



BARODON®에 의한 Human Gastric Adenocarcinoma AGS 세포고사

조은혜¹ · 최수일² · 김수림¹ · 조성대¹ · 안남식¹ · 정지원¹ · 양세란¹ · 박준석¹
황재웅¹ · 박용호³ · 이영순¹ · 강경선¹

¹서울대학교 수의과대학 공중보건학교실, ²BARODON-S.F. CORP.,
³서울대학교 수의과대학 세균학교실

Apoptosis Induced by BARODON® in Human Gastric Cancer Cells

Eun-Hye Jo¹, Soo-Il Choi², Soo-Rim Kim¹, Sung-Dae Cho¹, Nam-Shic Ahn¹, Ji-Won Jung¹, Se-Ran Yang¹,
Joon-Suk Park¹, Jae-Woong Hwang¹, Yong-Ho Park¹, Yong-Soon Lee¹ and Kyung-Sun Kang¹

¹Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

²BARODON-S.F. CORP., Ansung, Kyunggi, Korea

³Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Received February 3, 2005; Accepted March 10, 2005

ABSTRACT. BARODON® is a multi-purpose, high functional alkali solution made by mixing and liquid-ionizing silicon, calcium, sodium, borax, organic carbon chemicals and silver. In this study, we have investigated the apoptotic potential and mechanistic insights of BARODON® in human gastric cancer cell line (AGS cells). In MTT assay, BARODON® reduced cell viability in AGS cells. Morphological features of apoptosis with marked cytoplasmic vacuolation and appearance of apoptotic peaks in flow cytometry were observed in AGS cells with BARODON® treatment. In addition, BARODON®-induced apoptosis of stomach cancer cell is related to bax up-regulation, caspase 7 protease activation and subsequent cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). These results suggest that BARODON® can induce the apoptosis of AGS cells through modulation of bcl-2 family and the activation of intrinsic caspase cascades, indicating that it is potentially useful as an anti-cancer agent.

Keywords: BARODON®, Gastric cancer, Apoptosis, PARP, Caspase 7.

서 론

바로돈(BARODON®)은 규소, 칼륨, 나트륨, 붕소 (사붕산나트륨 10수화염), 유기탄소 화합물 및 은 등을 혼합하여 액상 이온화시킨 다목적 고기능성 알칼리용액 조성물 (PCT/KR01/00009, 한국특허 제 0331952호, 미국특허 US 6,447,810 B1/US 6,673,375 B2)로서 체내의 면역세포들 특히 T림파구들을 자극, 증가시켜 직접적인 세포성 면역 증진에 작용하여 비특이적으로 면역세포를 증가한다고 알려져 있다(Yoo *et al.*, 2001). 그리고 최근 바로돈은 피부의 청결유지와 면역기능강화를 주 기능으로 하

는 사람의 피부 외용제로 쓰이고 있으며 사료에 첨가되어 ((주) 퓨리나) 제품이 출시된 바 있고, 면역독성 시험, 유전독성 시험과 피부자극성 시험을 통해 그 안전성이 확인된 바가 있다(Jo *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2003).

Apoptosis 또는 세포고사는 세포의 항상성 유지와 성장의 결정적인 역할을 하는 필수적인 생리학적 과정이다(Zimmermann *et al.*, 2001). 화학적 암 예방의 목적은 특정의 자연물이나 합성물에 의해 신생 종양의 진행을 저해하거나 차단하는데 있다(Jo *et al.*, 2004). 따라서 세포고사를 유도하는 경로에서 특정 성분의 화학적 암 예방물질을 이해하는 것은 암의 효과적인 예방 전략으로 이용될 수 있다(Sun, 2001). 세포고사가 일어나게 되는 대표적인 경로는 두 가지가 있는데, 하나는 미토콘드리아에 의한 과정이고 나머지는 death receptor와 그것의 ligand의 상호작용에 의한 과정이다. Bcl-2 family의 Pro- 또는

Correspondence to: Kyung-Sun Kang, Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shilim-9dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: kangpub@snu.ac.kr

anti-apoptotic 구성요소가 미토콘드리아에 의한 세포고사 과정을 조절한다(Korsmeyer, 1995). Bcl-2 family 에 의해 조절되는 세포고사는 caspase라고 불리는 interleukin-1 converting enzyme(ICE) family의 upstream을 활성화시킨다(Alnemri *et al.*, 1996). 세포고사의 dysregulation 은 Bcl-2/Bcl-x and Bax의 불균형이 암의 병인이 될 수 있다(Bargou *et al.*, 1995).

