

## 저근백피(*Ailanthus altissima*) 물 추출물에 의한 급성림프성백혈병 Jurkat T Lymphocytes의 세포고사 유도

황상구 · 이형철 · 김춘관 · 천현자<sup>1</sup> · 정승일<sup>1</sup> · 전병훈\*

원광대학교 한의과대학 병리학교실, <sup>1</sup>원광대학교 한의학전문대학원 신약개발학과

### Induction of Apoptosis in Jurkat T Lymphocytes by Extract of *Ailanthus altissima*

Sang-Gu Hwang, Hyung Chul Lee, Chun Kwan Kim, Hyun Ja Chun<sup>1</sup>,  
Seung Il Jeung<sup>1</sup> and Byung Hun Jeon\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, and

<sup>1</sup>Department of Newly-Developed Drugs, Professional Graduate School of Oriental Medicine,  
Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

**Abstract** – *Ailanthus altissima* belonging to the family Simaroubaceae has been used to settle an upset stomach, to combat a fever, and as an insecticide. Apoptosis is an active process, which is a critical feature of the regulated development of multicellular organisms. We investigated whether the extract of *A. altissima* induced apoptotic cell death in Jurkat T-acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells. Upon treatments with the extract, the dose-dependent inhibitions of cell viability were observed. It also caused apoptosis as measured by cell morphology and DNA fragmentation. The capability of the extract to induce apoptosis was associated with proteolytic cleavage of specific target protein such as poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) protein, suggesting the possible involvement of the activations of caspases. Further study showed that Bcl-2 protein levels were not changed in all treated groups compared to control group. These results suggest that *A. altissima* induces Bcl-2-independent apoptosis in Jurkat T cells.

**Key words** – *Ailanthus altissima*, leukemia, Jurkat cells, apoptosis, antitumor

백혈병(leukemia)은 백혈구(white blood cells)를 생산하는 조직인 골수 또는 림프관내계에서 발생한 암세포 즉, 백혈병세포가 비정상적으로 증식하여 모든 장기에 침윤하면서 다식 증식하여 일어나는 것으로 알려져 있다. 성인의 백혈병은 전체 암 중 약 10%를 차지하고 있으며, 급만성 림프구성백혈병(ALL, CLL)과 급만성 골수성백혈병(AML, CML)으로 나뉘어진다<sup>1)</sup>. 백혈병세포들은 조혈계를 침범하여 정상적인 혈구형성을 파괴하므로 백혈병 환자들은 호중구 감소증, 혈소판 감소증, 빈혈에 의한 감염, 출혈, 피로 등이 발생한

다. 1998년 보건복지부 통계 자료에 의하면 백혈병은 인구 10,000명당 남성 4명, 여성 3명 정도로 추정되며 그 발생 빈도가 점차 높아지고 있으므로 백혈병에 대한 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것이다. 급성 백혈병은 한의학에서 熱勞, 急勞, 血證, 溫病, 積聚, 痰核 등의 범주에 속하며 그 주요한 病因病機를 살펴보면 內因으로는 勞倦, 饑飽, 房欲, 七情所傷, 外因으로는 溫熱毒邪侵襲으로 熱毒이 蘊結되고, 營分이 傷하여 血이 動함으로써 발생한다고 파악하고 있다<sup>2)</sup>. 급성 림프구성 백혈병은 소아의 경우 보통 4.5세에 발생하며 일반적인 징후로는 골수 침윤 때문에 일어나는 빈혈, 혈소판 감소증, 감염 그리고 특히 장골에서 발생하는 골통(bone

\*교신저자 : Fax : 063-850-6843

pain) 등이다. 성인의 경우 임상적 특징은 종격종괴 (mediastinal mass)를 지닌 환자가 많은 비율을 차지한다는 것을 제외하고는 소아와 유사하다<sup>3)</sup>.

