

# 백혈병 세포주 HL-60에서 瓜蒌實의 세포고사 유도 효과

권강범 · 김은경 · 한미정 · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

## Apoptosis-inducing Effect of *Fructus Trichosanthis* in HL-60 Leukemic Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Mi Jeong Han, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Many naturally occurring plant extracts are studied for their beneficial effects for health and particularly on cancer. Apoptosis, or programmed cell death, occurs in both normal and pathological conditions, including cancer. Dysregulation of apoptosis allows transformed cells to continually and uninhibitedly enter the cell cycle, thus perpetuating the sequence of mutation, genomic instability and, finally, oncogenesis. To investigate the apoptosis-inducing effect of the extract of *Fructus Trichosanthis* (EFT) on leukemic HL-60 cells and its mechanism, HL-60 cells in vitro in culture medium were given different doses of the extract. The inhibitory rate of cells were measured by microculture tetrazolium assay, cell apoptotic rate was detected by flow cytometry, morphology of cell apoptosis was observed by DAPI fluorescence staining, and the activations of caspases and PARP were detected using Western blotting analysis. The extract could activate the caspase-3 and caspase-8, induce PARP cleavage, inhibit growth of HL-60 cells, and cause apoptosis significantly. The suppression was in dose-dependent manner. Marked morphological changes of cell apoptosis including condensation of chromatin and nuclear fragmentation were observed clearly by DAPI fluorescence staining especially. These results will provide strong laboratory evidence of EFT for clinical treatment of acute leukemia.

Key words : *Fructus Trichosanthis*, Human leukemia-60 cells, Apoptosis

### 서 론

瓜蒌實(*Fructus Trichosanthis*)은 多年生の 攀援性草質藤本인 하늘타리 및 同屬 近緣植物의 成熟한 果實을 말하며 甘, 寒 無毒하고 肺 · 胃 · 大腸 三經에 작용하며 清熱化痰 · 寬中散結 · 消癰 · 滑腸 등의 효능이 있어 痰熱咳嗽, 胸痺, 結胸, 肺癰, 乳癰, 腸癰, 癰疽腫毒, 腸燥便秘 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 임상적으로 胸痺를 낮게 하며 心과 肺를 맑게 해주고 손과 얼굴에 주름이 진 것을 없게 하며 피를 토하는 것, 뒤로 피를 쏟는 것, 腸風, 赤痢, 白痢를 치료하는데 많이 이용된다<sup>2,4)</sup>.

암 세포의 특징은 무질서하게 증식하므로 본래의 자신에게 부여된 분화 기능을 다하지 못한다는 것이다. 또 자신의 구역을 이탈하여 여러 장소에서 증식하고, 다양한 조직의 정상 기능을 교란시킨다. 암 세포의 이 비정상적인 증식 능력 뒤에는 세포고사가

깊이 관련되어 있는 것으로 생각된다<sup>5-11)</sup>. 즉, 암세포는 세포고사를 피하는 메커니즘을 가지고 있다고 할 수 있다. 세포고사를 억제하는 유전자 bcl-2가 많이 발현하면 암에 걸릴 위험성이 높아진다는 것이 밝혀지고 있으며, 많은 암 관련 유전자가 세포고사 제어에 관련되어 있다는 것이 여러 연구에서 잘 해명되었다<sup>5-12)</sup>.

항암제의 개발은 세포고사의 연구가 진행되기 전부터 실시되어 왔다. 최근의 연구를 통해 모든 항암제가 암 세포에 세포고사를 유발한다는 것이 명백해졌다. 그러나 이들 항암제는 정상 세포에도 거의 같은 정도로 세포고사를 일으켜 원하지 않는 부작용이 초래된다. 그러나 세포고사가 제어된 세포의 죽음이라는 점을 생각하면 암의 세포에서만 선택적으로 세포고사를 유발하는 방법이 반드시 있을 것이다. 암의 치료는 이제 암 세포의 증식 능력을 억제하는 일에만 주안점을 두는 것이 아니라, 암 세포에 결정적으로 세포고사를 유발하는 것이 새로운 목표가 될 것이다<sup>5-23)</sup>.

