

冬蟲夏草의 인체 폐암세포 증식억제에 관한 연구

홍상훈 · 감철우 · 박동일*

동의대학교 한의과대학 내과학교실

Induction of Apoptotic Cell Death by an Aqueous Extract of Cordyceps militaris in A549 Human Lung Carcinoma Cells

Sang Hun Hong, Chul Woo Kam, Dong-Il Park*

Department of Oriental Medicine, Dongeui University

To investigate the anti-proliferative effects of an aqueous extract of Cordyceps militaris (AECM) on the growth of human lung carcinoma cell line A549, we performed various biochemical experiments such as the effects of AECM on the cell proliferation and viability, the morphological changes, the effects on expression of apoptosis and cell growth-regulatory gene products. Results obtained are as follow; AECM treatment declined the cell viability and proliferation of A549 cells in a concentration-dependent manner. The anti-proliferative effect by AECM treatment in A549 cells was associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. Taken together, these findings suggest that AECM-induced inhibition of human lung cancer cell proliferation is associated with the induction of apoptotic cell death via regulation of several major growth regulatory gene products, and C. militaris may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : Cordyceps militaris (AECM), apoptosis, lung cancer, A549

서 론

폐암은 발생빈도가 높은 악성종양의 하나로 최근 세계적으로 발병률과 사망률이 계속 상승하고 있다¹⁾. 우리 나라에서도 폐암은 발생빈도가 높은 악성종양의 하나로 계속 상승하고 있어 26.2%의 사인별 사망률을 보여주고 있는데^{1,2)}, 폐암의 원인으로는 흡연, 대기오염, 직업(석면, 우라늄)과 유전적 요인 등이 알려져 있다³⁾.

韓醫學의 문헌에 폐암이라는 병명이 언급되지는 않았지만, 肺積, 肺疽, 息賁, 肺癰 등의 병증이 폐암의 범주에 속한다고 볼 수 있는데²⁾, 그 병인병기는 邪毒侵肺, 痰濕內聚, 正氣內虛로 요약되며, 滋陰清肺, 溫陽益氣, 活血化於의 방법으로 主要 治法을 삼고 있다³⁾.

冬蟲夏草는 麥角菌과에 속하는 冬蟲夏草菌의 子實體와 寄生主의 幼蟲의 死體를 건조한 것으로, 주로 溫度 濕도가 높아지는

시기에 살아있는 昆蟲의 몸 속으로 들어가 發育, 增殖하면서 寄主昆蟲을 죽이고 얼마 후 子實體를 昆蟲의 表皮에 형성하는 일종의 약용버섯이다⁴⁾. 현대 약리학적으로는 冬蟲夏草가 氣管支의 擴張作用, 鎮靜作用, 抗腫瘤作用 등 유효한 약리작용이 있는 것으로 밝혀지고 있으며, 특히 Cordycepin과 다당체에 抗癌효과가 있는 것으로 보고되고 있다⁴⁻⁹⁾. 韓醫學에서 冬蟲夏草는 性味가 甘·溫하고 無毒하며 益腎補肺, 止咳化痰 등의 효능이 있어 腎虛陽痿, 肺虛久咳, 腰膝酸軟, 夢遺滑精, 耳鳴, 病後體虛, 自汗 등의 病症을 치료한다¹⁰⁾.

冬蟲夏草를 이용한 암에 대한 연구는 정 등¹¹⁾이 冬蟲夏草의 면역조절 및 항암효과를, 김 등¹²⁾이 冬蟲夏草가 사염화탄소로 유발된 간 손상 및 간암세포증식에 미치는 영향을, 김 등¹³⁾이 Caspase-3을 경유한 冬蟲夏草 자실체 유래 4-Acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3, 15-diol의 방광암 세포주(NBT-II) Apoptosis에 관한 연구를 하였으나, 인체 폐암세포에 관한 연구는 없었기에 冬蟲夏草의 항암작용을 조사하기 위하여 A549 인체 폐암세포주를 이용하여 冬蟲夏草 열수 추출물의 처리에 따른 암세포의 증식억제에 연관된 연구를 시도하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 박동일, 부산광역시 진구 양정2동 동의대학교 한의과대학
· E-mail : dipark@demc.or.kr, · Tel : 051-850-8650
· 접수 : 2004/05/24 · 수정 : 2004/06/17 · 채택 : 2004/07/20