현재 항암제로 이용되는 화학요법 약제로는 알킬화제, 대사길항제, 항생물질, 호르몬제 및 효소제제 등이 알려져 있으며, 이들은 각기 다른 활성기전을 갖고 있으므로 다양한 약물들이 암의 적절한 치료를 위하여 선택되어지고 있다<sup>4)</sup>. 그런데 이들 화학요법은 독성이 강하여 간장과 신장 기능의 장애, 약물의 축적에 의한 중대한 독성작용, 조혈현상 장애 등 부작용이 발생하는 문제점이 있다. 그러므로 정상세포의 과도한 파괴 없이 암세포를 파괴하거나 감소시키는 항암제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 우리나라의 산야에는 약용 및 식용으로 이용할 수 있는 식물이 많이 자생하고 있고, 이들 중에는 항암 효능을 가진 식물이 상당히 많이 있을 것으로 사료된다. 그러나 아직까지 우리나라에 자생하는 항암 식물에 대한 기초적인 연구가 광범위하게 이루어지지 않고 있으며, 예전에는 막연히 민간 전승요법과 경험에 의해서 이들을 소극적으로 이용하여 왔다. 최근 과학의 발달과 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 유용성분을 적극적으로 이용하고 있으며, 앞으로 과학적인 실험을 통하여 천연물의 효능을 검증하여야 할 것이다.

생물을 구성하는 세포는 발생, 분화, 성장 및 노화 등의 전과정을 통하여 지속적인 사멸의 과정을 거치게 된다<sup>5)</sup>. 이처럼 각 세포들이 생존과 사멸의 균형을 통하여 개체의 항상성을 효과적으로 유지하지만 여러 가지 원인에 의해 균형이 붕괴되거나 한쪽으로 치우치게 될 경우 생물은 질병의 상태로 전이된다. 여러 종류의 세포들에 있어서 세포고사(apoptosis)는 방사선, 세포독성 유발 물질, 성장 인자의 결핍, 열충격, 바이러스 감염과 같은 다양한 종류의 자극에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 세포고사가 일어나는 세포는 크기가 축소되고, 세포막 융기가 돌출하는 현상이 생기며, 핵에서는 염색사 응축과 핵 분절 등의 변화가 동반된다<sup>7,8)</sup>. 최근 caspases라는 효소를 발현시키는 유전자가 세포사멸의 신호를 실행하는 유전자로 밝혀졌고<sup>9,10)</sup>, 이 효소와 관련된 기질 단백질들은 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), retinoblastoma, lamins, gelsolin 등이 알려져 있다<sup>11,12)</sup>. 세포 사멸을 조절하는 유전자 중에 최초로 밝혀진 것이 B cell lymphoma-2 (Bcl-2)이며, 세포고사가 진행되는 세포에서 Bcl-2는 암 억제 유전자인 p53에 의해 단백질 발현이 억제되는 것으로

알려져 있다<sup>13)</sup>.

저근백피(柁根白皮)는 소태나무과(Simaroubaceae)에 속하는 가중나무(*Ailanthus altissima* Swingle)의 수피와 근피를 건조한 것으로서<sup>14)</sup>, 한방에서는 이질과 대하증, 치질, 고초열, 설사를 멈추게 하는 지사제, 살충제로 쓴다<sup>15)</sup>. 저근백피의 성분에는 수피, 종자, 잎으로부터 merosin, ailanthone, amarolide, quassin, ailantholide, chaparrinone, shinjuglycoside 등이 분리, 보고되었다<sup>16)</sup>. 이들 성분의 생리활성에 관한 연구로는 tar의 항균작용에 관한 것<sup>17)</sup>, glaucarubinone과 ailanthone 등의 항아메바작용 및 항말라리아 작용에 관한 것<sup>16)</sup>, 메탄올추출물의 간기능에 관한 것<sup>18)</sup>들이 있으나 항암활성에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 본 연구는 저근백피의 물 추출물을 이용하여 백혈병세포주인 Jurkat 세포에 대한 항암활성이 있는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**시료의 제조** - 저근백피 200 g을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 2,000 ml을 넣은 후 3시간 동안 가열, 추출하고 침전물을 3 M 여과지를 이용하여 3회 여과하였다. 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압, 농축하였다. 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 12시간 동안 방치하고, 30시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 10%의 수율인 20.3 g의 분말을 얻었다.

**Cell Culture** - 사람 T 세포성 유래의 급성 림프성 백혈병 세포주인 Jurkat은 미국 세포주 은행인 ATCC (The American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아, 실험실에서 37°C와 5% CO<sub>2</sub> 공급 조건을 갖춘 Sanyo 회사 배양기에서 배양하였다. 부유성 세포인 Jurkat의 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함시키고, 1% 항생제(100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)와 배지 1 L당 NaHCO<sub>3</sub> 2 g을 첨가하여 제조하였다.

