

폐암세포에서 백림의 항암효능연구
— Bcl-2 family 단백조절을 통한 자가사멸 —

남혜선 · 조민경*
동국대학교 한의과대학 약리학교실

The anti-cancer effects of *Ampelopsisradix*
Extract (AE) on A549 cells
— The role of Bcl-2 family protein on the AE-induced apoptosis —

Hye Seon Nam & Min Kyung Cho*
Department of Pharmacology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Abstract

Objective: The aim of this study is to evaluate anti-cancer effects of *Ampelopsisradix* Extract (AE) on human lung cancer A549 cells.

Method: The apoptotic activities and cell growth arrest activities of AE were measured using 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The molecules involved in apoptotic process were assessed by western blotting.

Result: Treatment of AE potently reduced cell viability in a dose-dependent manner in A549 cells. AE (100-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resulted in apoptosis via activation of caspase 9 following PARP cleavage in a time- and dose-dependent manner. The levels of Bax and Bad levels were increased by AE with a concomitant decrease of Bcl-xL. In addition, AE at the low dose (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly inhibited cell growth in the presence of serum.

Conclusion: AE has the potential as a therapeutic agent against lung cancer.

Key words: *Ampelopsis radix*, Lung cancer, Apoptosis, Bcl-2 family

· 접수: 2012년 1월 20일 · 수정접수: 2012년 4월 5일 · 채택: 2012년 4월 10일

* 교신저자: 조민경, 동국대학교 한의과대학 약리학교실

전화: 054-770-2666, 팩스: 054-770-2281, 전자우편: mkcho@dongguk.ac.kr

I. 서론

20세기 들면서 전 세계적으로 암 발병률 및 사망률의 증가는 현대인의 건강과 생명을 위협하는 주요 원인이다.^{1,2)} 최근 흡연, 인구의 노령화 및 대기 오염으로 국내 폐암의 발병률이 크게 증가하고 있다. 폐암의 일반적인 증상은 감기의 증상과 유사하거나 자각 증상이 없어 조기 진단을 놓치는 사례가 빈번하며, 진단 시 이미 전이되어 있는 경우가 많다. 따라서, 폐암은 치유가 어려운 암 중의 하나이며, 치료의 예후가 좋지 않아 15% 정도의 낮은 치료율을 나타내고, 5년 생존율은 15%에 불과하다.³⁾ 폐암은 주로 외과적인 수술 또는 방사선 요법과 화학요법으로 치료된다.⁴⁾ 표준 화학요법은 환자의 수명을 연장시키고 암을 치료하지만, 암 조직에 대한 낮은 선택성 때문에 정상조직에 다양한 부작용을 유발하는 한계가 있다.^{5,6)} 따라서, 기존의 화학항암제에 대한 한계를 극복하기 위하여 독성과 부작용이 적으면서 항암 효능과 효력이 높은 천연 소재의 항암제 개발에 대한 연구가 절실히 요구된다.

백렴(*Ampelopsis radix*)은 포도과(Vitaceae)에 속하며 다년생의 반원등본인 가회톱 *Ampelopsis japonica* (Thunb) Makino의 괴근을 건조한 것을 일컫는다.⁷⁾ 본경봉원(本經逢原)에서 백렴은 성(性)이 한(寒)하고 독(毒)을 풀며 종역창(腫瘍瘡)에 바르면 해산(解散)하는 효과가 있는데 이는 신미(辛味)와 관련된다.⁸⁾ 백렴은 심장, 비장, 간장으로 귀경하여 청열해독(淸熱解毒), 림창생기(斂瘡生肌)하는 효능을 나타내어⁹⁾ 주로 인후종통, 결막염, 임파선결핵, 고환염, 피부 습진 등을 치료하는 생약으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 현재까지 백렴의 항알레르기, adriamycin의 독성억제, macrophage와 NK cell 활성화를 통한 면역조절 등의 효과가 연구되었으나,¹¹⁻¹³⁾ 항암효과에 대

한 체계적인 연구는 매우 제한적이다.

