

四物湯 加味方이 黑色腫 細胞枯死에 미치는 效果

장성진, 박은정, 이해자

원광대학교 한의과대학 소아과학교실

Effect of *Samultanggambang* on Apoptosis of Melanoma cells

Chang Sung Jin, Park Eun Jung, Lee Hai Ja

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.

Objective : In this study, the ability of Oriental medicine *Samultanggambang* (SMTG) to induce apoptosis was investigated in B16F10 melanoma cells.

Methods : Tetrazolium-based colorimetric assay was performed for cytotoxicity test. Several new assays for the basis of biochemical events associated with apoptosis such as DNA fragmentation by a flow cytometry, caspase-3 activation and PARP cleavage by Western blotting should be carried out potentially useful for the basis of biochemical events associated with apoptosis such as a flow cytometry and caspase-3 activation.

Results : (1) The number of B16F10 melanoma cells was less than 30 % after exposure to 1 mg/ml SMTG for 48 h. SMTG increased cytotoxicity of B16F10 melanoma cells in a dose- and time-dependent manner.

(2) The percentage of apoptotic cells by flow cytometric analysis of the DNA-stained cells increased to 21 % at 24 h and 25 % at 48 h after treatment with 1 mg/ml SMTG.

(3) SMTG-induced apoptosis was accompanied by the activation of caspase-3 and the specific proteolytic cleavage of poly-ADP-ribose polymerase.

(4) SMTG induces the activation of caspase-3 and the specific proteolytic cleavage of poly-ADP-ribose polymerase and eventually leads to apoptosis through c-Jun NH₂-terminal protein kinase (JNK)-dependent manner in B16F10 melanoma cells.

Conclusions : SMTG had a strong cytotoxic effect on B16F10 melanoma cells.

Key words : *Samultanggambang*(SMTG), apoptosis, melanoma cells

접 수 : 2006년 3월 31일, 채택일자: 2006년 4월 22일

교신저자 : 장성진, 전북 전주 덕진구 덕진동 142-1 원광대학교 한의과대학 소아과학교실
(Tel. 063-270-1019, E-mail: hanihani1004@hanmail.net)

* 본 연구는 원광대학교 교비 지원으로 이루어졌음

I. 緒 論

醫學의 눈부신 발달에도 불구하고 아직까지 많은 질병들이 난치병으로 분류되고 있다. 그 중 癌은 전체 死亡原因에서 1위를 차지하며 주로 수술요법, 화학요법 및 방사선 요법으로 치료하고 있지만 癌의 豫防과 治療는 醫學界의 큰 과제로 認識되고 있다¹⁾.

皮膚에 발생하는 黑色腫(Melanoma)은 皮膚癌의 일종으로 멜라노사이트(melanocyte)나 모반세포가 악성화 된 腫瘍이다. 전체 癌 중에서 2.4~4%를 차지하고 있는데 각종 有害物質이나 紫外線에 노출될 기회가 많아지면서 最近 10년 사이에 2배 정도 증가하고 있는 추세이며 年平均 5%정도씩 증가하고 있다²⁻⁴⁾.

黑色腫은 韓醫學에서 翻花瘡, 石疽, 黑疔, 癌發, 失榮 등에 해당되고⁵⁾, 氣滯血瘀型 熱毒蘊結型 痰濕凝滯型 氣血兩虛型으로 분류되며²⁾, 病型에 따라 局部皮膚色이 灰色 藍黑色 棕色 등 다소 症狀의 차이가 있으나 瘙痒, 硬結, 刺痛하며 潰破되면 膿血性的 滲出液이 分泌된다.

四物湯 加味方은 調血養血하여 皮膚질환의 치료에 응용되어온 四物湯에 行氣活血하는 靑皮 枳實 丹蔘 桃仁 豨簽과 清熱解毒하는 苦蔘 牛蒡子 黃芩 地榆 및 消風止痒하는 樺皮 白鮮皮 荊芥 防風 地膚子 등 수종의 藥材를 加味한 處方으로 熱毒, 痰濁, 瘀血로 인한 黑色腫 치료에 사용할 목적으로 作方되었다.

黑色腫의 發生機轉은 확실치 않으나 유전적 요인과 紫外線 노출과 같은 환경적 요인이 관련되며 선천성모반(先天性母斑, Congenital Nevus)의 병변에서 丘疹이나 結節이 발생하면 黑色腫을 의심한다. 거대 선천성 멜라닌 색소 모반은 1%의 新生兒에게서 발생하는데

이중 10%가 惡性 黑色腫으로 進行된다⁶⁾. 黑色腫은 初期에 診斷되고 적절한 治療가 시행되면 잠재적으로 治療가 가능하나 治療時期를 놓치면 국소적인 후유증과 內部 臟器 등에 轉移를 일으켜 生命을 잃게 된다²⁾. 그러므로 思春期 以前의 黑色腫에 대한 早期診斷 및 早期治療는 중요한 意義를 가진다. 黑色腫에 대한 韓醫學의 治療法은 正氣의 虛實에 따른 扶正法, 祛邪法 및 扶正祛邪法을 사용하는데 이 방법들은 免疫力을 증강시켜 癌細胞의 成長을 억제하는 腫瘍免疫法과 유사하며 韓藥, 鍼灸, 電鍼 및 藥鍼療法の 抗癌效果에 대한 研究가 활발하게 進行되고 있다³⁾.

黑色腫에 대한 단일 약물을 이용한 抗癌效果 研究로는, 朴 等⁷⁾이 藥鍼用 蜂毒液이 黑色腫 細胞에 미치는 영향을 보고하였고, 吳 等⁸⁾이 蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 미치는 영향을 보고하였으며, 배 等³⁾이 魚腥草藥鍼이 B16黑色腫 癌모델에 대한 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 영향을 보고하였다. 복합약물을 이용한 보고로는 柳 等⁹⁾이 陽和湯의 B16黑色腫 癌모델에 대한 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 影響을 보고하였고, 河 等¹⁰⁾은 淸上補下丸이 黑色腫의 肺轉移 抑制 및 免疫調節作用에 미치는 영향을 보고하였다. 그러나 四物湯에 行氣活血, 清熱解毒, 消風止痒하는 수종의 약재를 가미한 四物湯 加味方の 黑色腫 細胞枯死에 관한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 四物湯 加味方이 黑色腫 細胞枯死 유도에 어떠한 영향을 미치는지 규명하고자, 四物湯 加味方の 세포독성능 관찰을 위해 tetrazolium-based colorimetric assay 및 유식세포분석에 의한 DNA 절단능, Western blotting에 의한 PARP 분할능과 같은 細胞枯死와 연관된 생화학적 변화를 분석하여 有意한 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 試藥

DMEM과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다.