**Cell Death Induction** - 세포들은 plastic culture dish에서 배양되었고, 4 × 10<sup>5</sup> cells/ml 정도의 세포수를 가진 배양 배지에 저근백피 추출물을 투여하였다. Jurkat 세포들은 여러 가지 농도(20, 40, 60, 80, 100 µg/ml)의 추출물로 24시간 동안 처리되었다. 저근백피 분말은 4°C에 저장되었고 사용 직전에 실험에 필요한 농도로 RPMI 1640 배지에 희석하여 사용하였다. 세포고

사의 유무는 아래에 기재된 세포 성장률의 비교, 세포 핵 형태의 변화 및 PARP 단백질의 가수분해 패턴을 비교하여 결정하였다.

**Antibody** – Monoclonal anti-PARP 항체는 Calbiochem(San Diego, CA, USA) 회사로부터 구입하였고, polyclonal anti-Bcl-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. Peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin 와 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Life Sciences(Cleveland, OH, USA) 회사로부터 구입하였다.

**Cell Viability** – 세포 증식에 대한 저근백피의 영향을 알아보기 위하여 세포를 24-well plate에 배양한 후 저근백피의 추출물을 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포를 1.5 ml tube에 모았으며, 동일 용량의 trypan blue 용액을 tube에 첨가한 후 부드럽게 섞고 2분 후 살아있는 세포의 숫자를 혈구 측정기를 이용하여 계산하였다.

**Western Blot Analysis** – 실험에 이용된 세포를 15 ml tube에 모은 후, 냉장 보관하였던 phosphate-buffered saline(PBS)로 2~3번 씻고 2000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 없앤 후 cell pellet에 EBC lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM sodium chloride, 0.5% Nonidet P-40)를 넣고 20분간 얼음 위에 놓아두면서 5분마다 교반하였다. Lysate는 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였고, 상등액을 실험을 위하여 다른 tube에 옮겼다. 단백질 농도는 Bradford 측정법(Bio-Rad)에 의하여 이루어졌고, 표준 단백질로 bovin serum albumin(BSA)를 이용하였다. 각 실험군마다 동일량의 단백질이 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel 전기영동장치를 이용하여 분리되었으며, 젤상에 있는 모든 단백질은 nitrocellulose membrane(Hybond C, Amersham Corp.)으로 옮겨졌다. Membrane들은 0.5% Tween-20을 포함한 Tris-NaCl-Tween 20(TNT) buffer를 이용하여 만들어진 5% nonfat milk 용액에 넣어서 전처리 하였다. PARP와 Bcl-2 일차 항체를 1 µg/ml 농도로 만든 nonfat milk 용액에서 membrane들을 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 배양 후 membrane들은 TNT buffer로 10분 동안 3번씩 씻었고 이차 항체로 다시 1시간 동안 실온에서 membrane을 배양하였다. Membrane들을 TNT buffer로 세척한 후 enhanced chemiluminescence reagent(Amersham)을 이용하여 2분간 반응시킨 후, 필름을 이

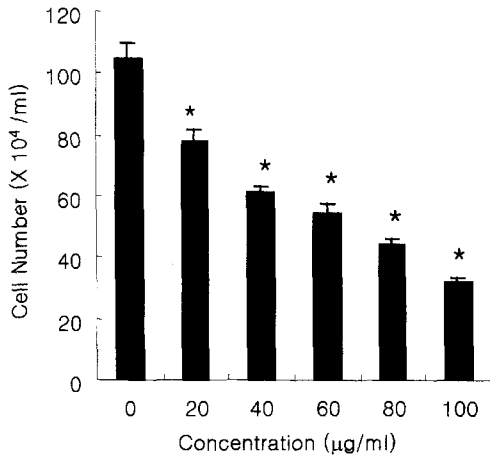
용하여 그 강도를 측정하였다.

