

馬齒莧이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
엄주요, 강복환, 김양호, 유심근

ABSTRACT

Herba Portulacae induced Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

Joo-Oh Eum, Bok-Hwan Kang, Yang-Ho Kim, Sim-Keun Yoo
Department of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

To address the ability of *Herba Portulacae*(HP) to induce cell death, we investigated the effect of HP on cell viability. Twenty-four hours later, loss of viability occurred following HP exposure in a dose-dependent manner. The treatment of HP, a commonly used herb formulation in Korea, Japan and China, caused a decrease in cell viability. HP also resulted in apoptotic morphology a brightly blue-fluorescent condensed nuclei by Hoechst 33258-staining, and reduction of cell volume. Our results show that 2mg/ml HP induces mitochondria membrane potential collapse. Immunoblotting data also shows that the expression of Bcl-2, antiaoptotic protein, decrease by the addition of HP. This GFP-Bax overexpression system shows that an important pro-apoptotic Bcl-2-family protein, Bax is translocated to mitochondria by the addition of 2mg/ml HP. Interestingly, MAPK inhibitor study shows that p38 MAPK inhibitor, SB203580 inhibits HP-induced cell death and caspase-3 activation in HP-treated HeLa cells. Furthermore, HP transiently but significantly induces p38 activation. But P38 MAPK inhibitor does not have any effect on the translocation of Bax. Considering these results, HP induces apoptosis via p38 MAPK activation. But the pathway does not involve the translocation of Bax.

Key words : *Herba Portulacae*(HP), Bax, mitochondria membrane potential, mitochondria, apoptosis, HeLa cells

이 논문은 2004년도 원광대학교 교비지원에 의하여 연구됨

I . 緒 論

女性の生殖器官인 子宮에 발생하는 惡性腫瘍의 一種인 子宮頸部癌은 현재까지 女性에서 가장 많이 發生하는 癌의 하나로서 全世界의 乳房癌 다음으로 빈번한 女性の腫瘍이며, 國內에서도 女性の 癌에서 1위의 發生頻度を 차지하고 있는 실정이다¹⁻²⁾. 子宮頸部癌은 30-50歲에서 多發하며 그 中 70% 以上이 中年婦人으로 陰道出血, 分泌物增加, 貧血, 淋巴節腫大, 體重減少 등의 症狀이 나타나며, 豫防과 治療가 적절치 못하면 晩期에 이르러 感染部位의 出血, 尿毒症, 惡液質 등 危急한 狀態에 이르러 死亡하게 된다³⁻⁹⁾.

子宮頸部癌에 該當하는 韓醫學的인 概念으로는 症狀 樣相으로 보아 ‘崩漏’, ‘帶下’, ‘癥瘕’, ‘血蠱’, ‘五色帶下’ 등이 있으며^{4,6,7,10)}, 이 중 積聚物의 有無와 其他症狀의 類似性에 根據한다면 ‘癥瘕’가 가장 恰似한 疾患이라고 할 수 있다. 癥瘕는 女性の生殖기 및 骨盤內腔에 발생하는 腫塊로서 腹中腫塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛劇盛하는 症狀을 나타내는 婦人科 疾患이다¹⁰⁾. 最近 國內 韓醫學界에서도 子宮頸部癌細胞에 관하여 여러 實驗的인 研究가 이루어져 왔으며, 대부분 癥瘕의 治療에 사용되어 온 藥物이 研究되었다¹¹⁻²¹⁾.

馬齒莧은 馬齒莧科에 속한 1年生 肉質草本인 쇠비름(*Portula oleraceae* L.)의 全草로서 陶弘景의 《本草經集注》의 “莧實”항에 最初로 “今馬莧別一種, 布地生, 實至微細, 俗呼爲馬齒莧. 亦加食, 小酸.”이라 하여 먹을 수 있다는 記錄이 發見되며, 이후 여러 文獻에서 여러가지 多樣한 效能을 가지고 있다고 알려져 있고²²⁻²⁶⁾, 그 중에서 淸熱解毒, 散血消腫의 效能이 臨床的으로 널리 活用되어 왔으며, 몇몇의 醫書에서는 癥瘕의 治療에 사용한다 하였다^{22-23,25-26)}. 馬齒莧의 效能에 關한 國內의

研究發表를 살펴보면, 金²⁷⁾은 쇠비름 抽出物이 CCl_4 로 損傷시킨 생쥐의 肝에 있어서 GOT 및 GPT의 活性을 抑制하였다고 報告 하였으며, 吳²⁸⁾는 쇠비름 抽出物이 細胞性 및 體液性 免疫反應에 있어서 過敏反應을 抑制한다고 報告하였고, 崔²⁹⁾는 쇠비름 抽出物이 肝癌細胞柱인 Hep B에서 強한 細胞毒性을 나타낸다고 報告한 바 있으나, 子宮頸部癌細胞인 HeLa cell에 미치는 影響에 대한 研究報告는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 馬齒莧이 癥瘕의 治療에 사용되어 왔으며, 抽出物이 肝癌細胞柱에 強한 細胞毒性을 나타냈다는 報告를 接하고 子宮頸部癌의 治療에도 사용될 수 있을 것으로 思料되어 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 馬齒莧 抽出物을 投與하고 HeLa cell의 生存度, apoptosis 誘發, mitochondria membrane potential collapse 分析, Bcl-2의 發顯變化, mitochondria로 Bax의 translocation 增加, SB 203580 compound의 保護效果, p38 Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 활성 등을 觀察하여 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

實驗에 使用된 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 益山韓方病院에서 購入후 精選하여 使用하였다.

2) 試藥

Anti-Bcl-2, Bax antibody는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 公급받았다. SB203580과 PD98059는 Calbiochem에서 구입하였으며 Hoechst 33258 dye는 Sigma에서 구입하였다. 細胞培養時 必要한 培養液 및 試藥들은 Life Technologies(Gaithersburg, MD,

USA)에서 구입하였다.

3) 檢液의 製造

馬齒莧 300g을 증류수 2,000ml와 함께 환저 플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 4時間동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 遠心分離하고 진공 농축기로 감압, 농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 건조액 기스 74g을 製造하였다.

2. 方法

1) 細胞柱 培養

사람 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa-cell을 37°C, 5% CO₂ 狀況에서 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories)이 包含된 D-MEM (Gibco BRL)에서 培養하는 동안 약 24時間 週期로 培養液을 交替하여 주며 log phase에 있는 細胞에 馬齒莧을 處理하여 apoptosis 現象을 觀察하였다.

2) 細胞 活性度 測定

細胞生存도는 crystal violet dye의 uptake 정도를 colorimetric assay로 測定한다. Apoptosis가 일어난 細胞에 crystal violet solution을 넣고 2분 동안 常溫에서 放置하여 staining한다. 바로 tap water로 水洗한 후, staining된 細胞를 10% acetic acid상에 5분 동안 常溫에서 反應하여 ELISA reader로 405nm에서 OD 값을 計算한다. 細胞 生存度 實驗에서 culture media상의 細胞를 100%의 細胞 活性度を 나타낸다는 基準으로 試藥處理群의 細胞 生存도를 %로 計算하였다.

