대한예방한의학회지 제17권 제2호(2013년 8월)
Kor. J. Oriental Preventive Medical Society 2013 ; 17(2) : 169-178

A549세포에 대한 목향추출물의 ROS 매개 세포독성

이영준[1), 2)], 구세광[2), 3)], 강수진[1), 2)*]
[1)] 대구한의대학교 한의과대학 예방의학교실, [2)] 대구한의대학교 방제과학글로벌연구센터
[3)] 대구한의대학교 한의과대학 해부조직학교실

Saussurea Lappa Radix-induced cytotoxicity via ROS generation in A549 lung cancer cells

Young-Joon Lee[1), 2)], Sae-Kwang Ku[2), 3)] & Su-Jin Kang[1), 2)*]
[1)] Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
[2)] Medical Research Center for Globalization of Herbal Formulation, Daegu Haany University
[3)] Department of Anatomy and Histology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

Abstract

Objectives : Many cancers acquired resistance to chemotherapy, thus limiting its anticancer efficacy. It is known that Glutathione (GSH) is related to the development of drug resistance. The expression of GSH synthesizing glutamylcysteine ligase (GCL) was controlled by nuclear factor-E2-related factor (Nrf2). Previous studies showed that pharmacological depletion of GSH results in ROS increase, apoptotic response, and sensitization to oxidizing stimuli. In the current study, we examined *Saussurea Lappa* (SL) have the inhibitory effect on Nrf2 activity using human lung cancer A549 cells overexpressing Nrf2.

Methods : Cell viability of A549 cells on SL treatment was determined by MTT assay. To detect the apoptosis in SL-treated A549 cells, sub-G1 population was measured by flow cytometry analysis (FACS). The level ROS was determined by FACS and fluorescence microscopy. To investigate whether SL have effect the suppression on Nrf2, we performed western blotting analysis. The GSH content was measured since GSH plays an important role in response to oxidative stress and was regulated by Nrf2.

Results : A549 cells treated with an SL extract showed a substantial decrease in cell viability, along with a concomitant increase in apoptosis compared to untreated cells. Treatment of the SL extract led to increased Reactive oxygen species (ROS) production and a suppression of Nrf2. In addition, the

· 접수 : 2013년 8월 1일 · 수정접수 : 2013년 8월 24일 · 채택 : 2013년 8월 28일
* 교신저자 : 강수진, 대구한의대학교 한의과대학 예방의학교실, 경상북도 경산시 한의대로 1, 712-715
전화 : 053-819-1299, 팩스 : 053-819-1576, 전자우편 : vegonia1@hanmail.net

antioxidant NAC attenuated SL-induced ROS generation, Nrf2 inhibition, and apoptosis. Taken together, these data show that the SL extract induced the production of ROS, and the inhibition of Nrf2, consequently resulting in A549 cell death.

Conclusions : These results suggest that SL might be an effective agent to enhance anticancer drug sensitivity via Nrf2 inhibition.

Key words : *Saussurea Lappa* Radix, Nrf2, ROS, GSH, A549

I. 서 론

항암약물 치료에 있어서 빈번이 발생하는 항암제 내성은 아직도 해결하기 어려운 문제로 남아 있다. 특히 항암제 대다수에 해당되는 산화적 스트레스 유발 관련 물질인 알킬화성 항암제는 암세포의 약물에 대한 내성이 치료 실패의 주된 요인이다. 이러한 항암 약물 내성의 설명 가능한 분자적 기전으로는, 해독화시키는 효소의 증가가 산화적 스트레스로 암세포를 공격하는 기전을 공유하여 항암제의 해독을 용이하게 함으로써 약물에 대한 세포의 민감성을 억제시킨다는 것이다[1), 2)]. 따라서, 최근에는 약물 내성을 극복하기 위해 세포의 민감성을 효과적으로 증진시키고자 하는 치료방법들이 새롭게 시도되고 있다.

