

원 지

## SNAP 유도성 RINm5F 세포 독성에 대한 黃連 추출물의 방어효과

류도곤, 권강범, 양정예<sup>1)</sup>, 김은경, 김강산<sup>2)</sup>

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 전북대학교 구강생체과학연구소<sup>1)</sup>, 원광대학교 한의과대학 내과학교실<sup>2)</sup>

### Protective Effect of *Coptidis Rhizoma* on SNAP-Induced Cytotoxicity in Pancreatic RINm5F Cells

Do-Gon Ryu, Kang-Beom Kwon, Jeong-Yeh Yang<sup>1)</sup>, Eun-Kyung Kim, Kang-San Kim<sup>2)</sup>

Department of Physiology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, Korea  
Institute of Oral Bioscience, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk, Korea<sup>1)</sup>

Department of Internal Medicine, Iksan oriental medical hospital, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, Korea<sup>2)</sup>

**Objectives** : *Coptidis rhizoma* (CR) is an oriental medicine that has been used in many traditional prescriptions against diabetes mellitus in Korea for centuries. Our purpose was to determine the protective effect and its action mechanism of CR on the cytotoxicity of pancreatic -cell line (RINm5F cell).

**Methods** : In this experiment, we used methods such as MTT assay for detection of cytotoxicity, DNA fragmentation assay for detection of apoptotic cell death, LDH activity assay for detection of necrotic cell death, and measurement of DiOC<sub>6</sub> (3) retention for detection of mitochondrial membrane potential (MMP).

**Background** : Nitric oxide (NO) is believed to play a key role in the process of pancreatic -cell destruction leading to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM).

**Results** : Exposure of RINm5F cells to chemical NO donor such as S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) induced cytotoxic events such as DNA fragmentation and lactate dehydrogenase (LDH) release into medium. However, pretreatment of RINm5F cells with CR extract (10~50 $\mu$ g/ml) for 3 hours prevented SNAP-induced DNA fragmentation and LDH release into medium through the inhibition of MMP disruption.

**Conclusions** : These results suggest that CR may be a candidate for a therapeutic or preventing agent against IDDM. (J Korean Oriental Med 2003;24(2):159-165)

**Key Words**: *Coptidis rhizoma*, diabetes mellitus, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, cytotoxicity

## 서 론

당뇨병은 유전, 바이러스, 혹은 유해화학물질 등의 원인으로 췌장의  $\beta$ -세포에서 insulin 분비가 감소하는 제 1형 당뇨병 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)과, 체내 insulin에 대한 수용체 및 신호전달에 관련된 물질의 이상으로 insulin의 효용이 떨어지는 제 2형 당뇨병 (insulin-independent diabetes mellitus,

· 접수 : 2003년 3월 15일 · 논문심사 : 2003년 4월 1일  
· 채택 : 2003년 4월 30일  
· 교신저자 : 김강산, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학 익산한방병원 내과학교실 (Tel. 063-850-2103, Fax. 063-842-3138, E-mail: bandit77@hanmail.net)  
· 본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (02-PJ9-PG3-20500-0009).

NIDDM) 으로 구분할 수 있으며, 적절한 치료 없이 오랫동안 지속되면 눈 (diabetic retinopathy), 신장 (diabetic nephropathy), 신경 (diabetic neuropathy)의 손상과 고혈압 등의 합병증을 유발하여 결국 죽음에 이르게 하는 대사성 질환으로, 미국의 경우 사망에 이르는 세 번째 원인이 되고 있다<sup>1,2)</sup>. 제 1형 당뇨병의 주된 원인은 췌장  $\beta$ -세포의 파괴로 인한 insulin 분비 능력의 감소인데 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나 면역 세포 등에서 생산된 싸이토카인(cytokines)에 의한 산화질소(nitric oxide, NO)의 생성이 그 주된 원인으로 알려져 있다<sup>3-6)</sup>. 최근에 싸이토카인 혹은 산화질소에 의한 췌장  $\beta$ -세포의 독성은 bcl-2(anti-apoptotic molecule) 단백질의 발현을 억제하여 일어난다고 보고되었으며<sup>7)</sup>, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential)의 분열(disruption)로 유발된다고 보고되었다<sup>8,9)</sup>.