3) 細胞形態觀察

HeLa cell(1x10⁵ cells)을 slide chamber dish에 培養하였다. 核의 染色을 위하여 馬齒莧을 24시간 處置한 HeLa cell群과 試藥處置를 하지 않은 HeLa cell을 3.7% para-formal-

dehyde로 固定하였다. PBS로 3번 洗滌한 후, Hoechst 33258dye로 染色하였다. 螢光顯微鏡 (Nikon, Tokyo)으로 觀察하고, 사진(x100)을 現상하였다.

4) Caspase 活性度 測定

HeLa cell(2x10⁶cells)을 4°C에서 15분 동안 lysing buffer(1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH8.0)에서 溶解하고 20,000g으로 15분 동안 遠心分離시켰다. 遠心分離하여 얻은 上層液은 BCA(Bicichonic acid, Sigma, St. Louis)方法으로 定量하여 assay buffer(100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH7.5, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM DTT)에 稀釋된 螢光標識된 機質과 37°C에서 30분간 反應시킨 후, fluorometer로 測定하였다. 이 때의 波長은 excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength (460nm)를 使用하였다. 機質은 CPP32-like caspase의 경우, fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD를 使用하였으며 proteolytic cleavage를 測定함으로써 인지하였다.

5) Western blotting

HeLa cell(5x10⁶)를 0.5 ml lysis buffer 溶液에 넣은 다음 蛋白質 量은 BCA protein assay法으로 定量한다. 定量한 蛋白質은 sample buffer에서 denaturation시킨 다음 SDS-PAGE를 利用하여 전기영동을 한다. 전기영동 후 gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer시킨 다음 抗體를 結合시킨 후 peroxidase가 conjugation된 2次 抗體와 結合시킨 후 luminescence를 利用하여 develop시킨다.

6) Green fluorescent protein(GFP)-Bax transfection

GFP-Bax는 pcDNA-Bax를 digestion하여 C2-GFP-vector(Clontech)에 ligation하여 사용하였으며, 하루 전날 HeLa cell을 24 well plate에 培養한 후 0.5ug의 DNA를 transfection하여 6 時間 incubation 한 후 GFP-BAX의 이동 및 expression level을 確認하였다.

7) p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity assay

細胞를 immune precipitation buffer(25mM Tris-HCl, pH8.0, containing 137mM NaCl, 10%(v/v) glycerol, 0.1% SDS, 0.5%(v/v) deoxycholate, 1%(v/v) Nonidet P-40, 2mM EDTA, 1mM pefabloc, 1mM sodium vanadate, 5mM benzamidine, 5g/ml aprotinin, 5g/mlleupeptin)에 30분간 incubation하여 lysis시킨다. Cell debris는 15,000rpm으로 10분간 遠心分離하여 除去한 후 上層液에 anti-p38 抗體를 넣어 2時間 동안 4℃에서 反應시킨다. 이 immunocomplex는 Pansorbin(Calbiochem, USA)으로 down한 후 lysis buffer(50mM LiCl /100mM, Tris/HCl(pH7.6)/0.1%(v/v) Triton X-100/1mM DTT)로 2회 水洗하여 준다. 沈澱에 0.3mg/ml of GST-ATF-2를 넣어 ATP 존재 하에 30℃에서 反應시킨다. ATF-2의 磷酸化는 phospho-ATF-2 항체를 사용하여 immunoblotting한다. Membrane에 붙은 抗體 등을 제거한 후, total-GST를 anti-GST 抗體를 사용하여 immunoblotting한다.

8) 結果算出

標示된 結果는 3번 以上の 獨立的인 結果이며 이들의 平均(mean)과 標準偏差(standard deviation, SD)를 算出하여 結果를 標示하였다. 細胞毒性을 보이는 값의 比較에 있어서는 Students's t-test를 使用하였으며 $p < 0.01$, 혹은 $p < 0.05$ 水準으로 有意性を 檢證하였다.

III. 實驗結果

1. 馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis

馬齒莧의 抗癌效果를 검색하기 위해 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 馬齒莧을 處理하고 죽음을 야기하는지 與否를 알아보았다. 馬齒莧(0, 1, 2, 5mg/ml)을 處理시 用量 依存的으로 細胞 죽음이 惹起됨을 確認하였다 (Fig. 1A). 특히 馬齒莧(0.5, 1, 2 or 5 mg/ml)을 處理한 24 時間 후, 細胞生存度의 顯著한 減少를 確認하였다.

細胞 죽음에는 자연적인 細胞枯死(apoptosis)와 物理的인 刺戟이나 滲透壓등으로 因한 壞死(necrosis)가 있다. Apoptosis시 細胞膜의 blebbing이나 핵의 凝縮, 分節化 등이 일어나므로 이의 形態를 관찰, apoptosis와 necrosis를 區別하고자 하였다. 핵을 染色하기위하여 Hoechst 33258dye를 이용하였으며 螢光顯微鏡으로 觀察하였다. 2mg/ml의 馬齒莧이 처치된 조건에서는 細胞의 分節化와 핵의 凝縮 現狀을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

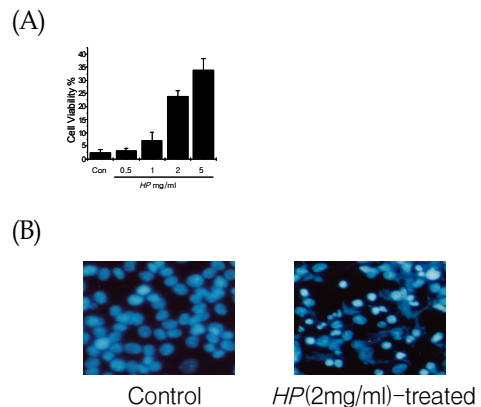


Fig.1. HP induces death in HeLa cells. (A). Cell death was assessed by crystal violet staining. HeLa cells were incubated with 0, 0.5, 1, 2 or 5mg/ml HP for 24h followed by measurement of crystal violet staining.

Data were the mean S.E. of three experiments. *Significantly different from control, $P < 0.05$. HP: Herba Portulacae. (B). HeLa cells were incubated with 2mg/ml HP for 24hrs. The cells were fixed with 3.7% para-formaldehyde and then were washed with PBS. The cells were stained with $1\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 dye for 10min. The cells were taken a picture using a fluorescence microscope.

2. 馬齒莧으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 mitochondria membrane potential collapse 분석

Mitochondria membrane potential은 mitochondria 經路를 경유하는 apoptosis의 研究에 있어서 最近 많은 報告가 이루어지고 있는 부분으로, 기존의 研究報告에 의하면 mitochondria membrane permeability transition에 影響을 미쳐 pore를 形成하게 되면, mitochondria에서 cytochrome c의 放出이 誘發되며, 이후 連鎖적으로 caspase의 活性化가 誘導되어 apoptosis가 誘發되고 이 過程에서 membrane potential도 collapse 되어진다는 여러 研究結果가 發表되었으나 細胞마다, 各各의 條件마다 差異를 보여주어 왔다. 本 研究에서는 HeLa cell에 2 mg/ml 濃度의 馬齒莧 處置時 有意性 있는 mitochondria membrane potential collapse를 觀察하였다(Fig. 2).

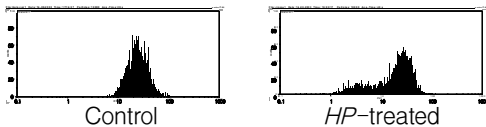


Fig. 2. HP induces mitochondria membrane potential collapse in HeLa cells. HeLa cells were subjected to 2mg/ml HP for 24hrs. The cells were incubated with 100nM DiO6dye for 20min. And then the cells were washed with PBS for 2times. The cells were harvested and mitochondria membrane potential was measured using FACSCaliber. HP: Herba

Portulacae.

