

남성호르몬 비의존형 전립선 암세포에서 托裏消毒飲 추출물의 세포고사 유도 효과

이형재 · 권강범 · 신병철¹ · 김은경² · 한미정² · 송미영² · 이영래² · 박병현² · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 한방재활의학교실, 2: 전북대학교 의과대학 생화학교실

Apoptosis-inducing Effect of Takrisodokyeum Extract in Androgen Independent Prostate Cancer Cells

Hyung Jae Lee, Kang Beom Kwon, Byung Cheul Shin¹, Eun Kyung Kim², Mi Jeong Han²,
Mi Young Song², Young Rae Lee², Byung Hyun Park², Do Gon Ryu*

Department of Physiology, 1: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2: Department of Biochemistry, College of Medicine, Chonbuk National University Medical School

Takrisodokyeum (TRSDY) has been known to exert anti-tumoral activity in Korea. However, its molecular mechanism of action is not understood. In this study, we found that TRSDY induced apoptosis in androgen-independent prostate cancer DU145 cells as evidenced by DNA fragmentation and chromatin condensation in hoechst 33342 dye staining. Our data demonstrated that TRSDY-induced apoptotic cell death was accompanied by increases of PTEN and Par-4 in a time-dependent manner. Taken together, these results suggest that TRSDY induce PTEN and Par-4 expression, and eventually lead to apoptotic cell death in androgen independent prostate cancer DU145 cells.

Key words : Takrisodokyeum(TRSDY), DU145 cell, apoptosis, PTEN, Par-4

서 론

托裏消毒飲은明代 龔의 《萬病回春》¹⁾에 “治一切癰疽六七日未消者 服此藥 瘡未成即消 已成即潰”라고 수록된 이래로 《東醫寶鑑》 등¹⁻⁹⁾ 역대 의서에서 癰疽치료에 活用되어 온 처방이다. 癰疽는 肌肉, 骨髓, 臟腑部位에서 국부적으로 發熱, 發赤, 堅硬, 腫痛, 患部の 陷沒突起 및 化膿 등의 양상을 나타내는 증상이며 서양의학적으로는 병원성 미생물의 감염으로 모세혈관의 확장과 혈액 및 체액의 저류로 발열, 부종, 동통, 기능실조 등의 증상을 수반하는 염증성 질환과 기육의 이상증식으로 인한 중앙성 질환의 범주에 해당된다¹⁰⁻¹⁷⁾.

최근 동·서의 결합치료에 대한 관심이 증대되면서 면역요법이나, 세포분화 유도법, 혈관형성 저해법, 세포고사(apoptosis) 유도법 등과 한약재와의 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다¹⁸⁾. 그 중에서 세포고사는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달

과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절받는 생리과정으로¹⁹⁻²¹⁾ 염색사 응축(chromatin condensation), 핵의 분절(nuclear fragmentation), endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절(ladder pattern DNA fragmentation, 200 base pairs)형성, transglutaminase의 활성화 및 세포고사 소체(apoptotic body) 형성과 같은 현상을 동반한다^{22,23)}.

이에 저자는 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145를 이용하여 托裏消毒飲의 세포고사 유도효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, MTT(3-

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

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

· 접수 : 2006/06/18 · 수정 : 2006/07/13 · 채택 : 2006/08/07

(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma(ST, USA)에서 구입하였고, PTEN과 Par-4 항체, Alkaline phosphatase-conjugated mouse IgG secondary antibody는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 RPMI에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되는 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 자주 성장을 유지하기 위해서 2~3일마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. 托裏消毒飲 구성약물 및 추출

본 연구에 사용된 托裏消毒飲은 《萬病回春》¹⁾에 근거하였으며 구성 약재는 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하였으며 처방 구성은 다음과 같다.

Table 1. The Ratio of the Component in TRSDY

Component	Ratio
<i>Lonicerae Flos</i> (金銀花)	3.0
<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i> (陳皮)	3.0
<i>Astragali Radix</i> (黃芪)	2.0
<i>Trichosanthes Radix</i> (天花粉)	2.0
<i>Phellopteri Radix</i> (防風)	1.0
<i>Angelicae gigantis Radix</i> (當歸)	1.0
<i>Cnidii Rhizoma</i> (川芎)	1.0
<i>Angelicae davuricae Radix</i> (白芷)	1.0
<i>Platycodi Radix</i> (桔梗)	1.0
<i>Machili Cortex</i> (厚朴)	1.0
<i>Manis Squama</i> (穿山甲)	1.0
<i>Gleditschiae Spina</i> (皂角刺)	1.0

위와 같이 구성된 托裏消毒飲 100g에 3차 증류수 0.9L를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 22.7g의 분말 시료를 얻었다.