세계보건기구(WHO)의 자료에 따르면 위암은 일본, 한국 등 아세아 국가와 동유럽, 중앙아메리카, 아이슬란드 등에서 많이 발생하고 있다고 한다(Ajani, 1998). 이들 국민들의 식생활의 공통점은 소금에 절여서 말린 생선, 연기에 훈제한 생선, 소금에 절인 채소, 짜고 매운 음식을 섭취하고 비타민 C의 함유가 많은 신선한 채소와 과일 등을 적게 먹는 식생활습관을 갖고 있다. 따라서 위암의 위험요인이 되는 것을 가능한 한 줄이고 야채, 과일, 우유 등을 항상 충분히 섭취하는 식생활을 영위하면 위암의 예방도 가능하다. 이러한 식품들은 알칼리성 물질을 많이 함유하고 있는 알칼리성 식품인데 지난해 미국 위생국에서 발표한 영양과 건강에 대한 조사 보고서에 따르면 연간 50만명에 이르는 암으로 인한 사망자의 3분의 1이 과실을 포함한 알칼리성 식품을 충분히 섭취했으면 예방할 수 있었을 것이라고 한다. 따라서, 본 연구에서는 알칼리성 용액이면서 알칼리성 물질을 형성하여 인간의 체액과 혈액의 pH를 조절하고 또한 인체구성 성분인 동시에 인체내에서 삼투압 조절이나 각종 효소의 활성화 인자로서 대사조절 작용을 한다는 무기질의 조성으로 칼륨, 인, 철 등의 무기원소를 함유하고 있는 바로돈을 섭취함으로써 위암세포의 증식을 억제하여 예방할 수 있는 지를 확인해 보았다.

재료 및 방법

재료

세포주 배양. Gastric cancer cell line인 AGS 세포는 한국 세포주은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양, 계대 배양하면서 생화학적 및 분자 생물학적 실험을 실시하였다.

AGS 세포는 10% FBS(fetal bovine serum)가 함유된 RPMI-1640 세포 배양액으로 5% CO₂의 대기조건에서 37°C 세포배양기에서 배양하였다.

시약 및 기기

본 실험에 사용된 시험물질은 바로돈 S.F(주)에서 공급한 음이온 알칼리 복합광물질 용액이다. 이 물질은 메타규산나트륨 100중량부에 대하여, 붕사 1-15 중량부, 티오황산나트륨 10-5-10 -4 중량부, 탄산칼륨 30-150중량부,

정제 백당 30-200중량부, 물 100-200 중량부 및 염화나트륨, 티오황산은 또는 몰리브덴산나트륨 중 선택된 1종 이상을 10 -1 중량부 이내 함유하는 것을 특징으로 하는 알칼리 용액 조성물이다. 물질은 연한 갈색이며 사용 기간 동안 실온에서 보관하였다. RPMI-1640, FBS, 항생제 및 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 배양용기(75 mm plask와 24 well plate)는 Nunc사(Nalge Nunc International, USA)에서 구입하여 사용하였다. caspase-7, PARP, Bax, Bad 등에 대한 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

방법

MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정. Multiwell plate에 1×10^5 cell/ml의 AGS를 파종한 후 cell viability assay의 경우 세포가 80~90%, growth assay의 경우 50% 가량의 confluency에 도달하면 농도별로 희석된 물질을 각 well에 처치하여 cell viability assay는 24시간, growth assay의 경우 12, 24, 48, 72시간 처치한 후 37°C humidified CO₂ incubator에서 배양하였다. 물질 처치 시간이 끝나기 4시간 전 MTT stock solution(5 mg/ml in PBS)을 각 well에 10%(vol/vol) 첨가한 후 4시간 배양하였다. 물질 처치 시간이 끝나면 배지를 제거하고 각 well 당 200 μ l의 DMSO를 첨가하여 purple formazan을 용해시킨 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 무처리군에 비례한 cell viability 혹은 growth의 비율을 산출하였다.

Cell cycle 측정. MTT assay와 같은 방법으로 세포를 배양한 후, trypsin 처리하여 세포를 수거한 다음, ice-cold PBS를 이용하여 2회 세척해준 후 70% ethanol로 -20°C에서 30분 이상 고정시켰다. 고정된 세포들은 다시 ice-cold PBS로 세척해주고, 50 μ g/ml의 propidium iodide를 100 μ g/ml의 RNase A와 함께 30분 동안 배양하였다. FACSCalibur를 이용하여 세포주기를 측정하여 세포주기의 arrest 여부를 확인하였다.

