

玄胡索이 인체간암세포 증식억제 및 apoptosis 유발에 미치는 영향

오명택 · 엄현섭 · 지규용*

동의대학교 한의과대학 병리학교실

Antiproliferative Effect and Apoptotic Mechanism of Extract of *Corydalis Yanhusuo* on Human Hepatocarcinoma Cells

Myung Taek Oh, Hyun Sup Eom, Gyoo Yong Chi*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongeui University

In this study, the effect of extract of *Corydalis yanhusuo* (ECT) used in Oriental medicine therapy was investigated on the cell growth and apoptosis of HepG2 human hepatoma cells. It was found that ECT could inhibit the cell growth effectively in a dose-dependent manner, which was associated with morphological change and apoptotic cell death such as formation of apoptotic bodies, DNA fragmentation and increased populations of apoptotic-sub G1 phase. And we observed the effects of ECT on loss of mitochondrial membrane potential (MMP), using the JC-1 probe by DNA flow cytometric analysis. Apoptosis of HepG2 cells by ECT was associated with a down-regulation of anti apoptotic Bcl-2 expression, inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) expression and proteolytic activation of caspase-3 and caspase-9. However, ECT did not affect the pro-apoptotic Bax expression and activity of caspase-8. ECT treatment also concomitant degradation and /or inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), phospholipase C-1 (PLC γ 1). Furthermore, ECT treatment caused a dose-dependent inhibition of iNOS and cyclooxygenase-2 (Cox-2). Additionally ECT have been implicated in the regulation of telomerase expression. ECT treatment induced the down-regulation of telomerase reverse transcriptase mRNA (hTERT) expression of HepG2 cells. Taken together, these findings suggest that ECT may be a potential chemotherapeutic agent for the control of HepG2 human hepatoma cells.

Key words : *Corydalis yanhusuo*, HepG2 human hepatoma cell, apoptosis, cell cycle

서 론

암세포란 세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의해 비정상적인 세포주기 반복을 통한 증식이 계속되는 것이라고 할 수 있다. 따라서 세포주기와 연관된 특정 유전자의 발현 조절을 통한 apoptosis 유발 기전의 해석은 암을 포함한 특정 약제의 개발에 매우 중요한 의미를 가질 수 있다. 특히 apoptosis에는 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다¹⁾. 또한 apoptosis는 개체보존수준

에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 특정 세포주기 조절인자 활성의 변화가 apoptosis의 주원인이 될 수 있다²⁾.

현호색은 양귀비과에 속하며 理氣止痛活血하는 약리작용이 있어서 肝鬱氣滯와 血瘀로 인한 胸脅痛과 腕腹疼痛 등의 진통 효과를 목적으로 사용되었다³⁾. 현대의 약리연구에 의하면 진통 작용이 가장 강하며 주요 성분은 corydaline과 tetrahydropalmetine이고 동물실험에서 여러 모델의 케양생성을 억제하고 부신피질호르몬의 분비를 억제한다고 한다⁴⁾. 실험적으로는 국내에서 간손상 보호효과⁵⁾와 관절염⁶⁾에 관한 연구 및 항알러지효능⁷⁾과 항염증작용 등에 대한 연구⁸⁾가 있고, 최근에는 기억기능이라든가⁹⁾ 뇌에서의 글루탐산 레벨의 조절¹⁰⁾ 등 뇌신경기능 방면의 연구가 있다. 따라서 癌性痛症에도 사용되는 현호색의 작

* 교신저자 : 지규용, 부산시 부산진구 진리1로 100, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : cgyu@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8659

· 접수 : 2007/10/09 · 채택 : 2007/11/26

용이 순수한 진통효과인지 암세포에 대한 실질적인 억제효능이 있는지 여부를 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 현호색은 부산 시내 종근당건재(주)에서 중국산 표준품 *Corydalis yanhusuo*를 500 g 구입하여 1 g/10 cc 비율로 환류냉각장치에 장착된 가열기에서 2시간씩 전탕하고 원심분리(3,000 rpm) 및 여과(Whatman Filter No. 2)한다. 감압 농축과정을 거쳐 얻은 고형성분(ECT)을 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 초저온 냉동고에 보관하였다. 이 ECT를 3차 증류수로 100 mg/ml의 농도로 녹인 후 멸균하여 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다. 실험에 사용된 mitochondrial membrane potential 측정용 iodide와 mRNA 분석용 primer, 단백질 분석용 항체, Immunoblotting용 2차 항체, Caspases의 colorimetric assay kit 등의 제조회사는 각각 CalBiochem (San Diego, CA, USA), Bioneer (Taejeon, Korea), Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 CalBiochem, Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA), R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) 등이다(Table 1).