3. 馬齒莧으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 Bcl-2의 發顯 變化

Bcl-2 family proteins은 多樣한 經路의 apoptosis에 관련됨을 證明하는 研究結果가 최근 많이 報告되었다. Bcl-2는 癌細胞에서 expression이 증가되어 있으며 이의 發顯을 癌의 positive marker로 간주하는 報告도 있었다. 本 研究에서 馬齒莧(2mg/ml) 單獨 處理時, Bcl-2 protein의 發顯은 6時間 이후부터 顯著한 減少를 보여주고 있으며, pro-apoptotic protein인 Bak의 發顯은 差異를 確認할 수 없었다. 또한 또 다른 pro-apoptotic Bcl-2 protein인 Bad의 量의 增加도 確認할 수 없었다(Fig. 3).

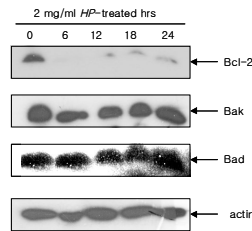


Fig. 3. HP regulates the expression of Bcl-2 in HeLa cells. HeLa cells were subjected to 2mg/ml HP for 0, 6, 12, 18 and 24hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Bcl-2, Bak, Bad and actin were visualized by western blot analysis. HP: Herba Portulacae.

4. 馬齒莧으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 Mitochondria로의 Bax의 translocation 增加

Bax는 세포죽음 研究에서 가장 많은 研究가 집중되어 온 蛋白質로서, Bax의 mitochondria로의 移動과 oligomerization은 mitochondria permeability transition pore 형성 및

membrane potential의 collapse 등을 야기하는데 관여하는 것으로 알려져 있다. 本研究에서는 GFP-Bax를 cloning하여 이를 HeLa cell에 transfection하여 control상태에서는 95% 이상 cytoplasm에 location되어 있는 상태에서 시간에 따라 13% mitochondria로 移動하였다(24hrs). 이에 비하여 馬齒莧(2mg/ml)을 處理한 群에서는 46.43% 移動되어 있음을 알 수 있었다(Fig 4). 그 이상의 incubation은 GFP-Bax의 移動增加를 誘發하지 않았다.

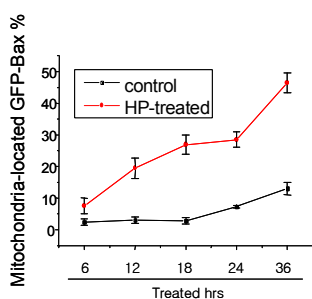


Fig. 4. HP increases the translocation of GFP-Bax into mitochondria in HeLa cells. Cells were transfected with GFP-Bax using Superfect. Six hours later, cells were incubated with 2mg/ml HP for various intervals (0, 6, 12, 18 and 24hrs). The translocation of GFP-Bax into mitochondria was measured using fluorescence microscope. *Significantly different from control, P < 0.05. HP: Herba Portulacae.

5. 馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK 抑制劑인 SB203580의 役割

HeLa cell에서 馬齒莧으로 因한 apoptosis에 MAPK 經路가 關聯되어 있는지 確認하기 위하여, 2mg/ml의 馬齒莧을 處理하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 p38MAPK 抑制劑인 SB203580을 10 μM 濃度로 處理하였을 때 有意性 있는 保護效果를 나타냈다. 5mg/ml의 馬齒莧을 處理했을 때에도 同一한

保護效果를 나타내었다. 이에 비해 ERK의 upstream인 MEK 1의 抑制劑인 PD98059를 20μM 濃度로 處理하였을 때는 별다른 影響을 미치지 않았다(Fig. 5A).

SB203580이 馬齒莧으로 因한 apoptosis에서 caspase-3의 活性調節에 미치는 影響을 알아보기 위하여 2mg/ml의 馬齒莧을 處理하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 SB 203580을 處理하고 caspase-3 活性를 測定하였다. SB203580(10 μM) 處理하였을 때 馬齒莧으로 因한 caspase-3의 活性增加가 抑制된 반면 PD98059를 處理하였을 때는 caspase-3의 活性增加에 아무런 影響을 미치지 않았다 (Fig. 5B).

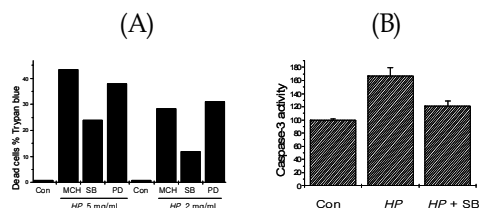


Fig. 5. P38 MAPK is involved in HP-induced apoptosis in HeLa cells. (A) HeLa cells were incubated with 2 or 5mg/ml HP in the presence or absence of 10μM SB 203580 or 20 μM PD98059. Twenty-four hours later, the cells were stained with crystal violet dye. The cell viability was measured as described in the Materials and Methods. (B) HeLa cells were incubated with 2mg/ml HP under the pretreatment of 10μM SB 203580. The cell lysates were assayed using 150μM DEVD-AFC as a caspase-3 substrate. Caspase-3 assay was measured as described in Materials and Methods. Data were the mean S.E.± of two experiments.

6. 馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK 活性化

馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK 經路가 關與하는 앞의 結果를

바탕으로 GST-ATF-2를 機質로 하여 kinase assay를 施行한 結果, 1시간의 짧은 시간에 p38MAPK의 活性化를 확인할 수 있었다(Fig. 6). GST protein의 量은 同一한 結果를 얻어 定量的으로 同一하였음을 알 수 있었다.

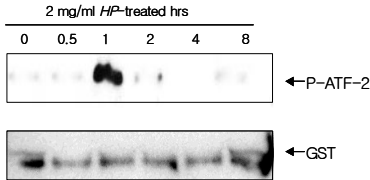


Fig. 6. HP induces p38 MAPK activation in HeLa cells. HeLa cells were treated with 2 mg/ml HP for 0, 0.5, 1, 2, 4 or 8hrs. And the cell lysates were immunoprecipitated with anti-p38 MAPK antibody. P38 MAPK assay was performed as described in Materials and Methods.

7. 馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK의 役割

馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK 經路의 活性化 및, Bax protein의 mitochondria로의 移動增加는 앞서 確認되었다. 이의 聯關性을 알아보기 위하여 SB 203580을 處理하고 Bax의 translocation을 觀察한 結果, p38 MAPK 抑制劑인 10 μ M SB 203580은 馬齒莧으로 因한 Bax의 translocation에는 影響을 주지 않고 있음을 알 수 있었다(Fig. 7).

한편 本 研究에서 馬齒莧 處理시 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 發顯量이 減少한다는 것을 確認한 바 있으므로, SB203580 處置時 이의 調節을 確認하여보고자 하였다. 10 μ M SB203580은 Bcl-2의 減少를 回復하였다(Fig. 8).

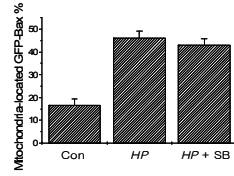


Fig. 7. SB203580 does not have any effect on the translocation of GFP-Bax into mitochondria in HeLa cells. HeLa cells were transfected with GFP-Bax using Superfect. Six hours later, cells were incubated with 2mg/ml HP for 24hrs. The translocation of GFP-Bax into mitochondria was measured using fluorescence microscope. *Significantly different from control, P < 0.05. HP: Herba Portulacae.

