

참나무 목초액에 의한 전립선암세포의 apoptosis 유발기전에 관한 연구

박 철 · 최영현 · 이원호³ · 최병태¹ · 이용태² · 김경철^{2*}

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 1: 해부학교실, 2: 생리학교실 및 한의학연구소, 3: 부산대학교 자연과학대학 생물학과

Up-regulation of Bax and Down-regulation of Bcl-2 in Oak Smoke Flavoring(Holyessing)-induced Apoptosis of Human Prostate Carcinoma Cells

Cheol Park, Yung Hyun Choi, Won Ho Lee³, Byung Tae Choi¹, Yong Tae Lee², Gyeong Cheol Kim^{2*}

Department of Biochemistry, 1: Department of Anatomy, 2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Donggeui University and Research Institute of Oriental Medicine, 3: Department of Biology, College of Natural Sciences, Busan National University

We investigated the effects of Oak smoke flavoring (OSF, Holyessing) on the growth of DU145 and PC-3 human prostate carcinoma cells. OSF treatment resulted in a concentration-dependent growth inhibition in both DU145 and PC3 cell lines. The anti-proliferative effect of OSF treatment was associated with the induction of apoptotic cell death which was confirmed by morphological change such as membrane shrinking, rounding up and chromatin condensation in DU145 and PC-3 cells. DNA flow cytometry analysis confirmed that OSF treatment increased population of apoptotic sub-G1 phase. Furthermore, we observed an increase of pro-apoptotic protein Bax expression and a decrease of anti-apoptotic protein Bcl-2 by OSF treatment in a dose-dependent manner. OSF also induced a proteolytic cleavage of specific target proteins such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and β -catenin proteins. The present results indicated that OSF-induced inhibition of human prostate carcinoma cell proliferation is associated with the induction of apoptosis.

Key words : Oak smoke flavoring, prostate cancer cells, apoptosis, Bcl-2, Bax

서 론

목초액(Wood vinegar)은 목탄의 제조 시 발생하는 증기를 냉각 응축시킨 액체로서 80-90%는 물이며, 10-20% 정도는 약 200여종의 유기화합물로 구성되어있다^{1,4)}. 목초액은 오래 전부터 향균, 살균, 식품의 보존성 향상, 항산화 효과, 향취개선 등의 목적으로 사용되어져 왔으며, 농업에서 잡초방제, 토양 개량, 종자 발아 촉진, 병충해 방지, 식물생장 촉진, 낙과 방지, 결실증가, 당도 향상 등의 목적으로 사용되어지고 있다^{5,6)}. 현재 농가에서 주로 사용되는 목초액은 낙엽교목인 참(신갈)나무를 주로 이용하고 있으며, 참나무는 예로부터 청열(靑熱), 해독의 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 옅은 세균성질환, 소화불량 치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 목초액은 부분적 유해성의 확인에도 불구하고

하고^{8,9)}, 이를 정제하여 민간요법으로도 다양하게 사용되어지고 있다¹⁰⁾. 그러나 이러한 목초액 효능의 과학적 검증은 제대로 이루어진 바 없으며, 특히 어떤 성분들에 의한 특정 생물학적 작용을 가지는지에 관하여서는 거의 조사된 바 없다. 최근의 연구결과에 의하면 목초액은 혈액의 림파구 및 혈소판의 증가에 의한 면역증강작용 가능성과 위암 및 대장암세포의 증식 억제 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다¹¹⁾. 또한 강력한 세포 부착 저지 작용, 부분적 암세포 전이 억제 및 항종양 효과 등이 있는 것으로 보고되어 항암 작용 가능성이 제기되었으나¹²⁾, 결과론적 현상의 관찰에 지나지 않으며 이에 관한 분자생물학적 기전 해석의 필요성이 대두되었다.