**DNA Fragmentation** – 세포를 PBS 용액으로 세척한 후 원심분리기를 이용하여 순수 세포만을 모았다. DNAzol reagent 1 ml을 넣고 pipetting하여 세포 pellet을 분쇄하였다. 그 후 10,000 g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 다른 tube에 옮기고 pellet은 버렸다. Lysate에 100% 에탄올 0.5 ml을 첨가하여 여러 번 흔들어서 DNA를 침전시켰다. 3분 후 DNA pellet만 남기고 상등액을 제거하고 DNA precipitate를 95% 에탄올 1 ml에 두 번 세척하고 5-15분 정도 실온에서 air dry 시켰다. DNA를 Tris-EDTA buffer를 이용하여 녹인 후 분광광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm의 optical density(OD) 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. 10 µg의 DNA 표준들을 10 µg/ml 농도의 ethidium bromide를 포함한 1.0% agarose gel로 2시간 정도 전기영동 시켰으며 ultraviolet light에서 DNA 절편들을 관찰하였다.

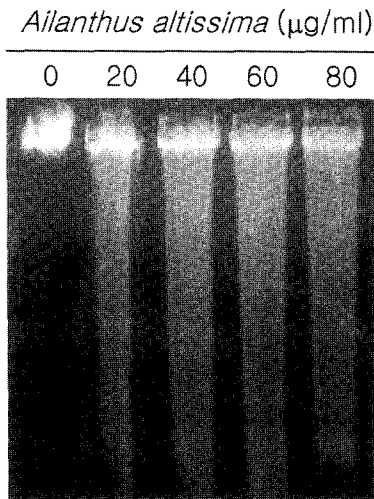
## 결과 및 고찰

본 실험에서는 사람의 급성 림프성백혈병 세포주인 Jurkat의 성장률에 대한 저근백피 추출액의 효과를 알아보기 위하여 추출액을 20, 40, 60, 80, 및 100 µg/ml의 농도 증가별로 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. Trypan blue 용액으로 세포 생존을 변화를 측정된 결과, 저근백피는 농도 의존적으로 점차 세포사멸을 유도하였다. 대조군에 비교하여 20 µg/ml 농도로 처리한 실험군에서 26%의 세포사멸이 일어났으며, 40, 60, 80, 및 100 µg/ml 농도로 처리한 그룹들에서도 각각 40, 49, 58, 및 66%의 세포사멸이 일어났다(Fig. 1). 또한 저근백피에 노출된 세포들의 외부 형태적인 특징을 현미경 하에서 관찰한 결과 세포막 외부 융기의 돌출현상을 볼 수 있었다(data not shown). 이는 저근백피의 추출성분이 Jurkat 세포의 성장을 억제함을 보여준다.

세포질뿐만 아니라 핵 속에서 일어나는 일련의 염색체 변화는 또 다른 세포고사의 한 증거로서 이용된다. 180-bp 크기의 분절된 DNA가 검출되던지 완전한 DNA의 함량이 줄어드는 현상이 나타나면 세포고사가 진행되는 것으로 보고된 예는 이제 놀라운 일이 아니다<sup>19,20</sup>. 저근백피에 노출된 급성 림프성백혈병 세포주인 Jurkat의 세포사멸이 necrosis가 아니고 생리적 사멸인 apoptosis와 관련되어 있을 가능성을 증명하기 위하여 Fig.



**Fig. 1.** Induction of dose-dependent cell death in Jurkat T cells by the extract of *A. altissima*. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Cells were harvested and resuspended in PBS. Same volume of trypan blue was then added and gently mixed. After 2 min, cells were counted using hemocytometer. The results are expressed as a total cell number and data are means ± SD of three experiments performed in triplicate. \*Significantly different from control group (\*P < 0.01)



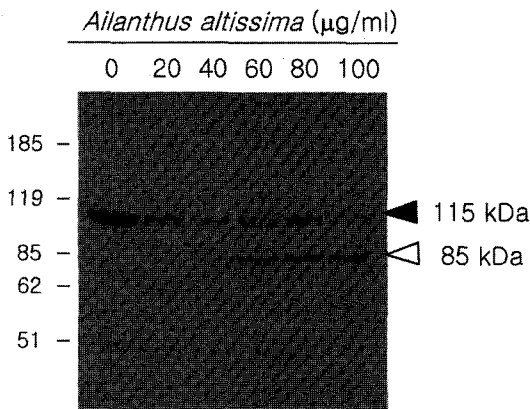
**Fig. 2.** Induction of apoptotic DNA fragmentation by the extract of *A. altissima* in Jurkat T cells. Genomic DNA was extracted from control and treated samples. Ten micrograms of DNA samples were separated on a 1.0% agarose gel containing 10 µg/ml ethidium bromide for 2 h and visualized under ultraviolet light.