본 연구에서는 瓜蒌實 물 추출물이 암세포에 대하여 caspase-9, caspase-3, PARP 절단과정으로 세포고사 유도에 있어 유의성 있는 결과를 얻은 바 이를 보고하고자 한다.

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2005/06/10 · 수정 : 2005/07/11 · 채택 : 2005/08/03

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 재료

배양배지 (RPMI 1640), antibiotic/antimycotic 및 Trypsin-EDTA 는 Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. DAPI (4',6-diamidino-2-phenyl-indole)는 Molecular Probe 사 (Willow Creek Re., OR, USA)로부터 구입하고 FBS (fetal bovine serum)는 U.S. Bio-Technologies 사로부터 구입하여 사용하였다. Annexin V-FITC는 BD Pharmingen 사로부터 구입하였으며 procaspase-8, procaspase-9, procaspase-3와 PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) 및  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz 사 (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Sodium bicarbonate, PI (propidium iodide), NP-40 및 기본 시약들은 Sigma 사 (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 세포배양 용기 및 튜브는 Falcon 사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

인체 혈액암 세포주 (human promyelocytic leukemia cell line, HL-60)를 ATCC (American Tissue Culture Collection)로부터 구입하여 10% FBS, antibiotic/antimycotic (100 U/mL penicillin, 25  $\mu$ g/mL amphotericin D, 100  $\mu$ g/mL streptomycin) 및 1.5% sodium bicarbonate가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub> 습기가 충분한 37 °C의 대기로 배양하였다. 세포는 10 cm 배양접시에 2 × 10<sup>6</sup> 개가 되도록 2~3일에 한 번씩 분주하여 배양하였다.

### 3. 약물 및 추출

본 연구에 사용된 瓜蒌實은 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 약제 100 g과 3차 증류수 0.9 L를 동근바닥 플라스크에 넣고 냉각기를 부착한 다음 3시간 동안 전탕한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 상층액을 취해 회전 진공 농축기로 감압 농축하였다. 농축된 시료는 동결 건조기에서 건조한 다음 DMSO에 녹여 사용하였다.

### 4. 세포 생존율 분석

瓜蒌實 추출물에 의한 HL-60 세포주의 세포 생존율을 MTT (2-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법을 이용하여 분석하였다. 간기하면, HL-60 세포주를 96-웰 플레이트에 웰당 1 × 10<sup>4</sup> 개가 되도록 seeding한 다음 및 약제를 24 시간 처리하고 50  $\mu$ g/mL이 되도록 MTT를 첨가하여 2~4시간 동안 반응시켰다. MTT와 생존세포로부터 생성된 보라색 불용성 formazan을 0.1% SDS 용액으로 용해하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율 (%)로 표시하였다.

### 5. Western Blotting

포집된 세포를 PBS (phosphate-buffered saline)으로 세척한 다음 세포 파쇄용액 (50 mM Tris, pH 8.0, 110 mM NaCl, 5 mM

EDTA, 1% Triton X-100, PMSF 100  $\mu$ g/mL)으로 용혈시킨 다음 원심분리하여 단백질을 얻었다. Bradford 분석 방법을 이용하여 정량한 다음 60  $\mu$ g을 취하여 동량의 sample buffer (125 mM Tris pH 6.8, 4% SDS 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) 혼합한 다음 100 °C에서 5분 동안 가열하여 단백질 변성을 유도하였다. 변성된 단백질을 1.2% acrylamide gel에서 전기영동을 수행한 다음 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia 사)으로 전위시키고 5% skim milk/TBS-T로 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. Procaspase-8, -9, -3, PARP 및  $\beta$ -actin 에 대한 1차 항체 (primary antibody)를 3% skim milk/TBS-T에서 1:1,000으로 희석하여 membrane과 상온에서 1시간 30분 동안 반응시키고 세척한 다음 anti-mouse or goat IgG conjugated Horseradish peroxidase 이차 항체 (secondary antibody)를 1% skim milk/TBS-T에서 1:5,000으로 희석하여 membrane과 상온에서 1시간 동안 반응시킨다. TBS-T로 세척한 다음 ECL reagent (ECL, Amersham, Buckinghamshire, England)로 발색시킨 다음 X-ray film에 감광시키는 방법으로 분석하였다.

