

## 肺癌細胞株 H460에 對한 補中益氣湯의 細胞枯死效果 및 機轉研究

이승언, 홍재의, 이시형\*, 신조영, 노승석

원광대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 원광대학교 한의학 전문대학원\*

### Study on Apoptosis Effect and Mechanism by Bojungikki-tang on Human Cancer Cell Line H460

Seung-Eon Lee, Jae-Eui Hong, Si-Hyeong Lee\*, Jo-Young Shin, Seung-Seok Ro

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University\*

**Objectives** : This study was designed to evaluate the effect on cytotoxicity of Bojungikki-tang(BIT) in human lung cancer H460 cells.

**Methods** : BIT-induced cell death was confirmed as apoptosis characterized by chromatin condensation and increase of the sub-G<sub>1</sub> DNA content. It was tested whether the water extract of BIT affects the cell cycle regulators such as, p21/Cip1, p27/Kip1, cyclin B<sub>1</sub>.

**Results** : The data showed that treatment of BIT decreased the viability of H460 cells in a dose-dependent manner. p21/Cip1 is gradually decreased by the addition of the cells with BIT extract. Interestingly, p27/Kip1 is not detected for 24 hr after the addition of BIT extract, however, after 24 hr, p27/Kip1 markedly increased. In addition, cyclin B<sub>1</sub> decreased in a time dependent manner after the addition of the water extract.

The activation of caspase -3 protease was further confirmed by degradation of procaspase-8 protease and poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) by BIT in H460 cells. Moreover, BIT induced the increase of Bak expression.

**Conclusion** : These results suggest that the extract of BIT exerts anticancer effects to induce the death of human lung cancer H460 cells via down regulation of cell cycle regulators such as p21/Cip1, and cyclin B<sub>1</sub> or up regulation of cell cycle regulators such as p27/Kip1. Moreover results suggest that BIT induces an apoptosis in H460 cells via activation of intrinsic caspase cascades.

**Key Words**: Bojungikki-tang(BIT), human lung cancer H460 cells, apoptosis

### 1. 緒 論

癌이란 人體內 조직의 자율적인 過剩成長으로 개체에 이롭거나 도움이 되지 않을뿐더러 정상조직에 대해서 破壞적인 영향을 끼친다. 산업발달에 따라 癌의 發生率은 점차 증가하는 실정이며, 아직까지 癌

發生要因이나 機轉은 명확히 밝혀져 있지 않다<sup>1,2</sup>.

최근 癌治療를 위한 抗癌劑로서의 韓藥劑의 效果에 대한 研究가 많이 보고 되고 있다<sup>3-8</sup>. 본 실험에 사용된 補中益氣湯은 金元四大家 중의 한 사람인 李東垣의 創方으로 東垣十書 中 <內外傷辨惑論> 및 <脾胃論>에 처음 수록된 處方<sup>9</sup>으로 勞役太甚이나 飲食失節로 인한 中氣不足 혹은 中氣下陷의 病理狀態로 유발되는 諸症狀에 활용되도록 立方되었으나<sup>10,11</sup>, 실제 臨床에서는 더욱 廣範圍하게 응용되고 있다.

細胞의 成長과 分化는 細胞週期(cell cycle)에 의

· 접수 : 2004. 10. 19 · 채택 : 2004. 11. 5  
· 교신저자 : 노승석, 대구광역시 달서구 두류 3동 495-3  
노환의원  
(Tel. 053-622-4182  
E-mail : nss@wonkwang.ac.kr)

해 조절되는데 이 과정에는 細胞週期 調節因子 (cyclin A, B, C, D, E 등)가 특이적인 단백질의 발현을 통해 細胞週期를 조절한다. 또한 細胞週期調節은 成長 및 분열하는 細胞뿐만 아니라 손상된 DNA 복구와 細胞枯死(apoptosis)에 있어 매우 중요한 역할을 수행한다<sup>12-15</sup>.

細胞枯死(apoptosis)는 多細胞 生命體에서 정상적인 器官의 發達과 組織의 恒常性 維持에 必須적인 生理現象의 하나인 細胞豫定死(programmed cell death)를 말하는 것이며<sup>16</sup>, 一般的으로 細胞枯死현상은 빠른 細胞脫水現象에 의한 細胞의 收縮, 細胞膜의 氣泡化 現象(blebbing), 細胞質內的 칼슘(calcium) 濃度の 增加, chromatin의 凝縮, endonuclease의 活性化에 의한 DNA의 사다리 模樣的 分節 (ladder pattern of DNA fragmentation)形成, transglutaminase의 活性化 및 核의 切斷과 아포토틱 소체 (apoptotic body)의 形成을 同伴한다<sup>17</sup>. 최근에 잠정적으로 유해한 細胞들을 제거하거나, 細胞豫定死(programmed cell death), 즉 細胞枯死의 회피가 癌을 포함하는 各種 疾病의 發病原因으로 해석하는 견해가 대두되고 있다.

한편 抗腫瘍 效果의 作用機轉이 細胞枯死에 의존한다는 사실이 밝혀져 더욱 細胞枯死 신호전달계의 기능변화를 통한 抗癌治療의 效能을 높이려는 研究에 관심이 모아지고 있다. 특히 癌治療를 위해 사용되고 있는 방법들(手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法)은 癌種에 따른 감수성, 治療 後의 경과와 副作用이 각기 다르며 이에 따른 많은 문제점

이 있어, 癌治療의 效果를 높일 수 있는 다양한 研究에 관심이 모아지고 있다.

전통적으로 癌治療에 사용되어온 韓藥劑 中에서 細胞枯死 신호전달계를 활성화 시킬 수 있는 韓藥劑의 效能과 機轉 研究는 癌治療에 대단히 유용한 것이다.

이에 著者는 韓醫學에서 正氣虛弱에 多用되고 있는 補中益氣湯을 사람의 肺癌에서 유래된 H460癌細胞에 처리하여 여러 細胞週期關聯 단백질들(cyclin B1, p21/Cip1, p27/Kip1)의 變化양상을 관찰하였으며, 細胞枯死 신호전달계에 미치는 影響을 究明하기 위해, caspase family cysteine protease-8 및 Bak 단백질 발현 양상을 분석하여 유의한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

補中益氣湯의 處方內容은 許浚의 <東醫寶鑑><sup>10</sup>에 依據하였으며, 實驗에 사용한 藥材는 Table 1에 나타난 바와 같이 8가지 藥材로 구성된 處方이며 圓光大學校 附屬 益山韓方病院에서 구입하였다.

