

인간 간암세포주 HepG2에서 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리에 의한 抗腫瘍 효과

백은기* · 문구 · 원진희 · 김동웅 · 백동기 · 윤준철 · 송봉길 · 이병호 · 박상구

원광대학교 한의과대학 내과학교실

Anticancer Effect of Combination with Paljinhangahm-dan and Adriamycin on HepG2 Human Malignant Hepatoma Cell Line

Eun Ki Baek*, Goo Moon, Jin Hee Won, Dong Ung Kim, Dong Gi Baek, Jun Chul Yoon, Bong Gil Song, Byung Ho Lee, Sang Gu Park

Department of Internal Medicine, college of Oriental Medicine, Wongkwang University

This study was designed to elucidate the synergistic cytotoxic mechanisms of the co-treatment of adriamycin and Paljinhangahm-dan in human hepatoma malignant cancer cell line, HepG2. The combination of adriamycin and the ethanol extract of Paljinhangahm-dan synergistically augmented the cytotoxicity of Adriamycin and Paljinhangahm-dan in HepG2 cells. The cytotoxicity of two drugs was revealed as apoptosis characterized by DNA fragmentaton in agarose gel electrophoresis. The apoptotic cytotoxicity of adriamycin and Paljinhangahm-dan was accompanied by the cleavage of procaspase -3 protease and PARP. Of note, anti apoptotic Bcl2 protein was obviously decreased, but Fas was dramatically increased in HepG2 cells co-treated with Adriamycin and Paljinhangahm -dan. In addition, through 2-D gel electrophoresis, we observed that the expression levels of a lot of proteins were obviously changed by the status of drug treatments. This results suggest that the synergistic cytotoxicity of the co-treatment of adriamycin and Paljinhangahm-dan might be caused by the changes of the expression levels of a lot of proteins which play pivotal roles in cell survival or death.

Key words : Paljinhangahm-dan(八珍抗癌丹), adriamycin, anticancer effect

서 론

암은 개체를 구성하는 정상세포가 여러 자극에 의해 유전자의 형질전환이 발생하여 무절제한 증식, 이른바 過剩成長으로 이뤄진 변형세포의 집단으로 주위 정상 조직에 침윤되어 파괴적이며 다른 조직으로 전이되어 인간의 건강과 생명에 위험을 주는 질병이다^{1,2)}. 암이 현대 사회의 난치병으로 대두된 이래 동서양의 의학자들의 끊임없는 노력과 의학기술의 발달로 암의 진단 및 치료방법이 향상되고 있으나 아직도 암은 인류가 당면하고 있는 가장 두려운 질병중의 하나이다.

현재까지 개발된 西洋醫學의 암치료법은 化學療法, 放射線療

法, 免疫療法 및 外科의 手術 등이 사용되고 있으나 각 癌腫에 대한 受容性 差異, 副作用, 再發 및 合併症 등의 문제점이 아직까지 존재하고 있는 실정이다³⁾.

韓醫學에서의 암치료는 病因, 病位, 性質 및 病人의 상태에 따라 陰陽氣血과 臟腑의 虛實에 근거하여 益氣補脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 補益을 위주로 하는 扶正固本法과 行氣理氣, 活血化痰, 清熱利濕, 軟堅散結하는 攻邪法 및 扶正固本法과 攻邪法을 병용하는 扶正祛邪法 등의 3가지로 분류하여 활용하고 있다^{4,5)}. 이 중에서 인체의 免疫能力을 강화시키는 扶正固本法과 “祛邪而不傷正 扶正而不助邪”하여 祛邪하되 正氣를 손상시키지 않는 扶正祛邪法을 가장 효과적인 방법으로 제시하였다^{6,7)}.

이에 최근에는 抗癌劑의 부작용을 줄이면서 抗腫瘍效果를 극대화하기 위하여 한약을 병용한 실험적 연구가 보고 되었는데 유⁸⁾ 등은 君理湯加減方이 抗腫瘍 免疫反應과 抗癌劑로 誘發한

* 교신저자 : 백은기, 서울 송파구 송파동 20-8, 경원대학교 부속 서울한방병원 · E-mail : jurio99@hanmail.net · Tel : 02-425-3456 · 접수 : 2003/07/14 · 수정 : 2003/08/25 · 채택 : 2003/10/06

副作用에 미치는 影響을, 김⁹⁾ 등은 消積白朮散이 Bleomycin의 副作用減少와 抗癌效果에 미치는 影響을 보고 하였으며 김¹⁰⁾ 등은 八珍湯合化積丸의 抗腫瘍效果에 관한 연구를, 그리고 이¹¹⁾ 등 및 임¹²⁾ 등은 각각 八珍湯合化積丸 및 adriamycin의 병용처리에 의한 癌細胞의 死滅 효과가 증대될 수 있음을 보고하였다.

八珍抗癌丹은 원광대학교 비계내과학 교실에서 八珍湯合化積丸에 白花蛇舌草를 加하여 사용하는 처방으로 白花蛇舌草는 清熱解毒, 利水通淋, 活血化痰, 消癰의 효능이 있어 消化器 腫瘍, 淋巴癌 및 各種 癌에 대한 抗癌효과와 八珍湯合化積丸의 健脾益氣, 活血祛瘀, 軟堅消腫, 抗癌 효과가 같이 작용하는 처방이다^{13,14)}. 이에 대한 최근의 연구로 이¹⁵⁾는 八珍抗癌丹의 인간 前骨髓性 白血病 細胞 死滅에 관한 效果를, 백¹⁶⁾은 八珍抗癌丹의 急性 骨髓性 白血病 細胞에서 抗腫瘍 效果를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 항암작용이 광범위하여 임상에서 널리 이용되는 抗癌劑이지만 약물축적시 심각한 심근 손상을 초래하는 adriamycin과 한방에서 암치료에 사용하는 八珍抗癌丹의 병용처방에 대한 세포독성의 상승효과를 확인하고 그 세포고사 작용기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 인간의 肝癌에서 유래된 간암세포주 HepG2에 두 약물의 병용투여 후에 세포생존율, procaspase-3 protease의 분해, Fas 및 Bcl2 단백질의 발현, 그리고 2-D gel을 이용한 八珍抗癌丹 및 adriamycin의 병용처리에 의한 암세포 고사능의 증진효과에 관련된 단백질들의 발현변화 양상을 분석하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 八珍抗癌丹은 원광대학교 비계내과학교실 처방에 의거하였으며 1첩의 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Paljinhangahm-dan