2. 암세포주 및 배양조건

실험에 사용한 HepG2 및 Hep3B 인체 간암세포는 생명공학 연구소(KRIBB, Teajeon, Korea)에서 분주 받았으며, 90%의 DMEM 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, Gibco BRL, USA) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 등이 포함된 성장배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 재배양하였다.

3. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 HepG2 인체 간암세포를 5×10⁴ 개/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 ECT를 배지에 희석하여 각 well 당 0.1~1 mg/ml의 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt(MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 μl씩 옮겨서 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를

Microsoft Excel 프로그램으로 구하였다.

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
p53	Sense	5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC-3'
	Antisense	5'-CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense	5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-ATG CAC CTA CCC AGC-3'
Bcl-XL	Sense	5'-CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC-3'
	Antisense	5'-TCA GGA ACC AGC GGT TGA AG-3'
TRAIL	Sense	5'-ATG GCT ATG ATG GAG TCC AG-3'
	Antisense	5'-TTG TCC TGC ATC TGC TTC AGC-3'
DR4	Sense	5'-CAG AAC GTC CTG GAG CCT GTA AC-3'
	Antisense	5'-ATG TCC ATT GCC TGA TTC TTT GTG-3'
DR5	Sense	5'-GGG AAG AAG ATT CTC CTG AGA TGT G-3'
	Antisense	5'-ACA TTG TCC TCA GCC CCA GGT CG-3'
Fas	Sense	5'-TCT AAC TTG GGG TGG CTT TGT CTT C-3'
	Antisense	5'-GTG TCA TAC GCT TTC TTT CCA T-3'
FasL	Sense	5'-GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA-3'
	Antisense	5'-AGC CCA GTT TCA TTG ATC ACA AGG-3'
survivin	Sense	5'-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3'
	Antisense	5'-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA-3'
XIAP	Sense	5'-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA-3'
	Antisense	5'-CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T-3'
cIAP-1	Sense	5'-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3'
	Antisense	5'-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3'
cIAP-2	Sense	5'-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3'
	Antisense	5'-CAC TTG CAA GCT CCT CAG G-3'
iNOS	Sense	5'-AGA GAG ATC CGG TTC ACA-3'
	Antisense	5'-CAC AGA ACT GAG GGT ACA-3'
Cox1	Sense	5'-TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT-3'
	Antisense	5'-GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC-3'
Cox2	Sense	5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'
	Antisense	5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'
c-myc	Sense	5'-AAG ACT CCA GCG CCT TCT CTC-3'
	Antisense	5'-GTT TTC CAA CTC CGG GAT CTG-3'
hTERT	Sense	5'-AGC CAG TCT CAC CTT CAA CC-3'
	Antisense	5'-GTT CTT CCA AAC TTG CTG ATG-3'
hTR	Sense	5'-TCT AAC CCT AAC TGA GAA GGG CGT AG-3'
	Antisense	5'-GTT TGC TCT AGA ATG AAC GGT GGA AG-3'
TEP-1	Sense	5'-TCA AGC CAA ACC TGA ATC TGA G-3'
	Antisense	5'-CCC CGA GTG AAT CTT TCT ACG C-3'
Sp1	Sense	5'-ACA GGT GAG VTT GAC CTC AC-3'
	Antisense	5'-GTT GGT TTG CAC CTG GTA TG-3'

4. 도립 현미경을 이용한 세포의 성장과 형태의 관찰

세포 배양용 100 mm petri dishes에 세포를 1 X 10⁵ 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 ECT를 적정농도로 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 도립 현미경을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동 카메라용 필름을 이용하여 사진을 촬영하였다.

