

# Cisplatin에 의한 뇌세포사멸에서 補中免疫丹의 방어효과

유경태\* · 문석재 · 원진희 · 김동웅 · 이종덕<sup>1</sup> · 원경숙<sup>2</sup> · 문 구

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실, 1:광주원광병원 방사선과, 2:계명대학교 의과대학 핵의학과

## Protective Effects of Bojungmyunyuk-dan in Cisplatin Treated Brain Cell Death

Kyung Tae Yoo\*, Seok Jae Moon, Jin Hee Won, Dong Woung Kim, Jong Deok Lee<sup>1</sup>, Kyoung Sook Won<sup>2</sup>, Goo Moon

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
1:Department of Radiology of Gwangju Wonkwang Hospital,  
2:Department of Nuclear Medicine, College of Medicine, Keimyung University

This study was designed to investigate the protective effect of Bojungmyunyuk-dan(BJMY-Dan) on the cisplatin-induced cytotoxicity of primary rat astrocytes. BJMY-Dan is an oriental herbal prescription for its ability to recover protective effects against anti-cancer chemotherapies. After astrocytes were treated cisplatin, MTT assay was performed for cell viability test. To explore the mechanism of cytotoxicity, I used the several measures of apoptosis to determine whether this processes was involved in cisplatin-induced cell damage in astrocytes. Also, astrocytes were treated with BJMY-Dan and then, followed by the addition of cisplatin. Cisplatin decreased the viability of astrocytes in a dose and time-dependent manner. BJMY-Dan increased the viability of astrocytes treated cisplatin. Astrocytes treated cisplatin were revealed as apoptosis characterized by nuclear staining and flow cytometry. BJMY-Dan protected astrocytes from cisplatin-induced nuclear fragmentation and chromatin condensation. Also, caspase-3 and caspase-9 proteases were activated in astrocytes by cisplatin. BJMY-Dan inhibited the activation of caspase proteases in cisplatin-treated astrocytes. Cleavage of [poly(ADP-ribose) polymerase](PARP) was occurred at 12hr after treatment of cisplatin in astrocytes. BJMY-Dan recovered the cleavage of PARP in cisplatin-treated astrocytes. Also, BJMY-Dan inhibited the activation of pro-apoptotic factor, Bak by cisplatin. Lastly, astrocytes stained with JC-1 and Rhodamine 123 were photographed by fluorescence microscope to visualize changes of mitochondrial membrane permeability transition(MPT) during treatment with cisplatin for 24hr. BJMY-Dan recovered the change of MPT by cisplatin in astrocytes. According to above results, BJMY-Dan may protect astrocytes from cytotoxicity induced by chemotherapeutic agents, including cisplatin.

Key words : Bojungmyunyuk-dan(補中免疫丹), Cisplatin, astrocyte, apoptotic cell death, caspase protease family

### 서 론

2001년 통계청 보고에 의하면 우리나라 사망 1위는 암(악성 신 생물)이 차지하고 있으며, 사망자 4명 중에 1명은 암에 의한 사망 으로 보고되고 있다<sup>1-2)</sup>. 또한, 암으로 인한 사망은 점차 증가 추세 이며, 전 세계적으로 의학계에서 암에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 서양의학에서 암에 대한 치료법으로는 화학요법, 방사선치 료, 수술 및 면역요법 등이 있으며, 이 중 화학요법은 전신요법으

로 수술 전 1차 치료로서 미세 전이 병소를 조기에 제거하고, 국소 종양의 크기를 축소 또는 소실시켜 수술이나 방사선요법의 효과 를 극대화시키기 위하여 사용하거나, 암의 근치적 수술 후에 잔류 세포암이나 미세전이 암세포의 완전 파괴·사멸을 위하여 사용되 고 있다<sup>3)</sup>. 화학요법제란 암세포의 각종 대사경로에 개입하여 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA복제(replication), 전사(transcription), 번역(translation)과정을 차단하거나 핵산의 합성을 방해하고, 세포 분열을 저해함으로써 항암활성, 즉 암세포에 대한 세포독성을 나 타낸다. 그러나, 이들 약제는 정상세포에 대한 세포독성이나 골수 억제, 오심, 구토, 구내염, 탈모증, 신장독성 등의 부작용이 보고되 고 있다. 이에 대해 서양의학에서는 항암제로 인한 구토를 줄이기

\* 교신저자 : 유경태, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 광주한방병원  
· E-mail : joungup@hanmail.net Tel : 062-670-6527  
· 접수 : 2003/01/29 · 수정 : 2003/02/24 · 채택 : 2003/03/28

위하여 ondansetron, tropisetron, metoclopramide 등을 투여하거나, 정상세포에 대한 항암제의 세포독성 억제를 위하여 sodium thiosulfate, amifostine 등의 약물을 병행 투여하는 등 항암제 부작용 억제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>3,6)</sup>.

한의학에서 암은 積聚, 腫瘍, 腫瘤, 癥瘕, 痰癖, 腸覃, 痞塊, 石瘕, 血蟲, 反胃, 石疝, 石癰 등과 관련된 질환으로 인식되고 있으며<sup>3,23)</sup>, 치료법으로는 辨證施治에 근거하여 초기에는 行氣活血 軟堅消積法을, 중기에는 攻補兼施法을, 말기에는 扶正培本法을 사용하고 있다<sup>3,25)</sup>. 최근 東·西醫 結合治療에 대한 관심이 증대되면서 항암제와 한약과의 병용에 의하여 항암효과를 높이거나 항암제로 인한 부작용을 억제시키고 면역력을 증강시키려는 노력이 많이 시도되고 있다. 이 중 항암제의 부작용 억제에 대한 報文으로는 李 등<sup>7,20)</sup>의 연구가 있으나, 대부분 혈액학적 연구이며 세포고사와 관련한 분자생물학적 연구는 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 항암제에 의한 신경교종 치료과정에 있어서 정상세포의 손상을 방어할 수 있는 補中免疫丹의 효과를 실험적으로 규명하고자 랫트 뇌의 정상세포인 astrocytes에 대표적 신경교종 항암치료제인 cisplatin을 처치하여 세포독성을 확인하고, astrocytes에서 補中免疫丹의 세포독성 방어효과를 확인하고자 하였다. 또한 세포고사 기전을 규명하기 위하여 cisplatin으로 처리한 세포의 세포고사 현상을 flow cytometry 분석법을 이용하여 확인하였고, 세포고사 신호전달기전을 규명하기 위하여 caspase proteases의 활성, PARP의 절단, Bak의 발현 변화, 미토콘드리아 막전위 변화를 관찰하였다. 본 연구를 통해 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 astrocytes 세포고사에 유의한 방어효과를 나타내었으므로 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 연구에 사용한 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 補中免疫丹은 원광대학교 비계내과 처방에 의거하였으며 1첩의 분량은 Table 1과 같다.