한약명	생약명	중량(g)
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	12
人參	Radix ginseng	6
白茯苓	Poria	6
生地黃	Rhizoma rehmanniae	6
醋紫甲	Carapax amydae	6
穿山甲	Squama manitis	6
白朮	Rhizoma atractylodia macrocephalae	4
當歸	Radix angelicae gigantis	4
赤芍藥	Radix paeoniae rubra	4
三稜	Rhizoma scirpi	4
蓬朮	Rhizoma curcumae zedoariae	4
香附子	Rhizoma cyperi	4
乳香	Mastrix	4
川芎	Rhizoma cnidii	4
甘草	Radix glycyrrhizae	3
Total		77

2) 檢液調製

실험에 사용된 藥材는 에탄올 용매를 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 먼저 에탄올추출물은 八珍抗癌丹 145g을 에탄올 1ℓ와 함께 플라스크에 넣어 24시간 방치한 다음

거즈로 여과하고 3,200 rpm으로 20분간 원심분리 후 濃縮器 (Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥시킨 것을 試料로 사용하였다. 이 八珍抗癌丹 에탄올 추출물을 이하 Herb extract라 부른다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 minimum essential medium(MEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum : FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였으며, 배양용기(96-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, SanJose, CA, U.S.A.) 제품을 사용하였다. MTT (methyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), Rhodamine 123은 Sigma사(St. Louis, Missouri, U.S.A.) JC-1은 Molecular probes (Pitchford Avenue, OR, U.S.A.)제품을 사용하였다. Bcl-XL, Bax, Bak 등의 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, U.S.A.), anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham사(Buckingham shine, England) 제품을 anti-cytochrome C 항체는 Pharmingen사(San Diego, CA, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. Genomic DNA 추출에 사용한 Wizard Genomic DNA purification kit는 Promega사(Medison, WI)에서 구입하였다. 항암제 5-fluorouracil (FU)는 중외제약 제품을, adriamycin은 일동제약 제품을 각각 사용하였다.

2. 방법

1) HepG2 간암세포주 배양

인간 간암세포주인 HepG2(KCLB 58065)는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 10% 우태아 혈청이 포함된 MEM(Gibco BRL, England) 배양액으로 배양하였으며 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 한 약제 등을 처리한 뒤 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 변화실험을 수행하였다

2) 세포 생존율 측정

세포 생존율 조사는 MTT assay 방법을 이용하였다. 簡記하면 세포 배양관(24-well plate)에 세포(1×10⁵세포수/ml)를 1ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음, MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 1/10이 되도록 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 0.1ml/well을 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 조사하기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit를 이용하였다. 먼저 quercetin 등이 처리된 세포를 수확, nuclear lysis buffer(100mM NaCl₂, 40mM Tris-Cl, pH 7.4, 20mM EDTA, 0.5% SDS)와 반응

하여 세포를 파쇄한 후 RNase를 37℃에서 5분간 처리하여 RNA를 제거하였다. 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거한 핵추출물은 isopropanol 침전에 의하여 응축하여 DNA를 70% 에탄올에 세척하여 진공 건조기로 건조하였다. DNA 정량은 응축된 DNA pellet에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 부가하여 용해한 후 260nm와 280nm의 파장의 spectrophotometer (Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)을 이용한 흡광도 측정으로 결정하였다. DNA 5µg은 1.8% agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등을 이용하여 분절을 관찰하였다.

4) Western blot analysis

세포는 한약재 등을 처리 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin)과 4℃에서 30분간 반응하였다. 세포 파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액(단백질 : 200µg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bcl2, Fas, PARP 및 caspase-3에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

5) 2-D gel 전기영동

(1) 시료 준비와 등전위 전기영동(IEF)

HepG2 세포에 quercetin을 처리 후 포집하여, 세포 파쇄용액과 4℃에서 30분 반응시켰다. 세포 파쇄액은 12,000rpm에서 20분간 원심분리 후 Bradford 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질은 등전점(isoelectric point)에 기초하여 분리하기 위하여 immobiline dry strip(Phamacia, Buckinghamshire, England)을 사용하였다. Strip은 IEF 시행하기 전에 rehydration solution(8M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG ampolyte, 0.3% DTT, Bromophenol blue)에 단백질(250µg)과 함께 넣고 12시간 rehydration을 시행하였다. Rehydration을 시행한 strips은 MultiphorII(Phamacia)에서 100kVh로 focussing하였다(0-300V : 1min, 300-3500V : 1hr 30min, 3500V : 10hr). 등전위 전기영동을 끝낸 strip은 평형화 용액(30% glycerol, 6M urea, 2% SDS, 50mM Tris-HCl, 65mM DTT, bromophenol blue)으로 평형화 하였다.

(2) SDS-PAGE

단백질은 분자량에 기초하여 분리하기 위하여 단일 12% acrylamide gel(180× 200×1.0mm)을 사용하였다. 평형화된 strips은 gel 상단에 옮기고 1% agarose sealing solution으로 고정한

후, protean II XI cell(BIO-RAD, CA, U.S.A.)로 각 gel당 40mA로 전기영동 하였다. gel속의 분리된 단백질은 silver staining으로 확인하였다.

