

導赤承氣湯이 白血病細胞의 Apoptosis에 미치는 효과

박민철 · 권진¹ · 정한솔 · 이광규*

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 군장대학교 보건행정과

Effects of Dojeokseungki-tang on the apoptosis of Leukemia Cell

Min Chul Park, Jin Kwon¹, Han Sol Jeong, Kwang Gyu Lee*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
1: Department of Health Administration, Kunjang College

The purpose of this research was to investigate the anticancer effects of Dojeokseungki-tang(DJSKT) on the various leukemia cell lines. DJSKT treatment suppressed proliferation of cultured-HL60, Jurkat, L1210 cells and increased apoptosis of cultured-L1210, HL60, Molt4, Jurkat cells. DJSKT treatment induced apoptosis of Jurkat cells including the morphologic changes such as the "ladder pattern" revealed by agarose gel electrophoresis of DNA in a dose-dependent manner. Administration of DJSKT induced apoptosis of transplanted-L1210 cells in vivo, and decreased of mitochondrial transmembrane potential of L1210 and Jurkat cells in vitro. DJSKT treatment reduced the expression of bcl-2 proteins in Jurkat cells and increased ICE, c-myc, p53 mRNA expression in Molt4 cells. In conclusion, these results suggest that DJSKT might be usefully applied for anti-carcinogenic agent of leukemia

Key words : Dojeokseungki-tang(導赤承氣湯), mitochondrial transmembrane potential, ladder pattern

서론

韓醫學 文獻에서 癌이라는 용어는 宋代의 東軒居士가 增註한 『衛濟寶書』¹⁾에서 최초로 기록되었으나, 『黃帝內經』에는 "腸覃", "石瘕", "膈中" 등 惡性腫瘤의 證候에 대한 기록이 있으며²⁾, 『難經』의 "積聚"³⁾, 『諸病源候論』의 "癥瘕", "石瘕", "石癭"⁴⁾ 및 後世의 "石疔", "腎岩" 등은 胃腸管, 子宮, 肝, 脾臟 등 臟器의 腫瘤를 표현하고 있다. 歷代醫家들은 대부분 그 원인을 痰滯痰濕에 두고 있는데 가령 『靈樞』 「百病始生篇」⁵⁾에서는 "汁沫과 血이 서로 격돌하면 병합되면서 응취하고 흩어질 수 없어서 積이 형성된다"라 하였고, 『丹溪心法』⁶⁾에서는 "무릇 인체의 上, 中, 下에 덩어리가 있는 것은 대부분 痰이다"라고 하였다. 또한 『中藏經』⁷⁾에서는 "무릇 癥瘕瘡腫이 생기는 것은 대개 五臟六腑에 毒氣가 쌓여 흩어지지 않아서 생긴다"라 하여 惡性腫瘤이 毒邪와 연관되어 있음을 인식하였다. 郁⁸⁾은 癌을 外感六淫, 內傷七情, 飲食不節 및 邪毒 등으로 개체의 臟腑機能이 失調되어 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 經絡瘀阻 등의 機轉으로 腫塊가 형성되고 변화되며, 이러한 변화가 相互膠雜 되면서 氣機不通 聚

集日久하여 발생하는 慢性疾患으로 인식하였다. 癌의 治療는 환자의 정기상태 및 질병의 정도에 따라 크게 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 인체 抗病能力을 증진시키는 扶正培本법과 清熱解毒, 活血祛瘀, 化痰消癥, 理氣消腫 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 배합한 扶正祛邪法 등이 활용되고 있다⁹⁾¹⁰⁾. 導赤承氣湯은 『溫病條辨』¹¹⁾의 陽明溫病 중 下之不通, 左尺牢堅, 小便赤痛, 時煩渴甚에 쓰이는 처방으로 大黃, 芒硝, 黃連, 黃柏, 生地黃, 赤芍藥 등 清熱瀉下시키는 약물로 구성되어 있다. 구성 약물에 대한 연구보고로 赤芍藥은 비교적 약한 항염작용과 아울러 抗腫瘤작용이 있다고 보고되었고¹²⁾, 生大黃은 생쥐의 脾臟과 胸腺의 重量을 증가시켰으며, 생쥐의 腹腔 大食細胞의 탐식능과 형질세포의 생성을 촉진시키는 것으로 보고되었다¹³⁾¹⁴⁾. 生地黃은 흰쥐의 足趾腫脹反應에 對抗하는 作用이 있고¹⁵⁾, 생쥐의 脾臟중의 rosette형성 세포에 대한 억제 작용이 있으며, 면역적혈구에 대한 항체생산을 증가시켜, 응혈소를 형성시키는 것으로 보고되었다¹⁶⁾. 黃連은 생쥐의 肉腫 S180세포의 DNA와 RNA 및 단백질의 합성을 억제하는 작용이 있으며¹⁷⁾, 비인두 암세포를 살상하는 작용이 있음도 보고되었다¹⁸⁾. 박¹⁹⁾ 등은 黃柏藥針이 류마티오이드 관절염의 억제에 일정한 치료효과가 있는 것으로 보고하였고, 쯔²⁰⁾ 등은 芒硝가 腸內環境의 酸化와 腸上皮細胞의 DNA합성의 억제와 관련하여 DMH로 흰

* 교신저자 : 이광규, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학
· E-mail : kwangl@core.woosuk.ac.kr, Tel: 063-290-1562
· 접수 : 2003/01/14 · 수정 : 2003/02/27 · 채택 : 2003/03/22