4. MTT 분석

DU145 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10⁴ cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 DU145 세포에 托裏消毒飲 추출물을 24 시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5. Hoechst 33342 dye를 이용한 핵 염색

DU145 세포 (1×10⁶cells/ml)를 10%의 FBS가 포함된 RPMI 1640배지를 이용하여 6-well dishes에서 배양하였다. 24시간 후에 1 ml의 세포부유액은 3분 동안 1,000rpm으로 원심분리 하여 세포를 침전시켰다. 세포 침전물은 4%의 중성 완충된 포르말린(100µl)을 첨가하여 고정했다. 고정된 세포부유액 (50µl)을 슬라이드에 옮겼고 실온에서 건조하였다. 고정된 세포는 PBS로 3번 세척했고, 건조시킨 뒤, nucleus-specific Hoechst 33342 염료(1ug/ml)로 10분간 상온에서 염색한 후 PBS를 이용해 세척했고, 건조시킨 후 90% 글리세롤(glycerol)로 마운트 연구용 표본이나 슬라이드를 제작하였다. 슬라이드는 형광현미경 (Olympus, Japan)을 이용해 조사했다.

6. Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후, 30µg의 단백질을 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodesyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후, 100°C에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10% gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm²)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. PTEN과 Par-4에 대한 일차항체(primary antibody)는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체(secondary antibody)인 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, NBT/BCIP 시약을 이용하여 노출시켰다.

7. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법²⁴⁾에 의거하여 정량하였다.

8. 통계 분석

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 Microcal Origin(Version 6.0)을 이용하여 ANOVA one-way test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 托裏消毒飲 추출물의 효과

托裏消毒飲 추출물이 DU145 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 1×10⁶cells/ml의 세포를 RPMI 배지에 접종하고 24시간 후에 托裏消毒飲 추출물을 0.2~5.0mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT를 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 처리한 농도에 비례하여 세포생

존율이 감소하였다. 특히 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 생존율이 각각 25.5%, 16.0%로 감소하였다(Fig. 1).

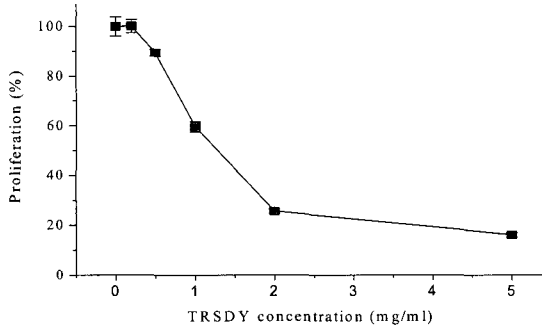


Fig. 1. Effects of Takrisodokyeum(TRSDY) extract on cell viability in DU145 cells. Cells were treated with various concentrations of TRSDY extract for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean \pm SEM of four independent experiments.

2. 세포고사에 미치는 托裏消毒飲 추출물의 효과

托裏消毒飲 추출물이 DU145 세포의 생존율 감소 효과가 세포고사에 의한 것인지 확인 하고자 Hoechst 33342 염료를 이용하여 세포고사의 특징적인 현상인 염색체 응축(chromatin condensation)과 DNA 분절(fragmentation) 현상을 조사하였다²⁵⁾. Hoechst 33342 염료는 세포 핵내의 염색체와 DNA를 선택적으로 염색하는 염료로서 세포고사 현상을 확인하기 위하여 사용되고 있다²⁵⁾. 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg/ml 托裏消毒飲 추출물을 24 시간 동안 DU145 세포에 처리한 후 염색하여 조사한 결과 1.0mg/ml의 농도부터 염색체 응축과 DNA 분절현상이 나타났으며 처리한 농도에 비례하여 세포고사 효과가 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