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT), isopropanol, RNase, sodium EDTA, propidium iodide (PI)와 다른 시약들은 Sigma Chemical (St. Louis, MO)에서 구입하

였다. Anti-human caspase-3와 PARP 항체 들은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) 것을 사용하였다. JNK, p38 과 ERK의 특정 억제제인 SP600125, SB203580과 PD98059는 Calbiochem (Carlsbad, CA) 것을 각각 사용하였다.

2) 細胞 培養

한국 세포주 은행(KCLB, Korean Cell Line Bank) 에서 黑色腫 細胞(B16F10 melanoma cell)를 분양 받았다. 黑色腫 細胞를 37 °C, 5 % CO₂를 함유한 공기 중에서 100 unit/ml penicillin과 100 unit/ml streptomycin으로 보

The Prescription of *Samultang-gamibang*

Herbal name	Scientific name	Amount(g)
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch (Scrophulariaceae)	20
芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall. (Ranunculaceae)	8
當歸	<i>Angelica sinensis</i> Diels (Umbelliferae)	8
川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort (Umbelliferae)	8
丹蔘	<i>Codonopsis pilosula</i> Nannf. (Labiatae)	8
苦蔘	<i>Sophora flavescens</i> Ait. (Leguminosae)	8
地榆	<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (Rosaceae)	8
樺皮	<i>Betula platyphylla</i> Suk. (Betulaceae)	8
豨薟	<i>Siegesbeckia pubescens</i> Mak. (Compositae)	8
青皮	<i>Citrus unshiu</i> Marcov. (Rutaceae)	8
枳實	<i>Poncirus trifoliata</i> L. (Rutaceae)	8
黃芪	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge. (Leguminosae)	8
白鮮皮	<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz. (Rutaceae)	6
白蒺藜	<i>Tribulus terrestris</i> L. (Zygophyllaceae)	6
牛蒡子	<i>Arcticum lappa</i> L. (Compositae)	6
地膚子	<i>Kochia scoparia</i> Schrad. (Chenopodiaceae)	6
桃仁	<i>Prunus persica</i> Batsch (Rosaceae)	6
黃芩	<i>Scutellaria baikalensis</i> Georgi (Labiatae)	6
荊芥	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq. (Labiatae)	6
防風	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischk (Umbelliferae)	6
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. (Leguminosae)	6
Total Amount		162

완, 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에서 유지하였다.

3) 藥材

四物湯 加味方 엑기스는 증류수에 건조된 약재들을 3시간 동안 달여 얻었다(162 g/ml). 달인 것은 여과, 동결 건조하여 4 °C에 보관하였다. 추출물 수율은 약 10 %이었다 (w/w). 四物湯 加味方 (162 g)은 熟地黃 20 g, 芍藥 8 g, 當歸 8 g, 川芎 8 g, 丹蔘 8 g, 苦蔘 8 g, 地榆 8 g, 樺皮 8 g, 豨薟 8 g, 靑皮 8 g, 枳實 8 g, 黃芪 8 g, 白鮮皮 6 g, 白蒺藜 6 g, 牛蒡子 6 g, 地膚子 6 g, 桃仁 6 g, 黃芩 6 g, 荊芥 6 g, 防風 6 g 과 甘草 6 g 등의 21 가지 약재로 구성됐다. 약재는 圓光大學校 全州韓方病院에서 구입하였다.

2. 方法

1) MTT assay

細胞 生存度는 Mosmann이 서술한 MTT 염색으로 측정하였다.¹¹⁾ 즉 細胞를 4-well plates (4×10^5 cells/ml의 밀도로 500 μ l/well)에 배양하고 24, 48시간 동안 여러 농도의 四物湯 加味方을 처리하였다. 처리 마지막에 MTT 용액 (PBS에 녹여 5 mg/ml)을 첨가했고 (50 μ l/well) 細胞는 37°C에서 4 시간 더 배양했으며, 형성된 formazan crystal을 원심분리하고 DMSO로 pellet을 녹였다. 540 nm에서 spectrometer로 흡광도를 측정했다. caspase-3 억제 분석을 위해 특정 caspase-3 억제제인 Z-DEVD-FMK를 사용했으며, 억제제는 DMSO에 희석하여 四物湯 加味方 처리 1 시간 전에 배양액에 처리하였다. MAPK 抑制 分析의 경우에는, JNK, p38과 ERK 특정 억제제인 SP600125, SB203580과 PD98059를 각각 사용하였다.

SP600125, SB203580과 PD98059를 DMSO로 희석시켜 각각 10, 0.02와 4 μ M의 억제제들을 四物湯 加味方 처리 1 시간 전에 培養液에 처리했다.

2) 세포 주기 분석

細胞를 거두어 차가운 PBS로 한번 洗淨한 다음 細胞 pellet을 50 μ g/ml PI, 0.1 % (w/v) sodium citrate와 0.1 % RNase를 포함하는 500 μ l of PI solution으로懸濁하였다. 세포 표본은 최소한 30 분 동안 4 °C 암실에서 배양했고 유식세포분석기 (FACS Calibur, Becton Dickinson)와 Cell Quest software를 사용하여 分析했다.

3) Western blotting

Western blotting은 최근에 확립된 방법에 따라 시행하였다.¹²⁾ 전체 세포 lysates를 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 20 % glycerol, 10 % 2-mercaptoethanol)에서 끓여 만들었다. 세포 lysate의 단백질을 10 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하였고 nitrocellulose paper로 옮겼다. membrane을 상온에서 1 시간 동안 0.1 % PBS-tween 20에 5 % skim milk로 차단시켰고 anti-caspase-3 or anti-PARP 항체로 배양했다. 0.1 % PBS-tween 20으로 세 번 洗淨한 다음, blot을 30 분 동안 이차 항체로 培養했고 항체 특정 단백질은 enhanced chemiluminescence detection system (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig, Germany)으로 分析하였다.

4) 統計學的 分析

각 실험은 최소한 세 번 반복 실험을 수행

하였다. 결과는 실험들의 수에 대해 mean ± S. D.로 나타냈다. 각 군간 Student's *t*-test로 統計學的 有意性을 비교하였다.

를 가지고 있었다. 48 시간 동안 1 mg/ml의 四物湯 加味方에 노출된 黑色腫 細胞의 生存率은 30 %를 넘지 못했다. 四物湯 加味方은 濃度와 時間 依存的으로 黑色腫 細胞에 대한 細胞毒性을 증가시켰다 (Fig. 1).

