

상록에서 추출한 α-spinasterol의 백혈병세포주(U937) 자멸사 유도 효능

양준석 · 정상훈 · 김 호 · 한 응 · 진재호 · 정일국¹ · 김대근¹ · 정승일² · 정한솔 · 이광규*

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1:해부학교실, 2:전주 생물소재 연구소

Effect of α-spinasterol Extracted from *Phytolacca americanna* on the Apoptosis of U937 cell line

Jun Seok Yang, Sang Hun Jeong, Ho Kim, Ung Han, Jae Ho Jin, Il Kook Jung¹, Dae Keun Kim¹, Seung Il Jeong², Han Sol Jeong, Kwang Gyu Lee*

Department of Pathology, 1:Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University, 2:Jeonju Biomaterials Institute

To investigate the possible mechanism of α-spinasterol as a candidate of anti-cancer drug, I examined the effects of α-spinasterol on the apoptosis of U937 cells. MTT assay, flow cytometric analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot analysis, and RT-PCR were performed. α-spinasterol treatment reduced the cell viability of U937 cells in a dose-dependent manner, which was associated with the induction of apoptotic cell death. α-spinasterol treatment also reduced the levels of Bcl-xL anti-apoptotic protein expression and increased the levels of caspase-3, p53, pro-apoptotic protein, in U937 cells. After treatment the level of Bcl-xL, anti-apoptotic gene expression was decreased and the level of ICE pro-apoptotic gene expression was increased. These findings suggest that α-spinasterol induced the apoptotic cell death via regulation of several growth regulatory gene products. The abbreviations used are: FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate buffered saline; PI, propidium iodide; OD, optical density; DiOC6, 3,3-dihexyloxa carbocyanine iodide; MTT, 3 [4-5-dimethylthiazol-2-yl] -2-diphenyltetrazolium bromide.

Key words : α-spinasterol, apoptosis, flow cytometric analysis, caspase, p53

서론

종양이란 인체를 구성하고 있는 어떤 정상세포가 어떤 자극에 의하여 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형 세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형세포의 집단, 즉 새로이 생긴 종괴로 정의된다¹⁾. 2000년 통계에 의하면 전 세계적으로 1000만 명의 암 환자가 발생하였고, 그 중 600만 명이 사망하였으며^{2,3)}, 2003년 우리나라 통계청의 자료에 의하면 인구 10만 명당 133.1명이 암으로 사망한 것으로 보고되어 질병으로 인한 사망률 중 1위를 차지하고 있는 실정이다.

암 치료의 성공여부를 결정하는 것은 조기 발견과 그에 따라 외과적 절제 혹은 방사선 치료를 통해 암을 치료할 수 있는가 여부이다. 불행히도 대부분의 암을 진단하는 시기에는 이미 전이가 일어나 있기 때문에 외과적 절제나 방사선요법 등만으로는 치료되지 않는다. 최근에는 면역요법이나 세포분화유도법 및 혈관 형성저해법 등 새로운 방법의 치료법이 연구되고 있으며, 특히 화학물질과는 달리 부작용이 덜한 천연물로부터 새로운 항암 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다^{4,5)}. 이에 본 연구에서도 약용 및 야생 식물자원에서 새로운 개념의 항암제 개발에 중요한 기초적인 자료가 될 것으로 여겨져 탐색한 결과 商陸으로부터 활성을 확인하고 그 성분에 관한 연구에 착수하였다. 이제까지 알려진 商陸의 화학성분으로는 triterpenoids의 sapogenin의 계통물질인 phytolaccoside A, B, C, D, E, F, I과 sterol saponin, phytolacca geninn, esculentic acid 등이 알려져 있다.

商陸은 性味が 苦寒, 有毒하고 利尿逐水, 消腫散結하는 효능

* 교신저자 : 이광규, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학

· E-mail : kwangl@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1562

· 접수 : 2007/08/20 · 채택 : 2007/09/19

이 있어서 水腫이나 癰腫에 쓰이는 한약재⁶⁾로 『本草綱目』⁷⁾에는 “水腫疔瘰癧를 다스리고 癰腫을 없애며, 胸中邪氣, 水腫痿痺, 腹滿洪直을 치료하고 五臟을 소통시키며, 물기운을 흐트린다. 또 열 가지 水病을 瀉하고 喉痺로 목이 막힌 것을 낮게 하고, 얇게 썰어서 醋炒하여 咽喉를 씻어내면 좋으며, 대소장을 소통시키고, 蠱毒을 없애며 유산시키고 腫毒을 지져서 惡瘡에 붙인다”라고 하였다. 商陸에 대한 연구로 杜⁸⁾는 만성기관지염 환자에 있어서 호산구의 감소 부진피질 기능의 증가 및 과민반응에 대한 개선작용이 있음을 보고하였고, 方⁹⁾은 복강대식세포의 혈소관활성인자(PAF)의 방출억제, 육아중성 염증에 대한 억제작용이 있음을 보고하였으며, 노¹⁰⁾는 고지혈증에 대한 예방효과가 있는 것으로 보고하였다.

이에 저자는 利尿逐水, 消腫散結시키며, 癰腫에 쓰이는 商陸의 추출물 중 글로로포름 층으로부터 α -spinasterol을 분리 및 구조동정하였고, 이 α -spinasterol의 항암능력을 살펴보고자 백혈병 세포주인 U937 세포에 apoptosis 유도활성능을 실험적으로 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받은 U937 세포¹¹⁾(human histiocytic lymphoma cell line)는 RPMI-1640 media에 10% fetal bovine serum을 첨가하여 습윤한 상태의 CO₂ incubator에서 5% CO₂ 농도를 유지한 채 배양하였다.

2. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, FBS(GIBCOBRL, Grand island, USA), PBS, PI, TEMED, Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo(dT), PCR marker(이상 Promega, Madison, USA), dNTP set(Amersham pharmarcia Biotech Inc., Piscataway, USA), prestained SDS-PAGE standard, sodium dodecyl sulfate(Bio-Rad, Hercules, USA), Trizol reagent(Life Technonogies®, Grand island, USA), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(Sigma, St. Louis, MO, USA) 및 기타 시약은 세포배양용 특급시약을 사용하였다. 사용한 항체는 Monoclonal human anti-Bcl-xL antibody, Monoclonal Anti-human Caspase 3 antibody(이상 R&D system, Minneapolis, MN, USA), anti-rabbit p53 antibody(Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. 추출 및 분획용 시약은 EP급 용매를 사용하였으며, TLC 및 column용 시약 등은 EP급 용매를 재증류하여 사용하거나, 특급시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Art. 7734 and 9385, Merck, Germany)으로 70-230, 230-400 mesh를 사용하였고, TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ precoated plate(Art. 7552, Merck, Germany)를 사용하였다. 발색시약으로는 10% H₂SO₄(in EtOH)을 사용하였으며, UV로 254, 365 nm detection을 병행하였다.

