	R	GTGGCCTAGCACTCAGTTAG	Antisense
Bcl-XL	F	GTAGAGCCTGATCATCATAG	Sense
	R	ATGAATTTGCCATTCCGGAA	Antisense
Bax	F	AGAGCGCTTTACGCTCTGAC	Sense
	R	TTTACGACTTAAGCAACTCG	Antisense

物 자외선을 이용하여 可視化한 후 사진촬영하였다. 사진영상의 음영이 깨끗해지도록 증류수에 적시고 나서 건조시켰다. Unspliced RNA 또는 genomic DNA의 PCR 産生物과 spliced mRNA의 PCR 産生物의 감별을 위하여 3' 과 5' primer는 적어도 하나의 intron에 의해 분리되어 각각 다른 exons에 놓여지도록 제작하였다. 각각의 유전자 증폭에 대한 RT-PCR의 특이성은 biotinylated internal oligonucleotides를 이용한 Southern probing analysis로 확인하였다.

#### (4) RT-PCR 産生物의 Densitometric Analysis

유전자 발현에 대한 정량화는 ethidium bromide-stained gels를 laser densitometry로 scanning하여 얻었다. Signal intensity의 측정은 IBM 호환 컴퓨터에서 Molecular Analyst program(version 2.0)을 이용하여 laser densitometer(Bio-Rad)로 실행하였다. RT-PCR 産生物 사진영상의 음영조절부는 지속적으로 scanning하고, 배경의 intensity를 減算한 후 housekeeping gene(GAPDH)의 intensity에 대한 각각의 유전자 발현 intensity의 비율을 계산함으로써 유전자의 발현을 정량화하였다. 각각의 준비된 cDNA는 최소 2회의 정량적 RT-PCR을 반복 시행하였다.

#### (5) 定量的 RT-PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10X amplification buffer	10.0 $\mu$ l
Mixture of dNTP (10pM)	2.0 $\mu$ l
GAPDH primer 1 (10pM)	1.0 $\mu$ l
GAPDH primer 2 (10pM)	1.0 $\mu$ l
Template cDNA	1.0 $\mu$ l
rTaq polymerase	0.4 $\mu$ l

H<sub>2</sub>O

84.6  $\mu$ l

② GAPDH primer를 이용하여 다음의 조건으로 36 cycles PCR반응을 시행 하였다.

#### First cycle

Denaturation	5 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	1 min at 72 $^{\circ}$ C

#### Subsequent cycle (34 cycles)

Denaturation	1 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	1 min at 72 $^{\circ}$ C

#### Last cycle

Denaturation	1 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	10 min at 72 $^{\circ}$ C

③ PCR 産生物은 2% agarose gels에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 분석하였으며 GAPDH에 대한 target 유전자의 상대적인 값을 이용하여 정량화를 시행하였다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. 세포독성 측정을 위한 MTT assay

약물의 항암효과에 대한 분석에 앞서 약물의 과잉투여에 의하여 유발될 수 있는 세포독성과 실험을 위한 적정 투여농도범위의 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다(Table 2). 木香의 경우 1.0  $\mu$ g/ml의 농도에서 세포활성의 저하가 나타나기 시작하여 5.0  $\mu$ g/ml 농도의 경우 뚜렷한 세포활성의 감소가 관찰되었다. 특히 5.0  $\mu$ g/

ml의 농도에서는 처리 24시간 후부터 세포활성의 현저한 감소가 발견되었다. 이에 반하여 車前草의 경우 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 다소의 세포활성 감소를 보였을 뿐 큰 변화는 나타나지 않았다. 본 실험에 사용된 두 약물 모두에서 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리될 경우 세포가 반응을 보이는 반면 세포활성의 급속한 감소나 세포사멸이 인지되지 않은 점에 기초하여 세포주기 및 자기살해능에 미치는 영향에 대한 실험에 적용될 약물의 투여농도는 독성효과를 배제할 수 있는 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위로 결정하였다.

## 2. 세포증식에 미치는 영향에 대한 분석

### (1) 암세포의 증식억제 효과에 대한 분석

木香, 車前草의 抗癌效果에 대한 분석을 위하여 우선 AGS 인체 위암세포의 세포증식에 미치는 각 약물의 영향을 조사하였다.  $1 \times 10^5/\text{well}$  개의 세포에 각각의 약물을 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

및 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 24, 48, 72 시간 처리한 후 세포의 수를 hemocytometer를 이용하여 2회 측정하여 그 평균값을 약물이 처리되지 않은 대조군과 비교하였다 (Table 3).

AGS 세포의 증식은 두 약물에서 모두 대조군과 비교하여 억제되었고, 목향의 경우 차전초에 비해 2배 이상의 억제효과가 관찰되었다. 목향에 의한 AGS 세포증식의 억제는 투여농도에 비례하는 경향을 보여주었다.