Western blotting. MTT assay와 같은 방법으로 세포를 배양한 후 lysis buffer(20% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 10 mM iodoacetamide, 1 mM leupeptin, 1 mM antipain, 0.1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride)를 첨가하여 세포를 lysis 시킨다. Cell lysate를 probe sonicator로 sonicate한 후 DC protein assay kit(Bio-Rad, USA)로 단백질을 정량하였다. 정량한 세포부유액은 4sample buffer와 혼합하여 12% polyacrylamide gel로 전기영동한 후, 영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로

4°C에서 25 V로 10시간 transter한 후 blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켰다. Caspase (BD, monoclonal antibody), PARP(Promega, polyclonal antibody), Bcl family(SantaCruz, monoclonal antibody) 등 apoptosis와 관련된 protein에 대한 항체를 0.05%의 Tween-20이 함유된 Tris-buffered sample saline(TBS-T)에 1 : 1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 4°C에서 16시간 반응한 다음 이차항체인 HRP-goat anti-rabbit IgG conjugate와 HRP-goat anti-mouse IgG conjugate(TBS-T로 1 : 1000으로 희석)와 상온에서 1시간 반응 후 chemiluminescent detection reagent를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 현상하였다.

통계분석

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험의 결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하였다. 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였고 p-value가 최대치 0.05 이하의 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

사람의 AGS 세포에서 바로돈 A와 B에 의한 생존율 저하

사람의 위암세포에서 세포 성장 억제효과를 확인하기 위하여 바로돈은 다음과 같은 농도별로 배지에 희석하여 처리한 후 MTT 시험법으로 조사하였다. 바로돈 A와 B는

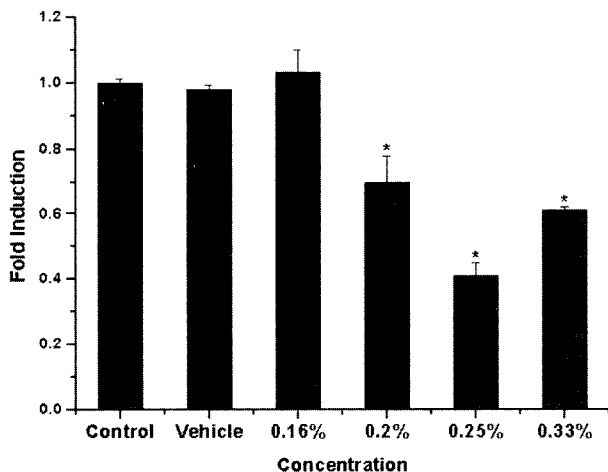


Fig. 1. Cell survival of AGS cells upon BARODON® A treatment for various time courses. Cells were treated with different concentrations (0.16~0.33%) of BARODON® A for 6 hr. Data are presented as means and Standard deviation (SD) for triplicate measurements. The fold induction is expressed relative to control, which is defined as 1. *, Significantly different from control at $p < 0.05$ level.

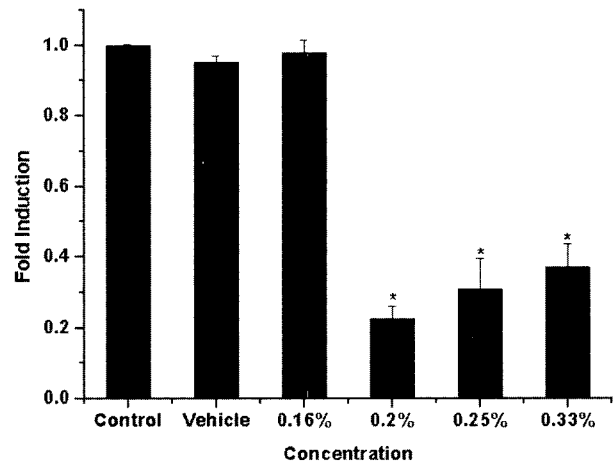


Fig. 2. Cell survival of AGS cells upon BARODON® B treatment for various time courses. Cells were treated with different concentrations (0.16~0.33%) of BARODON® B for 6 hr. Data are presented as means and SD for triplicate measurements. The fold induction is expressed relative to control, which is defined as 1. *, Significantly different from control at $p < 0.05$ level.

