

인간 폐암세포주 H-460세포에서 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 항종양 증진효과

허중찬* · 원진희 · 김동웅 · 한세희 · 문 구

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

Antitumor Effect of the Cotreatment of Gagamsibjeondaebotang and As₂O₃ in Human Lung Cancer Cell Line H-460

Jong Chan Hur*, Jin Hee Won, Dong Woung Kim, Se Hee Han, Goo Moon

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

This study was designed to elucidate the synergistic cytotoxic mechanisms of the cotreatment of Gagamsibjeondaebotang (GSD) and As₂O₃ in human lung cancer cell line, H-460. The combination of GSD and As₂O₃ synergistically augmented the cytotoxicity of GSD and As₂O₃ in H-460 cells. The nature of cytotoxicity was revealed as apoptosis which was characterized by chromatin condensation and fragmentation in DAPI staining. The apoptotic cytotoxicity of GSD and As₂O₃ was accompanied by the cleavage of PARP. Of note, the expression of pro-apoptotic BclXS protein was increased, but the expressions of Bax and BclXL was not affected in H-460 cells treated with GSD and As₂O₃. In addition, antioxidant NAC completely blocked the apoptotic death of H-460 cells by GSD and As₂O₃. In conclusion, this results suggest that the cotreatment of GSD and As₂O₃ induces the synergistic apoptosis of human large cell lung cancer cell line, H-460 via the induction of BclXS and reactive oxygen species (ROS).

Key words : Gagamsibjeondaebotang(加減十全大補湯), As₂O₃, Apoptosis

서 론

癌은 정상세포가 여러 가지 자극에 의해 유전자의 형질변환이 발생하여 무절제한 증식으로 이뤄진 변형세포의 집단으로, 최근 급격히 증가하여 국내는 물론 세계적으로도 가장 중요한 사망 질환 중 하나이다¹⁻³. 癌의 주요 원인은 環境汚染, 發癌物質 또는 자극에의 노출 및 각종 정신적 스트레스 등으로 보고 있다^{2,4}.

西洋醫學의 癌治療는 科學技術의 발달로 인한 早期 診斷과 그에 따른 적절한 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 면역療法와 遺傳子療法이 시행되고 있으며, 肺癌의 경우 수술과 방사선요법이 국소적인 부위에만 사용하는 한계가 있고 재발율도 높아 전신적인 化學療法가 주로 사용되고 있다. 그러나 化學療法에 사용되는 抗癌劑들은 정상세포의 대사를 억제하고 세포독성이나 장기독성 등의 다양한 부작용을 나타내기 때문에 그 사용의 위

험성을 배제할 수 없다⁵.

그 동안의 抗癌劑의 개발 방법들은 세포독성이 강한 물질을 찾는 것이었지만 최근에는 신생혈관 억제를 통한 抗癌, 抗轉移 연구^{6,7} 및 생약을 이용하여 抗癌劑의 부작용을 줄이면서 항종양 효과를 극대화하기 위한 연구⁸⁻¹¹와 세포고사 신호전달계의 기능 변화를 통한 抗癌治療의 효능을 높이려는 연구에 관심이 모아지고 있다¹². 化學療法的인 抗癌劑는 祛邪를 목적으로 사용하고, 辨證施治에 의한 扶正補益시키는 한약물은 부작용을 감소시키고 免疫性을 增強시켜주어 자기치료를 할 수 있게 하는데, 이 두 가지 방법의 併用은 癌治療에 있어서 중요한 치료원칙이다¹³.

韓·洋方 結合치료를 위한 抗腫瘍性 약물의 抗腫瘍 효과를 상승적으로 增進시키고 부작용을 줄이는 약물의 개발을 위해 化學療法의 부작용에 대하여 문헌고찰한 결과 그에 따른 주된 증상이 韓方辨證상 氣血兩虛證에 속함을 인식하였다¹⁴.

이에 따라 본 실험에 사용된 加減十全大補湯은 《最新專病專治高效方藥叢書》¹⁵에 수록된 처방으로, 氣血兩虛證에 대응되는 十全大補湯¹⁶에 黃連, 穿山甲, 玄胡索, 鷄血藤, 赤芍藥 등이 가

* 교신저자 : 허중찬, 광주시 남구 주원동 543-8 원광대학교 광주한방병원
· E-mail : kykklis76@hanmail.net, · Tel : 062-670-6527
· 접수 : 2004/04/16 · 수정 : 2004/06/10 · 채택 : 2004/07/13

미되어 益氣養血, 化痰止痛, 活血祛瘀, 健脾益氣하는 효능이 있어 면역기능을 향상시키면서 抗腫瘍 효과를 극대화시키는 처방이다.

본 연구에서는 加減十全大補湯과 As₂O₃과 병용처리 시 뚜렷하게 肺癌細胞의 암세포 고사 효과 증진을 유도할 수 있음을 확인하고 이에 대한 작용기전을 분석하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

加減十全大補湯의 처방내용은 《最新專病專治高效方藥叢書》¹⁵⁾에서 참고하였으며, 본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 전주 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였다. 1첩의 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Gagamsibjeondaebotang (GSD)

本草名	生藥名	學名	分量(g)
黃芪	<i>Radix astragal</i>	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	15
人蔘	<i>Radix ginseng</i>	<i>Panax ginseng</i> C. A. MEYER.	7.5
白茯苓	<i>Poria</i>	<i>Poria cocos</i> WOLF.	7.5
熟地黃	<i>Rhizoma rehmanniae</i>	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH.	7.5
穿山甲(炮)	<i>Squama manitis</i>	<i>Manis pentadactyla</i> L.	15
白朮(炒)	<i>Rhizoma atractylodis macrocephalae</i>	<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ.	6
黃連	<i>Rhizoma coptidis</i>	<i>Coptis japonica</i> MAKINO.	6
當歸	<i>Radix angelicae gigantis</i>	<i>Angelica gigas</i> NAKAI.	7.5
赤芍藥	<i>Radix paeoniae rubra</i>	<i>Paeonia japonica</i> MIYABE.	7.5
白芍藥	<i>Radix paeoniae lactiflorae</i>	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	7.5
鷄血藤	<i>Mucunae caulis</i>	<i>Spatholobus suberectus</i> DUNN.	15
玄胡索	<i>Tuber corydalis</i>	<i>Corydalis turtschaninovi</i> BESS.	7.5
川芎	<i>Rhizoma cnidii</i>	<i>Cnidium officinale</i> MAKINO.	4.5
甘草	<i>Radix glycyrrhizae</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	3
Total amount			117