Ⅲ. 實驗 成績

1. 四物湯 加味方이 細胞 생존도에 미치는 效果

四物湯 加味方에 노출된 黑色腫 細胞의 직접적인 生存度 측정을 위해 MTT assay를 시행하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이, 四物湯 加味方은 黑色腫 細胞에 강한 細胞毒性 效

2. 四物湯 加味方이 세포 주기 변화에 미치는 效果

四物湯 加味方을 처리한 黑色腫 細胞의 細胞枯死 變화를 유식세포분석기를 이용해 관찰했다. 1 mg/ml의 四物湯 加味方을 24, 48 시간 동안 처리하였을 때 細胞枯死 細胞의 비율이 각각 21 %와 25 %로 증가했다. 四物湯 加味方으로 처리한 黑色腫 細胞는 時間 依存的으로 hypodiploid 細胞 증가를 나타냈다.

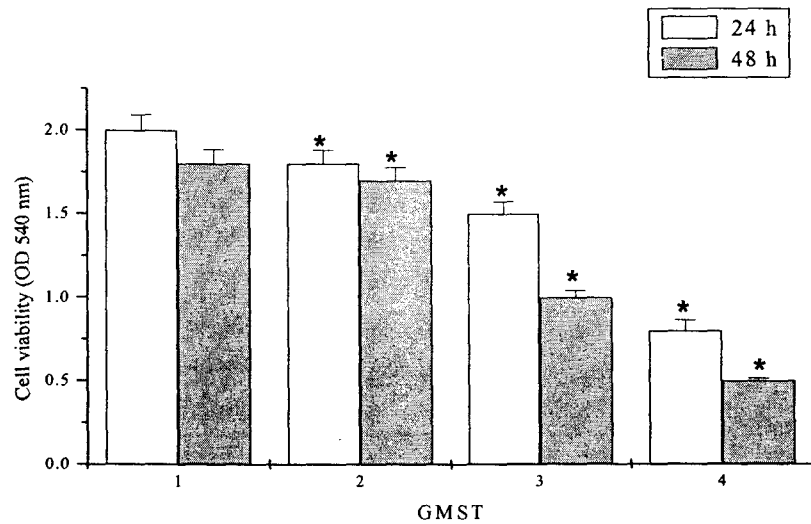


Fig. 1. Effect of SMTG on the cell viability in B16F10 melanoma cells. The cells (4×10^5 cells/ml) were treated with various concentrations of SMTG for 24 and 48 h. The value represented the mean ± S. D. from four independent experiments. *P < 0.01; significantly different from the negative control value. 1, negative control; 2, 0.01 mg/ml; 3, 0.1 mg/ml; 4, 1 mg/ml.

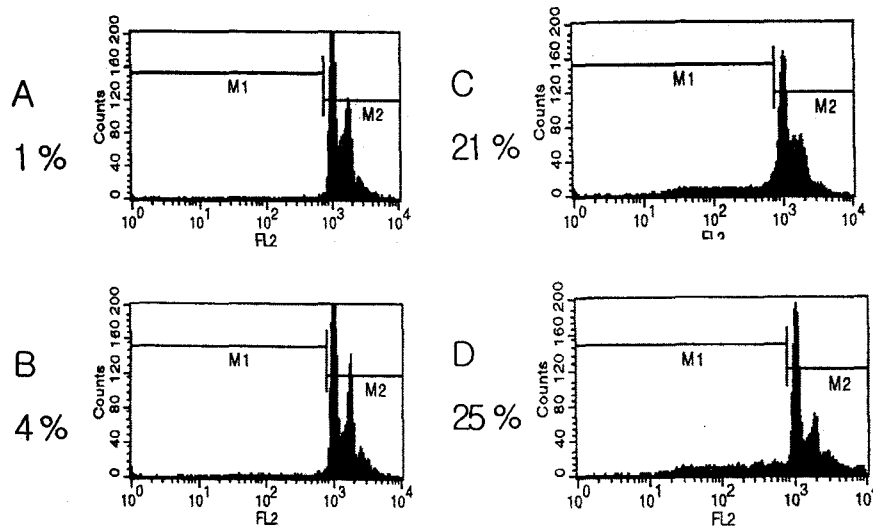


Fig. 2. Effect of SMTG on the cell cycle distribution in B16F10 melanoma cells. The cells (1.5×10^6 cells/ml) were treated with 1 mg/ml SMTG for 24 and 48 h. The cells were stained with PI solution and analysed for DNA content by flow cytometry (see Materials and Methods). A, 24 h negative control; B, 48 h negative control; C, 24 h SMTG; D, 48 h SMTG.

3. 四物湯 加味方이 procaspase-3와 PARP의 분할에 미치는 효과

caspase-3는 몇 가지 type의 抗癌劑에 의한 細胞枯死 신호의 전파에 필수적인 putative cysteine protease이다¹³⁾. 四物湯 加味方に 의한 黑色腫 細胞의 細胞枯死 유도에 cysteine protease와의 關聯性 研究는 중요하다. 본 실험에서는 Western blot 分析을 통해서 四物湯 加味方이 24 시간째에 procaspase-3의 단백질 分解 활성화를 유도함을 관찰했다.(Fig. 3의 upper panel) 四物湯 加味方은 1 mg/ml의 농도에서 procaspase-3의 대략적인 양적 분할을 유도했다. caspase-3의 활성화는 PARP를 포함한 많은 단백질의 분할을

일으킨다. 이런 분할은 PARP의 불활성화를 일으켜서 무익한 DNA 수복 주기를 막는다¹⁴⁾. PARP가 細胞 生存에 필수적이진 않을 지라도 PARP의 분할은 細胞枯死의 또 다른 특징이다¹⁵⁾.

黑色腫 細胞에 1 mg/ml의 四物湯 加味方을 24 시간 동안 처리하면 116 kDa PARP의 단백질 분해적 분할을 유도하여 89 kDa로 나뉜 생산물을 추적한다 (Fig. 3의 lower panel). 나아가 caspase-3와 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死 사이의 관계를 좀 더 확실히 증명하기 위해 caspase-3 inhibitor를 사용한 결과, 48 시간 동안 caspase-3 inhibitor에 노출된 黑色腫 細胞의 生存度는 60 % 이상이었다 (Fig. 4).

