

# 인간 신경모세포종 세포주 LAN5에 대한 扶正抗癌湯의 항종양효과

문미현\* · 조영기 · 이성균 · 이정섭 · 남상규 · 정현애<sup>1</sup> · 문 구

원광대학교 전주 한방병원, 1:익산 한방병원

## Anti-cancer Effects of Bujeonghangam-tang on Human Neuroblastoma Cell Line LAN5

Mi Hyun Moon, Young Kee Cho, Seong Kyun Lee, Jung Sup Lee, Nam Sang Kyu, Jeong Hyun Ae<sup>1</sup>, Goo Moon

Wonkwang University Jeonju Oriental Medicine Hospital, 1: Wonkwang University Iksan Oriental Medicine Hospital

Bujeonghangam-tang(BHT) has been used as an anticancer agent in oriental medicine, but the mechanism by which it induces cell death in cancer cells is still unclear. To investigate cell death mechanism by BHT in cancer cells, the activities of apoptosis signaling pathway were tested in human neuroblastoma cell line LAN5. Viability of LAN5 cells was markedly decreased by treatment of the water extract of BHT in a dose-dependent manner. BHT induced cell death was confirmed as apoptosis characterized by chromatin condensation. We tested whether the water extract of BHT affects the anti-apoptotic protein such as Bcl-2 and Bcl-XL, and the pro-apoptotic protein such as Bax. Both Bcl-2 and Bcl-XL were gradually decreased but Bax was increased in a time-dependent manner after the addition of the water extract of BHT. Cleavage of Bid by activation of caspase-8 protease was also observed in LAN5 cells by the treatment of the water extract of BHT. Taken together, these results suggest that the water extract of BHT exerts anti-cancer effects on human neuroblastoma LAN5 cells by inducing the apoptotic death via down-regulation of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-XL, up-regulation of pro-apoptotic protein such as Bax, and activation of intrinsic caspase cascades.

Key words : Bujeonghangam-tang(扶正抗癌湯), human neuroblastoma cell line LAN5

### 서 론

腫瘍이란 組織이 무절제하고 過剩的인 成長을 통해 個體에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않으며 正常組織에 대하여 파괴적인 功과를 형성한 것으로 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 나뉘며 그 중 惡性腫瘍을 癌이라 일컫는다<sup>1)</sup>.

韓醫學에서는 腫瘍이라는 단어는 직접 언급되고 있지 않으나 癌이라는 용어가 宋代의 《衛濟寶書》<sup>2)</sup>에 최초로 기술되고 있고 2천년 전 周禮에 瘍醫라는 말이 언급되어 있으며, 《黃帝內經》<sup>3)</sup>에서 積聚, 鼓脹, 石瘕, 息賁, 昔瘤, 瘤病, 伏梁, 厥疝, 瘕聚와 以後 여러 醫書에 보이는 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 失榮, 乳巖, 石疽,

石癰 등<sup>4)</sup>의 病症들이 지금의 癌과 가장 비슷하다고 할 수 있다<sup>7)</sup>.

癌의 원인으로 서양의학에서는 電離放射線, 吸煙, 飲酒, 바 이러스의 침입, 장기간에 걸친 다량의 藥物服用, 食餌의 문제, 寄生蟲 疝患, 환경오염 및 각종 정신 심리적 스트레스 등<sup>1,8)</sup>을 중시 하고 있으며 韓醫學에서는 風, 寒, 暑, 濕, 燥, 火의 六淫과 情志, 飲食의 內傷, 그리고 痰飲, 瘀血 등으로 나누고 있다<sup>4)</sup>.

癌의 治療法으로 서양의학적 방법은 外科의 處治法, 放射線 處治法, 化學療法 및 免疫療法 등이 대표적인데 이러한 治療法들은 癌種에 따른 감수성, 治療 후의 경과와 부작용이 각기 다르며 이에 따른 많은 문제점이 있어<sup>9,11)</sup>, 癌 治療의 효과를 높일 수 있는 다양한 研究에 관심이 모아지고 있다. 이에 비하여 韓醫學에서는 陰陽氣血과 臟腑의 虛實에 근거하여 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 補益藥을 위주로 하는 扶正培本法과 生氣理氣, 活血化痰, 清熱利濕, 軟堅散結하는 祛邪法 및 扶正培本法과 祛邪法을 병용하는 扶正祛邪法 등의 3가지로 분류하여 활용한다<sup>12)</sup>.

\* 교신저자 : 문미현, 전북 전주시 덕진구 덕진동 원광대학교 전주한방병원

· E-mail : be-ok@hanmail.net, · Tel : 063-270-1014

· 접수 : 2006/08/30 · 수정 : 2006/09/27 · 채택 : 2006/11/16

최근의 研究 결과 抗腫瘍 效果의 作用機轉이 세포고사에 의존한다는 사실이 밝혀져 세포고사 신호전달계의 기능변화를 통한 抗癌治療의 效能을 높이려는 研究에 관심이 모아지고 있으며<sup>13-17)</sup> 이와 관련하여 抗癌效果를 가진 韓藥材에 대한 연구 또한 활발하게 보고되고 있다<sup>18-20)</sup>.

본 실험에 사용된 扶正抗癌湯은 원광대학교 전주한방병원 3 내과에서 抗癌治療를 위해 사용되는 것으로 扶正의 作用이 있는 黃芪, 人蔘, 白朮, 陳皮, 當歸, 女貞子, 何首烏, 破故紙, 甘草 등 藥物과 祛邪의 作用이 있는 半夏, 山楂, 砂仁, 龍葵, 三稜, 蓬朮 등의 藥物, 그리고 抗癌의 作用이 있는 榆根白皮, 半枝蓮, 白花蛇舌草 등의 藥物로<sup>21)</sup> 구성되어 韓醫學의 癌治療法 중에서 扶正祛邪法에 해당하는 處方이다. 이에 대하여 金 등<sup>22-25)</sup>이 扶正法과 연관지어 扶正抗癌湯과 면역과의 관계를 연구하여 그 기전이 밝혀졌으나 祛邪法과 관련된 기전은 아직 설명되어지지 않았다.