항암치료의 전략은 다양한 기전을 통하여 암세포의 분열과 성장을 억제하고 선택적으로 암세포를 제거하는데 있다. 새로운 분자 표적 항암제들은 세포의 신호전달경로, 세포주기, 혈관신생 또는 세포 자가사멸 등 다양한 타겟에 특이적으로 효과를 나타낸다. 자가사멸은 프로그램화된 자발적 세포의 죽음을 유도하는 생체기작으로, 죽음수용체(FAS)를 매개하는 외인적 경로와 mitochondria를 매개하는 내인적 경로의 두 가지 경로로 구분된다.^{14,15)} 외인적 경로는 죽음수용체에 리간드가 결합함으로써 유도되며, 하위의 죽음특이도메인을 갖고 있는 Fas Associated Death Domain(FADD)와 결합하는데, caspase 8이 가지고 있는 유사한 도메인에 결합이 가능하다.¹⁶⁾ 반면, mitochondria를 매개하는 내인적 경로는 Bcl-2 family protein이 관여하며,¹⁷⁾ Bcl-2, Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic protein과 Bax, Bad와 같은 pro-apoptotic 단백질의 균형조절에 의해 cytochrome c의 방출을 유도하여 자가사멸을 유도한다.¹⁸⁾ 이러한 외인적 경로와 내인적 경로는 공통경로인 caspase 3 또는 caspase 9의 활성화와 PARP 절단을 유도하여 세포사멸을 야기한다.¹⁹⁾

본 연구에서는 인간 유래 폐암세포주 A549에서 백렴추출물의 항암효과를 apoptosis 지표인 PARP 절단과 caspase 9의 활성화로 평가하였고, 내인적인 경로에 관여하는 Bcl-family (e.g. Bad, Bax, Bcl-xL)에 미치는 효과를 관찰하였다.

II. 연구방법

1. 백렴추출물의 제조

건조 백렴 40g(휴먼허브, 한국)을 세척 후 추출용기에 넣고 메탄올 200ml을 가하여 80°C에

서 2시간 동안 추출하였다(수율: 12%). 얻어진 용액을 100°C에서 감압농축하고 동결건조하여 분말상태의 백림추출물(AE)을 얻었으며, 이를 -70°C에서 보관하며 사용하였다. 이를 증류수에 용해시킨 후 0.2μM filter(Advantec, Japan)로 여과하여 본 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 항체

Bad, Bax, Bcl-xL, PARP 항체들은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)에서 구입하였으며, caspase 9 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)에서 공급받았다. 기타 본 연구에 사용된 그 외 시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

3. 세포배양

인간 폐암세포주 A549는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입한 것을 사용하였으며, 37°C incubator에서 Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS)와 50μg/ml의 streptomycin 및 50 unit/ml의 penicillin을 첨가하였고, 5%의 CO₂를 유지하면서 배양하였다.

4. 세포 생존율 실험

세포독성을 평가하기 위하여 인간 폐암세포주 A549를 96 well plate에 분주하여 37°C에서 배양하고, 24시간 동안 FBS를 고갈시켜 성장을 정지시킨 후, 백림추출물을 Minimum essential medium (MEM) 배지에 희석하여 30~1000μg/ml의 농도범위로 24시간 동안 처치하였다. 세포 증식에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 96 well plate에 세포를 분주하여 FBS를 함유하는 배지

에서 배양하고 A549세포에 독성을 나타내지 않는 저농도인 30μg/ml의 백림추출물을 24시간 처리하였다. 백림추출물을 처치한 후 정해진 시간에 MTT용액을 가하고, 이때 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide로 용해시킨 후 Spectrophotometer(Tecan, Austria)를 사용하여 520nm에서 측정하였다.