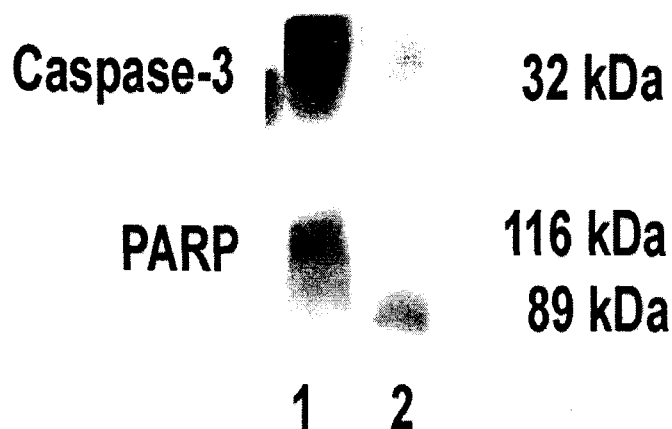


Fig. 3. Effect of SMTG on processing of procaspase-3 (upper panel) and proteolytic cleavage of PARP (lower panel) in B16F10 melanoma cells. Fifty μg of total protein were resolved by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and analyzed by Western blotting using anti-caspase-3 and anti-PARP monoclonal antibody.

1, negative control; 2, 1 mg/ml SMTG.

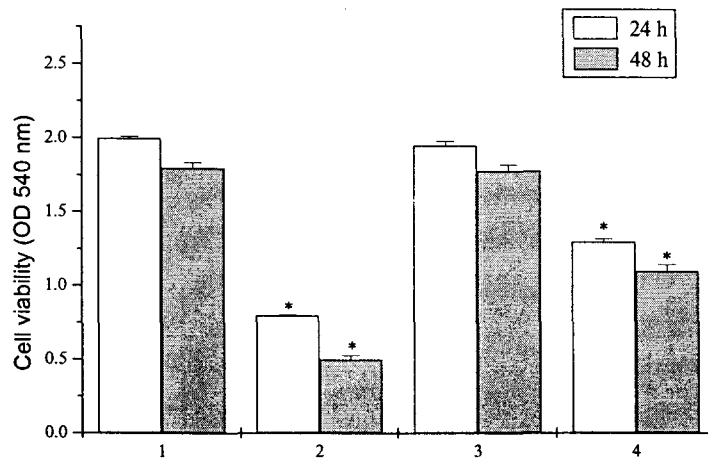


Fig. 4. Effect of caspase-3 inhibitor on SMTG-induced apoptosis in B16F10 melanoma cells. The cells (4×10^5 cells/ml) were treated with 1 mg/ml of SMTG for 24 and 48 h. The value represented the mean \pm S. D. from four independent experiments.

* $P < 0.01$; significantly different from the negative control value.

1, negative control; 2, 1 mg/ml SMTG;

3, 100 μM Z-DEVD-FMK; 4, 1 mg/ml SMTG+ 100 μM Z-DEVD-FMK.

4. 四物湯 加味方이 MAPK에 미치는 효과

MAPK와 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死 사이의 관계를 구분하기 위해 JNK, p38 과 ERK 억제제를 사용하여 실험하였다. SP600125 (10 μM), SB203580 (0.02 μM)과 PD98059 (4 μM)을 四物湯 加味方 처리 1 시간 전에 培養液에 처리하였다. 48 시간 동안 SP600125에 노출된 黑色腫 細胞의 生存度는 60 % 이상이었다 (Fig. 5).

IV. 考 察

黑色腫은 惡性黑色腫(Malignant Melanoma)과 同義語로 멜라닌 색소를 만들어내는

皮膚細胞 또는 母斑細胞가 악성화 된 腫瘍이다. 서양의 역학조사에 의하면 黑色腫의 發生頻도가 최근 10년 사이에 2배 정도 증가하고 있다. 가장 높은 발병률을 보이는 호주에서는 매년 10만 명당 40명에서 黑色腫이 발생된다고 한다. 우리나라에는 전국적인 통계조사가 없으나 서양보다는 훨씬 낮으며 발생양상에 차이가 있다⁴⁾.

黑色腫의 發生原因은 확실치 않으나 유전적 요인과 자외선 노출과 같은 환경적 요인으로 대별할 수 있다. 예를 들면 유전적 요인으로 黑色腫의 6%에서 家族歴이 있으며, 부모나 자식이 黑色腫이 있는 경우에는 黑色腫이 없는 경우보다 8배 높은 발병률을 보인다. 환경적 요인으로 紫外線 過多노출이나 發癌性化學物質 接觸 頻도와 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 有色人種보다 白人에서 發生率이 높으며 이들 중에도 피부색이 희

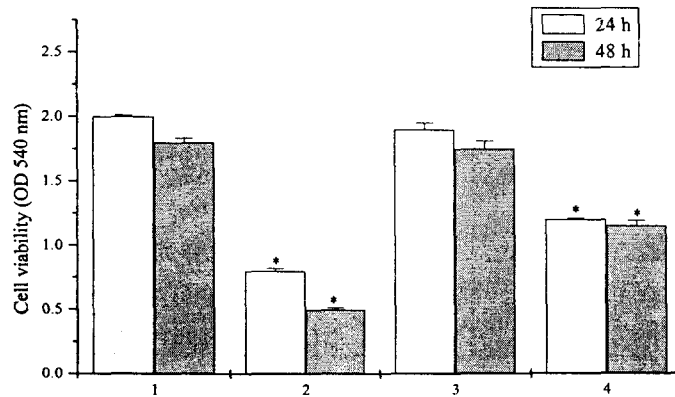


Fig. 5. Effect of MAPK inhibitors on SMTG-induced apoptosis in B16F10 melanoma cells. The cells (4×10^5 cells/ml) were treated with 1 mg/ml of SMTG for 24 and 48 h. The value represented the mean \pm S. D. from four independent experiments. *P < 0.01; significantly different from the negative control value. 1, negative control; 2, 1 mg/ml SMTG; 3, 10 μM SP600125; 4, 1 mg/ml SMTG+ 10 μM SP600125.

고 푸른 눈과 금발 또는 붉은 모발을 가진 사람으로 특히 야외에서 많은 시간을 보내는 경우가 黑色腫의 위험률이 높는데 이는 가장 중요한 原因 인자로 생각되어진 紫外線에 오랫동안 노출되어 色素가 沈着된 結果로 인한 것이다. 발생 기전에 관련되는 紫外線은 파장이 290-300nm인 紫外線B가 더 중요시 되고 있다. 20-50%의 黑色腫은 기존의 色素性 母斑에서 발생한다. 특히 선천성 모반세포성 모반이나 이형성 모반에서 黑色腫 발생 빈도가 높다. 黑色腫의 전구 병변으로 火傷, 반흔, 색소성 건피증을 들 수 있다⁴⁾.

發生部位는 발바닥, 안면, 종아리, 손발톱, 체간, 손바닥, 팔 順이며 眼部, 鼻腔, 肛門, 直腸, 食道, 外陰部 등의 粘膜에서도 발생한다¹⁷⁾. 黑色腫은 臨床組織學的으로 惡性黑字, 表在擴大型 黑色腫, 結節型 黑色腫, 末端黑字性 黑色腫으로 분류한다¹⁸⁾.