결 과

1. 八珍抗癆丹 및 Adriamycin이 사람 간암세포주의 生存率에 미치는 影響

항암·화학요법제인 八珍抗癆丹과 adriamycin과 암세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 인간 간암 세포주인 HepG2 세포에 다양한 농도의 八珍抗癆丹과 adriamycin을 단독 혹은 병용 처리한 후 세포생존율을 MTT 방법으로 조사하였다(Fig. 1). 먼저 八珍抗癆丹 단독처리는 세포독성을 농도와 시간의존적으로 유발시켰다(Fig. 1A). 또한, adriamycin 단독처리시 1µg/ml에서 43%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1B). 특히 八珍抗癆丹 62.5µg/ml 단독처리군, adriamycin 0.25µg/ml의 단독처리군의 세포 생존율이 각각 84% 와 75%인것에 비교하여 두 약물의 병용처리는 HepG2 세포에서의 이들 약제에 대한 감수성(sensitivity)을 증가시켜서 18%의 세포생존율을 보여 세포독성이 현저히 증가됨을 나타내었다(Fig. 1C). 이러한 八珍抗癆丹과 adriamycin의 세포독성에 대한 병용처리의 상승효과는 두 약물의 다양한 농도 조합에서도 관찰되었다.

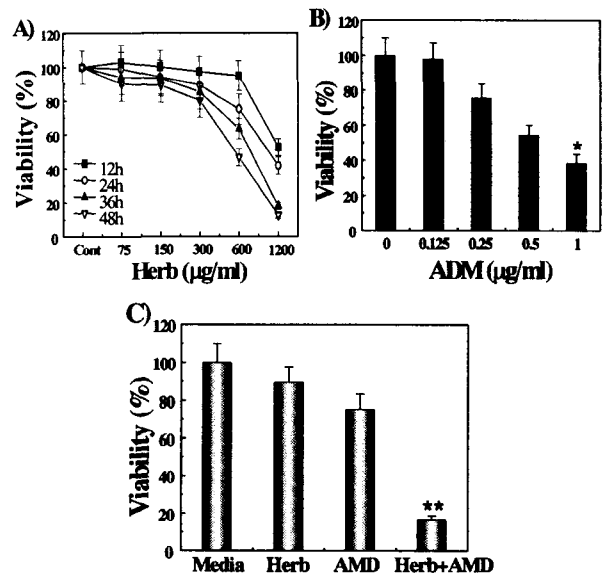


Fig. 1 The synergistic cytotoxic effects of the co-treatment of adriamycin and Paljinhangahm-dan in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with various concentrations of adriamycin or Paljinhangahm-dan alone, and the co-treatment of two drugs for 24 hr. Then, the cell viability was measured by MTT assay, and the data represented as mean of three independent experiments. Results were expressed as mean±S.D. of quadruplicates. *p<0.01, **p<0.001 by student's t-test

2. 八珍抗癆丹과 Adriamycin의 병용처리시 HepG2 세포주의 세포죽음 성격 규명

八珍抗癆丹과 adriamycin의 병용처리에 의한 암세포에서의 세포독성이 세포고사 기전에 의한 것임을 확인하기 위하여 HepG2 세포에 八珍抗癆丹 62.5µg/ml 단독, adriamycin 0.25µg/ml

mL 단독, 그리고 두 약물을 병용 처리한 24시간 이후에 genomic DNA를 추출하여 분절현상을 관찰하였다. 八珍抗癌丹이나 adriamycin 단독 처리군에서는 세포고사의 특징적인 DNA의 분절 혹은 분쇄 현상이 존재하지 않았으나, 두 약물의 병용 처리군에서는 뚜렷한 DNA 분절이 관찰되었다(Fig. 2).

이상의 결과는 HepG2 세포에서 관찰되는 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리에 의한 세포독성의 증가는 이들 약제에 의한 세포고사과정에 의해 초래되었음을 확인하였다.

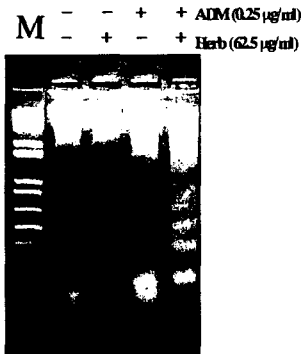


Fig. 2. The co-treatment of Paljinhangahm-dan and adriamycin induced DNA fragmentation in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with adriamycin(0.25µg/ml) or Paljinhangahm-dan(62.5µg/ml) alone, and the co-treatment of two drugs for 24 hr. Then, genomic DNA was isolated and separated on 1.8% agarose gel electrophoresis. Separated DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

3. 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리가 HepG2 세포의 Fas 단백질 발현변화에 미치는 영향

八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용에 의한 세포독성의 상승효과가 세포고사 기전에 의함을 확인할 수 있었기에 세포고사 신호전달기전의 중요 막수용체 단백질의 하나인 Fas 단백질의 발현변화를 Western blot으로 조사하였다. 八珍抗癌丹 62.5µg/ml 단독, adriamycin 0.25µg/ml 단독처리 실험군의 HepG2 세포 Fas 단백질 발현은 유의한 변화를 관찰 할 수 없었으나, 두 약물을 병용 처리 실험군에서는 Fas 단백질 발현이 현저히 증가하였다 (Fig. 3). 이때 각 실험군에 사용된 단백질의 양은 대조 단백질인 β-actin의 양이 동일함을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 3).

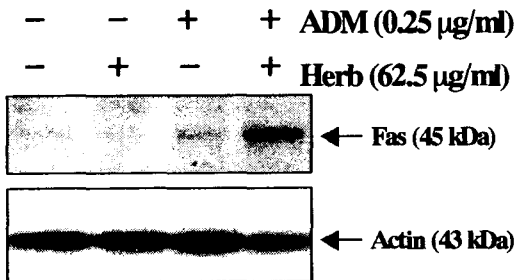


Fig. 3 The co-treatment of Paljinhangahm-dan and adriamycin increased the expression of Fas protein in HepG2 cells. Cells were treated with Paljinhangahm-dan(62.5µg/ml) or adriamycin(0.25µg/ml) alone, and the co-treatment of two drugs for 12hr. The same amount of protein from cell lysates were separated on 12.5% SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-Fas antibodies and the immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence(ECL system, Amersham, England).

