

瓜蒌仁이 자궁경부암세포의 성장억제 및 세포고사에 미치는 영향

이정구 · 김연희 · 이동녕 · 김형준*

세명대학교 한의과대학 부인과학교실

Growth Arrest and Apoptosis of Human Uterine Cervical Carcinoma Cells Induced by *Trichosanthes Semen* Extract

Jeong Gu Lee, Yeon Hee Kim, Dong Nyung Lee, Hyung Jun Kim*

Department of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

To investigate the effects of *Trichosanthes semen* extract on the growth and apoptosis of human uterine cervical carcinoma cells. Effects of *Trichosanthes semen* extract on the growth of ME-180 cells were assayed by MTT assay. Apoptosis induced by *Trichosanthes semen* extract was detected by fluorescent microscopy, DNA fragmentation analysis and flow cytometry. Caspase-3 and caspase-8 activities were assayed. *Trichosanthes semen* extract induced ME-180 cells to die in a dose- and time-dependent manner. ME-180 cells treated with *Trichosanthes semen* extract exhibited typical characteristics of apoptosis. The population of Sub-G1 cells increased significantly, and the cells represented the reduced size, condensed chromatin and apoptotic bodies. They showed the decreased mitochondrial membrane potential and increased activities of caspase-3 and caspase-8. The results suggest that *Trichosanthes semen* extract induced ME-180 cell apoptosis and the activation of caspase and mitochondrial pathway were involved in the process of *Trichosanthes semen* extract-induced apoptosis.

Key words : apoptosis, ME-180 cells, cell cycle, DNA fragmentation, caspase, mitochondria

서 론

자궁경부암(Uterine cervical cancer)은 전 세계 여성에서 발생하는 惡性 腫瘍中 2위를 차지하고 있으며 선진국보다 개발도상국에서 더 흔한 癌으로 알려져 있다¹⁾. 최근 우리나라의 자궁경부암은 점차 빈도가 감소하고 있다. 이는 癌에 대한 인식 향상, 효과적인 선별검사 그리고 치료법의 발달 등으로 치료성적이 좋아진 결과이지만 아직 높은 발생률을 보이고 있다²⁾. 자궁경부암의 특성은 장기간의 前癌性 병변인 上皮內癌의 상태를 거쳐 浸潤性癌으로 진행하기 때문에 早期診斷과 豫防이 비교적 용이하다³⁻⁷⁾. 발병 초기에는 증상이 없지만 癌이 진행할수록 腔出血, 악취 나는 腔分泌物, 骨盤痛, 腰痛, 尿路症狀, 疲勞感, 體重減少 등의 증상이 나타나며⁸⁾, 晩期가 되면 感染部位의 出血, 尿毒症, 惡液質 등이 나타나고 다른 장기로 전이되면 위험한 상태에 이르러 사망하게 된다⁹⁾.

韓醫學에서는 腹腔內에 발생하는 腫瘍을 積聚, 癥瘕, 痞, 瘕

塊, 腸覃, 石瘕, 血蠱 등의 범주에서 다루고 있으며¹⁰⁻¹³⁾, 이 중 여성 생식기관에 발생하는 종괴의 의미를 가진 癥瘕가 자궁경부암과 가장 유사하다^{8,9,14,15)}. 癥瘕는 여성의 生殖器 및 骨盤內空에 발생하는 腫塊로서 腹中腫塊가 시일이 지날수록 조금씩 커지며 때로는 經閉, 不妊 등을 유발하고 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛이 심한 증상을 나타내는 부인과 질환이다^{9,16)}. 癥瘕의 原因은 外感寒邪, 七情所傷, 正氣虛, 傷食, 瘀血, 痰濕 등과 관련이 있으며¹⁷⁻²²⁾, 活血, 理氣, 導滯, 消痰의 治法을 사용한다^{20,22-26)}.

최근 散結消癥의 효능이 있는 처방이나 약물을 이용하여 癥瘕와 관련된 子宮筋腫이나 자궁경부암과 관련한 많은 연구들이 발표되고 있다. 유 등¹⁴⁾의 香稜丸, 朴 등⁹⁾의 濟川煎, 曹¹⁶⁾의 斑玄丸, 朴¹⁵⁾의 六合湯, 曹²⁷⁾의 柴胡疎肝散加味方, 高²⁸⁾의 加味桂枝茯苓丸, 金²⁹⁾의 生地黃, 李 등³⁰⁾의 半枝蓮 등이 자궁경부암 세포의 증식을 억제하는 효과를 나타낸다고 보고한 바가 있다.

散結消癥의 효능이 있는 약물 중 瓜蒌仁은 문헌적으로 肺熱稠痰咳嗽, 乳癰, 腸癰, 腸燥便秘 등의 病症을 치료하는 효능이 있으며^{31,32)}, 실험적 연구로 梁³³⁾은 혈관 신생 억제 효능을, 李³⁴⁾는 백혈병 세포와 관련한 세포고사 효능이 있음을 발표한 것으로

* 교신저자 : 김형준, 충북 제천시 신월동 세명대학교 부속 한방병원.

· E-mail : khjoongy@hanmail.net, · Tel : 043-649-1819

· 접수 : 2005/06/02 · 수정 : 2005/07/14 · 채택 : 2005/08/05

보아 瓜藹仁은 癥瘕와 관련된 항종양효능이 있을 것으로 기대되는 약물이다. 그러나 아직 瓜藹仁이 자궁경부암세포에 미치는 영향에 대한 구체적인 보고나 실험이 된 바가 없다.

이에 저자는 瓜藹仁을 이용하여 자궁경부암세포의 성장억제와 cell apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 인간의 자궁경부암세포인 ME-180세포에 瓜藹仁을 투여하여 ME-180세포에 대한 성장억제 효과, 세포의 형태적 변화, 세포주기 분석, DNA 分節 관찰, Cysteine aspartyl specific protease(caspase)-3와 caspase-8 활성 및 mitochondria membrane potential 변화 등을 관찰하여 항암효과에 대한 유의성 있는 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

瓜藹仁 20 g을 200 ml의 이차증류수에 넣어 1시간 동안 불린 후 약한 불에서 2시간 동안 끓인 후 2,000 x g의 속도로 20분간 원심분리하였다. 위쪽의 상층액을 모아 동결건조 후 14 g의 건조분말을 얻었다. 건조분말은 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹여 최종농도 25 mg/ml로 만든 후 1 ml 씩 나누어 사용 직전까지 -20℃에 보관하였다.