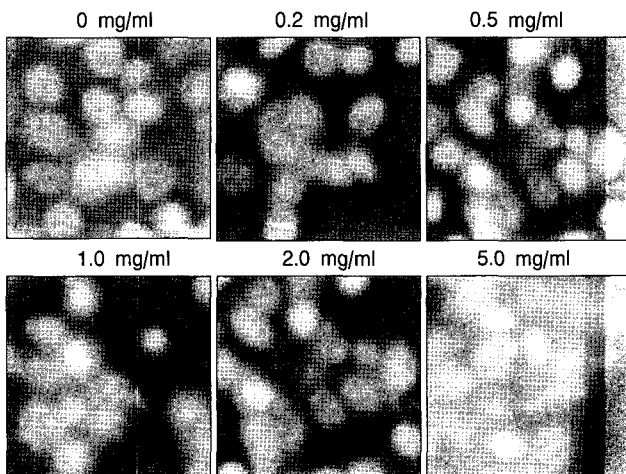


Fig. 2. Apoptosis inducing effects of Takrisodokyeum(TRSDY) extract in DU145 cells. Cells were treated with various concentrations of TRSDY extract for 24 hours. Hoechst 33342 staining was analyzed as described in Materials and Methods.

3. 托裏消毒飲 추출물이 PTEN 발현에 미치는 영향

托裏消毒飲 추출물에 의한 DU145 세포의 고사과정에 PTEN의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 2.0mg/ml 托裏消毒飲

추출물을 6, 12, 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 PTEN에 대한 일차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 PTEN의 발현이 증가하였다(Fig. 3).

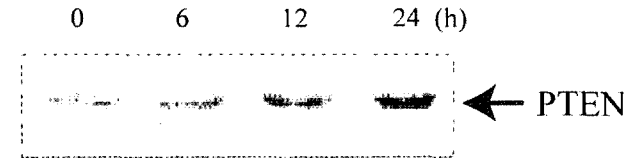


Fig. 3. Effects of Takrisodokyeum(TRSDY) extract on PTEN expression in DU145 cells. Cells were treated with 2.0mg/ml TRSDY extract for indicated periods. Lysate from cells was separated on 12.0% SDS-PAGE. PTEN on the nitrocellulose membrane was probed with anti-PTEN antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

4. 托裏消毒飲 추출물이 Par-4 발현에 미치는 영향

托裏消毒飲 추출물에 의한 DU145 세포의 고사과정에 Par-4의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 2.0mg/ml 托裏消毒飲 추출물을 6, 12, 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 Par-4에 대한 일차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 Par-4의 발현이 증가하였다(Fig. 4).

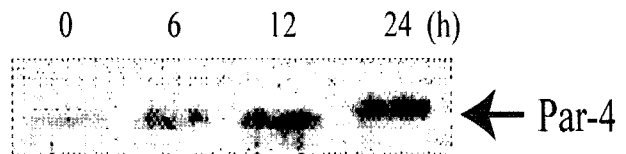


Fig. 4. Effects of Takrisodokyeum(TRSDY) extract on Par-4 expression in DU145 cells. Cells were treated with 2.0mg/ml TRSDY extract for indicated periods. Lysate from cells was separated on 12.0% SDS-PAGE. Par-4 on the nitrocellulose membrane was probed with anti-Par-4 antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

고찰 및 결론

전립선암이란 전립선 속에 암세포가 발견되는 병으로서 미국이나 유럽에서는 암으로 인한 사망자의 2번째 요인으로 빈도 높은 암이며²⁶⁾ 우리나라에서 또한 식생활의 서구화 및 고령화 사회로의 이행에 따라 빈도가 증가하는 추세이다. 전립선암은 초기에 국소적인 부위에 국한되어 나타나는 남성호르몬 의존형(androgen dependent)으로 존재하며 이에 대하여 남성호르몬 중지(androgen ablation)법의 치료를 시행하고 있으나²⁷⁾ 대부분의 남성호르몬 의존형 전립선암은 3년 이내에 남성호르몬 중지 치료법에 반응하는 세포고사(apoptosis)에 내성을 지니게 되어 남성호르몬 비의존형(androgen independent) 전립선암으로 진행하게 된다^{28,29)}.