5. 면역화학 분석법

면역화학 분석은 본 연구실에서 확립된 기법에 따라서 수행되었다.²⁰⁾ A549 세포주에 백림을 처리한 후, ice-cold phosphate buffered saline (PBS)으로 부착된 세포를 세척하였다. 세포에 lysate buffer를 가하여 세포를 긁어내어 원심 분리하여 lysate 분획샘플을 얻었고 -70°C에서 보관하여 사용하였다. 면역화학적 분석을 위해 샘플의 단백질을 Bradford 법으로 정량한 후, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel 전기영동장치를 이용하여 6% 또는 12% gel에서 단백질을 분리하고 nitrocellulose membrane에 단백질을 전이하였다. 5% Skim milk로 blocking한 후, 측정하고자 하는 1차 항체, 2차 항체를 순차적으로 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection kit(Amersham Biosciences, Amersham, UK)로 현상하였다. 단백질의 loading 양은 β-actin으로 보정하였다.

6. 통계처리

실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타냈으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때는 Analysis of Variance(ANOVA)과 Newman-Keuls test로 검정하여 P값이 0.05 또는 0.01 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

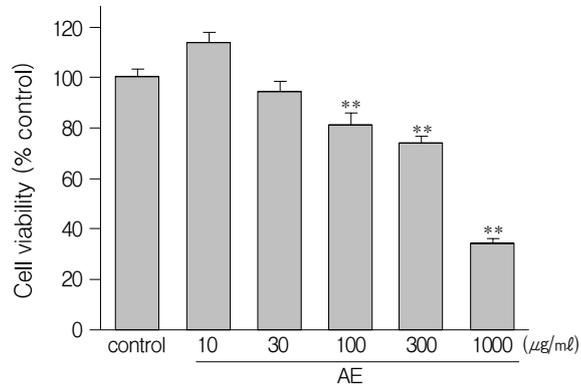


Fig. 1. AE-induced dose-dependent cell death in A549 cells. Cells were treated with 10-1000µg/ml of AE for 24 h. The value represents Mean ± S.E. of 3 different experiments. (significantly different from control, ** p<0.01)

III. 실험결과

1. 백령추출물의 인간유래 폐암세포주 A549에 대한 세포독성효과

백령추출물에 의한 폐암세포의 사멸효과를 관찰하기 위하여 혈청을 18시간 고갈한 후 백령추출물을 30-1000µg/ml의 용량으로 24시간 동안 처리하고 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 백령추출물은 30, 100, 300, 1000µg/ml의 농도에서의 세포생존율이 각각 95%, 81%, 73%, 34%로 폐암세포주 A549의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1).

2. 백령추출물에 의한 apoptosis의 유도 효과

폐암세포주 A549에서 백령추출물에 의한 apoptosis 기능 단백질 발현의 변화를 western blot analysis을 이용하여 관찰하였다. Apoptosis의 세포내 주요지표인 PARP full length는 백령추

출물에 의하여 농도 의존적으로 감소하였으며 PARP cleavage형은 증가하였다. 백령추출물은 PARP 절단의 상위 단백질인 caspase 9의 활성화를 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 2A). 백령추출물을 500µg/ml의 용량으로 36시간 동안 처리하였을 때, 시간의 경과에 따라 PARP full length 단백질 발현은 감소하였고, caspase 9의 절단형은 증가되었다(Fig. 2B).

3. Apoptosis의 내인성 경로에 미치는 백령추출물의 효과

백령추출물에 의한 apoptosis의 세포내 기작을 관찰하기 위하여 미토콘드리아 기능조절과 관련된 Bcl-2 family 단백질의 발현을 관찰하였다. 백령추출물을 100-500µg/ml의 농도로 12시간 동안 처리한 결과 pro-apoptotic protein인 Bax, Bad의 단백질발현은 백령추출물의 농도 의존적으로 증가하였다. 반면, anti-apoptotic protein인 Bcl-xL의 발현은 유의적으로 감소하였다(Fig. 3). 결과적으로, 백령추출물은 pro-apoptotic protein에 대한 anti-apoptotic protein의 비율감소를 통하여 내인적 경로를 매개한

