

# 托裏消毒飲의 PC-3 세포에 대한 세포고사 유도 효과 및 기전 연구

박형권 · 권강범 · 김은경<sup>1</sup> · 한미정<sup>1</sup> · 송미영<sup>1</sup> · 이영래<sup>1</sup> · 박병현<sup>1</sup> · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 전북대학교 의과대학 생화학교실

## Study on Apoptosis-Inducing Effect and Mechanism by Tarisodokyeum in PC-3 cells

Hyung Kwon Park, Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim<sup>1</sup>, Mi Jeong Han<sup>1</sup>,  
Mi Young Song<sup>1</sup>, Young Rae Lee<sup>1</sup>, Byung Hyun Park<sup>1</sup>, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
1: Department of Biochemistry, College of Medicine, Chonbuk National University Medical School

Takrisodokyeum (TRSDY) has been known to exert anti-tumoral activity in Korea. However, its molecular mechanism of action is not understood. In this study, we found that TRSDY induced apoptosis in androgen-independent prostate cancer PC-3 cells as evidenced by DNA fragmentation. Our data demonstrated that TRSDY-induced apoptotic cell death was accompanied by decreases of pAKT and NF- $\kappa$  activation, which is resulted from inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation. But TRSDY-induced apoptotic effect of PC-3 cells was independent of Par-4 expression. Taken together, these results suggest that TRSDY inhibits AKT phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation, and eventually leads to apoptotic cell death in androgen independent prostate cancer PC-3 cells.

Key words : Takrisodokyeum, PC-3 cell, apoptosis, p-AKT, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$

### 서 론

托裏消毒飲은 明代 龔의 《萬病回春》<sup>1)</sup>에 “治一切癰疽六七日未消者 服此藥 瘡未成即消 已成即潰”라고 수록된 이래로 東醫寶鑑 등<sup>2-9)</sup> 역대 의서에서 癰疽치료에 활용되어 온 처방이다.

현재 서양의학에서 암치료의 대표적인 치료법으로는 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 주를 이루고 있으나 수술요법과 방사선요법은 국소적인 부위에만 사용하는 한계가 있고 재발율도 높아 전신적인 화학요법이 주로 사용되고 있다. 그러나 화학요법에 사용되고 있는 항암치료제들의 대부분은 그 뛰어난 효능에도 불구하고 치료과정에서 동반되는 심각한 부작용, 즉 세포독성이나 장기독성 때문에 그 사용에 위험성을 배제할 수는 없다<sup>10,11)</sup>. 이에 항암치료제의 세포독성이 없는 농도에서도 세포고사 신호전달계를 활성화하여 암세포를 고사시킬 수 있는 한약제 중에서 복합처방, 단일처방 혹은 성분을 규명하는 연구는 암치료에 대단히 유용한 것이다.

전립선암은 초기에 국소적인 부위에 국한되어 나타나는 남성호르몬 의존형(androgen dependent)으로 존재하며 이에 대하여 남성호르몬 중지(androgen ablation)법의 치료를 시행하고 있으나<sup>12)</sup> 대부분의 남성호르몬 의존형 전립선암은 3년 이내에 남성호르몬 중지 치료법에 반응하는 세포고사(apoptosis)에 내성을 지니게 되어 남성호르몬 비의존형(androgen independent) 전립선암으로 진행하게 된다<sup>13)</sup>. 본 논문에서 사용한 PC-3세포는 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포로서 실험적으로 많이 이용되고 있다<sup>14)</sup>.

이에 저자는 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 PC-3를 이용하여 托裏消毒飲의 세포고사 유도효과를 조사하고 그 기전을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma(ST, USA)에서 구입하였고, PTEN과 Par-4 항체, Alkaline

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2006/06/18 · 수정 : 2006/07/12 · 채택 : 2006/08/05

pohsphatase-conjugated mouse IgG secondary antibody는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 PC-3 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 RPMI에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)가 소통되는 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. 托裏消毒飲 구성약물 및 추출

본 연구에 사용된 托裏消毒飲은 萬病回春<sup>1)</sup>에 근거하였으며 구성 약재는 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하였으며 처방 구성은 다음과 같다.

