

상황버섯 균사체 발효주의 세포독성 비교

최영현* · 박 철 · 정일홍 · 최병태¹ · 이용태² · 박동일³ · 정영기⁴

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 1: 해부학교실, 2: 생리학교실,
3: 폐계내과학교실 및 한방바이오연구센터, 4: 동의대학교 자연과학대학 미생물학과

In vitro Cytotoxic Effects of Wine Produced by *Phellinus linteus* Fermentation

Yung Hyun Choi*, Cheol Park, Il Hong Jung, Byung Tae Choi¹, Yong Tae Lee², Dong Il Park³, Young-Kee Jeong⁴

Department of Biochemistry, 1: Department of Anatomy, 2: Department of Physiology,
3: Department of Internal Medicine, Dongeui University College of Oriental Medicine and Biomedical Research Institute of Oriental Medicine,
4: Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dongeui University

Phellinus linteus (Berk. & M.A. Curtis) Teng, commonly referred to as Sangwhang in Korea, is a well-known species of the genus *Phellinus*, which attracts great attention due to its pharmacological values. *P. linteus* has been reported to produce anti-tumor, anti-angiogenic, anti-mutagenic and immunomodulatory activities *in vivo* and *in vitro*. However, despite extensive biochemical studies on *P. linteus*, the wine produced by *P. linteus* fermentation (WPLF) has poorly investigated. In the present study, it was compared the *in vitro* cytotoxic effects of WPLF with ethanol as positive control. WPLF as well as ethanol induced the inhibition of cell proliferation and morphological changes in both HepG2 and A549 cells in a concentration-dependent manner, however, WPLG treatment has less cytotoxic effects than ethanol treatment. These cytotoxic effects were associated with the induction of apoptotic cell death, but, WPLG treatment has less apoptosis inducing effects than ethanol treatment.

Key words : *Phellinus linteus*, fermented wine, cytotoxicity, apoptosis

서 론

상황버섯은 동의보감에 상목이(桑木耳)라 하여 탕액편에 소개되었고¹⁾, 본초강목에서는 木耳, 桑耳, 桑黃 등 여러 이름으로 언급하고, 효능을 黑桑黃과 金桑黃으로 나누어 설명하고 있으나, 대체적으로 여성 자궁, 남성 생식기, 소화기 계통의 어혈, 혈병, 종양 및 염증성 질환을 치료하는 효능이 있음을 시사하고 있다²⁾. 또한 상황버섯은 기원이 다양하고 종류가 많으나, 가장 효능이 탁월하고, 예로부터 인정하고 있는 것은 *Phellinus linteus*로 부터 분리한 단백질로서 뽕나무에 이의 균사를 이식하여 재배한 것을 말하며 여성의 자궁 질환 특히 자궁의 종양이나, 장의 염증, 종양 질환 및 숙취 등에 효능이 있으나 이는 인체의 면역 증강 및 항암 효능이 뛰어 남을 의미한다³⁻⁵⁾. 최근 기능성 상품의 등장과 함께 단일 또는 복합 한약제나 그 추출물을 첨가한 다양한 기능성 주류가 출시되고 있다. 이들의 대부분은 양조주(brewing

liquor)로서 누룩을 이용하여 곡물을 발효시켜 제조하고 있다. 그러나 누룩을 사용함에 따라 누룩 발효주 특유의 향이 그대로 남아 있는 경우가 많아 일부 이를 기피하는 현상이 있다. 본 연구진은 선행연구에서 *P. linteus*의 균사체가 알코올을 생산하는 것을 이용하여 상황버섯 균사체 발효주(Wine produced by *P. linteus* fermentation, WPLF)를 개발한 바 있다^{6,7)}. WPLF는 연한 노란색을 띠며 누룩 발효주와는 달리 독특한 향을 내는 발효주로 상황버섯 고유의 효능을 가지고 있다면 또 다른 기능성 주류로서 자리매김할 수 있을 것이므로 이에 대한 고찰이 절실히 요구된다.