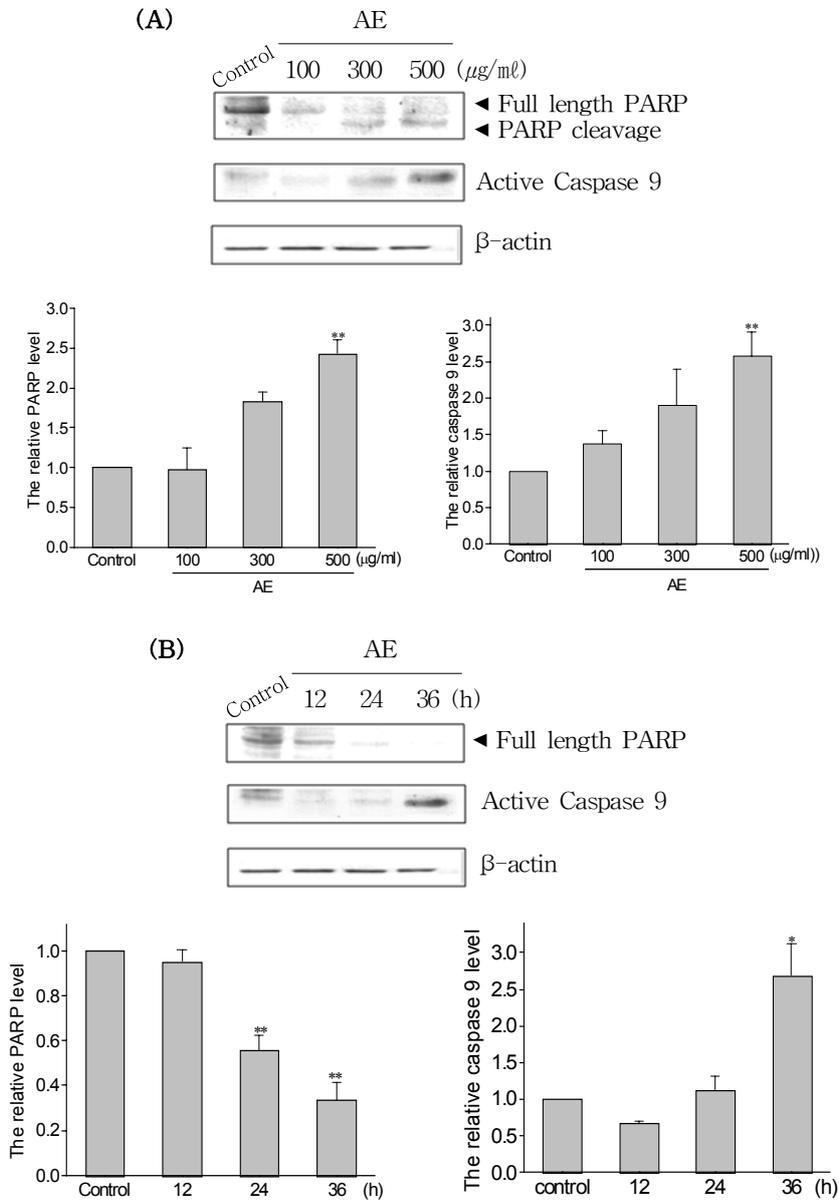


Fig. 2. PARP cleavage and caspase 9 activation by AE. (A) Western blottings were performed using specific antibodies against PARP and caspase 9 in lysates from A549 cells cultured in the presence of 100–500 µg/ml AE for 36 h. The lysates were fractionated as described in the Method. (B) A549 cells were treated with AE (500 µg/ml) for the indicated time period. The results were confirmed by 3 different repeated experiments. β -actin was used to confirm similar protein loading in each lane. Values indicate the relative densitometric intensities of each protein. (significantly different from control, * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$)