2) 검액조제

실험에 사용된 藥材는 에탄올 용매를 사용, 추출하여 실험에 이용하였다. 먼저 에탄올추출물은 加減十全大補湯 117 g을 에탄올 1 L와 함께 플라스크에서 혼합하여 하루 동안 우려나오도록 한 다음, 거즈로 여과하고 3,200 rpm으로 20분간 원심분리 후 濃縮器(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70 °C(Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 동결 건조시킨 것을 試料로 사용하였다. 이 加減十全大補湯 에탄올추출물을 'GSD'라 지칭하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Dubellco's minimum essential medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA.)에서 구입하였으며, 배양용기(48-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.) 제품을 사용하였다. As₂O₃는 Merck 사로부터 구입하고, MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl,

tetrazolium bromide), Rhodamine-123은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA.) 제품을 사용하였다. PARP, Bcl-XL, Bax, 등의 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA.), anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 ECL kit (Enhanced chemiluminescence kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England) 제품을 구입하여 사용하였다. 항암제 As₂O₃는 Sigma 사 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) H-460 肺癌細胞株 배양

인간 肺癌細胞株인 H-460 세포주는 한국 세포주 은행에서 분양받아 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 10 % 우태아 혈청이 포함된 DMEM(Gibco BRL, England) 배양액으로 배양하였으며, 2-3 일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 한약재 등을 처리한 후 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 변화실험을 수행하였다

2) 세포 생존율 측정

세포 생존율 조사는 MTT assay 방법을 이용하였다. 簡記하면 세포 배양판(48-well plate)에 세포(1×10⁵ 세포수/ml)를 0.25 ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 Fig. 1의 상단에 표시된 바와 같이 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음 (최종 부피 0.5 ml) 44시간 동안 배양기에서 배양하였다. 이후, MTT 용액(5 µg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 50 µl씩 첨가하였다. 4시간 후 상층액은 제거한 다음 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시킨 후 여기에 500 µl의 DMSO 용액으로 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) DAPI 염색

세포핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H-460 세포에 加減十全大補湯 및 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 포름알데히드(3.7 %)로 실온에서 10분 고정한 후, 10 µM DAPI 용액으로 실온에서 20분 염색하여 다시 PBS로 세척하였다. 염색된 세포는 형광 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) 미토콘드리아 막전위 측정

세포내 소기관의 하나인 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 Rhodamine-123 염색을 시행하였다. 加減十全大補湯 및 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리된 세포들은 PBS로 2회 세척하였다. Rhodamine-123(10 µg/ml)은 각각 DMEM 배지에 희석하여 20분간 37 °C, CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

5) Western blot analysis

세포는 한약재 등을 처리 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과

4 °C에서 30분간 반응시켰다. 세포 파쇄액은 13,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하고, 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질: 200 µg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100 °C에서 5분간 가열한 후 12.5 % SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5 % skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bcl-2, 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 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

6) 통계처리

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

실험성적

1. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리가 肺癌細胞株의 생존율에 미치는 영향

加減十全大補湯과 항암 화학요법제인 As₂O₃의 병용처리에 의한 폐암세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 인간 肺癌細胞株인 H-460세포에 다양한 농도의 加減十全大補湯과 As₂O₃를 단독 혹은 병용처리한 후 세포생존율을 MTT 방법으로 조사하였다 (Fig. 1A and 1B). 먼저 加減十全大補湯 및 As₂O₃의 단독처리 시에는 고농도에서는 각각의 농도에 의존적으로 암세포 세포죽음을 유발시켰다(Fig. 1B). 하지만 두 약물의 병용처리는 H-460 세포에서의 이들 약제에 대한 감수성(sensitivity)을 증가시켜서 세포독성이 현저히 증가됨을 나타내었다 (Fig. 1B). 이러한 加減十全大補湯과 As₂O₃의 세포독성에 대한 병용처리의 상승효과는 두 약물의 다양한 농도 조합에서도 관찰되었다. 또한 250 µg/ml 농도의 加減十全大補湯을 다양한 농도의 As₂O₃와 병용 투여한 결과 Fig. 2에서와 같이 병용투여시 유의하게 암세포 세포죽음효과를 향상시켰다.

A)

	As ₂ O ₃							
	Control	40µM	20µM	10µM	5µM	2.5µM	1.3µM	0.6µM
GSD								
1000µg/ml								
GSD								
500µg/ml								
GSD								
250µg/ml								
GSD								
125µg/ml								
GSD								
63µg/ml								

B)

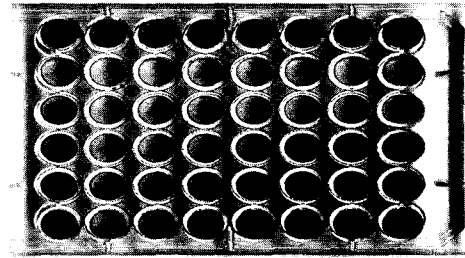


Fig. 1. The synergistic cytotoxic effects of the cotreatment of GSD and As₂O₃ in H-460 cells. Cells were treated with various concentrations of GSD or As₂O₃ alone, and the cotreatment of these two drugs for 48 hr. Then, cell viability was measured by MTT assay.