한편 세포의 죽음은 necrosis와 apoptosis로 구분되며, 이는 세포의 형태적 및 생화학적 특성에 의하여 구분된다. Necrosis는 생리적, 화학적인 외상에 의한 세포의 죽음이고, apoptosis는 개체의 정상적인 발달과 분화에 관여하며, 태아의 형태형성, 난자의 배란, 신경세포의 시냅스 형성 등과 연관된 체내 비정상적인 세포들을 제거하는 기전이다^{8,9)}. 특히 apoptosis에는 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다¹⁰⁾. Apoptosis 유발에 관여하는 유전자 중 apoptosis 기전을 억제하

* 교신저자 : 최영현, 부산시 진구 양정동 산 45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7413

· 접수 : 2005/05/20 · 수정 : 2005/06/21 · 채택 : 2005/07/18

는 Bcl-2 단백질 및 apoptosis 기전을 촉진하는 Bax 단백질이 중요하다 보고되었다¹¹⁻¹³. 이들 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들을 조절한다^{12,14}. 또한 caspases라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 정상적으로 성장중인 세포에서는 proenzyme 형태로 존재한다. 이들은 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 poly(ribose-ADP) polymerase (PARP)나 β -catenin 등과 같은 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다¹⁵⁻¹⁸. Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 또 다른 class인 "inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)"에 속하는 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다. 그리고 이들 중 몇 가지 IAPs는 caspases와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀져, IAP family들의 잠재적인 역할에 대한 관심이 높아지고 있다^{19,21}. 최근 알콜에 의한 간세포를 포함한 인체 세포의 사멸 현상은 기본적으로 mitochondria 경로를 거치는 apoptosis 유발과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며^{22,23}, in vitro 실험계를 이용한 알콜의 대사 특징을 분자생물학적인 방법의 접근이 가능해 졌고 그와 연관된 많은 결과들이 발표되고 있다.

따라서 본 세부과제에서는 상황버섯 균사체 발효주(WPLF)의 세포독성 정도를 인체 간 및 폐 세포들을 대상으로 일반 알콜 농도와 비교하고, 세포의 형태 변화 비교 및 apoptosis 유발의 정도를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포의 배양 및 시료의 처리

실험에 사용된 상황버섯 균사체 발효주(WPLF)는 (주)J&B Bio.(부산)에서 제공받았으며, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였고 이를 다시 0.45 μ m의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 실험에 사용하였다. 대조군으로는 Sigma Co.의 100% 순수 알코올을 사용하였다. 실험에 사용한 HepG2 간 및 A549 세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 세포의 배양과 시약처리를 위해 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco BRL) 등이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL)를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하의 CO₂ incubator에서 배양하였고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상에 의한 세포의 성장억제나 각종 contamination을 방지하기 위해 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적절한 수의 세포를 분주하여 재배양하였다.

2. 위상차 현미경을 이용한 세포 성장과 형태의 관찰

세포 배양용 100-mm Petri dishes에 세포를 4 X 10⁴개/ml의

개수로 dish 당 8 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 시료를 적정 농도로 처리한 후 48시간동안 배양시켰다. 48시간 후에 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율 하에서 정상 및 시료가 처리된 배지에서 배양된 세포의 형태를 비교하였다.

3. MTT assay를 이용한 세포 생존율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 HepG2 및 A549 세포를 3 X 10⁴ 개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 시료를 성장 배지에 적정 농도로 처리한 후 48시간동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)시약을 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 2 ml씩 처리 후, 3시간동안 CO₂ incubator에서 반응시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 1 ml씩 처리하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 96 well에 200 μ l씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3번의 측정값을 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석하였다.

4. DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

준비된 시료의 처리에 의한 세포들의 apoptosis 유발 여부 확인을 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 정상 및 시료가 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde용액과 PBS를 1 : 9의 비율로 섞은 고정액을 모아진 세포에 500 μ l 첨가하여 잘 섞어준 후, 실온에서 10분 동안 고정하였다. 1,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 PBS 200 μ l를 넣어서 충분히 섞은 후, slide glass 위에 80 μ l 정도 떨어뜨려 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. PBS로 2-3회 수세하고 PBS가 다 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 실온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 washing 하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 적당량을 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 실온에서 염색시켰다. 15분가량 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 수세하고 1차 증류수로 재빠르게 씻은 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리하고 cover glass를 덮는다. 그 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 시료의 처리 농도에 따른 세포들의 핵 형태 변화를 관찰하였다.

5. DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

WPLF 및 ethanol의 처리에 따른 sub-G1기 세포의 빈도를 정량적으로 분석하기 위하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. 이를 위하여 WPLF 및 ethanol이 함유된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액 (70% ethyl alcohol, 0.5% Tween 20)을 첨가하여 4°C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 μ g/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4°C에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로

두 번 씻어낸 후, nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 세포증식 억제에 미치는 영향

실험재료 및 방법에 서술한 바와 같이 준비된 세포주에 상 황버섯 균사체 발효주(WPLF)의 세포독성 정도를 조사하기 위하여 동일 농도의 순수 알코올을 두 종류의 세포주에 처리 한 후 48시간 동안 배양하였다. MTT assay에 준하여 세포증식에 미치는 영향을 조사한 결과를 각각 Fig. 1 및 2에 나타내었다. 모든 결과에서 저농도 처리군(0.5% 처리군)의 경우 세포증식 활성 효과가 다소 높아지는 경향을 보여 주었으나, 알콜의 농도가 증가 할수록 세포주 및 WPLF와 ethanol 사이에 다소 큰 차이는 있었지만 전체적인 세포증식의 억제 효과가 있었다.

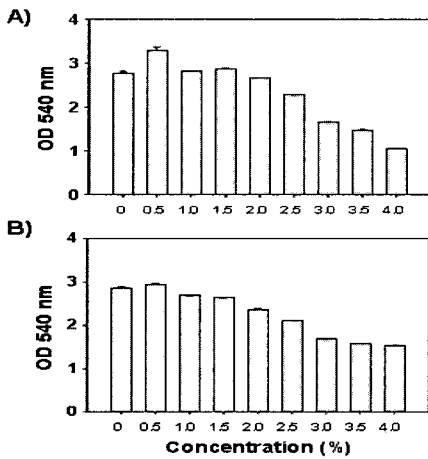


Fig. 1. Anti-proliferative effects of wine produced by *Phellinus linteus* fermentation, (WPLF) and ethanol treatment in HepG2 cells. Cells were treated with various concentrations of WPLF (B) and ethanol (A). After 48 h incubation with, MTT assay was performed. Results are expressed as average \pm SD from three separate experiments.

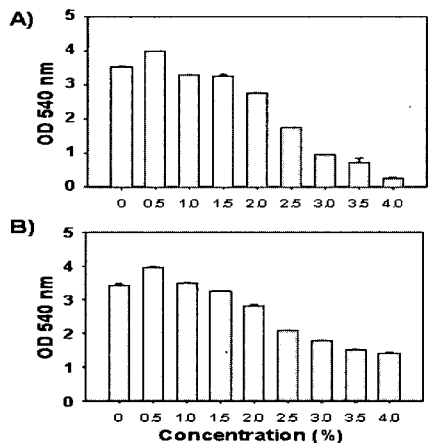


Fig. 2. Anti-proliferative effects of Wine produced by WPLF and ethanol treatment in A549 cells. Cells were treated with various concentrations of WPLF (B) and ethanol (A). After 48 h incubation with, MTT assay was performed. Results are expressed as average \pm SD from three separate experiments.