이에 著者は 扶正抗癌湯의 祛邪的 측면이 세포고사와 관련되어 있음을 확인하기 위해, 扶正抗癌湯이 인간 신경모세포종 세포주 LAN5의 생존을 감소에 미치는 영향을 관찰하고, 이와 관련된 세포고사 과정 중 caspase계 cysteine protease-8의 활성화와 Bcl-2 단백질군의 발현량 변화를 연구하여, 扶正抗癌湯의 항암기전을 규명하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용한 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 감정하고 엄선하여 사용하였으며, 扶正抗癌湯의 처방구성과 중량은 원광대학교 전주한방병원에서 사용하고 있는 기본방에 준하였다.

Table 1. Prescription of Bujeonghangam-tang

本草名	生藥名	學名	重量 (g)
黃芪	Radix Astragali	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	12
人蔘	Radix Ginseng	<i>Panax schinseng</i> NESS.	6
白朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ.	4
陳皮	Pericarpium Citri Reticulatae	<i>Citrus unshiu</i> MARCO.	4
半夏	Rhizoma Pinelliae	<i>Pinellia ternata</i> BREIT.	4
山楂	Crataegus Pinnatifida	<i>Crataegus pinnatifida</i> BUNGE.	4
砂仁	Fructus Amomi	<i>Amomum Xanthioides</i> WALL.	4
當歸	Radix Angelicae Gigantis	<i>Angelica Gigas</i> NAKAI.	4
女貞子	Fructus Ligustri Lucidi	<i>Ligustrum lucidum</i> AIT.	4
何首烏	Radix Cynanchi Wilfordii	<i>Cynanchum wilfordii</i> HEMSLEY.	4
破故紙	Semen Psoraleae	<i>Psoralea corylifolia</i> L.	4
龍葵	Herba Solani Nigri	<i>Solanum nigrum</i> L.	4
榆根白皮	Cortex Ulmi Pumilae	<i>Ulmus pumila</i> L.	4
半枝蓮	Herba Scutellariae	<i>Scutellaria Barbata</i> D.DON.	4
茵陳	Herba Artemisiae Capillaris	<i>Artemisia Capillaris</i> THUNB.	4
甘草	Radix Glycyrrhizae	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	4
三稜	Rhizoma Scirpi	<i>Scirpus flaviatilis</i> A. GRAY.	2
蓬朮	Rhizoma Zedoariae	<i>Curcuma zedoaria</i> ROSC.	2
白花蛇舌草	Herba Oldenlandiae Diffusae	<i>Oldenlandia diffusa</i> ROXB.	15
Total amount			93

#### 2) 검액조제

실험에 사용된 약재는 물 추출물(H<sub>2</sub>O extract)로, 음건된 扶正抗癌湯 100 g을 물 1 l와 함께 랭각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 것을 시료로 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

RPMI 1640, 항생제 및 trypsin은 Gibco BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서, 于胎兒 혈청은 Hyclones사에서 구입하여 사용하였다. 배양 용기(48-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bid, caspase-8, PARP 및 β-actin 등에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, U.S.A.)에서, anti-goat, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. Tetrazolium bromide(MTT) 및 Hoechst 33342은 Sigma사(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

#### 4) 세포주

인간 신경모세포종 세포 LAN5 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대배양 하면서 실험을 실시하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포 배양 및 시약처리

인간 신경모세포종 세포인 LAN5는 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>) 10% 于胎兒 혈청이 포함된 RPMI-1640 배지에서 培養하였다. 약 48시간 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 다양한 농도의 한약제를 처리한 뒤 세포의 죽음을 관찰하고, 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

#### 2) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포(1×10<sup>5</sup> cells/ml)는 세포배양판(24-well plate)에 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기 안에서 안정시켰다. MTT 용액(5 mg/ml, phosphate buffered saline: PBS, pH7.4)은 실험에 필요한 조건의 시약 등을 처리한 후 배양액 부피의 1/10되게 첨가하여 4시간 반응시켰다. 4시간 후, 배양액을 제거하고 1 ml DMSO를 첨가하여 살아있는 細胞에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음, 96-well용 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

#### 3) Hoechst 염색

세포핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 LAN5 세포에 한약제를 처리한 후 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 2회 세척하였다. 세포는 paraformaldehyde 용액(3.7%)으로 실온에서 10분간 고정한 후, 10μM Hoechst 33342 용액으로 실온에서 20분 염색하여 다시 PBS로 세척하였다. 염색된 세포는

형광 현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

4) Western blot analysis

배양된 LAN5 세포에 약제를 처리한 일정 시간 후에 세포를 채취하여, cold PBS로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 total cell lysate를 얻기 위해 세포용해緩衝液(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1 % deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)을 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시키고, 13,000rpm에서 20분 遠心分離하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액의 단백질을 BCA법으로 정량하고, 동량의 단백질 (60 µg)은 3× sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후, SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동 후 gel의 단백질은 electrotransfer system (Ellard Inc, seattle, WA, USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer(5 % skim milk)와 상온에서 2시간 반응하였다. Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bid, caspase-8, PARP 및 β-actin 등에 대한 항체는 0.05 % (v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 4시간 반응하였으며, Caspase-3 protease, PARP, Bcl2, Bcl-x/L, Actin 등에 대한 2차 항체 anti-goat, anti-rabbit igG conjugated horse-radish peroxidase(HRP)를 TBS-T로 희석(1:3000)하여 상온에서 2시간 반응한 후, enhanced chemilluminescence(ECL) kit (Amersham, England)를 이용하여 ECL 필름에 감광, 현상하였다.

5) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였다.