#### 2) 시약

항암제 cisplatin은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)과 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 용해한 후, 0.2 μm filter(Millipore, Bedford, MA, USA)에 여과한 후에 사용하였다. 세포배양에 사용한 세포배양판은 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, PARP, ICAD, Bcl-2, Bak 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Hoechst 33258, Horseradish peroxidase(HRP), JC-1, Rhodamine 123 등은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양액 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), Fetal bovine serum(우태아 혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Table 1. Prescription contents of Bojungmyunyu-dan Per Pack

本草名	生藥名	學名	分量(g)
黃芪	Radix astragali	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	12
白花蛇舌草	Herba oldenlandiae diffusae	<i>Hedyotis diffusa</i> WILLD.	8
人蔘	Radix ginseng	<i>Panax ginseng</i> C. A. MEYER.	4
白朮	Rhizoma atractylodia marcephalae	<i>Astragalus maceocephala</i> KOIDZ.	4
白茯苓	Poria	<i>Poria cocos</i> WOLF.	4
鷄血藤	Mucunae caulis	<i>Spatholobus suberectus</i> DUNN.	4
龍葵	Herba solani nigri	<i>Solanum nigrum</i> L.	4
蒲公英	Herba taraxaci	<i>Taraxacum platycarpum</i> H.	4
女貞子	Fructus ligustri	<i>Ligustrum lucidum</i> AIT.	3.2
麥芽(炒)	Fructus hordei germinatus	<i>Hordeum vulgare</i> L.	3.2
鷄內金(炒)	Corium stomachicum galli	<i>Callus gallus domesticus</i> BRISSON.	3.2
半夏	Tuber pinelliae	<i>Pinellia ternata</i> BREIT.	3.2
陳皮	Pericarpium citri nobilis	<i>Citrus unshiu</i> MARCOR.	3.2
砂仁(黃)	Fructus amomi	<i>Amomum xanthioides</i> WALL.	3.2
榆根白皮	Cortex ulmi pumilae	<i>Ulmus pumila</i> L.	3.2
甘草	Radix glycyrrhizae	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	3.2
Total amount			69.6

### 2. 방법

#### 1) 약재의 조제

補中免疫丹은 에탄올 용매로 추출하여 실험에 사용하였다. 補中免疫丹 69.6g은 에탄올 1 l와 함께 플라스크에 넣어 24시간 우려나오도록 처리한 다음, 깨끗한 거즈로 여과하여 3,200rpm으로 20분 원심분리한 후 농축기(rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃에서 12시간 이상 동결건조기로 건조시킨 후 시료로 사용하였다.

#### 2) 세포배양

생후 3일 이내의 랫트에서 astrocytes를 분리하여 10cm 세포배양판에 부착한 후, 10% 우태아혈청이 포함된 세포배양액 DMEM으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37℃가 유지된 세포배양기에서 배양하였다. Trypsin-EDTA를 사용하여 24시간 간격으로 계대배양하였으며, 세포배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포의 cisplatin에 의한 세포사멸 현상 및 이를 회복시키는 한약재와 관련한 분자생물학적 실험을 수행하였다.

#### 3) 세포생존율 측정

Astrocytes를 24 well 세포배양판에 1×10<sup>5</sup> cells/ml씩 분주하여 24시간 세포배양판에 부착시키고, 안정화된 astrocytes에 cisplatin을 일정 시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540nm 파장에서 ELISA reader(THERMO max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

#### 4) 핵 염색(Hoechst staining)

세포 핵 형태의 관찰은 4% formaldehyde 용액으로 세포를

고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하였다. 핵 염색 시약 Hoechst 33258을 10 µM로 희석하여 10분 염색하고 다시 PBS로 세척한 후 형광현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 핵 형태를 관찰하면서 10×10의 배율로 사진을 찍었다.

5) Flow cytometry 분석

세포를 원심분리 한 다음, 세포 핵의 분절을 확인할 수 있는 propidium iodide 용액과 20분 세포배양기에서 반응시킨 후, flow cytometry를 이용하여 SubG0/G1기에 있는 세포를 전체 세포의 백분율(%)로 나타내었다.

6) Caspase family cysteine protease 활성화 측정

세포를 4°C에서 30분 세포파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)과 반응 후, 14,000rpm으로 15분 원심분리하여 이 때 얻어진 상층액의 단백질량을 bicinchoninic acid(BCA) 용액을 이용하여 정량하였다. 세포파쇄액(100µg)은 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)로 희석한 형광기질(caspase-3: Ac-DEVD-AMC, caspase-8: Z-IETD-AFC, caspase-9: Ac-LEHD-AFC)과 37°C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 caspase 활성을 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength(460nm)를 사용하였다.

7) Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후, 동량의 단백질을 BCA용액으로 정량하였다. 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodesyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후, 100°C에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10% gel에서 sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm<sup>2</sup>)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차 항체는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, ECL kit(Amersham Co., England)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

8) 미토콘드리아 염색(JC-1, Rhodamine 123 staining)

미토콘드리아만을 특이적으로 염색하는 시약인 JC-1과 Rhodamine 123이 포함된 세포배양액과 30분 반응시킨 후에 세포배양액을 제거하고 세포를 PBS로 3번 세척하였다. PBS를 완전히 제거한 후, 생존한 상태를 유지하기 위하여 슬라이드 글라스로 세포표면을 조심스럽게 덮은 다음, 형광현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용해서 10×10의 배율로 사진을 찍었다.

9) 결과 산출

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의

평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하였으며, 통계적 유의성 검증은 standard t-test를 이용하였다.

결 과

1. 補中免疫丹이 cisplatin 세포독성에 미치는 영향

Astrocytes에 cisplatin을 농도별, 시간별로 처리하고 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. Cisplatin 2.5, 5, 10, 20µg/ml 농도를 astrocytes에 24시간 처리하자, 세포생존율은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 1A). Cisplatin에 의한 세포독성의 시간 의존적인 변화를 알아보고자 astrocytes에 cisplatin 10µg/ml을 처리한 후, MTT assay를 이용하여 세포생존율을 관찰하였다. Astrocytes에 10µg/ml cisplatin을 처리하고 6시간이 경과 하면서부터 서서히 세포생존율이 감소하였으며, 12시간 경과한 후에는 세포생존율이 대조군에 비교하여 20%정도 감소하였고, 24시간 경과한 후에는 50% 이상 감소하였다(Fig. 1B).