재료 및 방법

1. 암세포배양

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포(human lung carcinoma cells)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)가 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다¹⁴⁾. 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간마다 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

2. 冬蟲夏草 수용액의 추출물 및 처리

본 연구에 사용된 冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)는 대전대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 공급받았으며 100 g을 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 μm의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. 冬蟲夏草 수용액 추출물(aqueous extract of *Cordyceps militaris* (AECM))의 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터 부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에 6 × 10⁵ 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. 冬蟲夏草 추출물을 세포에 처리하기 직전 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

3. Hematocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

세포배양용 6 well plate에 A549 폐암세포를 2 × 10⁴개/ml 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 冬蟲夏草 추출물을 적정농도로 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA 0.5 ml를 처리하여 세포를 부유시킨 후 phosphate-buffered saline (PBS) 0.5 ml을 가하여 세포를 모은 다음 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞어 2분간 처리하였다. Pasteur pipette의 모세관 현상을 이용하여 세포를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰하여 푸른색으로 염색된 세포를 죽은 세포로 추정하고 염색이 되지 않은 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 이에 따른 결과는 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)을 사용하여 분석하였다.

4. DAPI staining을 통한 암세포 핵의 형태 관찰

세포배양용 6 well plate에 A549 폐암세포를 2 × 10⁴개/ml 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 冬蟲夏草 추출물

을 배지에 희석 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 후 PBS를 가하여 세포를 모은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 상층액은 버리고 세포만 남긴 다음 formaldehyde solution (Sigma)과 PBS를 1 : 9 비율로 섞은 fixing solution을 500 μl 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 다시 1,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하고 상층액을 버린 다음 PBS 200 μl를 넣어서 충분히 섞은 후, 슬라이드글라스 위에 세포부유액을 80 μl정도를 떨어뜨린 다음 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. Cytospin이 끝난 후 PBS로 2~3회 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA)을 떨어뜨린 후 상온에서 10분간 두었다. 다시 PBS로 2~3회 세척하고 PBS를 사용하여 2500 : 1로 희석된 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma)를 슬라이드 글라스 위에 적당량 떨어뜨린 다음 빛을 차단하여 10분간 상온에서 염색시켰다. PBS로 DAPI solution을 충분히 씻어내고 증류수로 재빨리 세척한 다음 100% ethanol을 이용하여 탈수과정을 거친 슬라이드 글라스 위에 mounting solution 처리를 한 다음 형광 현미경 (Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 冬蟲夏草 추출물 처리 농도에 따른 핵의 형태변화를 관찰한 다음 AxioVision 프로그램을 이용하여 사진을 촬영하였다.

5. DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

冬蟲夏草 추출물의 처리에 따른 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. 이를 위하여 정상 및 冬蟲夏草 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액 (70% ethyl alcohol, 0.5% Tween²⁰)을 첨가하여 4°C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 μg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4°C에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 두 번 씻어낸 후, nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 Choi¹⁵⁾의 방법에 준하여 분석하였다.

결 과

1. 冬蟲夏草 추출물이 암세포의 성장에 미치는 영향

먼저 A549 인체 폐암세포의 생존율에 미치는 冬蟲夏草 추출물의 영향을 알아보기 위하여 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 인체 폐암세포 A549를 적정 시간 안정화시킨 후 48시간 동안 배지에 冬蟲夏草 추출물을 적정 농도로 희석하여 처리한 후, trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하여 冬蟲夏草 추출물이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 Fig. 1에 나타내었다. 이때 trypan blue에 의해 염색이 되지 않은 세포를 살아있는 세포로 hemocytometer를 이용하여 계수하여 정상 배지에서 배양된 암세포의 수와 비교하였다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 48시간 동안 정상 배지에서 자란 암세포에 비하여 冬蟲夏草 추출물이 함유된 배지에서는 冬蟲夏草 추출물의 첨가 농도 의존적으로 생존율이 감소하였음을 알 수 있었다. 즉 1.0 mg/ml 처리군의 경우 대조군에 비하여 27% 이상 세포성장이 억제되었으며, 3.0 mg/ml 처리군에서는 약 60% 정도의 세포성장 억제현상을 관찰할 수 있었다. 그리고 5.0 mg/ml 처리군에서는 생존율이 20% 정도로 거의 모든 암세포가 정상적인 생존을 하지 못하였음을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 冬蟲夏草 추출물의 농도가 증가될수록 A549 인체 폐암세포의 증식은 억제되었으며, 본 실험 조건에서의 LC50 농도는 약 2.0 mg/ml임을 알 수 있었다.