### 6. DAPI를 이용한 세포 핵 염색

HL-60 세포를 웰 당 2 × 10<sup>5</sup> 개가 되도록 계속하여 24-웰에 seeding한 다음 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 배양하였다. 24 시간 동안 자극 처리 후 Cytospin (Cytospin2, SHANDON)을 이용하여 슬라이드 글라스에 세포를 부착시키고 3.5% formaldehyde로 고정한 다음 PBS로 세척하고 DAPI를 처리하여 상온에서 10분 동안 염색하였다. 염색된 세포를 다시 PBS로 세척한 다음 형광현미경을 이용하여 조사하였다 (PALM, Microlaser Technologies, Bernried, Germany).

### 7. 유세포 분석

EHD 농도에 따른 정량적 세포고사 분석을 위하여 Annexin V-FITC/PI 염색을 한 다음 유세포 분석법을 사용하였다. 간기하면, HL-60 세포에 EHD를 농도별로 처리한 후 6시간 동안 배양한 후 세포를 포집하고 세척한 다음 80% 에탄올로 고정한다. 실온에서 Annexin V-FITC 및 PI로 염색한 다음 유세포 분석기 (Flow cytometer, FACS Vantage, BD)를 이용하여 분석하였다.

### 8. DNA 절편 분석

HL-60 세포주 (1 × 10<sup>6</sup> cells/mL)를 자극하여 24시간 동안 배양한 후 1000 rpm에서 3분 동안 원침한 다음 PBS로 세척한다. 세포에 nuclei lysis solution (Promega, Madison, WI, USA)를 처리한 다음 30분 동안 실온에 방치하여 용혈시킨다. 여기에 단백질 침전 용액을 첨가한 후 4 °C, 13,000 rpm에서 10분 동안 원침한다. 층 분리된 상층액을 취하고 phenol-chloroform(1:1, v/v)으로 DNA 정제과정을 거친 다음에 동량의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시킨다. 원침하여 DNA를 모으고 70% EtOH로 세척한 다음 65 °C에서 1시간 동안 rehydration시킨다. 10 $\mu$ g을 취하여 agarose 젤 상에서 100V로 전기영동 한 후 EtBr로 염색하여 확인한다.

9. 통계분석

실험 결과는 mean ± S.D.로 표시하였으며 유의성 검정은 student's t-test에 의하였으며 p 값이 0.01 이하인 것만 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. 瓜蒌實의 세포독성

HL-60 세포에서 瓜蒌實 물 추출물 (EFT)의 세포독성 효과를 조사하였다. EFT를 농도별로 HL-60 세포에 24 시간 처리한 다음 MTT 방법으로 세포 생존율을 조사하였다. Fig. 1에 보인 결과와 같이 EFT의 농도 의존적으로 세포 생존율을 저하시켰다. 즉, 40% 이상의 세포 생존율 감소가 EFT의 농도 15 µg/mL에서 관측되었다.