2) 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT: Sigma사(St. Louis, MO, USA))는 Phosphate Buffered Saline(PBS)를 사용해 최종농도 5 mg/ml로 만든 후 여과멸균하였다. DMSO는 Aldrich사에서 구입하였고, RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), PBS는 Invitrogen사(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Penicillin, streptomycin, trypan blue, rhodamine-123, propidium iodide(PI), proteinase K, RNase A는 Sigma사에서 구입하였다. Ac-DEVD-pNA와 Ac-IETD-pNA는 Santa Cruz Biotechnology사(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 세포주 배양

자궁경부암세포주 ME-180(KCLB 30033)은 한국세포주은행에서 구입하였다. ME-180세포주는 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640배지를 사용하여 5% CO₂를 공급한 항온배양기에서 배양하였다. 동결된 상태로 구입한 FBS는 냉장에서 2-3일간 서서히 녹인 후 56℃에서 30분간 heat inactivation시켰다. 사용된 RPMI-1640/10% FBS배지에는 항생제 penicillin을 100 IU/ml, streptomycin을 최종농도 50 µg/ml로 첨가하여 4℃에 냉장 보관하여 사용 직전 37℃로 prewarming시킨 후 사용하였다.

사용된 chemical은 모두 0.2 µm filter로 여과 멸균하여 -20℃에 보관하였고 사용 직전 녹여서 사용하였다.

2) 세포수 및 생존세포수 측정

trypan blue와 hemocytometer를 사용하여 세포수 및 생존 세포수를 다음과 같은 방법으로 결정하였다. 60 mm culture용 dish에 키운 monolayer culture에서 배지를 Pasteur pipet을 사

용하여 제거하였다. 남아있는 FBS를 제거하기 위하여 1 ml PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺를 사용하여 부착된 cell monolayer를 두 번 행구었다. 1 ml의 0.5% Trypsin/EDTA 용액을 넣은 후 1-3분간 상온에 방치하여 plate에서 떨어진 세포들을 2 ml의 RPMI-1640/10% FBS를 넣은 15 ml 원심분리관에 옮겨 200 x g의 속도로 상온에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 세포침전물에 1 ml의 RPMI-1640/10% FBS를 넣고 RPMI-1640배지로 적당히 희석하였다. trypan blue 용액을 최종 농도 0.2%로 첨가한 후 hemocytometer로 살아있는 세포의 비율을 결정하였다.

3) 세포독성효과

瓜藹仁 추출액을 처리한 후 야기되는 세포독성효과(cytotoxic effect)를 결정하기 위해 살아 있는 세포에 의해 MTT가 수용성 formazan으로 변환되는 양을 측정하였다. 90 µl의 배양 배지에 10,000개의 세포를 포함시켜 96-well plate에 넣은 후 24시간 배양하여 plate에 세포를 부착시켰다. 瓜藹仁 추출액(10 µl)을 여러 농도(0, 0.63, 1.25, 2.50 mg/ml)로 넣은 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 15 µl의 MTT를 넣고 37℃에서 4시간 동안 배양하고 상층액을 조심스럽게 제거한 후 40 µl의 DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 형성된 formazan을 녹이기 위해 15분간 shaking 하였다. lysate의 농도를 Bio-Rad microplate reader를 사용하여 570 nm에서 측정하였다.

4) Propidium Iodide 염색에 의한 세포형태 관찰

96-well plate에 5 x 10⁴ cell을 넣고 24시간 후 瓜藹仁 추출액을 처리하였다. 瓜藹仁 추출액 처리 후 24시간 배양한 후 trypsin 처리로 세포를 plate에서 떼어내어 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 50 µl RPMI-1640 배지로 세포를 재부유한 후 70% ETOH로 10분간 고정한 후 PBS로 세 번 행구었다. PI염색액(1 µg/ml PI in PBS)을 처리하고 10분 후 형광현미경으로 관찰하였다.

5) DNA fragmentation 분석

96-well plate에 10⁶ cell을 넣고 24시간 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 여러 농도(0, 0.3, 0.6 mg/ml)의 瓜藹仁 추출액을 처리한 후 24시간 배양한 후 trypsin을 처리하여 세포를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 100 µl의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정한 후 -20℃에 16시간 이상 넣어두었다. 4℃에서 800 x g로 5분간 원심분리하여 에탄올을 완전히 제거한 후 20 µl의 lysis buffer (2 mM EDTA, 100 mM Tris.Cl (8.0), 0.8% SDS)를 넣은 후 2 µl 50 mg/µl RNase A를 넣고 혼합한다. 37℃에서 최소한 30분간 배양한 후 10 µl의 Proteinase K를 넣어 50℃에서 최소한 1시간 30분 배양한다. 8 µl의 4 x DNA loading buffer를 넣은 후 1.8% SeaKem agarose gel에서 TBE buffer로 sample을 50 Volt로 running하여 DNA를 분리시켰다.

6) 세포주기 분석

96-well plate에 10⁶ cell을 넣고 24시간 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 두 가지 농도(0, 0.6 mg/ml)의 약품을 처리한 후 24시간 배양한 후 trypsin을 처리하

여 세포를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하였다. 300 x g로 5분간 원심분리한 후 침전물에 1ml의 PBS를 넣어 300 x g로 5분간 원심분리로 수세 처리 후 다시 한 번 PBS로 수세하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 μ l의 PI 염색약 (0.1% Triton X-100, 200 μ g/ml RNase A, 20 μ g/ml propidium iodide in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 15분간 배양하였다. flow cytometry(Becton Dickinson社(NJ, USA))로 cell fluorescence를 측정하여 세포 주기를 분석하였다.

