

清肺瀉肝湯과 YKK012의 항암제 CPT-11과 병용투여 시 대장암 성장억제에 미치는 효과

안훈모^{1#}, 한상용^{2,3#}, 김지훈^{2,3}, 노태원², 정명수¹, 김윤경^{2,4*}

1 : 원광대학교 한의과대학 예방의학교실, 2 : 원광대학교 약학대학 한약학과 방제학교실,
3 : 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과 BK 21 Plus Team, 4 : 원광한약연구소

Effects of Cheongpyesagan-tang and YKK012 on *in vitro* and *in vivo* Colon Cancer Cell Growth with and without CPT-11

Hun-mo Ahn^{1#}, Sang-Yong Han^{2,3#}, Ji-Hoon Kim^{2,3},
Tae-Won Rho², Myong-Soo Chong¹, Yun-Kyung Kim^{2,4*}

1 : Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University

2 : Department of Herbal Medicine, College of Pharmacy, Wonkwang University

3 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, BK 21 Plus Team, Wonkwang University

4 : Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to evaluate the antitumor effects of Cheongpyesagan-tang(CST) and YKK012 on colon cancer.

Methods : MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of Single herbs and combinations of CST and YKK012 on murine colon cancer cells, Colon 38. To explain effects of apoptosis in colon cancer, we performed the western blot. Effects of CST and YKK012 on antitumor activity of CPT-11 using the murine colon38 allograft tumor in BDF1 mice.

Results : Single herbs and combinations of CST and YKK012 was tested *in vitro*. Rhei Radix (RH) and Scutellariae Radix (SC) and YKK012 showed dose-response cytotoxicity on Colon 38. This might be due to the apoptosis, as we see Bax and Caspase-3, which are apoptotic factors, was expressed in RH and SC treated cells. YKK012 also showed increased expression of Caspase-3.

In mouse colorectal cancer xenograft model of colon38 cells, herbal combinations showed tendencies of tumor regression, but was not significant. Furthermore, because toxicity was observed in CST group, we reduced the dose of CST for the next experiment. The anti-tumor effects of herbal combinations were insufficient to be used as single anti-tumor agent. With simultaneous usage of CPT-11, contrary to that CST showed no synergistic effects, YKK012 which was composed by the combination of four ER β selective herbs, significantly reduced the size of tumor and Bax expression was increased.

Conclusions : We suggest YKK012 can be a effective cancer adjuvant therapy with CPT-11 on colon cancer.

Key words : Colon38 cell, Xenograft model, Cheongpyesagan-tang, YKK012, CPT-11

서론

대장암은 통계청 자료에 의하면 2011년 암 사망률 중 4위

*Corresponding author : Yun-Kyung Kim, Department of Herbal Medicine, College of Pharmacy, Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6803 · FAX : +82-63-850-6803 · E-mail : hestia@wku.ac.kr

#First author : Hun-mo Ahn, Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6803 · FAX : +82-63-850-6803 · E-mail : ahnpig@gmail.com

Sang-Yong Han, Department of Herbal Medicine, College of Pharmacy, Wonkwang University

· Tel : +82-63-850-6803 · FAX : +82-63-850-6803 · E-mail : 030745@daum.net

· Received : 21 October 2014 · Revised : 20 January 2015 · Accepted : 20 January 2015

이고 5년간 발생빈도는 2위에 이르며 최근 식생활 및 생활습관의 변화로 그 발생 빈도가 점차 증가하는 추세다¹⁾. 대장암 발병률과 사망률은 남성에 비해 여성에서 낮을 뿐만 아니라, 2002년 WHI (Womes's Health Initiative) 연구 발표에 따르면 호르몬 대체요법 (Hormone Replacement Therapy, HRT)이 폐경기 여성의 대장암의 발생을 감소시킨다²⁾. 그러나 WHI를 포함한 여러 연구 결과, 폐경 후 호르몬 치료 시 유방암, 관상동맥질환 등의 위험성이 증가한다는 결과가 보고되면서 호르몬 치료에 대한 인식의 변화로 식물성 에스트로겐 (Phytoestrogen)에 대한 관심이 높아졌다.

한약재에는 phytoestrogen을 비롯한 식물성 유용성분 (Phytochemical)을 다수 함유한 것들이 있다³⁾. 국내에서 phytoestrogen에 대한 연구는 폐경기후증후군에 대한 HRT 목적으로 연구가 진행되었거나^{4,5)} 한약의 에스트로겐 분비효과에 대해 유의성을 확인한 실험연구^{6,7)} 등이 있으며, 한약의 대장암 치료 연구에는 혼합처방에 대한 연구^{8,9)} 단일 한약재에 대한 실험연구¹⁰⁾와 한약의 단독 투약에 따른 임상연구¹¹⁾ 등이 진행되고 있다. 국외에서는 대장암에 대한 黃芩湯 (PHY906)과 CPT-11의 상호작용에 대한 연구보고가 있다¹²⁾.

韓醫學에서 대장암은 "腸毒", "積聚", "腸風", "下痢", "腸覃" 등의 범주에 속한다. 대장암의 증상은泄瀉와便秘가 교대로 생기고 便血이 생기며 粘液便이나 粘液血便이 생긴다. 結腸梗塞 증상과 소견이 나타나고 여위며 빈혈이 생기거나 체중이 감소되고 배에서 腫物이 만져지는 등의 증상이 따른다¹³⁾.

四象醫學의 淸肺瀉肝湯은 근래 太陰人 裏病의 燥熱病 처방으로 실험연구를 통해 뇌혈류개선효과^{14,15)}와 신경세포 재생효과^{16,17)} 동맥경직도와 맥압을 감소시키고¹⁸⁾, 손상된 간기능을 회복시키며¹⁹⁾, 관절질환의 과도한 자가면역반응 억제효과²⁰⁾ 등이 확인되었으며 이외에도 임상적 활용도가 넓어지고 있다. 이를 구성하는 葛根, 黃芩, 蘘本, 蘿菔子, 桔梗, 升麻, 白芷, 大黃²¹⁾ 중 葛根²²⁾, 黃芩²³⁾, 蘿菔子²⁴⁾, 桔梗²⁵⁾, 升麻²⁶⁾, 大黃²⁷⁾의 항암효능이 연구되고 있을 뿐만 아니라 淸肺瀉肝湯의 항암효과도 확인되고 있어^{28,29)} 임상 항암연구의 가능성을 시사하고 있으며, 본 실험을 통해 葛根, 黃芩, 蘘本, 大黃의 Estrogen receptor β 에 선택적인 작용이 관찰되어 淸肺瀉肝湯의 대장암에 대한 항암작용기전(antitumor mechanism)을 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 먼저 淸肺瀉肝湯이 대장암 세포에 대하여 세포독성을 나타내는지, 그리고 실험약물이 ER β 에 선택적으로 작용하는지 조사해보았으며, 동물실험에서 淸肺瀉肝湯과 ER β 에 선택적인 작용을 하는 약재만으로 이루어진 복합처방 YKK012의 항암작용을 비교하고 나아가 현재 시중에서 대장암의 항암제로 사용되는 Irinotecan(CPT-11)과 병용투여 시 상승작용 여부를 살펴보았다. 이에 유효한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 갈근, 고본, 길경, 나복자, 대황, 백지,

승마, 황금은 (주)옵니허브에서 구입하였다.