사용한 기기는 mp(Gallenkamp melting point apparatus),

UV spectrophotometer(Shimadzu, Japan), ¹H, ¹³C-NMR(Bruck AMX 600 and 150 MHz), FAB-MS(JEOL), inverted microscope(Olympus, CK40), ELISA reader(Molecular Devices, VERSA Max), laser flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), centrifuge(Hanmil-Mega 17R), CO₂ incubator(SHEL LAB, USA), freeze dryer(Ilsin lab, Korea) 등을 사용하였다.

3. 추출 및 화합물 분리

본 실험에 사용한 商陸은 우석대학교 한방병원에서 정선하였다. 중량 5.0 kg을 MeOH로 10 일간 상온에서 2 회 추출하고, 수욕상(50℃)에서 5 시간씩 2 회 온침하였다. 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 MeOH엑스를 680 g을 얻었으며, 이 MeOH엑스를 증류수 1 l로 현탁시키고 동량의 hexane (31.5 g), chloroform (51.2 g), ethylacetate (19.7 g) 및 butanol (157.1 g)의 순차적으로 용매분획하여 각각의 분획물을 얻었다. Chloroform 분획(45 g)을 SiO₂ column chromatography (hexane : EtOAc = 9:1→8:2→7:3→1:1→0:1)를 실시하여 9 개의 분획 (PA1-PA9)으로 나누었으며, PA2 (5.2 g)를 n-hexane : EtOAc = 4:1을 용매로 silica gel column chromatography를 수행하여 소분획 (PA21-PA24) 4 개의 소분획을 얻었다. 소분획 PA22 (2.3 g)를 Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂:MeOH = 1:1) column chromatography를 실시하여 다시 3 개의 소분획 (PA221-PA223)을 얻었다. 소분획 PA222 (1.23 g)를 Lobar[®]-A (n-hexane:EtOAc=5:1) column chromatography로 정제하여 백색 침상형의 화합물 (727 mg)를 얻었다.

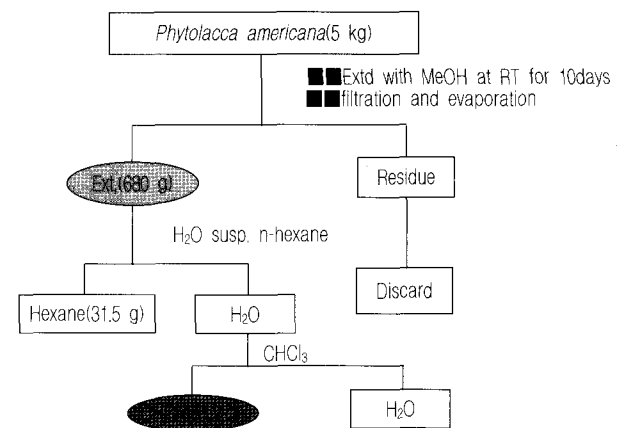


Fig. 1. Solvent fractionation of MeOH extract from *P. americana*.

4. 세포생존을 측정(MTT assay)

계대배양한 U937 세포의 세포부유액을 조제(1×10⁶ cells/well)하고 α -spinasterol(10⁻⁶~10⁻⁴ mol/ml)를 가하여 48 시간 동안 37℃의 CO₂ 배양기(5%-CO₂, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 μ l로 용해시켜 18 시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정 후 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다.

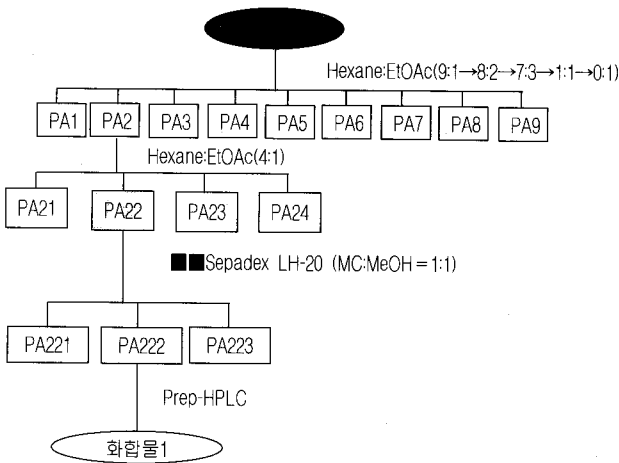


Fig. 2. Isolation of compound from the CHCl_3 soluble fraction of *P. ammericana*.

5. 단백질 정량 및 Western blot analysis¹²⁾

배양된 U937 세포에 α -spinasterol($10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/ml)의 농도로 24 시간 동안 처리한 후 수집하여 PBS로 washing하고 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1%NP-40)를 사용하여 30 분 가량 얼음에 둔 다음 pipetting으로 용해시켰다. 원심분리한 후 상층액을 얻어서 Bradford reagent를 이용하여 단백질을 정량하였고¹³⁾, 전체 lysate 30 $\mu\text{g}/\text{lane}$ 을 기준으로 12% SDS PAGE gel에 loading하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질을 PVDF membrane으로 230 mA에서 1 시간 동안 transfer하였고, 5% skim milk를 이용하여 1 시간 동안 blocking하였다. 1차 항체는 monoclonal mouse Anti-Bcl-xL antibody, monoclonal Anti-human Caspase 3 antibody, anti-rabbit p53 antibody를 각각 1: 1000으로 3% BSA in PBS에 희석, 4°C에서 overnight 하여 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-goat IgG를 1: 10000으로 5% skim milk에 희석하여, 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 ECL을 이용하여 band를 확인하였다.

6. Sub-G1 peak

Nicoletti 등의 방법¹⁴⁾으로 계대배양 중인 U937세포에 α -spinasterol($10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol)을 첨가한 후, 24 시간동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정($\times 3$ 회, 1,500 rpm, 5 분)한 후, 침전시킨 세포분획에 PI(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 20 $\mu\text{l}/1 \times 10^6$ cells의 농도로 염색(4 °C, 30 분간 반응)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm emission: 620 nm)를 이용해서 DNA fragmentation(sub-G1 peak)을 정량하였다.

7. Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$) 측정

계대배양 중인 U937세포에 α -spinasterol($10^{-6}, 10^{-5}$ mol)을 첨가한 후, 24 시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집하여 세정($\times 3$ 회, 1,500 rpm, 5 분)한 후, 1×10^6 cells/well이 되도록 세포를 조정해서 원심분리(250 g, 10 분)하고 침전시킨 세포분획에 DiOC₆(최종 농도: 40 nM)로 염색시켜 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 flow

cytometer(excitation: 488 nm emission: 525 nm)에서 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)을 측정하였다¹⁵⁾.

8. RT-PCR

α -spinasterol을 농도별로 처리($10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/ml)한 후, 24 시간 동안 37°C의 CO₂ 배양기 내에서 배양한 U937 세포로부터 RNA를 분리하였다. Total RNA는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조사의 방법에 준하였다. cDNA는 M-MLV reverse transcriptase와 random hexamer를 primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Perkin Elmer 2400 thermocycler에서 30 cycle 동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 95°C에서 30 초간 denaturation 시킨 후, 55°C에서 30 초간 annealing 시키고, 72°C에서 30 초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색하였다¹⁶⁾. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다.

