

원저

금은화 약침의 항암효과에 관한 연구

박희수

상지대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effects of Anti-cancer Response of Lonicerae Flos Herbal-acupuncture

Park Hee-soo

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Sang-ji University

This study was performed to investigate the effects of anti-cancer response of Lonicerae Flos Herbal-acupuncture. Experimental studies were evaluated through the anti-cancer response activities such as, cell viability, DNA fragmentation, and Apoptosis

The results obtained were summarized as follows : 1. Lonicerae Flos Herbal-acupuncture(>300mg/ml) could lead cancer cell to cell death.

2. Lonicerae Flos Herbal-acupuncture(400mg/ml) caused DNA cleavage.

3. Lonicerae Flos Herbal-acupuncture(400mg/ml) caused apoptosis in the cancer cell line.

According to above mentioned results, Lonicerae Flos Herbal-acupuncture is expected to be effective for anticancer response.

Key words : Lonicerae Flos Herbal-acupuncture, anti-cancer response

I. 緒 論

癌은 세포의 기본적인 규칙이 깨어져 나타나는 하나의 질환이다¹⁾. 이는 세포에서 일부가 돌연변이를 일으켜 무질서하게 증식하여 덩어리를 만들고, 이것

이 주위 장기를 압박할 뿐만 아니라 여기에 인접한 정상조직 및 장기에 침윤하는 것으로 악성종양이라고 일컫는다²⁾.

특히 폐암은 20세기에 들어서면서 세계적으로 발생빈도가 급격히 늘기 시작하였고³⁾, 우리나라의 경우 암의 발생 부위별 빈도는 2001년도에 위암(20.3%)에 이

· 접수 : 2005년 9월 7일 · 수정 : 2005년 9월 10일 · 채택 : 2005년 9월 10일
· 교신저자 : 박희수, 강원도 원주시 우산동 상지대학교 침구학교실
Tel. 033-741-9380 E-mail : najajim@empal.com

어 폐암(11.9%)이 두 번째로 많은 것으로 조사되었다⁴⁾.

원발성 기관지 폐암을 약칭하여 폐암이라 하는데, 기관지 점막과 폐포에서 원발하는 악성종양이다. 40세 이상의 장기적으로 심하게 흡연한 경험이 있는 남성에게 호발하며 흡연과 석면, 비소, 크롬, 니켈, 대기 오염 유전 등과 관련 있다⁵⁾.

韓醫學에서 癌에 대한 기록은 石瘤, 腸覃, 石瘕, 積聚, 癥瘕, 噎膈, 反胃⁶⁻⁸⁾, 肥氣, 伏梁, 痞氣, 息賁, 賁豚⁹⁾, 翻胃¹⁰⁻¹¹⁾, 石癰¹²⁾ 등 다양한 병명으로 기술하고 있다.

금은화는 淸熱解毒, 涼散風熱의 효능을 가지고 있는데, 朴¹³⁾은 항바이러스작용을 하며 황색포도상구균, 용혈성 연쇄상구균, 폐렴쌍구균, 결핵균 등의 억제작용이 있다고 하였고, 金¹⁴⁾은 항균, 항바이러스작용 및 항내독소작용, 소염작용, 면역증강작용 등이 있다고 하였다.

한방치료를 이용한 다양한 항암연구가 진행되고 있으나 金銀花藥鍼을 肺癌에 응용하여 抗癌 및 免疫效果를 입증한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 金銀花藥鍼液의 항암효과를 확인하기 위하여 A549 인체폐암세포를 이용하여 시험관내에서의 항암효과를 관찰한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 약침의 제조

실험에 사용한 金銀花(Lonicerae Flos)는 시중 건재상에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 약침의 제조는 300g의 金銀花를 물 3000ml와 함께 5000ml의 등근 플라스크에 넣어 3시간 전탕 한 후 전탕액을 300ml로 농축하였다. 농축액을 95%의 ethanol 100ml과 함께 넣어 침전 시켰다. 침전물을 제거 후 다시 100ml로 농축하고, 85%의 ethanol 100ml과 함께 침전 시켰다. 침전물을 제거하고 다시 100ml로 농축하였고, 75%의 ethanol 100ml과 함께 다시 침전 시켰다. 침전물을 제거 후 100ml로 농축 한 뒤 500ml의 생리 식염수와 함께 혼합하여 0.2 μ m의 filter(corning, USA)로 멸균 여과한 후 약침용 vial에 넣어 가압 멸균하여 실험에 사용하였다.