Erythroid NF-E2 계열의 bZIP 전사인자인 Nrf2는 여러종류의 항산화 효소, 해독화 효소 및 thiol 단백질들의 발현을 조절하는데 기여한다. Nrf2 knockout 마우스를 이용한 in vivo 연구를 통해 Nrf2가 항산화 단백질 발현을 조절하는데 관여함이 입증되었다. Nrf2 knockout 마우스에서는 해독화 효소(glutathione S-transferase, NAD(P)H: quinone oxidoreductase)와 같은 항산화 효소, thiol 단백질군(thioredoxin, peroxiredoxin), Glutathione (GSH) 합성 및 유지 관련 효소(GCL) 및 catalase 등의 유도력이 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다[3), 4)]. 정상세포에서의 Nrf2의 역할은 산화적 스트레스 상황에서 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. 반면, 정상세포에 비해 비교적 산화적 스트레스가 높은 상태인 암세포에서는 Nrf2 경로는 생존을 돕고 세포독성 유발 함암제 노출에 대해 그 하위 해독화 시스템을 촉진함으로써 항암제 내성에 관여할 가능성이 높다[4)-6)].

Keap1은 Nrf2 전사인자의 기능을 조절하는 억제 단백질로서, 세포질에서 Nrf2와 결합한 상태로 존재하여 핵내로의 이동을 막고 동시에 proteasome 시스템에 의한 분해를 촉진한다. 최근 사람의 폐암세포주에서 Keap1 유전자 돌연변이의 빈도가 높다는 사실이 확인되었다. 이들 돌연변이는 Keap1 단백질의 Nrf2에 대한 억제적 기능을 약화시켜 Nrf2의 핵 내 축적을 가져와 Nrf2의 과발현 상태로 이끄는 것으로 제시되고 있다[7), 8)]. 따라서, 최근 Nrf2의 억제하는 방법을 통해 폐암의 효율적으로 치료하고자 하는 접근이 고려되고 있다.

木香은 *Saussurea lappa* Clarke의 뿌리를 건조한 것으로 한의학에서 通氣止痛, 止瀉止痢하는 작용이 있어 腹痛과 後重을 치료하는 약재로 사용되고 있다[9)]. 木香의 주요 유효성분은 sesquiterpenes, polyene alcohols, triterpenes, lignans, alkaloids와 tannins으로서, costunolide는 sesquiterpene lactone의 일종으로 다양한 항염증효과, 항암효과를 보이고 있다. costunolide는 활성산소종(Reactive oxygen species ; ROS)

을 유발시켜 HL-60 세포에서 세포독성을 유발한다고 보고되었다[10].

본 연구에서는 Nrf2를 조절 단백질인 keap1인 돌연변이로 인해 Nrf2가 과발현 상태인 폐암 세포주, A549 세포에서 목향의 세포독성 효과를 관찰하였다. 목향에 의해 유도된 세포독성은 ROS가 중심적 역할을 하는 것으로 확인되었다. 또한 목향으로 인해 Nrf2가 감소됨으로써 세포독성이 증가할 수 있었던 것으로 사료된다.

II. 연구방법

1. 목향 추출 및 UPLC diagram 분석

목향(*Saussureae radix*, 옴니허브, 영천)은 파쇄한 후 에탄올을 사용하여 추출하였다. 추출방법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 목향분말 200g을 에탄올 1ℓ에 혼합시켜 72시간 동안 추출한 후 여과지(Whatman, No.2)로 여과하였다. 그 다음으로 55±2℃에서 회전 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축하고 초저온냉동고(Nihon freezer, Japan)에서 동결한 후 동결건조기(Labconco, USA)에서 건조하였다. 목향의 최종 수율은 8.43%이었으며 냉장보관 후 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. 목향 추출물내의 costunolide 함량 분석은 AcQUITY UPLCTM System (Waters, UK)으로 분석하여 179.17ppm의 농도로 함유된 것을 확인 후 사용하였다.

2. 세포 생존율 측정(MTT assay)

A549 세포를 96 well plate에 4×103개씩 분주하고 vehicle(DMSO) 또는 목향추출물(1, 5, 15, 30㎍/㎖)을 24시간 처리하였다. MTT 용액(2mg/ml)을 각각의 well에 첨가하고 4시간 동안 배양했다. MTT 용액을 제거한 뒤, 100㎕의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 가하고 Tecan microplate reader(Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 목향추출물이 유발한 세포독성이 ROS에 의한 것인지를 확인하기 위해 목향추출물 처리 1시간 전에 ROS 제거능을 가진 N-acetyl-L-cysteine(NAC; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 전 처리한 후 목향추출물을 처리하여 세포생존율을 측정하였다.