4. 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리가 세포고사 신호전달 분자 PARP 절단 및 caspase-3 활성화에 미치는 영향

八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용에 의한 세포고사 유도현상이 세포고사 신호전달계의 중요 신호전달 막수용체인 Fas의 발현증가에 의한 것임을 확인하였으므로 하방 단백질인 caspase-3의 활성화와 그의 주요 표적인자인 PARP의 절단 여부를 八珍抗癌丹 62.5µg/ml 단독, adriamycin 0.25µg/ml 단독, 그리고 두 약물을 병용 처리한 24시간 후에 세포를 채취, 분쇄한 세포부유액으로부터 Western blotting 방법으로 조사하였다. 그 결과 八珍抗癌丹이나 adriamycin 단독 처리군에서는 활성을 보이지 않았던 caspase-3 단백질은 두 약물의 병용처리에 의하여 34kDa의 전구체가 절단되어 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 34kDa의 전구체가 절단되어 활성화된 caspase-3에 의해 또다시 절단되는 세포내 기질 단백질인 PARP 단백질이 절단되어 116kDa에서 89kDa로 분절되었음을 확인하여 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리가 caspase-3의 활성을 유도하였으며 이 결과로 인하여 세포내 PARP 단백질의 분절이 초래되어 HepG2 세포의 세포고사에 기여하였다고 판단되었다(Fig. 4).

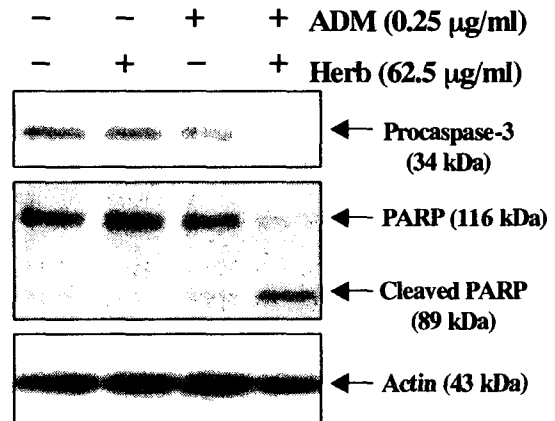


Fig. 4. The co-treatment of Paljinhangahm-dan and adriamycin increased the degradation of procaspase-3 and the cleavage of PARP protein in HepG2 cells. Cells were treated with Paljinhangahm-dan (62.5µg/ml) or adriamycin(0.25µg/ml) alone, and the co-treatment of two drugs for 24hr. The same amount of protein from cell lysates were separated on 12.5% SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-procaspase-3 and anti-PARP antibodies and the immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence(ECL system, Amersham, England).

5. 八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용처리가 세포고사 신호전달 분자 Bcl2 단백질의 변화에 미치는 영향

八珍抗癌丹과 adriamycin의 병용에 의한 세포독성의 상승효과가 미토콘드리아 기능과 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 세포고사에 중요한 역할을 수행하는 Bcl2 단백질의 발현변화를 조사하였다. 八珍抗癌丹 62.5µg/ml 및 adriamycin 0.25µg/ml을 24시간 동안 단독 혹은 병용 처리한 후에 HepG2 세포 부유액의 Bcl2 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. 八珍抗癌丹 및 adriamycin의 단독 처리는 HepG2 세포의 Bcl2 단백질 발현에 유의한 변화를 유도하지 못했으나 두 약물을 병용 처리한 실험군에서는 Bcl2 단백질의 발현이 감소하였다. 이때 단백질은 β-actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 5).

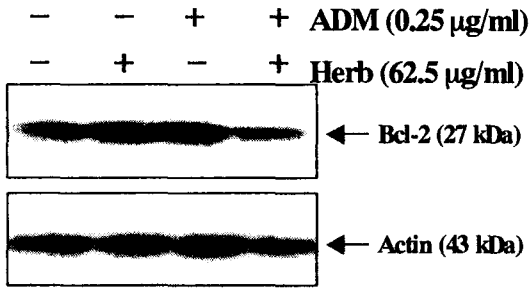


Fig. 5. The combination of Paljinhangaham-dan and adriamycin increased the expression of Bcl2 protein in HepG2 cells. Cells were treated with Paljinhangaham-dan(62.5µg/ml) or adriamycin(0.25µg/ml) alone, and the co-treatment of two drugs for 24hr. The same amount of protein from cell lysates were separated on 12.5% SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-Bcl2 antibody and the immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence(ECL system, Amersham, England).

6. 八珍抗癆丹과 adriamycin에 의한 HepG2 세포주의 세포고사에서 2-D를 통한 단백질 발현 분석

배양된 HepG2 세포에 八珍抗癆丹 62.5µg/ml 및 adriamycin 0.25µg/ml을 24시간 동안 단독 혹은 병용 처리한 후 포집하여, 파쇄한 후 단백질 추출물(250µg)의 2-D 전기영동을 시행하였고, 단백질 spots은 silver staining으로 가시화 하였다. Fig. 6에서는 단백질 250µg을 2-D gel 상에서 전개하여 약 300여개의 spots을 비교하였다(Fig. 6). 그 결과 八珍抗癆丹 및 adriamycin 단독처리 군에서는 대조군과 비교시 유의한 증가나 감소를 보이는 spots이 관찰되지 않았다. 그러나 두 약물의 병용처리군에서는 1, 2, 3, 5, 8, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 및 30번 spots은 대조군에 비하여 현저한 발현 감소를 보였으며, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 20, 21 및 22번 spots은 발현이 증가하였다. 특히 13, 19, 26, 27, 28, 29, 30번 spots은 두 약물의 병용처리에 의하여 단백질이 분해되어 사라짐을 관찰하였다(Fig. 7). 또한 pI 4.5~5.0 값을 갖는 60kDa의 6번 spot은 HSP60으로 추정 되어진다.