2) 시약

Bax, Bcl-2, Caspase-3 antibody는 Cell signaling Technology, Inc.(Massachusetts, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 전문의약품인 CPT-11(켄푸토주, Campto® inj), 40mg/2ml/vial, CJ제일제당주식회사 제조)을 구입하였다. 기타 사용된 모든 시약은 분석 등급으로 Sigma, Merck (Darmstadt, Germany), BD Biosciences에서 구입하였다.

2. 방법

1) 약물의 추출 및 제조

본 실험에 사용한 한약재는 무의도한방병원에서 제공하였으며, 구입한 약재는 각 100g에 정제수 1L를 넣고 Glas-Col (Terre Haute, IN, U.S.A.) 구입한 Heating mantle을 이용하여 2시간 동안 가열하여 추출하였다. 얻어진 추출액을 여과한 후 여액을 감압농축기 (Rotavapor R-124, Buchi, Switzerland)로 감압농축한 후 동결건조기로 건조하여 최종적으로 파우더 형태로 각각의 실험약물을 얻었다(Table. 1). YKK012는 淸肺瀉肝湯 구성약재 중 ER β 에 선택적인 작용을 하는 약재인 葛根, 黃芩, 蘘本, 大黃만으로 이루어진 복합처방이다. 처방의 경우 한 첩을 Table. 1의 구성용량으로 하여 10 첩 분량을 10배수로 상기 방법을 사용하여 최종 시료를 얻었다.

Table 1. Extraction yields of medicinal herbs used in this study.

	NAME	Abbreviation	Yield(%)
Single herbs	Puerariae Radix	PU	42.41
	Scutellariae Radix	SC	45.00
	Ligustici Rhizoma	LI	49.40
	Raphani Semen	RA	38.10
	Platycodi Radix	PL	52.15
	Cimicifugae Rhizoma	CI	72.28
	Angelicae dahuricae Radix	AN	47.78
	Rhei Radix et Rhizoma	RH	64.90
Herbal combinations	Puerariae Radix (16g) Scutellariae Radix (8g) Ligustici Rhizoma (8g) Rhei Radix et Rhizoma (4g)	YKK012	21.22
	Puerariae Radix (16g) Scutellariae Radix (8g) Ligustici Rhizoma (8g) Raphani Semen (4g) Platycodi Radix (4g) Cimicifugae Rhizoma (4g) Angelicae dahuricae Radix (4g) Rhei Radix et Rhizoma (4g)	CST	24.88

2) Colon38 세포주의 배양

추출물이 Colon cancer에 anti-tumor 작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Murine Colon38 세포를 사용하였다. Murine Colon38 세포는 10% Fetal Bovine Serum(Gibco), 100U/ml Penicillin-Streptomycin이 포함된 DMEM을 사용

하여 5% CO₂와 95%의 공기를 포함하는 가슴 조건하에서 37°C 온도를 유지하여 배양하였다.

3) MTT 분석

Colon38 세포의 생존율은 여러 농도의 추출물 처리하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 세포들은 DMEM 배지에서 3×10^4 cells/well의 밀도로 현탁하여 96well plate에 이식하고 24시간 배양 후 여러 가지 농도로 약물을 처리하였다. 24시간과 48시간에 노출시킨 세포에 100 μ l의 Tetrazolium bromide salt 용액(MTT, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A.)을 넣어 4시간 동안 37°C를 유지하는 배양기에 넣었다. 반응이 끝난 후 MTT희석액을 조심스럽게 제거하고 각 well에 100ul의 Dimethylsulfoxide 용액(DMSO, Sigma)으로 15-20분간 plate shaker로 흔들어 준 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Luciferase 분석을 이용한 한약재 추출물의 에스트로겐 수용체 α, β 에 대한 영향 평가

한약재의 각각 다른 특징을 규명, 분석하기 위해 2가지 에스트로겐 수용체인 ER α 와 ER β 수용체에 결합여부를 확인하였다. Luciferase gene과 각 estrogen receptor gene, ERE (estrogen responsive element) gene을 넣어 제조한 각각의 vector를 293T세포에 transient transfection 시킨 후 stable cell line을 제작하였다. 세포를 2% charcoal로 처리하고 dextran으로 코팅한 FBS(CD-FBS)를 추가한, 페놀레드가 없는 RPMI 배지 100ul로 96well plate에 well마다 2×10^4 개를 이식하였다. 24시간 후 한약재 추출물을 3가지 농도로 estradiol을 처리하거나 처리하지 않고 중복하여 처리하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고 세포를 20ul lysis buffer로 용해하여 luminometer를 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase 활성은 relative light units (RLUs)로 측정하여 데이터를 estradiol에 대해 표준화하였다.

5) Xenograft animal Model

본 실험에 사용되는 쥐는 Xenograft animal Model을 만들기 위해 Female BDF1 Mice를 사용하였으며, (주)ORIENT BIO에서 구입하였다. 4주 Female BDF1 Mice를 구입하여 일주일 동안 housing 후 배양된 Murine Colon38 세포를 복강주사하여 이식하였다. 이 과정은 Charles River Laboratories (Wilmington, MA)에 의한 방법을 수행하였다³⁰⁾. 10-14일 후 mouse의 복강을 개봉하여 암조직을 제거하였다. 제거된 암은 BD Biosciences에서 구입한 Cell stainer에 옮겨 pestle로 간 후 1×Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)로 흘려 암조직을 구성하는 세포를 걸러내었다. 걸러진 세포를 원심분리하여 모은 후 여러번 세척하여 6주된 Female BDF1 Mice의 복강에 동종이식하였다. 동종이식 후 암 사이즈가 150-300mm³가 되는 쥐만 선택하여 각 그룹별로 나누어 10-11일 동안 한약 약물을 경구투여하였다(Fig. 1).

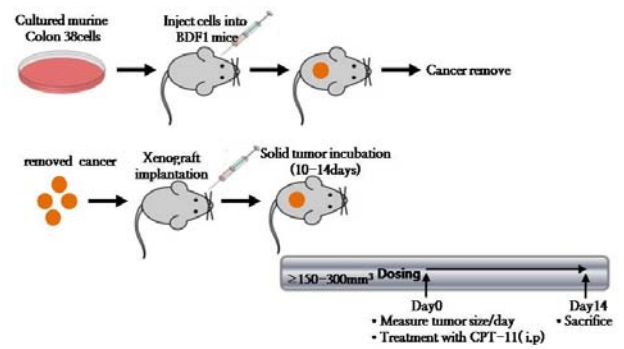


Fig. 1. Execution process of xenograft animal model.

6) Protein Extraction

Colon 38세포는 각 추출물의 농도와 시간에 따라 처리한 후 Scraper를 이용하여 세포를 모은다. 모아진 세포는 잔류물질을 제거하기 위하여 1×DPBS를 사용하여 여러번 세척하였다. Radio Immuno Precipitation Assay lysis Buffer (RIPA lysis Buffer, 1% Nonidet P-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15M NaCl, 0.01M Sodium phosphate pH7.2, 2mM EDTA)로 세포를 용해시킨 후 Sonic & Materials INC에서 구입한 Ultrasonic Processor(VC-130PB)로 분쇄 후 12000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 -70°C에 보관하였다.