2. 세포배양

1) 세포

본 실험에 사용한 세포는 B16-F10 (KCLB 80008) mouse melanoma cell과 A549 인체폐암세포를 사용하였고, 모두 한국 세포주은행으로부터 분양받아 5% CO₂와 95% air의 배양기(존샘, Korea)에서 37 $^{\circ}$ C를 유지하며 배양하였다. 배양된 세포는 매일 위상차 현미경(HUND, Germany)을 통하여 관찰하고 주 1-3회의 계대배양을 하면서 적정하게 성장시켜 사용하였다.

2) 배지

기본배지는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 3.7g/L sodium bicarbonate (Shinyopure Chemicals Co, Japan), Penicillin G (100,000 Units/ml, Sigma, USA) 1ml, Streptomycin (100mg/ml, Sigma, USA) 1ml, fungizone (Gibco, USA) 4ml을 첨가하여 혼합한 뒤, bottle top filter (Corning, USA)로 멸균하여 사용하였다.

FBS(Gibco, USA)는 56 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 30분간 inactivation시킨 후 사용하였다.

혼합배지는 RPMI 1640 기본배지에 FBS를 10% 첨가하여 사용하였으며, 암세포 배양 전반에 사용하였다.

3. 측정항목 및 방법

1) Apoptosis

(1) A549 폐암 세포주 배양 및 세포생존을 측정
A549 폐암세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI(GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포생존을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2 \times 10⁵ cells를 넣어 배양한 후 금은화약침을 50, 100, 200, 300, 400mg/ml 농도로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing한 후 0.5% crystal violet (in 20% methanol)을 300 μ l/well로 첨가하여 상온에서 5분 간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 μ l 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10^7 세포 당 lysis buffer(10mM Tris·HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 1% SDS) 100 μ l로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

(3) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 μ g/ μ l)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ μ l에 BCA 용액 100 μ l를 첨가하여 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 방치한 다음 흡광도 540nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μ l와 BCA 용액 100 μ l을 섞은 뒤 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

(4) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100 μ g를 caspase-3와 cytochrome C를 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 PARP, cytochrome c, caspase-3 등의 monoclonal 항체(PharMingen, USA)를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization시키고 난 후 PBS-Tween으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 antimouse IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Kodak X-Omat film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

(5) DNA fragmentation

처리한 배양세포를 얼음으로 차게 한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700 μ l의 lysis buffer(20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45분간 항온 시키면

서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 lysis를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 \times g로 20분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40 μ l의 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)로 용해시키고, 200 μ g/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 항온시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light 하에서 사진을 찍어 가시화하였다.

4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 STATISTICA 6.0 (Statsoft, USA)를 이용하였으며, 통계방법은 student's T-test를 하였고, 시험관내 세포독성에서 구한 IC50은 회귀분석을 통하였으며, P<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 成 績

1. Cell viability

金銀花 藥鍼의 세포사멸 효과를 알아보기 위하여 A549 폐암세포주에 50, 100, 200, 300, 400mg/ml 농도로 처리하여 세포생존율을 조사한 결과, 각각 98.2, 88.9, 69.3, 15.4, 8.85%로 나타났다. 따라서 金銀花藥鍼의 경우 농도의존적 세포사멸 결과를 나타내었고, 특히 300mg/ml 이상의 농도에서 암세포를 사멸시킬 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. DNA fragmentation

金銀花 藥鍼의 암세포사멸이 어떠한 기작에 의하여 일어나는지를 확인하기 위하여 위에서 확인된 농도를 근거로 하여 DNA 분절실험을 실시하였다. 그 결과 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 DNA 분절현상이 나타났다. 그러나 金銀花藥鍼 300mg/ml에서는 DNA 분절현상이 나타나지 않은 것으로 보아 암세포의 경우