Table 1. The ration of the component in TRADY

Component	Ratio
<i>Lonicerae Flos</i> (金銀花)	3.0
<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i> (陳皮)	3.0
<i>Astragali Radix</i> (黃芪)	2.0
<i>Trichosanthes Radix</i> (天花粉)	2.0
<i>Phellopteri Radix</i> (防風)	1.0
<i>Angelicae gigantis Radix</i> (當歸)	1.0
<i>Cnidii Rhizoma</i> (川芎)	1.0
<i>Angelicae davuricae Radix</i> (白芷)	1.0
<i>Platyodi Radix</i> (桔梗)	1.0
<i>Machili Cortex</i> (厚朴)	1.0
<i>Manis Squama</i> (穿山甲)	1.0
<i>Gleditschiae Spina</i> (皂角刺)	1.0

위와 같이 구성된 托裏消毒飲 100g에 3차 증류수 0.9L를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 22.7g의 분말 시료를 얻었다.

4. MTT 분석

PC-3 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10<sup>4</sup> cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 PC-3 세포에 托裏消毒飲 추출물을 48 시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5. DNA 분절(fragmentation) 조사

DNA 분절현상을 조사하기 위하여 genomic DNA 추출은

Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하였다. 托裏消毒飲 추출물을 PC-3 세포에 48시간 동안 처리한 후 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조한다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer하에서 OD값을 측정하여 DNA를 정량한다. DNA 5ug을 2% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

6. NF-κB의 활성측정

전사인자 활성을 측정키 위해 먼저 약제가 처리된 PC-3 세포에서 핵 추출물은 Jeong 등의 방법으로 모아졌다<sup>15)</sup>. 세포는 저삼투압 용해용액(0.2 mM PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 20 μM pepstatin A, 0.1 mM antipain)으로 10분 얼음에서 팽창시켜 최종적으로 Nonidet P-40을 0.1%로 처리한 후 2,500rpm에서 원심분리 하여 핵단백질을 모았다. NF-κB의 활성측정은 NF-κB의 consensus binding site을 가진 oligonucleotide probe(5'-CCG GCC GGT TAA CAG AGG GGG CTT TCC GAG; 5'-CCG GCT CGG AAA GCC CCC TCT GIT AAC CGG)를 10 mM Tris-HCL 용액(pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT 함유)에 희석한 후 85°C에서 5분 annealing 한 후 100 ng을 Rediprime kit(Amersham, England)를 이용하여 32P를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 5-10 μg의 핵단백질과 실온에서 30분 반응시킨 후 냉온실에서 4% polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF-κB 활성을 측정하였다. 핵 추출물을 취득하고 남은 cytosol 분획은 IκB-α Western blotting을 시행하였다.

7. Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후, 30μg의 단백질을 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 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. Akt, p-Akt, IκB-α와 Par-4에 대한 일차항체(primary antibody)는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체(secondary antibody)인 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간

반응시킨 후, NBT/BCIP 시약을 이용하여 노출시켰다.

8. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법<sup>16)</sup>에 의거하여 정량하였다.

9. 통계 분석

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 Microcal Origin(Version 6.0)을 이용하여 ANOVA one-way test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 托裏消毒飲 추출물의 효과

托裏消毒飲 추출물이 PC-3 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여,  $1 \times 10^6$  cells/ml의 세포를 RPMI 배지에 접종하고 24시간 후에 托裏消毒飲 추출물을 0.2-5.0mg/ml의 농도로 48시간 동안 처리한 후 MTT을 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 처리한 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다. 특히 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 생존율이 각각 46.2%, 24.5%로 감소하였다(Fig. 1).

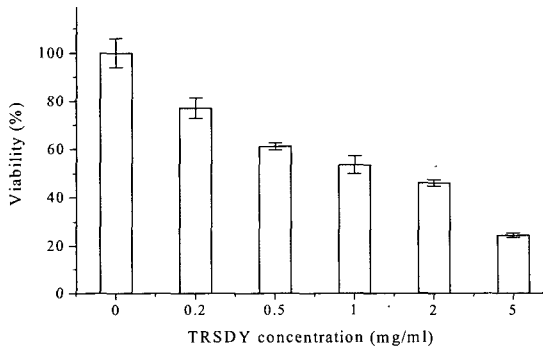


Fig. 1. Effects of Takrisodokyeum(TrSDY) extract on cell viability in PC-3 cells. Cells were treated with various concentrations of TrSDY extract for 48 hour. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean ± SEM of four independent experiments.

2. 세포고사에 미치는 托裏消毒飲 추출물의 효과

托裏消毒飲 추출물이 PC-3 세포의 생존율 감소 효과가 세포고사에 의한 것인지 확인 하고자 세포고사의 특징적인 현상인 DNA 분절(fragmentation) 현상을 조사하였다<sup>17,18)</sup>. 2.0mg/ml 托裏消毒飲 추출물을 3, 6, 12, 24, 48시간 동안 PC-3 세포에 처리한 후 조사한 결과 12시간부터 DNA 분절 현상이 나타났으며 48시간까지 지속되었다(Fig. 2).