취의 大腸癌發生을 억제한다고 보고하였다. 이에 저자는 이러한 清熱瀉下, 活血祛瘀시키며, 抗癌능력이 있는 약물로 구성되어 있는 導赤承氣湯이 암의 치료법 중 祛邪法에 해당되는 것으로 인식하여, 백혈병 세포에 어떠한 효과를 미치는지 규명하고자 인체 및 생쥐 유래의 각종 백혈병세포에 대한 apoptosis를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계통 웅성(8주령, 20±2 g)을 다물씨이언스(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암교대의 조건하에서 고품 펠렛사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide, ethidium bromide, triton X-100, RNase A, proteinase K, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide(DiOC6), agarose, m-chlorophenyl hydrazine(mClCCP), thioglycolate(TG) (Sigma Co.), anti-rabbit Bcl-2 antibody(Santa cruz Inc.), TEMED, Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo(dT), PCR marker(Promega), dNTP set(Amersham pharmarcia), prestained SDS-PAGE standard, sodium dodecyl sulfate(Bio-Rad), 기타 시약은 특급시약 및 세포배양용 시약을 사용하였다. 사용기구로서는 culture flask(Nunc), 96well microtiter plate(Costar Co.), inverted microscope(Zeiss), laser flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), ELISA reader(Dynatech, MR5000), Gel documentation system(Bio-Rad), PCR system(Perkin Elmer, Gene Amp PCR system 2400) 그 외 centrifuge(VS -15000CF), CO₂ incubator, freeze dryer, deep freezer 등은 Vision Scientific Co.의 제품을 사용하였다.

Table 1. Contents of Dojeokseungki-tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	11.25
生地黃	Rehmanniae Radix	18.75
生大黃	Rhei Radix et Rhizoma	11.25
黃連	Coptidis Rhizoma	7.50
黃柏	Phellodendri Cortex	7.50
芒硝	Natrii Sulfas	3.75
總量		60

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 導赤承氣湯의 구성은 『溫病條辨』¹¹⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 한방병원에서 정선해서 사용하였고, 처방 2첩 분량(120 g)을 증류수 2000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 14g(수득율:11.6%)을 얻어 동

물실험시에는 생리식염수, 세포배양용에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다. 導赤承氣湯 1貼의 처방구성내용은 table 1.과 같다.

4. 각종 백혈병세포의 증식반응 측정(in vitro)

계대배양한 L1210(mouse leukemia cell line), HL60(human acute promyelocytic leukemia cell line), Jurkat 세포(human acute T cell leukemia cell line)를 96 well micro culture plate에 1×10⁶cells/well이 되도록 주입하여 DJSKT(1, 10, 100 μg/ml)를 첨가한 후, 48 시간 동안 37℃의 CO₂ 배양기 내에서 배양한 다음, 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT 용액 20 μl를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 μl로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다²¹⁾.

2. DNA fragmentation 측정(in vitro)

계대배양한 L1210, HL60, Molt4(human acute lymphoblastic leukemia cell line) 및 Jurkat 세포를 96 well culture plate에 1×10⁶ cells/well이 되도록 세포를 조정된 다음, 1, 10, 100 μg/ml의 DJSKT를 첨가하여 24 시간 동안 배양하고 배양이 종료된 후, 각 세포를 수집해서 propidium iodide(PI)로 염색하여 sub-G1 peak를 정량하였다. 단편화된 DNA의 확인은 동일한 검체에 100 μl의 nuclear lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 4℃에서 10 분간 방치한 후 16,000 rpm으로 20 분간 원심 분리한 다음, 상층액을 별도의 원심관에 취했다. RNase A(20 mg/ml) 2 μl를 가해 37℃에서 1 시간 동안 배양한 후 다시 20 mg/ml의 proteinase K(20 mg/ml) 2 μl를 가하여 37℃에서 1 시간 동안 배양하고 5 M NaCl 20 μl와 isopropyl alcohol 120 μl를 가해 -20℃에서 over night시킨다. 16,000 rpm으로 20 간 원심분리해서 상층액을 제거한 다음, TE buffer 20 μl에 용해하고 1.2% agarose gel에 전기영동을 한 후 ethidium bromide(10 μg/ml)로 염색하여 단편화된 DNA를 정성적으로 확인하고 gel documentation reader로 판독하였다²²⁾.

3. 복강에 이식한 L1210 세포의 apoptosis 측정(in vivo)

생쥐에 5×10⁶cells/ml의 L1210 세포를 복강 내 주사한 다음 DJSKT(500 mg/kg body weight)를 7 일간 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 복강에서 L1210 세포를 무균적으로 수집하고 세포부유액을 조제해서 세정(×3회, PBS)한 후, 1×10⁶cells/well이 되도록 각 세포를 조정, 원심분리(250g, 10분, 4℃)하고 침전시킨 세포분획에 PI(10 μg/ml)를 20 μl/1×10⁶세포의 농도로 염색(4℃, 30분간 반응)한 다음 유세포분석기(Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm emission: 620 nm)를 이용해서 DNA 단편화(sub-G1 peak)를 정량하였다²³⁾.

4. Mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm) 측정(in vitro)

계대 배양한 L1210 세포와 Jurkat 세포를 96 well micro

culture plate에 1×10^6 cells/well이 되도록 주입하여 DJSKT(1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 후, 24시간 동안 37°C의 CO₂ 배양기 내에서 배양한 다음, 각각의 세포를 eppendorf tube에 수집하고 원심분리(250 g, 10 분)해서 침전시킨 세포분획에 DiOC6(최종농도: 40 nM)로 염색시켜 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm emission: 525 nm)로서 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi_m$)을 측정하였으며, 이때 negative control로서는 uncoupling agent로서 carbamoyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (mCICCP, 50 μM)을 가하여 동일한 방법으로 측정하였다²⁴⁾.