### (2) DNA replication 억제효과에 미치는 영향

AGS의 세포분열능력에 대한 영향을 분석하기 위해 각 약물이 DNA replication을 억제하는 기능이 있는지의 여부를 [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation assay를 이용하여 분석하였다. 위 MTT assay와 세포증식 실험결과를 기초로 하여 약물의 투여농도는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 정하였다. 약물처리하는 총 24시

Table 2. Effects of SR and PH on the cellular viability of AGS cells in MTT assay

Drugs( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		6 hr	12 hr	24 hr	48 hr
SR*	0.0	0.454	0.446	0.465	0.459
	0.1	0.448	0.449	0.453	0.454
	0.2	0.455	0.453	0.465	0.432
	0.5	0.457	0.466	0.431	0.422
	1.0	0.460	0.416	0.401	0.387
	5.0	0.454	0.424	0.369	0.304
PH**	0.0	0.454	0.446	0.465	0.459
	0.1	0.446	0.453	0.459	0.464
	0.2	0.455	0.458	0.463	0.454
	0.5	0.456	0.450	0.457	0.442
	1.0	0.461	0.448	0.431	0.425
	5.0	0.457	0.441	0.411	0.407

SR\* : Saussurea Radix, 목향

PH\*\* : Plantaginis Herba, 차전초

**Table 3.** Effects of SR and PH on the proliferation of AGS cells in MTT assay

		(AGS cells × 10 <sup>5</sup> )		
Drugs( $\mu\text{g/ml}$ )		24 hr	48 hr	72 hr
SR*	0.0	1.64	3.02	6.98
	0.5	1.55	2.54	4.99
	1.0	1.32	2.01	3.39
PH**	0.0	1.64	3.02	6.98
	0.5	1.59	2.91	5.94
	1.0	1.57	2.79	5.38

SR\* : Saussurea Radix, 목향

PH\*\* : Plantaginis Herba, 차전초

간 동안 시행하였으며 세포회수 4시간 전에 [<sup>3</sup>H]thymidine을 투여하였고, DNA내에 incorporation된 [<sup>3</sup>H]thymidine의 양을 약물을 처리하지 않은 대조군과 비교하였다 (Table 4). 실험은 2회 반복하였으며 실험간의 오차는 크지 않았다.

AGS 세포의 DNA 합성능은 木香의 경우 2회의 실험 모두에서 車前草에 비해 약 3배의 억제효과를 보였다. 또한 木香이 유도하는 DNA replication의 억제는 투여 농도에 비례함이 관

찰되었다. 車前草 투여군의 경우 목향에 비하여는 낮은 효과를 보였으나, 2회의 실험에서 0.5  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 DNA replication의 억제 현상이 반복적으로 관찰되었다.

### 3. 자기살해능 유발기능에 대한 분석

木香, 車前草의 자기살해능 유발효과 유무를 분석하기 위하여 약물 투여에 의한 AGS 세포의 자기살해능 유발을 trypan blue exclusion assay를 이용하여 조사하였다. 약물은 0.1 $\mu\text{g/ml}$ , 0.2 $\mu\text{g/ml}$ , 0.5 $\mu\text{g/ml}$ , 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 72시간 투여하였으며 2,000개의 세포를 조사하여 자기살해능이 일어난 세포의 수를 대조군과 비교하였다 (Table 5). 실험은 2회 반복하였으며 실험간의 오차는 크지 않았다.

자기살해능의 유발은 木香 투여군에서 관찰된 반면, 車前草 투여군에서는 관찰되지 않았다. 자기살해능의 유발은 木香 투여군에서 처리 농도에 비례하는 경향을 보여주었다.

**Table 4.** Effects of SR and PH on the inhibition of DNA replication in [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay (cpm)

Drugs( $\mu\text{g/ml}$ )		0.0	0.1	0.2	0.5	1.0
SR*	Exp.*** 1	23500	21400	20500	17400	14500
	Exp. 2	22600	21100	19600	17100	13700
PH**	Exp. 1	23500	23900	22700	21100	20300
	Exp. 2	22600	22400	22400	20800	20200

SR\* : Saussurea Radix, 목향

PH\*\* : Plantaginis Herba, 차전초

Exp.\*\*\* : experiment



**Table 5.** Apoptosis of SR or PH-treated AGS cells analyzed by trypan blue exclusion assay

Drugs( $\mu\text{g/ml}$ )	(apoptotic cells/total cells)					
	0.0	0.1	0.2	0.5	1.0	
SR*	Exp.*** 1	82/2000	94/2000	143/2000	172/2000	266/2000
	Exp. 2	79/2000	92/2000	139/2000	159/2000	244/2000
PH**	Exp. 1	82/2000	83/2000	88/2000	87/2000	83/2000
	Exp. 2	79/2000	77/2000	84/2000	84/2000	88/2000

SR\* : Saussurea Radix, 목향

PH\*\* : Plantaginis Herba, 차전초

Exp.\*\*\* : experiment

#### 4. 세포증식 조절 유전자 발현에 미치는 영향

세포증식억제와 자기살해능 유발효과가 관찰된 현재까지의 결과에 기초하여, 본 약물에 의한 이러한 세포학적 현상이 유전자의 발현의 변화에 의하여 야기될 가능성을 파악하기 위해 정량적 RT-PCR을 통한 유전자 발현분석을 수행하였다. 대조군 및 약물이 처리된 AGS 세포로부터 RNA를 추출하고 이로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 c-Jun, c-Fos, c-Myc, Cyclin D1, p53, p21/Waf1, p16/INK4a

transcripts를 RT-PCR을 통해 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물 10ml를 2% agarose를 이용한 전기영동을 통해 분리하였으며 densitometry를 이용하여 정량화하였다. 각 유전자의 발현수준은 동일 시료에서 관찰된 GAPDH 유전자의 발현량에 대한 비율로 결정하였다.