결 과

1. 扶正抗癌湯 抽出物이 인간 신경모세포종 細胞株 LAN5의 細胞生存率에 미치는 影響

扶正抗癌湯 추출물이 인간 신경모세포종 細胞株 LAN5의 생존율에 어떤 영향을 미치는가 알아보기 위해 먼저 扶正抗癌湯의 농도를 변화시키며 生存率을 MTT방법으로 측정하였다. LAN5 세포에 100 µg/ml의 韓藥劑를 처리한 후 24시간 뒤 生存率이 20 % 감소하였고, 500 µg/ml 처리 시에는 49 %, 1000 µg/ml 처리 시에는 55 % 이상 生存率이 감소하였다(Fig. 1).

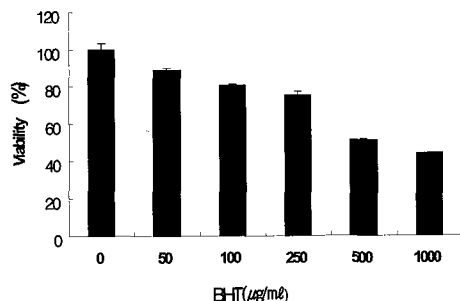


Fig. 1. BHT decreased the viability of LAN5 cells in a dose-dependent manner. LAN5 cells were treated with various concentrations (from 50 to 1000 µg/ml) of H2O extract of BHT for 24 hr. Cell viability was determined by MTT assay. Results represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiment. (BHT: Bujeonghangam-tang)

2. 扶正抗癌湯 抽出物에 의한 LAN5 細胞 죽음의 성격 규명

扶正抗癌湯에 의한 LAN5의 세포사멸이 세포고사에 의한 것인지 여부를 관찰하고자 Hoechst 33342를 이용하여 LAN5 세포를 염색하였다. LAN5 세포에 500 µg/ml 扶正抗癌湯을 24시간 처리한 후, Hoechst 33342 시약으로 細胞의 核을 염색하여 형광 현미경으로 관찰하였다. 정상 대조군 LAN5의 核은 둥글고 균질한 형광세기로 관찰되었으나, 500 µg/ml 扶正抗癌湯을 처리한 실험군에서는 세포고사 현상의 전형적인 특징인 核의 분절현상과 염색체 응축현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).



Fig. 2. BHT induced the nuclear fragmentation of LAN5 cells. Cells were treated with BHT(500 µM) for 24 hr. The nuclei of cells was observed with Hoechst dye under fluorescent microscope. (A) control cells, (B) cells were treated with BHT(500 µM) for 24 hr. (BHT: Bujeonghangam-tang)

3. 扶正抗癌湯 抽出物이 caspase protease의 활성화에 미치는 영향

扶正抗癌湯 추출물에 의한 LAN5 세포의 고사 현상이 세포고사 신호전달의 중요한 분자인 caspase family cysteine protease 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 procaspase-8 단백질 발현 정도를 조사하였다. 扶正抗癌湯 추출물 처리 시 시간이 경과함에 따라 procaspase-8 protease의 분해가 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 initiator caspase인 caspase -8의 pro-form이 절단되어 활성화되고 이는 caspase -3 protease의 활성을 유도했음을 시사하였다.

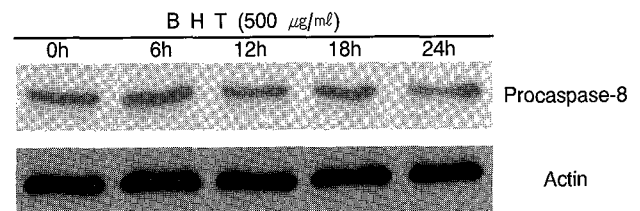


Fig. 3. BHT cleaved procaspase-8 protease in LAN5 cells. Cells were treated with 500 µg/ml BHT for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.0 % SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-procaspase-8 protease antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL. (BHT: Bujeonghangam-tang)

4. 扶正抗癌湯 抽出物에 의한 LAN5 細胞株 고사 시 Bid의 절단에 미치는 影響

扶正抗癌湯 추출물에 의한 세포고사 유도시 활성화된 caspase-8 protease에 의해 절단되어 미토콘드리아로 이동, 세포고사를 촉진하는 것으로 알려진 Bid 단백질의 변화를 LAN5 細胞株에서 조사하였다. 扶正抗癌湯 500 µg/ml을 처리한 후 시간에 따라 LAN5 세포를 채취, 분쇄한 세포부유액의 Bid 분자를 anti-Bid 항체를 이용한 Western blot을 시행하였다(Fig. 4). 扶正抗癌湯 추출물 처리시 시간이 경과함에 따라 Bid의 비활성 전구물질의 절단이 관찰되었다. 이러한 결과는 扶正抗癌湯(500 µg/ml)

ml)의 처리에 의해 활성화된 caspase-8 protease에 의해 세포내 Bid 단백질의 절단이 초래되어 LAN5 세포의 세포고사에 기여하였다고 판단되었다.

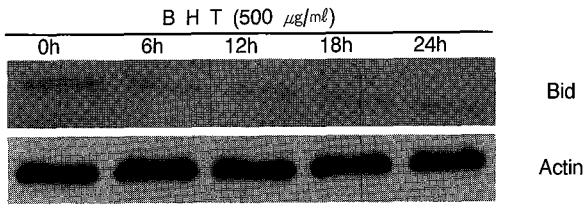


Fig. 4. BHT cleaved Bid in LAN5 cells. Cells were treated with 500 g/ml BHT for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.0 % SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane an immunoblotted with anti-Bid antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL. (BHT: Bujeonghangam-tang)

5. 扶正抗癌湯 抽出物이 LAN5 細胞株에서 미토콘드리아 단백질인 Bid, Bax 및 Bcl-XL 단백질 발현에 미치는 영향

세포고사를 조절하는 관여하는 중요한 유전자 산물이 Bcl-2 단백질군이다. 본 실험에서는 扶正抗癌湯 추출물에 의한 LAN5 세포고사에 있어 Bcl-2 단백질군 중 pro-apoptotic 기능을 하는 Bax 와 anti-apoptotic 기능을 하는 Bcl-XL 단백질의 발현 변화를 조사하였다. LAN5세포는 500 μg/ml 扶正抗癌湯을 시간별로 처리한 후, 세포를 포집하여 파쇄액을 얻어 Bax 및 Bcl-XL 단백질에 대한 항체를 사용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 세포사멸 과정에서 扶正抗癌湯 추출물이 시간 의존적으로 Bax 단백질의 발현을 증가시키며, Bcl-XL 단백질 발현은 감소시키고 있음을 확인하였다(Fig. 5).