본 연구에서는 목초액의 항암 효과에 관한 기전 해석의 시도를 위하여 참나무 목초액(Oak smoke flavoring, OSF, Holyessing)의 처리에 따른 인체 전립선암세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 성장을 및 생존을 억제, 이로 인한 형태적 변화 및 apoptosis의 유발과 연관성을 가지는 유전

* 교신저자 : 김경철, 부산시 진구 양정동 산45-1 동의대학교 한의과대학

E-mail : kimkc@donggeui.ac.kr Tel : 051-850-8649

· 접수 : 2002/10/24 · 수정 : 2002/12/06 · 채택 : 2003/01/20

자 산물의 발현 변화를 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 참나무 목초액의 처리 농도 의존적으로 인체 전립선암세포의 성장이 억제되었으며, 핵 내 apoptotic body의 형성과 sub-G1 군의 증가현상으로 apoptosis의 과정에 의하여 암세포의 사멸이 유도되는 것임을 알 수 있었다. 아울러 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소가 참나무 목초액에 의한 apoptosis 유발에 주요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

재료 및 방법

1. 시료준비

목초액은 천연목재를 탄화하는 과정에서 발생하는 연기를 냉각시켜 생산된 액체를 조목초액이라 하며, 조목초액을 6개월 이상 정치시켜 경질유와 타르 성분을 분리한 적갈색의 투명한 액체를 농업용 생활용 목초액이라 하며, 이를 다시 압력을 감압하여 끓는점과 물질의 안정성을 고려하여 분리하는 減壓蒸溜分離法으로 처리한 것을 식용 또는 의약품 목초액이라 한다. 竹瀝이 간접 열분해의 건류과정을 거친 액인 점에 비하여, 목초액은 직접 탄화로 화학적인 성분 변화를 거친 액체인 점에서 구성 성분 등의 이화화적인 특성에 차이가 있다.

2. 암세포주 및 배양조건

실험에 사용한 DU145 및 PC-3 전립선 암세포(prostate carcinoma cell)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받았으며, 암세포의 배양을 위하여 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)과 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA) 등이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였으며, 배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

3. 목초액의 처리

참나무 목초액의 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터 부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에 6×10^5 개/ml 정도로 분주하여 24시간동안 안정화 시켰다. 참나무 목초액의 배지에 적정 농도로 희석하여 처리하였다.

4. 세포형태의 관찰

세포배양용 페트리 접시에 세포를 분주하여 24시간동안 안정화시킨 다음 참나무 목초액이 함유된 배지를 이용하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰하였다.

5. MTT assay에 의한 암세포 성장율의 측정

세포배양용 페트리 접시에 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 참나무 목초액을 처리하여 24시간 및 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 2 ml씩 분주하고 3시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 이를 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin (Sigma)을 모두 녹인 후 96 well에 200 μ l씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준오차를 구하였다.

6. DNA flow cytometry 분석

정상 및 참나무 목초액이 들어 있는 배지에서 자란 암세포를 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 원심분리를 한 후 상층액을 버리고 남은 세포에 0.5 ml의 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol 0.5 ml를 첨가하여 4°C에서 한시간 동안 고정시킨 후 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, concentration, 50 μ g/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색하였다. PBS로 두 번 씻어낸 후, nylon mesh를 이용하여 세포덩어리를 하나씩으로 떼어내고 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 분석하였다¹³⁾.

7. DAPI staining

정상 및 참나무 목초액이 들어 있는 배지에서 자란 암세포를 모은 다음 3.7%로 희석된 formaldehyde로 상온에서 10분 동안 고정시킨 후 PBS로 수세하고 형광 염색물질인 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 fluorescence microscope를 이용하여 핵의 형태변화를 관찰하였다.

8. Western blot analysis

선행방법¹⁴⁾에 준하여 정상 및 참나무 목초액이 처리된 배지에서 배양한 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 다음 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 1차 항체(PBS-T로 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하여 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 처리한 다음 Enhanced ChemiLuminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL,

USA)을 적용시켜 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양상을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-mouse immunoglobulin 및 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포 증식에 미치는 참나무 목초액의 영향

인체 전립선 DU145 및 PC-3 암세포의 증식에 미치는 참나무 목초액의 영향을 알아보기 위하여 이를 24시간 및 48시간동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 조사한 결과, Fig. 1에서 나타난 바와 같이 참나무 목초액의 처리 농도 및 시간이 증가함에 따라 전립선암의 생존율이 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히, 48시간 후 DU145 와 PC-3 모두에서 0.6%의 참나무 목초액을 처리하였을 경우 50% 이상의 증식억제 효과가 있었다. 따라서 참나무 목초액의 처리농도 의존적으로 인체 전립선 암세포의 성장이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 Kim et al.¹²⁾이 조사한 조건보다 매우 낮은 농도에서 강한 암세포 성장억제 효과가 있었으나 사용된 목초액의 종류 및 실험 방법에서 다소 차이가 있기 때문에 정확한 비교를 할 수는 없었다.