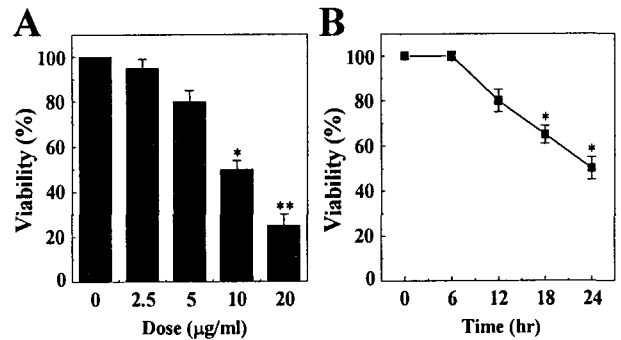


Fig. 1. Cisplatin decreased the viability of astrocytes in a dose and time-dependent manner. (A), Cells were treated with various concentrations of cisplatin for 24 hr. (B), Cells were treated with 10 µg/ml cisplatin for the indicated periods. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean±S.D. of three independent experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

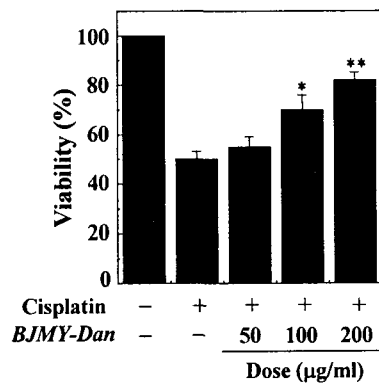


Fig. 2. Bojungmyunyu-dan protected astrocytes from cisplatin cytotoxicity in a dose-dependent fashion. Cells were treated with various co-concentrations of Bojungmyunyu-dan and followed by the addition of 10 µg/ml cisplatin for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean±S.D. of three experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

Cisplatin에 의한 astrocytes 세포독성에 대한 補中免疫丹의 방어효과를 확인하고자, astrocytes에 cisplatin 10µg/ml과 補中免疫丹 50, 100, 200µg/ml 농도를 24시간 처리한 후, MTT assay

를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 補中免疫丹은 cisplatin에 의한 astrocytes 세포독성을 농도 의존적으로 방어하였으며, 補中免疫丹 200 $\mu$ g/ml을 처리하였을 때는 cisplatin을 단독으로 처리한 세포군과 비교하여 세포생존율이 30% 이상 회복됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 세포고사에 미치는 영향

Cisplatin 세포독성에 의한 astrocytes의 형태학적인 변화를 알아보기 위하여 astrocytes에 cisplatin 10 $\mu$ g/ml을 처리하고 24시간이 경과한 후 4% paraformaldehyde로 세포를 고정하고, Hoechst 33258로 핵 염색을 시행하였다. 대조군에서는 타원형의 균질한 형광색의 핵이 핵이 관찰되었으나, 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin을 처리한 실험군에서는 세포고사의 형태학적 특징 중 하나인 염색사 응축(chromatin condensation)과 핵 분절(nuclear fragmentation)이 관찰되었다. 그러나 cisplatin과 함께 200 $\mu$ g/ml의 補中免疫丹을 24시간 처리한 실험군에서는 전체적으로 염색사의 응축과 핵 분절이 현저히 감소하여 대조군과 유사한 핵 형태가 관찰되었다(Fig. 3).

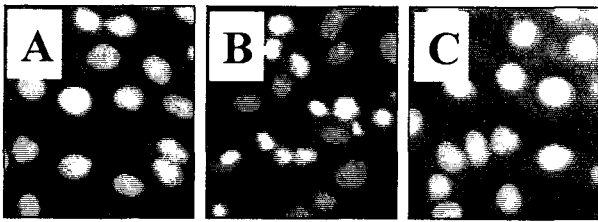


Fig. 3. Bojungmyun-yuk-dan protected the nuclear fragmentation of astrocytes from cisplatin cytotoxicity. Nuclear fragmentation shown in astrocytes treated with cisplatin revealed by Hoechst 33258 staining. (A) Control cells. (B) Cells treated with 10  $\mu$ g/ml cisplatin for 24 hr. (C) Cells treated with Bojungmyun-yuk-dan (200  $\mu$ g/ml) and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin.

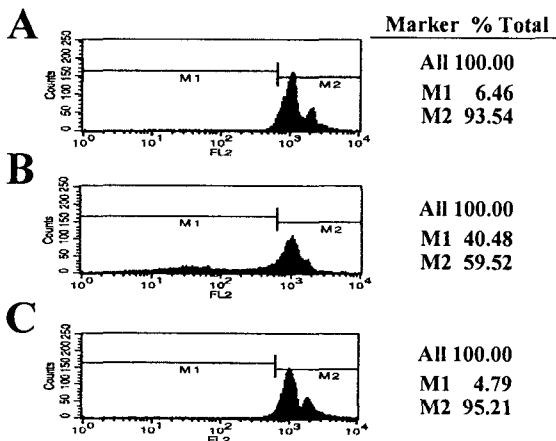


Fig. 4. Cell cycle analysis of cisplatin-treated astrocytes in the presence and absence of Bojungmyun-yuk-dan by nuclear staining of propidium iodide. DNA content of nuclei was measured by flow cytometric analysis. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml of cisplatin for 24 hr and analyzed their cell cycle by flow cytometry. (A), Control astrocytes. (B), Cells treated with 10  $\mu$ g/ml cisplatin. (C) Cells treated with Bojungmyun-yuk-dan (200  $\mu$ g/ml) and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin.

Cisplatin을 단독 처리한 세포군에서 세포고사의 전형적 특징인 염색사의 응축현상과 핵 분절현상을 관찰하였으므로, flow cytometry 분석법도 이용하여 세포고사 현상을 확인하였다. 대

조군 astrocytes에 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin을 24시간 처리한 후의 세포를 포함하여 propidium iodide 용액으로 DNA를 염색한 후, flow cytometry 분석을 시행하여 세포주기를 분석하였다<sup>36)</sup>. 그 결과 대조군에서는 SubG0/G1기의 비율이 6.46%였으나 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin을 24시간 처리한 실험군에서는 40.48%로 증가함을 확인할 수 있었으며, cisplatin과 補中免疫丹 200 $\mu$ g/ml을 처리한 실험군에서는 4.79%로 cisplatin 단독 처리 실험군과 비교하여 현저한 세포생존율의 회복을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

3. 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 caspase proteases 활성화에 미치는 영향

Cisplatin에 의한 astrocytes 세포고사 과정에 caspase proteases가 관여하는지를 확인하고자 caspase계 cysteine proteases 중에서 caspase -3, -8, 및 -9 proteases의 활성을 조사하였다. Caspase-3 protease 활성은 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin을 처리하고 시간이 경과함에 따라 증가하기 시작하여 12시간에 4배의 활성을 보였으며, 24시간에 가장 최고치(7배)를 나타냈다(Fig. 5).