5. Hemocytometer를 이용한 세포 생존율 측정

세포 배양용 6 well plate에 암세포를 5×10⁴ 개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 ECT를 적정농도로 처리하여 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시켜서 PBS를 각 well 당 적정량을 첨가하여 세포를 모은 다음 원심분리(2,000

rpm, 5분)하였다. 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 다시 PBS를 1 ml 첨가하여 잘 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 동량으로 섞은 다음 2분간 처리한 후 Pasteur pipette의 모세관현상을 이용하여 세포를 hemocytometer로 옮겨서 위상차 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여($\times 200$) 푸른색으로 염색되지 않은 살아있는 세포수를 세어 Microsoft EXCEL program으로 분석하였다.

6. DAPI staining에 의한 핵의 형태 관찰

정상 및 48시간 동안 ECT를 처리한 암세포를 모은 다음 formaldehyde solution과 PBS를 1 : 9 비율로 섞은 fixing solution을 500 μ l 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 원심분리(2,000 rpm, 5분)하여 상층액을 제거하고 PBS 200 μ l를 넣어서 충분히 섞은 후, 슬라이드글라스 위에 세포 부유액을 80 μ l정도 떨어뜨린 다음 cytospin(1,000 rpm, 5분)하였다. PBS로 세척하고 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA)을 떨어뜨린 후 상온에서 10분간 두었다. 다시 PBS로 세척하고 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 슬라이드 글라스 위에 적당량 떨어뜨린 다음 빛을 차단하여 상온에서 15분간 염색하였다. PBS로 DAPI 용액을 충분히 씻어내고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수한 슬라이드 글라스 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)($\times 400$)으로 농도별 핵형태 변화를 관찰하고 촬영하였다(AxioVision).

7. DNA flow cytometry에 의한 분석

정상 및 ECT 함유배지에서 48시간 동안 배양시킨 암세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 (2,000 rpm, 5분) 상층액을 버리고 세포들만 모았다. PBS를 첨가하여 세척하고 다시 원심분리시켜 얻은 세포에 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 암실에서 반응시킨(4 $^{\circ}$ C, 30min) 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

8. DNA fragmentation의 분석

정상 및 ECT처리 배지에서 48 시간 동안 배양된 세포를 모아 lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100]를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 그 상층액에 proteinase K (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 다음 50 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응시켰다. 그 후 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합 용액(25 : 24 : 1, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하고 상온에서 30분간 rotate시킨 다음 25 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 여기서 얻어진

상층액에 적정량의 isopropanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 5 M NaCl을 첨가하였다. 24시간 정도 냉장 보관한 후, 14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 버리고, RNase A가 적당량 들어있는 TE buffer를 이용하여 pellet을 녹이고 여기에 6X gel loading dye (Bioneer, Daejeon, Korea)를 섞어 주었다. 1.5% agarose gel을 만들어서 1시간가량 50 V로 전기영동시킨 후 ethidium bromide (EtBr, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색하여 ultra violet (UV) 하에서 사진 촬영하였다.

9. Mitochondrial membrane potential assay

Mitochondria에 손상이 생긴 정도를 측정하기 위하여 정상 및 ECT 배지에서 48 시간동안 배양된 암세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포들만 모았다. 여기에 mitochondrial membrane potential (MMP)을 측정할 수 있는 dye인 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1, San Diego, CA, USA)가 10 μ M 농도로 함유되어 있는 serum free medium을 1 ml씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 다음 다시 4 $^{\circ}$ C에서 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포들만 모았다. 여기에 1ml의 PBS를 분주하여 잘 섞은 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하고 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

10. RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

정상 및 ECT이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양시킨 암세포를 PBS로 세척하고 대상으로 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1x TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 ultra violet (UV) 하에서 확인하였으며 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

11. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

상기와 동일한 조건에서 준비된 암세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl(pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 분리하였다.

상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemml sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS) - polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담가 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 (5분간 3번)정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4℃에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척 (15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척 (10분간 3번, 5분간 3번)하고 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다.

12. in vitro caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 activity 측정

Caspases의 in vitro 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 각각 구입하였으며, 제시된 방법에 준하여 활성의 증감 여부를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 ECT이 처리된 배지에서 48 시간 배양된 세포를 모은 뒤 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA), caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-p-nitroaniline (pNA)이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37℃에서 3 시간동안 incubation 시킨 후 VERSAmax tunable microplate reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결 과

1. 인체 간암세포의 생존에 미치는 ECT의 영향

Hep3B 및 HepG2 인체 간암세포의 세포 생존율에 ECT이 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 ECT을 적정농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후, hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하여 ECT이 처리되지 않은 대조군과 비교하였다.