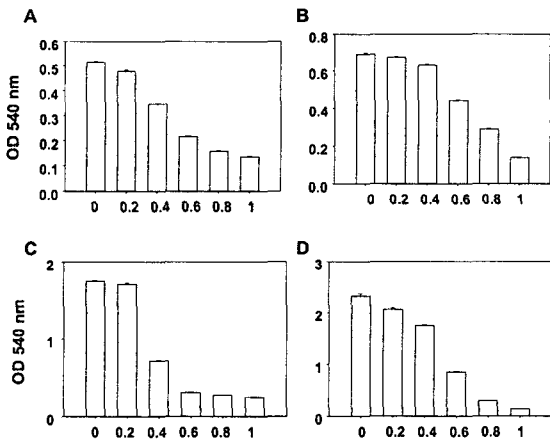


Fig. 1. Growth inhibition by Oak smoke flavoring (OSF, Holeyssing) treatment in DU145 and PC-3 human prostate carcinoma cells. DU145 (A and C) and PC-3 (B and D) cells were seeded at an initial density of 6×10^7 /ml, incubated for 24 h, and treated with OSF at different concentrations. MTT assay was performed after OSF treatment for 24 h (A and B) or 48 h (C and D). Results are expressed as percentage of the untreated control \pm SD obtained from three separate experiments.

2. 참나무 목초액 처리에 의한 암세포의 형태변화

참나무 목초액의 처리에 따른 암세포의 전체적인 형태변화를 알아보기 위하여 참나무 목초액을 다양한 농도로 처리하여 48시간동안 배양한 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 참나무 목초액의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변화가 관찰되었다. 특히, DU145 세포의 경우

는 0.4% 이상의 농도에서 세포의 rounding up 현상을 관찰할 수 있었고, PC-3 세포의 경우는 0.4% 이상의 농도에서 membrane shrinking 현상을 관찰할 수 있었으며, 전체적으로 0.6% 농도에서 거의 모든 세포들이 부착력을 상실하였다. 참나무 목초액의 처리 농도 증가에 따른 부착력 상실의 정도는 생존율 감소와 잘 일치되는 결과였으며, 참나무 목초액이 복합세포 외 기질 gelatin에 대한 암세포의 부착저지효과가 매우 우수하였다는 결과를 잘 반영하여 준다¹²⁾.

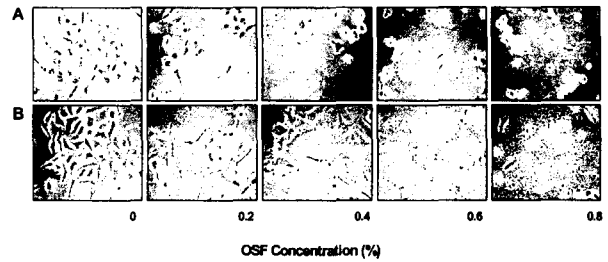


Fig. 2. Morphological changes in DU145 (A) and PC-3 (B) human prostate carcinoma cells following incubation with OSF. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or OSF for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$.

3. 참나무 목초액 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발

참나무 목초액에 의한 암세포의 성장억제에 따른 형태적 변형이 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 DAPI 염색에 의한 암세포의 핵 형태 변화를 조사하였다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 참나무 목초액이 함유된 배지에서 자란 암세포에서는 정상배지에서 자란 암세포에 비해서 apoptosis의 전형적인 특징인 chromatin condensation 현상에 의한 apoptotic body를 관찰할 수 있었다¹⁵⁻¹⁸⁾. 그리고 DNA flow cytometer를 이용하여 apoptosis 유발을 의미하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 정량적으로 조사하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 정상배지에서 자란 암세포에 비해서 참나무 목초액의 농도가 증가함에 따라 처리 농도 의존적으로 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, PC-3 보다 DU145 세포주에서 전체적으로 apoptosis 유발의 정도가 훨씬 높게 나타났다. 이상의 결과로 참나무 목초액에 의한 암세포의 성장억제가 apoptosis와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