7) caspase-3와 caspase-8 활성도의 측정

10⁶ cell을 24시간 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 한 후 여러 농도(0, 0.6, 0.9 mg/ml)의 瓜蒌仁 추출액을 처리하고 24시간 배양하였다. 200 μ l의 ice-cold lysis buffer (100 mM HEPES (7.4), 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF)를 넣어 세포를 용해시킨 후 scraper로 바닥에 부착된 세포를 긁어 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮긴 후 15분간 얼음 위에 놓았다. 12,000 x g의 속도로 5분간 원심분리한 후 Bradford assay로 단백질의 양을 측정하였다. 1000 μ l의 2x reaction buffer (100 mM HEPES (7.4), 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 20% glycerol)에 caspase-3와 caspase-8에 대한 기질로 4 μ l Ac-DEVD-pNA와 Ac-IETD-pNA를 최종농도 100 μ M로 넣고 96 μ l의 cell lysate를 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. caspase-3와 caspase-8에 의한 p-nitroanilide(pNA)의 방출은 405 nm에서 microtiter plate reader로 측정하였다.

8) mitochondria membrane potential 측정

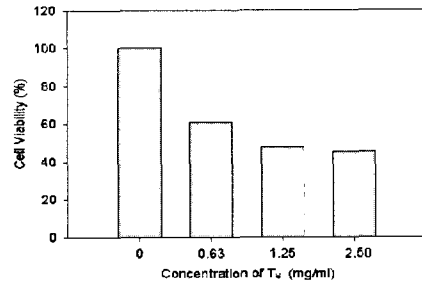
Mitochondria의 membrane potential 변화를 Rh123으로 염색 후 flow cytometry에 의해 결정하였다. 96-well plate에 10⁶ cell을 넣고 24시간 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 plate에 cell이 부착하도록 하였다. 여러 농도(0, 0.3, 0.6 mg/ml)의 瓜蒌仁 추출액을 처리한 후 24시간 배양한 후 trypsin을 처리하여 세포를 plate에서 떼어내었고 상온에서 300 x g로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 100 μ l의 PBS로 재부유시킨 후 1 ml의 ice-cold 70% 에탄올을 넣어 얼음 위에서 30분간 고정하였다. 300 x g로 5분간 원심분리한 후 침전물에 1 ml의 PBS를 넣어 300 x g로 5분간 원심분리로 水洗處理 후 다시 한 번 PBS로 水洗하여 에탄올을 제거하였다. 침전물을 500 μ l의 Rh123 염색약 (5 μ g/ml rhodamine 123 in PBS)으로 녹인 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 세포를 PBS로 수세한 후 FACS Calibur로 cell fluorescence를 측정하였다.

결 과

1. ME-180 세포의 성장에 대한 瓜蒌仁의 효과

瓜蒌仁 추출액을 다양한 농도(0, 0.63, 1.25, 2.50 mg/ml)로 ME-180세포에 처리하여 생존세포에 의해 MTT가 formazan으로 변환되는 양을 측정한 결과 48시간 후 0.63 mg/ml의 瓜蒌仁 추출액으로 처리한 군에서 39.5%의 세포가 고사하였고 농도의 증가에 따라 생존율이 점차 감소되었다(Fig. 1). ME-180세포를 1 mg/

ml 瓜蒌仁 추출액으로 처리한 후 48시간 후에 광학 현미경으로 관찰한 결과 瓜蒌仁 추출액을 처리하지 않은 세포군에서는 세포의 형태가 대부분 크고 둥글거나 다각형으로 나타났으나 瓜蒌仁 추출액으로 처리한 세포群에서는 세포들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있는 형태를 나타내었다.



Concentration of Ts (mg/ml)	Cell Viability
0	100
0.63	60.5± 0.7
1.25	47.8± 2.6
2.50	45.6± 0.5

Data are expressed as means + standard deviation. Data were analyzed for statistical significance by Student's t-test. p-value of less than 0.05 was considered statistically significant

Fig. 1. Growth-inhibitory effect of Trichosanthes semen extract (Ts) on ME-180 cells. ME-180cells were incubated with various concentrations of Ts for 48hrs and cytotoxicity was measured by MTT assay.

2. ME-180 세포의 성장에 대한 瓜蒌仁의 apoptosis 효과

瓜蒌仁 추출액을 넣고 ME-180세포를 배양한지 48시간이 지나 PI로 염색한 후 나타내는 형태적 변화를 조사한 결과 1 mg/ml 瓜蒌仁 추출액 존재 하에서 ME-180세포는 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 특징적인 축소된 세포, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies를 나타내었다.

3. DNA fragmentation 분석

세 가지 농도(0, 0.3, 0.6 mg/ml)의 瓜蒌仁 추출액을 처리한 뒤 24시간 후에 ME-180세포에서 분리한 DNA는 대조군 (Fig. 2, lane 1)에 비해 nucleosome 크기의 단일 band가 높은 비율로 형성되었다(Fig. 2, lane 2, lane 3).

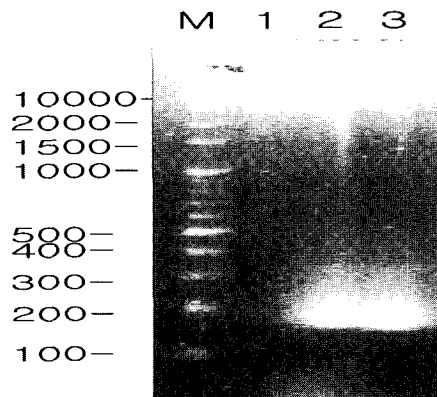
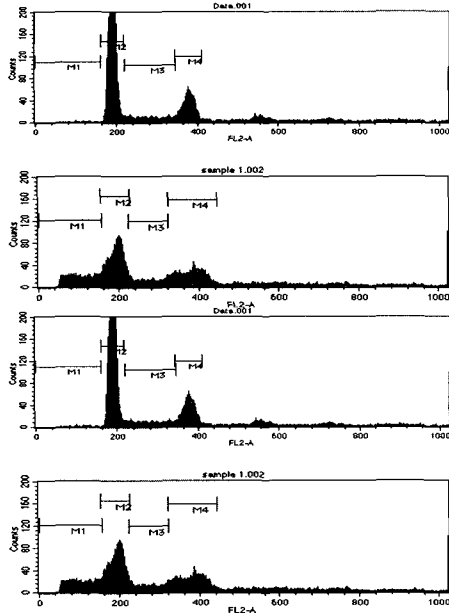


Fig. 2. Ts-induced DNA fragmentation analysis in ME-180 cells. ME-180cells were cultured in the presence of Ts for 24hrs, and genomic DNA was extracted and separated by 1.8% agarose gel. M: molecular weight marker, lane 1: 0 mg/ml Ts, lane 2: 0.3 mg/ml Ts, and lane 3: 0.6 mg/ml Ts. Left numbers indicates the size of DNA in base pairs.