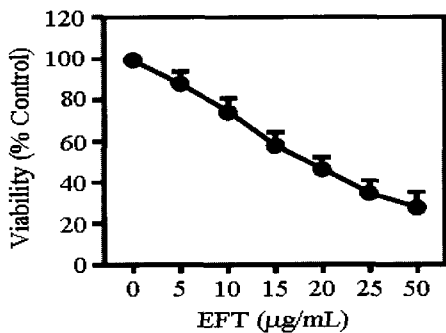


Fig. 1. Effects of EFT on the viability of HL-60 cells. The cells were cultured for 24 h in the absence or presence of EFT at indicated concentrations. The viability was measured by determining reduced MTT content. Values are the mean ± S.E. of duplicate determinations from three separated experiments.

2. 瓜蒌實의 세포고사 유발 효과

EFT에 의한 세포독성 효과가 세포고사와 관계가 있는지 조사하였다. 15 µg/mL의 EFT를 12 시간 처리한 다음 세포를 DAPI로 염색하여 세포핵의 변화를 관찰하였다.

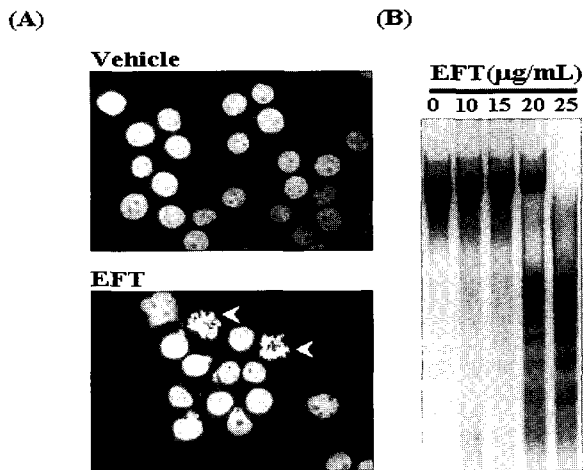


Fig. 2. Apoptotic effects of EFT in HL-60 cells. (A) The cells were incubated for 12 h with either PBS or EFT at 15 µg/mL, and stained with DAPI. Apoptotic nuclei (arrow head) were examined under a fluorescence microscope. (B) The cells were incubated for 12 h with either PBS or EFT at indicated concentrations, and genomic DNA was isolated for examining DNA fragments. Similar results were observed in three separated experiments.

Fig. 2A에 보인 결과와 같이 EFT를 처리한 군에서 세포고사의 근거로 보이는 세포핵 파괴가 관찰되었다. Fig. 2B에 보인 결과는 세포핵에서 분리된 DNA의 분절 여부를 판정하여 세포고사를 정성한 것으로, DNA 분절이 EFT를 처리한 군에서 발견되었다. 이들 결과로부터 EFT에 의한 세포독성이 EFT의 세포고사 효과와 관계가 있음을 알 수 있었다.

3. 瓜蒌實의 세포고사 정량화

EFT의 세포고사 정도를 정량화하기 위하여 대조군 세포와 EFT를 처리한 세포를 각 세포를 세포고사 표지인 FITC-Annexin-V로 염색한 다음 FACS로 염색된 세포를 조사하였다. Fig. 3에 보인 결과와 같이 EFT는 농도 의존적으로 세포고사를 유도하였다.

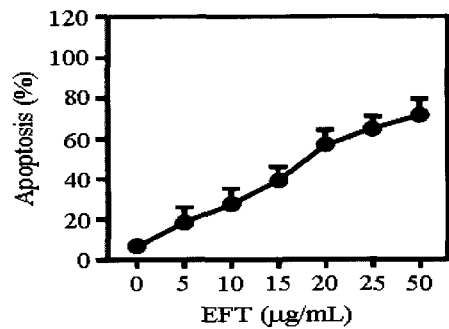


Fig. 3. Determination of EFT-induced apoptosis in HL-60 cells. The cells were incubated for 12 h with either PBS or EFT at indicated concentrations, and stained with FITC-Annexin-V antibody, a marker of apoptosis. The percentage of apoptotic cells was determined by using FACS. Values are the mean ± S.E. of duplicate determinations from three separated experiments.