1과 동일한 조건하에서 처리된 표본들을 이용하여 DNA fragmentation 실험을 실시하였다. 정상세포와 세포고

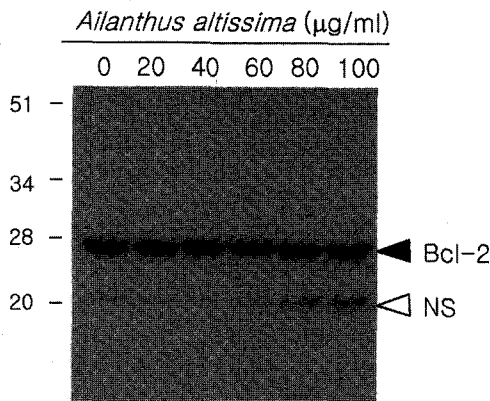
사가 유도된 세포들로부터 total DNA를 취해서 agarose gel로 전기영동을 실시하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보여주듯이, 저근백피 추출액을 20 µg/ml 농도로 처리한 실험군에서 고분자량의 DNA(50-300 kb)와 oligonucleosomal 크기의 DNA 분절(180 bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상을 agarose gel에서 볼 수 있었다. DNA 분절의 정도는 투여된 저근백피의 농도가 높을수록 점차 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이와 같은 DNA 분절 양상은 기존의 연구보고<sup>21)</sup>에 의해 밝혀진 결과처럼 세포고사가 진행되는 세포에서 internucleosomal DNA cleavage가 초래되어 나타나는 DNA 크기와 일치함을 보여준다.

최근의 연구 결과들은 대부분의 세포고사 유도물질이 intracellular cysteine proteases인 caspase family 활성화에 의해 세포사멸이 일어난다고 보고하였다<sup>22,23)</sup>. 단백질 분해 기능을 가지면서 세포사멸의 신호를 실행하는 효소로서 15종류의 caspases 들이 있다. 세포사멸의 신호를 받게되면 caspase 계열이 활성화되는 cascade를 거치게 되고 최종적으로 활성화된 caspase-1, -3, 및 -4 등이 세포내의 생존신호에 관련된 단백질을 분해하여 불활성화시키고, 세포골격단백질을 절단하여 구조적인 변화를 유발하여 세포사멸을 실행한다<sup>24)</sup>. 많은 종류의 세포성 단백질 즉, 세포질과 핵 속에 존재하는 단백질들이 세포고사가 진행되는 동안 caspases에 의해 쪼개짐 현상이 일어남을 보여주고 있다. 현재까지 알려진 기질들을 보면 poly ADP-ribose polymerase (PARP), actin, lamin, fodrin, protein kinase A(PKA), presenilin 등 다양하다<sup>11,25)</sup>. 그러므로 caspase의 주요 기질로 알려진 PARP 분해패턴을 조사하기 위하여 Jurkat 세포 배양배지에 저근백피를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 20 µg/ml 농도에서 116 kDa의 완전한 PARP 단백질이 85 kDa 크기로 분해되는 양상이 유도되었으며, 처리 농도가 높으면 높을수록 PARP 분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 실험 결과는 핵 속에서 일어나는 DNA fragmentation의 경향과 매우 잘 일치함을 보여 주었다. 이런 관점에서 저근백피 처리에 의한 PARP 단백질의 쪼개짐 현상은 caspase-3 활성화의 가장 주요한 증거 중의 하나이며 세포고사의 현상이 일어남을 보여준다. 저근백피에 의해 유도된 세포고사의 경우 어떤 기질 단백질들이 가장 중요한 역할을 하는지 차후 조사해 보아야 할 것이다.

미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치해 있



**Fig. 3.** Induction of PARP cleavage during apoptosis of Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 7.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for PARP. PARP 116 kDa and 85 kDa bands (closed and open triangles, respectively) are shown.



**Fig. 4.** Expression level of Bcl-2 protein in *A. altissima*-mediated apoptotic Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for Bcl-2.