黃連(Coptidis rhizoma, CR)은 毛茛科(미나리아재비과;Ranunculaceae)에 속한 다년생초목인 黃連(Coptis japonica MAKINO) 및 동속 근연식물의 근경으로서<sup>10)</sup> 항염증<sup>11)</sup>, 암세포 성장의 억제<sup>12,13)</sup> 효과, 그리고 성장과 관련된 rcl과 같은 유전자의 발현 증가 효과가 있는 것<sup>14)</sup>으로 알려지고 있다. 그러나 항 당뇨에 대한 黃連의 효과는 접할 수 없었다. 黃連의 주성분인 berberine은 항염증<sup>15)</sup>, 항균<sup>16)</sup>, 항암 효과<sup>14)</sup>를 포함한 다양한 약리학적, 생물학적 효능을 가지고 있다고 보고되었다.

이에 저자는 黃連 추출물의 항 당뇨 효과를 조사하기 위하여 먼저 췌장  $\beta$ -세포계인 RINm5F 세포에 산화질소 공여체인 S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)을 처리하기 3시간 전에 黃連 추출물을 처리하여 세포독성에 대한 방어효과를 조사하였으며 그 기전을 규명하기 위하여 미토콘드리아 막 전위를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Culture medium RPMI 1640, fetal bovine serum 및 trypsin-EDTA는 Gibco Ltd. (Paisley, Strathclyde, UK)에서 DiOC<sub>6</sub>(3)는 Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)에서 lactate dehydrogenase (LDH) assay kit, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) 및 cyclosporin A (CsA)는 Sigma (Saint Louis, Missouri, USA)에서 electrophoresis equipment는 Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 세포배양

RIN, clone 5F (RINm5F) 세포는 NEDH rat islet cell tumor에서 유래한 췌장  $\beta$ -세포계로서 17) American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 10,000 units/ml penicillin, 50 ug/ml streptomycin, 그리고 2.5 ug/ml amphotericin B가 함유된 RPMI 1640 배양액에서 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>, 37℃가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

#### 3) 黃連 추출물의 제조

黃連은 원광대학교 한의과대학 부속 익산 한방병원에서 구입하였으며 다음과 같이 추출하였다. 黃連 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액만 수집하여 회전 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 32.12g의 분말 시료(#omcphy-90)를 얻은 후 사용하기 전까지 -70℃ 냉암소에 보관하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포 생존율 조사

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)가 formazan으로의 환원을 이용한 방법을 이용하여 조사하였다<sup>18)</sup>. 요약하면 黃連 추출물과 SNAP이 포함된 배양액에서 세포(10<sup>4</sup>/well)를 96well plate에 24시간 노출시킨 후

PBS로 두 번 씻어낸 후 MTT(100mg/0.1ml PBS)를 각 well에 첨가하였다. 37℃에서 1시간이 지난후 formazan crystal를 용해하기 위하여 DMSO(100μl/well)를 첨가한 후 ELISA(E-max, Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) DNA fragmentation(분절) 조사

DNA 분절현상을 조사하기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하였다. 요약하면 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 spectrophotometer하에서 O.D.값을 측정하여 DNA를 정량한 후 DNA 5ug을 2% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

3) Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 조사

LDH 활성도의 측정은 최적화 된 LDH/LD procedure (Sigma, USA)를 이용하였다. 요약하면 phosphate buffer (pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate로 환원시키는 반응을 이용한 것으로340nm의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 됨을 이용하여 LDH 활성도를 측정하였다.

4) 미토콘드리아 막 전위 (mitochondrial membrane potential) 조사

미토콘드리아 막 전위는 선택적인 미토콘드리아 형광염료인 DiOC<sub>6</sub>(3)를 이용하여 조사하였다<sup>19)</sup>. 요약하면 시약을 처리한 후 세포(5×10<sup>5</sup>)를 포함하고 있는 500μl의 배양액에 100nM DiOC<sub>6</sub>(3)를 30분동안 노출시켰다. 그 후 세포를 PBS로 두 번 씻어낸 후 600ul의 deionized water를 첨가한 후 균질화 하였다. DiOC<sub>6</sub>(3)의 미토콘드리아내 보유 정도는 488nm의 excitation, 500nm의 emission wavelength에서 spectro-

fluorometer(F-2500, Hitachi, Japan)를 이용하여 측정하였다.