4. 세포주기 분석

0.6 mg/ml의 瓜蒌仁 추출액을 처리하여 48시간 배양한 후 cell cycle분포를 flow cytometer로 분석하였다. 瓜蒌仁 추출액을 처리하지 않은 대조군에서는 apoptosis를 일으킨 세포의 비율 (M1)이 0.23%에 불과하였으나 瓜蒌仁 추출액을 처리한 세포群에서는 12.78%를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).



Marker	control	0.6 mg/ml Ts, 48hrs
All	100.00	100.00
M1	0.23	12.78
M2	59.98	38.56
M3	7.62	9.24
M4	18.35	23.28

Fig. 3 . Flow cytometric analysis of ME-180 apoptotic changes. ME-180cells were incubated in the absence (upper panel) or presence of 0.6 mg/ml Ts (lower panel) for 48hrs. Cells were stained with PI as described in Materials and method and analyzed by Flow cytometer.

5. caspase-3 와 caspase-8 활성화도

caspase-3와 caspase-8의 각각 기질인 Ac-DEVD-pNA와 Ac-IETD-pNA에 瓜蒌仁 추출액을 처리하여 24시간 배양한 후 기질의 분해산물인 pNA의 방출량을 측정하였다. caspase-3 활성화도는 0.6 mg/ml 瓜蒌仁 추출액을 처리한 세포群에서는 13.0% 증가했고, 0.9 mg/ml에서는 66.0% 증가하였다. caspase-8의 활성화도는 같은 농도에 대해 각각 55.4%와 92.0% 증가하였다(Table 1).

Table 1. Caspase-3 and Caspase-8 activity. ME-180cells were incubated in the absence or presence of Ts for 24hrs. Cells were lysed and centrifuged. Supernatant was collected and protein concentration was measured by Bradford assay. Cell extracts (96 µl) were incubated with 4 µl Ac-DEVD-pNA or Ac-IETD-pNA at 37°C for 1 hr. Release of p-nitroanilide was detected at 405 nm by microtiter plate reader.

concentration of Ts (mg/ml)	caspase-3 activity (%)	caspase-8 activity (%)
0 mg/ml Ts	100	100
0.6 mg/ml Ts	113.0±1.7	155.4±6.1
0.9 mg/ml Ts	166.0±1.3	192.0±7.5

Data are expressed as means +standard deviation. Data were analyzed for statistical significance by Student's t test. p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

6. 瓜蒌仁의 mitochondrial membrane potential에 대한 효과

대조군에 대한 瓜蒌仁 추출액 처리군의 mitochondrial membrane potential이 감소됨을 보여주고 있으나 Rh123 형광강도는 0.3 mg/ml 瓜蒌仁 추출액 처리군과 0.6 mg/ml 瓜蒌仁 추출액 처리군에서 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Fig 4).

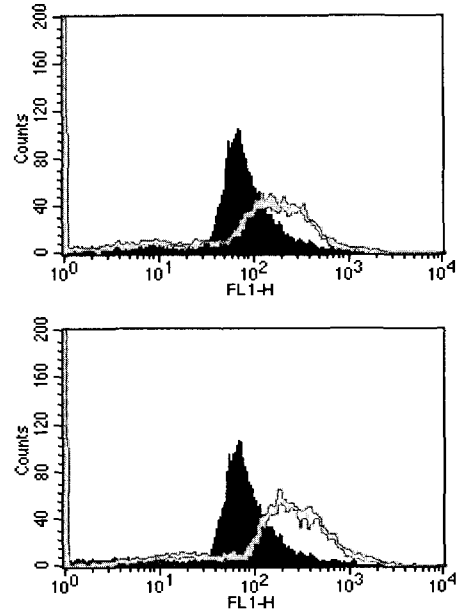


Fig. 4. Ts-induced changes on mitochondrial membrane potential in ME-180 cells. upper panel; 0.3 mg/ml Ts, lower panel; 0.6 mg/ml Ts. ME-180cells were incubated in the absence (violet peak in the middle) or presence of 0.3 and 0.6 mg/ml Ts (green lines in upper and lower panel) for 48hrs. Cells were stained with Rh123 as described in Materials and method and analyzed by Flow cytometer.

고찰

자궁경부는 편평-원주상피 접합부라는 이행대를 형성하기 때문에 癌이 잘 발생하는 부위로 전 세계 여성에서 惡性腫瘍 중 2위를 차지하고 있으며 선진국보다 개발도상국에서 더 흔한 癌으로 알려져 있다^{1,8,35}. 2002년 통계에 의하면 여성에서 발생하는 전체 惡性腫瘍 중에는 9.1%로 乳房癌, 胃癌, 大腸癌, 甲狀腺癌에 이어 5위를 차지하고 있으며, 前癌段階인 자궁경부 上皮內癌을 포함한 경우에는 여성의 암에서 2위를 차지하는 질환이다². 최근 우리나라는 자궁경부암에 대한 인식 향상과 효과적인 선별검사와 치료법의 발달 등으로 치료성적이 좋아진 것은 사실이지만 아직 높은 발생률을 보이고 있다.

자궁경부암의 원인은 명확히 알려져 있지 않으나, 많은 역학적 조사를 통하여 여러 가지 발생 인자들이 알려져 있으며 비교적 조기 발견이 가능하여 예방 및 근치가 가능한 질환이다. 치료법으로는 수술적 치료와 방사선법 등이 이용되고 있다³⁶. 자궁경부암에 대한 韓醫學的 용어는 없지만, 증상이나 병증으로 볼 때 癥瘕와 가장 유사하다^{9,14,15}. 癥瘕는 여성의 생식기 및 骨盤內空에 발생하는 腫塊로서 腹中腫塊가 시일이 지날수록 조금씩 커지며 때로는 經閉, 不妊 등을 유발하고 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛이 심한 증상을 나타내는 婦人科 질환이다^{9,16}.