각각 0.16%, 0.2%, 0.25%, 0.33%(바로돈 volume/배양배지 volume)의 양으로 배지에 첨가하여 AGS 세포를 6시간 동안 배양하였다. 0.16%의 바로돈 A를 처리하였을 때 AGS 세포의 성장에 변화가 없었지만 0.2%에서는 약 30%, 0.33%에서는 약 40%의 AGS 세포 생존율이 저하되었다(Fig. 1). 또한, 바로돈 A를 0.25%의 양으로 배지에 첨가하였을 때는 60% 이상의 AGS 세포 성장 억제효과가 관찰되었고 바로돈 B에서는 0.2%에서 성장 억제효과가 최대인 경향을 보였다(Fig. 1과 2). 그리고 바로돈 B를 0.16% 처리하였을 때 바로돈 A와 마찬가지로 AGS 세포의 성장에 어떠한 영향도 미치지 않았으나 0.2%, 0.25%와 0.33%를 처리하였을 때, 모두 60% 이상의 성장 억제효과가 관찰되어 바로돈 A보다 사람의 위암세포 생존율 저하가 더 현저하게 일어나는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

그러나 바로돈 B 0.2%의 경우 6시간 동안 AGS 세포에 노출되었을 때 세포독성에 의한 세포사가 의심되었으며, 따라서 세포독성이 관찰되지 않은 바로돈 A와 B의 0.25%와 0.33%를 AGS 세포에서 세포고사에 관여하는 유효한 농도로 결정하였다(data not shown).

AGS 세포에서 바로돈에 의한 형태학적 변화

AGS 세포에서 바로돈에 의한 생존율 저하를 확인한 뒤, AGS 세포에서 바로돈에 의한 변화를 관찰하였다. Fig. 3을 보면, 6시간 동안 바로돈 A와 B를 각각 0.25%, 0.33% 노출시켰을 때 정상세포와 비교하여 유의적인 형