이러한 결과로 扶正抗癌湯이 Bcl-2 단백질군 중 pro-apoptotic한 기능을 갖는 Bax 단백질의 기능을 활성화시키고, anti-apoptotic protein인 Bcl-XL 단백질의 발현을 감소시켜 LAN5 세포고사를 유도하였으리라 판단된다.

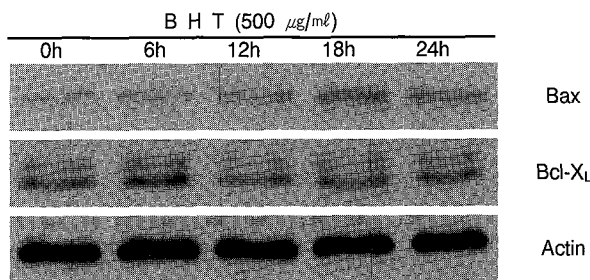


Fig. 5. BHT led to the increase of Bax expression, and decreased the expression of Bcl-XL in LAN5 cells. Cells were treated with 500 μg/ml BHT for various periods. The equal amounts of protein from lysates were subjected on 12.0 % SDS-PAGE. The membrane was immunoblotted with Bax and Bcl-XL antibody. The immunoreactive bands were visualized by ECL kit. (BHT: Bujeonghangam-tang)

고찰

癌이라 일컬어지는 惡性腫瘍은 지금까지 알려진 疾患들 중 높은 死亡 比率을 차지하는 疾患으로 宋代 《衛濟寶書》에서 “一日癌... 五日癰”이라고 최초로 언급된<sup>2)</sup> 이래 그 명칭은 體內에 발현한 腫塊의 모양, 表面高低不平, 質의 堅硬 등에 따라 다르

게 지칭되어 왔으며 積聚 癥瘕 癰腫 疔瘡 反胃 癰癧 石瘰 石疔 등이 암의 범주에 해당된다<sup>26,27)</sup>.

韓醫學으로 癌은 氣滯血瘀 痰結濕聚 熱毒內蘊 經絡瘀阻 등으로 發生하는데 이 중 氣滯血瘀는 ‘氣塞不通 血壅不流’로 發生하고, 痰結濕聚는 ‘癥瘕者 非陰陽正氣所結腫 乃五臟瘀血濁氣 痰滯而成’이라 하여 痰核 癰癧 結核 등의 病症이 發生하며, 熱毒內蘊은 ‘瘡瘍者 火之屬’이라 하여 血이 熱毒을 만나 凝集되고 津液이 熱毒을 만나 痰이 형성되어 氣血痰濁이 經絡과 臟腑를 壅阻시켜 發生되며, 經絡瘀阻는 經絡氣血運行이 阻滯되어 經氣가 鬱滯되거나 不足하여 腫瘍이 發生되는 機轉을 말한 것으로, 이외에도 ‘脾腎不足及虛弱失調的人 多有積聚之病’이라 하여 正氣가 虛弱해지면 저항력이 저하되어 腫瘍이 발생한다고 하였다<sup>6,7,9)</sup>.

西洋醫學으로 癌은 세포 성장과 행동양식의 일환이므로 궁극적 원인은 세포 및 세포이하 수준에서 정의 된다. 그러나 역학적인 癌 경향의 연구로 癌의 근본적인 기원을 알아내는데 큰 도움을 받을 수 있다. 癌의 原因은 크게 內的 要因, 生活樣式과 관련된 要因, 外的 要因으로 나누어 진다. 內的 要因은 지리학·인종적 요인, 나이, 유전, 후천적 전종양성질환을 들 수 있으며, 生活樣式과 관련된 要因은 흡연, 음주, 식이, 직업적 要因을 들 수 있다. 또한 外的 要因은 화학적 발암원, 바이러스, 이온화 방사선과 자외선, 약물 등을 그 要因으로 꼽을 수 있다<sup>9)</sup>.

이러한 癌을 치료하기 위한 韓醫學的 方法으로 가장 기본이 되는 것이 扶正과 祛邪이다. 扶正은 正氣를 扶助하는 藥物과 治療方法을 사용하는 것으로 補法을 말하며, 正氣가 虛한 患者에게 적용된다. 祛邪는 攻逐毒邪하는 藥物과 治療方法을 사용하는 것으로 瀉法을 말하며 邪氣가 盛한 腫瘍 患者에게 적용된다. 扶正의 治法으로는 養血, 助陽, 滋陰, 益氣, 健脾, 潤肺, 補腎 등이 사용되고 祛邪의 治法으로는 清熱, 解毒, 活血, 化痰, 軟堅, 散結, 逐水, 化癥, 消導, 疏肝, 瀉肺 등이 사용되나, 扶正과 祛邪는 상호보완의 관계에 있게 된다. 扶正은 正氣를 강화하여 면역력을 강화시키고 抗毒, 抗癌을 도와 祛邪를 유리하게 하며, 祛邪는 암세포를 죽이거나 암세포의 성장을 억제해서 正氣의 보존과 회복을 유리하게 하는 것이다. 결국 扶正과 祛邪의 方法은 동시에 행해져야 하며 상호 결합하여 治療했을 때 단순히 扶正의 方法이나 祛邪의 方法만을 사용하였을 때 보다 더욱 큰 효과가 나타나게 된다<sup>9)</sup>.