Table 1. Sequence of primer used for RT-PCR.

Gene		Oligonucleotide sequence
GAPDH	sense	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3'
	antisense	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'
bcl-xL	sense	5'-TTG GAC AAT GGA CTG GTG GA-3'
	antisense	5'-GTA GAG TGG ATG GTC AGT G-3'
ICE	sense	5'-AAT GCT GCT ACA AAA TCT GG-3'
	antisense	5'-ATC ATC CTC AAA CTC TTC TG-3'

9. 통계처리

통계처리는 Student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 이하면 유의성이 있는 것으로 판정하였다¹⁷⁾.

결 과

1. 화합물 1의 구조동정

CHCl_3 분획으로부터 얻어진 화합물의 mp는 157-159°C, $[\alpha]_D^{20} + 3.0^\circ$ (CHCl_3 ; c1)로 TLC에서 10% H₂SO₄ (in EtOH)에 violet색상의 발색을 보였고, Liebermann-Burchard reaction과 Molisch test에 있어서 양성으로 나타나 sterol 계열의 화합물임을 예상할 수 있었다¹⁸⁾.

1) Mass spectrum 분석

화합물의 분자량을 측정하기 위하여 negative FAB-mass으로 spectrum으로 얻은 결과 (Fig. 3)에서 m/z가 411에서 [M-H]⁺가 나타났으므로 molecular weight를 412로 확인하였다.

2) 1D-NMR 분석

¹H-NMR spectrum (Fig. 4)에서 δ 0.54 (18-CH₃), 0.79 (19-CH₃), 0.81 (27-CH₃), 0.82 (29-CH₃), 0.86 (26-CH₃) 그리고 δ 1.03 (21-CH₃)에서 angular CH₃가 signal들이 나타났고, δ 3.59에서 비교적 저자장 영역에서 나타난 signal은 hydroxy group (OH)이 결합된 C-3에 결합한 H-3의 수소로 추정할 수 있었다. 이중결합상의 수소가 δ 5.16에서 나타났으므로 Δ^7 -sterol의 골격을 가지는 sterol화합물로 보였다. 8.16와 5.04에서 나타나는

$J=15.2$ Hz의 doublet으로부터 2개(H-22, H-23)의 trans olefinic proton의 존재함을 알 수 있었다. 이상의 결과와 문헌¹⁹⁾을 비교하여 이 화합물은 24-ethyl- Δ^7 의 골격인 sterol 구조를 가진 것으로 알 수 있었다.

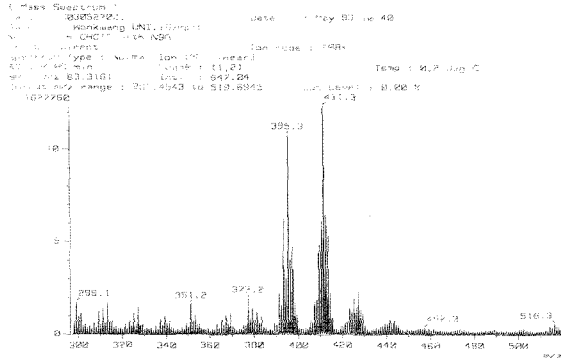


Fig. 3. Negative FAB-Mass spectrum of α -spinasterol.

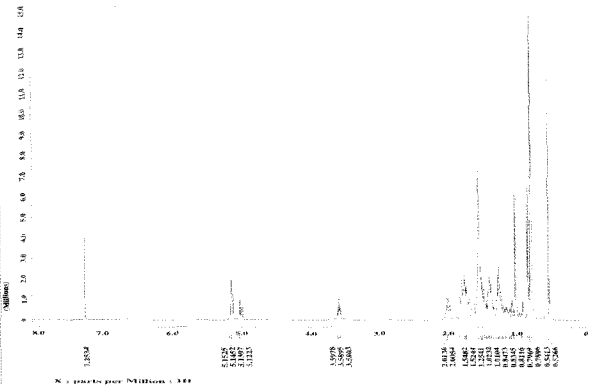


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of α -spinasterol (600 MHz, CDCl_3).

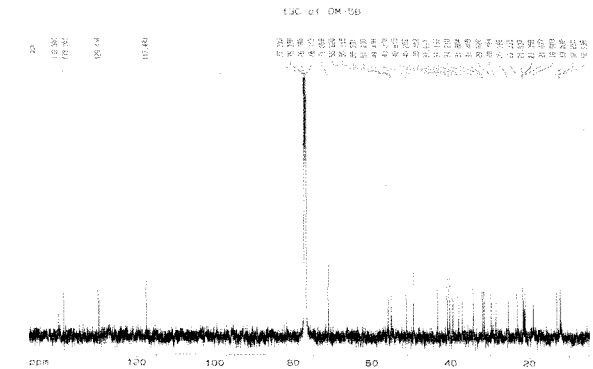


Fig. 5. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of α -spinasterol (150 MHz, CDCl_3).

또한 화합물의 탄소의 수와 종류를 알기 위하여 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 5) 및 DEPT (Fig. 6) spectrum에서 29 개의 탄소 signal들이 관측되었으며 이들의 탄소의 혼성 구성을 알기 위하여 DEPT의 135와 90도 확인 결과 135도의 CH (\uparrow), CH_3 (\uparrow) 및 CH_2 (\downarrow), 와 90도의 CH (\uparrow)의 spectrum으로부터 6개의 CH_3 , 9 개의 CH_2 , 11개의 CH 그리고 3개의 4차탄소를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 화합물의 분자식은 $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_1$ 로 추정

할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 δ 139.5의 signal은 C-8의 탄소이며 δ 138.2은 C-22, 129.4의 signal은 C-23, 및 117.4은 C-7 등에 결합되어 olefinic carbon들임을 추정할 수 있었다. δ 71.6의 signal은 수산기(OH)가 결합된 3번 탄소의 peak, 그리고 24종의 aliphatic ring의 탄소가 δ 55.9~23.0에서 확인할 수 있었다.

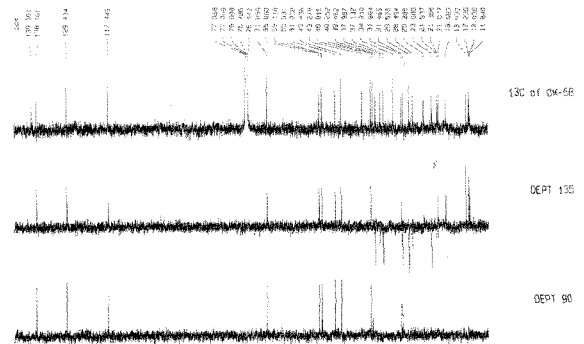


Fig. 6. DEPT spectrum of α -spinasterol.