적출된 암조직의 경우 조직의 혈액이나 잔류물질을 제거하기 위하여 1×PBS로 세척한 후 1×PBS을 조직 Volume의 3배를 넣고 Homogenizer로 균질화하였다. 3000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 남아있는 잔류물을 pipet을 이용하여 제거하였다. 제거 후 RIPA Buffer로 조직을 용해시킨 후 Ultrasonic Processor로 분쇄하였다. 분쇄 후 12000rpm에서 20분 동안 원심분리 한 후 상등액을 취하여 -70°C에 보관하였다.

7) Western blot

각 시료를 Bradford 방법에 따라 정량하고 12% SDS-PAGE에 전기영동하여 분리한 다음 Transfer Buffer를 이용해 PVDF-membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비 특이 반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 T-TBS(Blocking Buffer)로 room temperature에서 1시간 동안 충분히 흔들면서 방치하였다. 반응이 끝난 후 Blocking buffer에 1:1000으로 희석된 1차 항체를 넣고 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 T-TBS로 7분 간격으로 3번 세척하고 blocking buffer에 1:5000으로 희석한 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. TBS-T로 10분 간격으로 3번 세척한 후 ECL kit를 사용하여 발색을 시켜 단백질의 발현정도를 확인하였다.

8) 통계 분석

결과는 평균값 ± 표준편차로 표현하였다. 통계 분석은 Student's t-test와 One-way ANOVA를 이용하였다.

결 과

1. Luciferase 분석을 통한 한약재 추출물의 Estrogen receptor α, β 에 대한 영향 평가

각 한약재 추출물들이 Estrogen receptor와 결합하는지 확인하기 위하여 luciferase assay를 통하여 분석하였다. 한약재는 다음과 같이 Puerariae Radix, Scutellariae Radix, Ligustici Rhizoma, Raphani Semen, Platycodi Radix, Cimicifugae Rhizoma, Angelicae dahuricae Radix, Rhei Radix et Rhizoma 등의 한약재 물 추출물을 사용하였다.

본 실험에서는 에스트로겐 수용체 중 ER α 와 ER β 결합에 대한 효능을 확인하였으며, 그 결과 Table 2.에 보이는 것처럼 RA, PL, CI, AN는 단독처리를 할 경우와 1nM E₂ (Estradiol)를 동시 처리하였을 경우 ER α 와 ER β 에 대한 뚜렷한 효능이 나타나지 않는 반면에 PU, SC, LI, RH는 ER α 와 ER β 에 활성이 나타남을 확인할 수 있었으며 ER α 보다는 ER β 에 더 선택적으로 활성이 나타남을 관찰하였다.

본 실험에서 Luciferase assay를 통한 결과를 토대로 葛根, 黃芩, 蘘本, 大黃을 4:2:2:1의 비율로 배합하여 YKK012라 명명하였으며, 이들이 항암효과에 미치는 영향과 그에 따른 apoptosis발현에는 어떤 영향을 끼치는지 확인하였다.

Table 2. Effect of estrogen receptor- α, β by luciferase assay($\mu\text{g/ml}$)

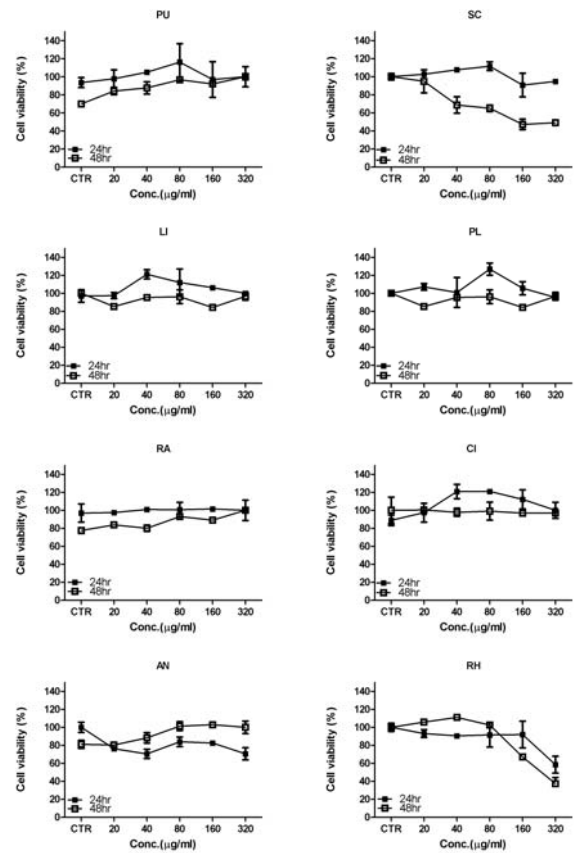
NAME	ER- α				ER- β			
	-		E ₂ (1nM)		-		E ₂ (1nM)	
	EC50	IC50	EC50	IC50	EC50	IC50	EC50	IC50
Puerariae Radix	16	-	>120	-	1.45	-	-	-
Scutellariae Radix	15	-	15	-	44.5	-	10	200
Ligustici Rhizoma	-	-	-	-	100	-	-	-
Raphani Semen	-	-	-	-	-	-	-	-
Platycodi Radix	-	-	-	-	800	-	-	-
Cimicifugae Rhizoma	-	-	-	-	-	-	-	-
Angelicae dahuricae Radix	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhei Radix et Rhizoma	-	200	-	300	60	-	-	-

2. 추출물이 대장암 세포 독성에 미치는 영향

이 연구의 한약재 추출물이 murine Colon38 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 추출물은 단미제제와 복합제제로 나누어 사용하였으며 각 추출물은 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g/ml}$ 의 각 농도에서 24시간과 48시간 동안 노출시킨 후 관찰하였다. 단미제제인 葛根 (PU), 黃芩 (SC), 蘘本 (LI), 萊菔子 (RA), 桔梗 (PL), 升麻 (CI), 白芷 (AN), 大黃 (RH)을 처리한 결과 SC와 RH 처리군을 제외하고는 세포독성이 보이지 않으며 이미 알려진 바와 같이 SC와 RH 처리군에서는 농도별, 시간별 세포독성이 나타남을 보였다(Fig. 2A).

단미제제를 혼합한 淸肺瀉肝湯 (Cheongpyesagan-Tang: CST), YKK012를 처리하여 MTT를 통한 Colon38 세포 독성을 확인한 바 CST에서는 독성이 나타나지 않았으나 YKK에서는 독성이 나타난 것을 확인하였다(Fig. 2B).