3. Apoptosis 측정

A549 세포를 6 well plate에 2×105개씩 분주하고 vehicle(DMSO) 또는 목향추출물(5, 15, 30 ㎍/㎖)을 24시간 처리하였다. 그 다음 trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후 70% EtOH로 세포를 고정시켰다. PI(propidium Iodine)를 30분간 37도에서 반응하여 FACS 분석(FACSCalibur; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)을 이용하여 세포내 DNA를 염색한 후, DNA 양의 변화를 측정하였다.

4. ROS 측정

A549 세포에 vehicle(DMSO) 또는 목향추출물 (15, 30㎍/㎖)을 24시간 처리 후 빛을 차단한 후 20μM DCFDA에 노출시켜 37°C에서 30분간 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 다음 FACS 분석 (FACSCalibur; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)을 통해 측정하였다. 우리는 또다른 방법으로 ROS의 여부를 확인하기 위해, A549 세포에 vehicle (DMSO) 또는 목향추출물(30㎍/㎖)을 24시간 처리한 후 20μM DCFDA에 노출시켜 37°C에서 30분간 반응시킨 후 형광현미경 (Nikon, UV-2A)을 이용하여 통해 관찰하였다.

5. GSH 측정

A549 세포에 vehicle(DMSO) 또는 목향추출

물(15, 30㎍/㎖)을 24시간 처리한 다음, GSH assay kit (Cayman Chem, USA)을 이용하여 Tecan microplate reader(Sunnyvale, CA, USA)을 통해 405-414nm에서 GSH 양을 측정하였다.

6. Western blot 분석

A549 세포를 2x106개씩 100cm 2 plate에 각각 분주하고, 목향추출물(0, 5, 15, 30㎍/㎖)을 24시간 동안 처리하였다. 목향 처리된 세포를 모은 후, RIPA 버퍼를 이용하여 세포를 lysis 시킨 다음 단백질을 Brad-ford assay를 통해서 정량하였다. 정량 된 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 크기 별로 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane에 옮긴 후, PVDF membrane을 blocking용액(5% BSA in TBS within 0.1% tween20)으로 1시간 동안 처리하였다. Blocking 후, Nrf-2(#8882; cell signaling), Lamin B(sc-6216; santa-cruz) 1차 항체를 첨가 한 후 4℃에서 20 rpm으로 overnight 반응시켰다. 이후 3차례 세척한 후, 2차 항체를 첨가한 후 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 3차례 세척 후 ECL 용액을 1분간 충분히 적셔주었다. ECL 용액을 제거한 후, 암실에서 x-ray film에 감광시켰다.

7. 통계처리

윈도우용 SPSS 18.0을 사용하여 분산분석(ANOVA test)을 실시하였으며, 유의한 결과가 나온 경우 Turkey post hoc test를 시행하여 비교분석하였다. 유의수준은 5%로 설정하여 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 목향추출물의 A549 세포에서의 세포독성 효과

