

원 저

## PC 12 세포의 Apoptosis에 대한 星香正氣散의 방어효과 및 작용기전 연구

최철원, 이인, 이기상, 조남수, 문병순

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실

### The Neuroprotective Mechanism of *Sunghyangjunggisan* Water Extracts on Apoptosis of PC 12 Cell

Cheol-Won Choi, In Lee, Key-Sang Lee, Nam-Su Cho, Byung-Soon Moon

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

**Objectives:** *Sunghyangjunggisan* (SHJS) is a commonly prescribed drug with a wide neuropharmacological spectrum. The water extracts of SHJS were found to be protective against neurotoxicity elicited by deprivation of serum and glucose.

**Methods:** The morphological examination and Hoechst staining of nucleus also clearly showed that the extracts attenuated the cell shrinkage, membrane blebbing, representing typical neuronal apoptotic phenomena and nucleosome-sized fragmentation under the microscope in PC 12 rat pheochromocytoma cells.

**Results:** Activation of protein kinase A (PKA) with dibutyl-cAMP and forskolin also protected during glucose deprivation, although it was not additive with the effect provided by phorbol ester. Interestingly, treatment with the protein kinase A inhibitor, KT5720, was not neuroprotective in the presence of SHJS. Electrophoretic mobility shift assays were used to characterize the neuroprotective binding of nuclear proteins to consensus sequences for AP-1, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) after glucose deprivation. When PC 12 cells are induced to undergo apoptosis by serum deprivation, AP-1 and NF- $\kappa$ B DNA binding activity transiently increases to a slight degree. This stimulation is blocked by the water extracts of SHJS. The site of action of the drugs appeared to involve specific inhibition of AP-1 and nuclear factor  $\kappa$ B binding activity.

**Conclusions:** Taken together, these results suggested the possibility that the extracts of SHJS might provide a neurotrophic-like activity in PC 12 cells. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(1):50-60)

**Key Words:** *Sunghyangjunggisan*(*XingXiangZhengQiSan*), apoptosis, NF- $\kappa$ B

## 서론

- 접수 : 2001년 9월 18일 · 채택 : 11월 25일
- 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 원광대학교 부속의  
산한방병원 2내과  
(Tel. 063-850-2102, Fax. 063-841-0033, E-mail:  
moonbs58@hanmail)
- 본 논문은 2000년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의해  
연구되었음.

星香正氣散은 明代 戴<sup>1)</sup>의 《證治要訣》에 처음 수록  
되었으며 藿香正氣散과 星香散이 合方된 것으로 理  
氣祛痰의 效能으로 食厥, 暑厥, 風厥, 氣厥 등 症에 先  
用되는 代表的 方劑이며, 임상에서 中風昏倒, 人事不

省, 痰涎壅盛 等證에 구급처방으로 調氣의 목적으로 활용되고 있다<sup>23)</sup>.

뇌혈관질환시 혈류장애로 인한 허혈은 산소, glucose 및 대사물질의 부적절한 공급에 의한 조직관류의 감소로 인하여 발생하는데, 수분간의 허혈로도 대사성 손상 및 물리-화학적 손상을 받아 비가역적 상태를 초래하여 신경세포손상을 유발한다<sup>9)</sup>. 이러한 중추신경세포의 손상의 기전은 아미노산 글루타메이트의 과다한 방출 또는 글루타메이트 수용체의 과다한 흥분에 의한 흥분독성, 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입이 중요하다고 알려져 있고<sup>9)</sup>, 산소자유기에 의한 산화성 손상도 관여하는 것으로 보고되었으며<sup>6,7)</sup>, 최근에는 이러한 기전외에 능동적인 세포사멸 기전인 apoptosis가 허혈성 뇌질환, 간질, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease) 등 신경계질환의 신경세포고사에 관련되어 있다는 보고들이 증가하고 있다<sup>8)</sup>.

星香正氣散에 관한 기존의 실험 연구로는 文<sup>9)</sup>이 頭蓋內壓 및 혈압에 미치는 영향을, 柳<sup>10)</sup>가 뇌손상에 미치는 영향 등을 보고하였으나 PC 12 세포의 apoptosis에 대한 방어효과 및 작용기전에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 중풍 급성기에 사용되는 星香正氣散의 효능을 실험적으로 구명하기 위하여 신경세포의 모델로 사용되는 PC 12 세포의 혈청과 glucose 결핍을 유발시켜 각종 protein kinase와 transcriptional activator의 역할을 관찰하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 세포주

쥐의 부신수질 암세포인 PC(Pheochromocytoma) 12 세포주는 한국세포주은행에서 구입하여 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 DMEM(GIBCO BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지로 배양하였다.

### 2) 약제

본 실험에 사용한 星香正氣散의 처방은 黃<sup>21)</sup>의《方藥合編》에 의거하였으며, 약제는 圓光大學校 韓醫科大學 益山韓方病院에서 구입한 후 精選하여 사용하였고, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prscription of Sunghyangjunggisan

本草名	生藥名	重量(g)
藜 香	<i>Herba agastachis</i>	6.0
蘇 葉	<i>Folium perillae</i>	4.0
南 星	<i>Rhizoma arisaematis</i>	4.0
木 香	<i>Radix saussurea</i>	4.0
大腹皮	<i>Radix angelicae dahuricae</i>	2.0
白 芷	<i>Pericarpium arecae</i>	2.0
白茯苓	<i>Poria</i>	2.0
厚 朴	<i>Cortex magnoliae</i>	2.0
白 朮	<i>Rhizoma atractylodis marcephalae</i>	2.0
陳 皮	<i>Pericarpium citri nobilis</i>	2.0
半 夏	<i>Tuber pinelliae</i>	2.0
桔 梗	<i>Radix platycodi</i>	2.0
炙甘草	<i>Radix glycyrrhizae</i>	2.0
生 薑	<i>Rhizoma zingiberis</i>	4.0
大 棗	<i>Fructus zizyphi jujubae</i>	4.0
Total amount		44.0