韓醫學에서는 癥瘕의 원인을 外感寒邪, 七情所傷, 正氣虛,

傷食, 瘀血, 痰濕 등으로 보았다¹⁷⁻²². 癥瘕의 치료는 “養正則邪自除”의 原則下에 발병원인에 따라 活血, 理氣, 導滯, 消痰의 처방을 사용하였다^{20,22-26}. 그 治方에 대하여 조사한 것을 보면 桃仁煎, 大硝石丸, 補中益氣湯, 大七氣湯, 通經丸, 香稜丸, 溫白元, 桂枝茯苓丸, 桃仁承氣湯, 三稜煎, 歸朮破癥湯 등이 多用되어 왔으며¹², 약물 구성으로는 活血藥, 補氣血藥, 理氣藥, 散結消癥藥이 주로 활용된 경향을 볼 수 있다.

散結消癥의 효능이 있는 瓜蒌仁은 葫蘆科(박과; Cucurbitaceae)에 속한 다년생의 攀援性草質藤本인 하늘타리 및 同屬 近緣植物의 성숙한 과실의 종자이다. 그 성분은 glycoside, saponin, 유기산 및 그 염류, resin, gum, fat, 색소 등을 함유하고 있다³⁷. 분류상 化痰止咳平喘藥에 속하며 性味는 甘·微苦, 寒하며 無毒하고 肺經, 胃經, 大腸經으로 歸經하며 諸家의 本草書 내용을 살펴볼 때 潤肺化痰, 散結消癥, 滑腸通便 등의 효능을 가지고 있다.^{31,32} 瓜蒌仁의 散結消癥 效能은 肺癰, 腸癰, 乳癰 등을 치료할 수 있다. 藥理學的으로는 祛痰作用, 瀉下作用, 冠狀動脈擴張作用, 항균 작용 등이 있다.³³

이에 저자는 散結消癥의 효능이 있는 瓜蒌仁을 이용하여 자궁경부암세포의 성장억제 및 cell apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 인간의 자궁경부암세포인 ME-180세포에 瓜蒌仁 추출액을 투여하여 ME-180세포에 대한 성장억제 효과, 세포의 형태적 변화, 세포주기 분석, DNA 분절 관찰, caspase-3와 caspase-8활성 및 mitochondria membrane potential 변화 등을 관찰하였다.

세포고사(apoptosis)는 세포괴사(necrosis)와 같이 세포사멸에 관계하는 신호전달체계로서 우연하게 손상을 받아 일어나는 세포괴사와 구별되어 gene-directed cellular self-destruction이나 programmed cell death로도 명명된다¹⁴. 세포가 심각한 상해를 입었을 경우에 나타나는 세포괴사는 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반한다^{3,38-42}. 세포고사는 죽는 세포가 면역반응을 일으켜서 주위세포에 악영향을 주는 부작용 없이 食세포(phagocyte)에 의해 청소가 될 수 있는 형태로 진행되는데 발생과 항상성 유지에 중요한 역할을 하며 조절상실에 대한 결과로 많은 병적 상태를 유발할 수 있다. 세포고사의 세포수준에서의 변화로는 세포탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리모양의 분절, 핵의 절단, 소포체의 팽창, apoptotic body 형성 및 칼슘이온 유입의 변화와 같은 생화학적 변화를 볼 수 있다^{3,38-42}.

Apoptosis는 인체의 항상성에 관여하여, 전체 유기체에 위협이 될 수 있는 세포를 제거하는 것으로 cytotoxic T-lymphocyte에 의해 virus에 감염된 세포를 제거하며, cell mediator minor response에서 정상조직을 공격하는 것을 방지한다. SLE, rheumatoid arthritis 같은 자가면역질환은 이러한 기전의 결함과 연관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 apoptosis는 癌세포의 화학요법이나 방사선요법에서 유발되어 癌세포의 성장과 미세이전을 억제한다고 보고되고 있다^{43,44}.