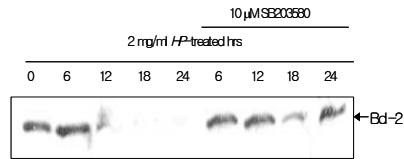


Fig. 8. SB203580 does not have any effect on the expression of Bcl-2 in HP-treated HeLa cells. Cells were treated with 2mg/ml HP in the presence or absence of 10 μ M SB 203580 for 0, 6, 12, 18 or 24hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Bcl-2 was visualized by western blot analysis. HP: Herba Portulacae.

IV. 考 察

Apoptosis 라는 用語는 細胞 數를 調節하는 過程에서 有絲分裂(mitosis)에 反對되는 概念으로 生物의 成長過程 中에서 自然的인 現狀으로 認識되었으나³⁰⁻³³⁾, 正確한 機轉에 對하여 밝혀진 바가 거의 없었으며 다만 細胞의 壞死(necrosis)過程과 形態의 差로만 다르게 일어나는 것으로 알려졌다. 그후 Kerr 등³⁴⁾이 apoptosis는 壞死로 因한 세포죽음과는 다르게

周圍 組織에 炎症을 일으키지 않으며, 細胞의 核에서 染色質이 緻密해지면서 核膜에 작은 덩어리들이 形成되고 細胞質이 濃縮되면서 세포 표면이 둘둘 말리어 꽃가루 모양 돌기들이 떨어져 나와 apoptotic body가 만들어지게 되는데, 이러한 細胞消滅過程을 고대 그리스어로 나뭇잎이 나무에서 떨어진다는 의미를 갖는 "Apoptosis"라고 命名하였다.

癌의 發病過程에는 여러 가지 多様な 機轉이 存在하지만 癌細胞가 될 可能性이 높은 細胞에서 細胞枯死 活性度(apoptotic activity)의 消失은 癌化 過程에 影響을 미치게 되며, 최근 國內의 子宮頸部癌 患者를 대상으로 한 研究에서도 子宮頸部癌의 發癌過程에 子宮頸部上皮細胞의 全體 細胞數 增加와 apoptosis의 減少가 密接한 關聯이 있다고 報告되고 있다³⁾.

子宮頸部癌의 原因은 現在까지 明確히 밝혀지지 않았으나 역학적 연구에 의하면 思春期中에 始作된 活潑한 性接觸과 여러 명의 性交相對者 등이 子宮頸部癌의 發生에 깊이 關聯되며, 性病을 앓은 病歷, 免疫障礙者, 社會經濟적으로 低所得層 특히 性傳播疾患의 感染과 關聯성이 높은 것으로 推定되고 있으며, 그 외에도 民族的 差異, 經口避妊藥服用, 비타민 缺乏, 吸煙, 人유두종 바이러스(Human papilloma virus, HPV) 感染, 高危險 男便要因 등이 提示되고 있고, 最近에는 HPV가 가장 有力한 發生因子로 믿어지고 있다^{1,4-8,35-36)}. 子宮頸部癌은 國際產婦人科學會(FIGO)에서 제정한 分類에 따라 上皮內癌을 제0기, 癌이 子宮頸部에만 局限된 것을 제1기, 癌이 子宮頸部를 벗어났으나 骨盤壁까지는 이르지 않은 것, 또는 癌이 腔을 侵犯하였으나 腔의 下部 1/3까지는 到達하지 않은 것을 제2기, 癌浸潤이 骨盤壁에 到達하였거나 腔 下方 1/3까지 侵犯된 狀態를 제3기, 癌이 眞骨盤腔 밖으로 進行하였거나 膀胱 또

는 直腸 粘膜을 侵犯하였을 때를 제4기로 病期를 分類한다^{4,6,35-36)}. 이러한 子宮頸部癌의 臨床的 進行病期에 따라 西洋醫學의 治療方法이 각기 다르게 適用되며, 子宮摘出術 등의 手術的 療法이나 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등이 使用되고 있고, 比較的 癌細胞의 轉移가 局限되었을 때 手術療法과 放射線療法이, 末期에는 化學療法과 免疫療法の 全身療法이 施行되고 있으나^{4,6,8,9,37-38)} 治療 후의 豫後, 副作用 등이 각기 多様하여 治療에 問題點으로 指摘되고 있으며³⁷⁻³⁸⁾ 副作用이 적은 새로운 抗癌藥物의 開發이 要求되고 있는 실정이다.

子宮頸部癌에 該當하는 韓醫學의 概念으로는 症狀 樣相으로 보아 '崩漏', '帶下', '癥瘕', '血蠱', '五色帶下' 등이 있으며^{4,6,7,10)}, 이 중 積聚物의 有無와 其他症狀의 類似性에 根據한다면 '癥瘕'가 가장 恰似한 疾患이라고 할 수 있다. 癥瘕는 女性의 生殖器 및 骨盤內腔에 發生하는 腫塊로서 腹中腫塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛劇盛하는 症狀을 나타내는 婦人科 疾患이다¹⁰⁾. 癥瘕의 形態에 對하여 巢³⁹⁾는 "其病不動者 直名爲癥 若病雖有結瘕而可推移者 名爲瘕瘕"라고 하였고 王⁴⁰⁾은 "夫癥者堅也 堅卽難破 瘕者假也 假物成形"이라 하였으며, 李⁴¹⁾는 "癥者堅而不能移 瘕者假而能移"라 하였고 武⁴²⁾는 "癥者假也 其結聚浮假而痛 推而乃動也.....如臟氣結搏堅牢 雖推之不移 名曰癥"이라 하여 한 곳에 留着되어 움직여지지 않는 것을 癥이라고 하고 비록 맺혀는 있으나 움직여지는 것을 瘕라고 하였으나, 一般的으로 癥과 瘕를 따로 區別하지는 않으며 女性의 下腹部에 생기는 腫塊를 통틀어 癥瘕라고 하였다. 癥瘕의 病因과 病理를 살펴보면 《靈樞·百病始生編》⁴³⁾에서는 "卒然外中於寒 若內傷於憂怒則氣上逆 氣上逆則六俞不