### 3) 시약 및 기기

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Glucose-free DMEM, FBS(fetal bovine serum), 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon(Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 및 핵의 염색과 관찰에 이용한 slide chamber는 Nunc사(Germany)로부터 구입하여 사용하였다. MTT (methylthizol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide), reduced GSH (glutathione), NAC (N-acetylcysteine) 등은 PMA (phorbol myristate acetate), forskolin, DB-cAMP (Dibutyl cyclic AMP)는 Sigma(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하였고 KT5720, PD98059, FTI (farnensyl transferase inhibitor), Caspase-9 substrate [1], DEVD-AMC 등은 Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A.)으로부터 구입하였다.

## 2. 방법

### 1) 검약의 조제

星香正氣散 4첩 분량인 176 g을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 넣은 다음, 120분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과하여 5,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 감압 회전 증발기에 넣어 감압 농축 하여 Effendorf tube에 100 mg/ml를 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹여서 냉장보관하면서 사용할 때에는 DMEM에 희석하여 사용하였다.

### 2) 세포주 배양

쥐의 부신수질 암세포인 PC 12 세포주를 CO<sub>2</sub> 세포 배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 DMEM 배지로 배양하여, 약 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체해 주며 log phase에 있는 세포에 星香正氣散을 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이와 연관된 생화학적 실험을 시행하였다.

### 3) 세포 생존율 측정

쥐의 부신수질 암세포 PC 12 세포를 세포배양판(24 well plate)에 10% FBS/DMEM으로  $1 \times 10^5/ml$ 의 세포를 24시간 동안 정치시켜 부착시킨 후 혈청이 제거된 DMEM으로 세척하여 영양성분을 모두 제거한 상태에서 星香正氣散을 처리한 다음 각각의 시간 차에 따라서 생존율(viability)을 측정하였다. 세포의 생존율은 MTT assay 방법과 crystal violet 염색법을 이용하였다. 약제 처리 후 최종시간에 모든 배양액을 제거한 후 500  $\mu g/ml$ 의 MTT 용액을 넣어 3시간 동안 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 확인한 후 DMSO에 의해 녹여낸 다음, ELISA reader로 540 nm의 파장 하에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 항산화제 실험의 경우 MTT와의 반응으로 결과의 차이를 보이므로 이 경우에는 crystal violet으로 생존율을 결정하였다. 실험이 끝나는 시간에 배양액을 버리고 30% ethanol, 3% formaldehyde에 녹여진 0.2% crystal violet 용액으로 고정과 염색을 5분간 한

후 말려서 1% SDS(sodium dodesyl sulfate)용액으로 세포에 염색된 crystal violet을 녹여낸 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻은 값은 평균을 내어 대조군에 비교한 %로 나타내었다.

### 4) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

쥐의 부신수질 암세포 PC 12를 4℃에서 15분 동안 lysis buffer (1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA(ethylene diamine tetra aceticacid), 1 mM PMSF(phenylmethyl sulfonyl fluoride), 1  $\mu g/ml$  aprotinin, 1  $\mu g/ml$  leupeptin, 2 mM DTT(dithiothreitol), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리시켰다. 원심분리한 후 얻은 상층액은 BCA(Bicinchoninic acid, Sigma Co, St. Louis, U.S.A.)방법으로 정량하여 assay buffer(100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1  $\mu g/ml$  aprotinin, 1  $\mu g/ml$  leupeptin, 2 mM DTT)에 희석되어 형광표지된 기질(YVAD-AMC 혹은 DEVD-AMC)과 37℃에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380 nm)와 emission wavelength (460 nm)를 사용하였다. 기질은 caspase-3 protease의 경우는 fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD 50 $\mu M$ 을, caspase-9 protease의 경우는 7-amino-4-coumarin(AMC)-YVAD 50  $\mu M$ 을 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase activity를 측정하였다.

### 5) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분질현상을 알아보기 위하여 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Co, Medison, WI)를 이용하여 추출하였다. 먼저 星香正氣散이 처리된 PC 12에 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴하고 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진

공진조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet를 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer (Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5  $\mu$ g을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

6) 핵단백질의 추출

전사인자들의 활성을 측정하기 위하여 먼저 星香正氣散이 처리된 PC 12로부터 다음과 같이 핵추출물만을 분리하였다. 세포를 200  $\mu$ M PMSF, 10  $\mu$ g/ml Aprotinin, 20  $\mu$ M Pepstatin A, 100  $\mu$ M Leupeptin 및 100  $\mu$ M Antipain이 들어 있는 저삼투압 용해용액과 10분간 얼음에서 팽창시킨 후 Nonidet P-40을 0.1% 되게 반응시키고 2,500 rpm에서 원심분리하여 세포질액만을 버린 후 pellet를 모아서 저삼투압 용액과 고염완충용액을 넣은 후 핵막을 터뜨려 핵단백질만을 모아서 정량한 후 5-10  $\mu$ g만을 EMSA에 이용하였다. 단백질의 표준농도는 BSA (bovine serum albumin)를 사용하였다.

7) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NF- $\kappa$ B의 활성도 측정을 위한 NF- $\kappa$ B의 consensus binding site를 가진 oligonucleotide probe는 5'-CCG GCC GGT TAA CAG AGG GGG CTT TCC GAG; 5'-CCG GCT CGG AAA GCC CCC TCT GTT AAC CGG이며, AP-1는 5'-AAG GCG CTT GAT GAC TCA GCC GGA A; 5'-AAG GTT CCG GCT GAG TCA TCA AGC G를 합성하여 10 mM Tris-HCl 용액 (pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT 함유)에 희석한 후 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 다음 실온에서 annealing한 후 100 ng을 Rediprime kit(Amersham, England)를 이용하여 <sup>32</sup>P를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 5-10  $\mu$ g의 핵단백질과 실온에서 30분간 반응시킨 후 냉온실에서 4% polyacrylamide gel에 걸어 0.5  $\times$  TBE buffer로 전기영동하

였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF- $\kappa$ B 활성도를 측정하였다.

8) 통계처리

실험의 통계처리는 Student' paired and/or unpaired t-test에 준하였으며, p-value가 최소한 0.01의 값을 보이는 경우 유의한 차이의 한계로 삼았다.

실험성적

1. 星香正氣散이 영양공급 차단시 발생하는 PC 12 세포의 死滅 과정에 미치는 영향

혈청 공급이 차단된 상태의 PC 12 세포는 뇌영양 공급 차단시 발생하는 뇌세포 사멸 기전을 연구하는 중요한 실험모델로 사용되어 왔다. 따라서 본 실험에서는 牛胎兒血清(FBS)이 제거된 상태에서 발생하는 세포사멸현상에 星香正氣散 추출물이 뇌세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 먼저 PC 12 세포를 24시간 동안 부착시킨 후 glucose와 혈청이 들어 있지 않은 DMEM으로 세포를 세척한 후 24시간 동안 배양시 그 생존율은 PC 12 세포가 12시간 안에 32.1% 수준으로 생존율이 감소하였으나, 星香正氣散이 뇌세포의 생존율을 110% 수준까지 유지함을 확인하였다 (Table 1).

Table 1. The Neuroprotective Effects of *Sunghyang-junggisan*(SHJS) on the Cell Death by Serum/Glucose Deprivation

Serum/Glucose	SHJS ( $\mu$ g/ml)	Viability (%)
+	0	100 $\pm$ 2
-	0	32.1 $\pm$ 5
-	20	78.4 $\pm$ 3*
-	100	96 $\pm$ 2*
-	200	110 $\pm$ 1**

The cells (3  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well) were seeded in 24-well plate for 24 hr and washed with serum/glucose-free DMEM, treated without FBS or with various concentrations of SHJS (20, 100, 200  $\mu$ g/ml as indicated) for 24 hr. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the mean  $\pm$  S. D. of three different experiments.

\* P<0.01 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

\*\* P<0.005 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

2. Protein kinase와 星香正氣散이 영양공급 차단 시 발생하는 PC 12 세포의 死滅 과정에 미치는 영향

영양성분의 고갈에 의한 세포사멸과정 중 protein kinase의 역할을 증명하기 위하여 protein kinase C (PKC)의 활성물질인 200 nM의 PMA와, protein kinase A (PKA)를 활성화시키는 물질인 DB-cAMP를 혈청제거 직후 처리하였고, 星香正氣散은 대조군으로 처리하여 세포생존율로 그 역할을 증명하였다 (Table 2). 星香正氣散의 세포생존율은 99%에 이르는 반면 PMA에 의해서는 그 생존율이 67%에 이르렀으며, PKA의 활성화 물질인 DB-cAMP에 의해서는 91%, adenylyl cyclase의 활성화 물질인 forskolin에 의해서는 88% 수준의 생존율을 유지하였다. 이 결과에서 PKC는 PC 12 세포의 영양성분의 고갈에 의한 세포사멸과정 중 보호작용이 없는 것으로 보이고, PKA가 그 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

그렇다면 星香正氣散의 PC 12 세포에 대한 보호작용의 기전이 PKA에 의한 것인지를 알아보기 위하여 星香正氣散을 처리하기전 PKA의 활성도를 특징적으로 저해하는 물질인 20 µM의 KT5720을 30분간 前 처리한 다음 24시간 후 세포생존율을 확인하였던 바, 星香正氣散의 PC 12 세포에 대한 보호효과가 80% 수준으로 떨어졌다 (Table 3). 따라서 星香正氣散의 효과는 PKA에 의해 매개되고 있음을 알 수 있다.

**Table 2.** Activation of Protein Kinase A, but not Protein Kinase C, Protected PC 12 Cells during Serum Deprivation

Drugs	Serum	Viability (%)
-	+	100±1
-	-	66±2.3
SHJS	-	99±2
PMA	-	67±1.9
DB-cAMP	-	91±1.4*
Forskolin	-	88±1.2**

The cells (3 x 10<sup>5</sup> cells/well) were seeded in 24-well plate for 24 hr and washed with serum-free DMEM, treated without 10% FBS or with SHJS (200 µg/ml), PMA (200 nM), DB-cAMP(200 µM), forskolin (20 µM) for 24 hr. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the mean % ± S. D. of three different experiments.