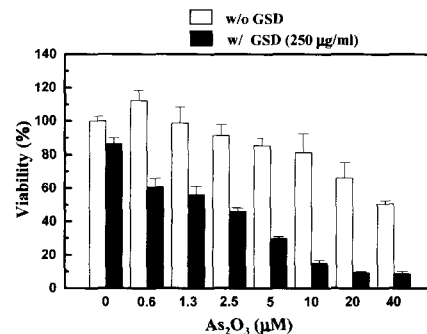


Fig. 2. The cotreatment of GSD and As₂O₃ induced synergistically the death of H-460 cells. Cells were treated with various doses of As₂O₃ in the absence or in the presence of GSD (250 µg/ml) for 48 hr. Then, cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean of three independent experiments. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates.

2. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리가 H-460 細胞株의 cytopathic effect에 미치는 영향

加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포에서의 세포병변 등의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 H-460 세포에 加減十全大補湯 250 µg/ml 단독, As₂O₃ 5 µM 단독, 그리고 두 약물을 병용처리하고 36시간 이후에 광학현미경하에서 암세포의 형태를 관찰하였다. Fig. 3에서와 같이 加減十全大補湯 혹은 As₂O₃ 단독으로는 별다른 세포병변 현상(cytopathic effect)을 관찰할 수 없었으나, 두 약물의 병용처리 시는 세포가 배양판의 표면에서 분리되며 분해되는 뚜렷한 세포병변 현상이 관찰되었다.

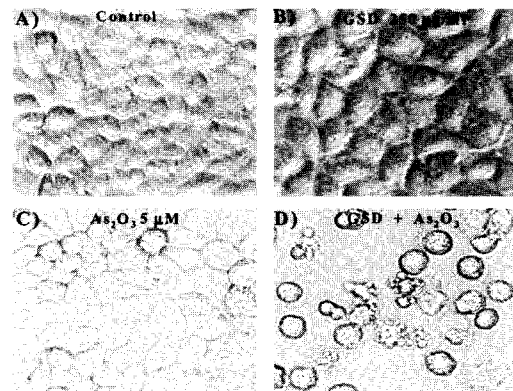


Fig. 3. The cytopathic effect of the cotreatment of GSD and As₂O₃ in H-460 cells. Cells were treated with GSD (250 µg/ml), As₂O₃ (5 µM) alone, or GSD and As₂O₃ for 36 hr. The cytopathic effect was observed under light microscopy (Olympus, Japan).

3. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 H-460 細胞株의 세포 죽음 성격 규명

加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포 죽음이 세포고사 기전에 의하여 매개될 가능성을 조사하기 위해, 세포고사 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 약제가 처리된 세포의 핵을 DAPI 염색을 시행하였다. 加減十全大補湯과 As₂O₃를 36시간 단독 혹은 병용처리 후 DAPI 염색을 시행한 결과, 정상대조군 및 加減十全大補湯, As₂O₃ 단독처리군에서는 모두 타원형의 온전한 형태의 핵 모양이 관찰되었으나, 병용처리군의 세포에서는 chromatin 구조의 응축(condensation)과 분절(fragmentation)된 핵 모양이 관찰되었다 (Fig. 4). 이러한 결과는 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포죽음이 세포고사 기전에 의하여 매개됨을 시사하였다.

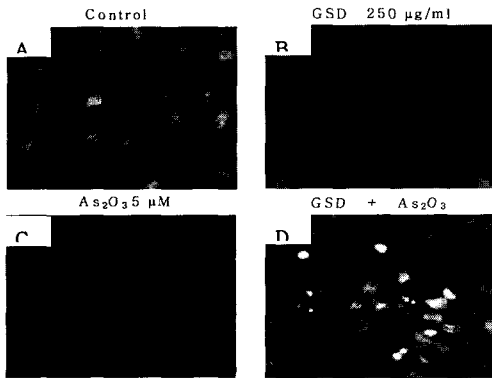


Fig. 4. The cotreatment of GSD and As₂O₃ induced the chromatin condensation and fragmentation of H-460 cells. Cells were treated with GSD (250 µg/ml), As₂O₃ (5 µM) alone, or GSD and As₂O₃ for 36 hr. After staining with DAPI, cells were observed under fluorescent microscopy (Olympus, Japan).

4. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 H-460 세포 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 영향

加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포죽음시 나타나는 미토콘드리아의 막전위 변화 여부를 조사하기 위하여 약제가 처리된 세포를 Rhodamine-123 염색을 시행하고 이를 관찰하였다.

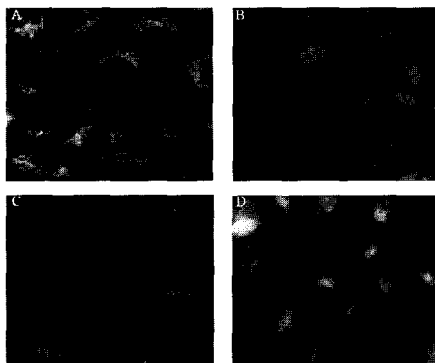


Fig. 5. The cotreatment of GSD and As₂O₃ induced the mitochondrial membrane potential transition in H-460 cells. Cells were treated with GSD (250 µg/ml), As₂O₃ (5 µM) alone, or As₂O₃ and GSD for 36 hr. After staining with Rhodamine-123 (5 µM), cells were observed under fluorescent microscopy (Olympus, Japan).

加減十全大補湯과 As₂O₃ 를 36시간 단독 혹은 병용처리 후

Rhodamine-123 염색을 시행한 결과, 정상대조군 및 As₂O₃, 加減十全大補湯 단독처리군에서는 모두 녹색의 형광이 세포질에서 점상형태(punctuated)로 분포하는 양상, 즉 막전위 변화가 일어나지 않았으나, 加減十全大補湯과 As₂O₃ 병용처리군에서는 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미분성(diffuse)으로 산재하는 녹색 형광이 관찰되어 미토콘드리아의 막전위 변화가 일어났음을 보여주었다 (Fig. 5).