약물의 투여농도는 위의 실험들을 통하여 세포독성을 보이지 않으면서 세포분열의 억제와 자기살해능 유도에 영향을 미치는 것으로 확인된 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 정하였고, 24시간 및 48시간 처리 후 유전자 각각의 발현에 대한 분석을 수행하였으며 동일한 과정을 2회 반복 실시하여 재

**Table 6.** Quantitative RT-PCR analysis of cell cycle-related genes

Genes	Control		SR*		PH**	
	0 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	
c-Jun	1.00	0.88	0.65	0.94	0.91	
c-Fos	1.00	0.90	0.72	0.95	0.92	
c-Myc	1.00	0.85	0.61	1.01	0.88	
Cyclin D1	1.00	0.79	0.54	0.96	0.85	
p53	1.00	1.39	1.52	1.01	1.02	
p21/Waf1	1.00	1.24	1.44	1.03	1.05	
p16/INK4a	1.00	1.02	1.04	1.01	1.05	

SR\* : Saussurea Radix, 목향

PH\*\* : Plantaginis Herba, 차전초

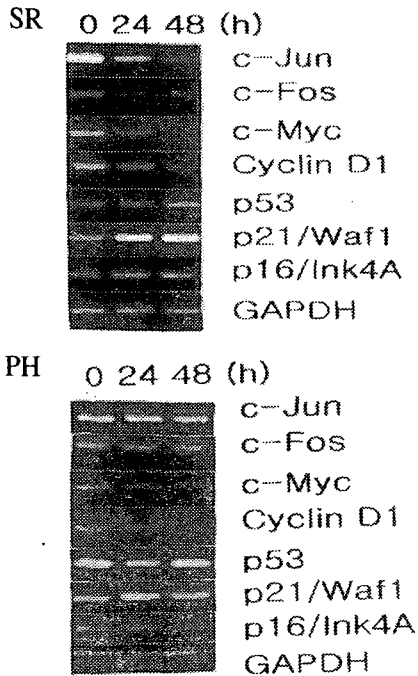


Fig. 1. Expression of cell cycle-related genes by quantitative RT-PCR analysis

현성이 높은 결과를 얻었다. 먼저 약물의 세포분열 억제효과와 유전자 발현과의 상관성을 파악하기 위하여 세포분열주기의 촉진을 유도함으로써 종양세포의 증식을 촉진하는 것으로 잘 알려진 c-Fos, c-Jun, c-Myc, Cyclin D1 유전자와 세포분열을 억제함으로써 종양의 성장을 억제하는 p53, p21/Waf1, p16/INK4a 유전자의 발현이 약물의 투여에 의하여 변화하는 양상을 분

석하였다(Table 6, Fig. 1).

木香의 경우 세포분열을 촉진하는 것으로 잘 알려진 c-Jun, c-Fos, c-Myc, Cyclin D1, 유전자의 발현이 모두 감소함이 발견되었으며 특히 종양억제 유전자로 잘 알려진 p53과 p53 기능의 매개자로서 세포분열 억제기능을 가진 p21/Waf1 유전자의 발현 증가가 관찰되었다. 車前草 투여군에서는 c-Jun, c-Fos, c-Myc, Cyclin D1 유전자 발현이 다소 감소함이 관찰되었으나 p53 및 p21/Waf1의 변화는 나타나지 않았다. 木香에 의한 유전자 발현의 변화는 투여시간에 비례하였다. p16/INK4a 유전자의 발현에서는 변화가 관찰되지 않았다.

## 5. 자기살해능 조절 유전자 발현에 미치는 영향

자기살해능의 유발을 억제하는 기능을 통하여 종양발생을 촉진하는 것으로 잘 알려진 대표적인 유전자인 Bcl-2 및 Bcl-XL과 자기살해능의 유발을 촉진함으로써 종양발생을 억제하는 것으로 알려진 Bax 유전자의 발현이 약물의 투여에 의하여 변화하는 양상을 분석하였으며, 위 4와 동일한 방법으로 시행되었다.(Table 7, Fig.2)

木香의 경우 Bax의 발현이 투여 시간에 따라 뚜렷이 증가하는 경향을 보이는 반면 Bcl-2와

Table 7. Quantitative RT-PCR analysis of apoptosis-related genes

Genes	Control		SR*		PH**	
	0 hr	24 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Bcl-2	1.00	1.05	1.02	1.02	1.04	1.03
Bcl-XL	1.00	0.98	0.99	0.99	1.00	1.02
Bax	1.00	1.36	1.88	1.88	1.03	1.02