목향추출물의 A549 cells에서의 세포독성을 평가하고자 MTT assay를 실시하였다. 24시간

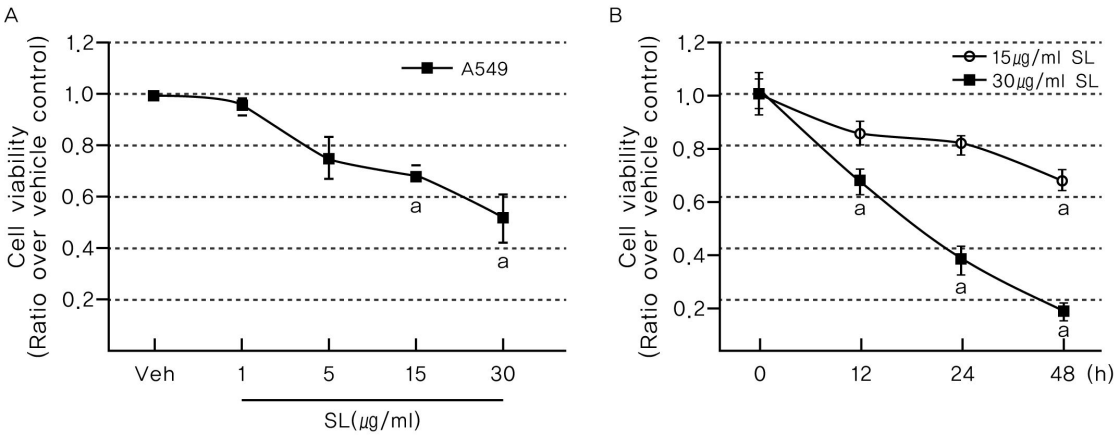

Figure 1. (A) Cell viability was assessed by an MTT assay in A549 cells following treatment with vehicle (Veh; DMSO), or S. *lappa* extract (SL; 1, 5, 15 and 30 μg/mL) for 24 h. (B) Cell survival was monitored in A549 cells following treatment with SL (15 and 30 μg/mL) for 0, 12, 24 or 48 h. All values reported are the means ± SE from three experiments. a $P < 0.05$, relative to the vehicle control.

의 0, 1, 5, 15, 그리고 30 ㎍/㎖ 목향추출물이 처리된 A549 cells에서 세포 생존율이 농도-의존적으로 감소하였다(Fig 1A). 뿐만 아니라, 15 또는 30 ㎍/㎖ 목향추출물의 처리는 시간에 따라 세포 수가 감소되었다(Fig 1B). 이러한 결과는 목향추출물은 A549 cells에서 세포독성을 일으키는 것임을 보여주고 있다.

2. 목향추출물의 세포자멸사(apoptosis) 유도

A549 cells에서 목향추출물로 인한 세포죽음이 apoptosis인지 necrosis인지 확인하기 위해서 FACS 분석을 실시하였다. 그 결과, 목향추출물을 처리하지 않은 군에 비해 목향추출물을 처리한 처리군에서 sub-G1 phase의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 2).

3. ROS에 의한 목향추출물의 세포독성

목향추출물이 처리에 따른 ROS의 유발을 측정한 결과 대조군에 비해서 목향추출물이 처리된 처리군은 ROS가 유의하게 증가되어 목향추출물에 의한 세포독성은 ROS 유발이 중심적인 역할을 할 것이라 추측되었다(Fig 3A). 1mM NAC이 1시간 전처리된 후 목향추출물이 처리된 A549 세포에서의 ROS의 수준은 목향추출물만 처리된 세포에 비해 ROS의 양이 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig 3A, B). 뿐만 아니라, 우리는 세포의 형태변화의 관찰을 통해 NAC 처리가 세포 생존에 영향을 미친 것을 확인하여(Fig 3C), 이를 확인하기 위해, NAC을 전처리한 A549 cell에서 세포독성을 MTT assay를 이용하여 생존율을 확인하였다. 그 결과 NAC 전처리에 의해서 목향추출물의 세포독성이 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 3D). 따라서, 이러한 결과를 종합해 보았을 때 ROS가 목향이 유발하는 세포독성에서 매우 중요한 요인임을 확인할 수 있었다.

4. 목향 매개 GSH 및 Nrf2 감소

A549 cells에 24시간동안 0, 15, 그리고 30 ㎍/㎖ 목향추출물을 처리한 후 GSH의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 목향은 GSH 수준을 통계적으로

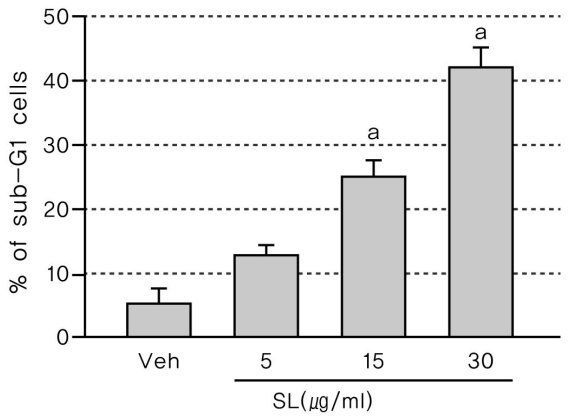

Figure 2. A549 cells were treated with vehicle (Veh; DMSO) or S. *lappa* extract (SL; 5, 15 or 30 μg/mL) for 24 h. The percentage of cells in sub-G1 phase was analyzed by flow cytometry to determine the rate of apoptotic cell death. All values reported are the means ± SE from three experiments. a $P < 0.05$ relative to the vehicle control.