#### 2) 檢液調製

實驗에 使用된 藥材는 물 抽出物 (H<sub>2</sub>O extract)로 陰乾된 補中益氣湯 100g을 물 1ℓ와 함께 冷却器를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로

Table 1. Prescription of *Bojungikki-tang* (BIT)

藥名	生藥名	重量(g)
黃芪	<i>Radix Astragali</i>	6.0
人蔘	<i>Radix Ginseng</i>	4.0
白朮	<i>Rhizoma Atractylodis Mactrocephalae</i>	4.0
甘草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	4.0
當歸	<i>Racix Angelicae Glgantis</i>	2.0
陳皮	<i>Pericarpium Citri Nobilis</i>	2.0
升麻	<i>Rhizoma Cimicifugae</i>	1.2
檀柴胡	<i>Radix Bupleuri</i>	1.2
Total amount		24.4 g

濾過하고 3,200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器 (Rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70°C(Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고, Freeze Dryer로 凍結乾燥 시킨 것을 試料로 使用하였다.

### 3) 試藥 및 機器

RPMI 1640, 항생제, 및 trypsin은 Gibco BRL社 (Grand Island, NY, U.S.A.)에서, 牛胎兒 혈청은 Hyclones社(Logan, Utah, USA)에서 구입하여 사용하였다. 배양 용기(48-well plate, 10 cm dish)는 Falcon社(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Bak, caspase-8, 8 p20, PARP, cyclin B, p21, p27 등에 대한 항체는 Santa Cruz社(San Diego, CA, U.S.A.)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham社(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. Tetrazolium bromide(MTT) 및 Hoechst 33342은 Sigma社(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

### 4) 細胞株

사람의 肺癌으로부터 由來한 H460細胞는 ATCC社(USA)에서 구입하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) H460 肺癌由來 癌細胞柱 培養

사람 肺癌으로부터 由來된 癌細胞柱인 H460는 CO<sub>2</sub>細胞배양기에서(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 10% 牛胎兒 혈청이 포함된 RPMI- 1640 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하여 주며, log phase에 있는 細胞에 다양한 농도의 韓藥劑를 처리한 후 細胞의 죽음을 관찰하고, 이에 연관된 生化學的 實驗을 수행하였다.

### 2) 細胞 生存率 測定

細胞의 生存率은 MTT assay 방법을 이용하였다. 簡記하면 세포배양판(48-well plate)에 細胞를 1×10<sup>5</sup> 씩 1ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 실험에 필요한 각 조건의 韓藥材 등을 처리한 다음, MTT를 최종농

도 100 μg/ml가 되도록 넣어주었다. 生存率의 판정은 MTT 처리 후 4시간 후에 살아있는 細胞에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 μl의 10% SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 細胞배양기에서 방치하여 녹인 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) Hoechst 염색

細胞核의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H460 細胞에 韓藥劑를 처리한 후 細胞를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 2회 세척하였다. 細胞는 paraformaldehyde 용액(3.7%)으로 실온에서 10분간 고정한 후, 10μM Hoechst 33342 용액으로 실온에서 20분 염색하고 다시 PBS로 세척하였다. 염색된 細胞는 형광 현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

### 4) Flow cytometry에 의한 sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>분획의 분석

細胞枯死의 현상을 확인하기 위하여 위해 propidium iodide(PI)로 DNA를 염색한 후에 FACS Vantage flow cytometry를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. H460 細胞에 韓藥劑를 처리한 후 일정 시간 후에 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척된 細胞는 PBS 300ul를 넣고, 細胞의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20μg/ml PI, 200μg/ml RNase) 600ul를 넣어 20분간 반응시킨 후 1 × 10<sup>6</sup> 細胞를 FACS Vantage flow cytometry로 sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>으로 나타나는 細胞枯死를 분석하였다. 얻어진 정보의 분석은 Cell Quest software(Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

### 5) Western blotting

배양된 H460細胞에 韓藥劑를 처리한 일정 시간 후에 細胞를 채취하여, cold Hank's balanced salt solution(HBSS)로 2회 세척하였다. 얻은 細胞는 total cell lysate를 얻기 위하여 RIPA 용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSH, 1 μg/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 細胞 부유액에 2 ×

sample buffer와 섞어 98℃에서 5분간 끓인 후, 12.5 % sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4℃, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking(5% skim milk)로 상온에서 1시간 동안 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. PARP, Bak, caspase-8, 8 p20, 및 β-actin 등에 대한 항체를 Tris-buffered saline에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 4시간 반응시킨 후, 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase(TBS로 1:3000으로 희석)와 상온에서 2시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

6) Nuclear extract 준비

核 抽出物(nuclear extract)에 있는 細胞週期 관련 인자(cyclin B<sub>1</sub>), p21, 및 p27의 발현양상의 변화를 측정하기 위하여 먼저 藥材가 처리된 H460 細胞에서 Jeong<sup>18</sup> 등의 방법(1997)에 따라 核 抽出物을 얻었다. 요약하면, H460細胞는 200 μM PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 20 μM pepstatin A, 100 μM leupeptin 및 100 μM antipain이 들어 있는 저삼투압 용해용액과 10분간 얼음에서 팽창시킨 후 NP-40를 0.1% 되도록 반응시킨 다음 2,500 rpm에서 원심 분리하

여 細胞質液만을 버렸다.

7) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과와 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05(p < 0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 實驗 結果

1. 補中益氣湯이 肺癌由來 H460 癌細胞의 細胞生存率에 미치는 影響

補中益氣湯 抽出物이 肺癌由來 H460 細胞의 生存率에 어떤 영향을 미치는가 알아보기 위하여 먼저 補中益氣湯의 농도를 변화시키면서 細胞生存率을 MTT방법으로 측정하였다. 補中益氣湯이 50 μg/ml 이하의 농도에서는 H460 細胞의 生存率에는 유의한 변화가 없었으나 75 μg/ml의 補中益氣湯을 처리한 다음 48시간 후 細胞生存率이 20% 감소하였고, 150 μg/ml 처리시에는 35%, 300 μg/ml 처리시에는 38%, 600 μg/ml 처리시는 40%, 1200 μg/ml 처리시에는 55% 이상 감소하였다(Fig. 1). 이와 같은 결과로부터 補中益氣湯 抽出物의 肺癌由來 H460細胞의 生存率에 效果를 갖는 농도는 600 μg/ml임을 알 수 있었다.

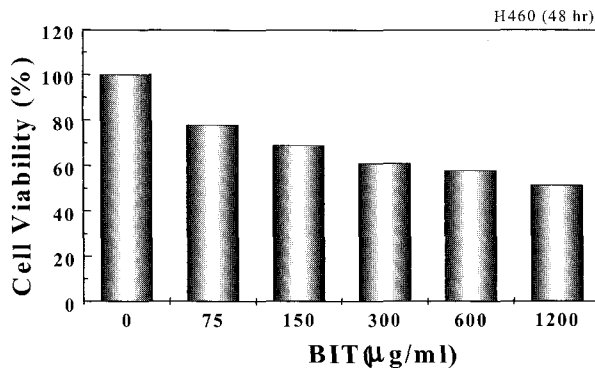


Fig. 1. The Effects of BIT on the viability of H460 cells in a dose dependent manner. H460 cells were treated with various concentrations(from 75 to 1200 μg/ml) of H<sub>2</sub>O extract of BIT. After 48 hr later, the cells were tested for viability by MTT assay. The data represented mean + S. D. of triplicates.