\* P<0.01 by student's t-test, compared to only serum-starved group

\*\* P<0.005 by student's t-test, compared to only serum-starved group

**Table 3.** The Neuroprotective Effects of Sunghyangjunggisan is Mediated by Protein Kinase A

Serum	KT5720	SHJS	Viability (%)
+	-	-	100±1.2
-	-	-	65±2
-	-	+	99±3*
-	+	+	80±1.2**
-	+	-	60±3

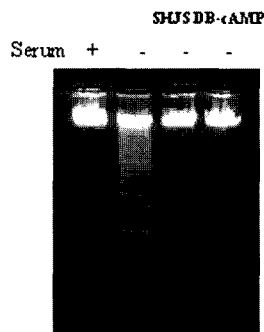
The cells (3 x 10<sup>5</sup> cells/well) were seeded in 24-well plate for 24 hr and washed with serum-free DMEM, refreshed DMEM without 10% FBS or pretreated with KT5720 (1 µM) for 30 min before adding of SHJS (200 µg/ml). After 24 hr, the viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the mean % ± S. D. of three different experiments.

\* P<0.01 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

\*\* P<0.005 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

3. 星香正氣散이 영양공급 차단시 발생하는 PC 12 세포의 사멸과정 중 chromatin의 condensation과 fragmentation에 미치는 영향

혈청과 glucose가 제거된 PC 12 세포의 세포사멸 과정에서 星香正氣散의 보호작용을 보이는 기전을 PKA에 의한 보호작용과 비교하고자 DNA분절 현상을 비교하였다 (Fig. 1). PKA에 의한 작용과 마찬가지로 星香正氣散에 의하여 DNA분절 현상이 전혀 일어나지 않았다. 형광염색물질인 DAPI staining에



**Fig. 1.** Sunghyangjunggisan inhibited the ladder pattern of DNA fragmentation on serum deprivation-induced apoptosis.

The dose-dependent neuroprotective effects of SHJS on the cell death by serum deprivation. Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gels. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

의한 nucleus의 염색시 영양공급이 차단되었을 때의 chromatin의 condensation과 fragmentation 또한 星香正氣散에 의해 거의 발생하지 않음을 알 수 있었다.

4. 星香正氣散이 caspase 활성화에 미치는 영향

위에서 관찰된 혈청과 glucose가 제거된 상태에서 발생하는 뇌세포의 apoptosis가 caspase의 활성화와 관계가 있는지 여부와 星香正氣散의 효과를 확인하기 위하여 20, 200  $\mu\text{g/ml}$ 로 20시간 처리 후에 caspase계 cysteine protease에서 caspase-3 cysteine proteases 및 caspase-9 cysteine protease의 활성 변화정도를 조사하였다. PC 12 세포는 앞의 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 혈청과 glucose를 고갈시키면 12시간 이내에 현저한 고사에 이르게 되는데 10시간 이후에 caspase-3의 활성도는 정상대조군에 비하여 20배에 이르렀다 (Table 4). 이는 caspase-3가 apoptosis의 신호를 전달받아 직접적인 세포붕괴 작업을 수행하기 때문에 그 활성도가 현저하게 증가함을 알 수 있다. 그러나 星香正氣散을 20, 200  $\mu\text{g/ml}$  전처리시에는 그 활성도를 2.5 배 이하로 감소시킴을 확인하였다.

caspase-9은 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 방출을 도와 apoptosis에 참여하게 된다. 6시간 이후의 caspase-9의 활성도가 증가함을 확인하였다(Table

4). 星香正氣散은 또한 그 활성도를 0.9배까지 이르게 감소시켰다.

5. 星香正氣散이 mitogen-activated protein kinase의 활성화에 미치는 영향

앞에서의 결과를 토대로 확인한 星香正氣散의 PC 12 세포에 대한 보호효과의 신호전달기전을 알아보기 위하여 세포내부의 protein kinase들의 연결기전을 관찰하였다. 먼저, extracellular stimuli가 전해질 수 있는 주요기전인 막에 연결된 Ras와 그 아래 세포질의 kinase의 과정, 특히 mitogen-activated protein kinase (MAPK)들의 역할을 알아보고자 저해제인 FTI (farnesyl transferase inhibitor)를 전처리하여 혈청이 들어있지 않은 DMEM으로 세포를 세척한 후 측정 한 결과 뇌세포 보호효과는 星香正氣散 처리시의 99% 수준에서 39%로 감소되었다 (Table 5). 이 결과는 저해제의 농도에 따라 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 Ras를 경유해서 보호효과가 진행되고 있음을 보여주는 결과이다.

또한 MEK를 특정적으로 저해하는 것으로 알려진 PD 98059의 경우에도 최고 20  $\mu\text{M}$  처리시에 40% 수준으로 PC 12 세포에 대한 보호효과를 저해하였다 (Table 6). 이는 星香正氣散이 성장인자나 분화에 관여하는 MAPK인 ERK 1/2를 통해 신호를 전달하고 있음을 증명하는 결과이다.

**Table 4.** *Sunghyangjunggisan* Reduced the Enzymatic Activation of Caspase-3/Caspase-9 Proteases by Serum/Glucose Deprivation in PC 12 Cells

Serum/ Glucose	SHJS ( $\mu\text{g/ml}$ )	Caspase-3 Activity(arbitrary unit)	Caspase-9 Activity(arbitrary unit)
+	0	1 $\pm$ 0.005	1 $\pm$ 0.1
-	0	20 $\pm$ 0.8	1.6 $\pm$ 0.05
-	20	18 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.01*
-	100	7 $\pm$ 0.1*	-
-	200	2 $\pm$ 0.005**	0.9 $\pm$ 0.02**

The cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 24-well plate for 24 hr and washed with serum/glucose-free DMEM, treated with/without FBS or with various concentrations of SHJS (20, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$  as indicated) for 24 hr. Lysates from the cells used to measure the activity of caspase-3/caspase-9 by using fluorogenic peptide DEVD-AMC (50  $\mu\text{M}$ ). Results represented as the mean  $\% \pm$  S. D. of three different experiments.