먼저 Fig.1은 HepG2 세포에서의 결과로서 ethanol 처리군에 비하여 WPLF 처리군이 처리 농도 의존적으로 세포증식 억제 효과가 다소 낮음을 알 수 있었다. Fig. 2의 결과는 A549 세포의 결과로서 A549 세포에서는 HepG2 세포에서 보다 ethanol 처리군의 세포증식 억제효과가 매우 높았음을 알 수 있었다. 즉 3% 처리군이상에서는 거의 모든 세포들의 증식이 30-10% 이하로 낮아졌다. 그러나 WPLF가 처리된 A549 세포의 경우 HepG2에서 보여준 세포증식 억제 경향성과 유사하게 나타났다. 이상의 결과에서 WPLF 처리군도 ethanol 처리군에서 처럼 처리 농도가 증가 할수록 세포증식의 억제 효과가 있었지만 ethanol 처리군에 비하여 상대적으로 세포독성의 효과가 낮았음을 알 수 있었다.

2. 세포의 형태 변화에 미치는 영향

다음은 이러한 ethanol 및 WPLF 처리에 따른 세포의 증식 억제 차이에 따른 두 종류 세포의 형태적 변형의 정도에는 어떤 차이점이 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 두 종류의 세포를 분주하여 24시간동안 안정화 시킨 후 Fig. 1 및 2에서와 동일한 농도의 ethanol 및 WPLF를 처리하였다. 48시간 배양 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰된 결과는 Fig. 3 및 4에 나타난 바와 같다. Fig. 3의 결과에 나타난 바와 같이 HepG2 세포에서 ethanol이 처리된 배지에서 자란 세포의 경우 처리 농도가 증가될수록 세포의 모양이 다소 길어지면서 부착력을 상실하여 배지 위로 점차 부유되면서 세포내 공포의 형성이 많아 졌음을 알 수 있었다.

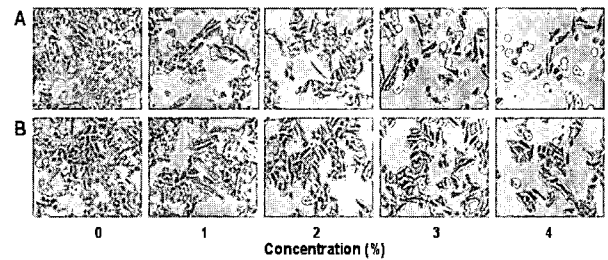


Fig. 3. Morphological changes in HepG2 cells following treatment with WPLF and ethanol. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or WPLF (B) and ethanol (A) for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$.

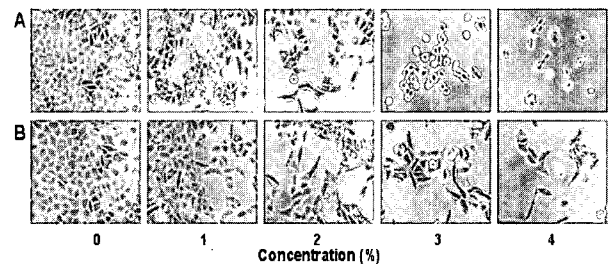


Fig. 4. Morphological changes in A549 cells following treatment with WPLF and ethanol. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or WPLF (B) and ethanol (A) for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$.

그러나 동일 농도의 WPLF 처리군의 경우 ethanol 처리군에 비하여 공포의 형성 정도는 현저히 낮으며 부착력의 상실 정도와 전체적인 세포의 변형된 모습이 ethanol 처리군보다 다소 정

상의 세포에 가까운 정도로 나타났다. 이러한 현상은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 A549 세포에서도 유사하게 관찰되었다. 이러한 세포의 형태적인 차이점은 순수 ethanol 처리군에 비하여 WPLF 처리군이 세포의 증식 억제 현상이 상대적으로 낮은 선행 결과와 매우 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

3. 세포핵의 형태에 미치는 영향

한편 ethanol에 노출된 세포들은 apoptosis 유발을 통한 세포의 죽음을 초래한다는 사실은 이미 잘 알려져 있는데^{22,23}, apoptosis가 일어난 세포에서 가장 일반적으로 관찰되는 현상이 DNA의 절단에 의한 염색질의 응축 현상이다⁸⁻¹⁰. 따라서 ethanol 및 WPLF 처리에 의한 세포의 증식 억제 및 형태적 변형 유발이 apoptosis 유발과 직접적인 관련성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 동일한 조건에서 배양된 세포들을 대상으로 DAPI 염색을 통한 세포의 핵 형태를 비교 조사하였다.