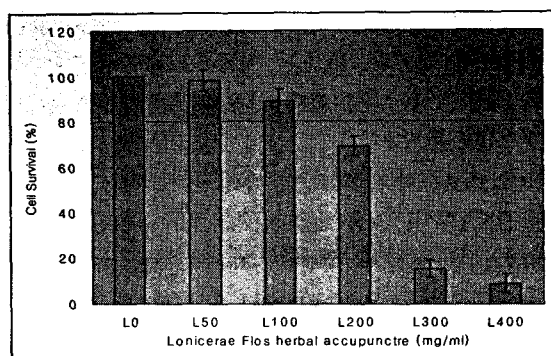


Fig. 1. Cell survivals by Lonicerae Flos herbal-acupuncture in A549 lung cancer cell line.

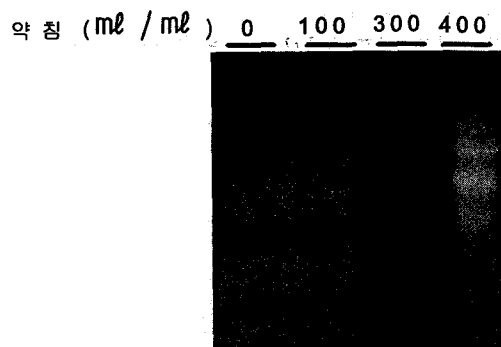


Fig. 2. DNA fragmentation by Lonicerae Flos herbal-acupuncture in A549 lung cancer cell line.

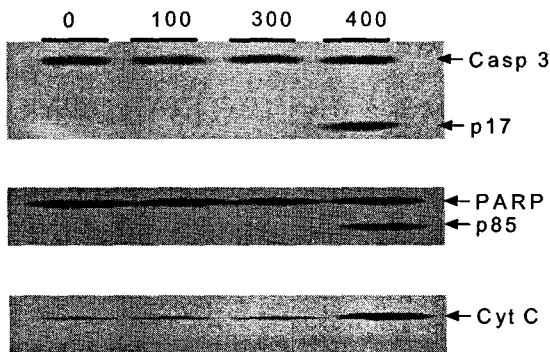


Fig. 3. caspase-3 activation, PARP fragmentation, and cytochrome C release in A549 lung cancer cell line.

金銀花藥鍼 300mg/ml에서는 세포사 과정 중 세포괴사(necrosis)가 일어나 DNA 분절현상이 나타나지 않는 것으로 추측되며, 金銀花藥鍼 400mg/ml에서는 이와는 달리 apoptosis가 일어나 DNA 분절현상이 나타난 것으로 추측된다(Fig. 2).

3. Western blotting

金銀花藥鍼에서 apoptosis 과정을 통하여 세포사가 일어났는지를 확인하기 위하여 caspase-3, poly (ADP-riboseyl), polymerase(PARP) 및 cytochrome C에 대하여 Western blot를 수행하였다. 그 결과 金銀花藥鍼의 농도가 400mg/ml에서만 caspase-3가 활성화되어 p17이 보였으며 PARP의 p85 분절화 및 cytochrome C의 방출이 일어남을 확인하였다. 즉 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 먼저 cytochrome C가 방출되어 caspase-3가 활성화됨으로써 PARP의 p85 분절화를 불활성화를 시킴으로써 결국은 DNA가 분절되어

세포가 죽는 것으로 결론내릴 수 있었다(Fig. 3).

IV. 考 察

종양은 아직도 발생원인과 기전이 밝혀져 있지 않고 또 그 생물학적인 성상이 복잡하므로 정의를 적절하게 내린다는 것은 어렵다. 그러나 많은 사람들은 R.A. Willis가 제창하고 E.T. Bell이 다소 수정한 다음의 정의를 인용하고 있다. “종양이라는 것은 조직의 자율적인 과잉적 성장이며 이것은 개체에 대해서 의의가 없거나 이롭지 않을뿐더러 정상조직에 대해서 파괴적인 것을 말한다”¹⁵⁻¹⁶⁾.