托裏消毒飲은 《萬病回春》¹⁾에 최초로 기록된 처방으로 金銀花, 陳皮, 天花粉, 黃芪, 防風, 當歸, 川芎, 白芷, 桔梗, 厚朴, 穿山甲, 皂角刺로 구성되어, 암의 개념을 포함한 한의학적 용어인 癰疽를 치료하는데 활용되어 왔다⁹⁾. 실험적으로 권 등³⁰⁾은 托裏消毒飲 추출물이 HL-60 세포에서 세포고사를 유도하고 그 기전이 hydrogen peroxide 발생, caspase-3 활성화, PARP 절단, DNA 분절, 세포고사 유도인 것을 발표하였다.

본 논문은 托裏消毒飲의 전립선암에 대한 응용 가능성을 확인하고자 남성호르몬 의존형 전립선 암세포인 DU145 세포에 托

裏消毒飲 추출물을 처리한 후 세포고사 유도 효과와 그 기전을 조사한 논문이다.

그 결과 托裏消毒飲 추출물은 DU145 세포의 생존율을 처리한 농도에 비례하여 감소시켰으며 2.0mg/ml의 농도에서 약 74.5%의 생존율 감소를 나타냈다(Fig. 1). 이러한 결과는 권 등³⁰⁾이 托裏消毒飲 추출물을 2.0mg/ml의 농도에서 24시간 동안 HL-60세포에 처리하면 약 70%의 세포생존율을 감소시킨다는 보고와 거의 일치하였다.

이러한 托裏消毒飲 추출물의 생존율 감소효과가 세포고사 유도에 의한 것인지 확인하고자 DU145 세포에 0.2에서 5.0mg/ml 농도로 托裏消毒飲 추출물을 24시간 동안 처리한 후 Hoechst 33342 염료를 이용하여 세포고사의 특징적인 현상인 염색체 응축과 DNA 분절 현상을 조사하였다²⁹⁾. 그 결과 1.0mg/ml의 농도로 처리한 군에서부터 염색체 응축과 DNA 분절현상이 나타났으며 그 효과는 5.0mg/ml의 농도까지 지속되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 托裏消毒飲의 DU145 세포에 대한 생존율 감소효과는 세포고사 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.

PTEN은 염색체 10q에 위치하고 있는 탈 인산화(phosphatase) 활성을 가지고 있는 암 억제 유전자(tumor suppressor gene)로 남성호르몬 비종형 전립선암을 포함한 다양한 암에서 발현이 억제되어 있거나 결손되어 있는 것으로 보고되고 있다³⁰⁻³²⁾. 전립선 암세포에서 PTEN 유전자 발현의 억제는 항 세포고사 기전인 Akt/PKB serine/threonine kinase를 활성화시켜 세포고사에 저항성을 나타나게 한다³²⁾. 托裏消毒飲 추출물을 2.0mg/ml의 농도로 6, 12, 24시간 동안 DU145 세포에 처리한 결과 처리한 시간에 의존적으로 PTEN 단백질의 발현을 증가시켰다(Fig. 3). 이러한 결과는 DU145세포의 托裏消毒飲의 고사효과는 암 억제 유전자인 PTEN의 발현을 증가시켜서 Akt/PKB의 인산화를 억제하여 나타낸 것으로 사료된다.

Par-4(prostate apoptosis response-4)는 전립선 암세포에서 세포고사를 유도하는 유전자로서³³⁾ tumor necrosis factor(TNF)- α 수용체 군중의 하나인 FasL/Fas의 활성화를 통하여 세포고사를 유도하거나 또는 세포 생존을 촉진하는 기전에 관여하는 nuclear factor(NF)- κ B의 활성화를 억제하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. Par-4 단백질 발현에 대한 托裏消毒飲 추출물의 효과를 DU145 세포에서 조사한 결과 PTEN의 결과와 마찬가지로 처리한 시간에 의존적으로 Par-4의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). 托裏消毒飲이 Par-4의 발현을 증가시켜 세포고사를 유도하는 것으로 나타났으나 FasL/Fas 신호전달기전을 활성화시키는 지 또는 NF- κ B의 활성화를 억제시켜 고사를 유도하는지 지속적인 연구가 필요할 것이다.