\* P<0.01 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

\*\* P<0.005 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

**Table 5.** The Farnesyl Transferase Inhibitor Attenuated the Neuroprotection of *Sunghyangjunggisan*

SHJS	Serum	FTI( $\mu\text{M}$ )	Viability (%)
-	+	-	100 $\pm$ 2
-	-	-	39 $\pm$ 2.9
+	-	-	99 $\pm$ 1.9
+	-	1	58 $\pm$ 2.2
+	-	2	39 $\pm$ 2.3*
-	-	1	39 $\pm$ 2

The cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 24-well plate for 24 hr and washed with serum-free DMEM, refreshed DMEM without 10% FBS or pretreated with FTI (1, 2  $\mu\text{M}$ ) for 30 min before adding of SHJS (200  $\mu\text{g/ml}$ ). After 24 hr, the viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the mean  $\% \pm$  S. D. of three different experiments.

\* P<0.005 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

**Table 6.** The MEK Inhibitor, PD98059, Attenuated the Neuroprotection of *Sunghyangjunggisan*

SHJS	Serum	PD98059( $\mu$ M)	Viability (%)
-	+	-	100 $\pm$ 1
-	-	-	39 $\pm$ 1.5
+	-	-	99 $\pm$ 1.9
+	-	10	63 $\pm$ 2
+	-	20	40 $\pm$ 2.6*
-	-	10	40 $\pm$ 2.4

The cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 24-well plate for 24 hr and washed with serum-free DMEM, refreshed DMEM without 10% FBS or pretreated with PD98059 (10, 20  $\mu$ M) for 30 min before adding of SHJS (200  $\mu$ g/ml). After 24 hr, the viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the mean %  $\pm$  S. D. of three different experiments. \* P<0.005 by student's t-test, compared to only serum/glucose-starved group

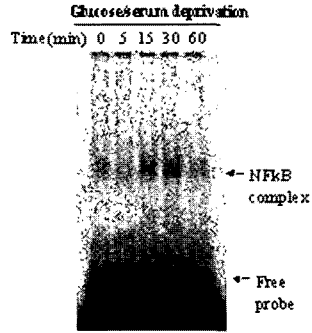
6. 星香正氣散이 전사활성인자 (transcriptional activator) NF- $\kappa$ B와 activator protein-1 (AP-1) 활성화에 미치는 영향

NF- $\kappa$ B는 각기 다른 자극에 의해서 발생하는 apoptosis에 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며<sup>11)</sup>, 이와는 반대로 활성화된 NF- $\kappa$ B가 apoptosis 유도에 직접적으로 관련하고 있음이 보고되고 있다<sup>12)</sup>. 혈청과 glucose가 제거된 상태에서 발생하는 세포 고사가 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성변화와 星香正氣散 추출물의 처리 후에 발생하는 변화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 처리된 세포들을 모아 핵단백질만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 방법으로 NF- $\kappa$ B 활성을 조사하였다. 혈청과 glucose가 결핍된 DMEM으로 세척 후 15분 후부터 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화가 진행되었으며 30분에 최고 활성을 보여주었으며, 1시간 이후부터는 급격히 전사인자의 활성을 보이지 않았다(Fig. 2).

星香正氣散 처리시에는 소량인 20  $\mu$ g/ml에 의해서도 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화가 저해되었다(Fig. 3).

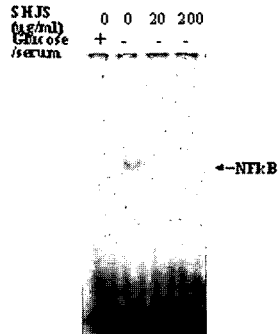
**고 찰**

腦는 생체 내에서 심장과 함께 대사가 가장 활발한 기관이며 glucose를 연소시켜 energy를 생성한다. 또한 뇌는 glucose와 산소를 저장하는 능력이 없으며



**Fig. 2.** The time-dependent activation of NF- $\kappa$ B by serum/glucose deprivation.

The nucleus of the cells were extracted by hypertonic buffer detailed in Materials and Methods. The nuclear extracts were probed with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P CTP-labelled oligonucleotide for NF- $\kappa$ B. Nuclear protein were incubated with the probes and separated on 4% polyacrylamide gel electrophoresis. The signal was quantitated with PhosphorImager analyzer (Fuji Co., Japan). These data represented the one of triplicated experiments.



**Fig. 3.** *Sunghyangjunggisan* reduced the transcriptional activation of NF- $\kappa$ B induced by serum/glucose deprivation.

Nuclear extracts from PC 12 cells were subjected to an electrophoretic mobility-shift assay with  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide probes containing the NF- $\kappa$ B. The signal was quantitated with PhosphorImager analyzed (Fuji Co., Japan). These data represented the one of triplicated experiments. Cells were either unstimulated (lane 1) or stimulated with serum/glucose-free medium (15 min pulse) in the absence (lanes 2) or presence (lanes 3, 4) of SHJS as indicated.