4. 瓜蒌實의 세포고사 기전

EFT의 세포고사 매커니즘을 조사하기 위해 세포고사 개시 효소인 caspase-8 및 caspase-9 활성 및 세포고사 실행 효소 caspase-3의 활성을 조사하였다. 또한, 세포고사 실행 효소의 결과에 의해 절단되는 PARP의 활성을 조사하였다.

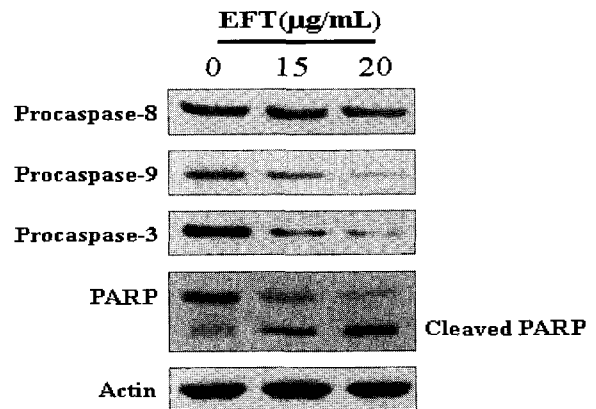


Fig. 4. Apoptotic mechanisms of the action of EFT in HL-60 cells. The cells were treated for 12 h with either PBS or ESL at indicated concentrations. Each protein expression was determined by Western blot. Similar results were observed in three separated experiments.

각 효소의 전구체는 이들 효소가 적절한 크기로 절단되면서 활성화된다. 즉, 각 효소 전구체의 단백질 양의 감소는 이 효소의 활성을 의미한다. 이 실험에서 세포고사를 뚜렷하게 보이지만 단

백질의 무차별 감소를 초래하지 않는 EFT의 농도 15 µg/mL과 20 µg/mL를 선택하여 각 효소의 활성을 Western blot 방법으로 조사하였다. Fig. 4에 보인 결과와 같이 EFT는 caspase-9, caspase-3 그리고 PARP 절단 순서로 세포고사를 유도하였다. Caspase-8 활성은 관찰할 수 없었다.

## 고찰 및 결론

瓜蒌實(Fructus Trichosanthis)은 淸熱化痰·寬中散結·消癰·滑腸 등의 효능이 있어 痰熱咳嗽, 胸痹, 結胸, 肺癰, 乳癰, 腸癰, 癰疽腫毒, 腸燥便秘 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있으며<sup>1)</sup> 임상적으로 腸風, 赤痢, 白痢를 치료하는데 이용된다<sup>1-4)</sup>.

개체의 죽음이 한 생명의 멈춤이고 1회적인 데 비해, 세포의 죽음은 개체의 일생을 통 해 부단히 일어난다. 세포의 죽음은 세포 안에 내장된 죽음의 장치가 발동하여 일어나는 것으로, 그 프로그램은 유전자 안에 입력되어 있다<sup>4,5)</sup>. 이른바 자살이라고도 할 수 있는 이 세포의 죽음은 '세포고사 (apoptosis)'라고 한다. 이제 까지 세포사로서 생각되고 있던 necrosis 즉 '괴사'는 화상, 허혈, 독물 등의 자극에 일어나는 수동적인 세포의 붕괴 과정이다. 괴사의 경우에는 세포가 팽화, 용해하여 내용물이 유출되고, 그 곳에 백혈구가 모여 염증 반응이 일어난다<sup>4,8)</sup>. 세포고사에서는 세포가 축소하고 세포의 표면의 미세한 융털이 소실되며, 표면은 평평해진다<sup>7,10)</sup>. 또 핵의 크로마틴이 핵막 주변에 응축하여 단편화되고 세포도 단편화하여 '아포토시스 소체'라 불리는 기름방울 모양의 작은 조각이 되고, 대식세포 등의 식세포에게 표적이 될 수 있는 형태로 변한다<sup>6,16)</sup>. 본 연구에서 瓜蒌實 추출물이 백혈병 세포에 고사를 유도함을 DNA 분절과 정량적인 실험을 통하여 확인하였다.