A



B

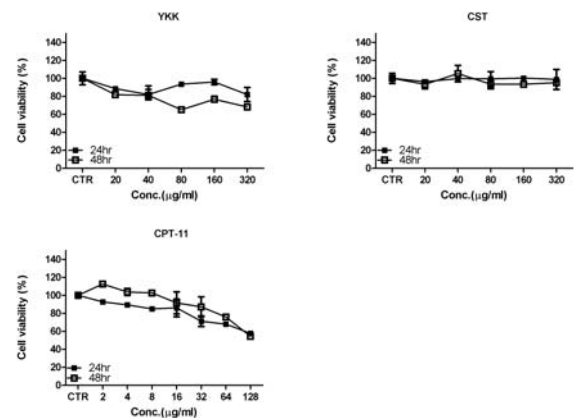


Fig. 2. Effect of water extractions on cytotoxicity in colon38 cells. Colon38 cells (3×10^4 /well plate) were incubated for 24 h and 48 h in the presence or absence of each extract at indicated doses. Cytotoxicity was measured by MTT assay as described in materials and methods. (A) Single herbs (Puerariae Radix: PU, Scutellariae Radix: SC, Ligustici Rhizoma: LI, Raphani Semen: RA, Platycodi Radix: PL, Cimicifugae Rhizoma: CI, Angelicae dahuricae Radix: AN, Rhei Radix et Rhizoma: RH) (B) Herbal combinations' data are means of three independent experiments.

3. 추출물이 Apoptosis에 미치는 영향

세포 독성이 관찰된 SC와 RH 처리군이 세포사멸 유발에는 어떠한 영향이 미치는지 알아보기 위하여 colon 38세포 (3×10^5 cells/well)를 접종하고 24시간 동안 배양 후 각각의

약물의 농도를 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 24시간동안 노출시킨다. 반응이 끝난 시료는 Western Analysis를 통하여 확인한 결과 단일제제인 SC와 RH처리군은 대조군과 비교하여 Dose-dependent하게 apoptosis의 발현인자인 Bax, Caspase-3가 발현됨을 확인하였다(Fig. 3).

복합제제인 CST, YKK를 처리하여 확인한 결과 apoptosis의 발현이 Dose-dependent하게 나타나지 않았으며, 각각의 복합제제가 다른 메커니즘을 보임을 확인하였다(Fig. 4).

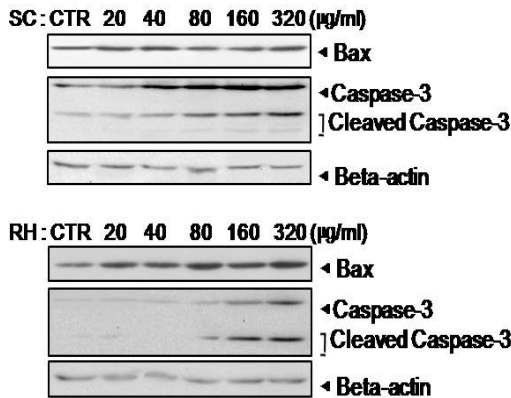


Fig. 3. Effect of Single herb water extractions on apoptosis expression in colon38. Cells (3×10^5 cells/well) were treated with or without each extract at indicated concentrations for 24 h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

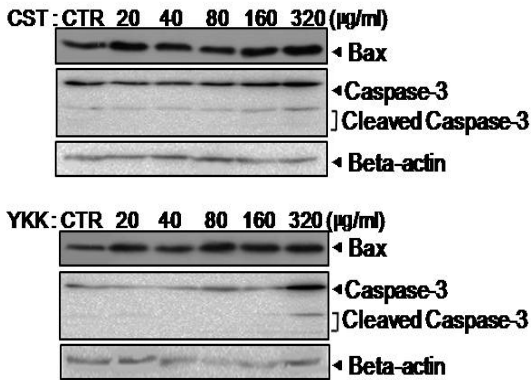


Fig. 4. Effect of Herbal combination water extractions on apoptosis expression in colon38. Cells (3×10^5 cells/well) were treated with or without each extract at indicated concentrations for 24 h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

4. Colorectal cancer xenograft model에서 CPT-11의 독성 실험

YKK, CST의 단독 투여 시 유의성 있는 anti-tumor activity가 관찰되지 않아 단독사용은 어렵다고 판단하고 anti-tumor 작용을 보고자 ICR mouse에 대장암세포인 colon38 cell를 동종이식하여 만든 대장암 모델에 현재 대장암 치료제로 시판되고 있는 CPT-11(irinotecan)과 병용 투여해 보았다. 병용투여 전 CPT-11의 독성을 확인하기 위하여 Colorectal cancer xenograft model에 용량별로 복강주

사하여 독성여부를 확인하였으며, 농도는 CPT-11 자체가 colon cancer의 성장을 완전히 억제하는 현 임상용량보다 낮으나 CPT-11의 anti-tumor의 효과가 있으며 YKK, CST의 상승효과를 볼 수 있도록 20mg/kg 농도를 선정하여 실험하였다³¹⁻³³. CPT-11은 첫날 1회 20, 40mg/kg 복강주사한 결과 10일 동안 대조군과 비교하여 전반적으로 암사이즈는 증가되지 않음을 관찰하였으며, 초기 5-6일까지는 항암제로서의 억제효과가 있어 큰 변화는 없었지만 이후로는 항암제 활성이 떨어져 암사이즈가 약간 증가됨을 확인할 수 있었다. 결과적으로 CPT-11과 병용 투여 시 초기단계보다는 5-6일이 지난 후 병용 투여될 YKK, CST의 효과가 나타날 것으로 보이며 또한 CPT-11치료로 인해 apoptosis의 발현에 영향을 확인한 바 Fig. 5C에서 보는 것처럼 Bax, Bcl-2 발현의 정도 차이는 관찰되지 않았으며 Cleaved Caspase-3가 증가하였다(Fig. 5).

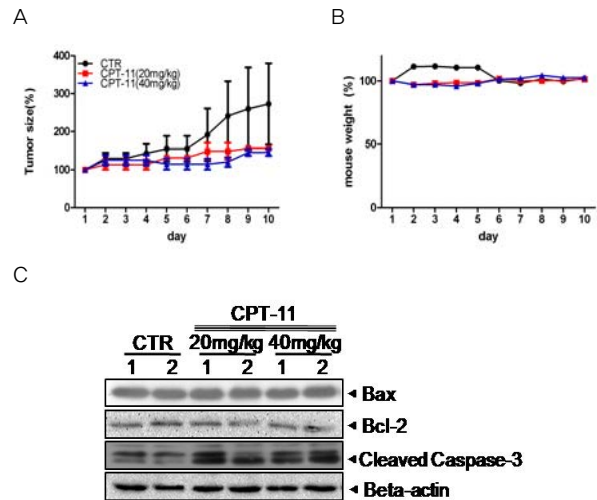


Fig. 5. Effect of CPT-11 in Colorectal cancer Xenograft model. Effect of CPT-11 on the antitumor activity (A) and weight(%) (B) using the murine colon38 allograft tumor in BDF1 mice. (C) Level of apoptosis expression in colorectal cancer by western analysis. Error bars indicate SDs; $n=3$.

5. YKK, CST이 CPT-11과 병용 투여시 anti-tumor activity와 toxicity에 미치는 영향

6주된 Female BDF1 Mice에 murine colon 38을 동종이식하여 Colorectal cancer xenograft model을 만들어 그룹을 나눈 후 약물투여 1일째에 CPT-11을 1회 복강주사를 하였으며, 1-14일 동안 YKK, CST 경구투여를 하였다. 이전 실험에서보다 관찰 일수가 길어진 것은 CPT-11의 투여로 인해 초기단계에 anti-tumor의 작용보다는 anti-tumor 작용의 활성이 어느 정도 감소된 이후 cancer가 유지되는 시점에서 약물의 효과를 보기 위함이다. YKK, CST을 CPT-11과 병용 투여한 결과 YKK를 처리한 그룹에서는 단독으로 투여 시 암세포 증식억제 효과보다 CPT-11과 병용투여 시 14일째에 대조군보다 암증식억제 작용이 더 좋았고 유의성 있게 관찰되었으며, apoptosis의 발현에 있어서도 대조군과 비교하였을 때 YKK 단독 처리군에서는 발현이 증가되었으나

CPT-11과 병용투여 시 감소됨을 관찰하였다(Fig. 6).