5. 항산화제가 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에 미치는 영향

加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포 죽음이 활성산소에 의해서 매개되어질 가능성을 조사하기 위하여 항산화제인 10 mM 농도의 N-acetyl cystein (NAC) 를 30분 전 처리한 후 加減十全大補湯과 As₂O₃를 병용처리하여 48시간 배양 후 광학현미경과 MTT 방법으로 세포병변 및 생존율을 조사하였다. 36시간 후의 세포병변 현상을 광학현미경으로 조사한 바 Fig. 6에서와 같이 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리군에서 뚜렷한 세포병변 현상이 관찰되었으나 항산화제인 NAC를 전 처리하고 두 약제를 병용처리한 실험군에서는 세포병변 현상이 관찰되지 않고 정상세포의 동일한 형태학적 모습을 보여 주었다.

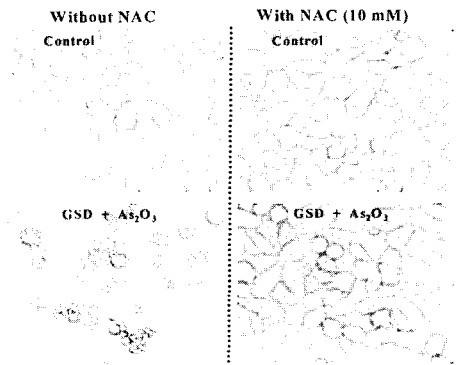


Fig. 6. Antioxidant, NAC prevented the death of H-460 cells by the cotreatment of GSD and As₂O₃. Cells were pretreated with 10 mM NAC for 30 min. Then, the cells were treated with GSD (250 µg/ml) and As₂O₃ (5 µM). After 36 hr, cell morphology was observed under light microscopy.

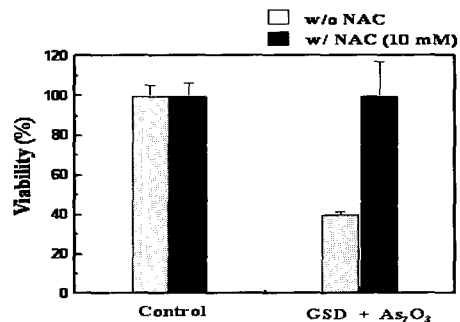


Fig. 7. Antioxidant, NAC prevented the death of H-460 cells by the cotreatment of GSD and As₂O₃. Cells were pretreated with 10 mM NAC for 30 min. Then, the cells were treated with GSD (250 µg/ml) and As₂O₃ (5 µM) for 48 hr. Then, cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean of three independent experiments. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates.

또한 48시간 후의 MTT 방법에 의한 세포 생존율을 측정시

에도 항산화제인 NAC를 전처리하지 않고 두 약제를 병용처리 시에는 생존율이 대조군의 38 %정도로 감소하였으나 항산화제인 NAC 10 mM을 처리하였을 때 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포독성을 억제하여 대조군과 유사한 생존율을 나타내었다 (Fig. 7). 그러나 NAC 10 mM을 단독처리하였을 때 H-460 세포의 고사율에 유의한 변화를 초래하지 않았다. 이상의 결과들은 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 나타나는 세포 죽음에 활성산소가 관여하고 있음을 시사하는 결과이다.

6. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에서 PARP cleavage 관찰

Apoptosis에 의해 일반적으로 caspase라 불리는 일련의 단백질분해효소(proteases)들이 활성화된다. 이중 세포사멸과정의 실행인자로 여겨지는 caspase-3는 procaspase-3 상태로부터 상위 활성유도인자인 caspase-8이나 -9에 의해 활성화되며, 활성화된 caspase-3는 이후의 세포고사과정의 중요한 실행인자인 ICAD를 분해시켜 DNA 분절을 유도하거나 PARP cleavage등을 야기한다. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리시에도 이러한 PARP cleavage가 관찰되므로 caspase-3의 활성화를 매개로 하는 전형적인 세포고사과정을 거치는 것으로 생각되어진다 (Fig. 8).

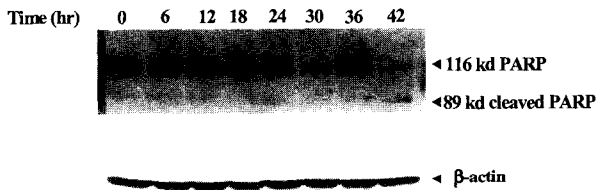


Fig. 8. The cotreatment of GSD and As₂O₃ induced PARP cleavage in H-460 cells. Cells were treated with GSD (250 μg/ml) and As₂O₃ (5 μM) for the indicated periods. PARP cleavage was measured by Western blotting with anti-PARP antibodies.

7. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 H-460 폐암세포 세포죽음에서 세포고사 신호전달 분자 Bax, BclXL, BclXS 단백질의 변화에 미치는 영향

세포고사 신호전달계에서 caspase-3의 활성화에 중요한 기관인 미토콘드리아에 연관된 Bcl-2 family 단백질군, 즉 Bax, Bak, Bcl-2, BclXL 그리고, BclXS등은 미토콘드리아의 기능을 조절하여 세포의 성장이나 사멸에 중요한 역할을 수행한다. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포죽음시 이러한 Bcl-2 family 단백질, 특히 Bax, BclXL 그리고, BclXS 단백질의 발현양상 변화를 조사하였다. 加減十全大補湯과 As₂O₃를 다양한 시간동안 처리한 후 세포를 포집한 후 파쇄하여 완충액에 녹아있는 총 단백질을 추출하였다. 이를 12.5 %의 SDS-PAGE에서 분리하여 '실험 및 방법'에 기술한 바와 같이 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후 Bcl-2 family계 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. Fig. 9A의 결과와 같이 pro-apoptotic Bax 단백질의 발현은 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리시에도 대조군에 비교하여 별다른 변화를 보여주지 않았다. 또한 Fig. 9B에서처럼 anti-apoptotic한 역할을 수행하는 것

으로 알려진 BclXL 단백질 역시 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리시에도 대조군에 비해 별다른 발현양상 변화를 나타내지 못하였다. 하지만 또다른 pro-apoptotic 기능을 수행하는 것으로 알려진 BclXS 단백질의 발현은 증가되는 양상을 나타냈으며, 이러한 BclXS 증가가 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리시의 세포 죽음에 밀접하게 연관되어 있으리라 사료된다.