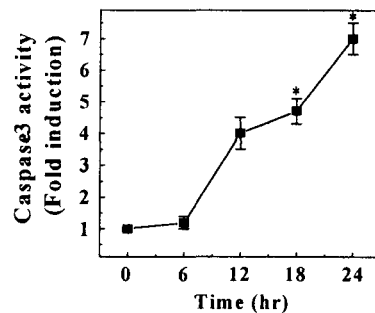


Fig. 5. Activation of caspase-3 protease in cisplatin-treated astrocytes. Cells were seeded for 24 hr and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for various periods. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 protease using fluorogenic peptide, Ac-DEVD-AMC (50 $\mu$  M) as a substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Results represent as the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

또한 caspase-9 protease는 cisplatin 처리시간에 비례하여 증가하기 시작하여 12시간에 1.5배, 24시간에 3배까지 활성화되었다 (Fig. 6). 그러나 caspase-8 protease의 유의한 활성 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 7).

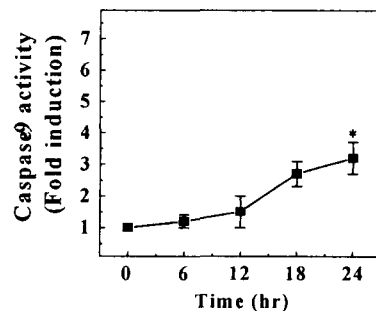


Fig. 6. Activation of caspase-9 protease in cisplatin-treated astrocytes. Cells were seeded for 24 hr and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for various periods. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-9 protease using fluorogenic peptide, Ac-LEHD-AFC as a substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Results represent as the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

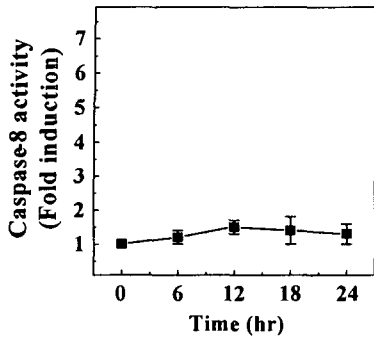


Fig. 7. Activation of caspase-8 protease in cisplatin-treated astrocytes. Cells were seeded for 24 hr and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for various periods. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase family protease using fluorogenic peptide, Z-IETD-AFC as a substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Results represent as the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

이러한 cisplatin에 의한 caspase proteases의 활성 변화에 補中免疫丹의 효과를 알아보기 위해 astrocytes에 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin과 補中免疫丹을 농도별(50, 100, 200 $\mu$ g/ml)로 24시간 처리한 후, caspase proteases의 활성을 측정하였다. 그 결과 cisplatin과 補中免疫丹 200 $\mu$ g/ml을 24시간 처리하였을 때, caspase -3과 -9 proteases의 활성이 정상세포 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

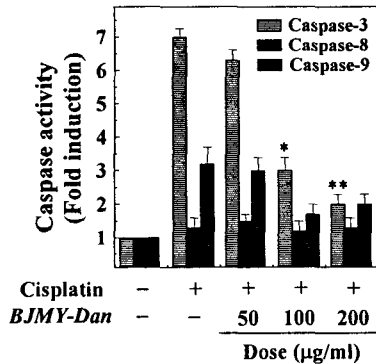


Fig. 8. Protective effects of Bojungmyunyu-dan on the cisplatin-induced activation of caspase-3, -8, and -9 proteases in astrocytes. Cells were treated with various concentrations of Bojungmyunyu-dan and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for 24 hr. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase proteases using fluorogenic peptides as substrates. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Results represent as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

4. 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 PARP 절단에 미치는 영향

세포고사의 매개체인 caspase-3 protease의 활성은 DNA 합성의 촉매 효소인 116 kDa의 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질을 절단하여 이 효소를 불활성화시키며, 이는 DNA의 손상을 회복하지 못하도록 함으로써 세포고사를 촉진시키는 기능을 한다<sup>36)</sup>. 활성화된 caspase-9 protease는 caspase-3 protease를 활성화시키고, caspase-3 protease는 Inhibitor of the caspase-activated deoxyribonuclease(ICAD)를 포함한 여러 기질 단백질을 절단하여 세포고사(apoptosis)를 촉진하게 되는데, caspase-activated deoxyribonuclease(CAD)와 결합하고 있던 ICAD가 caspase-3 protease에 의해서 절단되면 CAD가 활성화하여 핵에 존재하는 염색체 DNA를 절단함으로써 DNA

fragmentation(절단)을 유도하게 된다.

Astrocytes에서 cisplatin에 의한 caspase-3 protease의 활성화를 확인하였으므로, 이 효소의 세포내 기질인 PARP의 절단을 알아보고자 대조군과 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin을 처리한 실험세포의 세포파쇄액으로부터 PARP에 대한 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 cisplatin을 처리한 astrocytes에서 처리 12시간부터 PARP의 절편이 관찰되었으며(Fig. 9 upper panel), PARP와 같은 기능을 하는 ICAD 역시 현저한 감소를 보였다(Fig. 9 lower panel). 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 PARP의 절단에 미치는 영향을 알아보기 위해 astrocytes에 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin과 補中免疫丹을 50, 100, 200 $\mu$ g/ml 농도로 24시간 처리 후 PARP의 발현을 관찰하였다. 그 결과 cisplatin과 補中免疫丹 200 $\mu$ g/ml을 24시간 처리한 실험군에서 PARP가 정상수준으로 회복되어 116 kDa의 모습이 정상수준으로 발현하고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 10).

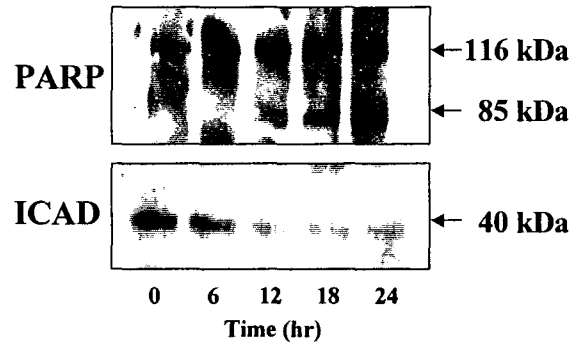


Fig. 9. Cleavage of PARP and ICAD in cisplatin-treated astrocytes. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml cisplatin for various periods. Lysate from cells was separated on 12.5% SDS-PAGE. PARP on the nitrocellulose membrane was proved with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