西洋醫學에서는 이러한 癌을 治療하기 위한 方法으로 手術療法 放射線療法 化學療法 免疫療法와 遺傳子療法을 이용한 治療를 시행하는데<sup>10)</sup> 手術療法과 放射線療法은 局部的 治療로 早期癌에는 효과적이거나 轉移癌일 경우 효과적이지 못하며, 化學療法은 微細 癌細胞를 제거하는데 效果的이나 個體의 저항력을 떨어뜨리는 부작용이 있으며 免疫療法은 補助的 요법으로 현재 研究가 진행 중이다<sup>12)</sup>. 이러한 方法들 이외에 요즘 주목을 받고 있는 方法이 세포고사를 이용한 抗癌治療이다.

세포고사(apoptosis)는 多細胞 生命體에서 정상적인 器官의 發達과 組織의 恒常性 維持에 必須的인 生理現狀의 하나인 細胞의 計劃된 죽음 (programmed cell death)을 말하는 것으로, 세포고사는 壞死 (necrosis)와는 다른 獨特한 形態와 生化學的인 特徵을 同伴하는 遺傳子 活性에 의하여 調節받는 生理過程이다. 一般

므로 세포가 深刻한 傷害를 입었을 경우에 나타나는 壞死는 細胞膜의 破壞, 細胞의 膨脹(swelling), 溶解(lysis)를 동반하는 것과는 달리, 반면에 세포고사 현상은 빠른 細胞脫水現狀에 의한 細胞의 收縮, 細胞膜의 氣泡化 現狀(blebbing), 細胞質內의 칼슘(calcium) 濃度の 增加, chromatin의 凝縮, endonuclease의 活性化에 의한 DNA의 사다리 模様の 分節(ladder pattern of DNA fragmentation) 形成, transglutaminase의 活性化 및 核의 切斷과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 形成을 同伴한다. 최근에 잠정적으로 유해한 細胞나 노쇠한 細胞의 예정사(programmed cell death), 즉 세포고사의 회피가 癌을 포함하는 각종 疾病의 發病原因으로 해석하는 견해가 대두되고 있다<sup>28-30</sup>.

세포고사 신호전달 機轉으로는 크게 Fas/Fas ligand를 경유하는 機轉과 미토콘드리아를 경유하는 機轉이 있다. Fas와 Fas ligand와 같은 TNF family에 속하는 세포 표면의 수용체를 경유하는 세포고사의 신호전달은 죽음 수용체 death receptor와 ligand의 발현을 증가시킴으로써 세포고사를 유도한다. Fas ligand의 발현은 autocrine 또는 paracrine 형태로 death receptor 기능을 갖는 Fas에 결합하여<sup>31</sup>, death receptor pathway를 활성화시킨다<sup>32</sup>. 세포고사를 유도하는 다른 경로로 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출을 조절하는 Bcl-2 단백질군이 관여하는 경로가 있다. Bcl-2 단백질군은 크게 두 가지로 구분할 수 있는데, 세포고사를 억제하는 작용을 갖는 Bcl-2는 voltage dependent ion channel의 열림(opening)을 촉진하는 Bax, Bak과 같은 pro-apoptotic family의 기능을 조절하여 cytochrome c의 방출을 저해한다<sup>33,34</sup>. Bcl-XL은 미토콘드리아의 내막 공간에 수 소이온(hydrogen ion)의 축적을 조절하는 구멍(pore)를 형성하여 미토콘드리아의 전지적 항상성(electrical homeostasis)을 조절한다는 보고가 있으며<sup>35,37</sup>, Bcl-2와 같이 Bax와 같은 미토콘드리아에 손상을 줄 수 있는 단백질의 기능을 저해함으로써 세포고사를 억제하는 기능을 갖고 있다. 그러나 Bax, Bak, Bad 그리고 Bcl-Xs같은 세포고사 촉진 단백질은 미토콘드리아로 이동되어 cytochrome c를 방출할 수 있는 pore를 형성하기도 한다. 특히 Bid 단백질은 활성화된 caspase-8에 의해 절단되어 미토콘드리아로 이동, 세포고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>38-40</sup>.

Caspase계 cysteine protease는 Fas를 경유하는 신호전달과정과 미토콘드리아를 경유하는 신호전달의 하방에 위치하여 세포고사에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>41</sup>. caspase는 정상적으로 세포 내에 불활성화효소 형태로 존재하다가 세포고사 자극에 의해 활성화되며, 다른 caspases 등 여러 표적 단백질의 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달활성을 조절한다<sup>42-44</sup>.

최근 研究에 의하면 양방에서 흔히 사용되는 많은 抗癌劑들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용 機轉에 관계없이 다양한 세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀져 있고 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide경로, 즉 발현 초기유전자(early immediate gene)발현, 단백질 분해효소

caspase family cysteine protease 및 DNA 분절을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고 되고 있다. 이러한 이유로 抗癌 治療의 효용성은 세포고사 機轉의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 腫瘍 치유의 관점에서 종양세포의 세포고사와 관련된 세포고사 유도인자, 신호전달경로 그리고 관련 유전자들과 단백질들을 研究하여 抗癌 機轉을 研究하고자 하는 많은 研究가 이루어지고 있다<sup>31,32,45,46</sup>.

본 研究에서 사용한 扶正抗癌湯에 대해 金은 抗腫瘍效果에 관한 실험적 연구를 진행하여 그 효과를 입증하였고<sup>22</sup>, 尹은 마우스의 體液性 및 細胞性 免疫反應과 食食細胞機能에 미치는 영향을 研究하였으며<sup>23</sup>, 林은 扶正抗癌湯이 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 영향을 研究하였고<sup>24</sup>, 崔는 抗癌作用 및 免疫機能에 미치는 영향을 研究한 바 있어<sup>25</sup> 人體의 免疫機能과 관련되어 扶正抗癌湯의 抗癌的 效果가 실험적으로 입증되었다. 이는 韓醫學의 扶正의 方法으로써의 扶正抗癌湯의 機轉과 效果를 밝힌 것으로 扶正과 祛邪의 두 方面에서 治療를 도모할 수 있는 扶正抗癌湯의 일면만을 밝힌 것이다. 이에 著者는 扶正抗癌湯이 지닌 또 다른 면모인 祛邪의 部分을 세포 고사의 관점과 연관지어 본 연구를 진행하였다.