3) 2D-NMR 분석

화합물의 공간적인 결합 상태를 확인하기 위하여 HMBC spectrum (Fig. 7)에서 δ 0.79 (H-19)의 수소가 δ 37.2 (C-1), 849.5 (C-9) 그리고 δ 34.2 (C-10)의 탄소와 long range coupling하고 있음을 확인 할 수 있다. 또한 δ 0.54 (H-18)의 수소가 δ 39.8 (C-12), δ 43.3 (C-13) 및 δ 55.9의 탄소들과 long range coupling 하고 있으며, δ 5.16 (H-22 or 23) 수소가 δ 40.8 (C-20)의 signal의 탄소와 long range coupling하고 있음이 나타났다.

화합물의 수소와 탄소의 직접적인 결합을 확인하기 위하여 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ COSY (HMQC)spectrum (Fig. 8)을 통하여 δ 0.54 (H-18)의 수소의 signal이 δ 12.04의 C-18에 결합된 탄소이며, δ 0.79 (H-19)의 수소가 δ 19.00의 C-27, 그리고 δ 1.03 (H-21)의 수소가 δ 21.1의 signal의 C-21의 탄소와 결합된 것을 확인 할 수 있고, δ 3.59(H-3)의 수소의 signal이 δ 71.0의 C-3에 결합된 탄소이다. 이상의 자료를 기초와 참고문헌²⁰⁾으로 화합물은 24-ethyl-5-cholesta-7, trans, 22-diene-3-ol 즉, spinasterol (Fig. 9)로 결정하였다.

White needle, mp 157-159 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} +3.0^{\circ}(\text{CHCl}_3; \text{c}1)$
 FAB-MS, m/z : 411[M-H] $^{+}$, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 5.17 (1H, m, H-7), 5.16 (1H, dd, $J=15.2, 8.7\text{Hz}$, H-22), 5.04 (1H, dd, $J=15.2, 8.7\text{Hz}$, H-23), 3.59 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J=6.6\text{Hz}$, H-23), 0.86 (3H, d, $J=6.2\text{Hz}$, H-26), 0.82 (3H, d, $J=7.5\text{Hz}$, H-26), 0.81 (3H, s, H-19), 0.79-0.81 (6H, m, H-27 and H-29), 0.56 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (150MHz, CDCl_3): δ 37.1 (C-1), 31.5 (C-2), 71.6 (C-3), 38.0 (C-4), 40.2 (C-5), 29.6 (C-6), 117.4 (C-7), 129.4 (C-8), 49.3 (C-9), 34.2 (C-10), 34.2 (C-11), 21.5 (C-12), 39.4 (C-13), 43.3 (C-14), 55.1 (C-15), 28.5 (C-16), 55.9 (C-17), 12.0 (C-18), 13.0 (C-19), 40.8 (C-20), 21.4 (C-21), 138.2 (C-22), 139.6 (C-23), 51.2 (C-24), 31.9 (C-25), 21.2 (C-26), 19.0 (C-27), 25.4 (C-28), 12.2 (C-29).

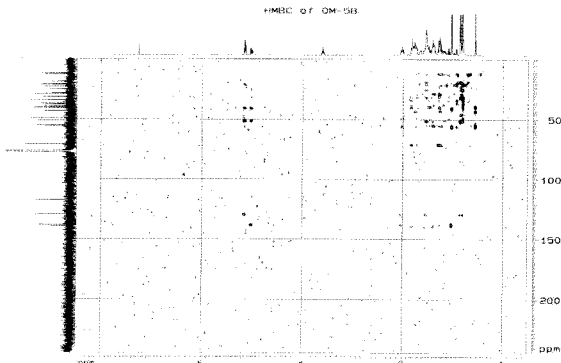


Fig. 7. HMBC spectrum of α -spinasterol.

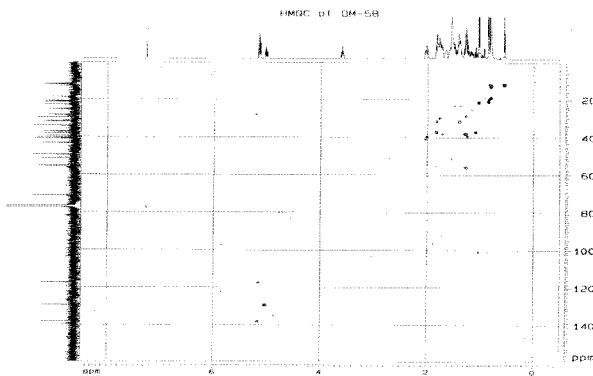


Fig. 8. HMQC spectrum of α -spinasterol.

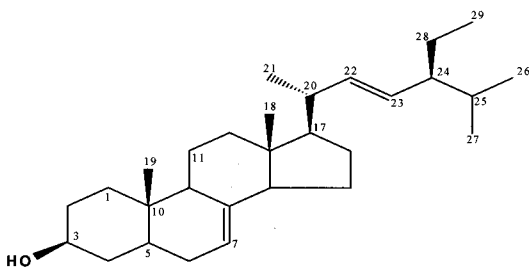


Fig. 9. Structure of α -spinasterol.

2. 세포 생존율에 미치는 영향

U937 세포를 5×10^6 개/ml (1×10^6 개/well)로 조절하여 1 ml당 10^6 , 10^5 , 10^4 mol 농도의 α -spinasterol을 첨가해서 48 시간 동안 배양하고, MTT assay로 세포증식반응을 측정 한 결과, 미처리군을 100%로 하였을 때, 각각의 농도에서 $95.2 \pm 1.1\%$, $88.3 \pm 2.8\%$, $78.4 \pm 3.4\%$ 로 억제 를 보였다(Table 2).

Table 2. Effect of α -spinasterol on the proliferation of cultured U937 leukemia cells.

Cell Type (mol/ml)	U937
0	100±0.5
10^6	95.2±1.1
10^5	88.3±2.8*
10^4	78.4±3.4**

α -spinasterol($10^5 \sim 10^4$ mol) was treated with cultured U937 leukemia cells, and incubated for 48 hours, and the cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. The data represents the mean±SE of 3 experiments. *, Significantly different from control group(*p<0.05, **p<0.01).

3. Apoptosis 유관 단백질 발현

U937 세포에 α -spinasterol을 농도별($10^6 \sim 10^4$ mol/ml)로 24 시간동안 처리한 후 단백질을 추출하여 western blotting을 통해 apoptosis를 유도하거나 억제하는 단백질의 발현을 관찰한 결과 apoptosis를 억제하는 단백질로 알려진 bcl-xL의 발현은 농도의 존적으로 점차 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, apoptosis를 유발하는 단백질인 caspase-3와 p53 단백질의 발현은 농도의존적으로 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10).