ME-180세포의 성장에 대해 瓜蒌仁이 영향을 미치는지에 대해 알아보기 위해 다양한 농도의 瓜蒌仁 추출액을 ME-180세포

에 처리하여 生存세포에 의해 MTT가 formazan으로 변환되는 양의 변화를 측정하였다. 瓜蒌仁 추출액을 처리한 지 48시간 후 0.63 mg/ml의 瓜蒌仁 추출액에서 39.5%의 세포가 고사하였고 농도의 증가에 따라 생존율이 점차 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 이 결과는 瓜蒌仁이 ME-180세포에 대해 농도와 시간에 따라 세포성장을 억제함을 나타낸다. ME-180세포를 1 mg/ml의 瓜蒌仁 추출액으로 처리한 후 48시간 후에 광학 현미경(x 200)으로 관찰하였다. 瓜蒌仁을 처리하지 않은 세포군에서는 세포의 형태가 대부분 크고 둥글거나 다각형으로 나타났으나 瓜蒌仁을 처리한 세포군에서는 세포들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있는 형태를 나타내었다. 또한, 1 mg/ml의 瓜蒌仁 추출액 존재하에서 ME-180세포의 성장억제와 심한 형태적 변화를 나타내는 것이 necrosis와 구별되는 apoptosis의 유도과 관련이 있는지 조사하기 위해 瓜蒌仁 추출액을 넣고 ME-180세포를 배양한지 48시간이 지나 PI로 염색한 후 나타내는 형태적 변화를 조사하였다. 1 mg/ml 瓜蒌仁 추출액 존재 하에서 ME-180세포는 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 특징적인 축소된 세포, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies를 나타내었다. 세포고사가 일어나면 endonuclease가 활성화가 되어 180-200 base-pair길이의 DNA가 작은 길이로 잘라진다. 이를 전기영동법을 이용하면 DNA는 전기적 성질이 음(-)이므로 양(+)을 띠는 아래쪽으로 향하게 되는데 짧은 DNA일수록 빨리 움직이며 그 결과로 사다리모양의 DNA 분절현상을 관찰할 수 있게 된다^{3,38-42}. 여러 농도의 瓜蒌仁 추출액을 처리한 후 24시간 후에 각각의 농도로 ME-180세포에서 분리한 DNA는 대조군(Fig. 2, lane 1)에 비해 nucleosome 크기의 단일 band가 높은 비율로 형성되었다. 흔히 세포고사가 일어나는 세포에서 관찰되는 사다리모양의 DNA 분절보다 瓜蒌仁 추출액 처리군에서 단일 band가 관찰되는 이유는 독특한 endonuclease가 더 많이 활성화되어 단일 nucleosome 단위로 분절화가 잘 이루어진 것으로 보인다(Fig. 2). 세포의 분열과 증식 과정은 생체체의 기본현상이다. 세포는 분열을 반복하는데 분열기와 분열간기 사이를 순환하는 과정을 세포주기라 하는데, 진핵세포의 세포주기는 DNA 합성의 조절 시기에 따라 합성전기(G1 phase), 합성기(S phase), 합성후기(G2 phase), 유사분열기(M phase)로 나누어져 있다⁴⁵⁻⁴⁷. 세포주기는 癌세포의 성장억제에 있어서 최근 활발히 연구되는 기전 중의 하나로 세포의 apoptosis 역시 세포주기와 밀접적인 관련성을 가지고 있으며⁴⁸⁻⁵⁰, 세포의 성장이 억제되는 조건은 apoptosis를 야기시키는 또 하나의 모델이 될 수 있다고 알려진 바 있다⁵¹⁻⁵³. 세포주기의 주요 조절점은 합성전기의 후반에 있어서 합성전기에서 합성기로의 진행을 통제하며, apoptosis가 일어나면 합성전기에서 합성기로 넘어가지 못하고, sub-G1이라고 불리는 apoptosis 단계에 머물러 더 이상 발전하지 못하는 세포의 비율이 늘어난다. M1(sub-G1기)은 정상 2n보다 적은 양의 DNA를 가지므로 apoptosis를 일으켜 DNA fragmentation이 일어남에 따라 적은 양의 DNA를 가지는 것으로 보인다. 즉, M1은 apoptotic cells의 비율을 측정하는 기준이 될 수 있다(Fig. 3). 0.6mg/ml의 瓜蒌仁 추출액으로 처리하고 48시간 후 M1의 비율을 확인한 결과, 과루

인 추출액으로 처리하지 않은 대조군 비율은 0.23%인 반면에 瓜 蓯 仁 추출액 처리군은 12.78% 관찰되었다(Fig. 3). 이는 瓜 蓯 仁 추출액으로 인한 세포의 죽음이 apoptosis임을 잘 보여주고 있다.

Caspase는 apoptosis과정 중 단백질을 분해하는 매우 중요한 과정으로 몇 가지의 단백질 분해 효소가 관여하며 세포고사의 신호전달과정을 통한 caspase의 활성화는 caspase의 N-말단에 존재하는 앞 부위가 단백질-단백질 결합을 통하여 세포고사 신호를 전달하고 활성화시킨다. 활성화된 caspase는 특정 기질 단백질의 분해를 통하여 세포고사를 일으킨다⁵⁴. 최근 활발히 진행되고 있는 여러 실험연구에서는 apoptosis가 진행되는 세포에서 caspase-3, 6, 8 및 9가 주된 caspase 경로라고 보고되고 있다⁵⁵. caspase-3는 DNase의 억제제(ICAD)를 분해시켜 DNA분절을 유도하거나 poly(ADP-Ribose)polymerase(PARP) 절단을 유도한다. caspase-8은 receptor를 경유하는 경로에 속하고 TNF- α , Fas로 인한 apoptosis에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁵⁶. 따라서 瓜 蓯 仁 추출액으로 유발된 apoptosis의 기전을 확인하기 위해 caspase 중 주요경로인 caspase-3와 caspase-8를 조사하였다. 이를 위해 caspase-3와 caspase-8의 기질인 Ac-DEVD-pNA와 Ac-IETD-pNA에 각각 다른 농도의 瓜 蓯 仁 추출액을 처리하고 24시간 배양한 후 기질이 瓜 蓯 仁 추출액에 의해 유도된 세포 추출액이 단백질 분해가 되는가를 기질의 분해산물인 pNA의 방출량을 측정하였다. caspase-3 활성화도는 0.6 mg/ml 瓜 蓯 仁 추출액으로 처리한 세포군에서는 13.0% 증가했고, 0.9 mg/ml에서는 66.0% 증가하였다. caspase-8의 활성화도는 같은 농도에 대해 각각 55.4%와 92.0% 증가하였다(Table 1). 따라서 瓜 蓯 仁 추출액에 의해 ME-180 세포에서 발생한 apoptosis는 caspase의 경로 중 caspase-3와 caspase-8을 통하여 활성화되었음을 알 수 있었다. 이는 瓜 蓯 仁 추출액으로 인한 세포 죽음은 병리적으로 주요한 의의를 가지고 있는 세포고사로 발생하고 있으며 세포고사와는 구별됨을 보여 주고 있다. 瓜 蓯 仁 추출액 처리군은 대조군에 비해 mitochondria membrane potential이 감소됨을 보여주고 있는데(Fig. 4), 이는 apoptosis의 발현은 mitochondrial dysfunction으로 이어지며 이로 인해 caspase-9의 활성화가 이루어지며^{57,59}, 최근 연구 결과에 의하면^{60,61}, mitochondria membrane potential collapse는 cytochrome c의 유리 및 연관이 있으며 apoptosis에 주요한 인자가 된다. 세포고사에 대한 자극으로 미토콘드리아의 막에 문제가 생기면 막이 permeabilization되어 막전위차가 낮아지고 미토콘드리아의 전자전달체인 cytochrome c가 세포질로 방출된다. 그 결과 cytochrome c는 caspase-9의 전구체인 pro-caspase-9를 활성형의 caspase-9로 만들고 연속해서 활성형의 caspase-8이나 caspase-9에 의해 caspase-3도 활성화된다. 이러한 일련의 과정으로 통해 모든 단백질분해효소가 활성화되면서 apoptosis가 일어난 것으로 보인다.