2. 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460 癌細胞 枯死時 細胞 죽음을의 성격 규명

補中益氣湯 抽出物에 의한 細胞 죽음이 細胞枯死 機轉에 의하여 매개될 가능성이 제시 되었기에<sup>4</sup>, 細胞枯死 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여

H460 細胞의 DNA분절을 Hoechst염색으로 확인하였다. H460細胞에 補中益氣湯 抽出物(600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 48시간처리 후 Hoechst 염색을 시행한 결과, 補中益氣湯 抽出物을 처리하지 않은 H460細胞群의 핵은 타원형의 온전한 형태의 균질한 형광 염색을 나타

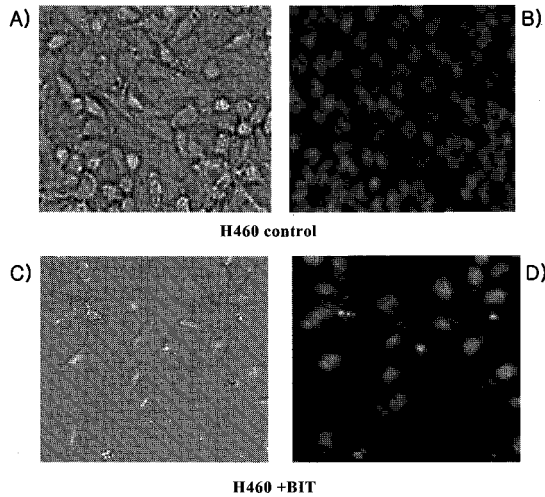


Fig. 2. BIT induced the nuclear fragmentation of H460 cells. Cells were treated with 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BIT for 48 hr, stained with Hoechst 33342 dye and observed by fluorescence microscope.

A, B ; Control cells (H460 cells)., C, D: H460 +BIT.

C, D : Cells were stained with Hoechst 33342 dye and visualized under a fluorescence microscope.

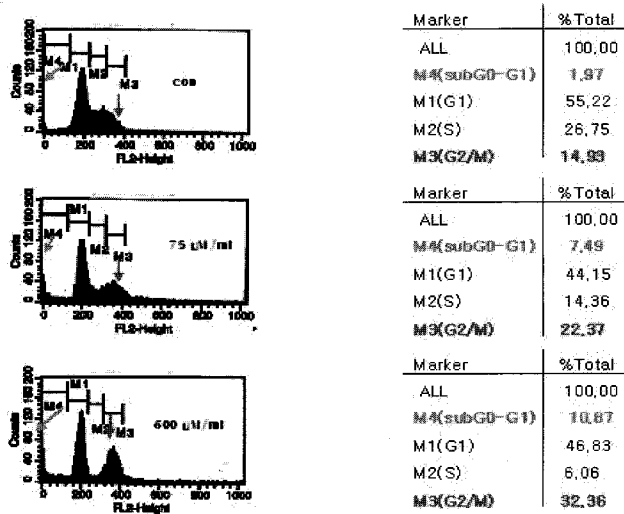


Fig. 3. BIT increased sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fraction in H460 cells

Cells were treated with 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BIT for 48 hr. Then, cellular DNA were stained with PI staining solution and analyzed by flow cytometry.

났다. 하지만 補中益氣湯 抽出物 처리군은 細胞의 數에서도 減少를 보이지만, 核이 여러 조각으로 분절된 형광 절편을 나타내었다(Fig. 2). 또한, H460 細胞에 補中益氣湯(600 $\mu$ g/ml)을 처리 하고 細胞核을 PI로 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 sub-G1 DNA 分획을 조사하였다. 대조군의 sub-G0/G1 DNA 分획은 1.97%였으나, 600 $\mu$ g/ml의 補中益氣湯을 처리한 실험군은 10.87%로 증가하였다(Fig. 3). 이러한 결과로부터 補中益氣湯에 의한 H460 細胞毒性은 細胞枯死 機轉에 의하여 매개됨을 시사하였다.

3. 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460 癌細胞 枯死時 p21/Cip1蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

p21Cip1/WAF1 유전자는 이 유전자에 의해 만들어진 단백질이 cyclin dependent kinase 2(CDK2)와 반응하는 물질로 처음 밝혀졌다. 이러한 p21/Cip1은 細胞週期の negative regulator로서 뿐만 아니라 細胞枯死에도 중요한 연관이 있다고 보고되고 있다. 따라서 본 실험에서는 補中益氣湯 抽出物 처리에 의한 p21/Cip1의 시간별 발현양상 변화를 측정함으로써 이들이 역할을 究明하고자 하였다. 補中益氣湯 抽出物을 다양한 시간동안 처리하여 細胞를 포집한 후 核 抽出物만을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착 등을 거친 후 p21/Cip1에 대한 항체를 사용하여 western

blotting을 시행하였다. p21/Cip1 단백질은 補中益氣湯 抽出物 처리 6시간부터 서서히 감소하기 시작하였으며, 36시간 후에는 처음 양의 70-80% 이상이 감소하였다(Fig. 4).

4. 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460 癌細胞 枯死時 p27/Kip1蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

p27Kip1 단백질은 접촉억제(contact inhibition)에 의하여 휴지기에 있는 細胞나 transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 를 처리한 細胞에서 negative growth regulator로서의 역할을 하는 것으로 밝혀졌다<sup>19</sup>. 본 실험에서는 補中益氣湯 抽出物 처리에 의한 p27의 시간별 발현양상 변화를 측정함으로써 이들이 補中益氣湯 抽出物이 처리된 H460 細胞의 細胞週期 변화 과정 중에서의 역할을 究明하고자 하였다. 補中益氣湯 抽出物을 다양한 시간동안 처리하여 細胞를 포집한 후 核 抽出物만을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착 등을 거친 후 p27에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. 흥미롭게도 p21과는 달리 p27 단백질은 補中益氣湯 抽出物 처리 12시간 후까지는 단백질의 존재가 대조군과 거의 변화를 보이지 않다가 24시간 후 서서히 증가하였으며, 48시간째에 최고 발현을 보이고 있다(Fig. 5).

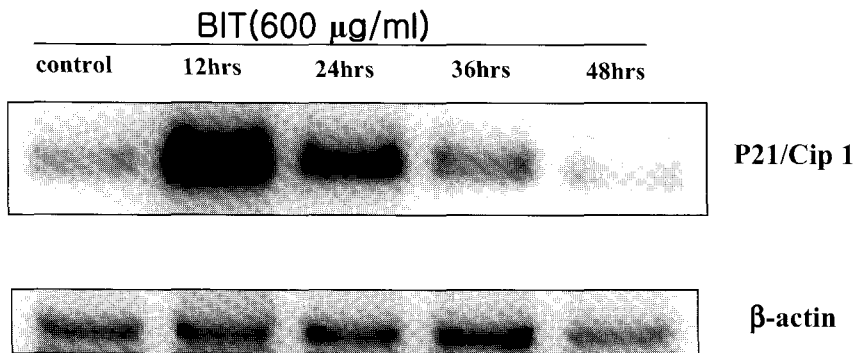


Fig. 4. BIT markedly decreased the level of p21/Cip1 in a time dependent manner. The H460 cells were treated with 600  $\mu$ g/ml of water extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-p21 antibody.