5) 통계처리

실험결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 세포 생존율에 대한 효과

산화질소 공여자(donor)인 SNAP에 대한 黃連 추출물의 방어효과를 세포 생존율을 분석하기 위하여 RINm5F 세포에 SNAP을 24시간 동안 노출시키기 3시간 전에 黃連 추출물을 10, 20, 50ug/ml의 농도로 처리하였다.

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 SNAP을 처리한 군에서는 세포 생존율이 대조군에 비하여 36.3%로 유의한 감소를 나타냈으며 黃連 추출물을 전 처리한 군에서는 SNAP에 의한 생존율의 감소를 농도 의존적으로 방어하였다. 또한 미토콘드리아 막 전위 분열에 대한 선택적 억제제인 cyclosporin A (CsA)를 30분

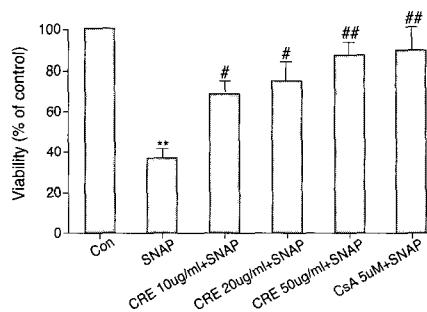


Fig. 1. Effect of *Coptidis Rhizoma* Extract (CRE) on cell viability in SNAP-treated RINm5F cells. RINm5F cells were pretreated with CRE for 3 hour and CsA for 30 min and then treated with SNAP for 24 hour. Their viability was determined by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A<sub>570</sub> of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean ± SEM of four independent experiments. \*\*p<0.01 vs control; #p<0.05, ##p<0.01 vs SNAP.

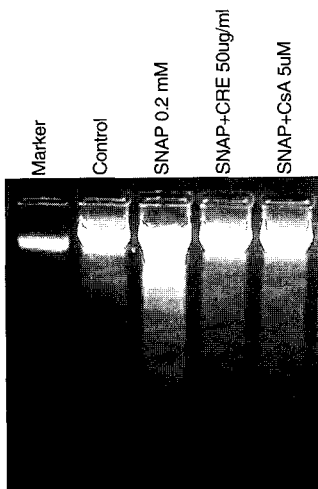
동안 전처리 한 결과 SNAP에 의한 세포 생존율의 감소가 유의하게 억제되었다(Fig. 1).

### 2. DNA 분절에 대한 효과

SNAP에 의한 RINm5F 세포 독성에 대한 黃連 추출물의 방어효과를 세포고사(apoptosis)의 특징적인 현상중의 하나인 DNA 분절 현상을 이용하여 조사하기 위하여 SNAP에 24시간 동안 노출시키기 3시간 전에 黃連 추출물을 3시간 동안 처리한 후 genomic DNA를 얻어 분절 현상을 확인 하였다. 그 결과 SNAP를 처리한 군에서는 DNA 분절 현상이 나타나 세포고사 효과를 나타냈으며 黃連 추출물을 전 처리한 군에서는 DNA 분절 현상이 나타나지 않아 SNAP에 의한 세포고사 효과를 방어하였다. 또한 CsA를 30분 동안 전처리 한 군에서도 SNAP에 의한 DNA 분절 현상이 나타나지 않았다(Fig. 2).

### 3. LDH 활성도의 증가에 대한 효과

SNAP에 의한 RINm5F 세포 독성에 대한 黃連 추

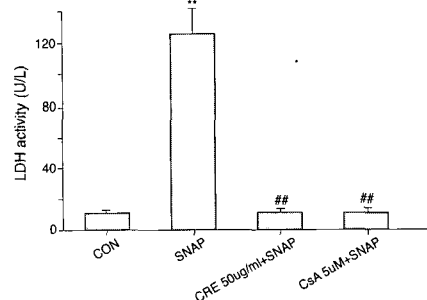


**Fig. 2.** Protection of RINm5F cells from SNAP-induced DNA fragmentation by *Coptidis Rhizoma* Extract (CRE) pretreatment. RINm5F cells were pretreated with CRE for 3 hour and CsA for 30 min and then treated with SNAP for 24 hour. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods.