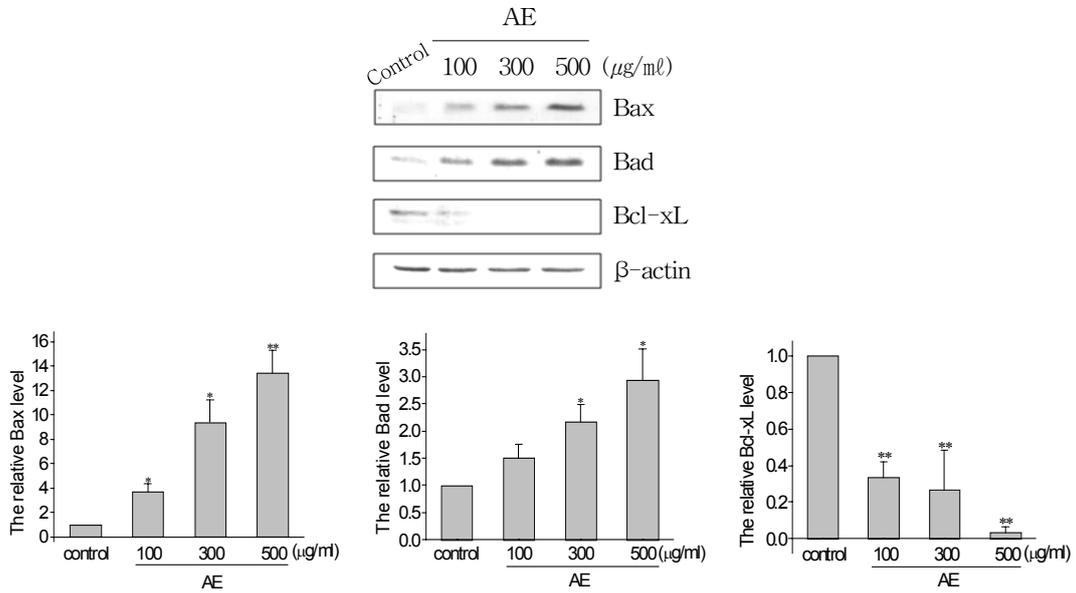


Fig. 3. The effects of AE on the regulation of Bcl-2 family protein. Lysates of A549 cells that were treated with AE at the indicated concentration for 12 h were analyzed by Western blot for Bad, Bax and Bcl-xL. The results were confirmed by repeated experiments. Values indicate the relative densitometric intensities. (significantly different from control, * P<0.05, ** p<0.01)

폐암세포의 apoptosis를 유도하였다.

4. 백령추출물이 폐암세포 증식에 미치는 영향

A549 세포에서 세포사멸을 유발하지 않는 저농도인 30µg/ml의 백령추출물이 세포 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 MTT 분석법으로 평가하였다. 그 결과 FBS로 배양한 대조군과 비교하여 백령추출물을 처리한 후 24시간에 약 66%의 증식저해 효과를 관찰하였다 (Fig. 4).

IV. 고찰

현대인의 주요사망원인인 암을 치료하기 위하여 세계적으로 많은 연구진들이 항암치료법

의 개발과 암특이적 생체내 기작에 대한 연구를 진행하고 있으며, 동시에 새롭게 개발된 치료법을 임상에 적용하고 있다. 따라서 암의 발병률 및 사망률의 급격한 증가에도 불구하고 치료율 및 생존율이 증가되고 있다. 역학연구에 따르면, 과일과 채소에 함유되어 있는 비타민 A의 전구물질인 베타카로틴과 비타민 C의 섭취가 다양한 암 발생의 위험을 50%로 감소시키는 예방효과를 나타낸다.^{21, 22)} 그러나, 사망률 1위를 차지하고 있는 폐암의 경우, 최근 발병률이 매년 10%씩 꾸준히 증가하고 있으며,^{1, 2)} 폐암치료를 위한 맞춤 유전학적 접근이 새로이 시도되고 있음에도 불구하고, 폐암에 대한 사망률이 개선되지 않고 있다. 폐암치료의 한계는 진단, 치료 및 치료 후 관리 등 여러 단계에 한계점을 나타내며, 이를 극복할 수 있는 천연소재의 항암 활성물질 발굴의 필요성이 절실하다고 할 수 있다.