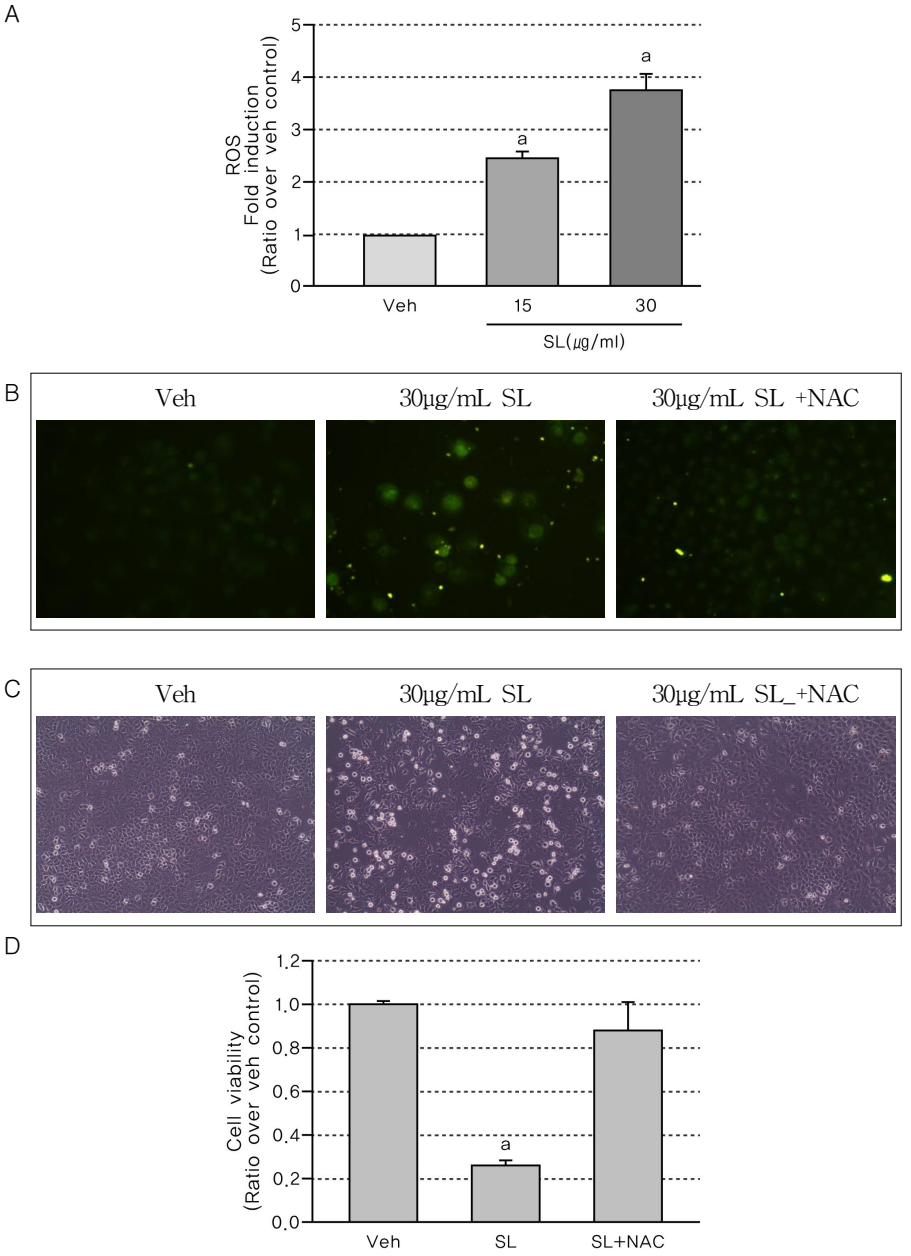

Figure 3. (A) The levels of ROS was analyzed by FACS analysis in A549 cells following treatment with DMSO, or SL 15 and 30 μg/mL for 24 h. (B) The levels of ROS was observed by microscope (Nikon, UV-2A) in A549 cells following treatment with DMSO, or SL 30 μg/mL for 24 h. (C) The morphological changes were observed using fluorescence microscopy. (D) A549 cells were incubated in the presence of 1 mM NAC for 1 h prior to challenge with 30 μg/mL SL for 12 h. All values reported are the means ± SE from three experiments. a $P < 0.05$ relative to the vehicle control.

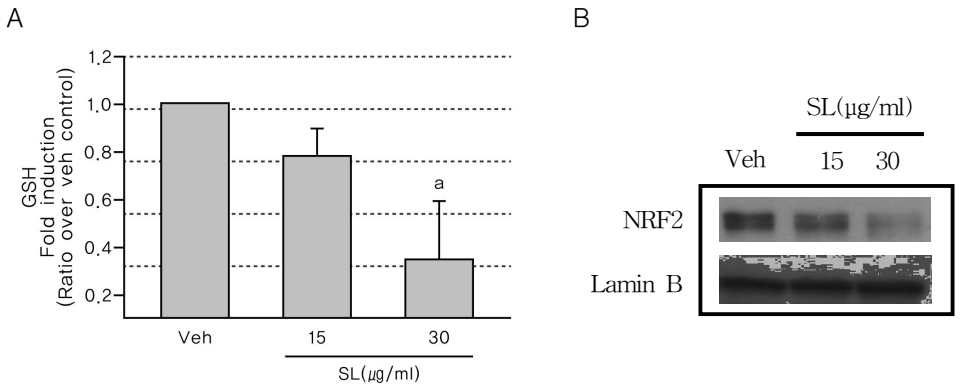

Figure 4. (A) GSH activity was examined following treatment with S. lappa extract. All values are the means ± SE of three experiments. a $P < 0.05$ relative to the vehicle control. (B) The levels of Nrf2 and Lamin B were analyzed by Western blotting in A549 cells; cells were incubated in the presence of S. lappa extract for the indicated doses. Similar blots were obtained from three different experiments.