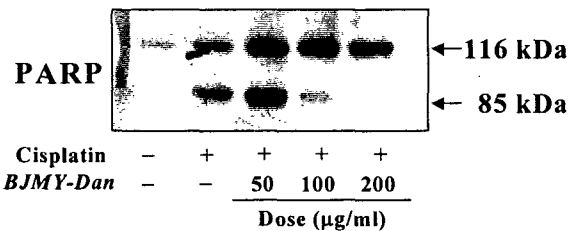


Fig. 10. Protective effects of Bojungmyunyu-dan on the cisplatin-induced PARP cleavage of astrocytes. Cells were treated with various concentrations of Bojungmyunyu-dan and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for 24 hr. Lysate from cells was separated on 12.5% SDS-PAGE. PARP protein was proved with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

5. 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 세포사멸 촉진 단백질 Bak의 발현에 미치는 영향

세포고사 신호전달 과정에 관여하는 Bcl-2 단백질계는 기능적인 면에서 크게 두 가지로 대별이 되는데, Bcl-2, Bfl-1, BAG-1, A1 및 Mcl-1은 세포사멸을 억제하는 기능을 하나, Bax를 비롯하여 Bad, Bak, Bid, Bim 등은 세포사멸 촉진 기능을 수행한다. 세포사멸 억제 단백질과 촉진 단백질간의 상대적인 발현 양에 의해 Bcl-2 단백질계는 구성원간의 결합을 조절하는 신호전달계도 세포의 사멸이나 생존에 직접적인 영향력을 발휘하고 있다. Cisplatin에 의한 astrocytes의 세포사멸에 촉진기능을 하는 Bak

의 발현 양의 변화를 관찰하고자 astrocytes에 10 $\mu$ g/ml의 cisplatin을 시간별로 처리하여 Bak의 발현 변화를 관찰하였다. Astrocytes에 cisplatin 처리시 Bak의 발현은 시간 의존적으로 증가하였으나(Fig. 11), 補中免疫丹을 50, 100, 200 $\mu$ g/ml 농도로 cisplatin (10 $\mu$ g/ml)과 동시에 처리한 실험군에서는 증가한 Bak의 발현 양이 정상 세포 수준 가까이 회복되는 것을 관찰하였다(Fig. 12).

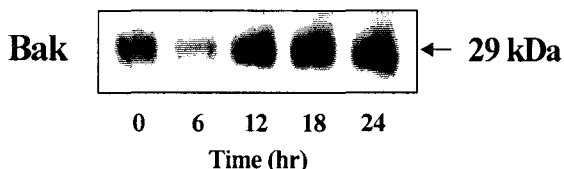


Fig. 11. Cisplatin increased the expression of Bak in astrocytes. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml cisplatin for various periods. Lysate from cells was separated on 15% SDS-PAGE. Bak protein on the nitrocellulose membrane was probed by anti-Bak antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

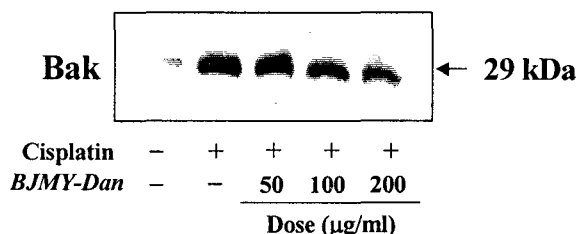


Fig. 12. Protective effects of Bojungmyunyuk-dan on the expression of Bak in cisplatin-treated astrocytes. Cells were treated with various concentrations of Bojungmyunyuk-dan and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin for 24 hr. Lysate from cells was separated on 15% SDS-PAGE. Bak protein was probed with anti-Bak antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

### 6. 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 미토콘드리아 막전위차 변화에 미치는 영향

세포사멸 과정에 있어서 미토콘드리아는 치명적인 손상을 입는다. 세포고사가 일어나는 세포에서는 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 세포질로 방출되고, 방출된 cytochrome c와 apoptotic protease activating factor-1(Apaf-1)이 caspase-9 protease를 활성화시킨다<sup>38)</sup>. 미토콘드리아를 특이적으로 염색하는 시약인 JC-1과 Rhodamine 123을 이용하여 대조군과 cisplatin(10 $\mu$ g/ml)을 24시간 처리한 실험군 세포의 미토콘드리아 막전위 변화를 관찰하였다<sup>39)</sup>. JC-1 염색 시(upper panel), 대조군 astrocytes의 미토콘드리아는 핵 주위로 분포되어 있고 JC-1의 정상적인 형광인 오렌지색을 띠고 있었으며, cisplatin 처리군 astrocytes의 미토콘드리아는 형광이 녹색으로 변해있음을 관찰할 수 있었다. Rhodamine 123으로 염색시(low panel), 대조군 astrocytes의 미토콘드리아가 세포질에 국한되어 점을 찍은 듯이 모여있으며(punctuated form), cisplatin 처리군 astrocytes의 미토콘드리아에서는 세포질과 핵 전체에 퍼져 있음(diffused form)을 관찰할 수 있었다(Fig. 13). 이러한 결과는 cisplatin 처리에 의한 대조군 astrocytes의 미토콘드리아 막전위에 변화가 있음을 의미한다. Astrocytes에 cisplatin과 補中免疫丹(200 $\mu$ g/ml)을 24시간 처리한 후 미토콘드리아의 막전위 변화를 관찰할 결과 정상수준으로 회복되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 13).

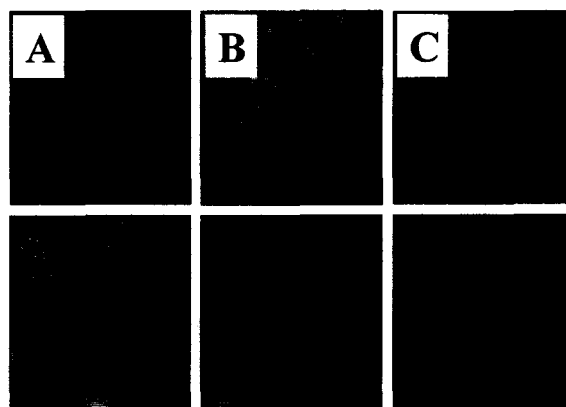


Fig. 13. Protective effects of Bojungmyunyuk-dan on the change of mitochondrial permeability transition (MPT) in astrocytes by cisplatin. Cells were treated with 10  $\mu$ g/ml cisplatin alone or pretreated with Bojungmyunyuk-dan(200  $\mu$ g/ml) and followed by the addition of cisplatin for 24 hr. Mitochondria of cells were stained with JC-1 (upper panel) and Rhodamine 123 (low panel). (A), Control cells, (B), Cells treated with 10  $\mu$ g/ml cisplatin for 24 hr. (C) Cells pretreated with Bojungmyunyuk-dan (200  $\mu$ g/ml) and followed by the addition of 10  $\mu$ g/ml cisplatin.