通 溫氣不行 凝血蘊裏而不散 津液滯滲 著而不去 而積皆成矣”라 하여 外感寒邪와 七情所傷을 主된 原因으로 보았고, 巢³⁹⁾는 “癥瘕者 皆由寒溫不調 飲食不化 與藏氣相搏 結所生也”라 하여 外感寒邪와 食傷을 主된 原因으로 바라본 반면, 孫⁴⁰⁾은 “積聚癥瘕雜蟲者 皆五臟六腑 眞氣失而 邪氣併 遂乃生焉”이라 하여 正氣虛로 因해 發生한다고 하였다. 이 외에 李⁴¹⁾는 傷食과 瘀血로, 薛⁴²⁾은 瘀血로 因해 發病한다고 하였고, 武⁴³⁾는 痰濕에 起因한다고 하였다. 그러므로 韓醫學에서는 癥瘕의 病因을 內經時代 以來로 外感寒邪, 七情所傷, 正氣虛, 傷食, 瘀血 痰濕 등으로 認識하고 있으며, 이로 因하여 胞中の 血行이 妨害를 받아 子宮의 血液循環이 不利해지면 血瘀 狀態가 誘發되어 硬塊를 形成하는 것으로 理解하고 있었음을 알 수 있다. 癥瘕의 治法을 살펴보면 《素問·至眞要大論》⁴⁴⁾에서 “堅者削之 客者除之 勞者溫之 結者散之 留者攻之”라 하여 攻, 消, 散, 補의 治法을 提示하였고, 張⁴⁵⁾은 “養正邪自除”의 原則을 主張하여 眞氣를 實하게 하면 胃氣가 強해져 邪氣가 저절로 消滅된다고 하여 正氣를 補養시키는 治法을 主張하고 大毒之劑의 濫用을 警告하였다. 한편 龔⁴⁶⁾은 消痰, 活血, 順氣, 健脾를 爲主로 治療하였으며, 吳⁴⁷⁾는 理氣를 基本으로 消導, 活血의 治法을 活用하였고, 王⁴⁸⁾은 桃仁·紅花·當歸 등으로 活血化瘀하는 膈下逐瘀湯을 사용하는 등, 諸家에 따라 方法의 差異는 있었으나 대체적으로 “養正則邪自除”의 原則下에 發病 原因에 따라 活血, 理氣, 導滯, 消痰의 治法을 使用하였다. 韓醫學 古傳文獻에서 言及된 癥瘕의 病因과 治法에 대한 理論들은 現代의 中醫學 및 韓醫學에서 子宮頸部癌의 病因을 肝鬱, 氣滯血瘀, 濕熱瘀毒, 痰濕結聚, 肝腎陰虛, 脾腎陽虛, 中氣下陷, 氣血兩虛 등으로 분류하고 있으며, 治法으로 疏肝解鬱, 活血化

瘀, 清熱解毒, 健脾利濕, 滋養肝腎, 溫補肝腎, 益氣升提, 補氣養血 등의 治法을 症狀에 따라 結合하여 活用하고 있다는 점에서 많은 類似性이 있다고 思料된다^{46-7,35,51-56)}. 最近 國內 韓醫學界에서도 子宮頸部癌細胞에 關하여 여러 實驗的인 研究가 이루어져 왔다. 蓬莪茂丸¹¹⁾, 穿山甲散¹²⁾, 歸朮破癥湯¹³⁾, 加味桂枝茯苓丸¹⁴⁾, 乾漆散¹⁵⁾, 荊蓬煎丸料¹⁶⁾, 鬼箭羽¹⁷⁾, 半枝蓮¹⁸⁾, 加味溫經湯¹⁹⁾, 濟川煎²⁰⁾, 六合湯²¹⁾등이 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell의 增殖을 抑制하는 效果를 나타낸다고 보고되었는데, 이들 처방의 대부분이 癥瘕의 治療에 사용되어온 藥物이었다.

馬齒莧은 馬齒莧과에 屬한 1年生 肉質草本인 쇠비름(*Portula oleraceae* L.)의 전초로서 陶弘景의 《本草經集注》의 “莧實” 項에 최초로 “今馬莧別一種, 布地生, 實至微細, 俗呼爲馬齒莧. 亦加食, 小酸.”이라는 記錄이 發見되며, 以後 여러 文獻에서 여러 가지 多樣한 效能을 가지고 있다고 알려져 있고²²⁻²⁶⁾, 그 중에서 清熱解毒, 散血消腫의 效能이 臨床적으로 活用되어 왔으나, 몇몇의 醫書 즉, 《新修本草》에서는 “飲汁主反胃, 諸淋, 金瘡血流, 破血癰癥瘕.”라고 하였고, 《開寶本草》에서는 “利大小便, 去寒熱, 殺諸蟲, 止渴, 破癥結癰瘡.”이라 하여 癥瘕의 治療에 사용되어온 藥物이다^{22-23,25-26)}. 本 研究者는 馬齒莧이 抗癌效果를 가지고 있다는 報告²⁹⁾를 接하고 馬齒莧이 癥瘕의 治療에 應用되었다는 점에 着眼하여 馬齒莧을 子宮頸部癌의 治療에 사용할 수 있을 것으로 思料되어 本 研究를 시도하게 되었다. 馬齒莧의 子宮頸部癌에 對한 抗癌效果를 究明하고자 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 馬齒莧을 處理하고, HeLa cell의 細胞枯死(apoptosis)와, 生存度, 細胞 蛋白質의 發顯을 觀察하였다.

細胞枯死(Apoptosis)는 細胞壞死(necrosis)와 같이 細胞死滅에 關係하는 信號傳達體系

로서 偶然하게 損傷을 받아 일어나는 細胞壞死(necrosis)와 區別되어, gene-directed cellular self-destruction이나 programmed cell death로도 命名된다. Apoptosis는 죽는 細胞가 免疫反應을 일으켜서 周圍細胞에 惡影響을 주는 副作用없이 食細胞(phagocyte)에 의해 清掃가 될 수 있는 形態로 進行되는데, 核酸의 濃縮 및 DNA가 一定한 크기로 조각나는 現狀을 비롯하여 細胞質속 細胞小器官, 小包體, 細胞膜 등에서의 變化가 發生하는 등 獨特한 模樣을 가지게 된다⁵⁷⁻⁵⁸).

Apoptosis는 人體의 恒常성에 關與하여, 全體 有機體에 위협이 될 수 있는 細胞를 除去하는 것으로 cytotoxic T-lymphocyte에 의해 virus에 感染된 細胞를 除去하며, cell mediator minor response에서 正常 組織을 攻擊하는 것을 防止한다. SLE, rheumatoid arthritis 같은 自家免疫疾患은 이러한 機轉의 缺陷과 聯關關係가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 apoptosis는 癌細胞의 化學療法이나 放射線療法에서 誘發되어 癌細胞의 成長과 微細轉移를 抑制한다고 報告 되고 있다^{3,59-61}).

馬齒莧으로 因한 抗癌效果를 檢索하기 위해 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 馬齒莧을 處理하고 죽음을 야기하는지 與否를 알아 보았다. 馬齒莧(0, 1, 2, 5mg/ml)을 處理시 用量 依存的으로 細胞 죽음이 惹起됨을 確認하였다(Fig. 1A). 특히 馬齒莧(0.5, 1, 2 or 5mg/ml)을 處理한 24 時間 후, 細胞生存度의 顯著한 減少를 確認하였다.

細胞 죽음을 是 自發적인 細胞枯死(apoptosis)와 物理的인 刺戟이나 滲透壓 등으로 因한 壞死(necrosis)가 있다. Apoptosis시 細胞膜의 blebbing이나 핵의 凝縮, 分節化 등이 일어나므로 이의 形態를 관찰, apoptosis와 necrosis를 區別하고자 하였다. 핵을 染色하기 위하여 Hoechst 33258 dye를 이용하였으며 螢光顯微鏡으로 觀察하였다. 2 mg/ml의 馬齒

莧이 處置된 條件에서는 細胞의 分節化와 핵의 凝縮現狀을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

Mitochondria membrane potential은 mitochondria 經路를 경유하는 apoptosis의 研究에 있어서 最近 많은 研究⁶²⁻⁶³)가 이루어지고 있는 부분으로, 기존의 研究報告에 의하면 mitochondria membrane permeability transition에 影響을 미쳐 pore를 형성하게 되면, mitochondria에서 cytochrome c의 放出이 誘發되며⁶⁴⁻⁶⁵), 이후 連鎖적으로 caspase의 活性化가 誘導되어 apoptosis가 誘發되고 이 過程에서 membrane potential도 collapse 되어진다 는 여러 研究結果가 發表되었으나 細胞마다, 各各의 條件마다 差異를 보여주어 왔다⁶⁶⁻⁶⁸).