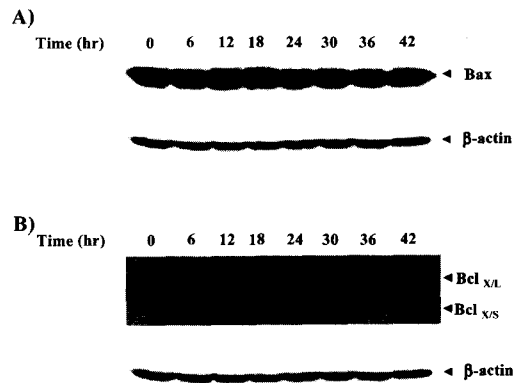


Fig. 9. The cotreatment of GSD and As₂O₃ increased the expression of Bclxs. Cells were treated with GSD (250 μg/ml) and As₂O₃ (5 μM) for the indicated periods. The same amounts of protein from cell lysates were separated on 12.5 % SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with anti-BclXL/XC, or anti-Bax, antibodies and the immunoreactive band was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL system, Amersham, England).

고 찰

醫學이 급속도록 발전하고 있음에도 癌의 발생빈도는 날로 증가 추세에 있으며, 각종 치료에도 불구하고 癌으로 인한 死亡率은 증가되고 있다^{2,3}. 癌은 細菌 등에 의한 傳染病과는 달리 個體를 형성하고 있는 正常細胞自體가 여러 가지 자극 등 어떠한 기전에 의하여 유전자의 形質轉換이 일어나 生物學的 性狀이 다른 非正常的인 癌細胞로 변화된 다음, 빠른 浸潤性 成長과 체내 각 부위로의 확산 및 전이와 같은 特異性을 지니고 無制限의으로 증식되어 결국 개체를 죽음에 이르게 하는데, 잘 발달되어 있는 생체의 방어기전에도 불구하고 발생하게 된다¹⁷⁻²⁰.

生體防禦 작용으로서 면역기능은 생체가自己和 非自己를 식별하는 기구이며, 외부로부터 침입하는 微生物, 同種의 조직이나 생체에 생긴 불필요한 產物 등과 특이하게 반응하여 항체를 생산하고 또한 이를 배재함으로써 그 개체의 항상성을 유지하는 현상으로²¹, 韓醫學에서는 《素問·刺法論》²²에 “五疫之至……正氣存內 邪不可干” 《素問·評熱病論》²²에 “邪氣所湊 其氣必虛”라 하여 질병의 성립과정 중 생체의 저항력으로서의 正氣의 중요성을 강조하고 있으며, 正氣虛는 疾病을 일으키는 중요한 內的 조건으로, 正氣는 인체의 生理活動을 정상적으로 유지시키고 內外的 病因으로부터 인체를 防禦하고 질병으로부터 회복시키는 작용을 한다²². 韓醫學에서 癌에 대한 인식은 《內經》²²에 ‘腸覃, 石瘕’의 기록에서 볼 수 있으며²³, 歷代 醫書에서 位置와 病理의 특성에 따라 腫瘍 및 積聚, 癥瘕, 癰疽, 石癰, 反胃, 噎膈, 石瘕, 癰疽, 舌疳 등으로 다양하게 기술되고 있으며²⁴⁻²⁵, 또한 發生原因은 外感六淫, 內傷七情, 飲食不節 및 邪氣 등으로 정리

할 수 있는데, 이들은 인체의 正氣虛와 복합적으로 작용한다고 볼 수 있다²⁵⁻²⁸⁾.

西洋醫學에서의 癌治療法은 外科的 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등이 주를 이루고 있으며²⁹⁾, 韓醫學에서 癌의 治法은 證型에 따라 活血化瘀, 化痰軟堅, 清熱解毒, 行氣散結, 以毒攻毒 등의 祛邪法과 健脾益氣, 滋補肝腎, 滋陰溫陽, 理氣活血 등의 扶正法을 응용하는데 病程에 따라 初期에는 攻法을, 中期에는 攻補兼施를, 末期에는 扶正을 治療원칙으로 한다³⁰⁻³¹⁾.

韓醫學에서는 肺癆이란 용어는 없으나 《素問·奇病論》³²⁾에서 “病脇下滿 氣逆……病名曰息賁”이라 하여 肺癆과 비슷한 의미로 “息賁”이 언급된 이래 《靈樞·邪氣臟腑病形》³²⁾에 “肺脈……滑甚 爲息賁上氣”, “肺脈……微急 爲肺寒熱 怠惰 咳唾血 引腰背胸”, 《難經·論五臟積病》³³⁾에 “肺之積名曰息賁……久不已, 令人漸漸寒熱 喘咳, 發肺癰”이라 述하였으며, 晚起肺癆의 경우 疲倦, 疲困, 乏力, 消瘦, 貧血, 食慾不振 등의 전신증상으로 나타나는 것으로 보아 氣血兩虛型의 辨證樣相으로 이해할 수 있다. 治療法 또한 正氣와 衛氣를 강화하여 宿主의 抗癌能力을 증강시키는 扶正固本法과 祛邪하되 인체의 正氣를 補益하며 正氣를 손상시키지 않는 扶正祛邪法이 널리 시행되고 있는데³⁴⁾ 최근에는 韓·洋方을 결합한 治療法이 점차 시행되고 있으며 본 연구에 사용한 加減十全大補湯은 이러한 扶正祛邪法에 충실한 處方으로 益氣養血, 化痰止痛, 活血祛瘀, 健脾益氣하는 治療효과를 갖고 있다^{15,16)}.

十全大補湯은 宋代, 《太平惠民和劑局方》¹⁶⁾에 최초로 수록된 處方으로 “治諸虛不足 五勞七傷 不振飲食 久病虛損 時發潮熱 思慮傷動血氣 喘咳中滿 脾胃氣弱 惡心煩悶 并皆治之”의 목적으로 立方되어 처음 기재된 이후 여러 醫家^{35,36)}들에 의해 氣血을 大補하여 虛勞를 治療하는 대표적인 方劑로 임상에 널리 응용되고 있다. 十全大補湯의 構成藥물 중 人蔘, 白朮, 白茯苓, 白芍藥, 甘草는 補氣健脾, 補氣健脾化滯하고 熟地黃, 當歸, 赤芍藥, 川芎은 補肝腎, 補血養血하고, 黃芪는 補氣升陽, 托毒排膿, 補氣扶正하는 效果가 있어 임상에서 많은 연구가 이루어지고 있다^{14, 37-38)}.