5. 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460 癌細胞 枯死時 cyclin B1 蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

Cyclin은 CDK와 더불어 細胞週期를 조절하는 인자로서 현재 30여종의 cyclin 유전자들의 sequence가 밝혀져 있다. 動物細胞에서는 8종류의 cyclin 즉, cyclin A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E가 밝혀져 있다. 이들은 G1 및 G2期에서 S 및 M期로의 細胞週期진행을 조절하는 주인자로서 G1 cyclin, G2 cyclin으로 분류된다. 이들 cyclin은 주관하는 정상적인 細胞週期에서 최대로 發現되어 CDK와 더불어 S期 및 M期로 진행되는데 필요한 인자를 활성화하며 일단 그 역할이 끝나면 cyclin은 분해되어 없어진다. 본 실험에서는 補中益氣湯 抽出物 처리에 의한 cyclin

B<sub>1</sub>의 시간별 發現양상 변화를 측정함으로써 이들이 補中益氣湯 抽出物이 처리된 H460細胞의 細胞週期 변화 과정 중에서의 역할을 究明하고자 하였다. 補中益氣湯 抽出物을 다양한 시간동안 처리하여 細胞를 포집한 후 核 抽出物만을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착 등을 거친 후 cyclin B<sub>1</sub>에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. Cyclin B<sub>1</sub>단백질은 補中益氣湯 抽出物 처리 24시간 후부터 서서히 감소하기 시작하였으며, 36시간 후에는 대략 처음 發現량의 50% 이하로 현저하게 감소하였다(Fig. 6).

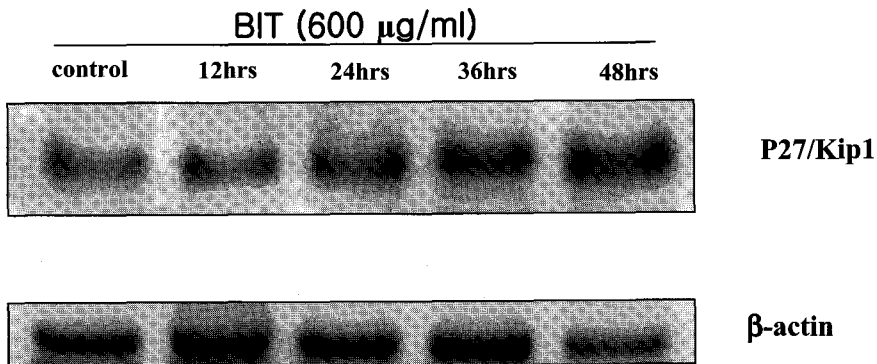


Fig. 5. BIT markedly increased the level of p27/Kip1 in a time dependent manner. The H460 cells were treated with 600 µg/ml of the extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-p27 antibody.

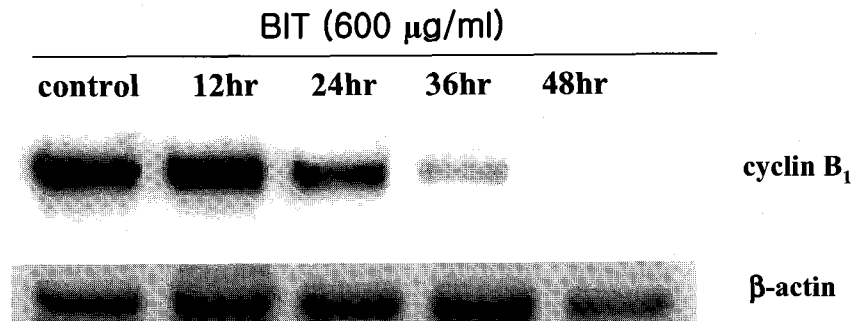


Fig. 6. BIT markedly decreased the level of cyclin B<sub>1</sub> in a time dependent manner. The H460 cells were treated with 600 µg/ml of water extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-cyclin B<sub>1</sub> antibody

6. 補中益氣湯 抽出物이 caspase protease의 활성화에 미치는 영향

補中益氣湯 抽出物에 의한 H460 細胞枯死현상이 細胞枯死 신호전달의 중요한 분자인 caspase family cysteine protein 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 procaspase-8, caspase-8 p20 단백질 발현 정도를 조사하였다. 補中益氣湯 抽出物 처리 24시간 후에 procaspase-8 protease의 현저한 분해가 관찰되

었다(Fig. 7). 이러한 결과는 initiator caspase인 caspase -8은 pro-form이 절단되어 활성화 되어 caspase -3 protease의 활성을 유도했음을 시사한다.

7. 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460 癌細胞 枯死時 PARP 蛋白質의 절단에 미치는 影響

補中益氣湯 抽出物에 의한 細胞枯死 유도현상이 細胞死 신호전달계의 중요한 caspase-3 protease의

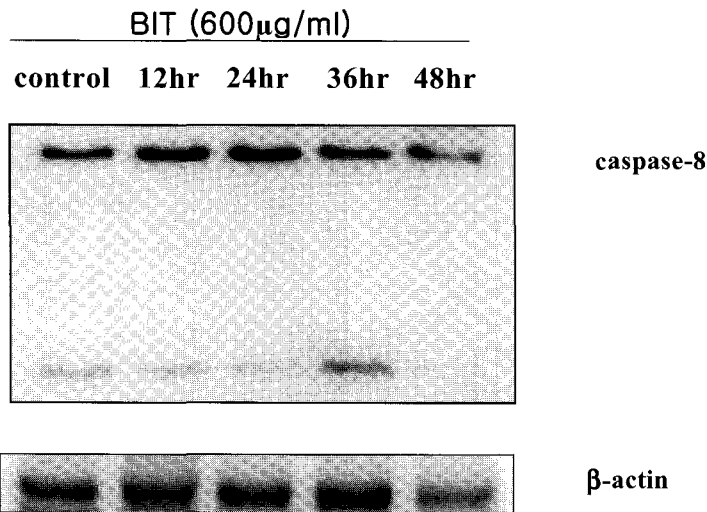


Fig. 7. BIT cleaved procaspase-8 protease in H460 cells  
Cells were treated with 600  $\mu$ g/ml BIT for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-procaspase-8 protease, anti-caspase-8 p20 protease antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

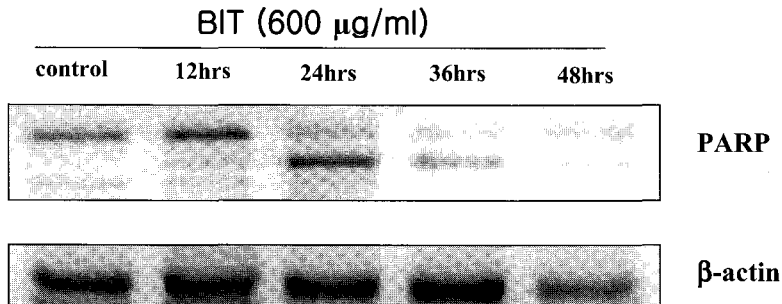


Fig. 8. BIT cleaved PARP in H460 cells  
Cells were treated with 600  $\mu$ g/ml BIT for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane an immunoblotted with anti-PARP antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL.