출물의 방어효과를 세포괴사(necrosis) 현상중의 하나인 LDH release를 이용하여 조사하기 위하여 SNAP에 24시간 동안 노출시키기 3시간 전에 黃連 추출물을 3시간 동안 처리한 후 배양액 내로 누출된 LDH의 양을 측정하였다. 그 결과 SNAP를 처리한 군에서는 LDH 누출이 대조군에 비하여 114.5%가 증가하여 세포 독성을 나타냈으나 黃連 추출물을 전 처리한 군에서는 LDH의 누출이 증가하지 않았다. 또한 CsA를 30분 동안 전처리 한 군에서도 SNAP에 의한 LDH 누출의 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

### 4. 미토콘드리아 막 전위 분열에 대한 효과

SNAP의 세포독성에 대한 黃連 추출물의 방어효과 기전을 구명하기 위하여 미토콘드리아 막 전위 분열에 대한 黃連 추출물의 효과를 조사하였다. 미토콘드리아 막 전위는 200uM SNAP을 3시간 동안 처리하였을 때 DiOC<sub>6</sub>(3)의 보유 정도가 대조군에 비하여 50% 정도 감소하여 막 전위의 분열이 일어나 SNAP에 의한 RINm5F 세포독성은 막 전위 분열로 인하여 일어남을 확인 하였다. 이에 대한 黃連 추출물의 방어효과를 조사하기 위하여 SNAP에 3시간 동안 노출시키기 전에 3시간 동안 여러 농도의 黃連 추



**Fig. 3.** Protection of RINm5F cells from SNAP-induced LDH release by *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) pretreatment. RINm5F cells were pretreated with CRE for 3 h and CsA for 30 min and then treated with SNAP for 24 h. LDH activity released into the medium was determined as material and method. Values are mean±SEM from four experiments. \*\* $p < 0.01$  vs control; ## $p < 0.01$  vs SNAP.

출물을 처리 한 후 미토콘드리아 막 전위를 조사 하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 DiOC<sub>6</sub>(3) 보유 정도가 증가하여 SNAP에 의한 막 전위 분열을 방어하였다. 또한 막 전위 분열의 선택적 억제제인 CsA를 전처리 한 결과 SNAP에 의한 막 전위 분열을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

### 고찰 및 결론

黃連은 毛茛科(미나리아재비과 ; Ranunculaceae)에 속한 多年生草本인 黃連 (*Coptis japonica* MAKINO) 및 同屬 近緣植物의 根莖으로 성미는 苦, 寒 無毒하고 心·肝·胃·大腸 四經에 작용하며 淸熱燥濕·淸心除煩·瀉火解毒 등의 효능이 있어 濕熱下痢, 痞滿, 嘔吐, 泄瀉, 心火亢盛, 煩躁不眠, 心煩, 胃火牙痛, 消渴, 肝火脇痛, 吐衄下血, 癰腫瘡毒, 耳目腫痛 등의 병증을 치료한다고 알려져 있다<sup>10)</sup>.

본 연구는 SNAP에 의한 韃장 β-세포계인 RINm5F 세포 독성에 대하여 黃連 추출물이 방어효과를 나타냈으며 그 기전이 미토콘드리아 막 전위 분열의 억

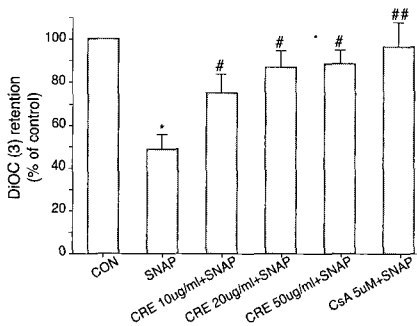
제를 통하여 이루어짐을 밝힌 논문이다.