加減十全大補湯은 《最新專病專治高效方藥叢書》¹⁵⁾에 수록된 處方으로 《太平惠民和劑局方》의 十全大補湯¹⁶⁾에서 肉桂를 減하고 黃連, 穿山甲, 玄胡索, 鷄血藤, 赤芍藥을 加한 處方으로, 黃連은 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒하고, 穿山甲은 活血通脈 消腫排膿하고, 玄胡索은 活血祛瘀 理氣止痛 通經脈하고, 鷄血藤은 補血 行血 舒筋活絡 通絡하고, 赤芍藥은 養血活血 消癰散腫하여 行血하면서도 瀉하지 않으므로 주로 虛證에 쓸 수 있으며 慢性消耗性疾患인 癌에도 역시 그 活用도가 높다^{39,40)}.

세포고사(apoptosis)는 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요 기전⁴¹⁾으로 인식되면서 1980년대 후반기부터는 생명과학에서 중요 관심영역으로 인식되어 많은 발전을 가져왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다^{42,43)}. 세포고사 기전의 이상은 암, 자가면역질환, 퇴행성 질환 및 HIV 등의 병리에 중요한 역할을 수행함이 보고되었다^{44,45)}. 특히 항암 치료에 대한 내성(resistance) 발현이나 감수성(sensitivity) 저하 등도 세포고사 신호전달기전의 기능과 밀접한 관계가 있다. 최근 연구에 의하면

항암 치료에 흔히 사용되는 많은 화학요법제제들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 암조직이나 세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀져 있고 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide 경로, 초기발현 유전자(early immediate gene) 발현, 단백질 분해효소 caspase family cysteine protease 활성화, DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 활성화 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다⁴²⁾. 이러한 이유로 항암 치료의 효율성은 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 항암 치료제들의 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 이미 입증되어 있는 상황이다. 이러한 사실에 근거하여 본 연구자는 韓·洋方에서 사용되는 항암치료제의 장점을 이용하여 두 분야 약제의 병용치료에 의한 항암치료의 상승효과에 대하여 治療法의 개발에 관심을 가지게 되었다. 특히, 임⁴⁶⁾등의 연구에서 八珍抗癆丹과 白花蛇舌草가 들어 있지 않은 것 외에는 동일한 약제로 구성되는 八珍湯合化積丸과 adriamycin과의 병용투여로 암세포의 세포고사 효능을 높일 수 있다고 보고하였다.

한편 As₂O₃로 인한 세포고사가 처음 관찰된 이후로 As₂O₃에 의한 세포고사의 분자적 기전은 혈액암에서 주로 광범위하게 연구가 되어 왔다⁴⁷⁻⁵⁰⁾. As₂O₃는 2000년에 미국식품의약청(FDA)에서 백혈병치료제로 승인한 이후 급성 전골수성 백혈병, 신경모세포종, 골수종, 위암, 전립선 및 난소암 등에서 세포고사 효과가 보고 되어 있다^{48,51-53)}. As₂O₃가 retinoic acid에 저항력을 가진 APL 환자들의 임상적 증상을 격감시켰다는 보도는 As₂O₃와 retinoic acid의 세포고사 기전이 다른 경로로 이루어진다는 것을 의미하였다^{48,49)}. As₂O₃의 백혈병 치료 효과가 정확하게 밝혀져 있지는 못하지만 As₂O₃가 임상적으로 적용 가능한 농도인 0.5-2.0 μM에서 세포고사를 유도하는 기전은 APL 세포주인 NB4에서 PML-RARα fusion 단백질의 조절과 Bcl-2를 통해 매개되어진다고 알려졌다⁵⁰⁾. 그러나 항산화제인 NAC는 PML-RARα chimeric protein의 분해에도 불구하고 As₂O₃로 유도된 NB4에서의 세포고사를 억제했다. 최근에, As₂O₃는 spindle microtubules의 조합을 방해하여 HeLa 세포의 고사를 유도한다고 보고되었다⁵⁴⁾.

본 연구에서도 10 μM 이상의 농도 하에서 As₂O₃에 의한 직접적인 암세포 사멸능력을 확인하였다. 그러나 加減十全大補湯을 As₂O₃와 병용처리 시 As₂O₃의 사용농도를 줄이면서도 폐암세포의 암세포사멸 능력을 현저하게 증진시킬 수 있음을 확인하였다 (Fig. 1, 2). 또한 정상대조군 및 加減十全大補湯, As₂O₃ 단독처리군에서는 암세포에서 별다른 형태학적 변화가 없었으나,

두 약물의 병용처리시는 세포가 배양판의 표면에서 분리되어 분해되는 뚜렷한 세포병변 현상이 관찰되었으며(Fig. 3), chromatin 구조의 응축(condensation)과 분절(fragmentation)된 핵 모양이 관찰되었다(Fig. 4). 이러한 결과로 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 암세포의 세포죽음이 세포고사 기전에 의하여 매개됨을 확인하였다. 한편, cisplatin 등의 다양한 항암제의 암세포 사멸과정에서 자유활성산소의 형성이 중요한 기전 중의 하나로 보고 되어 있다. 본 연구에서도 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 활성산소기의 역할을 규명하고자 항산화제인 NAC를 전 처리 후 조사한 바 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포죽음이 유의하게 감소하여 두 약물의 병용처리에 의해 유발되는 세포죽음이 이러한 활성산소 등의 산화적 손상에 기인된 것임을 시사하였다(Fig. 6, 7). 세포고사 과정중 caspase-3는 procaspase-3 상태에서 상위 활성유도인자인 caspase-8이나 -9에 의해 활성화되며, 활성화된 caspase-3 protease는 세포고사과정의 중요한 실행인자인 ICAD를 분해시켜 DNA 분절을 유도하거나 PARP cleavage등을 야기한다. 본 연구에서도 이러한 PARP cleavage가 관찰됨으로써 caspase-3의 활성화를 매개로 하는 세포고사 과정을 확인하였다(Fig. 8).