유의하게 농도-의존적으로 감소시켰다(Fig. 4A). 또한 목향추출물이 GCL의 조절에 관여하는 Nrf2 조절을 감소시키는 것이 확인되었다(Fig. 4B).

Ⅳ. 고찰

목향(Saussurea Lappa)은 行氣止痛, 溫中和胃하는 효능을 보임으로서 식욕부진과 복통, 구토, 설사 등을 치료하는데 많이 사용되어 왔다[9), 11)]. 목향의 대표적인 주요 유효성분인 costunolide와 dehydrocostus lactone은 sesquiterpene lactones으로[12)-15)], 이 중 costunolide는 HL-60 cell에서 ROS를 유발시켜 미토콘드리아 막 전위차에 이상을 유발시키고 mitochondria내의 cytochrome C가 방출되도록 하여 미토콘드리아-매개성 apoptosis를 유발한다[10)]. 또한, AGS cell에서 목향추출물은 p53과 p21의 유도하여 G2 세포주기 정지를 일으켜 apoptosis로 유도한다[16)].

본 연구는 기존 연구와 일치하는 결과를 보였는데, 목향추출물은 농도-그리고 시간-의존적으로 A549 세포 생존율을 감소시켰고 이러한 세포사멸은 apoptosis으로 인한 것임을 확인할 수 있었다. 목향에 의해 유발된 세포독성이 ROS와 연관이 있는지 조사하고자, 목향추출물 처리에 따른 A549세포에서의 ROS 변화를 살펴보았다. 그 결과 목향추출물에 의해 ROS 생성이 크게 증가하였고, 뿐만 아니라 항산화제 NAC의 전처리는 A549 세포의 세포독성을 현저하게 감소시켰다. 이러한 증거들은 A549세포에서 목향추출물에 의해 생성된 ROS가 세포독성에 있어서 중요한 인자라는 것을 제시하고 있다.