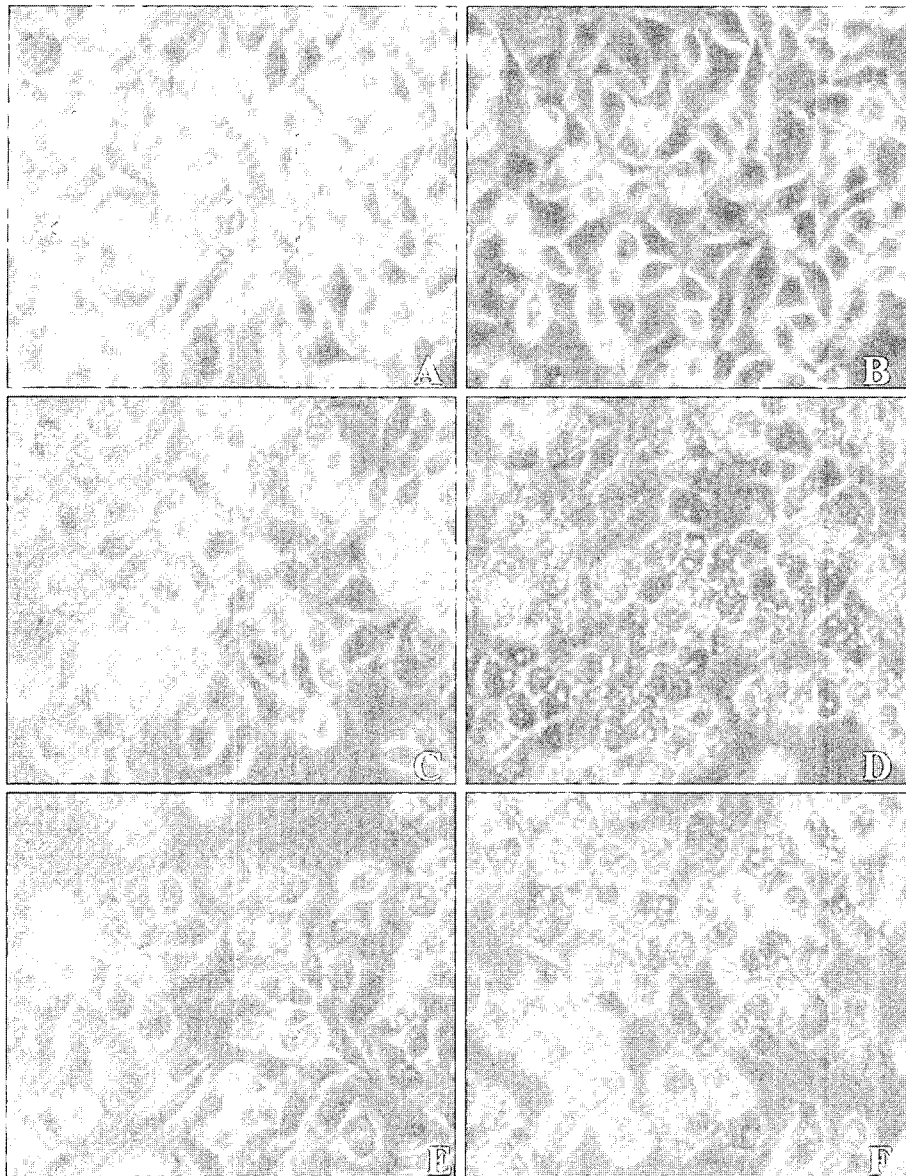


Fig. 3. Morphological alteration of AGS cells treated 0.25% and 0.33% BARODON[®]. After 6 hr, cells were examined microscopically ($\times 400$) with treated none (A), vehicle (0.1% DW) (B), 0.25% BARODON[®] A (C), 0.33% BARODON[®] A (D), 0.25% BARODON[®] B (E), 0.33% BARODON[®] B (F).

태학적 변화를 관찰 할 수 있었다. 이 변화는 세포질의 강한 공포화로 사료된다.

바로돈에 의한 사람 AGS 세포의 apoptosis 유발

Fig. 1, 2와 3의 결과들을 바탕으로 바로돈은 AGS 세포에 증식을 억제할 수 있는 활성성분을 가지고 있다고 사료되어, 바로돈이 AGS 세포에서 어떠한 기전으로 성장을 억제하고 세포의 증식이 감소하였는지를 알아보기 위하여 바로돈 A와 B를 0.25%와 그 보다 높은 농도인 0.33%를 6시간 동안 처리한 후 PI Staining을 하여

FACScan 시험법으로 세포고사의 정도와 동시에 세포성장 억제 요인 중의 하나인 cell cycle arrest를 동시에 알아보고자 하였다. Fig. 3(A)에서 바로돈 A의 경우 대조군에 비하여 바로돈 A를 0.25%와 0.33% 처리하였을 경우 sub-G1 phase(M1)가 증가하고 바로돈 B의 경우도 sub-G1 phase(M1)가 농도 의존적으로 증가하여 세포고사가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 바로돈 B의 경우 대조군에 비하여 바로돈 B를 0.33% 처리하였을 경우(B-3) 13.3%까지, 0.25% 처리하였을 경우(B-4) 9.01%까지, sub-G1 phase가 증가하여 바로돈 A보다 위암의 성장 억

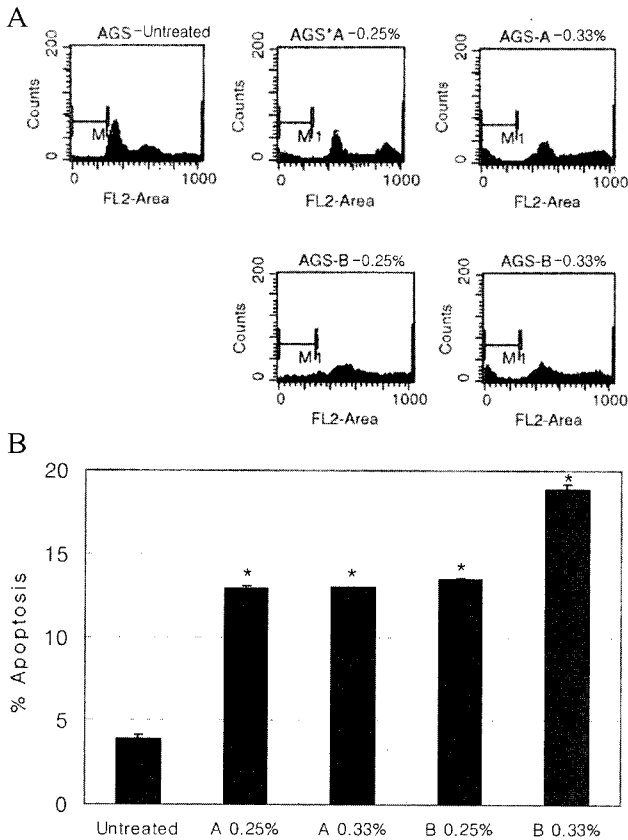


Fig. 4. Effects of 0.25% and 0.33% BARODON® on cell-cycle distribution of AGS cells after 6hr treatments. The cells were stained with PI solution at 37°C for 30 min (A). The sub-G1 populations (% apoptosis) are expressed as percentages shown in the graph (B). *, Significantly different from control at p<0.05 level.

제효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 세포고사의 정량적인 수치를 알아보기 위해 Flow cytometry 시험법을 실시하였고 그 작용기전을 확인하기 위하여 Western blotting 시험법을 사용하여 caspase family cysteine protease의 활성을 조사하였다.