5. 단백질 정량 및 Western blot analysis²⁵⁾(in vitro)

배양된 Jurkat 세포에 DJSKT를 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 48 시간 동안 처리한 후 수집하여 PBS로 washing하고 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1%NP-40)를 사용하여 30분 가량 얼음에 둔 다음 pipetting으로 용해시키고 원심분리를 이용하여 상층액을 얻은 다음 Bradford reagent를 이용하여 단백질을 정량하였고²⁶⁾, 전체 lysate 100 $\mu\text{g}/\text{lane}$ 을 기준으로 12% SDS PAGE gel에 loading하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질들은 PVDF membrane으로 230 mA에서 1 시간 동안 transfer하였고, 5% skim milk를 이용하여 4°C에서 overnight 시켜 blocking하였다. 1차 항체는 anti-rabbit bcl-2를 1: 500으로 PBS에 희석하여 실온에서 4 시간 동안 반응시켰고, 2차 항체는 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-goat IgG를 1: 1000으로 PBS에 희석하여, 실온에서 2 시간 동안 반응시키고 ECL을 이용하여 band를 확인하였다.

6. RT-PCR²⁷⁾(in vitro)

DJSKT를 농도별로 처리(1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)한 후, 48 시간 동안 37°C의 CO₂ 배양기 내에서 배양한 Molt4 세포로부터 RNA를 분리하였다. Total RNA는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조 회사의 방법에 준하였다. cDNA는 M-MLV reverse transcriptase 와 random hexamer를 primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Perkin Elmer 2400 thermocycler에서 30 cycle 동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 95°C에서 30 초간 denaturation 시킨 후, 55°C에서 30 초간 annealing 시키고, 72°C에서 30 초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색을 하였다. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다: ICE sense(5'-AAT GCT GCT ACA AAA TCT GG-3'), ICE antisense(5'-ATC ATC CTC AAA CTC TTC TG-3'), c-myc sense(5'-CGT CTC CAC ACA TCA GCA CA-3'), c-myc antisense(5'-CCG CAA CAA GTC CTC TTC AG-3'), p53 sense(5'-CCT CCT GGC CCC TGT CAT CT -3'), p53 antisense(5'-ACA AAC ACG CAC CTC AAA GC -3').

7. 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, p<0.05를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 각종 백혈병세포의 증식에 미치는 효과

계대배양한 L1210 세포와 HL60, Jurkat세포에 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 DJSKT를 48 시간 동안 처리하여, MTT assay를 통해 세포증식반응을 측정된 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, L1210 세포에서는 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도투여군에서 각각 89.5±11.8%, 57.3±13.6%로 증식을 억제하였으나 유의성은 인정되지 않았고, HL60 세포에서는 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도 투여군에서 각각 95.2±9.2%, 90.7±3.7%, 75.9±6.7%로 농도 의존적으로 증식을 억제하였으며, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 유의성있는 억제를 나타냈다. 또한 Jurkat 세포에서는 1, 10 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도 투여군에서 각각 89.1±8.3%, 73.1±5.3%, 64.1±6.1%로 농도 의존적으로 증식을 억제하였으며, 특히 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 유의성있는 억제를 보였다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effect of DJSKT on the proliferation of cultured L1210, HL60 and Jurkat leukemia cells

Cell Type	L1210	HL60	Jurkat
DJSKT($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
CONTROL(-)	100±0.5	100±1.8	100±1.8
1	113.8±3.6	95.2±9.2	89.1±8.3
10	89.5±11.8	90.7±3.7	73.1±5.3*
100	57.3±13.6	75.9±6.7*	64.1±6.1*

DJSKT(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was treated with cultured L1210, HL60 and Jurkat leukemia cells, and incubated for 48 hours, and the cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. The data represents the mean ±SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group(p<0.05).

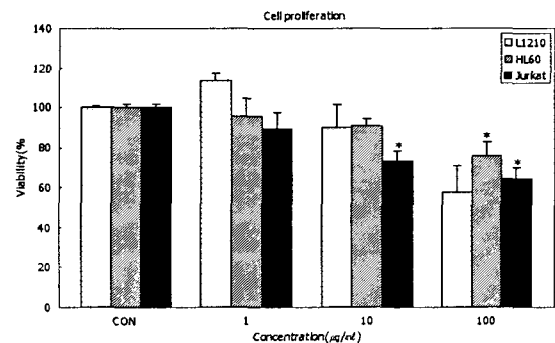


Fig. 1. Effect of DJSKT on the cell viability in cultured various leukemia cells. DJSKT(1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were treated to cultured L1210, HL60 and Jurkat cells for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Each data represents the mean ±SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group(p<0.05).

2. 각종 배양 백혈병세포의 apoptosis에 미치는 효과

계대배양한 HL60, Molt4 및 Jurkat 세포와 L1210세포에 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 DJSKT를 24시간 동안 처리하여 apoptosis를 측정된 결과, 농도 의존적으로 apoptosis를 유도하였으며 특히 Jurkat 세포에 대한 효과가 가장 좋았다(Table 3).

HL60세포에서는 대조군이 22.1±1.9%인데 비해 실험군에서는 각각 27.4±2.4%, 30.2±2.9%, 34.7±4.0%, 36.9±3.2%로

apoptosis를 유도하였으며, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도군에서 유의성을 보였다. Molt4세포에서는 대조군이 $18.7 \pm 1.3\%$ 인데 비해 실험군에서는 각각 $19.6 \pm 1.9\%$, $22.9 \pm 2.3\%$, $32.1 \pm 3.7\%$, $37.4 \pm 3.1\%$ 로 apoptosis를 유도하였으며, 특히 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도군에서 유의성을 보였다. Jurkat세포에서는 대조군이 $23.8 \pm 2.4\%$ 인데 비해 각각 $31.1 \pm 3.0\%$, $40.6 \pm 3.6\%$, $45.9 \pm 4.1\%$, $57.3 \pm 4.7\%$ 로 apoptosis를 농도의존적으로 유도하였으며, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도군에서 유의성을 보였다. 또한 L1210세포에서는 대조군이 $21.3 \pm 2.1\%$ 인데 비해 실험군에서는 각각 $26.5 \pm 3.3\%$, $35.7 \pm 3.1\%$, $37.3 \pm 3.9\%$, $41.6 \pm 5.2\%$ 로 apoptosis를 유도하였으며, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도군에서 유의성있게 apoptosis를 촉진하였다.