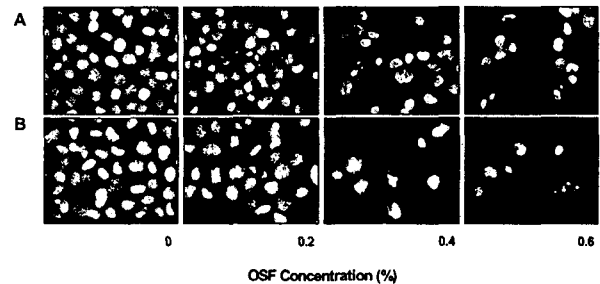


Fig. 3. Formation of apoptotic bodies by OSF treatment in DU145 (A) and PC-3 (B) human prostate carcinoma cells. Cells were untreated or treated with OSF for 48 h, stained with DAPI solution and then photographed by fluorescent microscope using blue filter. Magnification, $\times 400$.

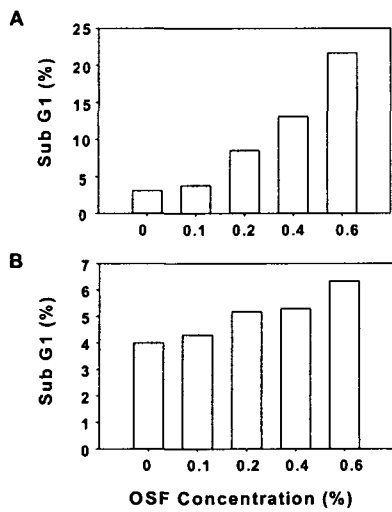


Fig. 4. Induction of sub-G1 by OSF treatment in DU145 (A) and PC-3 (B) human prostate carcinoma cells. Exponentially growing cells were treated with OSF for 48 h and trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase A, and then cellular DNA was stained with PI. DNA flow cytometric analysis was performed comparing untreated controls with cells treated with OSF for 48 h.

4. 참나무 목초액 처리에 의한 PARP 및 β -catenin의 degradation

참나무 목초액에 의한 apoptosis의 유발의 생화학적 증거를 제시하기 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적단백질인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 및 β -catenin의 발현에 미치는 참나무 목초액의 영향을 western blot을 이용하여 조사하였다. 특정 내, 외부 자극에 의하여 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질의 분해가 일어나며, 정상적인 세포의 경우는 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우는 85 kDa 크기의 단편이 나타난다^{19,20}. PARP는 DNA repair나 genomic stability의 유지에 중요한 역할을 하며²¹, apoptosis의 과정 중 caspase라는 효소의 활성화에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능이 상실되어 정상적인 DNA repair 과정이 억제되는 것으로 알려져 있다²². Fig. 5에서 나타난 바와 같이 참나무 목초액을 처리하였을 경우 PARP 단백질은 116 kDa 및 85 kDa 위치에서 2개의 band를 관찰할 수 있었다. 이 결과는 참나무 목초액에 의한 암세포의 성장억제가 PARP의 분해와 연관된 apoptosis 유발과 직접적인 관련이 있다는 것을 잘 나타내어 주는 것이다.

Catenin family 단백질 (α , β 및 γ)은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포연접기능에 중요한 역할을 한다^{23,24}. 특히 β -catenin은 세포내 골격유지와 다양한 부착성 세포의 전사조절에 중요한 역할을 하며 세포유착과 관계된 apoptosis 조절에 관여를 하는 것으로 알려져 있다^{24,25}. β -catenin은 정상세포의 경우 92 kDa의 분자량을 가지나 세포유착성 apoptosis (cadherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다²⁶⁻²⁸. 참나무 목초액에 의한 apoptosis가 이러한 세포유착과 관련이 있는지를 조사한 결과 DU145 세포의 경우 Fig. 5에서 보는 바와 같이 처리농도 의존적으로 단편화된 band를 관찰할 수 있었다. 이는 참나무 목초액에 의한 전체적인 형태변형이 apoptosis와 연관이 있다는 것을 잘

뒷받침하는 결과이다. 하지만 PC-3 세포의 경우는 β -catenin의 발현에 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 참나무 목초액에 의한 부착능력의 상실에도 불구하고 β -catenin의 변화가 없는 것은 세포의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 생각되며 cadherin 단백질과의 결합력은 떨어질 것으로 예상되므로 세포 부착과 관련이 있는 단백질들의 kinase 활성화도 및 상호작용에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