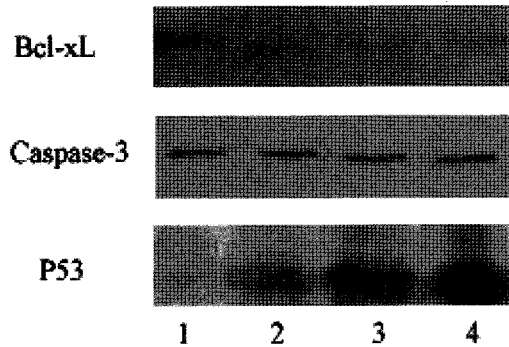


Fig. 10. Western blot analysis of Bcl-xL, Caspase-3, p53. The cells were treated with α -spinasterol for 24 hours, and lysates were collected for immunoblotting analysis. Total protein were isolated from untreated cells(lane 1) and cells treated with 10^6 mol/ml (lane 2), 10^5 mol/ml (lane 3), or 10^4 mol/ml (lane 4) for 24 hours.

4. Sub G1 peak

α -spinasterol을 농도별로($10^6 \sim 10^4$ mol/ml) 24 시간 동안 처리한 U937 세포를 PI로 염색하여 flow cytometer로 세포주기의 분포도를 분석한 결과 미처리군과 비교하여 각 농도처리 군에서 apoptosis를 나타내는 Sub G1 peak가 증가하였다(Table 3).

Table 3. Effect of α -spinasterol on the apoptosis of cultured U937 cells.

Cell Type (μ g/ml)	U937
0	26.7±2.7
10^6	34.7±2.0*
10^5	36.2±3.3*
10^4	38.9±0.9*

Cultured U937 cells were treated with α -spinasterol($10^6 \sim 10^4$ mol/ml) and incubated for 24 hours, and then cells were collected. The sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean±S.E of 3 experiments. *, Significantly different from control group(*p<0.05).

5. Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$)

α -spinasterol을 농도별로(10^6 , 10^5 mol/ml) 24 시간 동안 처리한 U937 세포를 DiOC₆로 염색하여 flow cytometer로 mitochondria의 membrane potential을 분석한 결과, 미처리군에 비해 10^6 , 10^5 mol/ml군에서 membrane potential이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

6. RT-PCR에 의한 Bcl-xL, ICE mRNA의 발현양상

α -spinasterol을 농도별로 투여($10^6 \sim 10^4$ mol/ml)하고 24 시간 동안 배양한 U937 세포에서 RNA를 추출한 후 reverse

transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성한 후 PCR을 시행하였다. PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동으로 관찰한 결과농도의존적으로 apoptosis 억제유전자인 Bcl-xL의 mRNA 발현이 전반적으로 감소하고 있으며, 유발유전자인 ICE의 mRNA 발현은 10^{-5} mol/ml 농도에서 증가하고 있음을 관찰하였다(Fig. 12).

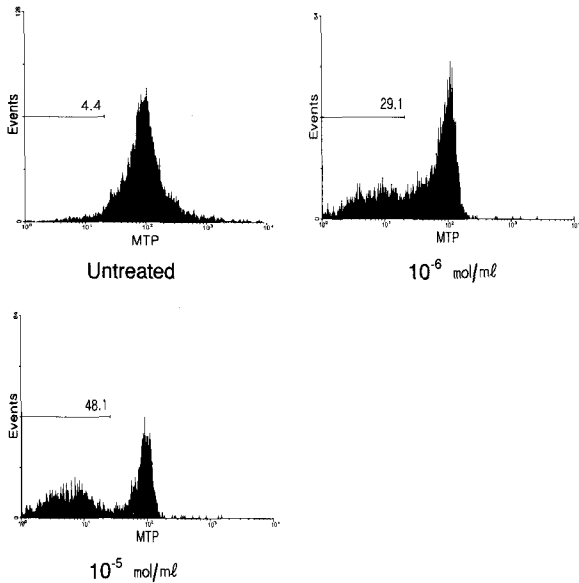


Fig. 11. Alteration of $\Delta\Psi_m$ induced by α -spinasterol. Determination of DiOC₆ incorporation into untreated U937 cells or treated with α -spinasterol (10^{-6} , 10^{-5} mol/ml) for 24 hours. Cells were stained with DiOC₆ in the presence of a buffer containing either 140 mM NaCl or 140 mM KCl. Results are representative of three independent experiments.

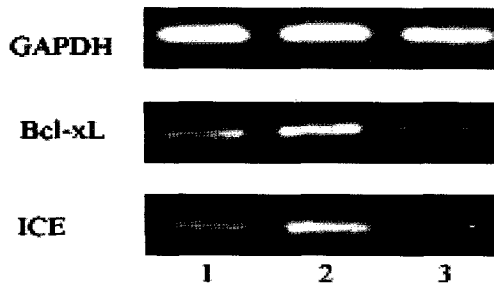


Fig. 12. Expression of apoptosis related genes(Bcl-xL, ICE). Treatment of α -spinasterol for 24 hours decreases the expression of Bcl-xL in U937 cells. Whereas the expression of ICE pro-apoptotic gene is increased. Poly(A⁺)RNA isolated from cells treated with 10^{-6} mol/ml (lane 1), 10^{-5} mol/ml (lane 2), or 10^{-4} mol/ml (lane 3) of for 24 hours.

고찰

암이란 세포의 기본적인 규칙이 깨어져 있는 질환이다. 정상 세포의 성장이 생명체 전체의 필요에 의해 정교하게 조절되는데 반해, 암세포는 스스로 계속 분열하여 결국 정상조직을 침범하고 그 기능을 방해하므로, 정상세포가 암세포로 변환되는 것은 정상 세포생리에 중심 역할을 하는 조절기능의 혼란에 의한 것으로 할 수 있다. 현재 암 치료에 사용되는 대부분의 약제는 DNA에

손상을 주거나 DNA복제를 방해하는 역할을 한다. 이러한 약제들은 암세포에 독성을 나타내지만 정상적인 세포 특히 빠르게 분열하는 세포-조혈세포, 위장관의 표피세포, 모낭세포에도 독성을 나타냄으로써 빈혈, 감염, 구토, 설사 등 심각한 부작용을 야기한다²¹⁾. 최근에는 면역요법이나 세포분화유도법 및 혈관형성 저해법 등 새로운 방법의 연구가 시도되고 있으며, 특히 화합물보다 인체독성이 적으며 부작용이 덜한 천연물로부터 새로운 항암물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 천연물을 이용한 항암제 개발에 대한 연구가 세계적인 관심사로 떠오르면서 한약재를 이용한 암치료제의 개발도 활발해지고 있다⁴⁾.

한의학에서 암에 대한 기제는 《黃帝內經》^{22,23)}에서 腸覃, 石瘕, 息賁, 癰病, 伏梁, 厥疝, 癥聚 등으로, 《諸病源候論》²⁴⁾에서 “留結不散”이라 하여 氣血이 체내에 留結된 결과로 발생된다고, 《肘後備急方》²⁵⁾에서는 “돌과 같이 단단하고 통증이 극심하여 주야로 울 정도이며 치료하지 않으면 백일 내에 죽는다”고 하여 오늘날의 암과 유사한 증상을 기술하고 있고, 宋代의 《衛濟寶書》²⁶⁾에서 최초로 암이라는 글자가 기술되었다. 이 외 문헌에 나타난 腫瘍의 범위에 드는 病症으로는 反胃, 噎膈, 積聚, 痞塊, 癥瘕, 疝癖, 石瘕 등 다양하게 기술하고 있다²⁷⁻²⁹⁾.