특정 세포에서 세포고사는 매우 복잡한 메커니즘에 의해 발생한다. 가장 잘 연구된 세포고사 메커니즘에는 순차적인 caspase 효소들의 활성화와 이들 효소의 활성화증가에 의한 특정 단백질의 분해가 수반된다. Caspase는 크게 두 종류로 분류할 수 있다<sup>24,25)</sup>. 첫 번째는 세포고사를 개시하는 caspase-8과 caspase-9가 있고, 두 번째로 이들 caspase의 활성화에 영향을 받아 세포고사를 실행하는 caspase-3로 구분된다. Caspase-3의 활성화로 여러 가지 단백질이 절단되거나 인산화 된다<sup>25,26)</sup>. 가장 대표적인 caspase-3 의존 절단 효소에는 PARP가 있다. PARP는 절단되지 않는 상태가 활성화된 상태로 이것은 정상 세포에 있어서 손상된 DNA를 신속하게 복구하는 일을 한다. 세포고사 과정에서는 DNA를 복구할 필요성이 없기 때문에 caspase-3에 의해 절단되어 활성이 없어진다<sup>26)</sup>.

본 실험 결과에 의하면 瓜蒌實 물 추출물은 세포고사에 의한 생존율을 억제하였으며 이러한 효과는 caspase-9, caspase-3, PARP 절단이 관여하는 것으로 나타났다. 이러한 세포고사 유도 효과는 瓜蒌實이 향후 항암치료에 응용될 수 있음을 시사한다.

## 감사의 글

이 논문은 2004년도 원광대학교 교내연구비 지원을 받았음

## 참고문헌

1. 신민교. 임상본초학. 서울. 남산당. 1997 pp 374-375.
2. Zhang, W.X., Hu, H.F., Li, W.G., Zhou, Z.T. Intercepting effects of seven Chinese herb drugs on experimental oral carcinogenesis. Shanghai Kou Qiang Yi Xue 13(1):34-37, 2004.
3. He, X.J., Qiu, F., Shoyama, Y., Tanaka, H., Yao, X.S. The active constituents from Gualou-xiebai-baijiu-tang part I: active saponins. J Asian Nat Prod Res 4(3):189-196, 2002.
4. He, X., Qiu, F., Shoyama, Y., Tanaka, H., Yao, X. Two new steroidal saponins from "Gualou-xiebai-baijiu-tang" consisting of Fructus trichosanthis and Bulbus allii macrostemi. Chem Pharm Bull (Tokyo) 50(5):653-655, 2002.
5. Abou, E.I., Hassan, M.A., van der Meulen-Muileman, I., Abbas, S., Krut, F.A. Conditionally Replicating Adenoviruses Kill Tumor Cells via a Basic Apoptotic Machinery-Independent Mechanism That Resembles Necrosis-Like Programmed Cell Death. J Virol. 78(22):12243-12251, 2004.
6. Hajra, K.M., Liu, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. Apoptosis 9(6):691-704, 2004.
7. Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Okumura, K. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. Cancer Sci 95(10):777-783, 2004.
8. De Santis, M.L., Hammamieh, R., Das, R., Jett, M. Adipocyte-fatty acid binding protein induces apoptosis in DU145 prostate cancer cells. J Exp Ther Oncol 4(2):91-100, 2004.
9. Olszewska-Slonina, D., Drewa, T., Styczynski, J., Olszewski, K., Musialkiewicz, D. B16 and CLS91 mouse melanoma cells susceptibility to apoptosis after vincristin treatment in vitro. Acta Pol Pharm 61(2):113-121, 2004.
10. Zou, W., Liu, X., Yue, P., Zhou, Z., Sporn, M.B., Lotan, R., Khuri, F.R., Sun, S.Y. c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-mediated up-regulation of death receptor 5 contributes to induction of apoptosis by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oate in human lung cancer cells. Cancer Res 64(20):7570-7578, 2004.
11. Scifo, C., Cardile, V., Russo, A., Consoli, R., Vancheri, C., Capasso, F., Vanella, A., Renis, M. Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. Oncol Res 14(9):415-426, 2004.
12. Pessayre, D., Fromenty, B., Mansouri, A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. Eur J Gastroenterol Hepatol 16(11):1095-105, 2004.
13. Jacob, D., Davis, J.J., Zhang, L., Zhu, H., Teraishi, F., Fang, B. Suppression of pancreatic tumor growth in the liver by systemic administration of the TRAIL gene driven by the hTERT promoter. Cancer Gene Ther 2004.
14. Hillman, G.G., Wang, Y., Kucuk, O., Che, M., Doerge, D.R.,