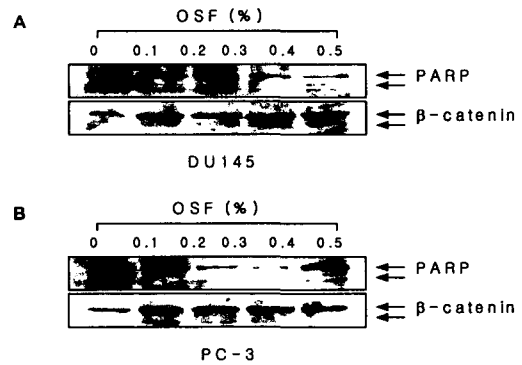


Fig. 5. Degradation of PARP and β -catenin in OSF-treated in DU145 (A) and PC-3 (B) human prostate carcinoma cells. Cells were treated with indicated concentrations of OSF. After 48 h incubation with OSF, cells were lysed and equal proteins were resolved on 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were detected with antibodies against PARP and β -catenin, and ECL detection.

5. Bcl-2/Bax family의 발현에 미치는 참나무 목초액의 영향

Apoptosis의 유발에 관여하는 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2/Bax family 중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하고, Bax는 pro-apoptotic 분자로서 apoptosis와 관련이 있다^{29,30}. 이들 유전자는 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제유전자인 p53, caspases, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다^{31,32}. Bcl-2와 Bax는 서로 dimer를 이루며, 만일 Bax가 주종단백질로 heterodimer를 만들면 apoptosis를 촉진시키고, Bcl-2가 주종이면 apoptosis가 억제된다. 즉 Bax와 Bcl-2는 서로 heterodimer를 이루므로써 미세한 발현의 차이로 이 현상을 조절한다.

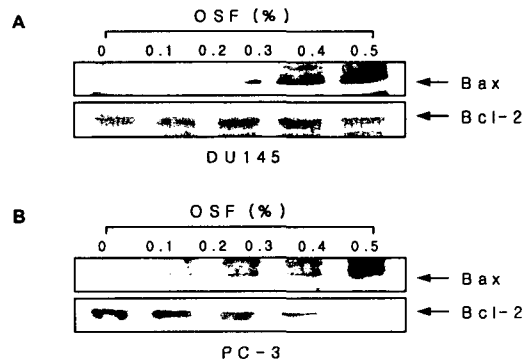


Fig. 6. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 by OSF treatment in DU145 (A) and PC-3 (B) human prostate carcinoma cells. Cells were treated with indicated concentrations of OSF. After 48 h incubation, cells were lysed and equal proteins were resolved on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were detected with antibodies against Bax and Bcl-2, and ECL detection.

참나무 목초액에 의한 apoptosis가 이들 유전자와 연관이 있는지를 조사한 결과 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 DU145 세포의 경우는 Bax의 발현이 농도 의존적으로 증가한 반면 Bcl-2 유전자의 경우는 변화가 없었다. PC-3 세포의 경우는 참나무 목초액의 농도가 증가함에 따라 Bax 유전자가 증가하였고 이와 반대로 Bcl-2 유전자는 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 참나무 목초액에 의한 apoptosis의 유발에는 Bcl-2/Bax family가 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것이다.

요 약

인체 전립선 암세포주인 DU145 및 PC-3 세포의 성장에 미치는 참나무 목초액의 영향을 조사하였다. 참나무 목초액이 함유된 배지에서 자란 암세포들은 처리시간 및 농도 의존적으로 성장이 억제되었으며, membrane shrinking 및 rounding up 현상을 관찰할 수 있었다. 그리고 apoptosis가 유발된 세포에서 특징적으로 관찰되는 chromatin condensation 현상을 유발하였고 DNA flow cytometry 분석결과 apoptotic sub-G1기에 해당하는 세포들의 빈도가 처리 농도 의존적으로 증가하였다. PARP 및 β -catenin 단백질을 조사한 결과 DU145 세포에서는 두 단백질 모두에서 apoptosis 유발 특이적인 분해 현상을 볼 수 있었고 PC-3 세포에서는 β -catenin 단백질은 변화가 없었으나 PARP 단백질에서 분해현상이 나타났다. Bcl-2/Bax family의 경우는 DU145 세포에서 Bax의 발현이 증가되었고 PC-3 세포에서는 Bax의 발현증가 및 Bcl-2의 발현감소가 관찰되었다.