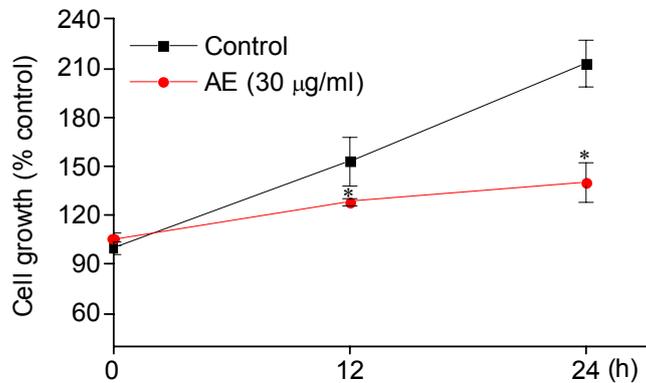


Fig. 4. Cell growth inhibition by AE in A549 cells. Cells were exposed to 30µg/ml of AE in the presence of serum for 12-24 h. Cell numbers were then determined by MTT assay (significantly different from control, *P<0.05). Each value shown is the mean ± S.E. of experiments conducted in quadruplicate.

본 연구실에서는 한약재 10종의 추출물에 대한 폐암세포 사멸효과를 평가하여 효능이 탁월한 백림추출물을 선별하였다. 백림은 임상에서 내복하는 처방보다는 창(瘡)을 수렴(收斂)하는 처방에 많이 사용되고 있으며, 부분적으로 결장, 직장암 또는 유방종양에 다른 본초와 배합하여 응용된다.²³⁾ 그러나, 현재까지 폐암 치료 효과에 대한 체계적인 연구는 전무하다. 따라서, 본 연구에서 인간 유래 폐암세포 A549 세포에서 백림추출물의 세포사멸 효과를 처음으로 관찰하였다.

항암치료의 대부분은 정상세포에 대한 부작용이 그 한계점으로 대두되며, 이를 극복하기 위한 다양한 방법이 모색되고 있다. 폐암에서 암세포의 분화와 성장을 촉진하는 epithelial growth factor receptor(EGFR)을 타겟으로 치료하여 항암치료의 선택성을 증가시키는 맞춤형 표적치료가 제시되고 있다.²⁴⁾ 나아가 천연소재의 항암활성물질의 발굴연구는 현재 사용되고 있는 표준 1차 화학항암제 시스플라틴과 탁솔, 알립타 등의 화학항암제의 부작용의 극복과, 병용 시 상승효과의 가능성을 제시할 수 있다.²⁵⁻²⁹⁾ 최근 암치료에 있어 한의학적인 접근이 다양해지고

그 효과에 대한 생체 내 기전이 과학적으로 입증되고 있다.^{30, 31)}

본 연구에서는 백림추출물의 폐암세포 사멸효과 및 세포내 기작을 연구하였다. 세포의 사멸은 크게 apoptosis, 비 apoptosis로 분류되는데 이 중 apoptosis는 caspases의 다단계 활성화로 apoptotic bodies를 형성하므로 면역 활성화를 회피할 수 있는 프로그램된 사멸과정이다.³²⁾ 이는 autophagy와 necrosis와 같은 비 apoptotic 세포사멸과 구분되며 주변 조직손상 또는 면역반응을 유발하지 않으므로 항암치료의 주된 전략 중의 하나이다.³³⁾ 백림추출물은 농도의존적으로 PARP를 절단하여 full length PARP의 양은 감소되고 PARP cleavage 형의 양은 증가되었다. Apoptotic bodies의 형성은 상위 caspases의 다단계 활성화에 의하여 궁극적으로 caspase 9의 cleavage에 기인한다.³⁴⁾ 백림추출물은 농도의존적으로 caspase 9의 절단형을 증가시켰으며 36시간에 최대 증가를 나타내었다. 이러한 백림추출물의 PARP 절단 및 caspase 9의 활성화는 AE의 apoptosis 매개성 세포사멸을 증명한다.