SR\* : Saussurea Radix, 목향

PH\*\* : Plantaginis Herba, 차전초

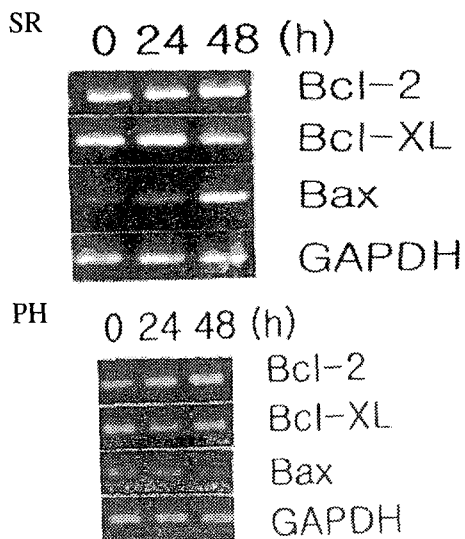


Fig. 2. Expression of apoptosis-related genes by quantitative RT-PCR analysis

Bcl-XL 유전자의 변화는 관찰되지 않았다. 車前草 투여군에서는 세 유전자 모두에서 특이할 만한 변화가 관찰되지 않았다.

#### IV. 고 찰

항약제의 항암효과 및 면역증강효과가 실험적으로 높은 유효성이 입증되고 있는 가운데, 최근들어 자연살해세포(natural killer cell)의 활성화와 면역세포의 감수성 및 활성물질분리 등의 연구에서 점차 자기살해능과 종양관련 및 세포주기관련 유전자 발현 등의 분자생물학적 차원의 연구가 활성화 되고 있는 실정이다.

康<sup>12)</sup>은 각 항약제가 선택적으로 항암활성을 가지고 있어, 각기 다른 癌腫에 대해 개별적 효능을 가짐을 제시하였고, 이 연구에서 吳茱萸, 木香, 黑丑은 모든 세포주에 대해 높은 항암활성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 또한, 康<sup>16)</sup>은 인체 위암세포주에 대한 수종 항약제의 항

암활성에 대한 연구에서 오수유가 가장 높은 저해활성을 보인다고 보고하였으며, 한국한의 학 연구원에서 數種 한약재의 위암세포에 대한 항암작용 효능검색 및 약리작용에 대한 분자생물학적 연구를 통해, 斑蝥의 강력한 암세포 증식억제효과와 살상효과를 입증한 바 있다<sup>17)</sup>.

세포 활성도를 측정하는 MTT법은 1983년 Mosmann<sup>18)</sup>에 의해 처음 시도되었는데 1986년 Cole<sup>19)</sup>이 사용하면서 최근에는 널리 보급되었다. MTT는 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue이며, 100mg, 250mg, 500mg 등 다양한 용량의 yellow water soluble tetrazolium 염색으로 세포의 생존도에 따라 MTT-formazan 양이 달라지는데, MTT법은 이를 적절한 용매에 작용하여 spectrophotometer로 세포의 생존능력을 측정하는 방법이다. 본 실험에서는 약물의 과잉투여로 유발될 수 있는 세포독성을 배제하고, 실험을 위한 적정투여농도의 범위를 결정하기 위해 시행되었다.

세포주기(cell cycle)는 전통적으로 G1(gap1), S(DNA synthesis), G2(gap2), M(mitosis)의 4기(phase)로 구분한다. G1기는 특별한 세포주기 변화가 발생하지 않은 시기로 대부분의 분열되지 않은 세포는 G1기에 속하며, S기는 핵에 있는 유전정보를 가진 DNA의 복제가 이루어지는 시기로 한 개의 염색체에서 두 개의 염색체가 되는 시기이고, G2기는 필요로 하는 세포질 인자들이 생산되면서 한 개의 세포가 두 개의 세포로 분열되는데 필요한 모든 인자들이 생성되는 시기이며, M기는 세포의 분열이 일어나면서 세포벽이 생기고 한 개의 세포에서 두 개의 세포로 나누어지는 시기이다. 그리고 대다수의 세포에서 이러한 세포주기 과정은 G1에서 조절된다. G1기에서 세포가 충분히 성장하고 여러 가지 다른 조건이 만족스러우면, 이들

세포는 점차 비역행적으로 분열하게 되는데, 이러한 “되돌아오지 못하는 지점”을 commitment point라 하며 진행세포의 세포주기를 결정하는 중요부위이다.