### 고 찰

癌은 조직의 자율적인 과잉 성장으로 개체에 대해 이롭지 않을 뿐만 아니라 정상조직에 대해 파괴적인 것을 말하며<sup>21)</sup>, 전 세계적으로 한해에 약 700만명 이상의 사망 원인이 되는 질환으로, 암에 의한 사망률은 계속 증가 추세이며, 우리나라에서도 1999년 이래로 사망원인의 1위를 차지하고 있다<sup>1-2,22)</sup>.

한의학에서 癌이란 용어는 宋代 《衛濟寶書》에 최초로 기재 되었으며, 殷墟의 갑골문에서 瘤라는 글이 나온 후, 「內經」에서 積聚, 鼓脹, 腸覃, 石瘕 등으로 언급되었고, 이후의 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 乳癆, 石疽, 石癰 등이 증상과 병리면에서 비슷한 병증으로 인식되고 있다<sup>3,23)</sup>. 한의학적으로 癌은 外感六淫, 七情內傷, 飲食不節, 過勞 및 邪氣 등에 의하여 개체의 장부 기능과 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 병리 변화가 나타나고 이런 변화가 單獨 혹은 相互錯雜하여 癌을 일으킨다<sup>24)</sup>. 한의학에서 암치료는 病因, 病位, 病性 및 환자의 상태에 따라서 陰陽氣血과 장부의 허실에 근거하여 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등을 위주로 하는 扶正培本法과 行氣理血, 活血化瘀, 清熱利濕, 軟堅散結하는 祛邪法 그리고 扶正培本法과 祛邪法을 결합한 扶正祛邪法의 세 가지로 대별된다<sup>3,25)</sup>. 서양의학에서 암에 대한 치료법으로는 화학요법, 방사선치료, 수술 및 면역요법이 있으며 그 중 화학요법에 쓰이는 기존의 항암제는 정상세포와 암세포를 선택적으로 명확히 구분하지 못하는 수준으로 주로 암세포에 대한 살상작용을 목표로 하기 때문에 정상세포에 대한 세포독성이나 골수억제, 신장독성, 간독성 등의 여러 부작용을 야기하게 된다<sup>26)</sup>. cisplatin (cis-dichlorodiammineplatinum)은 platinum원자가 chloride와 ammonia원자에 의해 둘러싸여진 inorganic complex로서 epithelial tumor에 효과적인 항암제로 1972년부터 사용되어 왔다. 이는 암세포의 핵 내에 존재하는 DNA 이중 나선구조에 부착되어 DNA복제를 저해하여 암세포의 성장 및 증식을 억제하고

암세포를 제거하는 항암효과를 나타낸다. 특히 cisplatin은 전이 고환암과 난소암의 치료에 좋은 효과를 나타내며, 방광암, 두경부의 편평세포암, 기관지암, 자궁암, 임파종에도 많이 사용된다. 그러나 신독성, 골수조직 억제작용, 심한 구토, 신경 장애 및 이독성 등의 부작용이 문제시 되고 있다<sup>8,27</sup>. 최근에는 항암제의 독성에 대하여 정상세포의 선택적 보호작용을 할 수 있는 세포 보호제가 집중적으로 연구되고 있는데, 그 약제로는 dexrazoxane, 및 amifostine, glutathion, mensa, ORG2766 등이 있다<sup>5-6</sup>. 東·西醫 결합치료에 대한 관심이 증가하면서 한의학에서도 이러한 항암제의 부작용을 억제하기 위한 많은 연구들이 진행 중이다<sup>7-20</sup>. 이에 대한 실험적 연구 報文에서 李 등<sup>7-17,20</sup>은 四君子湯, 四物湯, 十全大補湯, 補中益氣湯, 生脈散, 歸脾湯, 消積白朮散, 加味麥芽白朮散, 加味大補湯, 抗癌生血湯, 補陰免疫丹 등이 항암제의 부작용 억제 효과가 있음을 보고한 바 있다.

화학요법제의 부작용을 한의학적으로 辨證하면 氣血損傷, 脾胃失調, 肝腎虧損, 熱毒壅盛 등으로 대별되며, 주로 益氣健脾하는 扶正培本의 치료원칙 하에 病症에 따라 補氣補血, 健脾和胃, 滋補肝腎, 清熱解毒 등의 治法으로 치료한다<sup>3,18,28</sup>. 補中免疫丹은 圓光大學校 脾胃內科學教室에서 항암제로 인한 부작용을 감소시키고, 항암효과를 증진시키기 위해 만든 처방으로 扶正培本에 清熱解毒作用을 겸한 처방이다. 약물구성을 보면 黃芪, 人蔘, 白朮, 白茯苓, 半夏, 陳皮, 砂仁, 麥芽, 鷄內金, 甘草는 健脾益氣, 消食和中하며, 鷄血藤, 女貞子는 補血, 和血, 滋補肝腎하고, 白花蛇舌草, 龍葵, 蒲公英, 榆根白皮는 清熱解毒, 消癥하여 화학요법으로 인한 氣血虧損과 소화기 장애를 치료하며, 화학요법 중 나타날 수 있는 각종 염증성 반응을 치료하고 항암효과를 높일 수 있는 처방이다<sup>29,30</sup>. Astrocytes는 두뇌 용적의 30%를 차지하고 있는 세포로서 인접 뉴론과 중요한 관계를 가지고 있으며 각종 화학물질에 의한 세포손상의 일차적인 표적이 되기도 한다. 따라서 astrocytes는 화학물질에 의한 두뇌손상 또는 관련 질병의 발달에 중요한 역할을 하며 화학적 뇌 손상의 표적세포가 되는 것으로 알려져 있다<sup>31</sup>. 세포고사(apoptosis)란 apo(off: 분리되다)와 ptosis(falling: 떨어지다)의 합성어로 세포괴사(necrosis)와 구별하면 전자는 physiological cell death 혹은 programmed cell death, 즉 세포자멸이고, 후자는 pathological cell death 즉 괴사를 가리킨다. 최근의 항암연구에서 apoptosis와 관련한 분자생물학적 연구는 많았으나 항암제의 독성방어와 관련한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 신경교종의 화학요법 치료 시 정상세포인 astrocyte에 미치는 세포사멸 과정과 이에 補中免疫丹의 세포독성 방어능력을 실험적으로 규명하고자 하였다. 먼저 cisplatin에 의한 세포독성이 세포고사 현상임을 확인하고, 補中免疫丹의 이러한 세포독성에 대한 방어효과를 확인하였다. 그리고 세포고사 신호전달 기전을 규명하기 위하여 cisplatin으로 처리한 세포의 caspase proteases의 활성화, PARP의 절단, Bak 발현의 변화, 미토콘드리아의 막전위 변화를 살펴보았으며, 이를 통해 補中免疫丹의 세포고사 방어효과를 확인할 수 있었다. 먼저 cisplatin의 세포독성과 補中免疫丹의 세포독성 방어효과를 살펴보고자 MTT