본 연구에 사용된 A549세포는 Keap1 유전자의 돌연변이 빈도가 높게 나타남으로써[7), 8)], 이로 인해 Keap1의 Nrf2에 대한 억제적 기능을 약화시켜 Nrf2의 과발현 상태를 보인다. 정상세포에 비해 상대적으로 높은 산화적 스트레스를 보이는 암세포에서는 Nrf2 경로는 생존을 돕고 세포독성 유발 항암제 노출에 대해 그 하위 해독화 시스템을 촉진함으로써 항암제 내성에 관여할 가능성이 높다[4)-6)]. 따라서, 최근 Nrf2의 억제하는 방법을 통해 폐암을 효율적으로 치료하고자 하는 접근이 고려되고 있다. 이에 우리는 목향추출물의 Nrf2의 억제의 효과가 있는지 확

인하고자 하였다.

암세포에서 나타나는 Nrf2의 과발현 상태는 Nrf2 조절단백질인 Keap1의 돌연변이에 의해 또는 과도하게 증가하는 내인성 Nrf2 활성인자들에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다. 암세포에서 이런 상태는 Nrf2 하위 항산화 단백질들의 적극적 증가에 관여하고 암세포의 생존에 원인으로 작용할 가능성 역시 제시하고 있다[4)-6)]. 이러한 보고에 근거를 두어, 선택적으로 Nrf2 경로를 억제하는 방법은 암세포의 생존을 방해하고 더불어 항암제에 대한 감수성을 촉진시키는 효과적인 방법이 될 수 있을 제안하고 있다. A549 세포-Nrf2를 조절하는 단백질인 keap1 돌연변이 폐암 세포주-는 해독화 효소와 같은 항산화 효소, thiol 단백질군(thioredoxin, peroxiredoxin), GSH 합성 및 유지 관련 효소(GCL) 및 catalase 등이 keap1이 정상적으로 작용하는 세포에 비해 높게 유지되는 특징을 보임으로써 항암약물에 대한 민감도를 감소시키게 된다[7), 17)]. 이러한 특징을 보이는 A549 세포를 이용하여, 본 연구에서는 Nrf2에 대한 목향의 효과를 조사한 결과 목향추출물에 의한 GSH 억제는 목향의 세포독성을 효과적으로 유도하는 데 관여했을 것으로 예상되며, 목향추출물이 Nrf2를 억제시킴으로써 GSH의 수준에 영향을 미쳤을 것으로 추측된다.

GSH는 살아있는 세포에서 ROS로부터 세포를 보호하는데 매우 중요한 역학을 담당한다. GSH는 직접적으로 ROS와 결합하여 ROS와 결합하거나, 또는 GSH는 비타민 C와 같은 항산화 물질의 재생성(antioxidant recycling)에 관여함으로써 항산화 기능을 한다[18)]. 세포 내 GSH의 높은 농도는, GSH가 일차적으로 ROS에 방어함으로써 세포를 산화적 손상으로부터 보호할 수 있다[19), 20)]. GSH 억제는 ROS 증가, apoptosis 증가, 그리고 산화적 자극에 대해 과민하게 한다[21)].

본 연구결과, 목향추출물에 의해 Nrf2가 억제되고, GSH가 감소되는 것을 확인하였고, 이를 통해 우리는 목향추출물이 Nrf2 억제 효과가 Nrf2 및 하위 항산화/해독화 단백질의 발현을 억제하고 유도발현을 차단함으로써 A549 세포의 세포독성에 영향을 미치는 것으로 보여지고 있다. 하지만 직접적인 연관성을 입증하기 위해서는 추가적인 연구를 통해 목향의 Nrf2 경로 억제가 세포독성에 미치는 영향을 면밀하게 조사해야 할 것이다. 뿐만 아니라 정상 세포에서의 목향에 의한 Nrf2의 경로가 영향도 살펴봐야 할 것이다.