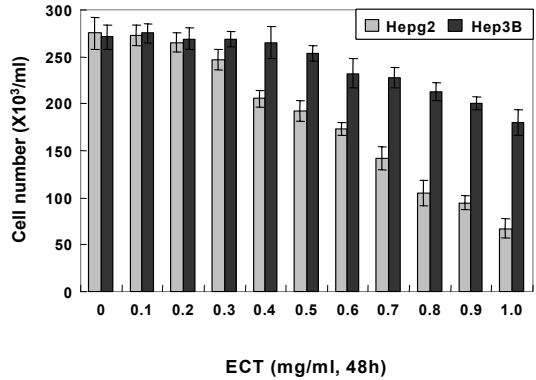


Fig. 1. Effects of extract of *Corydalis yanhusuo* (ECT) on the viability of Hep3B and HepG2 human hepatoma cells. Cells were seeded at 5 X 10⁴/ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of ECT for 48 h. The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

2. 인체 간암세포의 증식에 미치는 ECT의 영향

ECT가 Hep3B 및 HepG2 인체 간암세포의 증식에 미치는 영향에 대해서 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하여 분석하였다. MTT assay는 세포의 생존정도를 간접적으로 측정하는 방법으로 세포내 소기관인 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있으면서 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영하므로 조사 대상에 미치는 특정 물질의 영향을 비교하는데 가장 일반적으로 사용하는 방법이다.

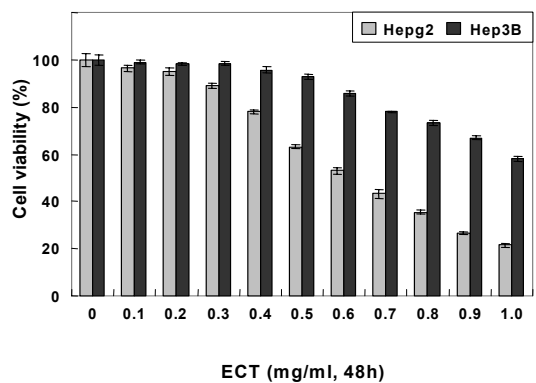


Fig. 2. Growth inhibition of Hep3B and HepG2 human hepatoma cells after treatment with ECT. Cells were seeded at 5 X 10⁴/ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of ECT for 48 h. The growth inhibition was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

3. 인체 간암세포의 형태에 미치는 ECT의 영향

이러한 ECT에 의한 생존율의 감소 및 증식억제에 따른 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 48시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 ECT이 처리된 조건에서 배양된 인체 간암세포의 모양을 관찰하였다.

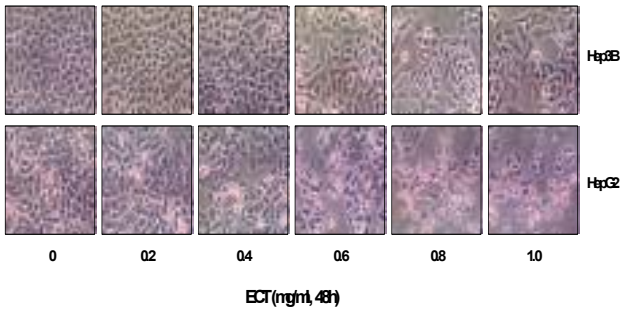


Fig. 3. Morphological changes of Hep3B and HepG2 human hepatoma cells after treatment with ECT. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

4. 세포주기 분포에 미치는 ECT의 영향

ECT의 처리에 따른 생존율의 감소와 증식억제 및 형태적 변형이 세포주기의 분포에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 동일 조건으로 ECT를 처리한 후 PI를 이용하여 세포의 핵을 염색한 다음 DNA flow cytometric analysis를 이용하여 조사하였다.