assay를 이용하여 cisplatin을 처리한 astrocytes의 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 농도, 시간 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며(Fig. 1), astrocytes에 cisplatin과 補中免疫丹을 처리하여 세포생존율을 측정하였을 때 cisplatin을 단독처리한 실험군에 비해 세포생존율이 현저히 증가하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 본 연구에서는 cisplatin에 의한 astrocytes 세포 손상이 세포고사 기전에 의하여 매개됨을 확인하기 위한 핵 염색 실험에서 세포고사의 형태학적 특징인 염색사 응축현상과 핵 분절현상을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Flow cytometry는 propidium iodide로 세포 DNA를 염색하여 세포고사가 일어나 조각난 DNA를 가지는 세포수를 측정하여 비율을 알 수 있는 방법으로 여러 세포주기의 핵산의 분포와 DNA의 상대적인 정량이 가능하다<sup>32-33</sup>. Flow cytometry 분석 결과 cisplatin을 처리한 군에서는 대조군에 비해 세포고사 비율을 나타내는 SubG0/G1기가 현저히 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 補中免疫丹과 cisplatin을 처리한 실험군의 세포고사 비율은 유의하게 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 cisplatin에 의한 astrocytes 세포사멸과정이 세포고사를 매개로 이루어지며, 補中免疫丹이 astrocytes의 세포고사를 방어하고 있음을 의미한다. Cisplatin과 같은 항암제들은 다양한 암세포에서 세포고사 신호전달 기전을 통하여 암세포를 세포사멸로 유도한다고 알려져 있다. 최근 세포고사 유도 기전으로 중요시되고 있는 caspase protease family는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화 되며, 현재까지 14종류가 알려져 있다<sup>40</sup>. 그 중 caspase-3 protease는 caspase cascade의 하방에 위치하여 상방에 위치한 caspase-8 protease와 -9 protease의 활성화가 합류하는 효소로서 손상된 DNA 복구와 스트레스 관련 발현유전자의 활성화 기능 유지에 중요한 단백질인 PARP를 절단하여 세포고사를 유도한다<sup>37</sup>. 다음으로 세포고사와 관련된 caspase protease family들의 활성화와 PARP의 절단 여부를 살펴보고, 이후 補中免疫丹의 회복효과를 관찰하였다. Cisplatin은 astrocytes에서 caspase-3 protease와 -9 protease를 활성화하였으며, 특히 caspase-3 protease는 최고 7배의 활성을 보였다(Fig. 5-7). 또한 caspase-3 protease 활성화에 의한 세포내 기질 PARP의 절단현상을 확인할 수 있었다(Fig. 9). 그러나 補中免疫丹 처리는 astrocytes에서 cisplatin에 의한 caspase-3 protease와 -9 protease의 활성억제하에 PARP의 절단을 방지하였다(Fig. 8, 10). Bcl-2는 apoptosis를 조절하는 유전자 중의 하나로 1979년 여포성 림프종에서 14번째 염색체의 면역글로블린 중쇄 유전자가 18번째 염색체로 전사된 것이 발견되었으며, 이를 B cell leukemia/lymphoma (Bcl-2)유전자로 명명하였다. Bcl-2 단백질계는 두 종류로 대별되는데 Bcl-2 및 Bfl-1, BAG-1, A1, Mcl-1은 미토콘드리아 막전위의 상실이나 cytochrome c의 방출을 억제하여 세포사멸을 억제하는 기능을 하나, Bax를 비롯하여 Bad 및 Bak, Bid, Bim 등은 cytochrome c의 방출을 촉진하고 미토콘드리아 막전위차 변화를 유도해 세포사멸 촉진 기능을 하는 것으로 알려져 있다<sup>34-35</sup>. Astrocyte에 cisplatin을 처리한 결과 Bak의 발현 양이 시간에 따

라 서서히 증가하고 있음을 확인할 수 있었으며(Fig. 11), 補中免疫丹은 cisplatin에 의한 Bak의 발현을 억제하여 정상세포 수준 가까이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 12). 마지막으로 세포고사 과정에서 큰 손상을 받는 미토콘드리아의 막전위 변화를 알아보기 위하여 JC-1, Rhodamine 123으로 미토콘드리아를 염색하여 살펴 본 결과 cisplatin에 의한 미토콘드리아의 막전위 변화를 관찰할 수 있었으며, 補中免疫丹은 cisplatin에 의한 미토콘드리아 막전위 변화를 억제하였다(Fig. 13). 이상의 결과는 補中免疫丹이 cisplatin에 의한 미토콘드리아 막전위 손상을 막아 세포고사에 대한 방어효과를 나타냄을 알 수 있다.

본 연구는 항암제의 부작용으로 인한 정상세포의 세포사멸 효과에 補中免疫丹이 세포고사 유도를 방어하여 항암제의 부작용을 감소시키는 효과와 작용기전을 제시하였으며, 앞으로 補中免疫丹의 구체적인 작용기전에 관한 더 깊고 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 결론

항암제 cisplatin을 처리한 랫트 뇌교세포에서 補中免疫丹의 cisplatin에 의한 세포독성 방어효과에 관한 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

補中免疫丹은 cisplatin에 의한 astrocytes의 세포독성을 농도 의존적으로 방어하였다. 補中免疫丹은 cisplatin에 의한 astrocytes의 염색사 응축, 핵 분절 및 SubG0/G1기의 증가와 같은 세포고사 현상을 억제하였다. 補中免疫丹은 cisplatin에 의한 astrocytes의 caspase-3 protease와 -9 protease의 활성화를 유의하게 억제하였다. 補中免疫丹은 cisplatin에 의한 astrocytes의 PARP 절단, ICAD 발현 감소, 세포사멸 촉진 단백질 Bak의 발현 증가를 현저하게 억제하였다. 補中免疫丹은 cisplatin에 의한 astrocytes의 미토콘드리아 막전위 변화를 대조군 수준으로 회복시켰다.