자기살해능은 세포 위축, 염색체 압축을 특징으로 하는 새로운 형태의 세포사망으로 세포의 팽창, 세포막의 붕괴, 세포내 물질의 유출 등으로 인해 주위에 염증반응을 일으키는 괴사(necrosis)와는 다르며 손상되거나 불필요해진 세포를 생명체가 자발적으로 제거하여 생명체를 보존하기 위한 현상으로 밝혀지고 있다<sup>20</sup>. 그리고 한때 자기살해능이 세포를 제거하는 역할이 강조되어 programmed cell death라 알려져 왔지만 programmed cell death 이외의 상황에서 발생하기도 하며, 현재는 stress, virus 등 다양한 원인과 조건에서 나타나는 자기살해능에 대한 분자생물학적 분석과 임상양상과의 상호 연관성이 연구되고 있다<sup>21</sup>. 자기살해능은 여러 가지 유전자 산물에 의해 조절되는데 현재 자기살해능 유발유전자, 자기살해능 억제유전자, 자기살해능 매개유전자들이 밝혀지고 있다<sup>22</sup>.

p53은 대표적인 종양억제 유전자로서 세포 증식, 분화, 유전체의 안정성, 자기살해능 등의 조절에 관여한다<sup>5-8</sup>). p53의 세포증식억제기능은 p53의 유전자 전사조절기능에 기인하는 것으로서 세포분열의 조절에 관여하는 Waf1, MDM2, c-Myc 등의 유전자 promoter에 직접 결합하여 이 유전자의 전사를 직접적으로 활성화함이 확인되었다<sup>23-28</sup>). 이러한 p53의 DNA 결합 특성과 유전자 전사조절기능은 약 50% 이상의 인체 암세포에서 p53 유전자 돌연변이로 인하여 상실되어 있음이 발견되었다<sup>6</sup>). 이와함께 p53은 interleukin-6, Bcl-2, MDR2 와 같은 여러 유전자의 발현을 억제하는 전사 억제자의 기능도 가지고 있으며 이 경우 TATA-binding protein, Sp1 등과 같은 다른 조절인자와 결합하

여 해당 유전자에 존재하는 p53-dependent negative response element를 통해 기능함이 관찰되었다<sup>7,8,29-32</sup>). p53에 의한 MDR1 발현의 억제는 p53과 chemotherapy resistance와의 관련성에 대한 기존의 관찰을 뒷받침하고 있다. MDR1 유전자에 의하여 생성되는 P-glycoprotein은 membrane efflux pump로 기능하여 Adriamycin 등을 포함한 DNA 손상유발물질의 세포내 축적을 억제함으로써 chemoresistant phenotype을 유도함이 알려져 있다<sup>33</sup>). 따라서 p53은 다양한 유전자의 발현을 조절함으로써 세포내 세포증식과 자기살해능의 신호전달체계를 조절하는 중요한 유전자라 할 수 있다. DNA 손상에 의해 유도된 세포내 p53의 축적은 세포증식을 억제하고 자기살해능을 유발하게 되며 이를 통해 세포는 손상된 DNA를 수복(repair)하고 과도하게 손상된 세포를 제거함으로써 돌연변이의 계속적인 축적을 차단하게 되어 결과적으로 종양의 발생을 억제하게 된다고 믿어지고 있다<sup>27,28</sup>). p53에 의해 유도된 세포성장억제는 세포성장의 분자적 지표인 histone H3 또는 PCNA의 감소와 연관되어 있다<sup>34-36</sup>). 또한 세포분열의 초기화를 촉진하는 c-Myc의 발현이 p53에 의하여 억제됨이 관찰되었으며, 최근 저산소증이 p53의 발현을 촉진함으로써 세포분열이 억제되고 자기살해능이 촉진된다는 사실이 확인되었다.

p21/Waf1 (CIP1)은 p53에 의하여 그 발현이 촉진되는 대표적인 유전자로서 cyclin-dependent kinase를 억제하는 기능을 통해 p53의 세포증식 억제기능을 실질적으로 매개하는 중요한 인자이다<sup>37,38</sup>). p21/Waf1 유전자의 전사는 정상적인 p53에 의하여 크게 촉진되며 이러한 현상은 p21/Waf1 유전자의 upstream 약 2.4 kb 부분에 위치하는 p53 binding element를 통하여 일어난다<sup>39</sup>). p53에 의한 p21/Waf1의 유도는

세포증식의 억제 또는 자기살해능의 유발로 이어지며 antisense p21/Waf1 mRNA를 이용하여 p21/Waf1의 발현을 억제시킬 경우 세포분열주기가 다시 활성화됨이 발견되었다<sup>37-40</sup>).