현재까지 알려진 제 1형 당뇨병의 발생 원인중의 하나가 싸이토카인에 의해 생성된 산화질소이다<sup>6)</sup>. 산화질소는 韃장 β-세포를 두가지 유형 즉 세포고사(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)의 형태로서 파괴한다고 알려져 있다<sup>7)</sup>.

본 연구에서 산화질소 공여체인 SNAP을 24시간 처리하였을 경우 RINm5F 세포 생존율이 대조군에 비하여 73.7% 감소하는 것으로 나타났으며 생존율의 감소는 DNA 분절과 LDH 활성도의 증가를 통하여 확인하듯이 각각 세포고사와 세포괴사의 형태로서 생존율의 감소를 나타낸 것으로 나타났다. 이러한 결과는 전 실험자들의 결과<sup>3,4,7)</sup>과 일치하였다.

그러나 黃連 추출물을 전처리 한 군에서는 SNAP에 의한 생존율의 감소, DNA 분절 현상, LDH 활성도의 증가를 억제하였다. 黃連은 항 염증<sup>11)</sup>, 암세포 성장의 억제<sup>12,13)</sup> 효과가 있는 것으로 밝혀졌으나 韃장 β-세포계인 RINm5F 세포를 이용한 연구는 처음 시도이다. 黃連의 주성분은 berberine으로서 다양한 생물학적 효과를 지닌 것으로 알려져 있다<sup>14,16)</sup>. 그러나 berberine은 SNAP에 의한 세포 독성을 방어하지 못하였다(미발표 성적). 이러한 결과는 黃連의 방어효과가 berberine 이외에 다른 성분에 의한 효과일 수도 있으며 또는 다양한 성분의 혼합에 의한 효과일 수도 있으리라 사료된다.

최근에 다양한 형태의 세포고사와 세포괴사가 공통적으로 미토콘드리아 막 전위의 분열을 공유한다고 알려지고 있다<sup>20,21)</sup>. 그래서 黃連 추출물의 SNAP에 의한 세포독성에 대한 방어효과가 미토콘드리아 막 전위의 분열 억제를 통하여 나타나는지 조사하였다. 미토콘드리아 막 전위의 양적 측정을 위하여 선택적인 염료인 DiOC<sub>6</sub>(3)를 사용하였다. DiOC<sub>6</sub>(3)는 미토콘드리아 막 전위의 작용으로 인하여 세포내에 흡수되어 보유되는 형광염료로서 다양한 물질에 의한 막 전위 정도를 측정하는데 이용되고 있다<sup>22,23)</sup>. 본 연구에서 SNAP을 RINm5F 세포에 3시간 동안 처리하였을 경우 DiOC<sub>6</sub>(3)의 보유정도가 감소하여 미토콘드리아 막 전위 분열이 일어났으며 黃連 추출물을 3시



**Fig. 4.** Protection of RINm5F cells from SNAP-induced mitochondrial membrane potential disruption by *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) pretreatment. RINm5F cells were pretreated with CRE for 3 h or CsA for 30 min and followed by incubation with 0.1 mM SNAP for 3 h. During the last 30 min of treatment, DiOC<sub>6</sub>(3) was added. An aliquot of the cells was used for the determination of cell-associated DiOC<sub>6</sub>(3) fluorescence. Values are mean ± SEM from four experiments. \**p*<0.05 vs control; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs SNAP

간 동안 전처리 한 군에서는 막 전위 분열이 일어나지 않았다. 이러한 결과는 SNAP의 세포독성에 대한 黃連 추출물의 방어효과는 미토콘드리아 막 전위 분열의 억제를 통하여 이루어진다고 할 수 있다. 또한 세포고사와 세포괴사에 관련된 중요한 미토콘드리아 내 단백질 중의 하나가 bcl-2이다<sup>7)</sup>. 항-세포고사 단백질인 bcl-2는 정상적인 상태에서 미토콘드리아 외막에 존재하며 bax 단백질(전-세포고사 단백질)의 삽입을 억제하거나 또는 미토콘드리아 막 전위의 분열을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>24,25)</sup>. 현재의 연구에서 黃連 추출물의 SNAP에 의한 세포독성의 방어 기전에 bcl-2 단백질의 관여를 배제할 수 없으며 앞으로 이에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