扶正抗癌湯은 黃芪 人蔘 白朮 陳皮 半夏 山查 砂仁 當歸 女貞子 何首烏 破故紙 龍葵 榆根白皮 半枝蓮 茵陳 甘草 三稜 蓬朮 白花蛇舌草로 구성된 方劑로 健脾 益氣 祛痰 活血 補腎 利肝 抗癌의 效果가 있는 藥物로 구성되어 있으며 각각 藥物의 效能 및 效果는 다음과 같다.

黃芪는 補氣升陽 固表止汗 托毒排膿 利水退腫하는 效能이 있으며 腫瘍환자의 手術 후 放射線治療와 化學治療 기간 중이나 회복기에 사용하며, 體虛氣虧한 환자의 扶正培本 健脾益氣의 主藥이 된다<sup>21,47</sup>. 人蔘은 大補元氣 補脾益氣 生津 寧神益智하는 效能이 있으며 각종 腫瘍수술 후 회복기나 放射線治療와 化學治療 기간 동안에 正氣虧虛할 때 사용한다<sup>21,47</sup>. 白朮은 補脾益氣 燥濕利水 固表止汗 安胎하는 效能이 있으며 腫瘍환자의 手術 후에 氣虛 脾胃虛弱에 사용되거나 放射線治療와 化學藥物治療로 인한 소화기 부작용에 사용한다<sup>21,47</sup>. 陳皮는 理氣健脾 燥濕化痰하는 效能이 있으며 각종 腫瘍에 대하여 일정한 緩解작용이 있어서 胃癌 原發性肝癌 骨肉腫 子宮頸部癌 등에 사용된다<sup>21,47</sup>. 半夏는 降逆止嘔 燥濕祛痰 消痞散結하는 效能이 있으며 子宮頸部癌과 그 前病變에 效果가 있으며 食道癌 胃癌 鼻咽癌 皮膚癌 등에 사용된다<sup>21,47</sup>. 女貞子는 滋陰 補肝腎 明目하는 效能이 있으며 放射線治療와 化學藥物治療로 인한 白血球 減少症에 사용되며 腎癌 骨癌 腦腫瘍 白血病 등에 사용된다<sup>21,47</sup>. 何首烏는 補肝腎 益精血 通便 解毒의 效能이 있으며 免疫增進效果가 있어서 肺癌 骨癌 甲狀腺癌 白血病 등에 사용된다<sup>21,47</sup>. 破故紙는 溫腎壯陽 散寒止痛하는 效能이 있으며 骨肉腫 腦腫瘍 腎癌 骨轉移癌의 治療에 사용하며 放射線治療와 化學藥物治療 후에 白血球가 減少된 경우 사용한다<sup>21,47</sup>. 龍葵는 清熱解毒 散結消腫 利尿하는 效能이 있으며 肺癌 胃癌 肝癌 膀胱癌 그리고 絨毛膜上皮癌 등의 각종 癌腫에 사용되며 癌性 胸水나 腹水에도 效果가 있다<sup>21,47</sup>. 榆根白皮는 利水通淋 消腫하는 效能이 있으며 肝癌 腸癌 子宮頸部癌 등

에 사용된다<sup>21,47</sup>. 甘草는 補脾益氣 清熱解毒 潤肺止咳 調和諸藥 하는 效能이 있으며 최근 胃癌의 豫防과 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>. 山楂는 消食肉積 活血散瘀하는 效能이 있으며 최근 食道癌 胃癌 直腸癌 骨癌 乳腺癌 등의 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>. 砂仁은 化濕健脾 溫脾止瀉 理氣安胎하는 效能이 있으며 肺癌 鼻咽癌 食道癌 등의 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>. 當歸는 補血活血 調經止痛 潤腸通便하는 效能이 있으며 急性白血病 乳腺癌 肝癌 등의 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>. 半枝蓮은 消腫解毒 抗癌하는 效能이 있으며 肝癌 鼻咽癌 卵巢癌 多發性神經纖維腫 胃癌 등의 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>. 茵陳은 清熱利濕 退黃하는 效能이 있으며 肝癌 膽囊癌 등의 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>. 三稜은 破氣祛瘀 消積止痛하는 效能이 있으며 胃癌 食道癌 骨肉腫 肝癌 등의 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>. 蓬朮은 行氣破血 消積止痛하는 效能이 있으며 甲状腺腫 子宮肉腫 胃癌 膀胱癌 食道癌 肝癌 등의 治療에 사용된다<sup>21,47</sup>. 白花蛇舌草는 消腫解毒 清熱利濕하는 效能이 있으며 胃癌 食道癌 直腸癌 肝癌 등의 治療에 사용되고 있다<sup>21,47</sup>.

본 研究에서는 인간 신경모세포종 細胞株인 LAN5 를 사용하여, 扶正抗癌湯 추출물에 의해 LAN5 細胞株의 세포고사 여부를 밝히고, 그 신호전달과정에 관여하는 단백질들의 발현 변화를 조사함으로써 扶正抗癌湯의 抗癌 효과에 대한 분자생물학적 機轉의 이해를 유추하고자 하였다. 먼저 扶正抗癌湯 추출물을 LAN5 세포에 농도별로 처리한 결과, 농도 의존적으로 세포독성 효과를 나타냈으며(Fig. 1), 그 機轉이 세포고사 機轉에 의해서 매개됨이 핵의 분절 현상으로 확인되었다(Fig. 2).