本 研究에서는 HeLa cell에 2mg/ml 濃度의 馬齒莧 處置時 有意性 있는 mitochondria membrane potential collapse를 觀察하였다 (Fig. 2).

Bcl-2 family proteins는 多樣한 經路의 apoptosis에 관련됨을 證明하는 研究 結果가 최근 많이 발표된바 있다⁶⁹⁻⁷⁰). Bcl-2는 癌細胞에서 expression이 증가되어 있으며 이의 發顯을 癌의 positive marker로 간주하는 報告도 있었다⁷¹⁻⁷²).

本 研究에서 馬齒莧(2mg/ml) 單獨 處理時, Bcl-2 protein의 發顯은 6時間 이후부터 顯著한 減少를 보여주고 있으며, pro-apoptotic protein인 Bak의 發顯은 差異를 確認할 수 없었다. 또한 또 다른 pro-apoptotic-Bcl-2 protein인 Bad의 量的 增加도 確認할 수 없었다(Fig. 3). Bcl-2의 發顯 抑制는 馬齒莧으로 因한 세포죽음에서 主要한 現象으로 간주되어질 수 있다.

Bax는 세포죽음 研究에서 가장 많은 研究가 집중되어 온 蛋白質로서, Bax의 mitochondria로의 移動과 oligomerization은 mitochondria permeability transition pore 形成 및 membrane potential의 collapse 등을 惹起하는

데 關與하는 것으로 알려져 있다⁷³⁾. Bax는 Bcl-2 protein family 中 하나로 pro-apoptotic protein으로서의 作用을 가지고 있으며, Bcl-2 와 association되어 細胞內 小器官에 位置해 있거나 soluble한 form으로 細胞質에 位置해 있는 것으로 알려져 있다⁷⁴⁾. 이 pro-apoptotic Bcl-2 family member protein의 location을 살아있는 狀態로 觀察하기 爲하여 Bax의 NH2 terminal에 green fluorescent protein(GFP)를 붙여서 HeLa cell에 transfection을 시켜 馬齒莧으로 因한 位置移動을 알고자 하였다.

本 研究에서는 GFP-Bax를 cloning하여 이를 HeLa cell에 transfection하여 control상태에서는 95% 이상 cytoplasm에 location되어 있는 상태에서 시간에 따라 13% mitochondria로 移動하였다(24hrs). 이에 비하여 馬齒莧(2mg/ml)을 處理한 群에서는 46.43% 移動되어 있음을 알 수 있었다(Fig 4). 그 이상의 incubation은 GFP-Bax의 移動增加를 誘發하지 않았다.

最近 apoptosis시의 신호전달기작이 活發히 研究되고 있으며 그 중 Mitogen-activated protein kinase(MAPK)등은 細胞 죽음 및 細胞 分化와 成長에 關聯되어 있다고 發表된 바 있다. Extracellular signal-regulated protein kinase(ERK), c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK), 및 p38 MAPK 등이 MAPK의 주류를 이루고 있으며 그 중, JNK 및 p38은 세포 죽음에 직접 關聯된다고 報告되고 있다⁷⁵⁻⁷⁹⁾.

HeLa cell에서 馬齒莧으로 因한 apoptosis에 Mitogen activated protein kinase(MAPK) 經路가 關聯되어 있는지 確認하기 위하여, 2mg/ml의 馬齒莧을 처리하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 p38 MAPK 抑制劑로 알려진 SB203580 compound⁸⁰⁾를 10 μ M 濃度로 處理하였을 때 有意性 있는 保護效果를 나타냈다. 5mg/ml의 馬齒莧을 處理했을 때에도 同一한 保護效果를 나타내었다. 이에

비해 ERK의 upstream인 MEK 1(MAPK/extracellular signal-regulated kinase(ERK) kinase)의 抑制劑로 알려진 PD98059 compound⁸¹⁾를 20 μ M 濃도로 처리하였을 때는 별 다른 影響을 미치지 않았다(Fig. 5A).

SB203580이 馬齒莧으로 인한 apoptosis에서 caspase-3의 活性調節에 미치는 影響을 알아보기 위하여 2mg/ml의 馬齒莧을 處理하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 SB203580을 處理하고 caspase-3 活性를 測定하였다. SB203580(10 μ M) 處理하였을 때 馬齒莧으로 因한 caspase-3의 活性增加가 抑制된 반면 PD98059를 處置하였을 때는 caspase-3의 活性增加에 아무런 影響을 미치지 않았다(Fig. 5B). 이는 cell viability 결과와 동일한 결과로 馬齒莧으로 인한 죽음이 p38 MAPK의 존적으로 야기함을 제시하여주고 있다.

馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK 經路가 關與하는 앞의 結果를 바탕으로 GST-ATF-2(Glutathione-S-transferase-Activating transcription factor)를 機質로 하여 kinase assay를 施行한 結果, 1시간의 짧은 시간에 p38 MAPK의 活性化를 確認할 수 있었다(Fig. 6). GST protein의 量은 同一한 結果를 얻어 定量的으로 同一하였음을 알 수 있었다.

本 실험에서는 p38 MAPK의 기질을 ATF-2를 사용하고 있으며 transcription factor중의 하나이다. 本 結果와 유사하게 抗癌劑로 臨床에서 쓰이고 있는 藥物을 사용하여 癌細胞를 자극하였을 때 biological response를 다양하게 보이는 p38 MAPK cascade를 活性化시킨다고 한다⁸²⁾. 이러한 p38 MAPK와 같은 酵素들이 일단 活性化되면 또 다른 kinase의 磷酸化를 거친 活性化가 유발되며, 이러한 反應은 하나의 protein이나 peptide가 p38 MAPK의 peptide-binding channel이라 할 수 있는 substrate pocket에 結合하면서 이 가운데 있는

ATP pocket에 ATP가 結合하게 되고 아주 신속한 連鎖反應이 일어난다⁸³⁾. 이러한 反應을 하게 되는 p38 MAPK의 down stream target은 MAPK-activated protein kinases 2, 3, 및 5 등이 있으며 transcription factor인 ATF-2, CHOP-1 등이 있다.

馬齒莧으로 因한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK 經路의 活性化 및, Bax protein의 mitochondria로의 移動增加는 앞서 確認되었다. 이의 聯關性을 알아보기 위하여 SB203580을 處理하고 Bax의 translocation을 觀察한 結果, p38 MAPK 抑制劑인 10 μ M SB203580은 馬齒莧으로 因한 Bax의 translocation에는 影響을 주지 않고 있음을 알 수 있었다(Fig. 7).

이 研究에서 馬齒莧 處理시 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 發顯量이 減少한다는 것을 確認한 바 있으므로, SB203580 處理時 이의 調節을 確認하여보고자 하였다. 10 μ M의 SB203580은 Bcl-2의 減少를 回復하였으며, 이는 馬齒莧으로 因한 子宮頸部癌細胞에서의 apoptosis를 p38 MAPK가 保護하고 있는 기전을 說明하여 주는 것이라 할 수 있겠다(Fig. 8).