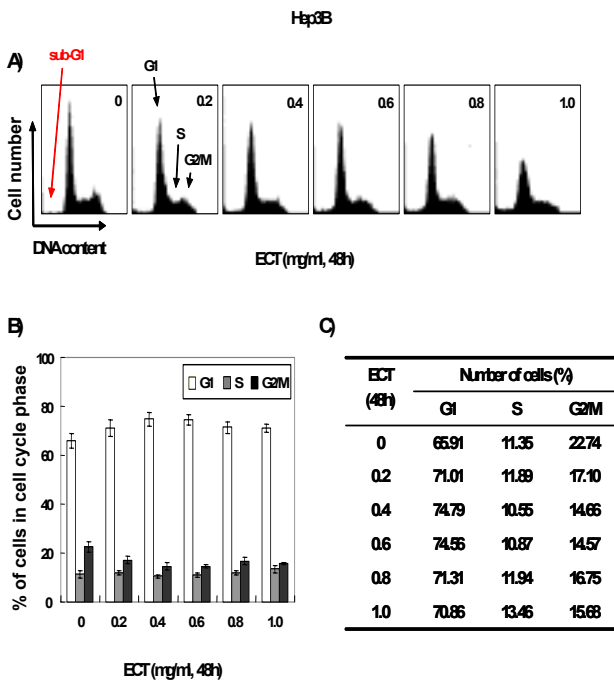


Fig. 4. Effects of ECT treatment on the cell cycle distribution of Hep3B cells. (A) DNA-fluorescence histogram of Hep3B human hepatoma cells nuclei after treatment with ECT. Exponentially growing cells at 50% confluency were for 48 h with indicated concentrations of ECT. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry. (B) The graph demonstrates the percentage of cells in each phase of cell cycle (total cell count is designated as 100%), with white, gray and black parts of each bar representing G1, S and G2/M phases, respectively. The average results from two independent experiments are presented. (C) Fractions of each cell cycle phase of Hep3B human hepatoma cells cultured in the presence or absence of various concentrations of ECT.

5. 세포핵의 형태에 미치는 ECT의 영향

ECT의 처리에 따른 핵의 형태적 변화를 조사하였다. 이를

위하여 정상 및 ECT이 처리된 배지에서 배양된 암세포를 고정시킨 후 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경하에서 관찰한 결과는 Fig. 6에 나타낸 바와 같다.

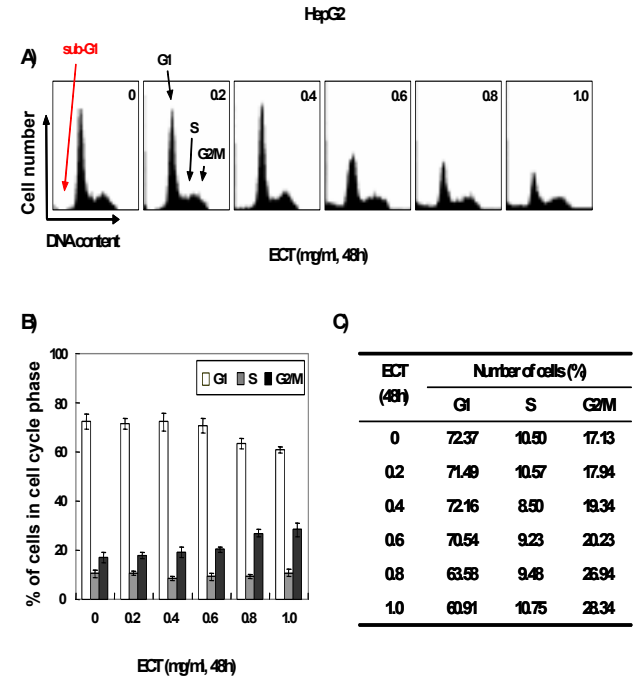


Fig. 5. Effects of ECT treatment on the cell cycle distribution of HepG2 cells. (A) DNA-fluorescence histogram of HepG2 human hepatoma cells nuclei after treatment with ECT. Exponentially growing cells at 50% confluency were for 48 h with indicated concentrations of ECT. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry. (B) The graph demonstrates the percentage of cells in each phase of cell cycle (total cell count is designated as 100%), with white, gray and black parts of each bar representing G1, S and G2/M phases, respectively. The average results from two independent experiments are presented. (C) Fractions of each cell cycle phase of HepG2 human hepatoma cells cultured in the presence or absence of various concentrations of ECT.