- Yudelev, M., Joiner, M.C., Marples, B., Forman, J.D., Sarkar, F.H. Genistein potentiates inhibition of tumor growth by radiation in a prostate cancer orthotopic model. *Mol Cancer Ther* 3(10):1271-1279, 2004.
15. Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C.G., Bubici, C., Franzoso, G. Linking JNK signaling to NF- $\kappa$ B: a key to survival. *J Cell Sci* 117(Pt 22):5197-5208, 2004.
  16. Delmas, D., Rebe, C., Micheau, O., Athias, A., Gambert, P., Grazide, S., Laurent, G., Latruffe, N., Solary, E. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004 .
  17. Zhang, J.H., Wan, M.X., Pan, B. R., Yu, B. Cytotoxicity of HSVtk and hrTNF-alpha Fusion Genes with IRES in Treatment of Gastric Cancer. *Cancer Biol Ther* 3(11), 2004.
  18. Chien, W., Kumagai, T., Miller, C.W., Desmond, J.C., Frank, J.M., Said, J.W., Koeffler, H.P. Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. *J Biol Chem* 2004.
  19. Kweon, S.M., Lee, Z.W., Yi, S.J., Kim, Y.M., Han, J.A., Paik, S.G., Ha, S.S. Protective role of tissue transglutaminase in the cell death induced by TNF-alpha in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Biol* 37(2):185-191, 2004.
  20. Volanti, C., Gloire, G., Vanderplassen, A., Jacobs, N., Habraken, Y., Piette, J. Downregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Oncogene* 2004.
  21. Zhang, X., Jin, T.G., Yang, H., DeWolf, W.C., Khosravi-Far, R., Olumi, A.F. Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res* 64(19):7086-7091, 2004.
  22. Hussain, S.P., Trivers, G.E., Hofseth, L.J., He, P., Shaikh, I., Mechanic, L.E., Doja, S., Jiang, W., Subleski, J., Shorts, L., Haines, D., Laubach, V.E., Wiltrout, R.H., Djurickovic, D., Harris, C.C. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* 64(19):6849-6853, 2004.
  23. Jimenez-Lara, A.M., Clarke, N., Altucci, L., Gronemeyer, H. Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Trends Mol Med* 10(10):508-515, 2004.
  24. Hsu, P.C., Huang, Y.T., Tsai, M.L., Wang, Y.J., Lin, J.K., Pan, M.H. Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the Bcl-2 family, p27, and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 52(20):6330-6337, 2004.
  25. Chandrasekher, G., Sailaja, D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K)/Akt but not PI-3K/p70 S6 kinase signaling mediates IGF-1-promoted lens epithelial cell survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (10):3577-3588, 2004.
  26. Hattangadi, D.K., DeMasters, G.A., Walker, T.D., Jones, K.R., Di, X., Newsham, I.F., Gewirtz, D.A. Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem Pharmacol* 68(9):1699-1708, 2004.