CST은 CPT-11과 병용 투여한 것보다 단독처리 시 더 좋은 암 증식억제효과를 보였으며, apoptosis의 발현에 있어서도 단독투여나 CPT-11과 병용투여한 결과가 다르지 않음이 관찰되었다(Fig. 7).

결과적으로 YKK와 CST는 anti-tumor activity는 상이하게 작용함을 확인하였으며 apoptosis의 발현에 있어서도 다른 pathway를 통한 것으로 생각된다. 또한 ERβ에 선택적으로 작용을 하는 약제로만 이루어진 처방 YKK012는 CPT-11과 병용투여 시 유의성있게 암세포증식을 감소시키는 결과를 보였다.

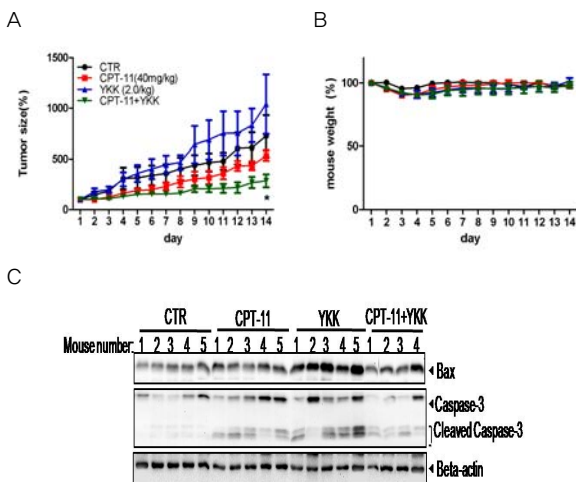


Fig. 6. Anti-tumor activity of Combination treatment of YKK with CPT-11 in colorectal cancer Xenograft model. Effect of YKK with CPT-11 on the antitumor activity (A) and weight(%) (B) using the murine colon38 allograft tumor in BDF1 mice, Error bars indicate SDs; n=6. (CTR: control). Significantly different from the control value (*p<0.05). (C) Level of apoptosis expression in colorectal cancer by western analysis. Error bars indicate SDs; n=5

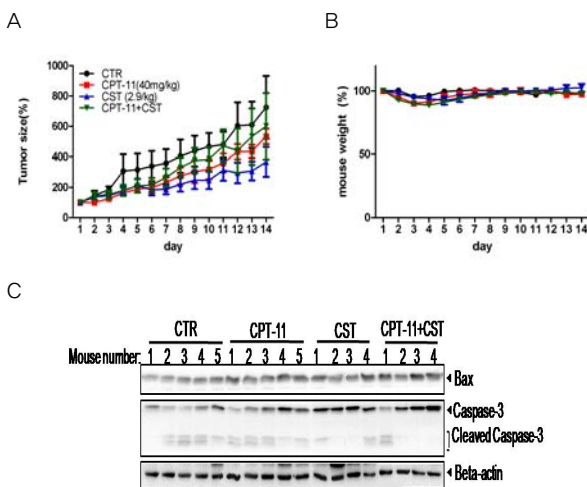


Fig. 7. Anti-tumor activity of Combination treatment of CST with CPT-11 in colorectal cancer xenograft model. Effect of CST with CPT-11 on the antitumor activity (A) and weight(%) (B) using the murine colon38 allograft tumor in BDF1 mice. (C) Level of apoptosis expression in colorectal cancer by western blot analysis. Error bars indicate SDs; n=5.

고찰

淸肺瀉肝湯은 熱多寒小湯에 大黃을 加한 처방이다. 李濟馬 선생의 저서에 처방명은 기록되어 있지 않고 太陰人 裏熱病證에서 熱多寒小湯 加 大黃의 형태로 手指焦黑斑瘡病, 飲一洩二證 시 大便燥澀할 때 사용되다가 『四象新編』에 처음 언급되었다. 熱多寒小湯은 太陰人 肝燥熱證에 대표적인 처방으로 『東醫壽世保元』에 따르면 太陰人 肝燥熱證은 侈樂無厭하고 慾火外馳함으로 인해 肝熱太盛하고 肺燥太枯하기 때문에 발생하는 병증으로서 飲一洩二한 消渴病, 手指焦黑斑瘡病, 虛勞夢泄證 등의 병증이 肝燥熱證의 범주에 속한다. 淸肺瀉肝湯의 처방구성은 葛根16g, 黃芩·蘘本 각 8g, 蘿藦子·桔梗·升麻·白芷·大黃 각 4g이다²¹⁾.

김²⁸⁾, 강²⁹⁾은 콩과식물에 속하는 葛根의 활성성분인 daidzein 등이 항암효과가 있다는 보고³⁴⁾에 주목하여 葛根을 君藥으로 하는 淸肺瀉肝湯의 구성약물간의 항암효과를 실험하여 항암효과에서 葛根과 蘘本の 배합이 중요한 역할을 하며 桔梗이 葛根의 상승작용의 주된 역할을 함을 확인하였다. 또한 淸肺瀉肝湯을 항암제 cisplatin과 병용투여 시 세포독성이 상승됨을 확인하여 보고하였다. 반면 처방의 주치증에 子癩, 胞衣不下, 産後痛도 있어²¹⁾ 부인과 질환 및 호르몬 관련 효능도 기대할 수 있어 향후 관련 연구가 필요하다고 생각한다.

산업화된 서양 국가에서 발병수준이 높았던 대장암은 일본과 우리나라를 포함한 아시아 국가들에서도 빠른 속도로 증가하고 있다. 이러한 변화는 식이 습관의 변화와 전반적인 신체 활동의 감소 그리고 비만을 포함한 대사증후군의 요인들과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되며 많은 역학 연구에서 이런 가설을 뒷받침하고 있다³⁵⁾. 2009년에 발생한 우리나라의 대장암환자는 24,986명이었고 전체 암 발생률 중 위암 다음으로 2위를 차지하였다. 2001년에는 인구 10만 명당 9.5명이 대장암으로 사망하였으나 2011년에는 15.4명이 대장암으로 사망하여 사망률이 약 1.6배 증가하였다. 반면에 대장암 발병률과 사망률은 남성에 비해 여성에서 낮게 나타나며, 호르몬 대체요법(Hormone Replacement Therapy, HRT)을 받은 폐경기 여성의 대장암의 발생율은 특징적으로 낮게 나타난다²⁾. 그 이유는 ER(Estrogen Receptor)와 관련있는 것으로 여겨졌다.