한편 세포고사의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 미토콘드리아에 대한 최근 보고에 의하면 미토콘드리아의 기능조절은 세포질로 방출되는 cytochrome c, caspase activators, 막전위차의 변화 그리고 Bcl-2 family 단백질 등이 관여하는 것으로 알려져 있다⁵⁵⁻⁵⁷). Bcl-2 단백질은 대표적인 세포고사 억제 단백질로서 미토콘드리아의 막에 존재하면서 세포의 운명을 결정한다. 세포고사를 억제하는 Bcl-2나 BclXL 단백질 등은 세포고사 촉진 단백질인 Bax와 heterodimer를 형성하거나 암세포에서 항암제 처리시 인산화되어 그 기능을 상실하게 된다. 그러나 Bax, Bak, Bad, 그리고 BclXS 같은 세포고사 촉진 단백질은 미토콘드리아로 이동되어 cytochrome c를 방출할 수 있는 pore를 형성하게 하여 세포고사를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 추정되고 있다. 본 연구에서도 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리는 肺癌細胞株 H-460에서의 미토콘드리아 막전위 변화를 유발하였으며(Fig. 5), 또한 anti-apoptotic한 역할을 수행하는 것으로 알려진 BclXL 단백질과 Bax 단백질의 발현변화는 관찰되지 않았지만, 세포고사를 촉진하는 BclXS 단백질 발현증가를 유도하여 세포고사를 유발하는 것으로 나타났다(Fig. 9)

이상의 결과들을 종합할 때 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리는 As₂O₃ 단독처리에 비하여 현저하게 암세포 고사 능력을 증진시킬 수 있으며, BclXS 같은 세포고사 촉진 단백질의 발현증가와 연관된 미토콘드리아의 막전위 변화를 유발시켜 세포고사 신호전달과정에 관여하고 있음을 알 수 있고, 또한 활성산소의 생성을 매개로 하는 산화적 손상이 중요하게 관련되어 있으리라 여겨진다. 따라서 이후 보다 심도있는 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 나타나는 작용기전에 대한 연구가 필요하며, 추후 임상에서 암 환자들의 치료에 유용하게 활용될 기초 자료를 제공할 수 있으리라 사료된다.

결론

본 연구에서는 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 폐암 세포에 대한 세포독성 상승효과를 확인하고 그 세포고사 작용기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 肺癌細胞株 H-460에 두 약물의 단독 및 병용투여 후 세포 생존율의 비교, 세포병변 현상, chromatin 구조의 응축과 분절, 미토콘드리아 막전위 변화, 항산화제 NAC의 영향, PARP, Bcl2 family 단백질의 발현 변화 양상을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 肺癌細胞株 H-460 세포에서 세포독성의 상승효과가 관찰되었다. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 세포병변 현상과 chromatin 구조의 응축과 분절된 핵 모양이 관찰되는 세포고사에 의한 세포독성을 확인하였다. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 肺癌細胞株 H-460 세포에서 미토콘드리아의 막전위 변화가 관찰되었으며, 이때 미토콘드리아의 기능에 연관된 BclXS 같은 세포고사 촉진 단백질의 발현증가가 유발되었다. 항산화제인 NAC를 전 처리 후 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리에 의한 세포죽음이 유의하게 감소하여, 두 약물의 병용처리에 의해 나타나는 세포죽음이 활성산소의 산화적 손상에 기인된 것임을 시사하였다. 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리 시 肺癌細胞株 H-460 세포에서 caspase-3 protease의 세포내 표적인자인 PARP의 cleavage가 관찰되었다.

이상의 결과들을 종합할 때 加減十全大補湯과 As₂O₃의 병용처리는 As₂O₃ 단독처리에 비하여 현저한 암세포 고사 능력을 증진시킬 수 있으며, BclXS 같은 세포고사 촉진 단백질의 발현증가가 연관된 미토콘드리아의 막전위 변화를 유발시켜 세포고사 신호전달과정이 관여하고 있음을 알 수 있고, 또한 caspase-3 protease의 활성화 및 활성산소의 생성을 매개로 하는 산화적 손상과 관련되어 세포고사 효과를 나타내었으며, 그 효과 기전에 대한 더욱 심도 있는 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. 趙鍾寬 : 韓方臨床腫瘍學, 대전, 周辰出版社, pp. 725-758, 2001.
2. 서울대 의과대학 : 면역학, 서울대학교 출판부, pp. 78-90, 303-311, 337-351, 1990.
3. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교출판부, pp. 1-3, 31-44, 1992.
4. 김정순 : 疫學原論, 신광출판사, pp. 223-254, 1990.
5. 서울대학교병원 : 전공의 진료편람, 서울, 의학출판사, pp. 108-111, 1994.
6. Madewell, B. R.: Tumor immunology and immune therapy. Tumor Immunol. 69, 213, 1982.
7. Harris AL. Antiangiogenesis of cancer therapy. Lancet, 349(SII):13-15, 1997.
8. 金柄住 : 百合固金湯加味方の抗腫瘍 効果에 關한 研究, 圓光大學校 大學院, 1999.
9. 李堇求 : 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용처리시 나타