AGS 세포에서 바로돈 A와 B에 의한 PARP의 분절과 caspase-7의 활성화

바로돈이 위암의 세포고사를 유도하는 메커니즘을 알아보기 위하여 세포고사에 대한 여러 단백질의 변화를 Western blotting을 통하여 관찰하였다. 최근에 apoptosis에 의한 세포고사기작에서 caspase로 이름 붙여진 interleukin-1-b-converting enzyme(ICE) family cystein protease가 고사 과정의 중심 역할을 하고 이 효소가 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 같은 기질을 분해하는 것으로 알려져 있다. 위의 Fig. 5를 보면 바로돈 A와 B는 PARP 기질을 분해시켜 세포고사로 이끌어 가는 것이 관찰되었다.

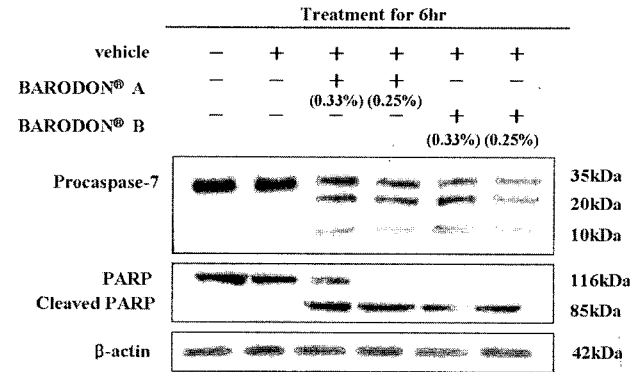


Fig. 5. Expression of caspase-7 and PARP in AGS cells. Procaspase-7 and PARP cleavage was detected in BARODON® A and B treated AGS cells. Lysate was separated in 12% SDS-PAGE and the immunoreactive signals were visualized by ECL kit.

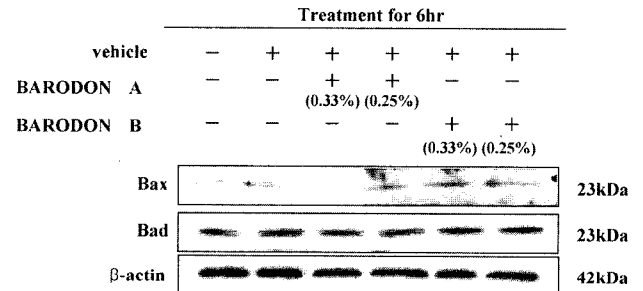


Fig. 6. Expression of Bcl-2 family in AGS cells. BARODON® A and B increased the expression of Bax protein in AGS cells. Lysate was separated in 12% SDS-PAGE and the immunoreactive signals were visualized by ECL kit.

AGS 세포에서 바로돈 A와 B에 의한 Bax 단백질의 발현 증가

세포 고사를 조절하는 세포 안팎의 여러 가지 인자들이 밝혀져 있는데, 그 중에서 Bcl-2 family 단백질들은 세포 고사를 촉진하거나(Bad, Bax) 억제하는 것(Bcl-2, Bcl-XL)으로 알려져 있으며, 이 단백질들이 서로 어떻게 결합하는가에 따라 세포 고사 억제 또는 촉진한다고 밝혀져 있다. 바로돈 A와 B는 세포고사를 촉진하는 Bax의 발현을 증가시키고 이로 인한 cytochrome C의 방출과 downstream caspase의 activation을 야기해 caspase 7의 activation을 유도하여 세포고사 기작이 일어나는 것으로 판단된다.

고찰 및 결론

천연물질에서 추출한 많은 성분들이 암을 포함한 여러 가지 질병의 치료를 위한 사용이 증가되고 있다(Gupta

and Mukhtar, 2002; Wattenberg *et al.*, 1976). 발암은 줄기세포의 불가역성 변이(개시단계), 개시된 줄기세포의 복제 증식(촉진단계)과 침윤과 전이(진행단계)에 관련되어 다단계적으로 여러 메커니즘을 통해 일어난다(Trosko and Chang, 2001). 암의 예방과 치료는 그러한 다양한 메커니즘에서 여러 형태로 이루어진다(Hu *et al.*, 2002). 세포고사 메커니즘은 여러 연구자들에 의해 암의 예방과 치료에 많은 관여를 하고 있다고 보고되고 있다(Li *et al.*, 2003; Osaki *et al.*, 1997; Takahira *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2002). 이 연구에서는 사람의 위암 세포인 AGS 세포에서 바로돈 A와 B의 세포고사 유도에 의한 증식 억제효과와 그 메커니즘을 시험해 보았다.