3. 托裏消毒飲 추출물이 NF-κB 활성화에 미치는 영향

托裏消毒飲 추출물이 PC-3 세포에서 NF-κB 활성화도에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 2.0mg/ml 托裏消毒飲 추출물을 3, 6, 12, 24, 48시간 동안 처리한 후 핵 추출물을 수집하여 NF-κB 활성도를 조사하였다. 그 결과 托裏消毒飲 추출물을 12시간 처리한

군에서 NF-κB 활성도가 감소하였으며 48시간에서는 완전히 억제하는 것으로 나타났다. 또한 NF-κB의 특이성(specificity)을 확인하기 위하여 100배(Lane N)의 κB oligonucleotide를 첨가하여 확인한 결과 NF-κB 활성도가 감소하여 NF-κB의 특이성을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 托裏消毒飲에 의한 NF-κB 활성도의 감소가 IκB-α degradation의 감소 의한 것임을 IκB-α Western blotting을 이용하여 확인하였다(Fig. 3B).

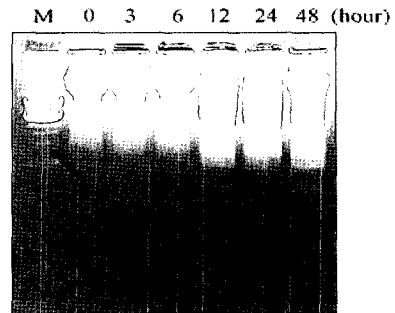


Fig. 2. Apoptosis inducing effects of Takrisodokyeum(TrSDY) extract in PC-3 cells. Cells were treated with 2.0mg/ml of TrSDY extract for various time intervals. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods.

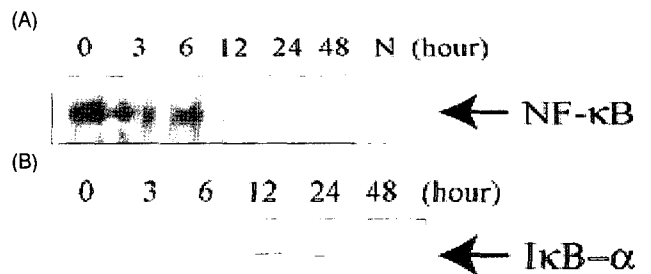


Fig. 3. Effect of Herba Patriniae(HP) extract on translocation of NF-κB from cytosol to the nucleus and IκB-α degradation in PC-3 cells. Cells were treated with 2.0mg/ml HP extract for indicated periods. Nuclear and cytosolic extracts were prepared and NF-κB activation was analyzed by electrophoretic mobility shift assay and IκB-α degradation by Western blotting as described in Materials and Methods. Lane N: 100 fold κB oligonucleotide

4. 托裏消毒飲 추출물이 p-Akt 발현에 미치는 영향

托裏消毒飲 추출물에 의한 PC-3 세포의 고사과정에 p-Akt의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 2.0mg/ml 托裏消毒飲 추출물을 6, 12, 24, 48시간 동안 세포에 노출시킨 후 p-Akt에 대한 일차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 p-Akt의 발현이 감소하였으나 항상 같은 양으로 존재하는 Akt의 양은 변화가 없었다(Fig. 4).

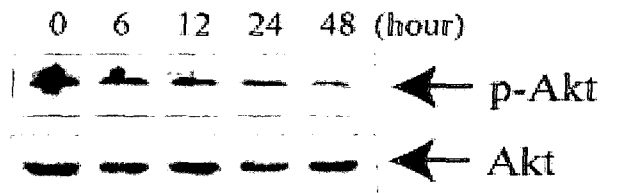


Fig. 4. Effects of Takrisodokyeum(TrSDY) extract on p-Akt expression in PC-3 cells. Cells were treated with 2.0mg/ml TrSDY extract for indicated periods. Lysate from cells was separated on 12.0% SDS-PAGE. p-Akt on the nitrocellulose membrane was probed with anti-p-Akt antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

5. 托裏消毒飲 추출물이 Par-4 발현에 미치는 영향

托裏消毒飲 추출물에 의한 PC-3 세포의 고사과정에 Par-4의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 2.0mg/ml 托裏消毒飲 추출물을 6, 12, 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 Par-4에 대한 일차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 托裏消毒飲 추출물을 처리한 군의 Par-4의 발현양은 대조군과 차이를 나타내지 못하였다(Fig. 5).