로 지속적으로 혈액이 공급되어야만 기능을 유지할 수 있는데, 만일 虛血로 인해 뇌조직에 정상적인 혈

류공급이 수분동안 차단되면 뇌세포의 변성 및 비가역적인 손상을 받아 그 기능을 상실하게 된다<sup>13)</sup>.

이러한 虛血의 기전은 여러 가설을 통해 검증되어 왔는데, 최근에는 분자생물학 및 유전학적 연구를 통해 능동적 세포사멸기전인 apoptosis가 신경계 질환의 신경세포 사멸기전에 관여한다는 증거들이 증가하고 있다<sup>14)</sup>.

Apoptosis는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 枯死 (programmed cell death)를 말하는 것으로<sup>15)</sup>, 괴사 (necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절되는 생리과정이다. 일반적으로 세포가 심각한 상해를 입은 경우에 나타나는 괴사는 세포막의 파괴, 세포의 팽창(swelling), 용해(lysis)를 동반하는 반면, apoptosis 현상은 빠른 세포탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상(blebbing), 세포질 내의 칼슘 농도의 증가, chromatin의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절 (ladder pattern DNA fragmentation, 200 base pairs) 형성, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체 (apoptotic body)의 형성을 동반한다<sup>16)</sup>. Apoptosis의 유도 기전은 종양치사인자 (tumor necrosis factor)에 의한 세포사멸 연구에서 신호전달 기전이 밝혀지기 시작하였으며<sup>17)</sup> 최근에는 caspase계 cystein proteases (caspase family cystein proteases)나 MAP kinase (mitogen activated protein kinase)의 중요성이 제시되고 있다<sup>17)</sup>. 한편, apoptosis를 조절하는 인자는 아직도 많은 부분이 미비하지만 protein kinase C(PKC) 또는 protein kinase A(PKA)가 관여하고 있음이 증명되고 있다<sup>19)</sup>. Apoptosis에 관한 많은 분자생물학적 지식이 축적되면서, apoptosis의 기전이 AP-1 (activator protein-1), NF- $\kappa$ B와 같은 초기 반응 유전자 (early immediate gene)와 많은 관련이 있음이 알려져 왔으며 이러한 유전인자들의 활성화 여부는 apoptosis 연구에 중요한 단서가 될 수 있다<sup>19,22)</sup>.

뇌허혈의 병태생리가 차츰 밝혀지기 시작하면서 그 치료에 있어서도 많은 연구가 진행되고 있는데,

급성기 혈전용해제와 신경보호제의 개발은 가장 핵심적인 치료전략으로 떠오르고 있으나 허혈에 의한 신경세포 손상에 효과적으로 사용될 수 있는 다양한 약제를 개발해 내는 것은 매우 어려운 일이다. 허혈 상태에서 신경세포가 생존할 수 있는 시간이 극히 제한되어있기 때문에 뇌허혈의 급성기에 재관류를 위한 혈전용해제와 신경세포 손상을 최소화시킬 수 있는 적절한 신경보호제 개발은 현대의학이 당면한 주요과제의 하나로 부각되고 있다<sup>4,23)</sup>.

허혈 및 출혈로 분류되는 뇌혈관 질환은 韓醫學에서 中風의 범주에 속하는데<sup>24)</sup> 그 原因은 다양하지만 風, 火, 痰, 虛, 瘀血 등이 주요원인이며<sup>25,27)</sup>. 이에 대한 中風의 治療는 疎風, 清熱瀉火, 理氣祛痰, 補虛 및 活血化瘀를 기본으로 하는데<sup>2,28)</sup>, 급성기 치료에서는 調氣를 우선으로 하여 氣血의 疏通을 중시하고 있다<sup>5,29)</sup>.

중풍초기의 치법에 있어서 王<sup>30)</sup>, 嚴<sup>31)</sup> 등은 調氣를 우선으로 하였으며, 朱<sup>27)</sup>도 治痰을 우선으로 하였으나 肥人中風 痰涎壅盛에 먼저 理氣로써 急治하라 하여 藿香正氣散과 星香散을 合方하여 처음 사용하였다.

이에 저자는 중풍 초기 조기의 목적으로 활용되는 星香正氣散의 효능을 실험적으로 구명하기 위하여 PC 12 세포의 혈청과 glucose 고갈을 유발시켜 각종 protein kinase와 transcriptional activator의 역할을 관찰하였다.

본 실험에 사용된 PC 12 세포는 성장인자공급이 차단된 상태의 허혈성 손상으로 인한 기전 연구에 사용되는 세포모델<sup>32)</sup>이다. 지속적으로 혈청을 차단하게 되면 세포손상을 받으면서 apoptosis에 빠지게 되는데, 특히 glucose의 차단시 급성으로 신경세포사 (delayed neuronal death) 현상이 나타난다(Table 1). glucose와 혈청이 결핍된 배지에 의해서는 PC 12 세포가 12시간 안에 30% 수준으로 생존율이 감소되어지는 반면, 星香正氣散은 PC 12 세포의 생존을 농도 의존적으로 100%로 유지함을 확인하였다(Table 1). 이러한 星香正氣散의 PC 12 세포에 대한 보호효과는 여러 protein kinase에 의하여 매개됨을 알 수 있는데, 星香正氣散을 처리하기 전 PKA의 활성도를 특정적



으로 저해하는 물질인 20  $\mu$ M의 KT 5720을 30분 전 처리한 다음 24시간 후의 세포생존율은 80% 수준으로 감소되었다(Table 3). 이는 星香正氣散의 효과가 PKA에 의해 매개됨을 보여주는 결과이다. 또한 혈청과 glucose가 고갈된 상태에서 발생하는 세포사멸 현상시 星香正氣散에 의한 PC 12 세포의 보호기전을 protein kinase A에 의한 보호기전과 비교시 DNA 분절현상이 전혀 일어나지 않았다(Fig. 1). 형광염색물질인 DAPI staining에 의한 nucleus의 염색시 영양공급이 차단되었을 때의 chromatin의 condensation과 fragmentation 또한 星香正氣散에 의해 거의 발생되지 않음을 알 수 있었다.