Table 3. Effect of DJSKT on the apoptosis of cultured-HL60, Molt4, Jurkat and L1210 leukemia cells

DJSKT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell Type			
	HL60	Molt4	Jurkat	L1210
CONTROL(-)	22.1 ± 1.9	18.7 ± 1.3	23.8 ± 2.4	21.3 ± 2.1
0.1	27.4 ± 2.4	19.6 ± 1.9	31.1 ± 3.0	26.5 ± 3.3
1	$30.2 \pm 2.9^*$	22.9 ± 2.3	$40.6 \pm 3.6^*$	$35.7 \pm 3.1^*$
10	$34.7 \pm 4.0^*$	$32.1 \pm 3.7^*$	$45.9 \pm 4.1^*$	$37.3 \pm 3.9^*$
100	$36.9 \pm 3.2^*$	$37.4 \pm 3.1^*$	$57.3 \pm 4.7^*$	$41.6 \pm 5.2^*$

DJSKT(0.1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was treated to cultured HL60, Molt4, Jurkat and L1210 leukemia cells, and incubated for 24 hours, and then cells were collected and the sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean \pm S.E of 3 experiments. *: Significantly different from control group($p < 0.05$).

3. DNA fragmentation에 미치는 효과

계대배양한 Jurkat 세포에 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 DJSKT를 48시간 동안 처리한 후 DNA를 추출하고 agarose gel 상에서 전기영동하여 DNA 단편화를 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 DJSKT로 처리된 세포의 genomic DNA가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 3), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 2), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 1)의 농도에서 모두 단편화되어 있음을 관찰할 수 있었다.

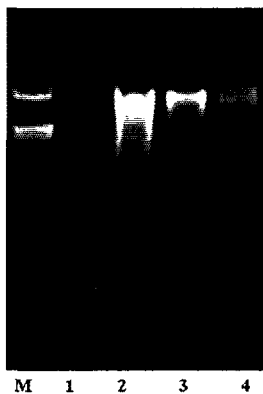


Fig. 2. Internucleosomal DNA fragmentation in Jurkat cells. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from untreated cells(control, lane 4) and cells treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 3), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 2), or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lane 1) DJSKT for 48 hours. DNA was stained with ethidium bromide after electrophoresis on a 1% agarose gel and then visualized under gel documentary system. Oligonucleosome-sized DNA fragmentation can be clearly seen in DJSKT-treated cells.

4. 복강내 이식된 L1210 세포의 apoptosis에 미치는 효과

생쥐의 백혈병세포주인 L1210 세포를 생쥐의 복강에 이식하고 DJSKT를 7 일간 경구 투여한 다음 복강에 이식된 L1210 세포를 수집하여 sub-G1 peak를 측정된 결과, 대조군은 $10.9 \pm 2.1\%$ 인데 비하여 DJSKT를 투여한 군에서는 $41.7 \pm 4.4\%$ 로 복강에 이식한 L1210 세포의 apoptosis가 현저하게 촉진되었다 (Table 4, Fig. 3).

Table 4. Effect of DJSKT on the apoptosis of transplanted L1210 leukemia cells

DJSKT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell Type
	L1210
CONTROL(-)	10.9 ± 2.1
DJSKT	$41.7 \pm 4.4^*$

L1210 leukemia cells transplanted to peritoneal cavity of BALB/c mouse. DJSKT(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. Transplanted-L1210 cells were collected from peritoneal cavity and sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. *: Significantly different from control group($p < 0.05$).

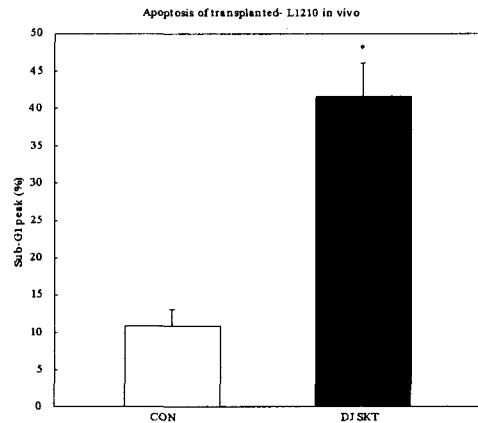


Fig. 3. Effect of DJSKT on the apoptosis of transplanted-L1210 leukemia cells.

5. 백혈병세포의 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi_m$)에 미치는 효과

세포사가 진행되는 과정 중, mitochondria의 swelling이 일어나기 전 단계에서 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi_m$)의 감소가 선행되어 일어난다는 보고를 확인하기 위하여 L1210 및 Jurkat 세포 배양계에 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DJSKT를 첨가해서 apoptosis가 유도되었을 때에 $\Delta\psi_m$ 의 감소가 일어나고 있는지를 검토하였다(Table 5).