Bcl-2는 분자량 26kD으로 Fas Ag과 TNF receptor를 매개로 하는 자기살해능을 차단하며 자기살해능 과정의 중요 유전자인 Cpp32의 활성을 저지하고 Bcl-2를 과발현시키면 자기살해능을 억제하여 세포수명이 연장되는 것이 알려져 있다<sup>41</sup>). Bax는 Tumor suppressor로 p53 mediated 자기살해능을 자극하며 chemotherapy로 유발되는 자기살해능에서 증가한다<sup>42-44</sup>). 또한, Bax는 Bcl-2와 유전자 염기서열이 비슷하여 Bcl-2 family에 속하는데, Bcl-2 family중 Bcl-2, Bcl-XL은 자기살해능을 억제하고 Bcl-Xs, Bax, Bak, Bad는 세포사를 증진시키는 것으로 알려져 있다<sup>45</sup>). 그리고, Bcl-2 family는 homodimers와 heterodimers의 두 형태로 존재하며 heterodimers는 Bcl-2/Bax와 같이 자기살해능 억제유전자와 촉진유전자의 결합형태를 나타낸다. 그러므로, 만약 single Bax가 활성화되면 자기살해능을 촉진하여 세포사가 증가하고 single Bcl-2가 활성화되면 자기살해능을 억제하여 세포사가 줄어들게 되므로 Bcl-2와 Bax의 발현은 세포가 자기살해능으로 진행될 때 감수성을 결정하게 된다<sup>46,47</sup>).

RT-PCR은 전통적으로 특정 유전자의 RNA 분석에 사용된 Northern blot의 문제점을 극복한 방법으로 미량의 RNA만으로도 특정 유전자의 분석이 가능하고 민감도가 뛰어나서 최근 대부분의 분자생물학적 연구에 사용되어지고 있다<sup>48</sup>). 본 실험에서는 표준 RNA를 이용하여 역전사가 일어나게 하고 cDNA를 차례로 회석하고 각각을 PCR로 증폭하여 densitometer로 정량화 하였다<sup>49</sup>).

본 연구를 통하여 木香은 p53을 비롯한 세포

분열 및 자기살해능 조절 유전자들의 전사에 영향을 미침과 두 약물들의 항암효과가 이들 유전자의 발현양상에 대한 영향과 강한 연관성이 있음이 확인되었다. 특히, 木香은 세포주기를 억제하고 자기살해능을 촉진하는 대표적인 종양억제유전자인 p53과 p53 기능의 매개자인 p21/Waf1 유전자의 발현을 크게 촉진함이 확인되었다. p53의 종양억제 기능은 p53의 유전자 조절기능과 밀접하게 연관되어 있음이 잘 알려져 있다<sup>9,23,24</sup>). 본 연구에서도 木香 투여군에서 p53의 증가와 p53에 의하여 그 전사가 유도되는 p21/Waf1의 발현촉진이 관찰됨으로써 이와 같은 관련성을 확인할 수 있었다. 따라서, 木香에 의한 p53의 발현증가는 木香 투여에 의하여 유도된 AGS 세포의 증식억제가 Cyclin/CDK 억제자로 기능하는 p21/Waf1에 의하여 매개되었을 가능성을 강하게 시사하는 것으로 이해된다. 그러나, 車前草 투여군에서는 木香에 비해 그 작용들이 현저히 떨어졌다.

이와 함께 木香의 투여는 c-Fos, c-Jun, c-Myc과 같은 세포분열을 촉진하는 발암유전자의 발현을 억제함이 관찰되었으며, 이는 기존의 연구에 의하여 확인된 p53에 의한 c-Myc 발현의 억제와도 연관된 현상으로 판단된다<sup>5</sup>. 따라서, 木香에 의한 세포증식억제는 c-Fos, c-Jun, c-Myc의 억제에 의한 G1 cell cycle arrest일 가능성이 높다고 판단되며 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation 실험결과도 이를 강하게 뒷받침하고 있다.

한의학에서 癌腫은 인체의 臟腑陰陽氣血이 失調한 데에 外感邪氣와 七情內傷, 飲食失調, 過勞, 房勞過度의 致病因素가 痰凝, 濕聚, 氣滯, 血瘀, 毒蘊 등의 病理因素와 결합하여 발생하는 것으로 보고 있다. 특히, 胃癌은 噎膈, 反胃의 범주에 속하며 氣結, 痰滯를 주된 병리기전으로 하여 발생하게 된다<sup>50</sup>).

木香은 辛苦溫한 性味와 行氣止痛, 健脾消食, 止痢의 효능을 가진 理氣藥類의 대표적인 약물이고, 車前草는 止瀉藥類인 車前子의 全草로서 甘寒한 性味の 車前子보다 清熱解毒作用이 양호하고, 熱證의 出血 또는 皮膚瘡毒에 우수한 효능을 가진 것으로 알려져 있어<sup>51)</sup>, 木香과 車前草는 效能과 性味 모두에서 차이를 보임을 알 수 있다.

癌에 대한 한의학적인 病因病理와 積聚의 치료처방 가운데 理氣藥類, 溫熱藥類가 가장 많음을 감안할 때, 본 실험에서 木香과 車前草의 항암효과의 차이가 木香의 性味와 理氣效能에 기인할 가능성을 고려해 볼 수 있다. 또한, 木香이 거의 모든 암세포주에 대해 높은 항암활성을 가지는 것으로 관찰되었으나, 한약제가 선택적으로 항암활성을 가지고 있음을 고려할 때, 다른 理氣藥物들의 항암효과에 관한 연구역시 수반되어야 할 것으로 사료되며, 이는 한의학적인 性味, 效能과 항암효과 사이의 상관성을 입증해 줄 것으로 본다.