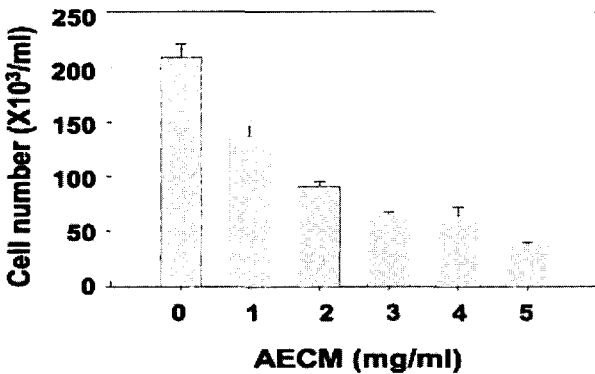


Fig. 1. Effect of an aqueous extract of *Cordyceps militaris* (AECM) on the viability in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and the viable cells were counted after 48 h AECM treatment. Data are means \pm SD of three separate experiments.

2. 冬蟲夏草 추출물에 의한 apoptosis 유도

冬蟲夏草 추출물의 처리에 의한 암세포의 생존을 감소에 의한 증식 억제 현상이 apoptosis 유발과 상관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI staining을 실시하여 핵의 형태를 조사하였다. 이를 위하여 실험방법에 서술한 것과 같이 정상 및 冬蟲夏草 추출물이 희석된 배지에서 자란 A549 폐암세포를 대상으로 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 통하여 핵의 형태변형 여부를 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 冬蟲夏草 추출물이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 冬蟲夏草 추출물이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 경우, 염색질 응축(chromatin condensation)에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 冬蟲夏草 추출물 처리 농도 의존적으로 관찰되었다.

다음은 冬蟲夏草 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 조사하기 위하여 준비된 세포들을 대상으로 PI 염색액을 이용하여 핵을 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 핵 내 DNA 함량을 비교 분석하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 冬蟲夏草 추출물의 농도가 증가될수록 apoptosis가 일어난 세포의 빈도에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 증가됨을 알 수 있었다. 특히 4.0 mg/ml 처리군에서는 약 11% 이상의 세포들이 apoptosis에 의하여 사멸되었음을 알 수 있었다.

즉 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한

DNA 단편화의 결과¹⁷⁻¹⁹⁾이므로 冬蟲夏草 추출물의 처리에 의한 암세포의 증식억제 및 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 시사하여 주는 것으로 사료된다.

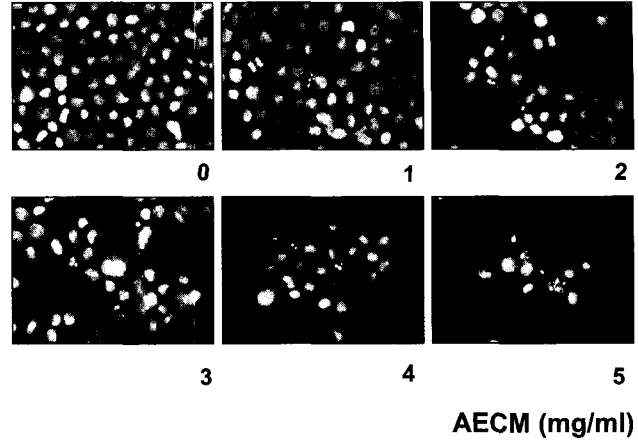


Fig. 2. Induction of apoptotic bodies in AECM-treated A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with AECM for 48 h, and fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