이상의 實驗結果로 볼 때 馬齒莧은 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell의 apoptosis를 誘導하였으며, 그 過程에서 mitochondria membrane potential collapse, Bcl-2의 減少, Bax의 mitochondria로의 移動增加, p38 MAPK의 活性化가 일어나고 있음이 밝혀졌다. 따라서 馬齒莧은 韓方의 癥瘕에 屬하는 子宮頸部癌의 豫防과 治療에 積極活用될 수 있으리라 생각된다.

V. 結論

子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에서 馬齒莧으로 因한 細胞枯死를 觀察한 結果 다음

과 같은 結論을 얻었다.

1. HeLa cell에 馬齒莧(0, 1, 2, 5mg/ml)을 處理시 用量 依存的으로 細胞 죽음이 야기됨을 확인하였다. 특히 馬齒莧(0.5, 1, 2, 5mg/ml)을 處理한 24 時間 후, 細胞 生存度의 顯著한 減少를 확인하였다.
2. HeLa cell에 馬齒莧(2mg/ml) 處置時 有意性 있는 mitochondria membrane potential collapse를 觀察하였다.
3. HeLa cell에 馬齒莧(2mg/ml) 單獨 處理時, Bcl-2 protein의 發顯은 6時間 이후 부터 顯著한 減少를 보여주고 있으나, pro-apoptotic protein인 Bak의 發顯은 差異를 確認할 수 없었다. 또한 다른 pro-apoptotic-Bcl-2 protein인 Bad의 量의 增加도 確認할 수 없었다.
4. GFP-Bax를 cloning하여 이를 HeLa cell에 transfection하여 control 群에서는 95% 이상 cytoplasm에 location되어 있는 상태에서 시간에 따라 13% mitochondria로 移動하였다(24hrs). 이에 비하여 馬齒莧(2mg/ml)을 處理한 群에서는 46.43% 移動되어 있음을 알 수 있었다(Fig 4). 그 이상의 incubation은 GFP-Bax의 移動增加를 誘發하지 않았다.
5. 馬齒莧(2mg/ml)을 處理하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 p38 MAPK 抑制劑인 SB203580을 10 μ M 濃度로 處理하였을 때 有意性 있는 保護效果를 나타냈다. 5mg/ml의 馬齒莧을 處理했을 때에도 同一한 保護效果를 나타내었다. 이에 비해 MEK 1의 抑制劑인 PD98059를 20 μ M 濃도로 처치하였을 때는 별다른 影響을 미치지 않았다.
6. 馬齒莧(2mg/ml)을 處理하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 SB203580을 處理하고 caspase-3 活性을 測定하였

다. SB203580(10 μ M) 處理하였을 때 馬齒莧으로 인한 caspase-3의 活性增加가 抑制된 반면 PD98059을 處置하였을 때는 caspase-3의 活性增加에 아무런 影響을 미치지 않았다.

7. 馬齒莧으로 인한 HeLa cell의 apoptosis에서 p38 MAPK 經路가 關與하는 앞의 結果를 바탕으로 GST-ATF-2를 機質로 하여 kinase assay를 施行한 結果, 1시간의 짧은 시간에 p38 MAPK의 活性化를 확인할 수 있었다.
8. 馬齒莧(2mg/ml)을 處理하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 SB203580을 處理하고 Bax의 translocation을 觀察한 結果, p38 MAPK 抑制劑인 10 μ M SB203580은 馬齒莧으로 인한 Bax의 translocation에는 影響을 주지 않고 있음을 알 수 있었다.
9. 馬齒莧(2mg/ml)을 處理하고 HeLa cell의 죽음을 誘導하는 條件에서 10 μ M SB203580은 Bcl-2의 減少를 回復하였다.

이상의 實驗結果로 볼 때 馬齒莧은 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell의 apoptosis를 誘導하였으며, 그 過程에서 mitochondria membrane potential collapse, Bcl-2의 減少, Bax의 mitochondria로의 移動增加, p38 MAPK의 活性化가 일어나고 있음이 밝혀졌다. 따라서 馬齒莧은 韓方의 癥瘕 積聚에 屬하는 子宮頸部癌의 治療劑로 使用될 수 있다고 思料되며, 이에 대하여 지속적인 研究가 必要하다고 생각된다.

- 투 고 일 : 2004년 07월 28일
- 심 사 일 : 2004년 08월 02일
- 심사완료일 : 2004년 08월 07일

參考文獻

1. 이승호, 자궁경부암의 역학과 병인론, 啓明醫大論文集, 1997; 16(1): 29-36.
2. 한국중앙암등록본부·보건복지부, 한국중앙암등록사업 연례보고서(2001.1.-2001.12.), 보건복지부, 2003.
3. 김태진 등, 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성, 대한부인종양콜포스코피학회지, 1999; 10(2): 138-47.
4. 문구, 김병주 등, 癌 東西醫結合治療, 益山: 圓光大學校 出版局, 1999; 379-421.
5. 서울대학교 의과대학 산부인과학교실, 산부인과학, 서울: 군자출판사, 1999; 404-11.
6. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會, 韓醫婦人科學(상), 서울: 정담, 2001; 319-26.
7. 최승훈, 東醫腫瘍學, 서울: 杏林出版, 1995; 229-34.
8. 大韓病理學會, 病理學(II), 서울: 고문사, 1995; 966-7.
9. 이중달, 病理學, 서울: 高麗醫學, 1991; 691-700.
10. 宋炳基, 韓方婦人科學, 서울: 癸丑文化社, 1992; 249-57.
11. 鄭鎮鴻, 蓬莖茂丸 煎湯液과 抗癌劑 併用投與時 子宮癌 細胞에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 博士學位論文, 1993.
12. 沈龍燮, 子宮癌細胞에 미치는 穿山甲散 煎湯液과 抗癌劑 併用投與 效果, 大田大學校 大學院, 博士學位論文, 1993.
13. 李廷華, 歸朮破癥湯이 子宮癌 細胞(HeLa Cell)에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1994.
14. 高昊奎, 加味桂枝茯苓丸과 抗癌劑 併用時 子宮癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1995.
15. 李俊成, 柳同烈, 乾漆散 煎湯液이 女性癌 細胞株에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 1997; 10(2): 201-21.
16. 柳浩粉, 鄭鎮鴻, 柳同烈, 荊蓬煎丸料가 女性癌細胞 및 마우스 免疫細胞에 미

