

瀉白散 추출물에 의한 인체 폐암세포의 Apoptosis 유도 기전에 관한 연구

이재훈 · 강병령¹ · 감철우¹ · 박동일¹ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 1: 폐계내과학교실 및 한의학연구소

Induction of Apoptotic Cell Death by Sabaek-san Extract in Human Lung Cancer A549 Cells

Jae Hun Lee, Byong Ryeong Kang¹, Cheol Woo Kam¹, Dong Il Park¹, Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, 1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Dongguk University and Research Institute of Oriental Medicine

We investigated the effects of Sabaek-san (SBS) water extract on the growth of human lung carcinoma A549 cells. Upon treatment with SBS extract, a concentration-dependent inhibition of cell viability was observed and cells developed many of the hallmark features of apoptosis, including condensation of chromatin. Flow cytometry analysis confirmed that SBS treatment increased populations of apoptotic-sub G1 phase. In addition, proteolytic cleavages of poly(ADP-ribose) polymerase and β -catenin protein were observed after treatment of SBS extract. These apoptotic effects of SBS in A549 cells were associated with marked inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL mRNA in a dose-dependent manner, however the levels of Bax expression were not affected. SBS treatment also induced a proteolytic activation of caspase-3, which is believed to play a central role in the apoptotic signaling pathway. The previous and present results indicated that SBS-induced inhibition of lung cancer cell proliferation is associated with the blockage of G1/S progression and the induction of apoptosis.

Key words : Sabaek-san(瀉白散), lung carcinoma, apoptosis, Bax, Bcl-2, caspase-3

서 론

세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의한 비정상적인 증식이 계속되는 것이 암세포라고 할 수 있다. 따라서 세포주기와 연관된 특정 유전자의 발현 조절을 통한 apoptosis 유발 기전의 해석은 암을 포함한 특정 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다. 특히 apoptosis (programmed cell death)는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다^{1,2)}, 또한 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptosis 유발의 주원인이 될 수 있다³⁾. Apoptosis의 유

발에는 세포증식에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53이나 Cdk inhibitor p21 뿐만 아니라, apoptosis를 직접 조절하는 Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다^{4,6)}. 잘 알려진 바와 같이 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도하며⁴⁾, 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 mitochondria에서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다. 특히 DNA 손상에 의한 p53의 발현 증가는 p21과 연관되어 세포주기 상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로 알려지고 있다^{4,6)}. 또한 caspase라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표

* 교신저자 : 최영현, 부산광역시 부산진구 양정동, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choiyh@dongguk.ac.kr, Tel : 051-850-7413

· 접수 : 2003/02/05 · 수정 : 2003/03/11 · 채택 : 2003/03/31

적 단백질의 분해에 관여한다^{2,4)}. 본 실험에 사용된 사백산(瀉白散)은 “소아약증직결(小兒藥證直訣)”에 처음으로 수록된 처방으로⁷⁾ 선행 연구에 의하면 사백산 추출물의 처리에 의하여 처리 농도 증가에 따른 폐암세포의 성장억제 효과가 세포주기 G1 arrest와 연관이 있었으며, 이러한 현상은 종양억제 유전자 p53의 발현 증가에 따른 세포주기 조절 억제 유전자 p21WAF1/CIP1의 발현 증가 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 저하와도 연관성이 있었다. 사백산 추출물의 이러한 효과는 암세포의 apoptosis 유발과도 밀접한 연관성을 가지기에 본 연구에서는 사백산 추출물 처리에 따른 폐암세포의 apoptosis 유발 관련 기전 해석을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 사백산

실험에 사용한 사백산 구성 약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며, 처방의 내용은 東醫寶鑑에 따랐다⁷⁾. 사백산 추출물의 준비는 Kang et al.⁹⁾의 방법에 준하였는데, 즉 상백피(桑白皮, Cortex mori), 지골피(地骨皮, Cortex Radicis) 및 감초(甘草, Radix glycyrrhizae)의 각각 중량 비 2:2:1의 비율로 혼합한 약재 1 g당 증류수 10 mL을 가하고 환류 냉각장치를 이용하여 추출한 후 동결 건조하여 고형 성분을 얻어 시료로 사용하였다.

2. 암세포주 및 사백산 추출물의 처리

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, Lee et al.¹⁰⁾의 방법에 준하여 배양하였다. 사백산 추출물의 처리를 위하여 암세포를 24시간동안 안정화시킨 후, 배양 배지에 사백산 추출물을 적정 농도로 희석하여 처리하였다.