종양과 관련된 韓醫學 문헌을 살펴보면, 각종 한의학 병명 중에는 서양의학의 암과 유사한 것들이 많이 포함되어 있는 것을 알 수 있다. 단지 계통적 분류가 미흡한데, 양·약성 등 구체적 분류를 하지 않고 증상에 근거해서 병정의 발생과 진행과정에 따라 분석해 놓았을 뿐이다¹⁶⁾.

한의학에서 종양의 원인은 外因, 內因으로 구별하여 설명하고 있다. 外因에 대하여 《素問·至眞要大論》⁶⁾에 “夫百病之生 皆生於風寒暑濕燥火 以之化之變也”라 하였고, 《靈樞·百病始生》⁸⁾에 “積之始生 得寒乃生 厥乃成積也”라 하였으며, 《靈樞·癰疽》⁸⁾에 “熱氣淳盛 下陷肌膚 筋髓枯 內連五臟 血氣竭 當其癰下 筋骨良肉皆無余 故名曰疽”라 하였다. 《諸病源候論》¹²⁾에서는 “惡核者 肉里忽有核 累累如梅李 小如豆粒 皮肉燥痛 左右走身中 卒然而起 此風邪挾毒所成”이라 하여 風寒暑濕燥火의 六淫과 熱毒 등 外邪에 의해 종양이 발생한다고 하였다. 또한 《素問·痺

論》⁶⁾에 “飲食自倍 腸胃乃傷”라 하였고 《素問·生氣通天論》⁶⁾에서는 “高粱之變 足生大丁受如持虛”라 하였으며, 陳¹¹⁾은 “婦人癥痞 由飲食失節 脾胃虧損 邪正相搏 積於腹中 牢固不動 故名曰癥”이라 하였고, 張¹⁷⁾은 “治反胃之法 當辨其新久及所致之因 或以酷飲無度 傷於酒濕 或以縱食生冷 敗其真陽 或因七情憂鬱 竭其中氣 總之無非內傷之甚 致損胃氣而然”이라 하여 過食, 기름진 음식, 음식의 무절제 등 飲食不節과 불결한 음식물의 섭취 및 음식물의 偏嗜도 종양의 원인이 될 수 있다고 하였다.

內因에 대해서는 《素問·陰陽應象大論》⁶⁾에 “喜傷心 怒傷肝 思傷脾 悲傷肺 恐傷腎”이라 하였고 《素問·舉痛論》⁶⁾에 “百病生於氣也 怒則氣上 喜則氣緩 悲則氣消 恐則氣下 寒則氣收 炅則氣泄 驚則氣亂 勞則氣耗 思則氣結”이라고 하였고 朱¹⁸⁾은 “憂怒鬱悶 朝夕積累 脾氣消阻 肝氣橫逆 遂成隱核 如大棋子 不痛不癢 數十年後方爲瘡陷 名曰奶岩”이라 하여 喜, 怒, 憂, 思, 悲, 恐, 驚의 七情의 자극에 의해 심한 정신적 손상을 받게 되면 종양이 발생한다 하였다.

《素問·刺法論》¹⁹⁾에서는 “正氣存內 邪不可干”이라 하였고, 《素問·評熱病論》⁶⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”라 하였으며, 《諸病源候論》²⁰⁾에서는 “積聚者 由陰陽不和 腑臟虛弱 受于風邪 搏于腑臟之氣所爲也”라 하여 先天의 稟賦不足이나 後天的으로 영양공급이 실조되어 體虛하거나 七情內傷, 六淫外感, 飲食失調 등으로 臟腑가 虧虛하여도 종양이 발생할 수 있다고 하였다.