결론적으로, 목형추출물은 A549 세포의 생존을 효과적으로 억제시켰다; 이러한 세포독성은 Nrf2 경로의 억제로 Nrf2에 의해 조절되는 GSH 합성이 억제와 ROS 증가로 인해 목향이 효과적으로 세포독성이 유발되는 것으로 보인다. 이러한 결과는 Nrf2의 과발현 상태인 A549 폐암세포에 있어서 세포의 과민성을 높여 항암작용을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구의 결론은 다음과 같다.

1. 목향추출물을 처리한 A549 cell에서 세포사멸이 관찰되었으나, 항산화제인 NAC을 전 처리한 경우 세포사멸이 감소되는 것이 관찰되었다. 그 결과 목향추출물은 활성산소종을 유발시켜 세포독성을 유발하는 것을 확인하였다.
2. 세포 내에서 활성산소종 조절에 관여하는 단백질인 Nrf2의 활성정도를 측정한 결과 목향추출물을 처리한 경우 농도의존적으로 감소되는 것이 관찰되었으며, 거기에 따른 GSH의 감소도 확인되었다.
3. 이상의 결과를 볼 때 목향추출물은 A549 cell에서 활성산소종 조절에 관여하는 단백질은 Nrf2를 억제하여 GSH 감소를 유도하

여 세포 내 활성산소종을 증가시킴으로써 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 대구한의대학교 기린연구비 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2001;478(1):23-43.
2. Fojo T, Bates S. Strategies for reversing drug resistance. Oncogene. 2003;22(47):7512-7523.
3. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. Antioxidants & redox signaling. 2005;7(3-4):385-394.
4. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:89-116.
5. Kwak M-K, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1?Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2004;555(1):133-148.
6. Cho H-Y, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. Antioxidants & redox signaling. 2006;8(1-2):76-87.
7. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E. Dysfunctional KEAP1?NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. PLoS medicine. 2006;3(10):e420.
8. Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsuji M, Kang M-I, Kobayashi A, Yokoyama S, Yamamoto M. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. Molecular cell. 2006;21(5):689-700.
9. 본초학교수 전한. 本草學. 서울: 영림사; 1992. 353-354 p.
10. Lee M-G, Lee K-T, Chi S-G, Park J-H. Constunolide Induces Apoptosis by ROS-mediated Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome C Release. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2001;24(3):303-306.
11. Bensky D, Gamble A. Chinese herbal medicine: materia medica: Eastland Press Seattle; 1986. 339-340 p.
12. Matsuda H, Kageura T, Inoue Y, Morikawa T, Yoshikawa M. Absolute Stereostructures and Syntheses of Saussureamines A, B, C, D and E, Amino Acid?Sesquiterpene Conjugates with Gastroprotective Effect, from the Roots of Saussurea lappa. Tetrahedron. 2000;56(39):7763-7777.
13. obles M, Aregullin M, West J, Rodriguez E. Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones. Planta medica. 1995;61(03):199-203.
14. hnishi M, Yoshimi N, Kawamori T, Ino N, Hirose Y, Tanaka T, Yamahara J, Miyata H, Mori H. Inhibitory Effects of Dietary Protocatechuic Acid and Costunolide on 7,

12?Dimethylbenz [a] anthracene?induced Hamster Cheek Pouch Carcinogenesis. Cancer Science. 1997;88(2):111-119.
15. atsuda H, Toguchida I, Ninomiya K, Kageura T, Morikawa T, Yoshikawa M. Effects of sesquiterpenes and amino acid-sesquiterpene conjugates from the roots of Saussurea lappa on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide-activated macrophages. Bioorganic & medicinal chemistry. 2003;11(5):709-715.
16. Ko SG, Kim H-P, Jin D-H, Bae H-S, Kim SH, Park C-H, Lee JW. Saussurea lappa induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. Cancer letters. 2005;220(1):11-19.
17. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. Cancer research. 2008;68(5):1303-1309.
18. May JM, Qu Z-C, Whitesell RR, Cobb CE. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. Free radical biology and medicine. 1996;20(4):543-551.
19. Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. Neuroscience letters. 2004;354(2):163-165.
20. Habib GM, Shi Z-Z, Lieberman MW. Glutathione protects cells against arsenite-induced toxicity. Free radical biology and medicine. 2007;42(2):191-201.
21. Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. Antioxidants & redox signaling. 2005;7(1-2):42-59.