3. Hematocytometer를 이용한 세포 성장률의 측정

세포배양용 6 wells plate를 이용하여 암세포를 분주하고 24 시간 동안 안정화시킨 후, 사백산 추출물을 48시간동안 처리하였다. 준비된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세한 후, trypan blue (Gibco BRL, Gaithersburg, MA, USA)로 염색하였다. 이를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경(x 200) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하였다¹¹⁾.

4. DNA flow cytometry에 의한 sub-G1기 세포 분석

사백산 추출물에 의한 apoptosis 유발의 여부를 조사하기 위하여 정상 및 사백산 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 염색한 후, RNase (Sigma)를 처리하여 4°C 암하에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 세포를 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 정량적 분석을 실시하였다¹¹⁾.

5. DAPI staining

사백산 추출물 처리에 의한 암세포 핵의 형태적 변화 관찰을 위하여 정상 및 48시간 동안 사백산 추출물이 처리된 암세포를 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액으로 염색한 후, 형광 현미경(x 400)을 이용하여 시료처리 농도에 따른 핵의 형태변화를 관찰하였다^{11,12)}.

6. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

Choi et al.¹³⁾의 방법에 준하여 정상 및 사백산 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 수세한 후, 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였으며, 동량의 단백질을 SDS (sodium dodecyl sulfate) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 4°C에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBST로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체를 적용시킨 다음 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다^{11,13)}. Western blot analysis를 위해 사용된 항체인 rabbit polyclonal antibody인 PARP, β-catenin 및 caspase-3는 Santa Cruz Biotechnology Int. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

7. RT-PCR

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNazol B(TEL-TEST, INC., Texas, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi¹¹⁾의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Bax, Bcl-2, Bcl-xLa 및 caspase-3 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 1).

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Bax	Sence	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Caspase-3	Sence	5'-ATG-GAG-AAC-ACT-GAA-AAC-TCA-3'
	Antisence	5'-GAA-CTC-TAT-TTT-TAT-CAC-TAA-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포의 증식에 미치는 사백산 추출물의 영향

준비된 사백산 추출물 (SBS)을 인체 폐암세포주 A549 세포에 48시간 동안 처리한 후, 살아있는 세포의 수를 계수하여 사백산이 처리되지 않은 대조군의 세포 수와 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 사백산 추출물의 처리농도 증가에 따라 폐암세포의 생존율은 처리된 윤페산의 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 1.5 mg/ml 농도의 윤페산 처리 48시간 후 생존율은 대조군(17.0×10^4 /ml)에 비하여 약 78.82% 정도 (13.4×10^4 /ml)로 감소되었으며, 3.0 mg/ml 처리군의 경우는 38.82%의 생존율(6.6×10^4 /ml)을 보였다. 한편 4.0 및 5.0 mg/ml 처리군(2.4×10^4 /ml 및 0.2×10^4 /ml)에서는 대조군에 비하여 생존율이 각각 85.88 및 98.82% 이상 감소하였다. 따라서 사백산의 처리농도 의존적으로 폐암세포의 성장이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

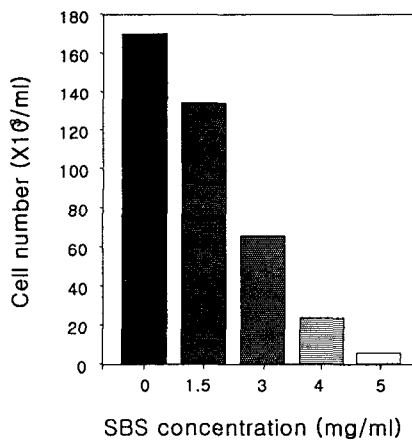


Fig. 1. Growth inhibition by water extract of Sabaek-san (SBS) treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and treated with various concentrations of SBS for 48 h. The viable cells were counted with hemacytometer. Results are expressed as percentage of the untreated control obtained from two separate experiments.