- 나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 관한 作用機轉 研究, 圓光大學校 大學院, 2000.
10. 金成鎮 : 八珍湯合化積丸의 抗腫瘍 效果에 관한 研究, 圓光大學校 大學院, 1999.
 11. 韓相日 : 乳根皮油抽出液이 HepG2 간암세포에 미치는 항암 효과 및 기전에 대한 연구, 圓光大學校 大學院, 1998.
 12. Sasake S. : Antitumor agents from medical plants, Jpn, Kokai Tokyo koho Jp, p. 58, 118, 820, 1983.
 13. 황규동 외 : 十全大補湯, 瓦松 및 十全大補湯加瓦松의 抗腫瘍 效果와 免疫反應에 관한 연구, 한방중앙학회지, 2(1):1-23, 1996.
 14. 李炯柱 외 : 十全大補湯加味方이 抗腫瘍化學療法제의 抗腫瘍 效果 및 腫瘍細胞의 lysosomal enzymes에 미치는 影響, 한국전통의학지, 7(2):116-122, 1997.
 15. 最新專病專治高效方藥叢書 編纂委員會 : 最新專病專治 高效方藥叢書, 학원출판사, p. 165, 2000.
 16. 陳師文 : 太平惠民和劑局方, 臺北, 旋風出版社, p. 318, 1975.
 17. 李淵月 : 肺癆湯이 人體癌細胞株 및 免疫反應에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1997.
 18. 郁仁存 外 : 癌症診治康復350問 北京, 金盾出版社, pp.98-105, 1989.
 19. 臥字魚 外 : 中國醫學史, 北京, 人民衛生出版社, p. 238, 1991.
 20. 東軒居士 : 衛濟寶書, 文淵閣四庫全書, 서울, 麗江出版社, p. 817, 1987.
 21. 菊地浩吉 외 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, pp. 33-35, 204-205, 211-212, 316-337, 1989.
 22. 王 冰 : 黃帝內經, 서울, 高文社, 素問 p. 91, 166, 229, 326, 靈樞 p. 76, 88, 1997.
 23. 錢伯文 : 腫瘤的辨證施治 上海, 上海科學技術出版社, pp.1-10, 1980.
 24. 梁寶仁 : 癌症適中灸治療 河北, 河北科學技術出版社, pp.1-24, 1992.
 25. 厲 暢 : 癌의 中醫治療, 서울, 東洋醫學 18(1) : 56-63, 1992.
 26. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版社, pp.13-14, 15, 245-255, 1995.
 27. 李 挺 : 醫學入門, 서울, 翰成社, p. 358, 390, 1982.
 28. 陳 言 : 三因極一病證方論, 북경, 人民衛生出版社, p.206, 1983.
 29. Fish B. : Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, Cancer, 54:2609, 1984.
 30. 문 구 外 : 암 동서의 결합치료 1권, 익산, 원광대학교 출판국, pp. 253-303, 383-460, 1999.
 31. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學技術出版社, pp.1-10, 1983.
 32. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院出版部, p. 44. 94, 1981.
 33. 扁 鵲 : 難經, 昭人出版社, pp. 187-193, 1985.
 34. 羅天益 : 衛生寶鑑, 서울, 金剛出版社, p. 220, 1981.
 35. 張介賓 : 景岳全書, 文淵閣四庫全書 弟七七冊, 서울, 麗江出版社, p. 451, 479, 481, 1988.
 36. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p. 447, 1979.
 37. 金大根 外 : 十全大補湯이 抗腫瘍劑를 投與한 생쥐의 胸線細胞에 미치는 影響, 대한분초학회지, 13(2):129-135, 1998.
 38. 윤재호 外 : 十全大補湯이 癌轉移 抑制에 미치는 迎香, 대한한방중앙학회지, 4(1):131-146, 1998.
 39. 辛民教 : 原色 臨床本草學, 서울, 永林社, p. 166, 172, 175, 219, 221, 240, 249, 297, 300, 310, 385, 403, 404, 453, 470, 472, 688, 1991.
 40. 孟琳升 : 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, p.149, 197, 232, 1995.
 41. Fadeel B, Henter JI, Orrenius S. Apoptosis required for maintenance of homeostasis: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by too little cell death Lakartidningen. 97:1395-1400, 1402, 2000.
 42. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. Adv. Pharmacol. 41: 461, 1997.
 43. Dai J, Weinberg SR, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. Blood. 93:268-277. 1999.
 44. Huang S, Huang CF, Lee T. Induction of mitosis-mediated apoptosis by sodium arsenite in HeLa S3 cells. Biochem Pharmacol. 60:771-780. 2000.
 45. Desagher S, Martinou JC : Mitochondria as the central control point of apoptosis, Trends Cell Biol, 10(9):369-77, 2000.
 46. Lim YS, So HS, Kim MS, Moon G, Won JH, Baek SW, Moon SR, Yang SH, Kim BJ, Ko CB, Park R. Palginsensitizes the adriamycin-induced apoptosis via the enhancement of Fas/Fas ligand expression. Life Sci. 2002 Oct 4;71(20):2391-401.
 47. Barry MA, Behbke CA and Eastman A. Activation of programmed cell death(apoptosis) by cisplatin, other cancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem Pharmacol. 40:2353-2362. 1990.
 48. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qui QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z and Wang ZY. Use of arsenic trioxide As₂O₃ in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. Blood. 89: 3354-3360. 1997.
 49. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, Deblasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP Warrell R. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. N Engl J Med. 339:1341-1348. 1998.
 50. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xiong SM, Shen ZX, Sun GL, Ma J, Zhang TD, Gazin C, Naoe T, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide As₂O₃ in the treatment of acute promyelocytic leukemia; As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with down-regulation of Bcl-2 expression and modulation of

- PML-RAR/PML proteins. *Blood*. 88:1052-1061. 1996.
51. Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K. Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro. *FEBS Lett*. 455:59-62. 1999.
52. Park WH, Seol JG, Kim ES, Hyun JM, Jung CW, Lee CC, Kim BK, Lee YY. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Res*. 60: 3065-3071. 2000.
53. Uslu R, Sanli UA, Sezgin C, Karabulut B, Terzioglu E, Omay SB, Goker E. Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 6:4957-4964. 2000.
54. Dai J, Weinberg SR, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood*. 93:268-277. 1999.
55. Desagher S, Martinou JC : Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol* 10(9):369-77, 2000.
56. Green DR, Reed JC : Mitochondria and apoptosis, *Science*, 281(5381):1309-12, 1998.
57. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X : Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu Rev cell Dev Biol*, 15:269-90, 1999.