한편, caspase family는 염증반응이나 포유동물의 apoptosis 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로는 세포내에서 불활성화된 효소형태로 존재하다가 apoptosis 유도 자극시 활성화 된다.

Apoptosis의 특징적인 현상을 초래하는 세포내 신호전달기전에서 caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있는데, 이러한 caspase는 cysteine protease로서 지금까지 14개가 알려져 있으며 이중 caspase-3 (CPP32, yama)의 역할에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다. Caspase 작용은 표적기질에 따라 아미노산 배열중 DEVD를 인식해서 절단하는 CPP 32-like caspase (caspase-3)와 YVAD를 인식해서 절단하는 ICE-like caspase로 대별된다. 일단 caspase-3이 활성화 되면 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), lamin, MEKK, 및 다른 caspases 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달활성을 조절함으로써<sup>32)</sup>, apoptosis에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. 최근의 보고에 의하면 death suppressor protein중의 하나인 Bcl-2 protein 역시 caspase-3에 의해 분할됨이 보고되고 있다<sup>34)</sup>. 위에서 관찰된 혈청과 glucose가 고갈된 상태에서 발생하는 PC 12 세포의 apoptosis시 caspase계 cysteine protease에서 caspase-3 cysteine protease 및 caspase-9 cysteine계 protease의 활성화를 보이게 되는데 星香正氣散은 또한 그 활성도를 감소시켰다 (Table 4). 이는 星香正氣散의 신호가 caspase의

upstream일 가능성을 내포하는 것이며 星香正氣散이 PC 12세포에 대한 보호효과가 있음을 입증하는 결과로 사료된다.

한편, 유핵세포의 신호전달경로의 주된 형태는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)라 불리는 것으로서, 다양한 기질특이성이나 세포의 자극에 대한 반응성을 보여 주지만, 기본적인 구조와 활성화 방법 등은 매우 유사한 것으로 밝혀지고 있다. 세포 내부로 extracellular stimuli가 전해질 수 있는 주요 기전은 막에 연결된 Ras와 그 아래 세포질의 kinase의 과정, 특히 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family로 구성된 기전이 주를 이룬다. Ras는 mitogens, cytokines, environmental stresses 그리고 자외선 노출 등의 자극에 의한 세포의 반응을 보이는 신호전달기전에서 중요한 역할을 하는 small GTPase 분자이다<sup>35)</sup>. Ras는 정상이거나 형질전환된 세포 성장시 필요한 외부자극에 의한 신호전달시 활성화 형태인 GTP-bound와 불활성화 상태인 GDP-bound상태의 주기를 반복하면서 세포내부의 molecular switch로서의 기능을 한다<sup>36)</sup>. 활성화된 Ras는 2개의 protein kinase인 Raf-1 그리고 MEK (MAPK) kinase (MEKK1)를 활성화시키며 MEKK1은 그 아랫쪽 MAPK인 JNK와 ERK를 활성화시키는데<sup>37)</sup>, 특히 JNK를 선호하여 신호를 전달하게 되며 Raf-1은 JNK가 아닌 ERK를 활성화시킨다고 알려져 있다<sup>36,37)</sup>. 가장 많이 밝혀진 MAPK 과정은 ERK 과정으로 Raf-1, MEK1 그리고 ERK1/2를 활성화시키는데 이는 신경성장인자 (NGF, nerve growth factor), epidermal growth factor (EGF) 그리고 인슐린과 같은 성장인자에 대해 반응한다고 알려져 있다<sup>38)</sup>.

星香正氣散의 PC 12 세포에 대한 보호기전은 farnesyl transferase 저해제와 MEK 저해제를 사용하여 알 수 있었는데 (Table 5,6), 이는 Ras를 경유해서 성장인자나 분화에 관여하는 MAPK인 ERK1/2를 통해 신호를 전달하고 있음을 보여준다.

NF- $\kappa$ B는 각기 다른 자극에 의해 발생하는 apoptosis에 대해 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며<sup>19,20)</sup>, 이와는 반대로 활성화된 NF- $\kappa$ B가

apoptosis 유도에 직접적인 관련이 있음이 보고되고 있다<sup>21)</sup>. NF- $\kappa$ B는 자극이 없을 때에는 inhibitory protein인 I $\kappa$ B- $\alpha$ 나 또는 I $\kappa$ B- $\beta$ 와 결합하고 있어서 핵 내로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 나 또는 I $\kappa$ B- $\beta$ 가 파괴되어 NF- $\kappa$ B가 활성화가 된다. NF- $\kappa$ B의 부적절한 활성화는 급성염증반응, 급성기반응 (acute phase response), 방사선 손상, 죽상경화증 및 악성종양과 같은 여러 가지 질병의 유발과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다<sup>22)</sup>.