주요 표적인자인 PARP의 절단 여부를 H460 細胞株에서 조사하였다. 補中益氣湯 600  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 후 시간에 따라 H460 細胞를 채취, 분쇄한 細胞부 유액의 PARP 분자를 anti-PARP 항체를 이용한 western blotting을 시행하였다(Fig. 8). 補中益氣湯 처리 24시간 후의 실험군에서부터 PARP 절단 분절이 관찰되었다. 이러한 결과는 補中益氣湯(600  $\mu\text{g/ml}$ )의 처리가 caspase-3-protease의 활성을 유도하였으며, 이 결과로 인하여 細胞내 PARP 단백질의 분절이 초래되어 H460細胞의 細胞枯死에 기여하였으리라 판단된다.

8. 補中益氣湯 抽出物이 H460細胞株의 Bak 단백질 발현에 미치는 영향

細胞枯死을 조절하는 관여하는 중요한 유전자 산물이 Bcl-2 단백질군이다. 본 실험에서는 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460 細胞枯死에 있어 Bak 단백질의 발현 변화를 조사하였다. H460細胞는 600  $\mu\text{g/ml}$  補中益氣湯을 12시간, 24시간, 36시간 그리고 48시간 처리한 후, 細胞를 포집하여 파쇄액내 Bak 단백질 발현을 Western blotting 방법으로 조사하였다. 그 결과 Bak 단백질 발현에 補中益氣湯은 시간의존적으로 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 9). 이러한 결과는 補中益氣湯이 pro-apoptotic한 기능으로 細胞

死滅을 촉진하는 Bak 단백질의 증가를 유도하여, H460 細胞枯死에 기여하였으리라 판단된다.

IV. 考 察

癌이라 부르는 惡性腫瘍은 개체를 구성하는 正常細胞가 여러 가지 자극에 의해 遺傳子의 形質轉換이 일어나 생물학적 성상이 다른 비정상적인 細胞가 발생하여 생체내 조절기능에 지배를 받지 않고 점점 과잉으로 증식되어 신체에 無益하고 害를 끼치는 것을 말한다. 현재까지도 發生原因과 機轉에 대해서는 명확히 알려지지 않은 상태이다<sup>20,21</sup>.

癌은 韓醫學에서 七情內傷, 過勞, 邪毒, 飲食不節 및 外感六淫 等の 原因으로 人體의 陰陽氣血이 失調되어 正氣虛弱, 氣滯血瘀, 痰結濕聚 및 熱毒蘊結 等の 病理變化가 나타나고 이런 변화가 單獨 或은 結合되어 發生하는 疾病으로 理解할 수 있다<sup>22,23</sup>.

여기서 正氣虛弱은 癌發生의 중요한 內的 要因이 되며, 이는 西洋醫學에서의 免疫機能低下에 該當된다고 볼 수 있다. 免疫系統의 監視機能이 低下되면 正常細胞가 癌細胞로 轉變되는 것을 防止하지 못하며, 癌細胞의 增殖을 抑制하지 못하게 되는데, 이는 韓醫學에서 “正氣虛則成巖”<sup>24</sup>의 概念과 一致한다고 볼 수 있다.

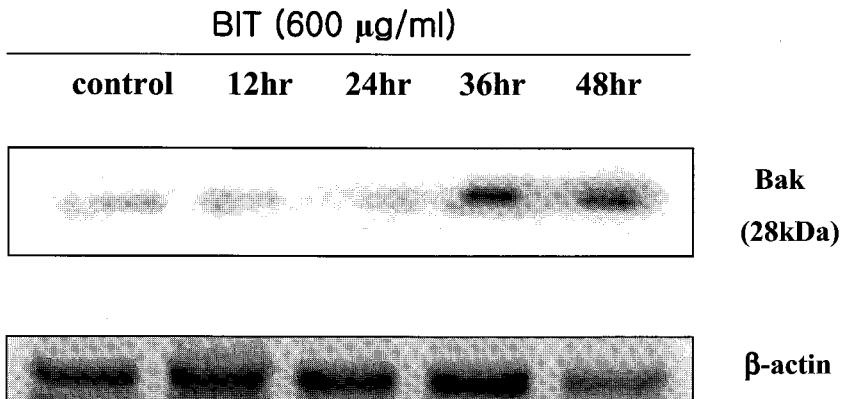


Fig. 9. BIT induced the expression of Bak protein in H460 cells. Cells were treated with 600  $\mu\text{g/ml}$  BIT for the indicated periods. The same amounts of protein from lysates were subjected on 12.5% SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with Bak antibody. The immunoreactive bands were visualized by ECL kit.

韓醫學에서 癌의 治法으로는 健脾益氣, 養血滋陰, 滋補肝腎, 滋陰溫陽, 理氣和血 등의 扶正培本法과 活血化痰, 化痰軟堅, 清熱解毒, 行氣散結, 以毒攻毒 등의 祛邪法, 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法으로 대별하는데 病程에 따라 初期에는 祛邪法을, 中期에는 扶正祛邪를, 末期에는 扶正培本을 治療原則으로 한다. 그 중에서 人體의 抗癌能力을 強化시켜주는 扶正培本法과 祛邪하되 人體의 正氣를 補益하고 正氣를 손상시키지 않는 扶正祛邪法을 가장 효과적인 방법으로 보고 있다.<sup>25,26</sup> 肺癌의 治療에서도 初期에는 解毒散結, 活血化痰 등의 祛邪法을 사용하나 末期에 가까울수록 滋陰清肺, 溫陽益氣 등의 扶正培本法을 사용한다.<sup>27</sup>