결론적으로 본 실험결과는 木香의 항암효과가 세포분열주기의 억제 및 자기살해능의 촉진과 깊은 관련을 가지고 있으며, 이러한 현상은 木香에 의한 p53, p21/Waf1을 비롯한 관련 유전자의 전사조절에 기인하는 것임을 강하게 시사하고 있다.

## V. 결 론

木香과 車前草가 위암세포의 활성, 증식, 자기살해능 및 세포주기관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하고자 MTT assay, [3H] thymidine incorporation assay, Tryphan blue exclusion, 정량적 RT-PCR을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay의 결과에서 세포주기 및 자기살해능에 미치는 영향에 대한 실험에 적용될 약물의 투여농도는 木香과 車前草 모두 약물의 독성효과를 배제할 수 있는 0.1~1.0 $\mu$ g/ml 범위가 적절한 것으로 나타났다.
2. MTT assay와 [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay의 결과 木香과 車前草 투여군에서 모두 암세포의 증식과 DNA 합성을 농도 $\propto$ 프 맛 $\propto$ 막 $\propto$  억제하였고, 목향의 경우 차전초 투여군보다 큰 억제효과를 나타냈다.
3. Tryphan blue exclusion assay의 결과 木香 투여군에서 apoptotic cells의 농도의존적인 증가를 보였고, 車前草 투여군에서는 변화를 보이지 않았다.
4. 정량적 RT-PCR의 결과 木香 투여군에서 세포분열촉진유전자 c-Jun, c-Fos, c-Myc, Cyclin D1이 투여시간에 비례하여 감소하였고, 세포분열억제유전자 중 p53, p21/Waf1이 투여시간에 비례하여 증가하였으며, p16/INK4a는 변화를 보이지 않았다. 또한, 車前草 투여군에서는 세포분열촉진유전자가 다소 감소하였으나, 세포분열억제유전자는 변화를 보이지 않았다.
5. 정량적 RT-PCR의 결과 木香 투여군에서 자기살해능 촉진유전자 Bax가 투여시간에 비례하여 뚜렷이 증가하였고, 車前草 투여군에서는 자기살해능 촉진 및 억제유전자 발현의 변화가 보이지 않았다.

이같은 결과에서 木香의 抗癌效果가 세포분열주기의 억제 및 자기살해능의 촉진과 깊은 관련을 가지며, 이는 p53, p21/Waf1을 비롯한 관련 유전자의 전사조절에 기인하는 것임을 알 수 있으므로, 木香을 암치료 약물로 널리 활용할 수 있는 근거를 제시한 것이라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. 金聖勳 : 韓醫學界의 癌研究動向과 研究戰略에 대한 研究, 서울, 대한한의학 회지, 19(1): pp.470~499, 1998.
2. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.10~11, 201, 1998.
3. Collins M. K. L. and Rivas, A. L. The control of apoptosis in mammalian cells. Trends in Cell Biology, 18: 307-309, 1993.
4. Williams G. T. and Smith, C. A, Molecular regulation of apoptosis : genetic controls on cell death. Cell, 74: 777-779, 1993.
5. Levine, A. J. The p53 tumor suppressor gene and product. Cancer Surveys, 12: 59-79, 1992.
6. Lane, D. P. p53, guardian of the genome. Nature (Lond.), 358: 15-16, 1992.
7. Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J. C. Identification of a p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. Cancer Res., 54: 3131-3135, 1994.
8. Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., kimchi, A., and Oren, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. Nature (Lond.), 352: 345-347, 1991.
9. Wang, E., Lee, M.-J., and Pandey, S. control of fibroblast senescence and activation of programmed cell death. J. cell. Biochem., 54: 432-439, 1994.
10. 문구 · 조성각 : 積聚 處方에 대한 文獻的 考察, 서울, 대한한방종양학회지, 2(1): pp.113~160, 1996.
11. 李瑞衡 : 癌細胞 增殖抑制에 대한 木香 및 良薑 추출물의 영향연구, 서울, 고려대학교 대학원, 1981.
12. 康坼林 : 數種 韓藥材의 抗癌活性 研究, 대전, 대전대학교 한의과 대학 논문 집, 3(2): pp.315~321, 1995.
13. 김창민 · 신민교 · 이경순 · 안덕균 외: 완역 중약대사전, 서울, 도서출판 정담, pp.5209~5213, 1998.
14. 김정인 : 차전초 수침액이 실험적 당뇨와 간기능 손상에 미치는 영향, 대구, 대구가톨릭대학교 보건과학대학원, 2000.
15. 백경연 : 질경이, 썸바귀 및 뽕잎의 열수 추출액이 흰쥐의 간 손상 회복에 미치는 영향, 대구, 대구가톨릭대학교 대학원, 2000.
16. 康坼林 : 인체 위암세포주 SNU-1에 대한 수종 한약재의 항암활성, 대전, 대전대학교 한의과 대학 논문집, 4(1): pp.445~448, 1995.
17. 한국한의학연구원 보고서 : 수종한약재의 위암세포에 대한 항암작용 효능검 색 및 약리작용에 관한 분자생물학적 연구, 서울, 한국한의학연구원, 1999.
18. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of immunologic methods, Vol. 65, No. 1-2, pp. 55-63, 1983.
19. Cole S. P.: Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, Cancer chemother Pharmacology, 17(3): 259 - 263, 1986.
20. Wyllie A. H.: apoptosis, Br. J. Cancer, Vol. 67: 205-208, 1994.
21. Solary E, Dubrez L, Eymin B: The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases, Eur Respir J, 9(6): 1293-305, 1996.