Fig. 5에 나타낸 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포의 경우 핵의 전체가 완전한 형태로 염색이 되는 양상을 보였으나 ethanol 및 WPLF 처리 농도가 증가될수록 DNA 절단에 의한 염색질의 응축된 형태인 apoptotic body의 형성 정도가 증가되었으나 apoptotic body의 형성 정도는 순수 ethanol 처리군에 비하여 WPLF 처리군에서 현저하게 낮게 나타났다. 이러한 경향성은 A549 세포에서도 유사하게 관찰되었으며(Fig. 6), 이는 WPLF 처리군에 비하여 ethanol 처리군에서 apoptosis 유발에 의한 세포의 죽음이 현저하게 높게 나타남을 의미하는 것이며, Fig. 1 및 2에 나타낸 생존율의 저하 현상과 밀접한 관련성을 보여주는 결과로 생각되어진다.

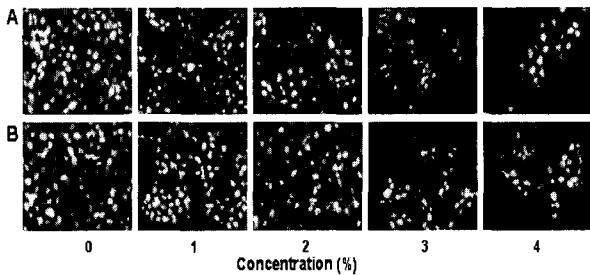


Fig. 5. Induction of apoptotic bodies in WPLF- and ethanol-treated HepG2 cells. Cells were treated with WPLF (B) and ethanol (A) for 48 h, fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

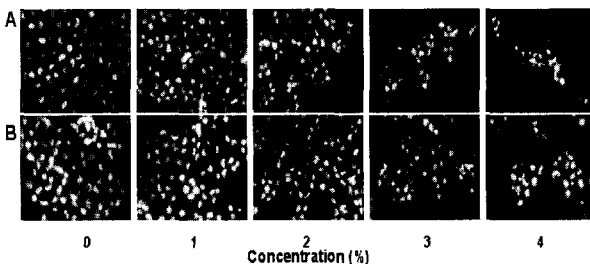


Fig. 6. Induction of apoptotic bodies in WPLF- and ethanol-treated A549 cells. Cells were treated with WPLF (B) and ethanol (A) for 48 h, fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

4. Apoptosis 유발에 미치는 영향

Fig. 5 및 6의 결과에서 조사된 두 가지 세포주에서 ethanol 및 WPLF 처리군 모두 세포의 증식억제 현상이 apoptosis 유발과 연관성이 있었으나, apoptotic body의 형성 정도에는 다소 차이가 있음을 알았다. 따라서 ethanol 및 WPLF 처리에 따른 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 평가 비교하기 위하여 동일한 조건에서 배양된 세포들을 대상으로 DNA flow cytometry 분석을 통한 세포주기의 sub-G1기에 해당되는 세포들의 빈도를 조사하였다. Table 1에 나타낸 결과에서 알 수 있듯이 ethanol 및 WPLF 처리의 농도 증가에 따라 sub-G1기에 해당되는 세포의 빈도는 두 세포주에서 모두 증가하였으나, WPLF 처리군 보다 ethanol 처리군에서 apoptosis 유발이 다소 높게 나타났음을 알 수 있었다. 따라서 이러한 자료들을 기본으로 하여 왜 WPLF 처리군이 ethanol 처리군에 비하여 세포독성의 정도가 낮은 지에 관한 분자생물학적 접근의 연구가 추가되어야 할 것으로 생각된다.