惡性 黑色腫의 惡性度を 규정하는 基準으로, 核分裂의 存在, 림프구나 形質細胞로 된 炎症反應, 표피 진피 경계활성과 黑色腫으로 破壞되어 진피간질이 消失된 것 등을 들 수 있다¹⁸⁾. Clark¹⁹⁾는 黑色腫의 침범 정도를 5개의 단계로 分類하면서 침투깊이(depth of invasion)와 예후의 높은 相關關係를 說明하였다²⁾. 최근에는 침범정도를 表皮單位層부터 mm 단위로 측정하여 stage I(피부에 국한), stage II(국소림프절) 및 stage III(원격전이)로 나누는 Breslow의 분류법¹⁸⁾이 많이 이용되고 있다. Breslow의 분류법에서는 腫瘍의 수직두께(vertical thickness)가 더 좋은 지표이고, 黑色腫의 예후가 '얼마나 침투되었는가'에 더 중요하게 관련되어 있다고 본다.

惡性 黑色腫은 病程의 進行이 비교적 빠르고 惡性 程度도 높으므로 早期에 診斷하여 적절한 治療를 시행하는 것이 가장 중요하다.

최근에 西洋醫學에서는 手術, 放射線, 化學療法과 免疫治療를 주로 시행하고 있다. I, II기 환자는 手術하여 切除하는 것을 위주로 한다. 放射線 療法은 단지 몇몇 case에서만 유용성이 보고가 되었을 뿐이며, 病所가 확대되어 手術이 적절치 않는 환자에게 症狀의 輕減을 위해 이용하는 정도이다²⁾. 惡性 黑色腫에 대한 西洋醫學的 治療법은 정상세포에 대한 毒性作用으로 人體에 副作用을 惹起하는 문제점을 안고 있다.

黑色腫은 韓醫學에서 명확히 일치하는 病名은 없으나 文獻的으로 考察할 때 翻花瘡, 石疽, 黑疔, 癩發, 失榮 등에 해당된다⁵⁾. 黑色腫에 대한 韓方治療는 氣滯血瘀型 熱毒蘊結型 痰濕凝滯型 氣血兩虛型으로 分類²⁾되는데 氣滯血瘀型은 肝鬱이 오래도록 풀리지 않아 氣滯血瘀, 絡脈不暢하여 瘀血內停하고 絡脈이 阻滯되어 생기는 것으로 주로 疏肝理氣 活血化瘀하는 治法이 사용된다. 熱毒蘊結型은 熱毒이 內盛하고 陽熱이 亢盛하여 津液을 損傷시키면 蘊結內阻하게 되는데 이에 清熱解毒, 活血散結하는 治法이 사용된다. 痰濕凝滯型은 粘稠한 痰과 濕氣가 신체 國부에서 結滯되고 凝固되어 생기는 것으로 理氣化痰 軟堅散結하는 治法이 사용된다. 氣血兩虛型은 腫瘍 末期나 혹은 化學療法, 放射線療法, 手術 後의 患者 그리고 久病으로 虛弱하여 精氣가 損傷되고 氣血 陰陽 臟腑가 虛損된 所致로 健脾益氣, 養血補血하는 治法이 사용된다²⁰⁾.

四物湯은 熟地黃, 芍藥, 當歸, 川芎 등의 네 가지 韓藥으로 구성된 處方으로 調血養血 通治血病하여 皮膚疾患의 治療에 응용되어 왔다. 四物湯의 추출물은 C6 glial 細胞에서 NF-kB의 down-regulation을 통해 lipopolysaccharide (LPS)나 phorbol 12-myristate

13-acetate (PMA)로 유도한 손상과 산화질소의 생성을 억제한다²¹⁾.

四物湯 加味方은 皮膚病을 治療하기 위한 목적으로 전통적인 東洋 藥理學的 지식에 基盤을 두고 새롭게 구성한 韓藥 처방이다. 이는 四物湯에 行氣活血하는 靑皮, 枳實, 丹蔘, 桃仁, 豨蠶과 清熱解毒하는 苦蔘, 牛蒡子, 黃芩, 地榆와 消風止痒하는 樺皮, 白鮮皮, 荊芥, 防風, 地膚子 등 수종의 藥材를 가미한 處方으로 免疫力이 약한 알레르기성 체질의 小兒에 빈발하는 아토피성피부염, 지루성피부염, 白斑症, 전염성 연속증 및 黑色腫의 治療에 活用될 수 있는 處方이다. 四物湯 加味方은 熟地黃, 芍藥, 當歸, 川芎, 丹蔘, 苦蔘, 地榆, 樺皮, 豨蠶, 靑皮, 枳實, 黃芩, 白鮮皮, 白蒺藜, 牛蒡子, 地膚子, 桃仁, 黃芩, 荊芥, 防風과 甘草 등의 21 가지 藥材로 구성된다.

行氣活血之劑로 靑皮는 肝 膽經에 작용하여 疏肝破氣 散積化滯하는 효능이 있고, 枳實은 脾 胃經에 작용하여 破氣行痰 散積消痞하고 丹蔘은 心 肝經으로 작용하여 活血祛瘀 涼血安神하고, 桃仁은 心 肝 大腸에 작용하여 破血祛瘀하고, 豨蠶은 肝 腎 脾經에 작용하여 祛風濕 強筋骨하는 효능이 있다. 清熱解毒之劑로 苦蔘은 肝 腎 大腸 小腸經에 작용하여 清熱燥濕 祛風殺蟲하는 효능이 있고, 牛蒡子는 肺 胃經에 작용하여 消散風熱 解毒透疹하고, 黃芩은 清熱瀉火하는 藥으로 除濕熱하며, 地榆는 肝 大腸經에 작용하여 涼血止血 瀉火斂瘡하고, 樺皮는 胃經에 작용하여 清熱利濕 消腫解毒하는 효능이 있고, 白鮮皮는 脾 胃 膀胱經에 작용하여 清熱燥濕, 祛風解毒등의 효능이 있고, 荊芥는 肺 肝經으로 작용하여 祛風解表 宣毒透疹하고, 防風은 肝 脾 膀胱經에 작용하여 祛風解表 勝濕解痙하고, 地膚子는 腎 膀胱經에 작용하여

清濕熱 祛風止痒하는 효능이 있다. 이외에도 白蒺藜는 肝 肺經에 작용하여 平肝疏肝 祛風明目하고, 黃芩는 脾 肺經에 작용하여 固表止汗 托毒排膿하는 효능이 있고, 甘草는 脾 胃 肺經에 작용하여 清熱解毒 調和諸藥의 효능이 있다²²⁾. 이처럼 본 연구에서는 黑色腫의 일반적인 病因 病機가 熱毒, 痰濁, 瘀血과 有關하다고 보고, 四物湯에 清熱解毒, 軟堅散結, 活血化瘀之劑를 가한 四物湯 加味方을 사용하였다.