扶正抗癌湯에 의한 LAN5 細胞株의 세포죽음이 세포고사 신호전달계를 활성화시키는지를 확인하기 위하여 여러 실험을 수행하였다. 먼저 세포고사의 주요 작용 機轉의 하나인 caspase family cysteine protease 의 활성화 여부를 조사하였다. 1986년 Eillis 및 Horvitz에 의하여 nematoid *C. elegans*에서 ced-3 및 ced-4의 mutation이 세포고사를 억제한다는 보고 이래로 ced-3의 mammalian homologue인 ICE가 clone되었으며 이는 후에 caspase-3 protease로 명명되었고<sup>43</sup>, 이후에 약 14종류의 caspase family cysteine protease의 subfamily가 밝혀져 있으며 이들 유전자는 cysteine기만을 선택적으로 절단하는 단백질분해효소(protease)를 coding하고 있다. Caspase-3 protease는 세포질 내에서 proenzyme 형태로 존재하고 있다가 caspase-8 및 9 같은 initiator caspase 에 의하여 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환된다.

본 研究에서는 扶正抗癌湯 처리시 세포고사가 유도되는 LAN5 細胞株에서 initiator caspase인 caspase-8 protease의 활성화 여부와 이에 의한 Bid의 절단 여부를 조사하였다. 본 研究에서도 caspase -8의 pro-form이 절단되어 활성화되는 것으로부터(Fig. 3) 세포고사가 caspase-3 활성화와 관련이 있음을 유추할 수 있었다. 또한 扶正抗癌湯 처리 후 시간이 경과함에 따라 caspase-8 protease에 의한 Bid 단백질의 절단이 나타났는데(Fig. 4), 절단된 Bid는 미토콘드리아로 이동, 세포고사를 촉진하는 데 기여했으리라 추정된다.

Bcl-2 단백질군은 다양한 세포고사 유도체에 의한 세포의 죽

음을 억제할 뿐만 아니라 세포의 생존을 촉진하는 단백질이다. 본 研究에서도 Bcl-2 단백질군의 발현양의 변화를 조사하였다(Fig. 5). 扶正抗癌湯 추출물은 LAN5 細胞株의 세포고사 유도에 있어 pro-apoptotic 기능을 하는 Bax 단백질의 발현을 증가시키며, anti-apoptotic 기능을 하는 Bcl-XL 단백질 발현을 감소시켰는데, 이는 扶正抗癌湯이 LAN5 細胞株에서 Bcl-2 단백질군의 발현 조절에 관련되었음을 시사하였다. 이러한 결과로부터 扶正抗癌湯 추출물에 의한 LAN5 細胞株의 사멸은 전형적인 세포고사 機轉에 의한 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 扶正抗癌湯 추출물에 의한 인간 신경모세포종 細胞株LAN5 의 사멸 시 세포고사 機轉을 조사한 바 caspase 계의 활성화와 Bid의 분절, Bax의 발현 증가 및 Bcl-XL 단백질의 발현 감소에 기인함을 시사하고 있다. 이러한 결과를 in vivo 실험동물 모델에 적용하여 효능 검증 실험을 실시한다면, 보다 나은 抗腫瘍 治療劑의 개발에 기여하는 바가 크리라 사료된다.

## 결론

癌治療에 사용되고 있는 扶正抗癌湯의 癌세포에 대한 세포독성 상승효과와 그 세포 고사 機轉을 밝히고자 扶正抗癌湯 추출물을 인간 신경모세포종 細胞株인 LAN5에 처리하여 생존율, 핵 분절 현상, caspase family cysteine protease의 발현, Bid 단백질의 절단, 그리고 세포고사 조절에 관여하는 Bcl-2 단백질군 중 Bax 및 Bcl-XL 단백질의 발현 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

扶正抗癌湯 추출물(500 µg/ml)을 인간 신경모세포종 細胞株 LAN5 에 처리 시 세포독성의 효과를 나타내었다. 扶正抗癌湯 추출물 처리 시 나타나는 세포독성은 핵 분절이 관찰되어 세포고사(apoptosis)에 의한 세포독성을 확인하였다. 扶正抗癌湯 추출물 처리 시 LAN5 細胞株에서 procaspase-8 protease를 활성화 형태로 분해하였다. 扶正抗癌湯 추출물 처리 시 LAN5 細胞株에서 caspase-8 protease 활성화에 의한 세포내 표적인자인 Bid의 절단이 나타났다. 扶正抗癌湯 추출물 처리 시 LAN5 細胞株에서 pro-apoptotic한 기능을 갖는 Bax 단백질의 발현 증가와 anti-apoptotic protein인 Bcl-XL 단백질의 발현 감소가 보였다.

이상의 결과를 종합하면, 扶正抗癌湯 抽出物에 의한 인간 신경모세포종 細胞株 LAN5 의 사멸은 세포고사 機轉에서 caspase 계의 활성화와 Bid의 분절, Bax의 발현 증가 및 Bcl-XL 단백질의 발현 감소에 기인함을 알 수 있었다. 이는 扶正抗癌湯의 祛邪法의 治療 측면이 세포고사와 관련되어 발현됨을 의미하는 것으로 이를 동물 실험과 임상 실험을 통하여 그 효능을 입증한다면 扶正抗癌湯을 이용한 抗腫瘍 劑 개발에 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 서울대학교 의과대학. 腫瘍學. 서울대학교 출판부, pp 1-3,