Table 5. Effect of DJSKT on the mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi_m$) of cultured-L1210 or Jurkat leukemia cells

DJSKT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Mitochondrial transmembrane potential (%)	
	L1210 cell	Jurkat cell
CONTROL(-)	77.1 ± 4.6	80.7 ± 5.5
1	69.6 ± 5.1	73.5 ± 5.2
10	$56.7 \pm 5.9^*$	$50.8 \pm 4.7^*$
100	$44.5 \pm 3.7^*$	$41.1 \pm 3.2^*$

DJSKT(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was treated to cultured L1210 or Jurkat cells and incubated for 48 hours, and then cells were collected and the $\Delta\psi_m$ was measured by a laser flow cytometer staining with DiOC6 (40nM). The data represents the mean \pm S.E of 3 experiments. *: Significantly different from control group($p < 0.05$).

그 결과 L1210 세포에서는 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서 대조군에 비해 각각 $56.7 \pm 5.9\%$, $44.5 \pm 3.7\%$ 로 $\Delta\Psi\text{m}$ 가 유의성있게 감소하였고, Jurkat 세포에서는 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서 대조군에 비해 각각 $50.8 \pm 4.7\%$, $41.1 \pm 3.2\%$ 로 $\Delta\Psi\text{m}$ 가 유의성있게 감소하였다.

6. DJSKT에 의한 bcl-2 단백질 발현 양상

DJSKT를 농도별로 48 시간 동안 처리한 Jurkat 세포에서 bcl-2 단백질 발현을 관찰하고자 Western blotting을 시행하였다. 각 농도별로 처리한 세포에서 추출한 단백질을 정량하여 100 μg /lane을 기준으로 12% SDS PAGE gel에 loading하였다. 이후 PVDF membrane에 transfer하였고, 1 차 및 2 차 항체로 반응시켰으며, band는 ECL로 확인하였다. Immuno blotting 결과(Fig. 4), 농도가 증가할수록 apoptosis를 억제시키는 bcl-2단백의 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

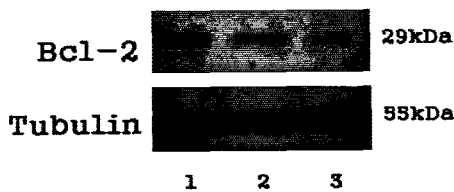


Fig. 4. Western blot analysis for bcl-2 protein. Western blot analysis showing the expression of bcl-2 in Jurkat cells cultured in medium various concentration of DJSKT extract for 48 hours. Proteins were isolated from cells treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ (lane 1), 10 $\mu\text{g/ml}$ (lane 2), 100 $\mu\text{g/ml}$ (lane 3) of DJSKT. Also shown for comparison is the level of Bcl-2 expression. Cell proteins were isolated and Western blot analysis using a specific polyclonal anti-human bcl-2 antibody was performed as described in Sect. III. 9.

7. RT-PCR에 의한 ICE, c-myc, p53 mRNA의 발현양상

DJSKT를 농도별로 투여하고 48 시간 동안 배양한 Molt4세포에서 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 PCR을 시행하였고, 1% agarose gel에서 전기영동한 결과(Fig. 5), 대조군(lane 1)에 비하여 실험군(lane 2, 3, 4)에서 apoptosis 유관 유전자인 ICE, c-myc, p53의 mRNA 발현이 전반적으로 증가하고 있음을 관찰하였다.

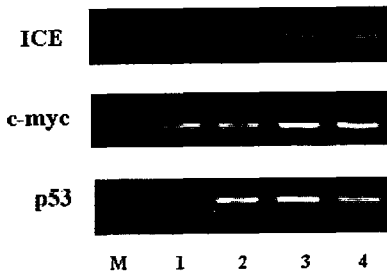


Fig. 5. Expression of apoptosis-related genes(ICE, c-myc, p53). Treatment of DJSKT for 48 hours leads to increase the expression of ICE and c-myc and p53 in Molt4 cells in a dose dependant manner. Poly(A⁺)RNA isolated from untreated cells(control, lane 1) and cells treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ (lane 2), 10 $\mu\text{g/ml}$ (lane 3), or 100 $\mu\text{g/ml}$ (lane 4) of DJSKT for 48hours.

고 찰

종양이란 개체를 구성하는 정상세포가 여러 종류의 자극에 의해 유전자의 형질이 전환되고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 면역학적 행동이 변한 변형 세포가 유전적으로 대를 이어 조절할 수 없이 증식하여 형성된 세포의 집단, 즉 새로이 생긴 종괴를 뜻한다. 암이 발생하는 빈도는 지역, 인종, 생활 양식에 따라 크게 다르나 일반적으로 인구 10 만 명 당 연간 300-400 명 정도가 되며, 악성 종양이 발생하는 빈도는 증가 추세를 보여 사망 원인 중 순환기 질환 다음으로 2 위이며, 현대의학의 암진단과 치료법을 다 동원해도 암환자의 약 반수는 결국 암으로 사망하는 것이 현재의 실상이다²⁸⁾. 서양의학에서의 암의 치료법으로는 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이 있다²⁹⁾. 암 치료의 성공 여부를 결정하는 것은 조기발견과 그에 따라 외과적 절제 혹은 방사선 치료를 통해 국한된 암을 치료할 수 있는가의 여부인데, 불행히도 대부분의 암이 진단되는 시기에 이미 전이가 일어나 있기 때문에 외과적 절제나 방사선요법 단독으로는 치료할 수 없다. 암의 화학요법에 있어서 그간 주요한 진보가 있어왔고, 지금은 약제를 효과적으로 조합하여 투여함으로써 급성 림프구성 백혈병, Hodgkin 질병, non-Hodgkin 림프종과 고환 암에 걸린 많은 환자들을 치료할 수 있게 되었다. 그럼에도 폐암, 유방암, 결장암, 전립선암과 같은 흔한 성인의 암은 여전히 화학요법으로 치료되지 않는다³⁰⁾. 최근 한의학계에서는 한약이나 약침액을 대상으로 항암·항전이³¹⁾³²⁾ 및 항암제 부작용 억제효과³³⁾³⁴⁾ 등을 검토하는 많은 연구가 진행되고 있다.