암의 원인에 대한 인식은 《黃帝內經》³⁰⁾에서 “五臟이 조화롭지 못하면 七竅가 통하지 못하고, 六腑가 조화롭지 못하면 순행해야 할 氣가 머물러 癰疽를 일으킨다”고 하였고 《中藏經》³¹⁾에서는 “무릇 癰疽瘡腫이 생기는 것은 대개 五臟六腑에 毒氣가 쌓여 흩어지지 않아서 생긴다”라 하여 惡性腫瘍을 毒氣와 연관시켰다. 또 《丹溪心法》³²⁾에서는 “무릇 인체의 上, 中, 下에 덩어리가 있는 것은 대부분 痰이다”고 하였고, 《景岳全書》³³⁾에서 “風寒 外感의 邪氣 또한 積을 이룰 수 있다”고 하였다. 이를 종합하여 본다면 암의 原因을 憂思憤怒 등의 七情內傷과 風寒邪 등의 六淫外感 및 毒氣 등으로 나누어 인식하고 있음을 알 수 있었다.

병리기전에 대하여서는 《黃帝內經》³⁴⁾에서는 “營氣가 經脈의 循行을 따르지 않고 肌肉과 腠理에 逆亂하면 곧 癰腫이 생긴다”고 하였고, 《諸病源候論》³⁵⁾에서는 “積聚란 臟腑의 病으로 虛勞한 사람이 陰陽이 모두 손상됨으로 인해 血氣가 멎쳐서 經絡을 돌아다닐 수 없을 때 안에서 멎치고 쌓인 것이다”라 하여 飲食, 虛勞 등의 원인으로 痰, 食, 氣血이 相搏하여 結塊를 형성함으로써 발생하는 것으로 인식하였다.

한의학에서의 암의 치료는 환자의 정기상태 및 질병의 정도에 따라 크게 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 인체 抗病能力을 증진시키는 扶正培本법과 清熱解毒, 活血祛瘀, 化痰消癥, 理氣消腫 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 배합한 扶正祛邪法 등이 활용되고 있다^{36,37)}.

商陸은 性味가 苦寒, 有毒하며 利尿逐水, 消腫散結의 效能때문에 水腫이나 癰腫에 쓰이는 한약재⁶⁾로 『本草綱目』⁷⁾에는 ““水腫疝瘕痺를 다스리고 癰腫을 없애며, 胸中邪氣, 水腫痿痺, 腹滿洪直을 치료하고 五臟을 소통시키며, 물기운을 흐트린다. 또 열 가지 水病을瀉하고 喉痺로 목이 막힌 것을 낮게 하고, 얇게 썰어서 醋炒하여 咽喉를 씻어내면 좋으며, 대소장을 소통시키고, 蠱毒을 없애며 유산시키고 腫毒을 지져서 惡瘡에 붙인다”라고

하였다"고 하였다.

한편 apoptosis는 계획된 세포사의 형태로서 세포의 수축, 염색질의 응축과 DNA의 분해와 같은 특징을 갖는 세포의 죽음으로 이르는 능동적이고 계획적인 과정이다. Apoptosis는 조직의 발생과 항상성 유지 및 손상되거나 원하지 않는 세포의 사멸에 있어서 매우 중요한 역할을 하며^{38,39}, 특히 DNA가 손상되었을 경우 이로 인한 유해한 돌연변이를 가질 수 있는 세포를 제거함으로써 다세포 동물에 유리한 작용을 하게 된다. 많은 종양에 있어서 이러한 apoptosis의 기전과 연관된 유전자들(p53, Bcl-2 등의 돌연변이가 관찰되었고, 이러한 유전자의 역할은 암발생에서 뿐 만 아니라 DNA 손상을 주는 화학 치료제에 대한 암세포의 반응에서도 세포사의 중요성을 부각시켜 주었다. Apoptosis를 유도하는 인자를 발견하는 것은 약제개발의 가능성을 열어주었으며 현재 암을 치료하기 위해 쓰이고 있는 여러 항암제들도 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다^{40,41}.

Apoptosis의 과정은 세포안의 주요한 기질을 쪼개는 *Caenorhabditis elegans*의 Ced-3 유전자와 연관된 cysteine protease인 caspase 군의 활성화에 의해서 조절된다⁴². Caspase의 활성화과정에 있어서 mitochondria의 바깥막의 투과성이 증가되어 cytochrome c를 포함한 일련의 단백질이 유리된다^{43,44}. Cytochrome c는 또 다른 매개 단백질인 Apaf(apoptotic protease activating factor)에 부착하여 이를 활성화시키며 활성화된 Apaf는 caspase-9를 모이게 하고 이를 다시 활성화시켜 일련의 apoptosis과정을 진행시키는 것으로 보고되었다^{45,46}.

다양한 apoptosis를 일으키는 자극에서 활성화되는 caspase-3은 apoptosis를 억제시키는 Bcl-2와 Bcl-xL를 분해하며, apoptosis를 야기시키는 C-말단 조각을 유리시키며^{47,48}, ICAD/DFF⁴⁹를 분해함으로써 ICAD에 부착된 CAD를 핵안으로 끌어들이어 DNA를 자르도록 유도한다^{49,51}. 또한 actin의 운동성을 조절하는 단백질인 Gelsolin을 활성화시킴으로써 DNA단편화 등 apoptosis를 촉진시킨다고 보고되었다⁵². Bcl-2, Bcl-xL은 Bcl-2 family를 구성하는 단백질로 apoptosis를 조절하는데 중요한 역할을 담당한다. Apoptosis를 유도하는 다양한 자극을 받는 세포에 있어서 Bcl-2와 Bcl-xL이 과다 발현되었을 때는 apoptosis가 억제됨으로써 세포의 생존이 증진된다⁵³. 17번 염색체 단위에 있는 종양억제 유전자인 p53 유전자의 산물인 p53 단백질은 손상된 DNA의 수복과 세포성장조절의 전사인자로서 세포주기 중 G1 조절점에 작용하는 종양억제유전자이다^{54,55}. p53은 전사인자로 작용하여 CDK 억제 단백질인 p21의 발현을 증가시킴⁵⁶으로써 세포주기의 진행을 막는 한편, 세포사멸사를 일으켜 손상된 DNA가 복제되지 않도록 하여 손상된 세포의 성장을 G1기에서 정지시켜 S기로 진행하는 것을 막는다⁵⁷.

Apoptosis로 사멸해 가는 세포에 있어서 가장 일찍 나타나는 구조적 변화 중 하나는 핵내 염색질의 응축이다. 이러한 형태학적인 변화는 세포 안의 endonuclease의 활성화를 통한 핵내의 염색질에서의 nucleosome의 절단과 밀접한 연관이 있는 것으로 보고^{58,59}되었으며, 이러한 DNA 단편화는 전기영동상에서 DNA ladder로서 관찰되는 것이 특징이다. 또한 DNA의 함량은

저이배체(hypodiploid)로 되어 DNA histogram상 이른바 "sub-G1" peak로 나타난다⁶⁰.