는 Bcl-2 단백질은 사람의 림프종 발생과 밀접한 유전자 산물로 세포의 생존을 조절하는 즉, apoptosis를 억제하는 생리적인 기능이 Vaux 등(1988)<sup>26)</sup>에 의해 처음으로 밝혀졌다. 이외에도 Bcl-2와 구조적으로 유사한 또 다른 단백질들이 세포의 생존을 조절하는 즉, 세포 사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있는데 대표적인 것이 Bax 단백질이다<sup>27)</sup>. 그러므로 세포고사가 일어나는 경

우에는 일반적으로 Bcl-2 단백질 양이 감소하고 Bax 단백질 양이 증가하는 것이 관찰되지만 이런 현상이 모든 세포사멸의 경우에 적용되는 것은 아니다. 본 실험에서는 저근백피로 세포고사가 유도된 Jurkat 세포에서 Bcl-2의 단백질 발현 정도를 Western blot으로 조사하였다. 대조군과 저근백피를 다양한 농도로 처리한 실험군 모두에서 Bcl-2 단백질 발현량을 비교한 결과 모두에서 차이점을 발견할 수 없었다(Fig. 4). 최근 연구에 의하면 apoptosis 관련 유전자로 잘 알려진 p53은 세포고사가 진행되는 세포들에서 p53 단백질 발현량이 증가하는 것으로 밝혀졌으며, 이 증가된 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고 Bax의 단백질 발현량을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. 그런데 본 실험에 이용된 급성 림프성백혈병 세포주인 Jurkat은 wild type p53가 결핍되어 있기 때문에<sup>28)</sup> 저근백피로 유도된 apoptosis가 진행되는 동안에도 Bcl-2 단백질 발현량을 p53가 직접적으로 감소시키지 못한 것으로 사료된다. 그러므로 최소한 p53 신호기전과 무관한 신호기전을 통하여 세포고사가 진행됨을 알 수 있다.

## 감사의 말씀

이 논문의 일부는 2001년도 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(PJ9-PG1-01CO04-0002)과 한국과학재단과 전북도청이 원광대학교 의학지원연구센터(MRRC)에 지원한 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 대한의학협회 분과학회(1992) 암의 진단과 치료. 여문각, 서울.
2. 문구, 정병학, 김병주(1999) 암 동서의 결합치료. 원광대학교 출판국, 익산.
3. 서울대학교 의과대학편(1992) 종양학. 서울대학교 출판국, 서울.
4. 이문호(1979) 내과학. 금강출판사, 서울.
5. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
6. Vaux, D. L. (1993) Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 786-789.

7. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
8. Wyllie, A. H. (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Meta. Rev.* 11: 95-103.
9. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75: 641-652.
10. Henkart, P. A. (1996) ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* 4: 195-201.
11. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53: 3979-3985.
12. An, B. and Dou, Q. P. (1996) Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* 56: 438-442.
13. Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B. and Stark, G. R. (1998) The p53 network. *J. Biol. Chem.* 273: 1-4.
14. 保健社會部(1984) 大韓藥典外韓藥(生藥)規格集. 서울.
15. 江蘇新醫學院(中國)(1979) 中藥大辭典. 제1판, 下冊, 上海.
16. Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag, New York.
17. 주화균, 노영수, 김신규(1984) 저근백피 Tar의 항근작용에 관한 연구. 경희약대논문집 12: 57-59.
18. 김종, 최종원, 김혜경, 박수원, 이창규(1994) 저근백피 성분의 생리활성에 관한 연구(I): 메탄올 추출물과 클로로포름 분획이 Epoxide 분해계에 미치는 영향. 생약학회지 25: 47-50.
19. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139: 271-279.
20. Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. J. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.
21. Bicknell, G. R., Snowden, R. T. and Cohen, G. M. (1994) Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937. *J. Cell Sci.* 107: 2483-2489.
22. Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Sadio, T. and Green, D. R. (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270: 6425-6428.
23. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.
24. Casciola-Rosen, L. A., Miller, D. K., Anhat, G. J. and Rosen, A. (1994) Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 269: 30757-30760.
25. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347.
26. Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442.
27. Oltvai, Z. N., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
28. An, W. G., Hwang, S. G., Trepel, J. B. and Blagosklonny, M. V. (2000) Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia* 14: 1276-1283.

(2001년 9월 3일 접수)