Apoptosis의 공통경로인 caspase 9의 활성화

는 내인적 경로 또는 외인적 경로에 의한 다단계 반응으로 일어나는 과정으로, 미토콘드리아 기능성 변화는 내인적 경로와 밀접한 관련성이 있다. Bcl-2 family 단백질 내 pro-apoptotic protein과 anti-apoptotic protein으로 구별되며, 이러한 pro-apoptotic 인자와 anti-apoptotic 인자의 비율 변화가 apoptosis 활성을 조절하는데,¹³⁾ 본 연구에서 발굴한 백림추출물은 pro-apoptotic protein에 속하는 Bax, Bad의 발현을 용량의존적으로 증가시키고, anti-apoptotic protein인 Bcl-xL의 단백질을 유의적으로 감소시켰다. 따라서, 백림추출물은 내인적 경로를 매개한 apoptosis의 활성화를 통해서 인간유래 폐암세포 A549의 독성을 유도한다.

암세포의 증식은 정상세포와 구분되는 특징으로서 영양인자에 대한 암세포의 증식억제는 항암작용의 주요한 타겟이다. 백림추출물은 세포독성이 나타나지 않는 저용량 30 μ g/ml의 농도에서 암세포의 증식을 현저하게 억제하였다.

결론적으로, 폐암세포주 A549에서 백림추출물은 내인적인 경로를 매개한 자가사멸과 암세포의 증식억제의 두 가지 표적에서 유의적인 효과를 나타내므로, 폐암을 치료할 수 있는 활성 후보물질로의 가능성이 높은 것으로 사려된다. 전임상 동물모델에서 백림추출물의 항암효과 연구는 향후 수행되어야 할 과제이다.

V. 결 론

인간유래 폐암세포주 A549에 백림추출물(AE)의 투여는 자가사멸을 통한 세포독성 및 암세포 증식 억제 효능을 나타낸다.

1. 백림추출물을 100 μ g/ml 이상의 농도에서 농도 유의적으로 세포생존율이 감소하였다.

2. 백림추출물은 농도 의존적(100-500 μ g/ml)으로 자가세포사멸에 관여하는 단백질인 PARP의 full length를 감소시켰으며, Caspase 9 활성

화형은 유의적으로 증가하였다.

3. 백림추출물에 의하여 자가세포사멸의 pro-apoptotic 단백질인 Bax와 Bad의 발현은 농도 의존적으로 증가했으나, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-xL은 급격히 감소하였다.

4. 세포독성이 나타나지 않는 저용량인 30 μ g/ml의 백림추출물을 처리한 경우 암세포의 증식이 대조군에 비하여 66% 억제되었다.

이상의 결론으로부터 백림은 폐암의 사멸과 증식억제 효과를 나타내어 폐암 치료제로서의 가능성이 기대되며, 향후 지속적인 연구의 필요성이 제기된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 동국대학교의 교원 해외연수 연구년 지원을 받아 수행된 연구이다.

참고문헌

- 1) 통계청. 2010년 암사망률통계(지정통계 10154호). 대전: 통계청. 2011.
- 2) 보건복지부. 2009년 암발생률통계(지정통계 11744호). 대전: 통계청. 2011.
- 3) 김혜영. 암의 조기검진; 폐암의 조기진단. 대한내과학회지. 2010; 79(3): 231-6.
- 4) Bold RJ, Termuhle PM, Mcconkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. Surg Oncol. 1997; 6: 133-42.
- 5) Maroun JA, Anthony LB, Blais N, Burkes R, Dowden SD, Dranitsaris G, Samson B, Shah A, Thirlwell MP, Vincent MD, Wong R. Prevention and management of chemotherapy-induced diarrhea in patients with colorectal cancer: a consensus statement by the Canadian Working Group on