최근 apoptosis의 유도에 노출된 흉선세포나 림프구에서 핵내의 변화가 생기기 전 mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)이 감소되는 현상이 보고되었으며^{61,62}, $\Delta\Psi_m$ 의 감소는 여러 다양한 자극에 대한 neuron⁶³, fibroblast⁶⁴, myelomonocytic 세포의 apoptosis에서 일반적으로 관찰되었다. $\Delta\Psi_m$ 는 rhodamin 123; 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetradhyben-zimidazolcarbocyanine(JC-1); 3,3'-dihexyloxaca bocyane iodide [DiOC6]과 같은 형광색소에 의해 쉽게 측정이 되는데 이들은 양전하를 띄고 있는 지방친화성 물질로 mitochondria내로 격리되는 특성이 있다^{65,66}.

본 연구에서는 商陸 메탄을 추출물 중 U937 세포의 apoptosis를 유도효과를 나타내는 콜로포를 분획물을 silica gel column chromatography, sepadex LH-20 및 prep-HPLC 등으로 분리한 후 이화학적 방법 중 ¹H-NMR spectrum (Fig. 4)에 있어서는 δ 0.54 (18-CH₃), 0.79 (19-CH₃), 0.81 (27-CH₃), 0.82 (29-CH₃), 0.86 (26-CH₃), δ 1.03 (21-CH₃)에서 angular CH₃기 signal들이 나타났고, δ 3.59에서 비교적 저자장 영역에서 나타난 signal은 hydroxy group (OH)이 결합된 C-3에 결합한 H-3의 수소로 추정할 수 있다. 이중결합상의 수소가 δ 5.16에서 나타났으므로 Δ^7 -sterol의 골격을 가지는 sterol화합물로 보였다.

또한 ¹³C-NMR (Fig. 5) 및 DEPT (Fig. 6) spectrum에서 29개의 탄소 signal들이 관측되었으며 이들의 탄소의 혼성 구성을 알기위하여 DEPT의 135와 90도 확인 결과 135도의 CH (↑), CH₃ (↑) 및 CH₂ (↓), 와 90도의 CH (↑)의 spectrum으로부터 6개의 CH₃, 9개의 CH₂, 11개의 CH 그리고 3개의 4차탄소를 관찰할 수 있었다.

이와 같은 결과를 통해 화합물의 분자식은 C₂₉H₄₈O₁로 추정할 수 있다. 화합물의 분자량을 측정하기 위하여 negative FAB-mass으로 spectrum으로 얻은 결과 (Fig. 3)에서 m/z가 411에서 [M-H]⁻가 나타났으므로 molecular weight를 412로 확인되었고 화합물은 24-ethyl-5-cholesta-7, trans, 22-diene-3-ol 즉, α -spinasterol (Fig. 9)로 결정하였다.

이와 같은 방법을 통해 얻은 α -spinasterol의 apoptosis 효과를 관찰하기 위하여 MTT방법을 통한 세포생존율 및 sub-G1 peak, mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi_m$) 등을 측정하였고, western blot을 통해 apoptosis와 밀접한 연관을 가진 caspase-3, p53, Bcl-xL 단백질의 발현을 보았으며, RT-PCR을 통해 apoptosis와 연관된 유전자인 Bcl-xL, ICE의 mRNA 발현을 보았다.

계대배양한 백혈병세포주인 U937 세포에 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ mol 농도의 α -spinasterol을 첨가해서 4 시간 동안 배양하고, MTT assay로 세포증식반응을 측정한 결과(Table 2), 대조군을 100%로 하였을 때, 각각의 농도에서 95.2±1.1%, 88.3±2.8%, 78.4±3.4%로 억제를 보였고, 이것이 apoptosis의 기전에 의한 것인지를 확인하기 위하여 western blotting을 실시한 결과 apoptosis를 억제하는 단백질인 Bcl-xL의 발현은 농도의존적으로 점차 감소되었으며, apoptosis를 유발하는 중요한 단백질인 caspase-3과 p53 단백질의

발현은 농도의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10).

또한 DNA 저이배체 유도를 보고자 α -spinasterol을 농도별로 처리하여 PI로 염색한 후 flow cytometer로 세포주기의 분포도를 분석한 결과 대조군과 비교하여 각 농도처리 군에서 apoptosis를 나타내는 sub G1 peak가 증가하였으며, 모든 농도에서 유의성 있는 증가를 보였다(Table 3).

$\Delta\Psi_m$ 의 감소를 관찰한 결과 10^6 , 10^5 mol/ml의 농도에서 모두 현저한 감소를 확인할 수 있었으며(Fig. 11), 마지막으로 U937 세포에 α -spinasterol을 24 시간동안 10^6 mol/ml, 10^5 mol/ml, 10^4 mol/ml 농도로 처리하여 각각의 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 PCR을 시행한 결과 apoptosis를 억제하는 Bcl-xL의 mRNA 발현은 감소했고, apoptosis를 야기하는 ICE의 mRNA 발현은 10^5 mol/ml 농도에서 증가하였다(Fig. 12).

이상의 내용을 종합하면, α -spinasterol이 U937 세포주에 있어서 DNA의 저이배체 유도(sub G1 peak의 증가), mitochondria의 $\Delta\Psi_m$ 감소, apoptosis 유도 단백질인 caspase-3와 p53의 발현 증가 및 억제단백질인 Bcl-xL의 감소 등을 통하여 apoptosis를 유도함으로써 암세포의 증식억제 및 조절에 일정한 역할을 하는 것으로 생각된다.

결 론

商陸으로부터 추출한 α -spinasterol이 U937 세포의 apoptosis에 미치는 효과를 관찰한 결과는 다음과 같다.

商陸 메탄올 추출물 중 U937 세포의 apoptosis를 유도효과를 보이는 클로로포름 분획물로부터 화합물을 분리하여, 이화학적 방법(NMR, Mass)으로 α -spinasterol을 구조동정 하였다. α -spinasterol은 농도의존적으로 U937 세포의 생존율을 감소시켰다. α -spinasterol은 U937 세포에서 apoptosis를 억제하는 Bcl-xL 단백질의 발현을 감소시켰으며 apoptosis를 유도하는 caspase-3, p53단백질의 발현을 증가시켰다. α -spinasterol은 U937 세포에서 농도의존적으로 sub-G1 peak를 증가시켰다. α -spinasterol은 U937 세포의 mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)을 감소시켰다. α -spinasterol은 U937 세포에서 bcl-xL의 mRNA 발현을 감소시켰고, ICE mRNA의 발현을 증가시켰다.