종양의 치료에 대하여 《素問·陰陽應象大論》⁶⁾에서는 “治病必求於本”고 하였고, 《素問·至真要大論》⁶⁾에 “寒者熱之 熱者寒之 微者逆之 甚者從之 堅者削之 咯者除之 勞者溫之 結者散之 ……帝曰何謂逆從? 岐伯曰 逆者正治 從者反治”라 하여 종양의 치료에 있어 근본적인 치료를 원칙으로 삼고 病因에 근거하여 病程에 부합되는 치료를 해야 한다고 하였다. 方²¹⁾은 健脾益氣, 養血滋陰 등의 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化癥, 攻堅破積 등의 祛邪法, 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法으로 구분하였다.

金銀花(Lonicerae Flos)는 인동과에 속한 다년생 半常綠大質藤木인 인동(Lonicera japonica THUNB), 紅腺忍冬(Lonicera hypoglaus MIQ), 山銀花(Lonicera confusa DC) 및 毛花柱忍冬(Lonicera dasystyla REHD)의 花蕾를 여름철 꽃이 피기 전에 採取하여 乾燥한 것으로^{14,22-27)}, 異名은 銀花, 忍藤, 忍冬藤, 忍冬, 二花, 土銀花, 銀花子 등이 있다²²⁻²⁸⁾. 性味는 寒, 無毒, 甘하

며^{13-14,22-29)} 肺, 胃, 心으로 歸經하고^{14,22-29)} 清熱解毒, 涼散風熱의 효능이 있어 癰腫疔瘡, 腫瘍, 喉痺, 丹毒, 疥癬, 楊梅惡瘡, 五種尸疔, 瘰癧, 痔漏, 熱毒血痢, 風熱感冒, 溫病發熱을 치료한다^{13-14,22-29)}. 張¹⁷⁾은 “善於化毒 故治癰疽 腫毒 瘡癬 楊梅 風濕諸毒 誠爲要藥 毒未成者能散 毒已成者能潰”라 하였다.

이에 저자는 金銀花藥鍼의 항암 및 면역효과를 알아보기 위하여 실험관내에서 A549 human epithelial lung cancer cells에 약침을 처리한 후 Cell viability, DNA fragmentation과 같은 Apoptosis를 관찰하였다.

Apoptosis는 세포 사멸의 대단히 조절된 다단계의 메카니즘이다.

Apoptosis에 분자적으로 관여하는 요소는 mitochondria, plasma membran, cytosol, 그리고 nucleus에 위치하며 이러한 구획들 간에 상호 작용을 한다. 그 경로는 두 가지로 대별되는데 mitochondria와 caspase이다³⁰⁾.

실험연구에 의하면 두개의 caspase를 활성화시키는 경로가 보고되었는데, 첫째는 Schimmer³¹⁻³²⁾ 등이 보고한 death receptor의 TNF family가 상류의 caspase-8을 활성화시키는 receptor mediated apoptosis pathway이며, 둘째는 Rokhlin³³⁻³⁴⁾ 등이 보고한 mitochondria로부터 cytochrom c가 방출되고 상류의 caspase-9를 활성화시키는 mitochondrial mediated apoptosis pathway이다. 이는 최근 apoptosis가 caspase-9와 caspase-3을 활성화시키는 동안 mitochondria로부터 cytochrome c가 방출된다는 보고³⁵⁻³⁶⁾와 일치한다.

PARP은 caspase-3와 caspase-7의 기질이고³⁷⁻³⁸⁾ 이 핵단백질의 분열은 apoptosis의 생화학적인 증명이다.

상술한 두 경로는 하류의 effector caspase-3의 활성화에서 완결된다³⁹⁻⁴⁰⁾. 한번 활성화하면 상류의 caspase는 특별한 단백질 기질(PARP, DFF45)을 분열시키고 apoptosis의 실행으로 이끈다⁴¹⁾.