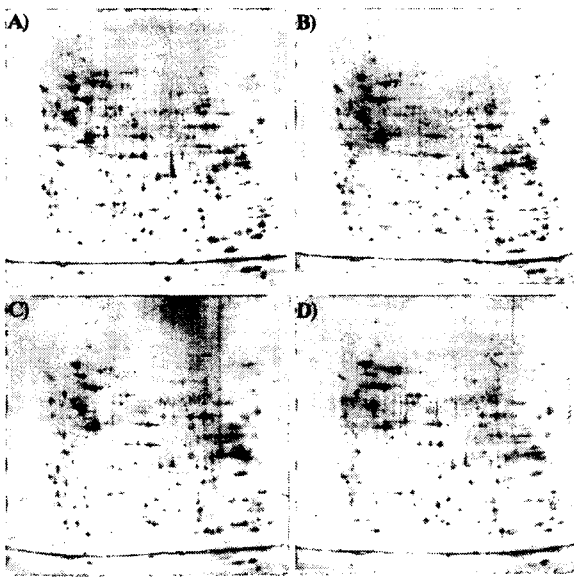


Fig. 6 Silver staining of 2-D gel in HepG2 cells. (A) Control cells, (B) Cells treated with Paljinhangaham-dan, (C) Cells treated with adriamycin and (D) Cells were treated with the combination of Paljinhangaham-dan and adriamycin.

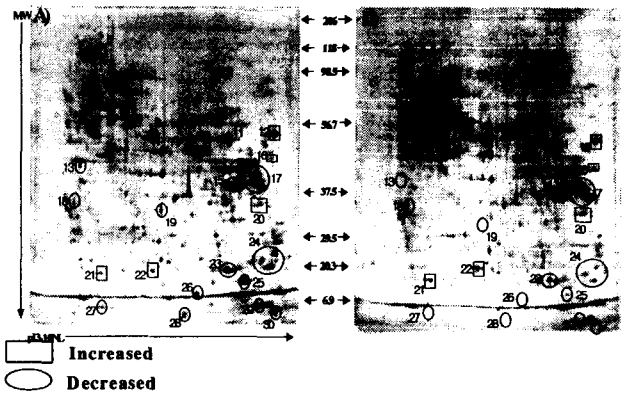


Fig. 7 Schematic representation of silver stained 2-D gel in HepG2 cells treated with the co-treatment of Paljinhangaham-dan and adriamycin for 24hr. Molecular weight (MW) and isoelectric point(pI) of a set of proteins identified in the pattern. Lysate was separated on 2-D electrophoresis and stained with silver staining. (A), Control cells and (D), Cells treated with combination of Paljinhangaham-dan and adriamycin.

고찰

腫瘍이란 세포의 정상 조절기능과 주위장기의 정상적인 영향력에서 벗어나 우리 몸에 이롭지 않은 세포들의 過剩成長을 의미하며 臨床 및 病態學적인 소견에 의하여 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 구분된다^{17,18}. 일반적으로 암이란 惡性腫瘍을 總稱하는 용어로 정상 조절기능에서 벗어나 주위 조직을 浸潤하고 轉移를 일으켜 정상 조직을 파괴하는 특징을 가진다¹⁸.

현재까지의 연구결과에 의하면 모든 암의 약 80%는 生活習慣 및 環境要因에 의하여 발생하는 것으로 인정되며¹⁷, 암 발생 원인을 분류하면 遺傳, 人種과 地理的 要因, 年齡, 免疫學的 因子 등의 內的因子와 吸煙, 藥劑, 大氣汚染등의 化學的 發癌物質, 物理的 發癌物質, 바이러스와 같은 外的因子로 나눌 수 있다¹⁸.

西洋醫學에서의 암 치료법은 外科處置, 放射線療法, 化學療法, 호르몬療法, 免疫療法 등이 사용되고 있지만 그에 수반되는 부작용과 한계점이 나타나기 시작했다¹⁷. 그래서 최근의 항암제 연구는 細胞毒性 보다는 암세포에 대하여 항암효과를 유지하면서 부작용이 적은 免疫療法 및 한의학적 방법이 중요시되고 있다^{8-12,15,16,19}. 한의학에서는 종양에 일치하는 단어는 없지만 많은 한의학 문헌에서 종양에 관한 내용을 찾아볼 수 있는데 종양에 대한 기술은 殷墟의 甲骨文에서 '瘤'라 한 것이 처음이며²⁰, 이후 內經에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 癥, 五臟之積 등에 대하여 구체적으로 언급하였으며 歷代 醫書에서 종양의 위치와 병리적 특성에 따라 癭瘤(五癭六癭), 反胃, 乳癆, 陰瘡, 石疽, 失榮, 惡核, 喉疔, 舌疔, 缺盆疽 등으로 다양하게 서술하고 있다²¹. 한의학적 암의 發生原因으로는 外因, 內因, 不內外因으로 나눌 수 있는데 風, 寒, 暑, 濕, 燥, 火의 外感六淫과, 怒, 喜, 思, 悲, 憂, 驚, 恐에 의한 七情內傷과 辛鹹, 甘苦, 煎炒, 酒濕의 飲食內傷 및 過勞, 房勞過度의 不內外因으로 들 수 있으며, 이들은 인체의 正氣虛와 복합적으로 작용하는 것으로 볼 수 있다²⁰⁻²³. 上記의 원인 중에서도 특히 正氣虛는 모든 질병을 일으키는 內的條件으로 正氣는 一切의 생리 활동을 정상적으로 유지시키고 內外的 病因으로부터 인체를 방어하고 질병으로부터 회복시키는 작용을 한다²⁴. <內經·評熱病