- 치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 1998; 11(1): 109-29.
17. 崔達永, 鬼箭羽(Euonymus alatus(Thunb.) Sieb)가 肝癌細胞(Hep3B)와 子宮癌細胞(HeLa)의 成長抑制에 미치는 影響에 관한 研究, 東國韓醫學研究所論文集, 1999; 7(2): 155-62.
 18. 李允貞 등, 半枝蓮이 子宮癌細胞(HeLa 22918)의 成長抑制에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 1999; 12(1): 185-96.
 19. 金修敬, 加味溫經湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 碩士學位論文, 2001.
 20. 박경미 등, 濟川煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 2003; 16(2): 161-76.
 21. 박중문 등, 六合湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 2003; 16(3): 128-46.
 22. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會, 中華本草(上冊), 上海: 上海科學技術出版社, 1998; 381-5.
 23. 冉先德 主編, 中華藥海(上卷·第一冊), 北京: 哈爾濱出版社, 1998; 183-5.
 24. 徐國均 등 主編, 中國藥材學, 北京: 中國醫藥科技出版社, 1996; 1383-4.
 25. 新文豐出版公司, 新編中藥大辭典(第二冊), 臺北: 新文豐出版公司, 1984; 1655-7.
 26. 辛民教, 臨床本草學, 서울: 永林社, 1994: 327-8.
 27. 金哉希, 쇠비름의 藥理作用에 관한 研究, 碩士學位論文, 淑明女子大學校 大學院, 1984.
 28. 吳旻眞, 쇠비름이 세포성 및 체액성 면역반응에 미치는 영향, 생약학회지, 1992; 23(1): 63.
 29. 崔根杓, 쇠비름 抽出物의 抗突然變異原性 및 抗癌效果에 관한 研究, 博士學位論文, 江原大學校 大學院, 1996
 30. Steel GG, Cell loss as a factor in the growth rate of human tumors, Eur J. Cancer, 1967; 3: 381-7.
 31. Frindel E, Malaise E, Tubiana M, Cell proliferation kinetics in five human solid tumors, Cancer, 1968; 22: 611-20.
 32. Laird AK, Dynamics of growth in tumors and in normal organisms, Human Tumor Cell Kinetics(eds. Perry S) Natl Cancer Inst Monogr, 1969; 30: 15-28.
 33. Clifton KH, Yatvin MB, Cell population growth and cell loss in the MRG-B mouse mammary carcinoma, Cancer Res, 1972; 30: 257-89.
 34. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR, Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br J. Cancer, 1972; 26: 239-57.
 35. 조종관, 한방임상중양학, 대전: 주민출판사, 2001; 799-818.
 36. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회, 부인과학, 서울: 칼빈출판사, 1997; 980-1027.
 37. Hersh EM, Ereish EJ, Host defence mechanisms and their modification by cancer chemotherapy. In methods in Cancer Research, New York Academic Press, 1986; 335.
 38. Madewell BR, Tumor immunology and immunotherapy, Tumor immunol, 1982; 69: 213.
 39. 巢元方, 巢氏諸病源候論, 서울: 大星文化社, 1992; 150-2.
 40. 王肯堂, 六科證治準繩, 서울: 大星文化社, 1992; 218-34.
 41. 李梴, 編註醫學入門 婦人門, 서울: 大星文化社, 1990; 40-3.
 42. 武之望, 濟陰綱目, 臺北: 旋風出版社, 1977; 149-61.
 43. 楊維傑 編, 黃帝內經譯解(靈樞), 서울: 成輔社, 1980; 473.
 44. 孫思邈, 華陀神醫秘傳, 서울: 東醫輔, 1976; 20.
 45. 薛己, 校注婦人良方注釋, 서울: 一中社, 1989; 157-60.
 46. 楊維傑 編, 黃帝內經譯解(素問), 서울: 成輔社, 1980; 664.
 47. 張介賓, 張氏景岳全書, 서울: 成輔社, 1983; 734-8.
 48. 龔廷賢, 萬病回春, 서울: 醫聖堂, 1993; 176-81.
 49. 吳謙, 醫宗金鑑, 서울: 大星文化社, 1983; 452-8.

50. 王清任, 醫林改錯評譯, 서울: 成輔社, 1998; 129-32.
51. 郎偉君, 孟立春, 抗癌中藥一千方, 北京: 中國醫藥科技出版社, 1996; 401.
52. 王愛芹, 曹慧娟 主編, 實用中西醫結合婦科學, 1996; 471-6.
53. 羅元愷 主編, 實用中醫婦科學, 上海: 上海科學技術出版社, 1997; 300-1.
54. 吳高媛, 冀敦福 主編, 婦科疾病診斷與治療, 天津: 天津科技翻譯出版公司, 2000; 267-9.
55. 郭志強, 趙吉平 主編, 婦科常見病診治, 北京: 科學技術文獻出版社, 2000; 169-72.
56. 孟煒, 梁學林 主編, 婦產科手冊, 沈陽: 遼寧科學技術出版社, 2000; 184-7.
57. Alnemri ES, Mammalian cell death proteases : a family of highly conserved a spartate specific cysteine proteases, J Cell Biochem, 1997; 64: 33-42.
58. Chae HJ et al, Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblast: possible role for ceramide, Endocrinology, 2000; 141(8): 2904-13.
59. Kang YJ et al, Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice, J Biol Chem, 1996; 271(21): 12610-6.
60. Rocha GM et al, Direct toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs for renal medullary cells, Proc Natl Acad Sci USA, 2001; 98(9): 5317-22.
61. Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM, Low-level methyl mercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction, Environ Res, 1998; 77: 149-59.
62. Smaili SS et al, Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential, Cell Death and Differ, 2001; 8(9): 909-20.
63. Gross A et al, Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to Bax and BCL-X(L). Mol, Cell Biol, 2000; 20(9): 3125-36.
64. Marchetti P et al, Mitochondria permeability transition is a central coordinating event of apoptosis, J. Exp. Med, 1996; 184(3): 1155-60.
65. Marzo I et al, The permeability transition on pore complex: A target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2 related proteins, J. Exp. Med, 1998; 187(8): 1261-71.
66. Kitanaka C et al, Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression : differential effects of Bcl-2 and Bcl-XL on Bax-induced caspase activation and apoptosis, Oncogene, 1997; 15(15): 1763-72.
67. Jurgensmeier JM et al, Bax indirectly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1998; 95(9): 4997-5002.
68. Pastorino JG et al, The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition, J. Biol. Chem, 1998; 273(13): 7770-5.
69. Hattori T et al, Heterodimerization of Bcl-2 and Bcl-X(L) with Bax and Bad in colorectal cancer, Acta Oncologica, 2000; 39(4): 495-500.
70. Tudor G et al, Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels, Cell Death & Differentiation, 2000; 7(6): 574-86.
71. Dekker NP et al, Apoptosis-associated markers in oral lichen planus, J. Oral. Pathol. Med, 1997; 26(4): 170-5.
72. Kang M et al, Ki-67, p53 and Bcl-2 expression of serrated adenomas of the colon, Am. J. Surg. Pathol, 1997; 21(4): 417-23.
73. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. : The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nature. Cell Biol 2(3) : 156-162, 2000.
74. Wolter KG et al, Movement of Bax from

- m the cytosol to mitochondria during a poptosis, *J. Cell. Biol.*, 1997; 139(5): 1281-92.
75. Wilson DJ et al, JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells, *Eur J Immunol*, 1996; 26(5): 989-94.
 76. Saldeen J, Lee JC, Welsh N, Role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis, *Biochem Pharmacol*, 2001; 61(12): 1561-9.
 77. Zhu W et al, MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes, *Circulation*, 1999; 100(20): 2100-7.
 78. Liao JH et al, The involvement of p38 MAPK in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in murine hepatocytes, *Cell Res*, 2001; 11(2): 89-94.
 79. Nagata Y, Todokoro K, Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis, *Blood*, 1999; 94(3): 853-63.
 80. Clerk A, Sugden PH, The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs), *FEBS Lett*, 1998; 426(1): 93-6.
 81. He H et al, Phorbol ester-induced mononuclear cell differentiation is blocked by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD98059, *Cell Growth Differ*, 1999; 10(5): 307-15.
 82. Bacus SS et al, Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways(ERK and p38) and is independent of p53, *Oncogene*, 2001; 20(2): 147-55.
 83. Herlaar E, Brown Z, p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease, *Mol. Med. Today*, 1999; 5(10): 439-47.