NSAIDs(Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs) 계열인 JTE-522는 AGS 세포에서 NF- κ B, p53, bcl-2 그리고 caspase 3를 조절함으로써 세포고사를 유도하여 위암세포의 사멸을 유도한다고 보고된 적이 있고(Li *et al.*, 2002), 그리고 미토콘드리아의 막전위가 저하되고 cytochrome C의 방출을 유도하여 세포고사를 일으킨다는 보고도 있었다(Pricci *et al.*, 2001). 바로돈의 경우, AGS 세포에서 바로돈 A를 0.25% 처치하였을 때와 바로돈 B를 0.2% 처치하였을 때 세포의 생존율이 감소되었다. 또한, 세포 내 공포(vacuolation)가 생성되고 세포주기 분석에서 분절된 sub-G1의 세포가 증가하는 것을 보아 세포고사의 특징을 관찰할 수 있었다. 세포 내 공포형성은 대부분의 세포에서 발견되는 lysosomal vacuolation과는 다르다. 이러한 공포화는 자발적 공포화(spontaneous vacuolation)라고도 불리는데, 세포에서 개별적으로 작은 cluster를 형성하고 인접해 있는 세포에는 영향을 미치지 않는다(Henics and Wheatley, 1999). 공포형성과 세포고사와의 관계는 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나, Bernard L. 등의 연구 결과에 따르면 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포에서 Amino-terminal region of insulin-like growth factor binding protein-3가 공포화를 수반한 세포고사를 유도한다고 보고되었다(Bernard *et al.*, 2002). 따라서, 본 연구 결과에서도 공포화된 cluster 외에 남은 세포에서는 형태학적으로 어떠한 영향을 받지 않은 것으로 보아 바로돈 A와 B는 자발적인 공포화를 유도하여 세포고사가 발생하는 것으로 판단된다.

세포고사의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 미토콘드리아에 대한 최근 보고서에 의하면 미토콘드리아의 기능조절은 세포질로 방출되는 cytochrome C와 같이 caspase activators, 막전위차의 변화, 그리고 Bcl-2 family 단백질 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 2002; Green and Reed, 1998; Loeffler and Kroemer, 2000; Yin *et al.*, 2002). 본 실험에서는 세포고사에 관련

된 Bcl-2 family 중 Bax와 Bad의 변화와, caspase 7의 activation을 시험한 결과, 바로돈은 위암세포의 미토콘드리아를 경유하는 downstream caspase인 caspase 7의 activation과 DNA repair에 관련된 death substrate인 PARP의 cleavage, pro-apoptotic protein인 bax의 up-regulation을 통해 세포고사를 유도하는 것으로 밝혀졌다.

그러므로, 사람의 AGS 세포 이외의 위암세포에서 *in vitro* 시험과 더불어 이종(xenograft) 동물 위암모델을 이용하여 생체 내 항암실험에 대한 연구가 이루어진다면 바로돈은 사람의 위암의 예방과 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-005-E00076).

참고문헌

- Ajani, J.A. (1998): Chemotherapy for gastric carcinoma: new and old options. *Oncology (Huntingt)*, **12**, 44-47.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- Bargou, R.C., Daniel, P.T., Mapara, M.Y., Bommert, K., Wagnener, C., Kallinich, B., Royer, H.D. and Dorken, B. (1995): Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int. J. Cancer*, **60**, 854-859.
- Bernard, L., Babajko, S., Binoux, M. and Ricort, J.M. (2002): The amino-terminal region of insulin-like growth factor binding protein-3, (1-95)IGFBP-3, induces apoptosis of MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **293**, 55-60.
- Choi, Y.H., Kim, M.J., Lee, S.Y., Lee, Y.N., Chi, G.Y., Eom, H.S., Kim, N.D. and Choi, B.T. (2002): Phosphorylation of p53, induction of Bax and activation of caspases during beta-lapachone-mediated apoptosis in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.*, **21**, 1293-9.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- Gupta, S. and Mukhtar, H. (2002): Chemoprevention of skin cancer: current status and future prospects. *Cancer Metastasis Rev.*, **21**, 363-380.
- Henics, T. and Wheatley, D.N. (1999): Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. *Biol. Cell*, **91**, 485-498.
- Hu, H., Ahn, N.S., Yang, X., Lee, Y.S. and Kang, K.S. (2002): Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int. J. Cancer*, **102**, 250-253.
- Jo, E.H., Cho, S.D., Ahn, N.C., Jung, J.W., Yang, S.R., Park,