論》²⁵⁾에 “邪氣所湊 其氣必虛”이라 하였고, 《靈樞·百病始生》²⁶⁾에 “風雨寒熱 不得虛邪 不能獨傷人 卒然逢疾風暴雨 而不病者 皆無虛 故邪不能獨傷人”이라 하여 비록 病邪가 침범하더라도 正氣가 虛하지 않으면 病을 일으킬 수 없음을 말하였다. 또한, 《景岳全書·積聚篇》²⁷⁾에 “脾胃不足 及虛弱失調之人 多有 積聚之病”이라 하였고 “壯人無積 虛人則有之 脾胃怯弱 氣血兩衰 四時有感 皆能成積”이라 하여 正氣가 허약한 사람에게 종양이 잘 생긴다고 하였다. 그러므로 한의학에서 암이란 外感六淫, 七情內傷, 飲食不節, 過勞 및 邪氣 등에 의하여 個體의 臟腑機能과 氣血이 失調되어 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 正氣虛弱, 經絡瘀阻 등의 病理變化가 나타나고 이런 變化가 單獨 혹은 相互錯雜하는 慢性的인 疾患으로 이해할 수 있다^{20,21)}. 따라서 암의 치료도 正氣와 衛氣를 強化하여 宿主의 抗癌能力을 증강시키는 扶正固本法과 祛邪하되 人體의 正氣를 補益하며 正氣를 損傷시키지 않는 扶正祛邪法이 널리 시행되고 있는데^{7,27-29)}, 특히 최근에는 한·양방을 결합한 연구 및 치료법이 점차로 시행되고 있으며 본 연구에 사용한 八珍抗癌丹은 이러한 扶正祛邪法에 충실한 처방으로 健脾益氣, 活血祛瘀, 軟堅消腫, 抗癌하는 치료효과를 갖고 있다^{14,16)}.

구성약물중 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草는 補氣健脾하고 生地黃, 當歸, 赤芍藥, 川芎은 補肝腎, 補血養血하며 香附子, 乳香, 三稜, 蓬朮은 行氣破血, 消積止痛하며 穿山甲은 活血通經, 消腫排膿하고, 鱉甲은 滋陰潛陽, 軟堅消結하며 白花蛇舌草는 清熱解毒 작용으로 癌細胞를 억제하는 祛邪의 효능을 지니고 있는데 이러한 효능으로 인해 八珍抗癌丹은 면역기능을 향상하며 抗腫瘍效果를 나타낸다^{13-16,30-32)}.

세포고사(apoptosis)는 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요기전³³⁾으로 인식되면서 1980년대 후반기 부터는 생명과학에서 중요 관심영역으로 인식되어 많은 발전을 가져왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다^{34,35)}. 세포고사 기전의 이상은 암, 자가면역질환, 퇴행성 질환 및 HIV 등의 병리에 중요한 역할을 수행함이 보고되었다^{36,37)}. 특히 항암치료에 대한 내성 발현이나 감수성 저하 등도 세포고사 신호전달기전의 기능과 밀접한 관계가 있다. 최근 연구에 의하면 항암 치료에 흔히 사용되는 많은 화학요법 제재들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 암조직이나 세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀졌고 그 작용기전으로는 Fas/ Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide 경로, 초기발현 유전자 발현, 단백질 분해효소 caspase family cysteine protease 활성화, DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 활성화 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다³⁸⁾. 이러한 이유로 항암치료의 효용성은 세포고사 기전의 활성화와 밀접한 관련이 있으며 성공적인 암 치료법의 개발을 위해 세포고사 현상에 대한 정확한 생화학적 작용기전에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다.

그러나 서양의학에서 사용되고 있는 항암치료제들의 대부분은 그 효능에도 불구하고 치료과정에서 동반되는 심각한 부작용,

즉 세포독성이나 장기독성 때문에 그 사용에 제약을 가지고 있다. 한방적인 종양의 치료기술이나 약제는 수세기 동안 사용되어 오면서 그 효능의 작용기전은 실험적으로 제공되어 있지 않지만 부작용 등으로 인한 안전성의 문제는 없는 것으로 수세기 동안의 경험으로 이미 입증되어 있는 상황이다. 이러한 사실에 근거하여 본 연구자는 한·양방에서 사용되는 항암치료제의 장점을 이용하여 두 분야 약제의 병용치료에 의한 항암치료의 상승효과에 대하여 치료법의 개발에 관심을 가지게 되었다. 특히, 김¹⁰⁾, 임¹²⁾등의 선행 연구에서는 八珍抗癌丹의 처방 내용물 중 白花蛇舌草가 제외된 것 외에는 동일한 약제로 구성된 八珍湯合化積丸과 adriamycin과의 병용투여로 암세포의 세포고사능을 높일 수 있다고 보고하였다. 한편, 인간 염색체 염기서열 분석의 완성을 계기로 생물학 분야는 새로운 전기를 맞고 있다. 이 중 유전자학 연구와 생물정보학의 발전은 세포고사 신호전달계 지도를 규명할 수 있는 많은 정보를 제공하고 있다³⁹⁾. 본 연구에서는 이러한 최신 연구기법을 이용하여 八珍抗癌丹 및 adriamycin의 병용치리에 의한 암세포 고사능의 증진효과에 관련된 단백질들의 발현 변화 양상을 분석하고자 하였다.

Adriamycin과 八珍抗癌丹의 세포독성에 대한 상승효과는 간암 세포주인 HepG2세포에서 관찰되었다(그림 1). 또한 Adriamycin과 八珍抗癌丹의 병용처방에 의한 세포독성이 세포고사 현상에 의함은 agarose gel 전기영동법으로 확인하였다. 두 약물의 병용처방시 HepG2 세포는 전형적인 세포고사의 특징인 사다리형 핵분열(ladder-pattern DNA fragmentation)이 관찰되었다(그림 2). 또한 이러한 Adriamycin과 八珍抗癌丹의 병용치리는 세포고사 기전중의 하나인 Fas/Fas-L의 상호작용에 관여하는 Fas 단백질의 현저한 발현을 촉진시키는 것을 확인하였다(그림 3). 이러한 연구 결과는 임¹²⁾등의 선행 연구에서 제시한 Chang 및 HL-60 세포주를 이용한 adriamycin과 八珍湯合化積丸의 병용처방이 Fas 수용체의 발현증가를 통해 이루어진다고 보고한 것과 일치함을 보여준다. Adriamycin과 八珍抗癌丹의 병용처방에 의한 세포독성이 세포고사 현상임을 확인하였기에 그 작용기전의 하나인 caspase family cysteine protease의 활성화 여부를 조사하였다. 1986년 Ellis 및 Horvitz에 의하여 nematoid *C. elegans*에서 ced-3 및 ced-4의 mutation이 세포고사를 억제한다는 보고 이래로 ced-3의 mammalian homologue인 ICE가 clone되었으며 이는 후에 caspase-1 protease로 명명되었다⁴⁰⁾. 그 이후에 약 14종류의 caspase family cysteine protease의 subfamily가 밝혀져 있으며 이들 유전자는 cysteine기반을 선택적으로 절단하는 단백질 분해효소(protease)를 coding하고 있다⁴⁰⁻⁴³⁾. 본 연구 결과에서 adriamycin과 八珍抗癌丹의 병용처방은 HepG2 세포주에서 비활성의 procaspase-3 protease가 사라짐을 확인하여 caspase-3가 활성화됨을 간접적으로 확인하였다(그림 4). Caspase-3 protease는 mammalian ced-3 homologue로서 ICE라고도 알려져 있으며 세포질에서는 pro-enzyme 형태로 존재한다. Proenzyme 형태의 caspase-3 protease는 caspase-8 및 9와 같은 initiator caspase에 의하여 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환된다. 세포고사 과정에서 caspase-3 protease의 세포내