결론적으로 黃連 추출물은 췌장  $\beta$ -세포계인 RINm5F 세포에 대한 산화질소 공여자인 SNAP의 독성에 대하여 방어효과를 나타냈으며 그 기전은 미토콘드리아 막 전위 분열의 억제인 것으로 사료된다. 앞으로 黃連의 항 당뇨 효과에 대한 심도있는 기전 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Harrison TR. Diabetes Mellitus Principles of internal medicine 11th Ed. 1987:1778-1797.
2. Mahler RJ, Adler ML. Type 2 Diabetes Mellitus: Update on diagnosis, pathophysiology, and treatment J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999;84(4):1165-1169.
3. Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Molvig J, Pociot F, Johannesen J, Nerup J. Cytokine and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. Curr Top Microbiol Immunol. 1990;164:169-193.
4. Corbett JA, McDaniel ML. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. Diabetes 1992; 41:897-903.
5. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as a beta-cell targeted disease of immunoregulation. J Autoimmun. 1995;8:439-463.
6. Eizirik DL, Flodstrom M, Karlsen AE, Welsh N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase

and related genes in pancreatic beta cells. Diabetologia 1996;39: 875-890.

7. Saldeen J. Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2- inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. Endocrinology 2000;141:2003-2010.
8. Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Bosca L, Kroemer G Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. FEBS Lett. 1990;410:373-377.
9. Barbu A, Welsh N, Saldeen J. Cytokine-induced apoptosis and necrosis are preceded by disruption of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in pancreatic RINm5F cells: prevention by Bcl-2. Mol Cell Endocrinol. 2002;190:75-82.
10. 辛民教. 臨牀本草學. 서울:南山堂. 1986:310-312.
11. Iizuka N, Miyamoto K, Hazama S, Yoshino S, Yoshimura K, Okita K, Fukumoto T, Yamamoto S, Tangoku A, Oka M. Anticachectic effects of Coptidis rhizoma, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. Cancer Lett. 2000;158:35-41.
12. Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, Tangoku A, Hayashi H, Yosino S, Abe T, Morioka T, Hazama S, Oka M. Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. Cancer Lett. 2000;148:19-25.
13. Iizuka N, Hazama S, Yoshimura K, Yoshino S, Tangoku A, Miyamoto K, Okita K, Oka M. Anticachectic effects of the natural herb Coptidis rhizoma and berberine on mice bearing colon 26/clone 20 adenocarcinoma. Int J Cancer. 2002;99:286-291.
14. Chan CP, But PP, Ho JW. Induction of rcl, a novel growth-related gene by coptidis rhizoma in rat H4IIE cells. Life Sci, 2002;70:1691-1699.
15. Zhou H, Mineshita S. The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats in vivo and in vitro. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294:822-829.
16. Ghosh AK, Bhattacharyya FK, Ghosh DK. Leishmania donovani: amastigote inhibition and mode of action of berberine. Exp Parasitol. 1985;60:404-413.
17. Mabley JG, Cunningham JM, John N, Di Matteo MA, Green IC. Transforming growth factor beta 1 prevents cytokine-mediated inhibitory effects and induction of nitric oxide synthase in the RINm5F insulin-containing

- beta-cell line. *J Endocrinol.* 1997;155:567-75.
18. Oez S, Platzer E, Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Blut.* 1990;60:97-102.
  19. Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 1998;273:7770-7775.
  20. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998;8:267-271.
  21. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med.* 1998;187:1261-1271.
  22. Kahn E, Lizard G, Monier S, Bessede G, Frouin F, Gambert P, Todd-Pokropek A. Flow cytometry and factor analysis evaluation of confocal image sequences of morphologic and functional changes occurring at the mitochondrial level during 7-ketocholesterol-induced cell death. *Anal Quant Cytol Histol.* 2002;24:355-362.
  23. Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ, Reber HA, Pandolfi SJ. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J Cancer.* 2002;98:761-769.
  24. Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.* 2001;276:18361-18374.
  25. Xia Z, Lundgren B, Bergstrand A, DePierre JW, Nassberger L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochem Pharmacol.* 1999;57:1199-1208.