혈청과 glucose가 고갈된 상태에서 발생하는 세포 고사시 NF- $\kappa$ B 전사인자는 30분 이내에 활성화가 이루어지고(Fig. 2) 星香正氣散을 전처리시엔 소량인 20  $\mu$ g/ml에 의해서도 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화가 저해된다 (Fig. 3). NF- $\kappa$ B의 활성화는 산화적 손상기전에 의해서도 조절됨이 알려지고 있다<sup>23)</sup>.

이상의 결과를 종합하면 星香正氣散은 protein kinase A와 Ras/MEK를 자극하여 세포사멸에 관여하는 전사인자의 활성을 억제함으로써 혈청과 glucose의 고갈을 유발시킨 PC 12 세포의 보호작용이 있는 것으로 나타났으므로, 허혈성 뇌졸중 초기의 뇌세포 손상을 보호하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 이에 대한 작용기전 및 임상적 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

## 결론

중풍초기에 사용되는 星香正氣散의 효능을 실험적으로 구명하고자 혈청과 glucose 고갈을 유발시킨 PC 12 세포에 星香正氣散을 처리한 후 세포생존율, 염색사의 응축과 핵분절, caspase 활성화 및 protein kinase와 transcriptional activator의 활성도를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 星香正氣散은 농도의존적으로 PC 12 세포의 사멸을 보호하였다.
2. 星香正氣散의 PC 12세포 보호작용은 protein kinase A에 의해 매개되었다.
3. 星香正氣散은 caspase-9과 caspase-3의 활성을

현저하게 감소시켰다.

4. 星香正氣散의 PC 12 세포 보호효과는 ERK1/2 및 Ras를 통하여 진행되었다.

5. 星香正氣散은 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제시켰다.

이상의 결과로 보아 星香正氣散의 PC 12 세포에 대한 보호효과를 입증할 수 있었으며, 그 기전은 protein kinase A와 Ras/MEK를 자극하여 세포사멸에 관여하는 전사인자의 활성의 억제에 의한 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 戴思恭. 證治要訣(醫部全錄 VI). 香港: 宇光出版社. 1976:35-6.
2. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울: 南山堂. 1992:124.
3. 李鍾馨. 晴崗醫鑑. 서울: 成輔社. 1990:214-5,219-21.
4. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible types of ischemic cell damage. Progress in Brain Res. 1985;63:39-58.
5. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J. Neurosci. 1987;7:357-68.
6. Monyer H, Hartley DM, Choi DW. 21-Aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures. Neuron. 1990;5:121-6.
7. Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Choi DW. Mitochondria production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. J. Neurosci. 1990;15:6377-88.
8. Shigeno T, Yamasaki Y, Kato G, Kusaka K, Mima T, Takakura K, Graham DI, Eurukawa S. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. Neurosci Lett. 1990;120:117-9.
9. 文炳淳. 星香正氣散이 家菑의 頭蓋內壓 및 血壓에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 博士學位論文. 1988.

10. 柳鍾三. 星香正氣散이 흰쥐의 腦損傷에 미치는 影響. 大田大學校 大學院. 碩士學位論文. 1992.
11. Snedecor GH, Cochran WG. *Statistical Methods*, 6th ed. Ames, Iowa State University. 1967.
12. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- $\kappa$ B. *Immunology(Today)*. 1998;19:80-8.
13. 大韓神經外科學. 神經外科學. 서울:眞秀出版社. 1988;303-4.
14. Savitz SI, Rosenbaum DM. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery*. 1998;42:555-74.
15. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol(Today)*. 1993;14:126-30.
16. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am. J. Pathol*. 1991;138:447-53.
17. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem*. 1998;254:439-59.
18. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vailancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gereau Y, Griffin PR, Lavelle M, Lazebnik YA. *Nature*. 1995;376:37.
19. Amer A, David B. An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science*. 1996;274:782-4.
20. Wang CY, Marty WM, Alber S, Baldwin Jr. TNF and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science*. 1996;274:784-7.
21. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Ann. Rev. Immunol*. 1994;12:141-79.
22. Siebenlist U, Franzo G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Ann. Rev. Immunol*. 1994;12:405-55.
23. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg*. 1992;77:169-84.
24. 全國 韓醫科大學 心系內科學 教室. 心系內科學. 서울:書苑堂. 1999;420-35.
25. 劉完素. 劉河間三六書. 서울:成輔社. 1976;37-44,323-30.
26. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울:大成文化社. 1976;281.
27. 朱丹溪. 丹溪心法. 서울:杏林書院. 1965;19.
28. 楊思澍, 張樹生, 傅景華. 中醫臨床大全(上冊). 北京:北京科學技術出版社. 1991;193-4.
29. 張壽頤 著, 元秦喜 譯. 國譯 中風輯註. 서울:大成文化社. 1994;294-6.
30. 王肯堂. 證治準繩(1). 臺北:新問豐出版公司. 1974;37,40-1.
31. 嚴用和. 濟生方(醫部全錄 VI). 香港:宇光出版社. 1976;16.
32. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976;73:2424-8.
33. Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem*. 1995;270:3255-60.
34. Cheng EH, Kirsh DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. *Science*. 1997;278:1966-8.
35. Hill CS, Trisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 1995;80:199-211.
36. Boguski MS, McCormic F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature(London)*. 1993;366:643-54.
37. deVries-Smits AMM, Bergering BMT, Leever SJ, Marshall CJ, Bos JL. Involvement of p21 ras in activation of extracellular signal-regulated kinase. *Nature(London)* 1992;357:602-4.
38. Yan M, Dai T, Deak CJ, Kyriakis JM, Zon LI, Woodgett JR, Templeton DJ. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature(London)*. 1994;372:798-800.