표적인자로는 protein kinase C(PKC), lamin 및 PARP 등이 알려져 있으며 endonuclease의 활성화도 caspase-3 protease의 활성화에 의존적이라고 알려져 있다^{44,45}.

APO-1 혹은 CD95라고도 알려져 있는 Fas 및 이의 ligand인 Fas-L은 세포고사 신호를 전달하는 activation-induced cell death(AICD)의 mediator라고 알려져 있다. 특히 면역반응을 약화시키거나 cytotoxic T 세포의 활성화 혹은 자연살해세포(natural killer cell)를 활성화시켜 종양세포를 제거하는데 Fas/Fas-L system은 중요하다고 알려져 있다. 또한 최근에 보고된 여러 종류의 항암 치료제가 Fas/Fas-L system을 통하여 세포고사 신호를 전달한다는 사실⁴⁶과 본 연구 결과(그림 3)의 두 약물의 병용치리에 의한 Fas의 발현증가는 논리적으로 상통하는 내용이다.

Bcl2는 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 유관한 암유전자로서 단백질의 분자량은 26kDa이며, 다른 암유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여한다고 알려져 있다⁴⁷. Bcl2는 산화-환원(redox cycle) 상태조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase cysteine protease 활성화, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절화, 스트레스에 의한 세포고사 신호전달계(JNK 및 p38 MAPK)의 활성화조절 등의 기능을 통하여 세포를 죽음으로부터 보호한다고 알려져 있다. 본 연구결과에서는 두 약물의 병용치리가 Bcl2의 발현을 현저히 감소시킴을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 두 약물에 의한 암세포주 세포고사의 상승효과는 Bcl2의 발현 감소도 크게 기여하였음을 시사하고 있다.

1980년대 20년 동안 유전자 조작 기술의 발달과 더불어 DNA 및 RNA를 포함한 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되어 high-throughput 유전자 분석 기술이 크게 발달되었다³⁹. 이를 이용하여 인간 게놈 프로젝트가 진행되어 전체 인간 유전자의 염기서열이 모두 밝혀졌으나, 그 유전자가 발현하는 단백질의 기능에 대한 연구는 현재 진행중이다⁴⁸. 본 연구에서는 八珍抗癆丹 및 adriamycin의 병용치리에 의한 암세포 고사능의 증진효과에 관련된 단백질들의 발현변화 양상을 분석하고자 2-D gel 전기영동을 시행하였다. 그 결과 2-D gel 전기영동을 이용하여 세포 단백질을 분리, 전개 하여 약 300여개의 spots중에서 八珍抗癆丹 및 adriamycin 단독처리군에서는 대조군과 비교시 유의한 증가나 감소를 보이는 spots이 관찰되지 않았다. 그러나 두 약물의 병용치리시 유의하게 발현이 감소하는 26개의 spots과 증가하는 10개의 spots을 확인하였다(그림 7). 이들 발현이 변화된 단백질들을 identity를 확인하고 세포고사에 미치는 영향을 규명하기 위해서는 발현 변화가 현저한 단백질 spot 30개를 분리하여 MALDI-TOF 방법으로 단백질의 질량과 펩타이드분석이 필요할 것으로 사료되며 이때 얻어진 정보는 암의 효과적인 치료에 중요한 정보를 제공하리라 사료된다.

결론

본 연구에서는 암 치료제로 가장 널리 사용되고 있으면서도 약물독성시 심각한 심근 손상을 초래하는 adriamycin과 한방에서 암치료에 사용하는 八珍抗癆丹의 병용치리에 대한 세포독성

의 상승효과를 확인하고 그 세포고사 작용기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 인간의 肝癌에서 유래된 간암세포주 HepG2에 두 약물의 단독 및 병용투여 후 세포생존율의 비교, procaspase-3 protease의 분해, Fas 및 Bcl2 단백질의 발현, 그리고 2-D gel을 이용한 八珍抗癆丹 및 adriamycin의 병용치리에 의한 암세포고사능의 증진효과에 관련된 단백질들의 발현변화 양상을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Adriamycin과 八珍抗癆丹의 병용치리시 간암세포주 HepG2 세포에서 세포독성의 상승효과가 관찰되었다. Adriamycin과 八珍抗癆丹의 병용치리시 세포독성은 DNA 분절 등이 관찰되는 세포고사에 의한 세포독성을 확인하였다. Adriamycin과 八珍抗癆丹의 병용치리시 HepG2세포에서 caspase-3 protease의 활성화가 증가하였으며 이 효소적 활성화는 세포내 표적인자인 PARP를 분해하여 85kDa 분절을 관찰할 수 있었다. Adriamycin과 八珍抗癆丹의 병용치리시 세포고사 신호전달분자인 Fas의 발현은 증가하고 세포의 생존에 관계된 Bcl2의 발현은 감소됨을 확인하였다. Adriamycin과 八珍抗癆丹의 병용치리시 세포내 단백질은 30개 부분에서 유의한 변화를 나타내었다.