- J.S., Park, K.S., Hong, I.S., Seo, M.S., Nguyen, B.T., Lee, Y.S. and Kang, K.S. (2003): Antigenicity study of nonspecific immunostimulator BARODON®. *Korean. J. Vet. Res.*, **43**, 255-261.
- Jo, E.H., Cho, S.D., Ahn, N.C., Jung, J.W., Yang, S.R., Park, J.S., Park, K.S., Hong, I.S., Seo, M.S., Nguyen, B.T., Lee, Y.S. and Kang, K.S. (2003): Eye irritation, skin irritation and skin sensitization tests for nonspecific immunostimulator BARODON®. *J. Tox. and Pub. Health*, **19**, 39-44.
- Seo, M.S., Cho, S.D., Ahn, N.C., Jung, J.W., Yang, S.R., Park, J.S., Park, K.S., Hong, I.S., Jo, E.H., Nguyen, B.T., Lee, Y.S. and Kang, K.S. (2003): Mutagenicity studies on nonspecific immunostimulator BARODON®. *J. Tox. and Pub. Health*, **19**, 141-146.
- Jo, E.H., Hong, H.D., Ahn, N.C., Jung, J.W., Yang, S.R., Park, J.S., Kim, S.H., Lee, Y.S. and Kang, K.S. (2004): Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of licorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1715-1719.
- Korsmeyer, S.J. (1995): Regulators of cell death. *Trends Genet*, **11**, 101-105.
- Li, H.L., Chen, D.D., Li, X.H., Zhang, H.W., Lu, J.H., Ren, X.D. and Wang, C.C. (2002): JTE-522-induced apoptosis in human gastric adenocarcinoma [correction of adenocarcinoma] cell line AGS cells by caspase activation accompanying cytochrome C release, membrane translocation of Bax and loss of mitochondrial membrane potential. *World J. Gastroenterol.*, **8**, 217-223.
- Li, J.Q., Chen, R.C., Cai, K.X. and Ye, Z.Y. (2003): [Apoptosis of human gastric cancer cell induced by photochemical riboflavin]. *Ai Zheng*, **22**, 253-256.
- Loeffler, M. and Kroemer, G. (2000): The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell Res.*, **256**, 19-26.
- Osaki, M., Tatebe, S., Goto, A., Hayashi, H., Oshimura, M. and Ito, H. (1997): 5-Fluorouracil (5-FU) induced apoptosis in gastric cancer cell lines: role of the p53 gene. *Apoptosis*, **2**, 221-226.
- Pricci, M., Linsalata, M., Russo, F., Messa, C., Amati, L., Caradonna, L., Jirillo, E. and Di Leo, A. (2001): Effects of 17beta-estradiol administration on apoptosis and polyamine content in AGS cell line. *Anticancer Res.*, **21**, 3215-3220.
- Sun, S.Y. (2001): Apoptosis induction by chemopreventive agents. *Drug News Perspect*, **14**, 75-80.
- Takahira, K., Sano, M., Arai, H. and Hanai, H. (2004): Apoptosis of gastric cancer cell line MKN45 by photodynamic treatment with photofrin. *Lasers Med. Sci.*, **19**, 89-94.
- Trosko, J.E. and Chang, C.C. (2001): Role of stem cells and gap junctional intercellular communication in human carcinogenesis. *Radiat. Res.*, **155**, 175-180.
- Wattenberg, L.W., Loub, W.D., Lam, L.K. and Speier, J.L. (1976): Dietary constituents altering the responses to chemical carcinogens. *Fed. Proc.*, **35**, 1327-1331.
- Yin, X.M., Luo, Y., Cao, G., Bai, L., Pei, W., Kuharsky, D.K. and Chen, J. (2002): Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42074-42081.
- Yoo, B.W., Choi, S.I., Kim, S.H., Yang, S.J., Koo, H.C., Seo, S.H., Park, B.K., Yoo, H.S. and Park, Y.H. (2001): Immunostimulatory effects of anionic alkali mineral complex solution Barodon in porcine lymphocytes. *J. Vet. Sci.*, **2**, 15-24.
- Zhao, A.G., Zhao, H.L., Jin, X.J., Yang, J.K. and Tang, L.D. (2002): Effects of Chinese Jianpi herbs on cell apoptosis and related gene expression in human gastric cancer grafted onto nude mice. *World J. Gastroenterol.*, **8**, 792-796.
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C. and Green, D.R. (2001): The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.*, **92**, 57-70.