韓醫學에서 癌에 대한 문헌은 宋代의 『衛濟寶書』¹⁾에서 최초로 기술되었으며, 이전의 『黃帝內經』³⁵⁾³⁶⁾에서는 腸覃, 石瘕, 息賁, 癪病, 伏梁, 厥疝, 瘕聚 등으로 기술되었다. 巢³⁷⁾는 “留結不散”이라 하여 氣血이 체내에 留結된 결과로 발생한다고 하였고, 葛³⁸⁾은 “돌과 같이 단단하여 통증이 극심하여 주야로 울 정도이며 치료하지 않으면 백일 내에 죽는다”고 하여 오늘날의 암과 유사한 증상을 기술하고 있다. 이 외 文獻에 나타난 腫瘍의 範圍에 드는 病症으로는 反胃, 噎膈, 積聚, 痞塊, 癥瘕, 痰癖, 石瘕 등 다양하게 기술하고 있다³⁹⁾⁴⁰⁾. 東西醫學의 癌의 원인에 대한 인식을 종합해보면 外因 즉 外感六淫과 邪毒(화학적, 물리적, 바이러스성 발암인자)이 중요한 원인으로 인식되고 있으며, 이외에도 內因 즉 內傷七情과 不內外因 즉 飲食不節(유전, 연령, 인종, 지리적 요인, 면역학적 요인, 개개의 감수성 등)도 암 발생에 있어서 중요한 인자로 인식되고 있다. 이러한 암의 병인병기에 관여하는 인자들은 서로 영향을 미치고 상호 작용을 거쳐서 전체적인 암 발생의 병리과정을 형성하게 된다⁴¹⁾⁴²⁾. 韓醫學에서는 모든 질병의 발생이 外感六淫, 七情內傷, 飲食 등의 病因과 직접적인 관계가 있는 것으로 보고 있으나 『素問』 「刺法論」에서는 “不相染者正氣存內 邪不可干 避其毒氣”이라 하였고, 『素問』 「評熱病論」에서는 “邪氣所湊 其氣必虛”라 하여⁴³⁾ 正氣의 허손이 發病의 根本이고, 邪氣가 發病의 條件임을 나타내고 있다. 따라서 癌의 발생 역시 人體의 正氣虛損과 유관한 것으로 인식할 수 있다.

韓醫學에서 癌의 治療法으로는 清熱解毒, 活血祛瘀, 化痰軟堅,

行氣散結 등의 攻邪法과 健脾益氣, 健脾補腎, 益氣補血, 滋陰溫陽 등의 扶正法으로 大別하여 活用하고 있다⁴⁴⁾. 導赤承氣湯은 『溫病條辨』¹¹⁾에 수록된 처방으로 “陽明溫病, 下之不通, 左尺牢堅, 小便赤痛, 時煩渴甚”에 쓰인다고 기록되었다. 이는 溫病 중 下法을 썼는데도 大便이 통하지 않고 小腸의 熱이 盛하여 小便赤痛이 있을 때 사용하는 처방으로 火腑를 통하게 하고 胃氣를 울리며 大腸을 소통시키는 효능이 있다. 본 실험에서는 DJSKT의 항암효과를 관찰하기 위하여 L1210, HL60, Molt4, Jurkat 세포 등의 백혈병세포에 대한 증식반응, sub-G1 peak, DNA fragmentation, mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi m$) 등을 측정함과 아울러 apoptosis와 관련된 유전자인 ICE, c-myc, p53 등의 mRNA 발현을 보고자 RT-PCR을 시행함으로써 여러 백혈병 세포주에 대한 apoptosis 효과를 살펴보았다.

DJSKT를 농도별로 처리한 HL60, Molt4, Jurkat, L1210 세포에 PI 염색을 한 후 유세포분석기를 이용하여 sub-G1 peak를 정량한 결과 모든 종류의 세포에서 농도의존적인 apoptosis 유도효과가 관찰되었으며 그 중 human acute T cell leukemia cell line인 Jurkat 세포에 대한 효과가 두드러졌다. 이에 DJSKT를 농도별로 처리한 Jurkat 세포의 DNA를 추출하여 agarose gel상에서 전기영동한 결과 모든 농도 처리군에서 DNA의 laddering을 관찰할 수 있었다. 또한 in vivo상 생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포를 생쥐의 복강에 이식하고 DJSKT를 7 일간 경구 투여한 다음 복강에 이식된 L1210세포를 수집하여 sub-G1 peak를 측정한 결과, 대조군에 비하여 처리군에서 복강에 이식한 L1210세포의 apoptosis가 현저하게 촉진되었다.