Fig. 5. Effects of Takrisodokyueum(TRSDY) extract on Par-4 expression in PC-3 cells. Cells were treated with 2.0mg/ml TRSDY extract for indicated periods. Lysate from cells was separated on 12.0% SDS-PAGE. Par-4 on the nitrocellulose membrane was probed with anti-Par-4 antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

고찰 및 결론

한의학에서 癌의 治法으로는 健脾益氣, 養血滋陰, 滋補肝腎, 滋陰溫陽, 理氣和血 등의 扶正培本法과 活血化癥, 化痰軟堅, 清熱解毒, 行氣散結, 以毒攻毒 등의 祛邪法, 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法으로 대별하는데 病程에 따라 초기에는 祛邪法을, 중기에는 扶正祛邪를, 말기에는 扶正培本을 治療原則으로 한다. 그 중에서 인체의 抗癌能力을 강화시켜 주는 扶正培本法과 祛邪하되 인체의 正氣를 補益하고 正氣를 손상시키지 않는 扶正祛邪法을 가장 효과적인 방법으로 보고 있다<sup>19,20</sup>.

細胞枯死(apoptosis)가 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요 기전으로 인식되면서 1980년대 후반기부터는 생명과학에서 중요 관심영역으로 인식되어 많은 발전을 가져 왔으며 특히 신경계와 면역세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다<sup>21,22</sup>.

托裏消毒飲은 萬病回春<sup>1)</sup>에 의하면 金銀花, 陳皮, 天花粉, 黃芪, 防風, 當歸, 川芎, 白芷, 桔梗, 厚朴, 穿山甲, 皂角刺로 구성되어 있는 처방으로 암의 개념을 포함한 한의학적 용어인 癰疽를 치료하는데 활용되어 왔다<sup>19</sup>. 실험적으로 권 등<sup>17)</sup>은 托裏消毒飲 추출물이 HL-60 세포에서 세포고사를 유도하고 그 기전이 hydrogen peroxide 발생, caspase-3 활성화, PARP 절단, DNA 분절, 세포고사 유도인 것을 발표하였다.

본 논문은 托裏消毒飲의 전립선암에 대한 응용 가능성을 확인하고자 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 PC-3 세포에 托裏消毒飲 추출물을 처리한 후 세포고사 유도 효과와 그 기전을 조사한 논문이다.

托裏消毒飲 추출물은 PC-3 세포의 생존율을 처리한 농도에 비례하여 감소시켰으며 2.0mg/ml의 농도에서 48시간 동안 처리한 결과 약 54%의 생존을 감소를 나타냈다(Fig. 1). 이러한 托裏消毒飲 추출물의 생존을 감소효과가 세포고사 유도에 의한 것인지 확인하고자 PC-3 세포에 0.2에서 2.0mg/ml 농도로 托裏消毒飲 추출물을 3-48시간 동안 처리한 후 세포고사의 특징적인 현상

인 염색체 응축과 DNA 분절 현상을 조사하였다<sup>17,18)</sup>. 그 결과 12 시간부터 DNA 분절현상이 나타났으며 그 효과는 48시간까지 지속되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 托裏消毒飲의 PC-3 세포에 대한 생존을 감소효과는 세포고사 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.

전립선 암세포에서 NF-κB는 세포 생존 기전을 활성화시키는 기능을 가진 전사 인자로서 발현되어 cell death 기전을 방어하는 역할을 하고 있다<sup>23)</sup>. NF-κB는 불활성화 상태에서 IκB와 같이 복합체를 이루어 적절한 신호가 전달되면 IκB가 인산화되며 분해되고 NF-κB는 핵내로 이동하여 활성화되는 것으로 알려져 있다<sup>24,25)</sup>. 2.0mg/ml 托裏消毒飲 추출물을 PC-3 세포에 처리한 후 NF-κB의 활성도를 측정된 결과 12시간부터 핵내로 이동한 NF-κB의 양이 감소하였으며(Fig. 3A) 이것은 IκB-α의 분해의 감소로 인한 것으로 나타났다(Fig. 3B).