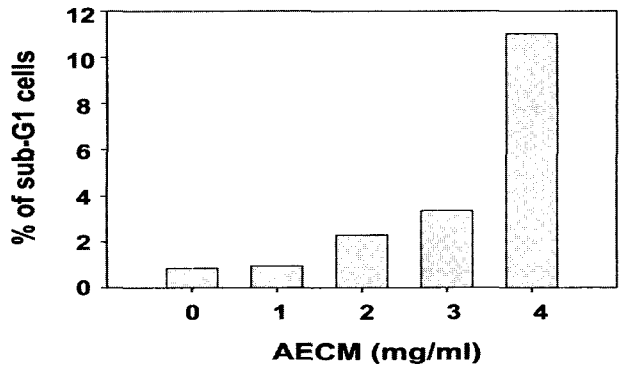


Fig. 3. Increase of the sub-G1 cells of the cell cycle in AECM-treated A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with AECM for indicated concentrations for 48 h. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry. Data are means average of two separate experiments.

고찰

韓醫學에서 肺癌은 그 發病過程 및 症狀面에서 肺積, 肺疽, 息賁, 肺癰 등에서 그 類似點을 찾을 수 있다²⁾. 예를 들면, 《素問·咳論篇²⁰⁾》에 “肺咳之狀, 咳而喘息有音, 甚則唾血……久咳不已……咳而腹滿, 不欲飲食, 此皆聚于胃, 關於肺, 使人多涕唾而面浮腫氣逆也” 라 했고, 《靈樞·邪氣臟腑病形²¹⁾》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” 이라 했으며, 《難經·論五臟積病²²⁾》에 “肺之積名曰息賁……久不已, 令人洒淅寒熱, 喘咳發肺癰” 이라고 했고, 《濟生方²³⁾》에서는 “息賁之狀, 在于脇下, 復大如杯, 喘息賁賁, 是爲肺積, 診其脈浮而毛, 其色白, 其病氣逆, 背痛少氣, 喜忘目瞑, 膚寒, 皮中時痛, 或如虱緣, 或如鍼刺” 라고 하였고, 《聖惠方》에도 息賁, 上氣咳嗽, 喘促咳嗽, 結聚脹痛, 腹脇脹滿, 咳嗽見血, 痰粘不利, 坐臥不安, 胸膈壅悶, 食少無力, 咳嗽胸痛, 嘔吐痰涎, 面黃體衰

등 증에 대한 處方이 기재되어 있는 것과, 金元時代의 李東垣이 肺의 積을 치료했던 息賁丸과 宋代의 陳無擇이 “肺之積”으로 인한 咳嗽을 치료했던 處方의 적응증이 모두 폐암의 증상과 유사하다²⁾. 肺癌은 正氣가 損傷되어 肺氣가 虛해지면 邪毒이 肺에 侵犯하여 宣發과 肅降機能이 失調되고 氣機가 不暢하여 津液이 散布되지 못하므로 脈絡이 阻塞되어 氣滯血瘀하고 痰濕이 內聚하여 腫塊가 形成된다고 하여 氣滯, 血滯, 熱毒, 濕, 痰 등의 邪氣를 病因으로 보았으며, 主要症狀으로는 咳嗽, 胸痛, 咯血, 體重減少, 發熱, 胸悶, 氣短(호흡곤란) 등이 나타난다. 臨床의으로는 陰虛內熱型, 氣陰兩虛型, 脾虛痰濕型, 陰陽兩虛型, 氣滯血瘀型 등으로 辨證하여 그 治法으로 滋陰生津, 益氣養陰, 益氣健脾, 滋陰溫陽 등의 扶正培本法을 中心으로 化痰軟堅, 清熱解毒, 化痰散結, 行氣活血, 清熱化痰, 止咳化痰 등을 加減應用하는 ‘扶正祛邪法’이 多用되고 있다²⁴⁾.

서양의학에서 인식하는 肺癌의 원인으로 가장 명확하고도 흔한 것은 흡연이며, 이 외에 대기오염, 직업적 원인물질노출, 유전적 소인, 식이 등이 있다^{25,26)}. 그 症狀으로는 기침, 지속적인 흉통, 천명, 짧은 호흡, 반복되는 폐렴, 기관지염, 객담, 혈담, 애성(hoarseness), 림프선 비대, 뼈의 통증 등이 나타나며, 全身症狀으로는 疲勞, 食慾不振, 體重減少를 일으키며, 암이 다른 部位로 전이하면 전이된 部位에 關聯된 症狀을 일으킬 수 있다^{27,28)}.