최근에는 apoptosis를 유도할 만큼의 glucocorticoids에 노출된 흉선세포나 림프구에서 핵내의 변화가 생기기 전 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi m$)의 감소가 관찰되었으며⁴⁵⁾⁴⁶⁾, $\Delta\psi m$ 의 감소는 여러 다양한 자극에 대한 neuron⁴⁷⁾, fibroblast⁴⁸⁾의 apoptosis에서 일반적으로 관찰된다고 보고되었다. $\Delta\psi m$ 는 rhodamin 123; 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetradhylylbenzimidazolcarbocyanine(JC-1); 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC6(3)]과 같은 형광색소에 의해 쉽게 측정되는데 이들은 양전하를 띠고 있는 지방친화성 물질로 mitochondria내로 격리되는 특성이 있다⁴⁹⁾⁵⁰⁾. 본 실험에서 L1210 및 Jurkat세포 배양계에 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 DJSKT를 첨가하여 apoptosis가 유도되었을 때에 $\Delta\psi m$ 의 감소가 일어나고 있는지를 검토한 결과 L1210세포 및 Jurkat세포 동일하게 대조군에 비하여 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 DJSKT첨가군에서 $\Delta\psi m$ 가 유의성 있게 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

Apoptosis를 조절하는 분자생물학적인 기전에 대한 많은 정보가 *Caenorhabditis elegans*의 연구로부터 나왔다⁵¹⁾⁵²⁾. *C. elegans*의 발생 과정에서 1090개의 세포 중 131개의 세포가 apoptosis과정으로 소실되었는데 이 과정은 세 유전자에 의해 조절되어지며, CED3, CED4, CED9가 그것이다⁷⁸⁾⁷⁹⁾. CED3과 CED4는 apoptosis를 일으키는 유전자이고 CED9는 apoptosis를 억제하는 유전자이다. CED3 유전자를 클로닝한 결과 포유류의 cystein protease인 ICE와 동일하다는 사실이 밝혀졌다⁵³⁾.

Miura⁵⁴⁾ 등은 Rat-1 fibroblast에서 ICE와 CED3이 과발현되었을 때 apoptosis를 유도함을 증명하였다. 원종양유전자인 c-myc도 apoptosis의 절차에 있어 한 부분을 담당한다. 이 유전자의 역할은 성장인자가 존재할 경우 세포증식을 유도하는 반면, 성장인자가 없을 경우 apoptosis를 야기한다⁵⁵⁾. 또 많은 종양유전자와 종양억제유전자들의 산물이 apoptosis를 조절하는데 관여하는데, 그 중 종양억제유전자인 p53은 DNA의 상태를 감찰하고 DNA가 손상되었을 경우 세포주기를 촉진시키는 조절자로 알려진 cyclin-dependent kinases의 인산화를 막아주는 p21 단백질의 발현을 유도시킴으로써 세포주기를 멈추게 한다⁵⁶⁾. 이렇게 세포주기가 멈춘 상태에서는 DNA복구 기전이 활성화되는데, 만일 DNA의 복구가 실패하게 되면 p53은 apoptosis를 유도하는 bax를 과발현시키고, 항 apoptosis 작용을 하는 bcl-2발현을 억제시킴으로써 apoptosis를 야기한다⁵⁷⁾⁵⁸⁾. 여포성 림프종에서 특징적으로 관찰되는 14번 염색체와 18번 염색체간의 전좌로 인해 그 존재가 확인된⁵⁹⁾ bcl-2는 apoptosis의 조절에 있어서 중요한 억제 작용을 담당한다⁶⁰⁾. 이 단백질의 과발현은 apoptosis를 억제시킴으로써 백혈병세포를 다양한 세포독성 물질로부터 살아남게 한다⁶¹⁾. 본 연구에서 48 시간 동안 DJSKT를 농도별로 처리한 Jurkat 세포에서 단백질을 추출하여 Western blot analysis를 통해 bcl-2 단백질의 발현양상을 관찰한 결과, 농도가 높아질수록 bcl-2단백질의 발현도가 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 또한, Molt4 세포에 DJSKT를 48 시간동안 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 RT-PCR을 시행한 결과 ICE, c-myc, p53의 mRNA 발현이 전반적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

이상의 내용을 종합하면, DJSKT는 Jurkat 세포를 비롯한 여러 종류의 백혈병 세포에 apoptosis를 유발하였다. 아울러 다양한 동물실험을 통해 본 약물의 효능을 극대화하는 보충연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 논문은 우석대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음

참고문헌

1. 余桂清: 歷代中醫腫瘍論選粹, 北京, 北京出版社, pp.1-2, 1988.
2. 金達鎬, 李鍾馨: 注解 補注 黃帝內經靈樞, 醫聖堂, p.1036, 142, 2001.
3. 本間祥白: 難經之研究, 正言出版社, p.325, 1965.
4. 丁光迪: 諸病源候論校注, 人民衛生出版社, p.902, 935, 1110, 1992.
5. 金達鎬, 李鍾馨: 注解 補注 黃帝內經靈樞, 醫聖堂, p.1174, 2001.
6. 朱震亨: 丹溪醫集, 人民衛生出版社, p.246, 1993.
7. 華陀: 中藏經 卷中, 江蘇科學技術出版社, p.45, 1985.
8. 郁仁存: 中醫腫瘍學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.1-22, 41-44, 384-391, 1991.