현재 西洋醫學에서 癌治療의 대표적인 방법으로는 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法, 遺傳子療法 등을 사용하는데 이 중 手術療法과 放射線療法은 癌이 全身에 轉移, 增殖되기 전에 실시함으로써 效果를 거둘 수 있는 局所的인 治療法으로 制限性이 있다. 肺癌治療의 경우 肺癌의 특성상 진단이 된 경우 手術療法은 전체환자의 1/4~1/5에서만 가능하고 또한 放射線治療과 더불어 局所的인 치료 방법에 해당하여 制限性이 있고, 再發率도 높은 편이다. 免疫療法과 遺傳子療法도 치료방법이 연구중에 있고 완전히 定立되어 있지 않기 때문에 현재로는 전신적인 化學療法이 주로 사용되고 있다.<sup>27</sup> 그러나 免疫療法은 正常細胞의 損傷을 最少化 하면서 既存의 治療方式과 다르게 癌을 攻擊할 수 있다는 점에서 높은 效果가 기대되고 있다.<sup>28-31</sup>

최근에는 기존의 이러한 治療法의 보완으로 西洋醫學에서는 溫熱療法을 이용하고 있는데, 溫熱治療은 조직학적 종류에 관계없이 惡性腫瘍細胞의 殺傷에 대단히 效果의이며, 특히 放射線 治療 또는 抗癌劑治療과 병용시 단독치료의 효과에 비해 약 1.5~2 배 정도의 상승효과가 있으며, 국소관해율의 현저한 증가가 있다고 보고되고 있다.<sup>32</sup> 뿐만 아니라 韓醫學에서는 기존 西洋醫學의 副作用을 보완하기 위해 免疫機能強化와 抗腫瘍效果의 검증을 위한 韓方藥物의 실험연구가 이루어지고 있다.<sup>3-8</sup>

肺癌에 있어서 免疫治療은 내부방어계통의 기능을 향상시킴으로써 癌의 성장과 확산을 저지시키는 작용을 한다. 免疫治療과 韓醫學에서의 扶正治療은 대단히 유사한 부분이 많다. 扶正藥物들은 특히 網狀內皮系統에 대한 作用이 현저한데 종류로는 補氣藥, 滋陰藥, 清熱解毒藥 등으로 모두 생체 면역기능을 향상시키는 작용을 한다.<sup>27</sup>

補中益氣湯은 金元四大家 중의 한 사람인 李東垣의 創方으로 東垣十書 中 <內外傷辨惑論> 및 <脾胃論>에 처음 수록된 處方<sup>9</sup>으로 勞役太甚이나 飲食失節로 인한 中氣不足 혹은 中氣下陷의 病理狀態로 유발되는 諸症狀에 활용되도록 立方되었으며, 이 후 여러 醫家들이 李東垣의 立方 취지에 따라 각종 慢性, 虛弱性 疾患에 사용되어 왔고<sup>10,11</sup>, 그 適應證은 脾胃氣虛로 인한 食少, 神疲, 畏寒, 自汗, 發熱, 脈虛大無力, 中氣下陷, 內臟下垂 및 不能攝血崩漏 등 症을 治療한다 하였으며, 실제 臨床에서는 正氣虛弱으로 인한 諸疾患을 治療하는데 광범위하게 응용되고 있다.

최근 補中益氣湯을 이용하여 免疫機能強化와 抗腫瘍效果의 검증을 위한 실험연구로는 李<sup>33</sup>의 補中益氣湯加味方이 抗癌效果와 mitomycin C의 細胞毒性에 미치는 影響, 金<sup>34</sup>의 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 韓<sup>35</sup>의 補中益氣湯, 手拈散 및 補中益氣湯合手拈散의 抗癌과 免疫調節作用에 관한 實驗的 研究 등이 報告되고 있으며, 이에 著者는 임상에서 正氣虛弱에 많이 활용되는 補中益氣湯의 肺癌細胞枯死 신호전달계를 활성화 하는 機轉에 대한 研究를 시행하였다.

최근 연구에 의하면 洋方에서 흔히 사용되는 많은 抗癌劑들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 細胞株에서 細胞枯死를 유도함이 밝혀져 있고, 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ ceramide경로, 즉 발현 초기유전자(early immediate gene)발현 등이 관

여하는 것으로 보고되고 있다<sup>12-15,19,36-49</sup>. 한편 각종 자극에 의해 이러한 細胞枯死가 유도되면서 여러 가지 細胞週期 조절인자의 변화 역시 수반된다고 알려져 있다. 따라서 본 研究에서는 補中益氣湯 抽出物에 의해 유도되는 細胞枯死에서 細胞週期調節 인자들의 발현 변화를 조사함으로써 補中益氣湯의 抗癌 效果에 대한 분자생물학적 기전의 이해를 유추하고자 하였다.

먼저 이러한 補中益氣湯 抽出物이 H460細胞에 직접적으로 細胞죽음을 야기하는지를 알아보기 위하여 抽出物을 농도별로 처리한 결과 농도 의존적인 H460細胞의 죽음을 초래하는 細胞毒性 效果를 나타내었다(Fig. 1). 또한 補中益氣湯 抽出物 처리에 의한 H460細胞의 죽음은 DNA fragmentation, caspase 활성화 등이 수반되는 細胞枯死 過程에 의한 細胞죽음임을 확인하였다(Fig. 2). 최근 여러 研究들에 의해 細胞枯死때에 細胞週期調節의 변화가 수반된다는 것이 보고 되어 있어 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460細胞 죽음 시 나타나는 細胞週期 조절인자들(cyclin B<sub>1</sub>, p21/Cip1, 및 p27/Kip1)의 발현 양상을 단백질 수준에서 조사하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 細胞週期和 관련하여 의미있는 결과는 p21/Cip1 및 p27/Kip1의 상반적인 발현양상 변화이었다. p21은 CDK2와 반응하는 단백질로서 처음 알려졌으며, wild type p53의 활성화에 의해 발현이 유도 되어진다<sup>22-26</sup>. 이렇게 발현된 p21은 p21의 N-terminal 부위를 통해 G1 cyclin-CDK 복합체와 결합하여 cell cycle 진행을 방해하며, p21의 c-terminal 부위를 통해 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)에 결합하여 PCNA에 의한 DNA polymerase δ의 활성화를 저해한다고 보고되고 있다<sup>46,47</sup>. 최근에 p21/Cip1이 apoptosis 細胞를 보호할 수 있는 또 다른 중요한 기능이 보고 되었다. 예로서 Gorospe 등은 p21/Cip1이 인간 흑색종(melanoma cells)細胞의 p53매개성 apoptotic 細胞죽음을 저지할 수 있음을 보고하였다<sup>48</sup>. Zhang 등은 p21/Cip1이 caspase-3에 의하여 cleavage되며, 이때 이 p21/Cip1은 PCNA에 binding하는 능력을 상실하며, 또한 핵속

에 위치하는 능력을 상실하게 된다고 報告하였다<sup>47</sup>. 따라서 이들은 caspase-3에 의하여 잘려진 p21/Cip1은 癌細胞를 growth arrest 상태에서부터 細胞枯死를 진행하는 상태로 전환시켜 癌細胞의 chemotherapy-induced apoptosis를 촉진시킬 수 있다고 報告하였다<sup>45</sup>. 본 研究에서도 p21/Cip1의 발현은 補中益氣湯 抽出物 처리 후 시간의존적으로 감소되는 것을 관찰하였다. 이것은 앞서 언급된 선행연구자들의 研究내용에 비교하여 설명해 보면 핵속의 p21/Cip1 역시 補中益氣湯 抽出物 처리 시 이루어지는 apoptotic death signal 전달과정의 일환으로 활성화되는 caspase-3 등에 의해 절단되어 cell cycle를 arrest 할 수 있는 效果를 상실하며, 또한 ask1에 부착할 수 있는 능력이 상실되어 ASK1/SEK1/JNK1 등의 일련의 細胞枯死를 촉진시키는 신호전달과정을 활성화시키는 것으로 사료된다.