- Chemotherapy-Induced Diarrhea. *Curr Oncol*. 2007; 4(1): 13-20.
- 6) De Gramont A, Figier A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000; 18(16): 2938-47.
 - 7) 이상래, 이종일, 정경진. 한국항암본초. 1판. 서울: 진솔. 2004: 389-90.
 - 8) 안세영, 김순일. 본초정의. 1판. 서울: 청홍. 2009: 504.
 - 9) 뇌재권, 장정모. 중화임상중약학(상권). 북경: 인민위생출판사. 1998: 557-9.
 - 10) 박종희. 한약백과도감(상권). 1판. 서울: 신일상사, 2002: 310.
 - 11) 김장현, 친진홍, 김성운, 박용기. 백림의 항알레르기 효능에 대한 연구. 대한본초학회지. 2008; 23(4): 91-101.
 - 12) 이성호, 김동석, 정연봉. Adriamycin의 독성 발현에 미치는 백림(*Ampelopsis radix*)의 영향. 한국식품영양학회지. 1994; 7(3): 232-8.
 - 13) 박승만, 안상우, 조종관. 백림 抽出物이 腫瘍免疫에 미치는 영향. 한국한의학회연구원논문집. 2005; 11(2): 113-40.
 - 14) Sartorius U, Schnitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBiochem*. 2001; 2: 20-9.
 - 15) Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006; 25(34): 4798-811.
 - 16) Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. A novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 85: 817-27.
 - 17) Martinou JC, Green DR. Membrane perturbations induced by the apoptotic Bax protein. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2: 63-7.
 - 18) Spampanato C, De Maria S, Sarnataro M, Giordano E, Zanfardino M, Baiano S, Carteni M, Morelli F. Simvastatin inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis correlated to activation of Bax and down-regulation of BCL-2 gene expression. *Int J Oncol*. 2011; 1273-80.
 - 19) Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol*. 2003; 22: 15-20.
 - 20) Lee JW, Cho MK. Phenethyl isothiocyanate induced apoptosis via down regulation of Bcl-2/XIAP and triggering of the mitochondrial pathway in MCF-7 cells. *Arch Pharm Res*. 2008; 31(12): 1604-12.
 - 21) Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J, Barrett MJ, Pietinen P, Malila N, Tala E, Liippo K, Salomaa ER, Tangrea JA, Teppo L, Askin FB, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen JK. Alpha-Tocopherol and Beta-Carotene Supplements and Lung Cancer Incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: Effects of Base-line Characteristics and Study

- Compliance. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1560-70.
- 22) CAEron E, Pauling L, Leivovitz B. Ascorbic acid and cancer. *Cancer Res.* 1979;39(3):663-78.
- 23) 전백문. 항암중약적임상효용. 1판. 상해:상해번역출판공사 1987:90.
- 24) 이계영. 폐암의 표적치료제. *J Korean Med Assoc.* 2008;51(5):483-91.
- 25) 김한섭, 홍순복, 성현제, 문근아, 윤유식. 녹혈의 化學療法 抗癌劑 副作用 抑制 効果. *생약학회지.* 2003;34(2):145-9.
- 26) 조수인, 김형우. Cisplatin 유도 신장독성에 대한 蓮根 추출물의 보호 효과. *대한본초학회지.* 2003;18(4):127-34.
- 27) 이경태, 노영수, 안규석, 장성구, 정지창. 생약제제인 이공산(異功散)의 Cisplatin 유도 신장 독성 보호 효과. *생약학회지.* 1998;29(3):258-64.
- 28) 안창범, 권혜연, 윤현민, 장경진, 송춘호. 黃芩藥液이 Cisplatin에 의해 유발된 急性腎不全에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌.* 2002;19(3):156-67.
- 29) 박춘하, 채우석, 윤여충. 車前子藥液이 cisplatin에 의해 유발된 급성신부전에 미치는 影響. *대한침구학회지.* 2004;21(2):155-64.
- 30) Choi WC, Smirnova Z, Kubasova I, Baryshnikov A. Antitumour Efficacy of the Allergen-removed extract(ACM909Q) in *Rhus Verniciflua*. *Eur J Pharm Sci.* 2002;17:77-85.
- 31) Jin CH, Shin EJ, Park JB, Jang CG, Zhengyi Li, Kim MS, Koo KH, Yoon HJ, Park SJ, Choi WC, Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima, Kim HC. Fustin flavonoid attenuates B-amyloid(1-42)-induced learning impairment. *J Neurosci Res.* 2009;87(16):3658-70.
- 32) Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med (Maywood, N.J).* 2003;228(9):995-1003.
- 33) 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.
- 34) Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large(approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem.* 1999;6:274(32):22686-92.