皮膚에 발생하는 惡性 腫瘍에 대한 西洋 醫學적 治療法의 不作用으로 새로운 治療法의 必要性이 증가함에 따라, 능동적인 細胞死인 apoptosis에 대한 관심이 높아지고 있다. Apoptosis는 진화적으로 보존 되어온 細胞 안에 존재하는 自殺 프로그램으로, 嚴格하게 調節되는 과정을 통해 細胞를 죽음으로 이끌어 결과적으로 損傷되거나 필요치 않은 組織을 제거한다^{23,24)}.

최근 癌의 治療나 豫防을 위해 apoptosis 과정의 造作에 觀心이 집중되면서 Apoptosis에 영향을 미치는 物質을 찾거나 그들의 作用 機轉을 이해하기 위한 研究가 활발히 進行 중이다.

Apoptosis(programmed cell death, PCD, 細胞枯死)^{25,26)}는 1972년 Kerr에 의해 정립된 개념으로 異常 細胞를 除去하여 多細胞 生物의 發生過程과 恒常性 유지에 중요한 役割을 한다. 生體構造의 形成, 불필요한 組織이나 異常 細胞의 除去, 細胞數의 調節 등이 apoptosis를 통해 일어난다. 藥物이나 毒性物質 등과 같은 외부 刺戟으로 인한 細胞死인 壞死가 발생하여 죽게 되는 細胞는 그 과정에서 부피가 커지면서 결국에는 細胞가 터지고, 밖으로 분출된 細胞質에 의해 炎症반응을 일으키는 반면, apoptosis에서는 細胞內 器官들

이 保存된 상태로 炎症을 동반하지 않으면서 細胞 부피의 축소, 이웃 細胞와의 접촉 상실, 細胞質의 액포 생성, 細胞質膜과 核膜의 수포화, 核 染色質 농축과 細胞枯死體(membrane-bound apoptotic body)의 형성이 이루어지며²⁷⁾, 細胞枯死體는 대식세포에 의해 빠르게 除去된다²⁸⁾. 또한 apoptosis는 能動的인 細胞死의 形態이므로 病理的 상황에만 국한되지 않고 mitosis와 상호 견제하여 정상 細胞 數를 조절한다⁷⁾.

Apoptosis에 의한 細胞枯死體 核의 대다수가 G1과 G2기에 멈춰졌는데 이는 DNA 형광 유식세포분석 경향과 일치한다. 四物湯 加味方은 앞선 실험에서 黑色腫 細胞의 生存度를 현저히 抑制했다. 그리고 hypodiploid 細胞의 증가도 時間 依存的으로 觀察되었는데 이런 結果들은 四物湯 加味方의 黑色腫 細胞毒性 機轉이 apoptosis 유도 때문인 것을 暗示한다.

細胞枯死은 시작(initiation), 진전(propagation)과 실행(execution)을 포함한 몇 가지 段階 또는 期로 구분될 수 있다²⁹⁾. 細胞枯死의 실행(execution) 段階는 진화적으로 保存되어 나타나기 때문에 細胞枯死 과정의 正確性과 效率性 모두를 統制하는데 특별히 중요한 役割을 할 가능성이 있다^{30,31)}.

細胞枯死의 實行 단계는 caspase들의 활성화와 그에 따르는 poly-ADP-ribose polymerase (PARP), gelsolin, actin, lamins, 그리고 fodrin과 같은 몇 가지 세포 기질의 分割에 관계한다. 인간 caspase 1-10이 보고 되었고, caspase 多段階 反應의 활성화가 化學物質과 인자가 유도하는 細胞枯死과 연관되어 있음이 증명되었다³²⁻³⁴⁾. Caspase-9은 caspase developmental apoptosis-4 (CED-4)에 필수적인 caspase의 同族體 Apaf-1과 結合 활성화

화되어 그것의 소중합체 형성을 유도하는 細胞枯死 개시자이다³⁵⁻³⁷⁾.

그 다음, 활성화된 Caspase-9이 나뉘고 細胞質 내에 비활성 상태로 존재하고 있는 실행자 Caspase-3를 활성화시키며 Caspase-3의 다중 분할에 의해 단백질 분해적으로 활성화되어 細胞枯死를 겪는 細胞에서 나뉜 fragment를 발생시킨다³⁸⁻⁴⁰⁾.

Caspase-3는 자극이 유도한 細胞枯死 동안의 세포 죽음과 연관된 마지막 실행효소이다⁴¹⁾. Caspase-3는 한 번 활성화되면, 細胞枯死에 관련된 다양한 과정을 자유롭게 개시한다⁴²⁾. 활성화한 Caspase-3는 오로지 細胞枯死를 겪는 細胞에서만 발견되는데 p18과 p12 아단위로 구성되어 있으며 복합 aspartic acid 부위에서 32 kDa 효소 전구체로부터 유도된다⁴³⁾.

단백질 분해효소 Caspase-3가 활성화된 후 PARP와 같은 Caspase-3를 위한 특정 기질이 나뉘는데 그것은 細胞枯死 진행에 중요한 과정이다⁴⁴⁻⁴⁶⁾. Caspase-3는 DNA 수복에 쓰이는 효소인 PARP를 분할시키고 불활성화시킬 수 있다⁴⁷⁾. PARP는 116 kDa의 단백질이며 nicotinamide adenine dinucleotide를 nicotinamide와 protein-linked ADP-ribose polymers로 변환시킨다. Growth factor의 상실, 다양한 化學療法 化合物에 노출되어 반응한 결과 PARP가 나뉘어 85 kDa을 발생한다.

Houttuynia cordata Thunb. 추출물은 아마도 HL-60 세포에서 미토콘드리아 손상을 일으켜 cytosol로 cytochrome C를 방출시키고 caspase들을 활성화시켜 PARP를 분할시켜 細胞枯死的 細胞死滅을 일으킬 것이다. 한국에 抗癌 效果를 발휘한다고 알려진 處方인 托裏消毒飲은 과산화수소 발생을 유도하고 차례로, 그것이 caspase-3의 활성화와 PARP, D4-GDI를 퇴화시켜 결과적으로 細胞枯死的 細胞死

減을 일으킨다. HL-60 細胞에서 squamocin 이 유도한 細胞枯死는 caspase-3의 활성화를 필요로 하며 JNK 활성화와 관련되어 있다.