이상의 실험 결과, α -spinasterol은 U937 백혈병 세포주에 대해 유의성 있게 apoptosis를 유도함으로써 항암작용을 나타내었다.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 5th ed, 서울, 고문사, p 144, 2003.
2. Parkin, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533, 2001.
3. Pisani, P., Bray, F., Parkin, D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 97: 72, 2002.
4. 이진우, 정우열. 활혈화어약물을 응용한 새로운 암치료제 개발 연구. *대한 동의병리학회지* 14(1):45-50, 2000.

5. Richardson, M.A., Sanders, T., Palmer, J.L., Greisinger, A., Singletary, S.E. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. *J. Clin. Oncol.* 18: 2505-2514, 2000.
6. 顏正華. 中藥學. 北京, 人民衛生出版社, p 270, 1991.
7. 明·李時珍 著. 本草綱目(上). 서울, 一中社, p 1123, 1991.
8. 杜志德. 商陸醇浸膏의促腎上腺皮質功能. *藥物分析雜誌* 1: 31, 1983.
9. 方軍 等. 商陸皂甲抑制大鼠腹腔巨噬細胞釋放血小板活化因子. *藥學學報* 26: 721, 1991.
10. 노성택, 김인락. 상록이 고지방식이 흰쥐의 체지방 변화에 미치는 영향. *대한본초학회지* 16(1):153-157, 2001.
11. Ralph, P., Moore, M.A., Nilsson, K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* 143: 1528-1533, 1976.
12. Burnette, W.N. "Western blotting" - Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203, 1981.
13. 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.
14. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G., Riccardi, C.A. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279, 1991.
15. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., Kroemer, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp. Med* 181: 1661-1672, 1995.
16. Birch, D.E., Kolmodin, L., Laird, W.J., McKinney, N., Wong, J., Young, K.K.Y., Zangenberg, G.A., Zoccoli, M.A. Simplified Hot-Start PCR. *Nature* 381: 445-446, 1996.
17. Dowdy, S., Weardon, S. Statistics for research. New York, Wiley, p 262, 1983.
18. Jain, M.P., Koul, S.K., Dhar, K.L. and Atal, C.K. Novel nor-harmal alkaloid from *Adhato dasavica*. *Phytochemistry* 19: 1880-1882, 1980.
19. Itoh, T., Kikuchi, Y., Shimizu, N., Tamura, T., Matsumoto, T. 24 β -ethyl-31-norlanosta-8,25(27)-diene-3 β -ol and 24 β -ethyl-25(27)-dehydrophenol in seeds of three Cucurbitaceae specie. *Phytochemistry* 20: 1929-1933, 1981.
20. Furuya, T., Orihara, Y. and Hayashi, C. Triterpenoids from *Eucalyptus periniana* cultured cells. *Phytochemistry* 26: 715-719, 1987.
21. 백문기, 홍경만 역. 암유전자(Geoffrey M. Cooper). 서울, 월

- 드사이언스 p 350, 2000.
22. 金達鎬, 金重漢. 注解 補注 黃帝內經 · 靈樞(水脹, 九鍼論). 서울, 도서출판 의성당, p 1036, 1352, 2000.
 23. 金達鎬, 李鍾성. 注解 補注 黃帝內經 · 素問 上(陰陽別論, 腹中論篇). 서울, 도서출판 의성당, p 174, 837, 2000.
 24. 巢元方. 諸病源候論. 臺北, 文化圖書有限公司, pp 1-17, 129, 1979.
 25. 葛洪. 肘後備急方. 北京, 人民衛生出版社, pp203-210, 1987.
 26. 余桂清. 歷代中醫腫瘤案論選粹. 北京, 北京出版社, pp 1-2, 1988.
 27. 賈埜. 癌瘤防治研究. 서울, 成輔社, pp 25-28, 1984.
 28. 史宇廣 等. 當代名醫臨證精華, 腫瘤全集. 北京, 中醫古籍出版社 pp 1-25, 1982.
 29. 薛己. 薛氏醫案. 上海, 上海古籍出版社, p 315, 1980.
 30. 金達鎬. 注解 補注 黃帝內經 · 靈樞(脈度篇). 서울, 도서출판 의성당, p 488, 2000.
 31. 華陀. 中藏經 卷中. 江蘇科學技術出版社, p 45, 1985.
 32. 朱震亨. 丹溪醫集. 北京, 人民衛生出版社, p 246, 1993.
 33. 張介賓. 景岳全書, 대성문화사, 卷23 積聚, p 477, 1988.
 34. 金達鎬. 注解 補注 黃帝內經 · 素問 上(生氣通天篇). 서울, 도서출판 의성당, p 63, 2002.
 35. 巢元方. 諸病源候論. 北京, 人民衛生出版社, pp 576, 644, 691-692, 1979.
 36. 儲水鑫. 惡性腫瘤中醫調理四法. 上海中醫藥雜誌 7: 33-34, 1992.
 37. 趙健斌. 吳一純教授治療晚期惡性腫瘤的經驗. 陝西醫學 14: 451-453, 1993.
 38. Wyllie, A.H. Apoptosis. *Br J Cancer* 67: 205-208, 1993.
 39. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995.
 40. Fisher, D.E. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell* 78: 539, 1994.
 41. Yamazaki, R., Kusunoki, N., Matsuzaki, T., Hashimoto, S., Kawai, S. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Apoptosis in Association with Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Rheumatoid Synovial Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 18-25, 2002.
 42. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-converting enzyme. *Cell* 75: 641-652, 1993.
 43. Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157, 1996.
 44. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42, 2000.
 45. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1: 949-957, 1998.
 46. Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-11556, 1999.
 47. Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., Hardwick, J.M. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like Death Effector by Caspases. *Science* 278: 1966-1968, 1997.
 48. Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., Hardwick, J.M. Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 554-559, 1998.
 49. Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99, 1998.
 50. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175-184, 1997.
 51. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, 1998.
 52. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science* 278: 294-298, 1997.
 53. Yang, E., Korsmeyer, S.J. Molecular Thanatopsis: A Discourse on the BCL2 Family and Cell Death. *Blood* 88: 386-401, 1996.
 54. Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., Fornace, A.J. Jr. A mammalian cell cycle check point pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71: 587-597, 1992.
 55. Fields, S., Jang, S.K. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249: 1046-1049, 1990.
 56. Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene; clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878, 1994.
 57. Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.
 58. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980.

59. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. Chromatin cleavage in apoptosis association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142: 67, 1984.
60. Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* 13: 137-143, 1992.
61. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182: 367-377, 1995.
62. Petit, P.X., Lecoeur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., Gougeon, M.L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130(1):157-167, 1995.
63. Deckwerth, T.L. and Johnson, E.M. Jr. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor (NGF). *J Cell Biol* 123: 1207-1222, 1993.
64. Vayssiere, J.L., Petit, P.X., Risler, Y., Mignotte, B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(24):11752-11756, 1994.
65. Johnson, L.V., Walsh, M.L. and Chen, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 990-994, 1980.
66. Petit, P.X., O'Connor, D., Grunwald, D., Brown, S.C. Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur J Biochem* 194: 389-397, 1990.