Table 1. Induction of sub-G1 population of the cell cycle after WPLF and ethanol treatment in HepG2 and A549 cells.

concentration (%)	cell line	
	HepG2	A549
0	0.98	0.98
ethanol	1	2.51
	2	29.5
	3	51.3
	4	70.8
WPLF	1	1.98
	2	15.9
	3	30.7
	4	39.6

Exponentially growing cells were incubated with various concentrations of WPLF and ethanol for 48 h. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI. DNA flow cytometric cell cycle analysis was performed comparing untreated controls with cells treated with WEAB and then the frequencies of sub-G1 population were calculated.

결론

본 연구에서는 상황버섯 균사체 발효주(WPLF)가 인체세포에 미치는 세포독성의 정도를 ethanol 처리군과 비교하였다. Ethanol 및 WPLF 처리군 모두 조사된 두 세포주(HepG2 및 A549)에서 처리 농도의존적으로 세포의 증식이 억제되었으나, WPLF 처리군이 ethanol 처리군 보다 세포독성의 정도는 다소 낮음을 알 수 있었으며, WPLF가 동일 알코올 농도 조건에서 ethanol 처리군에 비하여 세포의 형태변형 유발 정도도 다소 미약한 것으로 조사되었다. 이러한 ethanol 및 WPLF 처리군 모두에서의 세포증식의 억제 및 형태변형 유발 현상은 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 그러나 apoptosis 유발의 정도에서도 WPLF는 ethanol에 비하여 동일 조건에서 다소 낮게 나타났다.

참고문헌

1. 허준. 동의보감. 서울, 남산당. p 719, 1993.
2. 이시진. 본초강목. 서울, 고문사. p 980, 1975.

3. Yamada, S. Mycelial culture method of *Phellinus linteus*. Korean patent pp 92-1194. 1994.
4. Choi, J.H., Ha, T.M., Kim, Y.H., Rho, Y.D. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. Kor J Mycol 24, 214-222, 1996.
5. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K., Ham, S.S. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. J Kor Soc Food Sci Nutr 29, 322-328, 2000
6. Lee, J.H., Choi, Y.H., Lee, Y.T., Choi, S.H., Chung, K.T., Jeong, Y.K., Choi, B.T. Effect of the evaporating extract from liquor of fermentation using mycelium of *Phellinus linteus* on the expression of inflammatory proteins and the generation of reactive oxygen species, Kor J Ori. Physiol Pathol 18, 1825-1831, 2004.
7. 정영기. 버섯균사체가 분비하는 알코올의 생산과 이를 이용한 기능성 주류의 개발. 농림부연구과제. 2004.
8. Lieberthal, W., Koh, J.S., Levine, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. Semin Nephrol 18, 505-518, 1998.
9. Zimmermann, K. C., Bonzon, C., Green, D. R. The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther 92, 57-70, 2001.
10. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. Eur. J. Biochem. 254, 439-459, 1998.
11. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M., Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. Cell Mol Biol Res 40, 603-612, 1994.
12. Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4997-5002, 1998.
13. Antonsson, B., Martinou, J.C. The Bcl-2 protein family. Exp Cell Res 256, 50-57, 2000.
14. Lenaz, G., Bovina, C., Formiggini, G., Castelli, G.P. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. Acta. Biochim. Pol. 46, 1-21, 1999.
15. 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.
16. 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.
17. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. Int J Biochem Cell Biol 31, 519-529, 1999.
18. 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.
19. Holcik, M., Gibson, H., Korneluk, R.G. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. Apoptosis 6, 253-261, 2001.
20. Hussein, M.R., Haemel, A.K., Wood, G.S. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. J Pathol 199, 275-288, 2003.
21. Salvesen, G.S., Duckett, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 401-410, 2000.
22. Aroor, A.R., Shukla, S.D. MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol. Life Sci 74, 2339-2364, 2004.
23. Cahill, A., Cunningham, C.C., Adachi, M., Ishii, H., Bailey, S. M., Fromenty, B., Davies, A. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. Alcohol Clin Exp Res 26, 907-915, 2002.