이상의 결과들은 補中免疫丹이 항암제 치료에 의한 부작용으로 발생하는 정상세포 사멸효과에 대한 방어효과가 있음을 보여준다. 이는 항암제 치료를 비롯한 다양한 항암 화학요법으로 발생한 부작용에 補中免疫丹을 투여하여 부작용을 최소화시킬 수 있는 임상적 응용가능성을 시사한다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

## 참고문헌

1. 통계청, 사망원인통계연보, pp. 8-10, 통계청, 대전, 2001.
2. 통계청, 사망원인통계연보, pp. 16-20, 통계청, 대전, 2000.
3. 문구, 정병화, 김병주, 암 동서의 결합치료 1권, pp.1-22,255-258,381-386,413-419,477,488, 원광대학교 출판국, 익산, 1999.
4. 김용범, 강순범, 이효표, 송용상, 김재원, 박노현, 이철민, 서동기, cisplatin을 포함한 항암화학요법 치료 시 환자에서

- 발생하는 오심 및 구토에서의 정맥주사용 및 경구용 tropisetron과 ondansetron의 비교연구, 대한산부인과학회지 41(10), 2544-2550, 1998.
5. 신정호, 오희숙, 조수용, 박용균, 서호석, 허준용, 이린화, 지현준, 정화경, 정유아, 부인과 악성종양 환자에서 복합 항암 화학요법에 따른 세포독성에 대한 amifostine의 임상효과에 관한 연구, 대한산부인과학회지 44(11), 1961-1967, 2001.
6. 박은동, 박지욱, 김원규, 문찬화, 진행된 난소암의 복강내 cisplatin 항암화학요법, 대한산부인과학회지 36(10), 3635-3641, 1993.
7. 李永宇, 사군자탕, 사물탕, 십전대보탕 및 보중익기탕이 cisplatin 투여로 유발된 체중감소와 혈액변화에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1991.
8. 白承學, 消積白朮散의 항암효과 및 cisplatin 부작용에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 1991.
9. 安文生, 항암제 mitomycin C와 數種 補益劑의 병용투여 효과에 관한 연구, 원광대학교 대학원, 1992.
10. 김남재 외, 加味蔘苓白朮散과 cisplatin 병행투여에 의한 부작용 경감 효과, 생약학회지 22(3), 197-206, 1991.
11. 홍남두 외, cisplatin 및 mitomycin C와 加味大補湯의 병행투여에 의한 부작용 경감 효과, 생약학회지 23(2), 89-95, 1992.
12. 盧水範, cisplatin 부작용에 대한 補益劑의 실험적 연구, 원광대학교대학원, 1992.
13. 李丕熾, 消積白朮散이 doxorubicin의 부작용 및 항암효과에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 1996.
14. 李浚潯, 抗癌生血湯이 methotrexate로 유발된 부작용과 면역기능저하에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 1997.
15. 오정진, 八珍湯加減方이 항종양 면역반응과 항암제로 유발한 부작용에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
16. 殷載淳, 항암제 mitomycin C의 부작용에 대한 수종 복합생약의 영향, 생약학회지 23(4), 248-258, 1992.
17. 趙成基, 消積白朮散의 抗癌, 免疫增強 效果 및 cisplatin의 신장독성억제에 미치는 영향에 관한 연구, 대전대학교대학원, 1993.
18. 김동희 외, 항암제 부작용에 대한 한방요법, 대전대학교 한의학연구소 한의학논문집 2(1), 33-51, 1993.
19. 광계호, 김성훈, 임낙철, 종양의 화학요법과 방사선요법의 부작용에 대한 한방약물요법, 동의병리학회지 10, 45-87, 1995.
20. 姜泰熙, cisplatin을 처리한 뇌세포에서 補血免疫丹의 세포방어효과, 원광대학교 대학원, 2001.
21. 서울대학교 의과대학, 腫瘍學, pp. 1-2, 149-159, 서울대학교 출판부, 서울, 1990.
22. 분자암학회 한국유전자이식 연구재단, 화학적 암 예방, pp.142-162, 고려의학, 서울, 2000.
23. 하지용, 정병익, 이선구, 유병길, 大七氣湯이 항암, 면역조절 작용 및 apoptosis에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 15(1), 111-124, 2001.
24. 이병구, 팔진탕합화적환과 adriamycin의 병용처리시 나타나



- 는 synergistic 항종양 효과에 관한 연구, 원광대학교대학원, 1999.
25. 진선두, 신상우, 양재하, 권영규, 김광중, 녹차의 주성분인 epigallocatechin gallate의 항암활성과 apoptosis기전에 관한 분자생물학적 연구, 동의생리병리학회지 15(4):611-620, 2001.
  26. 白銀景, 육계로부터 추출된 cinnamaldehyde가 F9 기형암종 세포주에 미치는 항암효과, 원광대학교 대학원, 1999.
  27. 황영희, 이경아, 신순분, 박용훈, 하정옥, 김춘동, 이영환, cisplatin의 신독성에 관한 연구, 영남의대학술지 9(2), 327-333, 1992.
  28. 李炯柱, 항암화학요법제의 세포독성 및 종양세포의 라이소솜에 미치는 十全大補湯加味方の 영향, 원광대학교대학원, 1996.
  29. 신민교, 임상본초학, pp.166-167, 169-171, 172-173, 175-177, 245-246, 250-252, 323-324, 334-335, 380-381, 399-400, 422-423, 425-426, 556-558, 614-615, 688, 영림사, 서울, 1994.
  30. 劉春安 外, 항암중초약대사전, pp.14-22,115-119,260-265, 294-297,340-344,367-371,392-398,579-582,593-596,710-714, 721-724, 903-909,1066-1070, 湖北科學技術出版社, 湖北, 1994.
  31. 成承模, 발암물질에 의한 뇌세포의 protein kinase C 변화 분석, 대구가톨릭대학교 대학원, 2001.
  32. 신상우, 박종현, 최승훈, 안규석, 手拈散의 apoptosis작용기전에 관한 연구, 동의생리병리학회지 15(5), 745-756, 2001.
  33. 임웅호 外, NMR spectroscopy를 이용한 apoptosis의 판단, 농업생명과학 8(1), 9-12, 2001.
  34. 정용민, 양승하, 이성열, 김대중, 김의한, 각종 피부종양에서 p53과 bcl-2 발현 양상, 순천향의대 논문집 5(1), 63-72, 1999.
  35. Channy Park, KH Yoon, YJ Lee, YK Kim, YC Choi, JH Shin, JH Cho, RK Park, 5-FU induces apoptosis of Fas(+), HepG2 cells via activation of Fas-mediated caspase and mitochondria dysfunction, Cancer Research and Treatment 34(2), 128-138, 2002.
  36. Chang LC, Tsai TR, Wang JJ, Lin CN, and Kuo KW, The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis, Biochem Biophys Res Commun. 242(1), 21-25, 1998.
  37. Wang ZQ, Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosyl) action develop normally but are susceptible to skin disease, Genes Dev. 9, 509-520, 1995.
  38. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X, Apaf-1, a human protein homologues to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, Cell 90, 405-413, 1997.
  39. Buckman JF, and Reynolds IJ, Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons, J Neurosci. 21(14), 5054-5065, 2001.
  40. Kim TW, Warren H, Jung YK, Kovacs D, Tanzi R, Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease, Science. 277, 373-376, 1997.