22. Sen S.: Programmed cell death: concept, mechanism and control., *Biol Rev Camb Philos Soc*, 67(3): 287-319, 1992.
23. Zambetti, G., Bargonetti, J., Walker, K., Prives, C., and Levine, A. J. Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev.*, 6: 1143-1152, 1992.
24. Weintraub, H., Hauschka, S., and Tapscott, S. J. The MCK enhancer contains a p53 responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:4570-4574, 1991.
25. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. Mdm-2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO*, 12: 461-468, 1993.
26. Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science (Washington DC)*, 256: 827-830, 1992.
27. Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., and Fornace, A. J., Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71: 587-597, 1992.
28. Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M., and Oren, M. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9979-9983, 1991.
29. Mack, D. H., Vartikar, J., Pipas, J. M., and Laimins, L. A. Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature (Lond.)*, 363: 281-283, 1993.
30. Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J., and Shenk, T. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 12028-12032, 1992.
31. Borellini, F. and Glazer, R. I. Induction of Sp1-p53 binding heterocomplexes during granulocyte macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *J. Biol. Chem.*, 268: 7923-7928, 1993.
32. Chin, K.-V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by ras and p53. *Science (Washington DC)*, 255:459-462, 1992.
33. Kane, S. E., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22: 593-618, 1990.
34. Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J. W., and Ullrich, S. J. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6166-6170, 1990.
35. Flores-Rozas, H., Kelman, z., Dean, F. B., Pan, Z.-Q., Harper, J. W., Elledge, S. J., O'donnell, M., and Hurwitz, J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8655-8659, 1994.
36. Mercer, W. E., Shields, M. T., Lin, D., Appella, E., and Ullrich, S. J. Growth



- suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1958-1962, 1991.
37. El-Deiry, W. S., Harper, J. W., O' Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Brrrell, M., Hill, D. E., Wang, Y, Wiman, K. G., Mercer, W. E., Kastan, M. B., Kohn, K. W., Elledge, S. J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Waf1/Cip1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 54: 1169-1174, 1994.
  38. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75: 805-816, 1993.
  39. El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75: 817-825, 1993.
  40. Nakanishi, M., Adami, G. R., Robetorye, R. S., Noda, A., Venable, S. F., Dimitrov, D., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. Exit from G0 and entry into the cell cycle of cells expressing p21Sdi1 antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4352-4356, 1995.
  41. Itoh N, Tsujimoto Y., Nagata S.: Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death, the journal of immunology, Vol. 151, No. 2, pp. 621 -627, 1993.
  42. Schlesinger P.H., Gross A., Yin A.M., Yamanotó K., Saito M., Waksman G., Korsmeyer S.J.: Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2, *proc. natl.Acad. Sci. USA*; Vol. 94, No. 21, pp. 11357-11362, 1997.
  43. Tu Y., Feng-hao Xu., Jin Liu, Versco R., Berenson J., Fady C. and Lichtenstein A. : Upregulated Expression of Bcl-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to Doxorubicin, Etoposide, and Hydrogen peroxide, *Blood*, Vol. 88, No. 5, pp. 1805-1812, 1996.
  44. Lisovsky M., Estrov Z., Zhang X., Consoli U., Sanchez-Williams G., Snell V., Munker R., Goodacre A., Savchenko V. and Andreeff M. : Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells : Regulation of Bcl-2 and Bax, *Blood*, Vol. 88, No. 10, pp. 3987-3997, 1996.
  45. Findly H. W., Gu L., Yeager A. M. and Zhou M.: Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xL, Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, Vol. 89, No. 8, pp. 2986-2993, 1997.
  46. Strobel T., Swanson L., Korsmeter S. and Cannistra S. A.: BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 14094-14099, 1996.
  47. Yin C., Knudson C. M., Korsmeyer S. J. and Van-Dyke T.: Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo, *nature*, Vol. 385, pp. 637-640, 1997.
  48. Ferre F. : Quantitative or semi-Quantitative

- PCR : reality versus myth, PCR Methods and Applications, Vol. 2, pp. 1-9, 1992.
49. Wang A. M. W., Doyle M. V., and Mark D. F. : Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, No.24, pp. 9717-9721, 1989.
50. 全炳旭, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠 : 癌腫의 病因病理에 대한 文獻的 考察, 서울, 대한한방종양학회지, 1(1): pp.83~101, 1995.
51. 辛民教 : 原色 臨床本草學, 서울, 영림출판사, pp.387~388, 585~586, 1988.