Wogonin과 fisetin은 肝腫瘍細胞 SK-HEP-1 에서 細胞枯死 유도를 통해 효과적인 細胞毒性 효과를 갖는데 거기에는 caspase-3 다단계 반응의 활성화, p53 단백질의 유도와 p21 단백질의 선택적인 발현 등이 연관되어 있다.

최근 JNK같은 MAPK(mitogen activated protein kinases) 신호 경로의 활성 상태가 化學療法 인자에 대한 敏感性과 연관되어 있음이 증명되고 있다. 세 가지 주요 MAPK, 다시 말하면 c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK), p38과 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)는 세포 표면 수용기에서 核으로 신호를 전달하는데 중요한 역할을 한다. 몇 가지 研究는 JNK 또는 p38 MAP kinase 활성이 Jurkat T 細胞에 γ -放射線, 쥐 小腦 과립 세포에서 glutamate, 인간 B 림프구에서 mIgM 또는 紫外線, X-ray, 과산화수소, 熱 충격 그리고 세포 포면 수용기인 Fas와 같은 genotoxic stresses 같이 다양한 자극이 유도한 細胞枯死에 연관되어 있음이 밝혀졌다. ERK의 활성화와 인산화는 표피 성장인자와 혈소판 유도 성장인자와 같은 細胞外 刺戟에 의해 細胞增加를 조절하는 신호 변환 다단계 반응에서 중요한 단계이다.

이런 protein kinase 다단계 반응은 化學療法劑가 유도하는 細胞枯死와 연관이 되어 있다. 예를 들면 platinum을 포함하는 약인 cisplatin은 인간 卵巢癌 細胞에서 p38이 아닌 ERK와 JNK를 활성화한다고 보고가 되었다. Cisplatin이 유도한 ERK 활성화의 역제는 cisplatin의 細胞毒性을 강화시켰다.

부가적으로, taxol은 인간 肺와 乳房癌 細胞類에서 ERK와 JNK를 포함한 신호 다단계

반응을 활성화시킨다. 이처럼 여러 MAPK 신호 경로를 활성화시키는 化學療法 製劑와 細胞反應 調節體의 조합은 癌 化學療法에 있어서 새롭고 有望한 戰略이 될 수 있을 것이다.

요컨대 이번 연구에서 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死 동안 24 시간째에 caspase-3의 활성화가 정확히 관찰되었다. caspase-3의 활성화는 분자량 85,000 단편의 생성과 함께 PARP의 退化에 수반된다. 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死에서 caspase-3 抑制劑를 함께 投與했을 때 caspase-3 抑制劑가 1 mg/ml의 四物湯 加味方을 처리한 지 24, 48 시간 後에 살아남은 黑色腫 細胞 생존도가 60 % 이상이 되도록 黑色腫 細胞의 죽음을 막았기 때문에 caspase-3와의 관련성이 좀 더 明確해졌다. 이런 결과들은 黑色腫 細胞에서 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死에는 caspase-3의 활성화가 매개함을 의미한다. 다시 말해 四物湯 加味方에 의한 caspase-3의 활성화는 黑色腫의 치료에 기여할 수 있음을 의미한다.

부가적으로 p38과 ERK가 아닌 JNK 활성화의 직접적인 抑制가 黑色腫 細胞에서 四物湯 加味方이 유도하는 細胞枯死를 弱화시키는 것을 관찰했다. 이런 結果는 JNK 활성이 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死의 긍정적인 調節에 유효할 수 있음을 暗示한다. 이런 發見은 藥物에 의해 유도된 細胞枯死를 이해하는데 중요한 정보를 제공한다. JNK 활성화는 또한 interleukin-1 β -converting enzyme proteases의 활성화에 필요하다. 따라서 JNK 신호는 caspase 활성화의 상류 활성화인자일 수 있다. 반대로 caspase들이 JNK의 활성화에 관계된 상류 kinase인 MEKK1을 활성화한다는 다른 보고도 있다. 이런 결과들은 細胞枯死 과정에서 JNK 신호가 중요한 역할을 함을 의미

하므로, 더 나아가 細胞枯死의 분자적 과정에서 JNK의 정확한 위치를 밝히는 연구를 수행할 필요가 있을 것이다.

결론적으로 四物湯 加味方은 黑色腫 細胞의 增殖을 抑制시키고 caspase-3의 활성화와 PARP의 단백질 분해적 분해를 유도하여 결과적으로 JNK 의존적인 방법으로 細胞枯死를 일으켰다. 향후 더욱 상세한 藥理學的 機轉을 밝힐 필요가 있으며, 生體에서의 抗癌作用, 정상세포에 미치는 영향 그리고 과도한 濃度 및 用量 등을 알아내는 추가적인 實驗 및 研究가 필요할 것으로 思料된다.

V. 結 論

四物湯 加味方이 黑色腫 細胞枯死 유도에 어떠한 영향을 미치는지 규명하기 위하여, 四物湯 加味方の 세포독성능 관찰인 tetrazolium-based colorimetric assay 및 유식세포분석에 의한 DNA 절단능, Western blotting에 의한 PARP 분해능과 같은 細胞枯死와 연관된 생화학적 변화를 분석한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 四物湯 加味方に 노출된 黑色腫 細胞의 직접적인 생존도 측정을 위해 MTT assay를 시행한 결과 四物湯 加味方은 농도와 시간 의존적으로 黑色腫 細胞에 대한 細胞毒性을 증가시켰다.
2. 黑色腫 細胞에 1 mg/ml의 四物湯 加味方을 24, 48 시간 동안 처리하였을 때 細胞枯死 細胞의 비율이 각각 21 %와 25 %로 증가하였다.

3. Western blot 분석을 통해서 四物湯 加味方이 24 시간째에 procaspase-3의 단백질 분해 활성화를 유도함을 관찰하였다.
4. Caspase-3 inhibitor를 사용한 결과, 48 시간 동안 caspase-3 inhibitor에 노출된 黑色腫 細胞의 생존도는 60 % 이상이었다.
5. 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死는 JNK에 대한 특정억제제 SP600125의 처리로 감소되었다.
6. 四物湯 加味方이 유도한 細胞枯死는 p38 과 ERK의 특정억제제인 SB203580 과 PD98059에 영향을 받지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 四物湯 加味方은 黑色腫 細胞에서 caspase-3의 활성화와 PARP의 특정한 가수분해적 분해를 유도하여 JNK 의존적인 방법으로 黑色腫 細胞를 고사시키고 있음을 알 수 있었다. 따라서 四物湯 加味方은 黑色腫 細胞枯死에 유의성이 있었으며, 향후 in vivo에서의 研究가 필요할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 공현식, 류봉하, 박동원, 유기원. 韓國韓醫學의 腫瘍研究에 대한 現況. 大韓韓方腫瘍學會誌 1995;1(1):55-81.
2. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료 2. 익산:圓光大學校出版局. 1999:569-89.
3. 배원영, 고흥균, 김창환. 魚腥草 藥鍼이 B16 黑色腫 癌모델에 대한 抗腫瘍効果 및 免疫反應에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌 2001;18(1):186-201.