이상의 실험결과로 볼 때 瓜 蓯 仁 추출액은 자궁경부암세포인 ME-180세포의 성장을 억제하고 apoptosis을 유도하였으며, 그 과정에서 ME-180세포에 대한 성장억제 효과, 축소된 세포, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies 등 세포의 형태적 변화, 세포주기의 sub-G1 fraction 비율의 증가, nucleosome 크기의 단일 band

비율 증가, caspase-3와 caspase-8활성화, mitochondria membrane potential의 감소 등이 일어나고 있음이 밝혀졌다. 따라서 瓜 蓯 仁은 자궁경부암의 예방과 치료에 활용될 수 있으리라 생각된다.

결 론

瓜 蓯 仁이 자궁경부암세포 ME-180의 성장억제 및 cell apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 ME-180세포에 瓜 蓯 仁 추출액을 투여하여 ME-180세포에 대한 성장억제 효과, 세포의 형태적 변화, 세포주기 분석, DNA 분절 관찰, caspase-3와 caspase-8 활성화 및 mitochondria membrane potential 변화 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

다양한 농도(0, 0.63, 1.25, 2.50 mg/ml)의 瓜 蓯 仁 추출액을 ME-180 세포에 처리한 결과 0.63 mg/ml의 瓜 蓯 仁 추출액 존재 하에서 39.5%의 세포가 고사하였고 농도의 증가에 따라 생존율이 점차 감소되었다. ME-180 세포를 瓜 蓯 仁 추출액으로 처리하여 광학 현미경으로 관찰한 결과 세포들이 위축되어 여러 집단으로 뭉쳐있거나 산재해 있었다. 瓜 蓯 仁 추출액을 넣고 ME-180 세포를 배양한 후 PI로 염색하여 형태적 변화를 조사한 결과 축소된 세포, 응축된 염색질 및 apoptotic bodies가 나타났다. 瓜 蓯 仁 추출액을 처리한 ME-180세포에서 분리한 DNA에서는 대조군에 비해 nucleosome 크기의 단일 band가 높은 비율로 형성되었다. ME-180세포 cell cycle 분포를 flow cytometer로 분석한 결과 瓜 蓯 仁 추출액 처리하지 않은 세포군에서는 M1의 비율이 0.23%였으나 처리한 세포군에서는 12.78%로 관찰되었다. caspase-3와 caspase-8의 각각 기질에 瓜 蓯 仁 추출액을 처리하여 기질의 분해산물인 pNA의 방출량을 측정한 결과 caspase-3 활성화도는 0.6 mg/ml 瓜 蓯 仁 추출액을 처리한 세포군에서는 13.0% 증가했고, 0.9 mg/ml에서는 66.0% 증가하였다. caspase-8의 활성화도는 같은 농도에 대해 각각 55.4%와 92.0% 증가하였다. ME-180세포의 미토콘드리아 막전위를 분석한 결과, 농도에 따라 막전위가 크게 감소한 것으로 나타났다.

이상의 실험결과로 볼 때 瓜 蓯 仁 추출액은 자궁경부암 세포인 ME-180 cell에 대해 성장억제 효과와 함께 세포의 형태적 변화를 동반한 cell apoptosis가 나타났으며, nucleosome 크기의 단일 band 비율이 증가하였고, 세포주기에서 M1의 비율이 증가하였다. 이러한 효과는 caspase-3와 caspase-8의 경로가 활성화되어 나타난 것으로 보이며, mitochondria membrane potential이 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 瓜 蓯 仁은 韓 方의 癥 瘕에 속하는 자궁경부암의 치료제로 사용될 수 있다고 사료되며 이에 대한 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 54, 594-606, 1993.
2. 한국중앙암등록본부, 보건복지부. 한국 중앙암등록사업 연례