암 억제 유전자(tumor suppressor gene)로 남성호르몬 비존형 전립선암을 포함한 다양한 암에서 발현이 결손 되고 있는 PTEN<sup>26,27)</sup>은 항암제에 의하여 PTEN이 증가하며<sup>26)</sup> 이러한 증가는 Akt/PKB serine/threonine kinase을 활성화 시켜 Akt를 인산화시켜 p-Akt의 발현을 증가시키고 그 결과 세포고사에 저항성을 나타나게 한다<sup>27)</sup>. 托裏消毒飲 추출물을 2.0mg/ml의 농도로 6, 12, 24, 48시간동안 PC-3 세포에 처리한 결과 처리한 시간에 의존적으로 Akt의 인산화를 감소시켰으며(Fig. 4) 이는 Fig. 3에서 보여준 NF-κB 활성의 감소와 관련이 있는 것으로 사료된다. Par-4(prostate apoptosis response-4)는 전립선 암세포에서 세포고사를 유도하는 유전자로서<sup>28)</sup> tumor necrosis factor(TNF)-α 수용체 군중의 하나인 FasL/Fas의 활성화를 통하여 세포고사를 유도하거나 또는 세포 생존을 촉진하는 기전에 관여하는 nuclear factor(NF)-κB의 활성화를 억제하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>. Par-4 단백질 발현에 대한 托裏消毒飲 추출물의 효과를 PC-3 세포에서 조사한 결과 뚜렷한 변화를 나타내지 못하였다(Fig. 4).

이상의 결과를 요약하면, 인간 전립선 암세포인 PC-3 세포에서 托裏消毒飲 추출물은 세포고사에 의한 생존율의 감소를 유도하였으며 세포고사 기전에 Akt의 인산화 억제를 통한 IκB-α의 분해 감소, Nk-κB 활성도의 감소가 관여하는 것으로 나타났다. 앞으로 다른 암세포에서의 托裏消毒飲의 고사 유도효과를 조사하고 in vivo에서의 효과를 조사한다면 전립선 암치료제로서 托裏消毒飲을 개발할 수 있는 가능성을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 원광대학교 교비 지원(2005)에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 龔廷賢. 增補萬病回春. 台北, 大中國圖書公社, pp 176-182, 1959.
2. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, 卷二 p 725, 卷三 p 726, 728, 733, 734, 741, 745, 1986.

3. 杏林書院編. 古今實驗方. 서울, 杏林書院, p 205, 1958.
4. 金定濟. 東醫診療要鑑. 서울, 東洋醫學研究院, 上 p 618, 626, 下 pp 446-447, 1974.
5. 金定濟 外. 東醫臨床要鑑. 서울, 書苑堂, p 218, 314, 1977.
6. 南采祐. 靑囊訣. 서울, 漢城圖書株式會社, p 92, 1949.
7. 陳憲定. 丸散膏丹集成. 中國, 大新書局, p 732, 1967.
8. 康命吉. 濟衆新篇. 서울, 通文館, p 108, 1968.
9. 吳克潛. 古今醫方集成. 서울, 翰成社(重刊), p 688, 1980.
10. 趙鍾寬. 한방임상중양학. 대전, 周辰出版社, pp 725-758, 2001.
11. 서울대학교 병원. 전공의 진료편람. 서울, 의학출판사, pp 108-111, 1994.
12. Greenlee, R.T., et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin, 51(1):15-36, 2001.
13. Isaacs, J.T., et al. Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. J Androl, 13(6):457-464, 1992.
14. Gurumurthy, S., Vasudevan, K.M., Rangnekar, V.M. Regulation of apoptosis in prostate cancer. Cancer Metastasis Rev, 20(3-4):225-243, 2001.
15. Jeong, J.Y., Jue, D.M. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Journal of Immunology 158, 4901-4907, 1997.
16. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254, 1976.
17. Kwon, K.B., et al. Vibrio vulnificus cytotoxin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. J Biol Chem, 276(50):47518-47523, 2001.
18. Kwon, K.B., et al. Induction of apoptosis by takrisodokyem through generation of hydrogen peroxide and activation of caspase-3 in HL-60 cells. Life Sci, 73(15):1895-1906, 2003.
19. 方藥中 外. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, pp 621-636, 1986.
20. 文 九 外. 癌東西醫結合治療(1). 익산, 원광대학교출판국, pp 253-303, 383-460, 1999.
21. Raff, M.C., Bares, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. Programed cell death and the control of cell survival. Science, 262, 695-700, 1993.
22. De Bono, J.S., Rowinsky, E.K. Therapeutics targeting signal transduction for patients with colorectal carcinoma. Br Med Bull, 64, 227-254, 2002.
23. Beg, A.A., et al. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. Genes Dev, 9(22):2736-2746, 1995.
24. Baeuerle, P.A., Henkel, T. Function and activation of NF-kB in the immune system. Annual Review of Immunology 12, 141-179, 1994.
25. Baldwin, A.S. Jr. The NF-kB and IκB proteins: new discoveries and insights. Annual Review of Immunology 14, 649-683, 1996.
26. Davies, M.A., et al. Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. Cancer Res, 59(11):2551-2556, 1999.
27. Steck, P.A., et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. Nat Genet, 15(4):356-362, 1997.
28. Chakraborty, M., et al. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. Cancer Res, 61(19):7255-7263, 2001.