ERβ는 ERα와 구조적으로 유사하고, 특히 DNA-binding domain과 ligand-binding domain의 아미노산 동질성은 각각 95%와 53%이다³⁶⁾. 그러나 나머지 도메인의 동질성은 미미하여 각각의 유전자 위치도 다르고³⁷⁾ 조직에 따라 발현양상이 서로 달라³⁸⁾ 상호협력과 길항작용을 하고 있다³⁹⁾. 호르몬 대체요법은 유방암과 자궁내막암의 발병율을 높이고, anti-osteoporotic 과정에도 관여하나⁴⁰⁾, 선택적인 ERβ에 결합하면 유방암, 대장암, 전립선암, 난소암의 위험감소에 관여하며, 대장에서 ERα와 상호협력, 길항작용을 통한 조정기능으로 결합내 상피세포를 복구시키고, 동물실험상 우울증, 불임, 전립선질환에 작용이 있는 것으로 보고되었다⁴¹⁾. 그러므로 연구자들은 ERβ-agonists 개발에 주목하고 있다. 폐경후의 갱년기 증후군 증상에 대처할 수 있는 식물성 에스트로겐의 연구는 국내외에서도 진행되어 왔고^{42,43)} 한약의 에스트로겐 분비효과에 대한 연구가 있었으나^{7,44)} 혈중 에스트로겐 측정에 그쳐 한약이 어떻게 작용하는가 규명하는 연구는 부족하였다. 그러므로 선택

적으로 ER β 에 작용하는 한약재에 대한 연구와 한약재에 의한 대장암 억제 기전을 연구할 필요가 있다.

본 연구에서는 대장암의 濕熱下注, 火毒內蘊의 病機가 淸肺瀉肝湯의 주치인 肝燥熱證, 大便燥澀의 병증과 관련성이 있다고 보았다. 그리고 실험 중 淸肺瀉肝湯 일부 구성약물이 ER β 에 대한 선택적인 작용이 있음을 확인하여 대장암의 脾胃虧虛, 正氣不足의 病機는 淸肺瀉肝湯 구성약물의 ER β -agonists 작용과 관련이 있다고 여겨 항암효능을 기대하였다. 한약의 대장암에 대한 연구는 桑紅白朮散의 생쥐에서 대장암세포의 간접억제⁸⁾와 二妙散의 메탄올 추출물의 대장암 세포주 HCT116의 생존을 감소에 대한 보고⁹⁾ 등이 있고, 임상연구에서 消積正元散의 대장암 환자의 삶의 질 개선 효과에 대한 연구⁴⁵⁾와 옻나무 전탕추출물¹¹⁾이나 항암단⁴⁶⁾을 투여한 대장암 환자에 대한 임상보고 등이 있으며, 국외에는 대장암에 대한 黃芩湯(PHY906)과 CPT-11의 상호작용에 대한 연구 보고¹²⁾가 있었다.

淸肺瀉肝湯 구성약재들이 Estrogen receptor α, β 에 결합하는지 여부를 각 수용체에 대한 reporter cell을 만들고 luciferase 활성을 측정하여 확인한 결과 葛根, 黃芩, 蘘本, 大黃의 4가지 약재가 ER α 보다 β 에 선택적으로 결합하는 것을 확인하였다. 또한 黃芩과 大黃의 2가지 약재는 CPT-11과 같이 murine cancer cell인 colon38 cell에서 농도의존적으로 높은 세포독성을 보이는 것을 확인하였다. 이는 apoptosis 관련 인자인 Bax와 Caspase-3의 발현을 높이는 것을 통한 작용으로 생각된다.

항암작용의 주요기전인 Programmed cell death라고도 불리는 apoptosis는 개체 보존 수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단으로써 개체의 발생단계나 DNA손상 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절하에서 일어나는 정교한 개체의 생존을 위한 방어기전으로 알려져 있다⁴⁷⁾. 이러한 apoptosis 유발은 intrinsic pathway 및 extrinsic pathway의 두 가지 중요한 apoptosis pathway로 구분된다. Apoptosis pathway 중 intrinsic pathway에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1, Bcl-B와 apoptosis를 유발하는데 관여하는 pro-apoptotic 단백질인 Bax, Bak, Bcl-XS, Bok 및 BH3 only 단백질인 Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa로 구성되어 있다. Bcl-2 family의 anti- 및 pro-apoptotic 단백질들은 서로 결합하여 복합체를 형성하는데 이들 사이의 균형이 깨어지게 되면 mitochondrial membrane의 permeability 변화가 유발되어 mitochondria의 기능이 상실됨으로써 mitochondria 내부로부터 cytosol로 cytochrome c가 방출되어 cysteine-related proteases인 caspases, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절함으로써 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다⁴⁸⁾.

Apoptosis 유발에 있어서는 caspase protease라는 효소가 중요한 조절인자로서 작용하는 것으로 알려져 있는데, 이들은 세포가 정상적으로 성장 및 생존할 때에는 핵과 mitochondria의 외막에 불활성상태인 proenzyme 형태로 존재하지만, apoptosis 유발 신호에 의하여 활성화되면 많은 기질 단백질들을 분해함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있

다⁴⁹⁾. 그러나 단미의 결과에 비해 복합방제에서 淸肺瀉肝湯은 黃芩, 大黃을 함유하였음에도 세포독성을 보이지 않은 반면 YKK012는 낮은 세포독성을 보였으며 Bax와 Caspase-3의 발현도 높이는 것을 알 수 있었다. 이는 실험에 사용된 용량에서 黃芩, 大黃의 함유량이 차이가 나기 때문일 것으로 생각된다.

이 결과에 기인하여 淸肺瀉肝湯과 葛根, 黃芩, 蘘本, 大黃의 4가지 약재만으로 구성된 YKK012를 구성하여 대장암 실험에 사용하였다. 淸肺瀉肝湯과 YKK012를 단독으로 대장암 세포 colon38 cell을 이식한 생쥐에 처리한 결과 암세포 증식 억제 효과가 있었으나 항암제 사용 시와 같은 강력한 억제 효과는 기대할 수 없었으며 淸肺瀉肝湯보다 YKK012이 보다 지속적인 유의성을 보였다. 또한 淸肺瀉肝湯 단독투여군에서 몸무게 변화는 없었으나 사망개체가 발생하여 독성이 우려되었다. 따라서 현실에 적용가능한 항암효과를 위해 CPT-11과 병용투여 실험을 진행하였다.

시판되고 있는 CPT-11의 도입과 항암화학요법, 수술기술의 향상, 그리고 중재적 방사선학의 발전 등으로 대장암의 생존율은 높아지고 있다. 하지만 이와 관련된 소화기계 부작용으로는 복통, 설사, 오심, 구토 등이 있으며, 특히 설사는 매우 흔하게 나타난다고 한다⁵⁰⁾. 따라서 항암제인 CPT-11과 淸肺瀉肝湯, YKK012를 병용하여 항암작용과 부작용에 미치는 영향을 보고자 하였다. CPT-11은 성인 1일 1회, 100 mg/m²를 1주 간격으로 3-4회 점적정주 후, 적어도 2주일간 투약 중단하는 것을 동일한 주기로 반복하는 것을 임상 상용량으로 하고 있으나 본 실험에서는 한약의 상승효과를 보기 위해 동물실험에서 상용량보다 적은 20mg/kg 용량에서 암세포 억제효과가 나타나는 것을 확인하여 병용실험에 사용하였다. CPT-11은 DNA-topoisomerase I complex에 결합하여 complex를 안정화시키므로 uncoiling은 일어나지만 resealing (religation)은 억제시켜 replication fork에서 DNA파괴로 합성을 억제하는 기전으로 작용하는 약으로 apoptosis와 관련된 Bax와 Bcl-2에 영향을 나타내지 않았다. YKK, CST을 CPT-11과 병용 투여한 결과 YKK를 처리한 그룹에서는 단독으로 투여시의 암세포 증식억제 효과보다 CPT-11과 병용투여 시 암증식 억제작용이 더 좋았고 14일째에 대조군보다 유의성 있게 나타났으며, apoptosis의 발현에 있어서도 대조군과 비교하였을 때 YKK 단독 처리군에서는 Bax와 Caspase-3 발현이 증가되었으나 CPT-11과 병용투여 시 감소됨을 관찰하였다. CST은 CPT-11과 병용 투여한 것보다 단독 처리 시 더 좋은 암 증식억제효과를 보였으며, apoptosis의 발현에 있어서도 단독투여나 CPT-11과 병용투여한 결과가 다르지 않음을 관찰하였다.