이상의 결과를 요약하면, 인간 전립선 암세포인 DU145 세포에서 托裏消毒飲 추출물은 세포고사에 의한 생존율의 감소를 유도하였으며 세포고사 기전에 PTEN과 Par-4 발현의 증가가 관여하는 것으로 나타났다. 앞으로 다른 암세포에서의 托裏消毒飲의 고사 유도효과를 조사하고 그 유도 기전을 밝힌다면 전립선 암 치료제로서 托裏消毒飲을 개발할 수 있는 가능성을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 원광대학교 교비 지원(2006)에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 龔廷賢. 增補萬病回春. 台北, 大中國圖書公社, pp 176-182, 1959.
2. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, 卷二 p 725, 卷三 p 726, 728, 733, 734, 741, 745, 1986.
3. 杏林書院編. 古今實驗方. 서울, 杏林書院, p 205, 1958.
4. 金定濟. 東醫診療要鑑. 서울, 東洋醫學研究院, 上 p 618, 626, 下 pp 446-447, 1974.
5. 金定濟 外. 東醫臨床要鑑. 서울, 書苑堂, p 218, 314, 1977.
6. 南采祐. 青囊訣. 서울, 漢城圖書株式會社, p 92, 1949.
7. 陳憲定. 丸散膏丹集成. 中國, 大新書局, p 732, 1967.
8. 康命吉. 濟衆新篇. 서울, 通文館, p 108, 1968.
9. 吳克潛. 古今醫方集成. 서울, 翰成社(重刊), p 688, 1980.
10. 熊純生. 辭海. 臺北, 中華書局, p 90, 1974.
11. 朱仁康. 實用外科中藥治療學. 中國, 文光圖書公司, pp 1-3, 15-28, 1957.
12. 蔡炳允. 癰疽에 應用되는 仙方活命飲이 鎮痛, 消炎, 解熱에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 論文集 三卷, pp 67-90, 1980.
13. 黃德讚. 清熱消毒飲이 實驗動物의 鎮痛·消炎에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院, 1989.
14. 金在百 外. 病態生理學. 서울, 圖書出版 社, p 14, 1984.
15. 金聖培. 大黃牡丹皮湯이 實驗動物의 鎮痛, 消炎, 鎮靜 및 正常體溫에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院, 1991.
16. 鄭善充. 內托羌活湯 煎湯液이 實驗動物의 鎮痛, 消炎, 解熱 및 筋弛緩에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院, 1990.
17. 吉仁浩. 榮衛返魂湯이 實驗動物의 鎮痛, 消炎, 解熱 및 筋弛緩에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院, 1990.
18. 東西醫學融合研究會編. 臨床東西醫學. 서울, 영림사, pp 538-546, 1997.
19. Janus, T.J., Kyritsis, A.P., Forman, A.D., Levin, V.A. Biology and treatment of gliomas. Ann Oncol Review, 3(6):423-433, 1992.
20. Yoshida, T., Kawano, N. Clinical cure of glioblastoma-two case reports. Neurol Med Chir (Tokyo), 40(4):224-229, 2000.
21. Madajewicz, S., Chowhan, N. Therapy for patients with high grade astrocytoma using intraarterial chemotherapy and radiation therapy. Cancer, 88(10):2350-2356, 2000.
22. Wyllie, A.H., Kerr, J.F. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol, 68, 251-306, 1980.
23. Widmann, C., Gibson, S. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis: a turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. J Biol Chem, 273(12):7141-7147, 1998.
24. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254, 1976.
25. Kwon, K.B., et al. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. *J Biol Chem*, 276(50):47518-47523, 2001.
 26. Greenlee, R.T., et al. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 51(1):15-36, 2001.
 27. Lu-Yao, G.L., et al. An assessment of radical prostatectomy. Time trends, geographic variation, and outcomes. The Prostate Patient Outcomes Research Team. *Jama*, 269(20):2633-2636, 1993.
 28. Walsh, P.C., Partin, A.W., Epstein, J.I. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol*, 152(5 Pt 2):1831-1836, 1994.
 29. Isaacs, J.T., et al. Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl*, 13(6):457-464, 1992.
 30. Kwon, K.B., et al. Induction of apoptosis by takrisodokyeum through generation of hydrogen peroxide and activation of caspase-3 in HL-60 cells. *Life Sci*, 73(15):1895-1906, 2003.
 31. Davies, M.A., et al. Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res*, 59(11):2551-2556, 1999.
 32. Steck, P.A., et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 15(4):356-362, 1997.
 33. Chakraborty, M., et al. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res*, 61(19):7255-7263, 2001.
 34. Gurumurthy, S., Vasudevan, K.M., Rangnekar, V.M. Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 20(3-4):225-243, 2001.