실험결과에서 金銀花(Lonicerae Flos)의 세포사멸 효과를 알아보기 위하여 A549 폐암세포주에 金銀花藥鍼液을 50, 100, 200, 300, 400mg/ml 농도로 처리하여 세포생존율을 조사하였더니, 각각 98.2, 88.9, 69.3, 15.4, 8.85%로 나타났다. 따라서 金銀花藥鍼의 경우 300mg/ml 이상의 농도에서 암세포를 사멸시킬 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

金銀花 藥鍼의 암세포사멸이 어떠한 기작에 의하여 일어나는지를 확인하기 위하여 위에서 확인된 농도를 근거로 하여 DNA 분절실험을 실시하였다. 그 결과 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 DNA 분절현상이 나

300mg/ml에서는 DNA 분절현상이 나타나지 않은 것으로 보아 암세포의 경우 300mg/ml에서는 세포사 과정 중 세포괴사(necrosis)가 일어나 DNA 분절현상이 나타나지 않은 것으로 추측되며, 400mg/ml에서는 이와는 달리 apoptosis가 일어나 DNA 분절현상이 나타난 것으로 추측된다(Fig. 2).

金銀花藥鍼에서 apoptosis 과정을 통하여 세포사가 일어났는지를 확인하기 위하여 caspase-3, poly(ADP-riboseyl), polymerase(PARP) 및 cytochrome C에 대하여 Western blot를 수행하였다. 그 결과 金銀花藥鍼의 농도가 400mg/ml에서만 caspase-3가 활성화되어 p17이 보였으며 PARP의 p85 분절화 및 cytochrome C의 방출이 일어남을 확인하였다. 즉 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 먼저 cytochrome C가 방출되어 caspase-3가 활성화됨으로써 PARP의 p85 분절화를 불활성화를 시킴으로써 결국은 DNA가 분절되어 세포가 죽는 것으로 결론내릴 수 있었다(Fig. 3).

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 金銀花藥鍼液은 A549 인체폐암세포에 대하여 농도의존적 세포사멸의 효과가 있었다.

V. 結 論

金銀花藥鍼液의 항암 및 면역효과를 확인하기 위하여 A549 인체폐암세포와 B16F10 폐암세포를 이용하여 시험관내에서의 항암효과와 mouse에서의 항암 및 면역반응을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 金銀花藥鍼은 300mg/ml 이상의 농도에서 암세포를 사멸시킬 수 있음을 알 수 있었다.
2. 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 DNA 분절현상이 나타났다.
3. 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 apoptosis가 유발되었다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 金銀花藥鍼液은 A549 인체폐암세포에 대하여 농도의존적 세포사멸의 효과가 있었으며, 앞으로 金銀花를 응용한 다양한 방법으로서의 심도 있는 연구가 진행되어져야 할

것으로 사료된다.

VI. 參考文獻

1. 백문기, 홍경만 : 암유전자, 서울, 월드사이언스, 2000, p. 3.
2. 이찬영 : 알기 쉬운 암의학(상)-암의 모든 것-, 서울, 단국대학교출판부, 2002, pp. 27, 31-40, 85.
3. 문구, 정병화, 김병주 : 암 동서의 결합치료, 익산, 원광대학교출판국, 1999, Vol.2, pp. 117-124.
4. 박재갑 외 13인 : 한국중양암등록 사업 연례보고서, 국립암센터, 2003, p. 12.
5. 潘敏求 : 中華腫瘤治療大成, 華北科學技術出版社, p. 358, 1996.
6. 楊維傑 : 黃帝內經素問解釋, 서울, 一中社, 1991, pp. 3, 25, 32-33, 42, 50-52, 59, 171, 234, 276, 304, 331, 412, 661-662, 664-665.
7. 河北醫學院 : 靈樞經校釋, 北京, 人民衛生出版社, 1992, Vol. 1, pp. 484.
8. 河北醫學院 : 靈樞經校釋, 北京, 人民衛生出版社, 1992, Vol. 2, pp. 237, 246, 355-356, 395, 468.
9. 成樂箕 : 八十一難經解釋, 서울, 高文社, 1975, pp. 77-79.
10. 朱震亨 : 丹溪心法附餘, 서울, 大星文化社, 1990, pp. 349-354.
11. 陳自明 : 婦人良方大全, 文光圖書有限公司, pp. 券七, 13, 37.
12. 南京中醫學院 : 諸病源候論校釋, 人民衛生出版社, Vol. 2, pp. 839-846, 857, 879, 1487.
13. 박영순 : 한방의 약리 해설, 서울, 아카데미서적, 2002, pp. 120-121.
14. 김호철 : 한약 약리학, 서울, 集文堂, 2001, pp. 150-152.
15. 서울대학교 의과대학 : 중양학, 서울, 서울대학교출판부, 1985, pp. 1, 3-5.
16. 문구, 정병화, 김병주 : 암 동서의 결합치료, 익산, 원광대학교출판국, 1999, Vol.1, pp. 1-23, 35-43, 55-62, 68-98, 219.

17. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 科學技術出版社, 1984, Vol. 1, pp. 382, 387, 407, 933.
18. 朱震亨 : 丹溪醫集-格致餘論, 北京, 人民衛生出版社, 1993, p. 26.
19. 王琦외 4人 : 素問今釋, 서울, 一中社, 1981, p. 412.
20. 南京中醫學院 : 諸病源候論校釋, 人民衛生出版社, Vol. 1, pp. 575, 623.
21. 方藥中外7人 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, 1986, pp. 621-623.
22. 全國韓醫科大學 本草學教室 : 本草學, 서울, 永林社, 1992, pp. 198-199.
23. 顏正華 : 中藥學, 北京, 人民衛生出版社, 1991, pp. 163-165.
24. 新文豐出版公司 : 新編中藥大辭典, 臺北, 1983, Vol. 2, pp. 1136-1139.
25. 梁基相 : 處方構成을 위한 漢藥의 配合과 應用, 서울, 傳統醫學研究所, 1993, p. 212.
26. 張相文, 崔炬, 金鍾元, 朴炳允, 朴宣東 : 韓藥資源植物學, 서울, 學文出版, 1996, pp. 471-473.
27. 李時珍 : 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, 1982, Vol. 1, p. 1334.
28. 上海中醫學院 : 中草藥學, 香港, 商務印書館, 1983, p. 137.
29. 楊東善 : 本草備要解釋, 서울, 一中社, 1991, pp. 264-265.
30. D.R. Green : 2000, Apoptotic pathway, paper wraps stone blunts scissors, *Cell* 102, 1-4.
31. A.D. Schimmer, D.W. Hedley, L.Z. Penn, M.D. Minden : 2001, Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translation view, *Blood* 98, 3541-3553.
32. B. Fadeel, S. Orrenius, B. Zhivotovsky : 2000, The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases, *Leukemia* 14, 1514-1525.
33. O.W. Rokhlin, R.A. Glover, M.B. Cohen : 1998, Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines occurs via activation of caspase-8 and caspase-7, *Cancer Res.* 58, 5870-5875.
34. Y. Hu, L. Ding, D.M. Spencer, G. Nunez : 1998, WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation, *J. Biol. Chem.* 273, 33489-33494.
35. D.R. Green : 1998, Apoptotic pathway, the roads to ruin, *Cell* 94, 695-698.
36. J. Rodriguez, Y. Lazebnik : 1999, Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme, *Genes Dev.* 13, 3179-3184.
37. M. Germain, E.B. Affar, D. D'Amours, V.M. Dixit, G.S. Salvesen, G.G. Poirier : 1999, Cleavage of automodified poly[ADP-ribose] polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7, *J. Biol. Chem.* 274, 28379-28384.
38. M. Tewari, L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen, V.M. Dixit : 1995, Yama/ CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly[ADP-ribose] polymerase, *Cell* 81, 801-819.
39. J.J. Kang, M.D. Schaber, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G. Litwack, D.J. Hall, M.A. Bjornsti : 1999, Cascades of mammalian caspase activation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 274, 3189-3198.
40. H.R. Stennicke, J.M. Jurgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B.B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H.M. Ellerby, L.M. Ellerby, D. Bredesen, D.R. Green, J.C. Reed, C.J. Froelich, G.S. Salvesen : 1998, Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8, *J. Biol. Chem.* 273, 27084-27090.
41. P.K. Kim, Y.G. Kwon, H.T. Chung, Y.M. Kim : 2002, Regulation of caspases by nitric oxide, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962, 42-52.