본 연구에서는 韓醫學의 임상적 항암요법을 연구함에 있어 처방근거를 마련하는 방법론을 제시하고자 하였다. 실험 중 淸肺瀉肝湯의 구성약물 중 葛根, 蘘本, 黃芩, 大黃의 ER β 에 선택적인 작용이 확인되어 淸肺瀉肝湯의 apoptosis에 의한 항암효과 뿐만 아니라 ER β 에 선택적인 작용을 통한 항암효과도 기대할 수 있었다. 아울러 淸肺瀉肝湯과 ER β 에 작용하는 한약재로 구성된 YKK012와의 항암효능 비교를 통해 대장암 성장억제 효과와 기전을 살펴보고자 실험을 수행하였다. 결과적으로 YKK와 CST의 항암기전은 상이하게 작용함을 확인하였으며 apoptosis의 발현에 있어서도 다른 pathway를 통한

것으로 생각된다. 또한 ER β 에 선택적으로 작용을 하는 약제로만 이루어진 처방 YKK012는 CPT-11과 병용투여 시 유의성있게 암세포증식을 감소시키는 결과를 보였다.

결론

淸肺瀉肝湯과 그 구성약물 중 ER β 에 선택적으로 작용하는 葛根, 黃芩, 蘘本, 大黃으로 구성된 YKK012의 대장암에 대한 항암효과를 살펴보았다. 우선 처방의 단미 또는 복합탕제의 세포독성을 평가하였고 그 결과와 세포사멸 유발과의 관계를 살펴보았다. 아울러 각 복합탕제의 독립적 항암효과와 항암제 CPT-11과 병용투여 시 항암효과를 암증식 억제효과를 비교 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 淸肺瀉肝湯 및 그 구성약제가 murine colon cancer cell Colon 38 세포의 생존율에 미치는 영향으로는 단미 중 黃芩과 大黃 추출물에서 농도별, 시간별 세포독성이 나타났다. 복합탕제에서는 淸肺瀉肝湯에서 독성이 나타나지 않았으나 YKK012에서는 독성이 나타났다.
2. 세포독성과 세포사멸 유발과의 관계로는 黃芩과 大黃은 농도의존적으로 apoptosis의 발현인자인 Bax, Caspase-3가 발현됨을 확인하여 독성이 세포사멸 유발로 인한 것임을 알 수 있었고 복합탕제의 경우 YKK012에서 Caspase-3의 발현이 증가되었다.
3. 동물모델에서 항암제 CPT-11과 병용투여 시에는 淸肺瀉肝湯은 병용투여 시 효과의 상승이 없었으나 YKK012는 유의성 있게 암증식 억제효과가 있었으며 Bax가 증가되는 것을 확인하였다.

이상의 결과로 淸肺瀉肝湯이 대장암 성장억제 효과가 있으나 용량에 따라 독성이 발현될 우려가 있으며 항암제 CPT-11과의 병용투여 시에는 淸肺瀉肝湯 중 ER β 에 작용하는 한약재로 이루어진 YKK012가 효과적인 암성장 억제효과를 보인다는 것을 확인하였다.

References

1. Statistics Korea, Statistics of death Cause. Available from : URL : http://kosis.kr/abroad/abroad_01List.jsp
2. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA. 2002 ; 288(3) : 321-33.
3. Widyarini S, Reeve VE. The phyto-oestrogens: its anticarcinogenic and antioxidant activity—a review. OPEM. 2006; 6(2) : 69-78.
4. Kim SN, Lee YS, Seo HD, Lee DG, Kim MS, Lee SP, Lee KT, Lee JK, Kim JS, Kwon MS, Jang PS, Kwak BY. Phytoestrogenic Effects of Combined Plant Extracts on the Change of Bone Metabolism of OVX Rats. Korean J Food Sci Technol. 2008 ; 40(3) : 316-20.
5. Lee DG, Lee SH. Verification of Cytotoxicity Against Cancer Cell Line and Estrogen-like Activity of Cheongkukjang. Korean J Orient Physiol Pathol. 2007 ; 21(1) : 153-7.
6. Jeong YS, Kang KH, Kim KC, Lee YT. Effect of Gamisamul-tang on hyperlipidemia in Ovariectomized Rats. Korean J Orient Physiol Pathol. 2002 ; 16(1) : 89-94.
7. Nam SW, Choi SS, Hong SE, Yoo SG. Effects of Buikjihwanghwan on the ovulation in rats. Korean J Orient Physiol Pathol. 2001 ; 15(3) : 490-6.
8. Oh SS, Kang H, Shim BS, Kim SH, Choi SH, Ahn KS. Effect of Sanghongbaekchul-san on Anti-metastatic and Immunopotentiating Activities. Korean J Orient Physiol Pathol. 2008 ; 22(2) : 282-9.
9. Kim SM, Yun HJ, Lee HW, Kim PJ, Lee CH, Park WH, Park SD. Imyosan induces caspases-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. J Herb Formula Sci. 2006 ; 14(2) : 21-32.
10. Han SY, Kim JA, Song HJ, Chae H, Kwon YG, Kim BJ. Effects of Carthami Flos on Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. J Korea Inst Orient Med. 2011 ; 17(2) : 129-34.
11. Kim BG, Park SC. Treatment of Rhus vernificiflua STOKES decoction to colorectal cancer patient (stage IV): single case report. J Korean Traditional oncol. 2010 ; 15(1) : 111-7.
12. Wang E, Bussom S, Chen J, Quinn C, Bedognetti D, Lam W, Guan F, Jiang Z, Mark Y, Zhao Y, Stroncek DF, White J, Marincola FM and Cheng YC. Interaction of a traditional Chinese Medicine (PHY906) and CPT-11 on the inflammatory process in the tumor microenvironment. BMC Med Genomics. 2011 ; 4 : 38.
13. Kim GS, Kim MD, Kim YB, Kim JH, Kim JH, Lee WC, Im YG, Jeong CG. Practical East-West Clinical Medicine 1. Seoul : Jeongdam publisher. 2001 : 624.
14. Jung GS, Kim BH, Hwang WD. Effect of *Chungpaesagan-tang* on cerebral ischemic damage induced by MCAO rats. Korean J Orient Prev Med Soc. 2009 ; 13(1) : 13-27.
15. Jeong CG, Kim EY, Shin JW, Sohn YJ, Lee HS, Jung HS, Sohn NW. Effect of *Chungpaesagan-tang* on Ischemic Damage Induced by Middle Cerebral