9. 儲水鑫: 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.
10. 趙健斌: 吳一純教授治療晚期惡性腫瘤的經驗, 陝西醫學, 第14期, pp.451-453, 1993.
11. 吳鞠通: 溫病條辨 卷二 中焦篇 17條
12. 黃孔威: 赤芍對實驗腫瘤生長和轉移的影響及藥理作用的研究. 中華腫瘤雜誌, 5:1, 24, 1983.
13. 張丙生 等: 大黃揮發油對小鼠免疫功能的影響. 中藥材, 20:2, 85, 1997.
14. 攀永平 周勇, 嚴宣左: 大黃水煎液對小鼠免疫功能的影響. 中國中醫藥科技, 2:2, 24, 1995.
15. 王浴生主編: 中藥藥理與應用. 北京: 人民衛生出版社, p.400, 1983.
16. 基礎部微生物教研室. 北京醫學院學報, 10:3, 158, 1978.
17. 小林義典: 黃連含有生物鹼的拓朴異構酶依存DNA切斷活性, 國外醫學, 中醫中藥分冊, 17:4, 39, 1995.
18. 唐發清: 黃連及其復方對人鼻咽癌細胞殺傷動力學研究, 湖南中醫學院學報, 15:4, 41, 1995.
19. 박철원, 김갑성: Lipopoly saccharide 유발 토끼 관절염에서 黃柏藥針이 관절염증의 억제에 미치는 영향, 대한침구학회지, 15:1, 229-248, 1998.
20. 竺振榕, 張瑞英, 朱廣傑 等. 元明粉抑制 DMH 誘發 Sprague Dawel 大鼠大腸癌的實驗研究. 中華腫瘤雜誌, 14:1, 78, 1992.
21. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65: 55-63, 1983.
22. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G. and Riccardi, C.A.: Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods, 139: 271-279, 1991.
23. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L. Petit, P.P.X. and Kroemer, G.: Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp. Med., 181, 1661-1672, 1995.
24. Kondo, Y, and Takano, F. : Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophage enhanced with glycyrrhizin. Biol. Pharm. Bull., 17(5), 759-761, 1994.
25. Burnette, W.N.: "Western blotting" - Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112, 195-203, 1981.
26. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-254, 1976.
27. Birch DE, Kolmodin L, Laird WJ, McKinney N, Wong J, Young KKY, Zangenberg GA, Zoccoli MA: Simplified Hot-Start PCR. Nature 381: 445-446, 1996.
28. 大韓病理學會: 病理學, 高文社, p.179, 2001.
29. 서울대학교의과대학: 종양학, 서울, 서울대학교출판국, p.137, pp.1-3, 203-204, 213-215, 225-234, 1989.
30. 백문기, 홍경만 역: 암유전자, 월드사이언스, p.347, 2000.
31. 李鳳雨: 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 실험적 연구, 大韓韓醫學會誌, 15:1, 245-263, 1994.
32. 康炳林: 數種 韓藥材의 抗癌活性 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 3:2, 315-321, 1995.
33. 孫甲鎬 외: 柴胡 茵陳의 肝癌세포에 대한 抗癌活性 및 抗癌劑와의 相乘效果, 大韓韓醫學會誌, 16:2, 414-432, 1995.
34. 張代釗 외: 中醫藥對腫瘤放化療의 增敏減毒作用, 中國中西結合雜誌, 12:3, 135-138, 1992.
35. 河北醫學院: 靈樞經校釋, 人民衛生出版社, 上卷 p.78, 219, 下卷 p.37, 48, 142, 255, 326, 391, 1982.
36. 王洪圖: 黃帝內經素問, 春秋出版社, p.71, 237, 271, 1988.
37. 巢元方: 諸病源候論, 臺北, 文化圖書有限公司, pp.1-17, p.129, 1979.
38. 葛洪: 肘後備急方, 北京, 人民衛生出版社, pp.203-210, 1987.
39. 賈瑩: 癌瘤防治研究, 서울, 成輔社, pp.25-28, 1984.
40. 史宇廣 等: 當代名醫臨證精華, 腫瘤全集, 北京, 中醫古籍出版社, pp.1-25, 1992.
41. 白明玆, 金疼熙, 金聖勳: 癌과 瘵血의 東西醫學의 相關性에 대한 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 7(2), 1999.
42. 中國中西醫結合研究會 中國中醫研究院: 惡性腫瘤中西醫結合的研究成就, 中西醫結合雜誌, Vol.8(2), p.57, 1988.
43. 金達鎬, 李鍾聲: 注解 補注 黃帝內經素問(全), 醫聖堂, 下卷 p.76, 上卷 p.726, 2001.
44. 權昶賢, 金演鎮, 趙鍾寬: 國內에서 自生하는 抗癌效果가 있는 食物에 대한 考察, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 6(2), 1998.
45. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, nB., Kroemer, G., : Sequential reduction of mitochondrial -btransmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. J. Exp. Med. 182, 367-377, 1995.
46. Petit PX, Lecoer H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML: Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. J Cell Biol, 130(1):157-167, 1995.
47. Deckwerth, T.L. and Johnson, E.M., Jr.: Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor (NGF). J. Cell Biol. 123:1207-1222, 1993.
48. Vayssiere JL, Petit PX, Risler Y, Mignotte B.: Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. Proc Natl Acad Sci

- U.S.A. 22;91(24):11752-11756, 1994.
49. Johnson L.V., Walsh M.L. and Chen L.B.: Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 77, 990-994. 1980.
 50. Petit P. X., O'Connor D., Grunwald D., Brown S. C. : Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. Eur. J. Biochem., 194: 389-397, 1990.
 51. Hengartner MO, Horvitz HR: Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. Curr Opin Genet Dev 4:581-586, 1994.
 52. Horvitz HR, Shaham S, Hengartner MO: The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 59: 377-385, 1994.
 53. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR.: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β converting enzyme. Cell 75: 641-652, 1993.
 54. Miura M, Zhu H, Hartweg EA, Rotello R, Yuan J.: Induction of apoptosis in fibroblasts by interleukin-1 β converting enzyme, a mammalian homolog of *C. elegans* cell death gene *ced-3*. Cell 75: 653-660, 1993.
 55. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell, 69: 119-128, 1992.
 56. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, Cell 75: 805-816, 1993.
 57. Lane DP: P53, guardian of the genome. Nature 358: 15-16, 1992.
 58. Miyashita T, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell, 80: 293-299, 1995.
 59. Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J, Nowell PC, Croce CM.: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B-cells with the t(14; 18) chromosome translocation. Science 226: 1097, 1984.
 60. Korsmeyer SJ.: Regulators of cell death. Trends Genet 11: 101-105, 1995.
 61. Miyashita, T., Reed, J.C. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in human leukemia cell line. Blood 81, 151-157, 1993.