- 23-24, 26-43, 137-143, 225-234, 1992.
2. 余桂清. 歷代中醫腫瘤案論選粹. 北京, 北京出版社, pp 1-2, 1988.
  3. 王洪圖. 黃帝內經素問. 春秋出版社, p 71, 237, 271, 1988.
  4. 金定濟. 東醫臨床要覽. 서울, 書苑堂, pp 253-254, 1981.
  5. 上海中醫學院. 中醫外科學. 香港, 商務印書館, pp 301-307, 239-164, 1994.
  6. 郎偉君. 抗癌中藥一千方. 北京, 中國醫藥技術出版社, pp 5-17, 1994.
  7. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울, 杏林出版社, pp 9, 19-100, 1995.
  8. 大韓病理學會 編. 病理學. 서울, 高文社, p 225, 1990.
  9. 공격덕, 이상욱, 한병훈, 서승연, 허만하, 박병채. 진행성 위암에 대한 5-FU, Adriamycin 및 Cisplatin(FAC) 병용화학요법의 치료효과. 대한암학회지 22: 144, 1990.
  10. KURT, J. ISSELBACHER 外. HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE Thirteenth Edition Volume 2, United States of America, Monotype Composition Company, pp 1814-1815, 1826-1840, 1817-1821, 1994.
  11. 李家康. 中醫腫瘤防治大全. 中國, 科學技術文獻出版社, pp 10-47, 76-103, 142-150, 1994.
  12. 문구. 정병학, 김병주 편저. 암 동서의 결합치료. 권1, pp. 72-92, 93-98, 256-257, 1999.
  13. Fadeel, B., Henter, J.I., Orrenius, S. Apoptosis required for maintenance of homeostasis: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by too little cell death Lakartidningen. 97:1395-1400, 1402, 2000.
  14. Mesner, P., Budihardjo, I., Kaufmann, S.H. Chemotherapy-induced apoptosis. Adv. Pharmacol. 41:461, 1997.
  15. Dai, J., Weinberg, S.R., 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.
  16. Huang, S., Huang, C.F., Lee, T. Induction of mitosis-mediated apoptosis by sodium arsenite in HeLa S3 cells. Biochem Pharmacol. 60:771-780. 2000.
  17. Desagher, S., Martinou, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis, Trends Cell Biol, 10(9):369-377, 2000.
  18. Sasaki, S. Antitumor agents from medical plants, Jpn. Kokai Tokyo koho Jp, pp 58-118, 1983.
  19. Tang Defang, Hao Yohung, Liu Zuoya, Miao Shulin, Wei Hua, Wu Jian. Constituents of the essential oil from rhizome of *Actactylodes macrocephala* produced in pingjiang (China) and their antitumor effects, Yaoxue Tongbao, 19(9):555-558. 1984.
  20. 노훈정. 消積補中丸의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究. 익산, 원광대학교 대학원, 1995.
  21. 신민교. 臨床本草學. 서울, 永林社, pp 172-173, 179-183, 188-191, 194-196, 211-212, 236-239, 255-260, 279-280, 469-472, 479-480, 480-481, 567-568, 569-570, 576-577, 585-588, 593-594, 668-669, 688-689, 819-821, 1997.
  22. 金柄住. 扶正抗癌湯의 抗腫瘍효과에 관한 實驗적 研究. 益山, 원광대학교 대학원, 1997.
  23. 尹泳大. 扶正抗癌湯이 마우스의 체액성 및 세포성 면역반응과 탐식세포기능에 미치는 영향. 익산, 원광대학교 대학원, 1997.
  24. 林美良. 扶正抗癌湯이 抗腫瘍 면역반응에 미치는 영향. 익산, 원광대학교 대학원, 1997.
  25. 崔云榮. 扶正抗癌湯이 抗癌작용 및 면역기능에 미치는 영향. 익산, 원광대학교 1999.
  26. 金完熙, 崔達永. 臍腑辨證論治. 서울, 成輔社, pp 140-142, 168-170, 281-284, 1985.
  27. 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.
  28. Searle, J., Kerr, J.F.R., Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, Pathol. Annu, 17:229-259, 1982.
  29. Klaus, S.O., Davide, F. Apoptosis signal by death receptors, Eur. J. Biochem, 254:439-459. 1998.
  30. 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.
  31. Scott, H.K., William, C.E. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Experimental Cell Research, 256:42-49, 2000.
  32. Freisen, C., Herr, I., Krammer, P.H., Debatin, K.M. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in Leukemia cells. Nature Med. 2: 574-577, 1996.
  33. Green, D.R., Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. Science, 281:1309-1312, 1998.
  34. Yang, J., Lui, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: realease of cytochrome c from mitochondria blocked. Science, 275:1129-1132, 1997.
  35. Kim, C.N., Wang, X., Huang, A.M., Liu, I., Fang, G., Bhalla, K. Overexpression of Bcl-xL inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. Cancer Res, 57:3115, 1997.
  36. Kharbanda, S. et al. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome c accumulation in DNA damage-induced apoptosis. Proc. Natl Acad. Sci, USA, 94:6939-6942, 1997.
  37. Mattew, G., Vander Heiden, Navdeep, S.C., Edward, K.W., Paul, T.S. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria, 91:627-637, 1997.
  38. Shigeomi S., Masashi N., Yoshihide T. : Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, Nature 399:483-487, 1999.
  39. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. : Bcl-2 family proteins

- regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, *Nature* 399:411-412, 1999.
40. Adams J.M., Cory S. : The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* 281:1322-1326, 1998.
41. Kluck, R.M., Martin, S.J., Hoffman, B.M., Zhou, J.S., Green, D.R., Newmeyer, D.D. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role on a *Xenopus* cell-free apoptosis system, 1997.
42. Talanian, R.V., et al. Substrate specificities of caspase family protease, *J. Biol. Chem.*, 272:9677-9682, 1997.
43. Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W., Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like protease during Fas-mediated apoptosis, *Nature* 380:723-726. 1996.
44. Widmann, C., Gibson, S. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273(12):7141-7147, 1998.
45. Mesner, P., Budihardjo, I., Kaufmann, S.H. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 41:461, 1997.
46. Thomson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462, 1995.
47. 劑春安. 抗癌中草藥大辭典. 中國, 湖北科學技術出版社, pp 14-23, 33-35, 80-84, 115-119, 260-265, 294-297, 340-344, 367-371, 392-398, 398-401, 440-447, 538-543, 565-570, 704-708, 721-724, 817-820, 903-908, 1102-1104, 1994.