한편 p27/Kip1 역시 다양한 cyclin과 CDK의 복합체의 활성화를 저해함으로써 G1에서 S phase로의 전이를 조절하는 중요한 細胞週期調節인자이다. p27유전자가 결여된 생쥐의 경우 성장이 촉진되며, 다양한 기관의 이상증식(hyperplasia), pituitary tumor의 자연 발생 등이 나타나고 있다<sup>44</sup>. 또한 Fugieda 등은 p27의 발현은 Bax 등의 발현을 촉진시킴으로써 oral 및 oropharyngeal carcinoma 등에서 일어나는 spontaneous 細胞枯死에 밀접한 연관이 있다고 보고하였다<sup>28</sup>. 따라서 이러한 선행연구자들의 결과는 본 研究에서 관찰된 補中益氣湯 抽出物에 의한 p27/Kip1의 발현증가(Fig. 5)는 癌細胞 細胞죽음에 밀접하게 관련되어 있음을 시사한다. 보다 흥미로운 것은 동일하게 CDK inhibitor로 작용하는 p21/Cip1 및 p27/Kip1이 補中益氣湯 抽出物에 의한 癌細胞枯死時 그 발현이 상반되게 나타나는 것이다. 이는 아마도 이 調節인자들이 細胞週期 調節이외의 또 다른 기능을 수행하리라 사료된다. 또한 CDK와 더불어 細胞週期 조절인자인 cyclin에 속하는 cyclin B<sub>1</sub>의 발현양은 24시간 처리군에서부터 감소가 일어나, 48시간 처리군에서 현저하게 감소되었다(Fig. 6). 이러한 결과로부터 24시간 이후부터 그 역할이

줄어 들어 48시간에 완전히 분해되어 사라짐을 알 수 있었다.

補中益氣湯에 의한 細胞毒性이 細胞枯死 현상임을 확인하는 細胞枯死의 주요 작용기전의 하나인 caspase family cysteine protease의 활성화 여부를 조사하였다. 1986년 Ellis 및 Horvitz에 의하여 nematoid *C. elegans*에서 *ced-3* 및 *ced-4*의 mutation이 細胞枯死를 억제한다는 보고 이래로 *ced-3*의 mammalian homologue인 ICE가 clone되었으며 이는 후에 caspase-1 protease로 명명되었고<sup>50</sup>, 이후에 약 14종류의 caspase family cysteine protease의 subfamily가 밝혀져 있으며 이들 유전자는 cysteine 期만을 선택적으로 절단하는 단백질분해효소 (protease)를 coding하고 있다<sup>51</sup>.

Caspase-3 protease는 mammalian *ced-3* homologue로서 ICE라고도 알려져 있으며, 細胞質에서는 proenzyme 형태로 존재한다. Proenzyme 형태의 caspase-3 protease는 caspase-8 및 9 같은 initiator caspase에 의하여 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환된다. 細胞枯死 과정에서 caspase-3 protease의 細胞內 표적인자로는 protein kinase C(PKC), lamin, 및 PARP 등이 알려져 있으며, endonuclease의 활성화도 caspase-3 protease의 활성화에 의존적이라고 알려져 있다<sup>50</sup>. 본 研究에서는 caspase-3 protease의 활성화의 특성을 알아보고자 이미 알려진 initiator caspase인 caspase-8의 발현양상과 PARP 발현도를 조사하였다. Initiator caspase인 caspase-8은 pro-form이 절단되어 활성화되고 이는 caspase-3 protease의 활성을 유도한다. 본 研究에서도 initiator인 caspase-8의 발현의 증가를 보여 caspase-3 활성화와 관련이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 또한 Caspase-3 protease의 細胞內 표적인자인 PARP의 발현도에 있어서도 補中益氣湯 처리 후 24시간 경과시부터 PARP 단백질이 분절되어 나타났다(Fig. 8). 이러한 결과로부터 補中益氣湯 抽出物の H460 細胞株의 죽음은 전형적인 細胞枯死 機轉에 의함을 알 수 있었다.

Bcl-2系 단백질은 다양한 細胞枯死 유도체에 의

한 細胞의 죽음을 억제할 뿐만 아니라 細胞의 生存을 촉진하는 단백질이다. 본 研究에서도 Bcl-2 단백질에 속하는 Bak 단백질의 발현을 조사하였다(Fig. 9). 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460細胞株의 細胞枯死 유도에 Bak 단백질 발현의 증가를 보여, H460 細胞柱에서 補中益氣湯이 Bcl-2계 단백질의 발현에 관련되었음을 시사하였다.

이상의 결과를 종합하면, 補中益氣湯 抽出物에 의한 H460癌細胞의 죽음시 細胞週期調節 인자들의 발현양상 변화와 細胞枯死 機轉을 조사한 바 p21/Cip1의 시간의존적 감소 그리고 p27/Kip1의 시간의존적 증가가 관찰되었으며, cyclin B<sub>1</sub>의 경우도 시간에 따라 감소하였다. 이들 인자들의 발현 양상 변화는 細胞죽음유도와 밀접한 연관이 있는 것으로 사료되며, 補中益氣湯의 細胞枯死 작용기전은 caspase-3 protease의 활성화, Bak의 발현 증가에 기인함을 시사하고 있다.

## V. 結 論

補中益氣湯의 癌細胞에 대한 細胞毒性 상승효과와 그 細胞 枯死 機轉을 究明하기 위하여, 補中益氣湯 抽出物을 사람의 肺癌으로부터 유래된 H460細胞株에 처리하여 細胞生存率, 細胞週期 조절자(cell cycle regulator; p21/Cip1, p27/Kip1) 발현도, cyclin B<sub>1</sub> 발현도, caspase family cysteine protease의 발현 및 Bak 단백질의 발현을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 補中益氣湯 抽出物 처리 시 H460細胞株에서 농도의존적으로 細胞毒性효과를 나타내었다.
2. 補中益氣湯 抽出物 처리 시 나타나는 細胞毒性은 DNA분절 및 sub-G1 DNA양의 증가 등이 관찰되어 細胞枯死에 의한 細胞毒性임을 확인하였다.
3. 補中益氣湯 抽出物 처리 시 시간의존적으로 cell cycle regulator인 p21/Cip1은 감소하였으며, p27/Kip1은 증가하였다. 또한 cyclin B<sub>1</sub>의 경우도 시간에 따라 감소하였다.