- 보고서(2002.1-2002.12). 보건복지부, 2003.
3. 대한병리학회. 제3관 병리학. 서울, 고문사. pp 31-38, 896-900, 1998.
 4. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울, 칼빈서적. pp 980-1027, 1997.
 5. 전국의과대학교수 譯. Current Medical Diagnosis & Treatment. 서울, 한우리. pp 792-793, 1999.
 6. 趙鍾寬. 한방임상중양학. 대전, 周珉出版社. pp 799-818, 2001.
 7. Jonathan S. Berek. Novak's gynecology(12th edition). Williams & Wilkins. pp 1111-1153, 1996.
 8. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學(上). 서울, 鼎談. p 18, 319-326, 2001.
 9. 박경미, 김덕남, 김양호, 조한백, 유심근. 濟川煎이 子宮經部 癌세포(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 16(2):161-176, 2003.
 10. 許浚. 對譯東醫寶鑑. 서울, 法仁文化社. pp 1275-1301, 1999.
 11. 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 癥瘕의 東西醫學의 考察. 大韓韓醫學會誌 7(1):84-88, 1986.
 12. 李京燮, 宋炳基. 癥瘕治方に 關한 文獻考察. 大韓韓醫學會誌 3(2):54-62, 1982.
 13. 陣貴廷, 楊思澍 主編. 實用中西醫結合 診斷治療學(上卷). 서울, 醫聖堂. pp 959-976, 1993.
 14. 유심근, 김송백, 박종규, 조한백. 香稷丸이 子宮經部 癌세포 (HeLa Cell)의 apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 17(2):11-26, 2004.
 15. 朴鍾文 등. 六合湯이 子宮經部 癌세포(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 16(3):128-146, 2003.
 16. 曹永斗. 斑玄丸과 抗癌劑의 併用投與가 子宮癌세포(HeLa)에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 碩士學位論文, 1995.
 17. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울, 大星出版社. pp 736-738, 1983.
 18. 李慶雨 譯. 編注譯解 黃帝內經靈樞 (3卷). 서울, 여강출판사. pp 221-243, 1994.
 19. 孫思邈, 李景榮 등. 備急千金要方校釋. 北京, 人民衛生出版社. pp 258-263, 1998.
 20. 李挺, 安秉國 譯. 國譯編註醫學入門(V卷). 서울, 南山堂. pp 36-43, 2001.
 21. 薛己. 校注婦人良方注釋. 서울, 一中社. pp 157-160, 1989.
 22. 김동철, 백승희, 박종현, 이영선. 香附子가 子宮筋腫세포의 成長抑制와 MAP Kinase 活性 및 Cell Apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 16(2):18-33, 2003.
 23. 李慶雨 譯. 編注譯解 黃帝內經素問(5卷). 서울, 여강출판사. pp 7-160, 1994.
 24. 張介賓, 경희 한의대 제47기 졸업준비위원회 학술부 校勘. 校勘景岳全書. 서울, 鼎談. pp 439-446, 1999.
 25. 龔廷賢. 國譯萬病回春(上卷). 서울, 癸丑文化社. pp 352-361, 1997.
 26. 王清任. 醫林改錯評譯. 서울, 성보사. pp 129-132, 1998.
 27. 조옥현, 정우석, 서운점, 조한백. 柴胡疎肝散加味方이 子宮經部 癌세포(HeLa cell)에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 17(4):101-111, 2004.
 28. 高昊奎. 加味桂枝茯苓丸과 抗癌劑 併用時 子宮癌세포(HeLa Cell)에 미치는 효과. 大田大學校 大學院, 1995.
 29. 金柱延. 生地黃이 子宮經部 癌세포(HeLa cell)에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文, 2003.
 30. 李允貞 등. 반지련이 자궁암세포(HeLa 22918)의 성장 억제에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌 12(1):185-196, 1999.
 31. 辛民教. 臨床本草學. 서울, 永林社. pp 369-372, 1997.
 32. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울, 永林社. pp 461-463, 1998.
 33. 梁珠勞. 瓜蒌仁의 血管新生 抑制에 대한 研究. 慶熙大學校 大學院 碩士學位論文, 2003.
 34. Ju Ryoung Lee. Effect of methylene chloride fraction of *Trichosanthes kirilowii* Maxim on apoptosis in U937 cells. 경희대 동서의학대학원 碩士學位論文, 2004.
 35. Frank, H., Netter, M.D. CIBA 원색도해의학총서 편찬위원회 編. The CIBA Collection of Medical Illustrations(II卷). 서울, 鼎談. pp 170-172, 2000
 36. 목정은 등. 자궁경부암 환자 1058예의 임상적 분석. 대한산부회지 44(1):101-113, 2001
 37. 金昌玟 등. 中藥大辭典. 서울, 鼎談. pp 476-479, 1998
 38. 고경희. Cisplatin에 의한 사람 자궁경부암세포종 HeLa세포의 세포 고사에 미치는 ROS의 영향. 圓光大學校 大學院 博士學位論文, 2002
 39. 崔益準. 자궁경부암 HeLa 세포주에서 삼산화비소(As₂O₃)의 세포 고사 기전연구. 圓光大學校 大學院 博士學位論文, 2002.
 40. Gao-Liang Ouyang, Qiu-Feng Cai, Min Liu, Rui-Chuan Chen, Zhi Huang, Rui-Sheng Jiang, Fu Chen, Shui-Gen Hong, Shi-Deng Bao. Growth arrest and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells induced by hexamethylene bisacetamide. World j Gastroenterol 10(7): 954-958, 2004.
 41. Shu-Lan Yuan, Yu-Quan Wei, Xiu-Jie Wang, Fei Xiao, Sheng-Fu Li Jie Zhang. Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells. World j Gastroenterol 10(14):2024-2028, 2004.
 42. Ying ZHANG, Li-jun WU, Shin-ichi TASHIRO, Satoshi ONODERA, Takashi IKEJIMA. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. Acta Pharmacol Sin 25(1):83-89, 2004.
 43. Kang, Y.J., Chaen, Y., Epstein, P.N. Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. J Biol Chem 271(21): 12610-12616, 1996.
 44. Rocha, G.M. et al. Direct toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs for renal medullary cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98(9):5317-5322, 2001.
 45. 강신성 등. 생물과학. 아카데미서적. pp 292-304, 1997.

46. 李和京. 鷄血藤이 子宮筋腫세포의 增殖抑制와 세포自滅死 관련 遺傳子의 發顯에 미치는 影響. 大邱한의대학교 대학원 博士學位論文, 2004.
47. 전미혜, 백승희, 신상우, 이영선. 五積散이 子宮筋腫세포의 死滅과 Cell Apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 16(2):45-55, 2003.
48. Sugawara, T. et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci* 22(1):209-217, 2002
49. Sanchez-Alcazar, J.A., Khodjakov, A., Schneider, E. Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death. *Cancer Res* 61(3):1038-1044, 2001.
50. Hollwnsworth, S.B. et al. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 28(8):1161-1174, 2000.
51. Le, X.F. et al. Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene* 16(14):1839-1849, 1998.
52. Musgrove, E.A. et al. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17):8022-8026, 1994.
53. Nigg, E.A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17(6):471-480, 1995.
54. 박소월, 백승희. 鹿茸이 雌性 생쥐의 生殖能力과 Caspase-3 MAP kinase 및 MPG 遺傳子 發顯에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 17(1):1-14, 2004.
55. Perry, D.K. et al. Zinc is a potent inhibitor of protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 18530-18533, 1997.
56. Van Loo G et al. the role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet: Cell death and Differentiation Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. Petak I, Houghton JA. *Pathol, Oncol. Res* 9(1):1031-1042, 2002.
57. Wei-wei An, Min-wei wang, Shin-ichi Tashiro, Satoshi Onda, Takashi Ikejima. Norcantharidin Induces Human Melanoma A375-S2 Cell Apoptosis through Mitochondrial and Caspase Pathways. *J Korean Med Sci* 19:560-566, 2004
58. Susin, S.A. et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptotic protease. *J. Exp. Med* 184(4):1331-1341, 1996
59. Zamazmi, N. et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med* 183(4):1533-1544, 1996.
60. Zanzani, N. et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med* 182(2):367-377, 1995.
61. Castedo et al. Mitochondrial perturbation defines lymphocytes undergoing apoptotic delectin in vivo. *Eur. J. Immunol* pp 3277-3284, 1995.