冬蟲夏草는 《本草從新²⁹⁾》에서는 “甘平補肺益腎, 止化痰, 已勞嗽, ……”이라고 하였고, 《本草問答³⁰⁾》에서는 “又如冬蟲夏草本草不載, ……故欲補下焦之陽, 則但用根, 則益上焦之陰, 則兼用苗, ……”라고 하였고, 《本草綱目拾遺³¹⁾》에서는 “……性溫, 治蟲脹, ……”이라고 하였다. 冬蟲夏草는 性이 溫하고 味가 甘하며, 補肺益腎, 止喘化痰의 작용이 있어 肺虛咳嗽, 咯血, 盜汗, 肺癆, 肺轉移癌, 遺精, 陽痿, 腎氣虧虛에 응용할 수 있다⁸⁾. 冬蟲夏草의 항암효과에 대한 약리작용은 소뇌에 대한 실험을 통해 鼻咽頭癌細胞에 대해 生長活性을 억제하고, 腹腔의 大食細胞의 食食力을 높여주고, T림프구의 排斥反應을 억제하며, 非特異性 刺戟免疫 反應을 갖추고 있다고 밝혀져 있다⁹⁾.

본 연구에서는 冬蟲夏草의 항암기전 해석을 조사하기 위하여 인체 폐암세포 A549의 성장에 미치는 冬蟲夏草 열수 추출물의 영향에 관한 조사를 실시하였다. 이를 위하여 먼저 A549 폐암세포의 증식에 미치는 冬蟲夏草 추출물의 영향을 알아보기 위하여 재료 및 방법에서 서술한 것처럼 다양한 농도의 冬蟲夏草 추출물이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포들을 대상으로 생존율을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 정상 배지에서 자란 A549 폐암세포에 비하여 冬蟲夏草 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포는 冬蟲夏草 추출물 첨가 농도가 증가할수록 생존율이 감소되었음을 알 수 있었고 48시간 처리에 따른 LC50의 값은 약 2.0 mg/ml 전후로 나타났다. 아울러 冬蟲夏草 추출물의 A549 폐암세포 증식억제 효과에 따른 암세포의 전체적인 형태의 심한 변형도 관찰할 수 있었다(data not shown). 이러한 폐암세포 증식 억제 및 형태 변화의 관찰에서 冬蟲夏草 추출물의 처리에 의한 암세포 증식의 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있을 것으로 기대되었기 때문에 이에 대한 증거를 제시하기

위하여 형광 현미경을 이용한 암세포의 핵 형태 변화를 관찰하였다. DAPI staining 결과 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 대조군의 경우 모든 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 冬蟲夏草 추출물이 처리된 암세포의 경우, 冬蟲夏草 추출물 처리 농도 의존적으로 염색질 응축(chromatin condensation)에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body의 증가 현상을 관찰할 수 있었다^{17-19,32)}. 즉 이는 nuclease에 의한 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 冬蟲夏草 추출물의 처리에 의한 암세포의 증식억제 및 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 그리고 冬蟲夏草 추출물의 처리에 따른 apoptosis가 유발된 암세포의 빈도 변화를 위하여 flow cytometry 분석에 의한 결과에서도 apoptosis가 유발된 세포 집단에 해당되는 sub-G1의 빈도³³⁾가 冬蟲夏草 추출물의 처리 농도 증가에 따라 점차 증가되었음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 결과들에서 冬蟲夏草 추출물 처리에 따른 A549 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있음을 다시 확인할 수 있었다.

결론

冬蟲夏草의 인체 폐암세포 증식억제에 미치는 영향을 실험한 결과 다음과 같다. 冬蟲夏草 추출물의 농도가 증가될수록 A549 인체 폐암세포의 증식은 억제되었다. 冬蟲夏草 추출물이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 경우, 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 冬蟲夏草 추출물 처리 농도 의존적으로 관찰되었다. 冬蟲夏草 추출물의 농도가 증가될수록 apoptosis가 일어난 세포의 빈도에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 증가되었다.