4. 補中益氣湯 抽出物 처리 시 caspase-8 protease 활성화 형태로 분해하여 caspase-3 protease 활성을 유도하였다.
5. 補中益氣湯 抽出物 처리 시 caspase-3 protease 활성화에 의한 細胞內 표적인자인 PARP 분해가 나타났다.
6. 補中益氣湯 抽出物 처리 시 신호 전달 분자인 Bak 단백질 발현이 현저하게 증가하였다.

이상의 결과로 보아 補中益氣湯은 肺癌細胞 細胞枯死 신호전달계를 활성화시켜, 細胞毒性效果를 나타낸 것으로 사료된다.

### 參考文獻

1. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death : the significance of cell death. *Int. Rev. Cytol.* 1980;68:251-306.
2. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis : distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 1982;17:229-59.
3. Odajima Yoshio. Effects of Ginseng on cancer cell Yakuyo Ninjin sono Kenkyu to Shinpo. 1981, pp.198-209.
4. Guadagno, T. M. and Newport, J. W. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of cdc-2 cyclin B kinase activity. *Cell.* 1996;84:73-82.
5. Tang, Defang : Hao, Yohung : Liu, Zuoya : Miao, Shulin, Wei, Hua, Wu, Jian. Constituents of the essential oil from rhizome of *Attactylodes macrocephala* produced in pingjiang (China) and their antitumor effects. *Yaoxue Tongbao.* 1984;19(9):555-8.
6. 임재훈. 數種의 韓藥物이 癌細胞 감수성에 미치는 영향. *慶熙韓醫大論文集.* 1986;9:242-66.
7. 김병주. 扶正抗癌湯의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的研究, 圓光大學校 大學院. 1996.
8. 노훈정. 消積補中丸의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的研究, 圓光大學校 大學院. 1995.
9. 李東垣. 東垣十種醫書. 臺北:五洲出版社; 1981, pp.2-3.
10. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂; 2000, pp.644-46.
11. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂; 1998, pp.299-309.
12. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. *Science.* 1993; 262:695-700.
13. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 1997;41:461.
14. Tewari M, and Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 1995;270:3255-60.
15. Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R and Roth GS. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathways. *J Biol Chem.* 1998;273:3756-64.
16. Giolett E, Raingeuard J, Ranger A, Tepper RI, Davis RJ, Harlow E. Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;94:3302-7.
17. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 1998;254:439-59.
18. Jeong, J. Y., and Jue, D. M. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Immunol.* 1997;158:4901-7.
19. Polyak, K., Kato, J., Solomon, M. J., et. al. p27Kip1, a cyclin-CDK inhibitor, links transforming growth factor-β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.*

- 1994;8:9-22.
20. 대한병리학회. 병리학. 서울:高文社; 1997, pp.201-2.
  21. 송계용 외. 핵심 병리학. 서울:高麗醫學; 1998, p.147.
  22. 郁仁存. 中醫腫瘍學(上冊). 北京:科學出版社; 1991, pp.1-25, 65-74.
  23. 廣暢. 癌의 中醫治療. 東洋醫學. 1992;18(1): 56-63.
  24. 戴新民. 中醫免疫學. 臺北:啓叢書局; 1985, pp.1-50, 90-2.
  25. 方藥中外. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社; 1986, pp.621-36.
  26. 文九外. 癌東西醫結合治療(1). 益山:圓光大學校出版局; 1999, pp.253-303, 383-460.
  27. 趙鍾寬. 한방임상중양학. 大田:周珉出版社; 2001, pp.725-58.
  28. 金潞經 等. 腫瘍學. 서울:서울大學校出版部; 1990, pp.1-8, 85-99.
  29. 金東集 : 癌의 免疫療法의 現在와 將來, 카톨릭 醫大論文集. 1980;33:719-20.
  30. 金東集. 癌患者에서의 自然殺害細胞活性. 延世 大論文集. 1982;15(1):1.
  31. 金鎮福 等. 正常人 및 癌患者 淋巴球의 自然殺 害細胞 機能에 關한 研究. 大韓免疫學會誌. 1984;6(1):1-13.
  32. 韓상목. 病氣丸이 백혈병과 임피종환자에서 추 출한 癌細胞에 미치는 抗癌效果. 圓光大學校 大 學院, 1991.
  33. 이기영. 補中益氣湯加味方이 抗腫效果와 mitomycin C의 細胞毒性에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 1998.
  34. 김수진. 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 cyclophosphamide 에 의한 副作用에 미치는 影響. 大田大學校 大 學院. 1993.
  35. 韓晟圭. 補中益氣湯, 手拈散 및 補中益氣湯合手 拈散의 抗癌과 免疫調節作用에 關한 實驗的 研 究, 慶熙大學校 大學院. 1995.
  36. Han J, Lee JD, Bibbs L, and Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science. 1994;265:808-11.
  37. McBride, K., and Nemer, M. The c-terminal domain of c-fos is regulated for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. Mol. Cell. Biol. 1998;18:5073-81.
  38. Daniel J. Van Antwerp, Inder M. Verma. Suppression of TNF- $\alpha$  induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. Science. 1996;274(1):787-9.
  39. Amer A, Beg and David Baltimore. An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. Science. 1996;274(1):782-4.
  40. Siebenlist, U., Franzo, G., and Brown, K. Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. Ann. Rev. Immunol. 1994;12:405-55.
  41. May, M. J., and Ghosh, S. Signal transduction through NF- $\kappa$ B. Immunology Today. 1998;19: 80-8.
  42. Tounekti, O., Pron, G., Belehradek, J., and Mir, LM. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. Cancer Res. 1993;53(22):5462-9.
  43. Bian, X., Hughes F.M. Jr., Huang, Y., Cidlowski, J.A., and Putney, J.W. Jr. Roles of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. Am. J. Physio. 1997;272:1241-9.
  44. Polyak, K. Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H et. al. Cloning of p27Kip1, a cyclin dependent kinase and a potent mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell. 1994;78:59-66.
  45. Chen, J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W. and Dutta, A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. Nature.

- 1995;374:386-8.
46. 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 kinase. *Cell*. 1993;75: 805-16.
47. Zhang, Y., Fujita, N., and Tsuruo, T. Caspase-mediated cleavage of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*. 1999;18: 1131-8.
48. Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M. C. and Holbrook, N. J. p21 (Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*. 1997;14:929-35.
49. Fujieda, S., Inuzuka, M., Tanaka, N., Sunaga, H., Fan, G. K., Ito, T., Sugimoto, C., Tsuzuki, H., and Saito, H. : Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*. 1999;84:315-20.
50. Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem*. 1998;273(12):7141-7.
51. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide, role of Bcl-2 and caspases. *CMLS*. 1998;54:427-45.