2. 사백산 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발

이상의 사백산 추출물에 의한 암세포의 성장억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 DNA flow cytometry를 이용하여 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 분석하였다¹³⁾. 이를 위해 실험 방법에 서술한 것처럼 정상 및 사백산이 함유된 배지에서 자란 세포들을 고정한 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 PI로 염색하여 flow cytometry로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에서는 apoptosis 현상을 3% 전후였으나, 사백산

추출물의 처리 48시간 후 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 급격히 증가되어 1.5 mg/ml 처리군에서 9.24%를, 3 및 5 mg/ml 처리군에서는 각각 약 13.69 및 22.98%의 세포가 apoptosis의 과정을 통하여 사멸되었음을 알 수 있었다. 따라서 사백산의 처리에 의한 apoptosis 유발의 직접적인 증거를 제시하기 위하여 정상 및 사백산이 함유된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 핵의 형태적인 변화를 조사하였다. Fig. 3은 DAPI 염색에 의한 핵의 형태에 미치는 사백산 추출물의 영향을 나타낸 결과로서, 사백산 추출물이 처리된 배지에서 자란 암세포의 경우 정상배지에서 자란 세포들에서 관찰할 수 없는 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 apoptotic body의 출현^{14,15)}이 사백산 추출물 처리 농도 의존적으로 증가됨을 알 수 있었다. 이상의 결과는 사백산 추출물의 처리에 의한 암세포 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 보여 주는 것으로 사료된다.

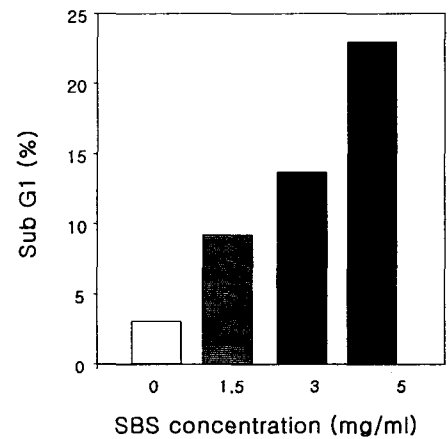


Fig. 2. Induction of apoptotic cell death by SBS treatment in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were treated with SBS for indicated concentrations for 48 h. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry. Data are means average of two separate experiments.

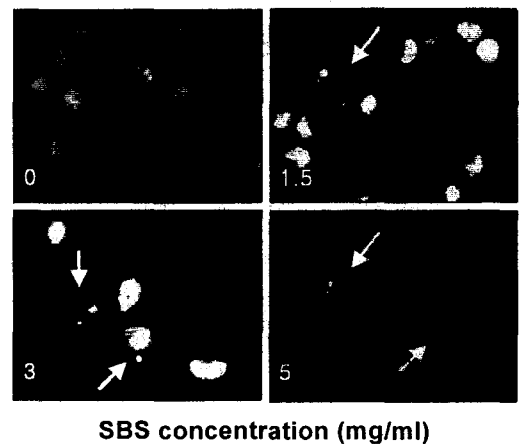


Fig. 3. Formation of apoptotic bodies by SBS treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with SBS for 48 h, and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

3. PARP 및 β -catenin 단백질의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향

다음은 사백산 추출물에 의한 apoptosis의 유발을 생화학적으로 증명하기 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질인 PARP^{16,17)}의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향을 Western blot 분석으로 조사하였다. 특정 내, 외부 신호전달에 의하여 세포 내에서 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질의 분해가 수반되며, 그 결과 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편을 관찰할 수 있다^{16,17)}. 특히 PARP는 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며¹⁸⁾, apoptosis의 과정 중 caspase의 활성화에 의해 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다¹⁸⁾. 이를 확인하기 위하여 48시간 동안 정상 및 사백산 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포의 총 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 전이시켜 PARP 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였다.

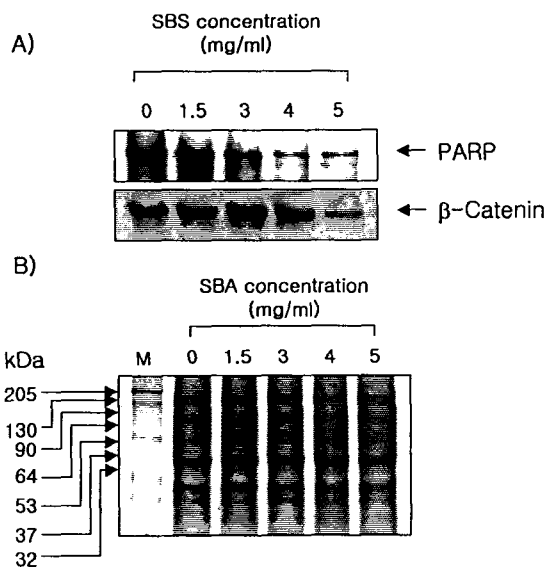


Fig. 4. (A) Down-regulation of the levels of PARP and β -catenin protein by SBS treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with SBS for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 6% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-PARP and anti- β -catenin antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Total protein patterns of A549 cells after SBS treatment. Cells were treated with SBS for 48 h and the cell lysates were prepared. Proteins were separated on 13% SDS-polyacrylamide gel and visualized by coomassie blue staining.

Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있었다. 사백산 추출물이 처리된 배지에서 배양된 세포의 경우 본 실험 조건에서 85 kDa 위치에서 발현되는 band는 관찰할 수 없었으나 PARP 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. 한편 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세

포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다¹⁹⁻²¹⁾. 사백산에 의한 apoptosis가 이러한 세포 유착과 밀접한 관계를 지니는지의 여부를 조사하기 위해서 윤폐선이 함유된 배지에서 자란 세포들의 β -catenin 발현을 조사한 결과 Fig. 4에서 처럼 고농도의 사백산 추출물 처리군에서는 대조군에 비하여 β -catenin의 발현이 현저하게 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 실험 과정에서 관찰된 사백산 추출물이 함유된 배지에서 배양된 암세포의 부착력 상실과 연관성이 있었음을 알 수 있었다.

4. Apoptosis 관련 유전자의 발현에 미치는 사백산 추출물의 영향

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 사백산 추출물이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제는 PARP 및 β -catenin 단백질의 분해와 연관된 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 사백산에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 몇 가지 유전자 산물들의 발현을 조사하였다. 그중 Bcl-2/Bax family의 대표적 유전자인 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다⁴⁾. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로 부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspases 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 효소 활성을 조절한다^{4,22)}. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다^{22,23)}. Fig. 5는 RT-PCR에 의한 결과로서 사백산 추출물의 농도 증가에도 Bax의 발현에는 큰 변화가 없었다. 그러나 Bcl-2 및 Bcl-2 family에 속하는 Bcl-xL의 발현은 사백산 추출물의 처리농도 의존적으로 발현이 감소되었음을 알 수 있었다. 따라서 사백산 추출물의 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발에는 Bax의 발현 증가보다는 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현 감소와 연관성이 있는 것으로 사료된다. 한편 ICE/CED-like protease family인 caspase 역시 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로서 작용하는데^{1,2)}, 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며, Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성화가 조절되는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 따라서 지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 (CPP32)의 발현 정도를 조사하였다. Caspase-3가 활성화된 형태로 관찰되려면 불활성 형태인 32 kDa의 상대적 발현이 줄어들거나 그들의 활성형인 17 및 19 kDa 분자량을 가지는 활성형의 단백질 발현이 증가되어야 한다. Fig. 6의 결과에서 볼 수 있듯이 사백산 추출물의 처리에 의하여 mRNA의 발현에는 큰 영향 없이 불활성형인 procaspase-3 단백질의 발현이 사백산 처리 농도 의존적으로 감소되었을 알 수 있었다. 즉 사백산의 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2/Bax family의 발현 변화에 의한 caspase-3의 활성화와 관련이 있었음을 알 수 있었다.

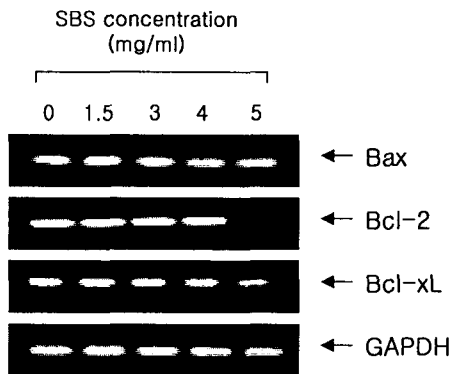


Fig. 5. Inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL mRNA by SBS in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with SBS for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

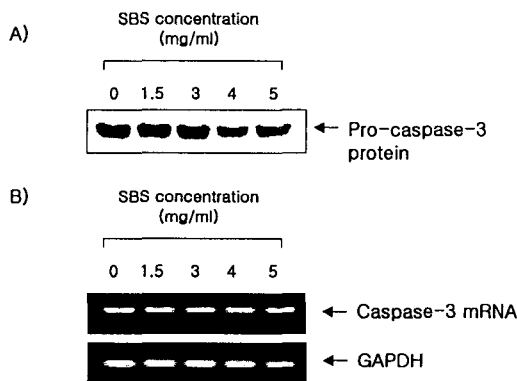


Fig. 6. Activation of caspase-3 by SBS treatment without alteration of its mRNA level in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with SBS for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-caspase-3. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with SBS for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using caspase-3 primer described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