이상의 결과 八珍抗癆丹은 adriamycin에 의한 암세포 세포고사를 증가시키는 효과가 있었으며, 이때 두 약물의 병용은 세포고사 신호전달계인 caspase family cysteine protease, Fas, Bcl2 그리고 아직 더 그 정체가 밝혀져야 할 30여개의 단백질 등이 관여함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2003년 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 수행되었으며 원광대학교의 연구지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울대학교출판부, p.1,95,96,126, 1989.
2. 문구 외 : 암 동서의 결합치료 1, 익산, 원광대출판국, p.35, 1999.
3. 이문호 외 : 내과학, 서울, 학림사, p.2466,2468,2479, 1986.
4. 上海中醫學院 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.621-635, 1986.
5. 楊寶仁 : 癌症的中醫治療, 河北, 河北科學技術出版社, pp.1,6,7, 12-22, 1992.
6. 홍원식:黃帝內經素問, 서울, 동양의학연구원, p.14,124,285, 1981.
7. 李萍萍 : 益氣消症方治療晚期腫瘤臨床研究, 中醫雜誌, 34(4): 217-219, 1994.
8. 유경태 외 : 君理湯加減方이 抗腫瘍 免疫反應과 抗癌劑로 誘發한 副作用에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 4(1):71-88, 1998.
9. 김태운 외 : 消積白朮散이 Bleomycin의 副作用減少와 抗癌效果에 미치는 영향, 大韓韓方腫瘍學會誌, 5(1):77-102, 1999.
10. 김성진 외 : 八珍湯合化積丸의 抗腫瘍效果에 관한 연구, 大韓韓方內科學會誌, 21(1):65-72, 2000.

11. 이병구 외 : 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용처리시 나타나는 syner gistic 抗腫瘍 效果에 관한 작용기전 연구, 大韓韓方內科學會誌, 21(3): 443-452, 2000.
12. Lim YS, So HS, Kim MS, Moon G, Won JH, Baek SW, Moon SR, Yang SH, Kim BJ, Ko CB, Park R. Palgin sensitizes the adriamycin- induced apoptosis via the enhancement of Fas/Fas ligand expression. *Life Sci*, 4;71(20):2391-401, 2002.
13. 신민교 : 臨床本草學, 서울, 영림사, p.569,570, 1997.
14. 潘敏求 외 : 中華腫瘤治療大成, 河北, 河北科學技術出版社, p.60, 1996.
15. 이건업 : 八珍抗癌丹의 인간 前骨髓性 白血病 細胞 死滅 效果, 원광대 박사학위 논문, 2001.
16. 백동기 : 八珍抗癌丹의 급성 骨髓性 白血病 細胞에서 抗腫瘍 效果, 원광대 석사학위 논문, 2002.
17. 서울대학교의과대학 : 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판부, pp.717-749, 1997.
18. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp.213,231-251, 1995.
19. 홍원식 역 : 現代中國의 癌治療法, 서울, 영문사, pp.17-35,81-84,361-388, 1980.
20. 최승훈 : 東醫腫瘍學, 서울, 행림서원, pp.19,32-42, 1995
21. 전병욱 외 : 癌腫의 病因病理에 關한 文獻의 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):83-101, 1995.
22. 김창중 : 病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp.72-74, 1988.
23. 문준전 외 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.78-90, 1990.
24. 안규석 외 : 韓醫學의 診斷類型에 따른 韓藥方劑의 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 9:1-20, 1994.
25. 홍원식 편찬 : 精校 黃帝內經素問, 서울, 동양의학연구원출판부 p.109,124,285, 1985.
26. 홍원식 편찬 : 精校 黃帝內經靈樞, 서울, 동양의학연구원출판부 p.32,36, 331,337, 1985.
27. 張介賓 : 景岳全書, 文淵閣四庫全書 第七七七冊, 서울, 여강출판사, p.451, 479,481, 1988.
28. 眞 暢 : 癌의 中藥治療, 서울, 東洋醫學, 18(1):56-63, 1992.
29. 李 挺 : 醫學入門, 서울, 翰成社, p.358, 390, 1982.
30. 李家康 외 : 中醫腫瘤防治大全, 北京, 科學技術文獻出版社, p.599, 1994.
31. 劉春安 외 : 抗癌中草藥大事典, 湖北, 湖北科學技術出版社, p.14,33,45,100,260,340,440, 638,710,752,776, 1994.
32. 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南, 湖南科學技術出版社, p.7,16,19,96, 122,194,213, 235,343, 1987.
33. Fadeel B, Henter JL, Orrenius S. : Apoptosis required for maintenance of homeostasis : Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by too little cell death. *Lakar-tidningen*, 22;97(12):1395-400, 1402, 3, 2000.
34. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. : Programed cell death and the control of cell survival. *Science*, 262: 695-700, 1993.
35. Williams GT. : Apoptosis in the immune system. *J. Patho*, 173:1-4, 1994.
36. Williams GT. : Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65:1097-1098, 1991.
37. Thomson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disea se. *Science*, 267:1456-1462, 1995.
38. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. : Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol*, 41:461, 1997.
39. Mills PB, Mills K, Johnson AW, Clayton PT, Winchester BG. : Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of alpha 1-antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics*, 1(6):778-786, 2001.
40. Alnemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87:171, 1996.
41. 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*, 273:3756-3764, 1998.
42. Han J, Lee JD, Bibbs L, and Ulevitch RJ. : A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265: 808-811, 1994.
43. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apop tosis. *Adv. Pharmacol.*, 41:61, 1997.
44. Widmann C, Gibson S. : Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem*. 273(12):7141-7147, 1998.
45. Kim Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. : Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase 3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem*, 272:31-138, 1997.
46. Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. : Sequential activation of ICE-like and CPP32-like protease during Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 380:723-726, 1996.
47. Reed. J. C. : Bcl2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol*, 124:1-6, 1994.
48. Wulfschle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF 3rd : New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics*, 1(10):1205-1215, 2001.