참고문헌

1. 통계청, 2002년 사망원인통계결과, 2002.
2. 최승훈, 동의종양학, 행림출판, 서울, pp.207-208, 1995.
3. 조종관, 한방임상종양학, 주민출판사, 서울, p725, 2001.
4. 陸昌洙·金泰姬·李京淳·文永熙·朴種熙·黃完均. 신동아본초학, 계축문화사, 서울, pp.418-419, 1998.
5. 江蘇新醫學院, 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, 上海, pp.497-498, 1978.
6. 潘敏求, 中華腫瘤治療大成, 河北科學技術出版社, 石家莊, p.182, 1996.
7. 王浴生, 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京, pp.357-360, 1983.
8. 鬱仁存, 中醫腫瘤學(下), 科學出版社, 北京, pp.213-214, 1997.
9. 石洪, 抗癌本草, 湖南科學技術出版社, 長沙, pp.118-119, 1987.
10. 신민교, 임상본초학, 영림사, pp.207-208, 1997.
11. 정한술, 권진, 이태규, 冬蟲夏草의 면역조절 및 항암효과, 동의생리병리학회지, 16(2):327-331, 2002.
12. 김산, 황충연, 김남권, 冬蟲夏草가 사염화탄소로 유발된 간손상 및 간암세포증식에 미치는 영향, 동의생리병리학회

- 지, 16(4):684-692, 2002.
13. 김형진, 장선일, 홍경환, Caspase-3을 경유한 冬蟲夏草 자실체 유래 4-Acetyl-12, 13-epoxy-9-trichothecene-3, 15-diol의 방광암 세포주(NBT-II) Apoptosis, 大韓韓醫學方劑學會誌, 10(2):213-223, 2002.
 14. Kim, Y.A., Lee, W.H., Choi, T.H., Lee, S.H., Park, K.Y. and Choi, Y.H., Involvement of p21, pRB, Bax and NF- κ B in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int. J. Oncol.*, 23:1143-1149, 2003.
 15. Choi, Y.H., Research technics for the cell cycle study. *Exp. Mol. Med.* 33:15-36, 2001.
 16. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A. and Trepel, J.B., Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.*, 272:28479-28484, 1997.
 17. Evans, V.G., Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.*, 17:461-476, 1993.
 18. Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A.H., Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, 136:593-608, 1990.
 19. Chiarugi, V., Magnelli, L. and Basi, G., Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.*, 40:603-612, 1994.
 20. 楊維傑, 黃帝內經素問譯解, 一中社, 서울, p.294, 356, 1991.
 21. 洪元植, 精校黃帝內經靈樞, 東洋醫學研究院出版社, 서울, pp.37-40, 1985.
 22. 成樂箕, 八十一難經解釋, 서울, 高文社, p.34, 1982.
 23. 余志強, 吳正翔, 中醫藥治療原發性肺癆的近況, 陝西中醫, 112(1): 42-44, 1991.
 24. 王學玉, 實用腫瘤臨床, 中國醫藥科技出版社, pp.94-102, 1995.
 25. 대한임상의학연구소, 알기쉬운건강진단해설, 의학문화사, 서울, p.241, 1994.
 26. 신영기 편역, 임상진단학, 계축문화사, 서울, pp.308-309, 1993.
 27. 한용철, 임상호흡기학, 일조각, 서울, p.137, 1995.
 28. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室, 東醫肺系內科學, 훈문문화사, 서울, p.79, 2002.
 29. 陳北桓, 增註 本草從新, 文光圖書有限公司, 台北, p.28, 1986.
 30. 唐宗海, 國譯本草問答, 大星文化社, 서울, pp.34-40, 1994.
 31. 趙學敏, 本草綱目拾遺, 人民衛生出版社, 北京, pp.138-139, 1983.
 32. Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R., The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.*, 92:7-70, 2001.
 33. Lizard, G., Miguet, C., Gueldry, S., Monier, S and Gambert, P., Flow cytometry measurement of DNA fragmentation in the course of cell death via apoptosis. New techniques for evaluation of DNA status for the pathologist. *Ann. Pathol.*, 17:61-66, 1997.