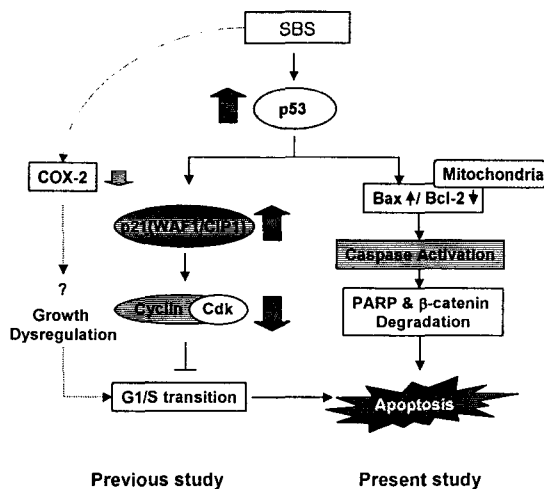


Fig. 7. Proposed schematic model for SBS treatment-mediated cell cycle dysregulation and apoptosis of A549 cells.

이상의 결과를 최근 본 연구실에서 보고한 바 있는 결과⁹⁾와 종합하여 볼 때, Fig. 7과 같이 암세포의 성장억제와 연관된 사백산 추출물의 기전을 제시할 수 있었다. 즉 선행연구의 결과에 의하면 사백산 추출물의 처리에 의한 암세포의 성장억제효과는 세포주기 G1 arrest와 연관성이 있었으며, 이는 세포주기 조절 양성 인자인 cyclins 및 Cdk의 발현 변화보다는 종양억제 유전자 p53의 발현 증가에 따른 Cdk inhibitor p21 특이적인 발현의 증가 현상을 관찰할 수 있었다⁹⁾. 이러한 특이 유전자들의 발현과 연관된 암세포의 성장억제는 apoptosis 억제 유전자들의 발현 감소에 따른 caspase의 활성화에 의한 apoptosis 유발로 연결될 것으로 추측되어진다.

결론

A549 인체 폐암 세포의 성장에 미치는 사백산의 영향을 분석하기 위하여 사백산 추출물 처리에 의한 암세포 성장 억제와 연관된 apoptosis 유발 여부를 조사하였다. 사백산 추출물의 처리농도 증가에 따른 암세포의 성장은 농도 의존적으로 대조군에 비하여 매우 감소되었고, 이는 sub G1기의 증가, chromatin의 응축에 의한 apoptotic body의 증가, PARP 및 β-catenin 단백질의 분해와 연관된 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있었음을 알 수 있었다. 사백산 추출물에 의한 apoptosis의 유발에는 Bax의 발현 변화보다는 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현 억제에 의한 것이었으며, 이로 인한 caspase-3의 활성화에 의한 것임을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
2. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476, 1993.
3. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.
4. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
5. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174, 1994.
6. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
7. 許浚. 東醫寶鑑. p 470, 南山堂, 서울, 1994.
8. 北京中醫學院 編, 中醫學 臨床病理, p. 572, 成輔社, 서울, 1983.

9. Kang, B.R., Oh, C.S., Lee, J.H., Choi, Y.H., Park, D.I. Cell cycle arrest by Sabaek-san is associated with induction of Cdk inhibitor p21 in human lung cancer A549 cells. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* (submitted).
10. Lee, J.H., Kang, G.H., Kim, G.C., Kim, K.M., Choi, B.T., Kang, H.S., Lee, Y.T., Choi, Y.H. Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 21, 1239-1244, 2002.
11. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study, *Exp. Mol. Med.* 33, S15-36, 2001.
12. Choi, Y.H., Im, E.O., Suh, H.S., Jin, Y.E., Lee, W.H., Yoo, Y.H., Kim, K.W., Kim, N.D. Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int. J. Oncol.* 18, 979-984, 2001.
13. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* 272, 28479-28484, 1997.
14. Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92, 57-70, 2001.
15. Lieberthal, W., Koh, J.S., Levine, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol.* 18, 505-518, 1998.
16. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985, 1993.
17. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
18. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Yama/CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809, 1995.
19. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87, 992-1005, 2000.
20. Debruyne, P., Vermeulen, S., Mareel, M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta. Gastroenterol. Belg.* 62, 393-402, 1999.
21. Choi, Y.H., Baek, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, N.D., Kim, K.W. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 17, 565-571, 2000.
22. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, L., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499, 1998.
23. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251, 1993.
24. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136, 1997.