- Artery Occlusion in Diabetic Rats. *J Korean Med*, 2005 ; 26(2) : 217-30.
16. Bae NY, Yang HO, Ahn TW. Protection effect of New-Yeolda-Hanso tang against β -Amyloid Induced Cytotoxicity in NGF-differentiated PC12 Cells. *J Sasang Constitutional Med*, 2009 ; 21(3) : 138-53.
 17. Moon HK, Kim JW, Kang CH, Whang WW. The effects of Chungpesagan-Tang and herbs on Mouse neuroblastoma 2a cells damaged by hypoxia-reoxygenation. *J Orient Neuropsychiatry*, 2005 ; 16(2) : 89-112.
 18. Park YM, Hong JW, Shin WJ, Jeong DW, Kim SM, Bae HS, Kim YS, Moon SK, Jung WS, Cho KH. Effects of Chungpyesagan-tang on arterial stiffness and pulse pressure in acute stroke patients. *J Korean Orient Intern Med*, 2006 ; 27(2) : 416-28.
 19. Kim JY, Shin MR, He WY, Kim DR, Jeon JW. The Effect of the ChukChangEum (CCE) on CC14 Induced Acute Liver Damage in Rats. *J Sasang Constitutional Med*, 2005 ; 17(1) : 130-41.
 20. Kim JH, Park SS. The Effect of Chungpyesagantang on Lipopolysaccharide induced Arthritis in Mice. *J Sasang Constitutional Med*, 2002 ; 14(3) : 114-31.
 21. The National, College of Oriental Medicine. Sasang Constitutional Medicine office. Sasang Constitutional Medicine. Seoul : Jipmundang Publisher, 1997 : 534-53.
 22. Hong JW, Shin JY, Joo SM, Jeon BH, Lee SH. Effects of Puerariae Radix extract on Cisplatin-Induced Apoptosis of Rat Mesangial Cell. *Korean J Orient Physiol Pathol*, 2010 ; 24(2) : 220-7.
 23. Kim KS, Kim LH, Rlee YJ, Lee SH, Choi JH, Ko HN. Analysis on Research Trend of Studies Related with Scutellariae Radix in Korea. *Korean J Orient Physiol Pathol*, 2011 ; 25(6) : 1095-101.
 24. Hwang WI, Lee SD, Oh SK. A Study on the Pharmacological Activities of Korean Medicinal Herbs -Mainly on the Antitumor Activities-. *Korean Biochem J*, 1982 ; 15(3) : 205-19.
 25. Lee SY, Lee JH, Kim WI, Bae SJ, Park DI, Choi YH. Apoptotic Cell Death of Human Lung Carcinoma A549 Cells by an Aqueous Extract from the Roots of *Platycodon grandiflorum*. *J Life Sci*, 2003 ; 13(2) : 154-62.
 26. Kwon SJ, Song BH. Meta-analysis for effect of dietary isoflavones on breast density and hot flush suppression. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 2011 ; 39(3) : 224-37.
 27. Kim YM, Do JR, Kim DS, Park JH. Cytotoxicities of Hydrolyzed Crude Laminaran from *Eisenia bicyclis* on the SNU-1, HeLa and SW Cells. *Korean J Food Sci Technol*, 2006 ; 38(6) : 793-8.
 28. Kom JD. Studies on cytotoxicity of Chungpasagantang combined with cisplatin against tumor cell lines. Graduate school of Kyung Hee University, 2000.
 29. Kang BJ. Studies on cytotoxicity of Chungpasagantang combined with cisplatin against tumor cell lines. Graduate school of Kyung Hee University, 2000.
 30. Lam W, Bussom S, Guan F, Jiang Z, Zhang W, Gullen EA, Liu SH and Cheng YC. The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity. *Sci Transl Med*, 2010 ; 2(45) : 45-59.
 31. Ji Y, Hayashi K, Amoh Y, Tsuji K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M and Hoffman RM. The camptothecin derivative CPT-11 inhibits angiogenesis in a dual-color imageable orthotopic metastatic nude mouse model of human colon cancer. *Anticancer Res*, 2007 ; 27(2) : 713-8.
 32. Rubinfeld B, Upadhyay A, Clark SL, Fong SE, Smith V, Koeppen H, Ross S, Polakis P. Identification and immunotherapeutic targeting of antigens induced by chemotherapy. *Nat Biotechnol*, 2006 ; 24(2) : 205-9.
 33. Xu H, Tang W, Du G and Kokudo N. Targeting apoptosis pathways in cancer with magnolol and honokiol, bioactive constituents of the bark of *Magnolia officinalis*. *Drug Discov Ther*, 2011 ; 5(5) : 202-10.
 34. The National, College of Oriental Medicine. Joint Textbook Compilation Committee. *Herbology* (Edition 2). Seoul : Younglim Publisher, 2011.
 35. Koh SJ, Kim JS. Reasons for the increased incidence of colorectal cancer in Korea. *Korean J Intern Med*, 2010 ; 25(2) : 97-103.
 36. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 1996 ; 392(1) : 49-53.
 37. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Friedet G, Nordenskjöld M, Gustafsson J. Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization and Expression Pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997 ; 82(12) : 4258-65.
 38. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol*, 2000 ; 24(1) : 145-55.
 39. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, 2003 ; 3(5) : 281-92.
 40. Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*, 1993 ; 260(5108) : 626-7.

41. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor β : an overview and update. *Nucl Recept Signal*. 2008 ; 6 : e003.
42. Lien LL, Lien EJ. Hormone therapy and phytoestrogen. *J Clin Pharm Ther*. 1996 ; 21(2) : 101-11.
43. Lukaczer D, Darland G, Tripp M, Liska D, Lerman RH, Sxhiltz B, Bland JS. Clinical effects of a proprietary combination isoflavone nutritional supplement in menopausal women: A pilot trial. *Altern Ther Health Med*. 2005 ; 11(5) : 60-5.
44. Lee JJ, Kim JH, Kim CW, Yoo SK. Effect of Dangguijagyagsan on the ovulation in Rat. *J Traditional Korean Med*. 2000 ; 10(1) : 227-39.
45. Shin WT, Kwon OS, Lee JJ, Hong SH. A Case Report of Rectal Cancer Treated by Sojukjeongwon-san. *J Korean Orient Med*. 2007 ; 28(3) : 108-15.
46. Lee YY, Seo SH, Yoo HS, Choi WJ, Cho JH, Lee YW, Son CK, Cho CK. The Clinical study in 83 cases for colorectal cancer patients on the effects by Hangamdan. *J Korean Orient Oncol*. 2000 ; 6(1) : 165-80.
47. Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int*. 1993 ; 17(5) : 461-76.
48. Scorrano L and Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 ; 304(3) : 437-44.
49. Rao L, White E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 ; 7(1) : 52-8.
50. Bleiberg H, Cvitkovic E. Characterization and clinical management of CPT-11 (irinotecan)-induced adverse events: the European perspective. *Eur J Cancer*. 1996 ; 32A Suppl 3 : S18-23.