4. 大韓皮膚科學會 刊行委員會. 皮膚科學 改正四板. 서울:麗文閣. 2001:542-7.
5. 藩敏求. 中華腫瘤治療大成. 河北:河北 科學技術出版社. 1995:9-112.
6. 홍창의. 小兒科學. 서울:大韓教科書株式 會社. 1999:1047.
7. 朴贊烈 南相水. 藥鍼用蜂毒液이 黑色 腫細胞에 미치는 抗癌效果에 대한 分子生 物學的 研究. 大韓鍼灸學會誌 2000;17 (2):169-86.
8. 오기남, 이재동, 박동석. 蜂毒藥鍼이 C57BL mouse의 黑色腫에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌 2002;19(2):78-91.
9. 柳慧定. 陽和湯의 B16黑色腫 癌모델에 대한 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 影響. 경희대대학원 박사논문. 2000.
10. 하지용, 유명길. 清上補下丸이 黑色腫의 肺轉移 抑制 및 免疫調節作用에 미치 는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌 1998;4 (1):159-75.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: ap- plication to proliferation and cytotox- icity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
12. Koo HN, Hong SH, Kim CY, et al. Inhibitory effect of apoptosis in hu- man astrocytes CCF-STTG1 cells by lemon oil. *Pharmacol Res* 2002;4:469-73.
13. Kaufman SH. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Bio- phys Acta*, 1998;1400:195-211.
14. Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death strug- gle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:329-39.
15. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibi- table protease that cleaves the death substrate poly-(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995;81:801-9.
16. 임명규. 皮膚扁平上皮癌의 原因疾患에 관한 臨床的 考察. 大韓皮膚科學會誌 1996;34(1):85-92.
17. Austoker J. Melanoma: Prevention and early diagnosis. *Br Med J*, 1994;308: 1682-6.
18. 大韓皮膚科學會 教科書 編纂委員會. 皮膚科學 改正三板. 서울:麗文閣. 1994: 452-6.
19. Mihm MC Jr, Clark WH Jr. The Clini- cal diagnosis classification and histo- genic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas. *N Engl J Med* 1971;284(19):1078-82.
20. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료 1. 익산:원광대학교출판국. 1999:253-381.
21. So HS, Oh J, Chung YT, Moon YJ, Kim DH, Moon BS, Lee HS, Baek SW, Park C, Lim YS, Kim MS, Park R. The water extract of Samultang protects the lipopolysaccharide (LPS)/ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)- induced damage and nitric oxide pro- duction of C6 glial cells via down-reg- ulation of NF-kappaB. *Gen Pharmacol* 2000;34:303-10.
22. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學.

- 서울:永林社. 1999:171.
23. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481-6.
 24. Heasman SJ, Giles KM, Ward C, et al. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol*, 2003;178:29-36.
 25. Jacobson M. D, Weil M. and Raff M. C. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997;57:1605-13.
 26. Wyllie A. H. Apoptosis. *Br. J. Cancer* 1998;67:205-8.
 27. Roman AE, Karlene KG, Thomas E. GunterBcl-2 prevents abnormal mitochondrial proliferation during etoposide-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* 2003;289:275-81.
 28. Buttke TM, Sandstrom, PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* 1994;15:7-10.
 29. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-65.
 30. Wood KA, Youle RJ. Apoptosis and free radicals. *Ann NY Acad Sci* 1994;738:400-7.
 31. O'Brien T, Babcock G, Cornelius J, et al. A comparison of apoptosis and necrosis induced by hepatotoxins in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164:280-90.
 32. Tazzari PL, Bontadini A, Fruet F, et al. Flow cytometry characterization of white cell-reduced blood: apoptosis markers and morphology of postfiltration elements. *Vox Sang* 2003;85:109-13.
 33. Huschtscha LI, Jeitner TM, Andersson CE, Bartier WA, Tattersall MH. Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry. *Exp Cell Res* 1994;212:161-5.
 34. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase 8 and apaf-1 form an active holoenzyme. *Gene Dev* 1999;13:3179-84.
 35. Chen YC, Kuo TC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of HSP-70 gene expression by modulation of Ca²⁺ ion and cellular p53 protein by curcumin in colorectal carcinoma cells. *Mol Carcinog* 1996;17:224-34.
 36. Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Involvement of p53 and HSP70 proteins in attenuation of UVC-induced apoptosis by thermal stress in hepatocellular carcinoma cells. *Photochem Photobiol* 1996;70:78-86.
 37. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Lin HY, Ko CH, Shih CM. Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol* 2002;76:351-9.
 38. Yu R, Mandlikar S, Harvey KJ, Ucker DS, Kong TAN. Chemopreventive isothiocyanates induce apop-

- tosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Res* 2000;58:402-8.
39. Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* 2002;109:437-41.
40. Liu HZ, Li DD, Zhen YS, Shao RG. Potentiation and mechanism of cisplatin-induced apoptosis by lidamycin in human hepatoma BEL-7402 cells. *Yao Xue Xue Bao*, 2003;38:250-4.
41. Ohta T, Kinoshita T, Naito M, et al. Requirement of the caspase-3/ CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1997;272:23111-6.
42. Nuez G, Benedict M, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998;17:3237-45.
43. Schlegel J, Peters I, Orrenius S, et al. CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:1841-4.
44. Huigsloot M, Tijdens IB, Mulder GJ, Van de Water B. Differential regulation of phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation by caspases in anticancer drug-induced apoptosis of rat mammary adenocarcinoma MTLn3 cells. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1087-97.
45. Kanuka H, Sawamoto K, Inohara W, Matsuno K, Okano H, Miura M. Control of the cell death pathway by Dapaf-1, a *Drosophila* Apaf-1/CED-4-related caspase activator. *Mol Cell* 1999;4:757-69.
46. Krieser RJ, Eastman A. Cleavage and nuclear translocation of the caspase 3 substrate Rho GDP-dissociation inhibitor, D4-GDI, during apoptosis. *Cell Death Diff* 1999;6:412-9.
47. Piedrafita FJ, Pfahl M. Retinoid-induced apoptosis and Spl cleavage occur independently of transcription and require caspase activation. *Mol Cell Biol* 1997;17:6348-58.