이러한 결과는 참나무 목초액에 의한 인체 전립선 암세포의 성장억제가 apoptosis 뿐만 아니라 세포주기의 억제도 관여를 한다고 추정되어지며, 세포주기인자들에 관한 연구도 추진되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2002년 동의대학교 교내연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

1. Yatagai, M., Unrinine, G. By-products of wood carbonization V. Germination and growth regulation effects of wood vinegar components and their homologs on plant seeds. Acids and neutrals. Mokuzai Gakkaishi 35, 564-571, 1989.
2. Yatagai, M., Unrinine, G. By-products of wood carbonization V. Germination and growth regulation effects of wood vinegar components and their homologs on plant seeds. Alcohols and phenols. Mokuzai Gakkaishi 35:1021-1028, 1989.
3. Guillen, M.D., Manzanos, M.J., Ibargoitia, M.L. Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavorings. J. Agric. Food Chem. 49, 2395-2403, 2000.
4. Guillen, M.D., Sopelana, P., Partearroyo, M.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. J. Agric. Food Chem. 48, 5083-5087, 2000.
5. Pszczola, D.E. Tour highlights production and uses of smoke-based flavors, Food Technol. 49, 70-74, 1995.
6. 김광은, 박상범, 안경모. 숯과 목초액, p.280, 한림저널사, 2000.
7. 정보섭, 신민교. 도해 향약(생약) 대사전, p. 810-811, 영림사, 1998.
8. Gaworski, C.L., Heck, J.D., Bennett, M.B., Wenk, M.L. Toxicologic evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco: skin painting bioassay of cigarette smoke condensate in SENCAR mice. Toxicology 139, 1-17, 1999.
9. Putnam, K.P., Bombick, D.W., Avalos, J.T., Doolittle, D.J. Comparison of the cytotoxic and mutagenic potential of liquid smoke food flavourings, cigarette smoke condensate and wood smoke condensate. Food Chem. Toxicol. 37, 1113-1118, 1999.
10. Chang, H.Y., Kang, A.S., Cha, D.Y., Sung, J.M., Morinaga, T. Effects of wood vinegar on the mycelial growth promotion of some edible mushrooms and Trichoderma pathogen inhibition. RDA J. Agri. Sci. 37, 766-771, 1995.
11. 김한성, 김성훈. 목초액의 약리 및 입사 효능과 연구 방향. 대전대학교 한의학연구소 논문집, 7, 831-835, 1998.
12. Kim, D.H., Choi, J.S., Choo, J.H., Song, H.C., Lee, E.O., Kang, I.C., Choi, J.W., Kim, S.H. Study on immunomodulatory and antitumor activity of holyessing. Kor. J. Oriental Med. Physiol. Pathol. 15, 881-886, 2001.
13. Choi, Y. H., Lee, W. H., Park, K. Y. and Zhang, L. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. Jpn. J. Cancer Res. 91, 164-173, 2000.
14. 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.
15. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. Am. J. Pathol. 136, 593-608, 1990.
16. Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Sellins, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. Annu. Rev. Immunol. 10, 267-293, 1992.
17. Lieberthal, W., Koh, J.S., Levine, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. Semin. Nephrol. 18, 505-518, 1998.
18. Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. The machinery of programmed cell death. Pharmacol. Ther. 92:57-70, 2001.
19. 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.
20. 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.
 21. 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 beta, 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.
 22. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
 23. Johnson, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 18:345-357, 1999.
 24. 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.
 25. Rowlands, T.M., Symonds, J.M., Farookhi, R., Blaschuk, O.W. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev. Reprod.* 5:53-61, 2000.
 26. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of beta-catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31:519-529, 1999.
 27. Steinman, R. A., Hoffman, B., Iro, A., Guillouf, C., and Liebermann, D., el-Houseini, M.E. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9:3389-3396, 1994.
 28. 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.
 29. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M., Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
 30. Antonsson, B., Martinou, J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256, 50-57, 2000.
 31. Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., Jacks, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849, 1993.
 32. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391: 496-499, 1998.