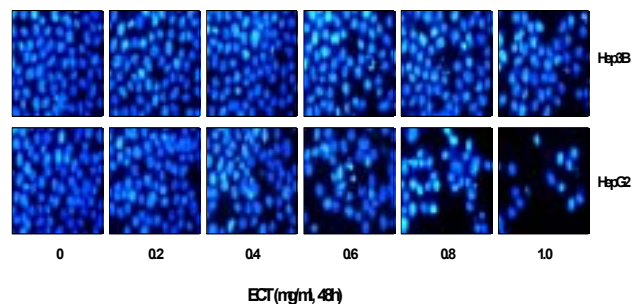


Fig. 6. Formation of apoptotic bodies by ECT treatment in Hep3B and HepG2 human hepatoma cells. Cells were treated with ECT for 48 h and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

6. Apoptosis 유발에 미치는 ECT의 영향

ECT 처리에 따른 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 비교 평가하기 위하여 동일한 조건으로 배양된 세포들을 대상으로 PI 염색액을 이용하여 핵을 염색한 후 DNA flow cytometry 분석을

이용하여 세포주기의 sub-G1기에 해당되는 세포들의 빈도를 조사하였다(Fig. 7A).

또한 정상 및 ECT이 함유된 배지에서 자란 세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사하였는데 결과는 Fig. 7B에 나타난 바와 같다.

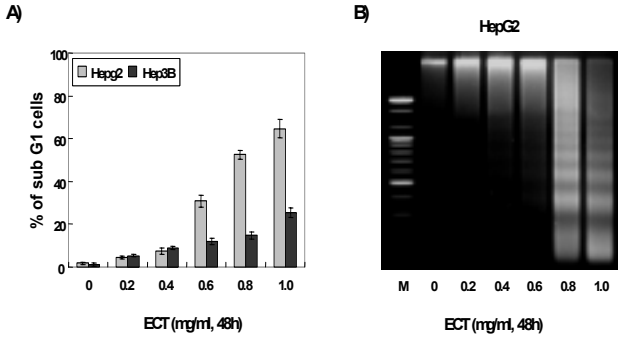


Fig. 7. ECT induced apoptosis in Hep3B and HepG2 human hepatoma cells. (A) Cells were exposed for 48 h with increasing concentration of ECT and then the cells were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. Data are means average of two separate experiments. (B) Cells were incubated with variable concentrations of ECT for 48 h, then collected and DNA was extracted. The DNA fragmentations were separated on 1% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr.

7. Mitochondrial membrane potential에 미치는 ECT의 영향

ECT 처리에 따른 mitochondria의 손상정도를 알아보기 위하여 정상 및 ECT이 함유된 배지에서 배양된 세포들을 모아서 JC-1을 처리하여 염색한 후 DNA flow cytometric analysis를 이용하여 조사하였다(Fig. 8).

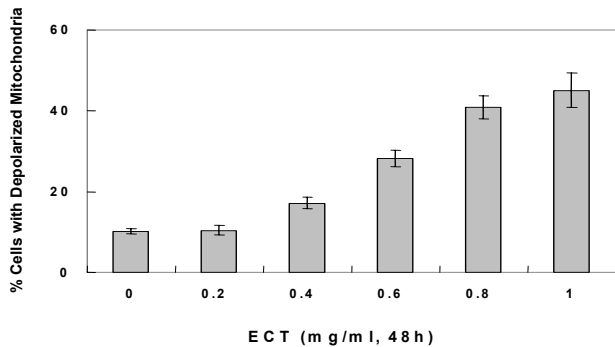


Fig. 8. ECT depolarized mitochondrial membrane potential in HepG2 human hepatoma cells. Cells were exposed for 48 h with increasing concentration of ECT and then the cells were collected and stained with JC-1 for flow cytometry analysis. The graph demonstrates the percentage of cells with depolarized mitochondria. The average results from two independent experiments are presented.

8. p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 ECT의 영향

ECT의 처리에 의한 HepG2 인체 간암세포의 증식억제 현상이 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 전제적인 세포주기

에 중요한 역할을 하는 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 ECT의 영향을 조사하였다(Fig. 9).

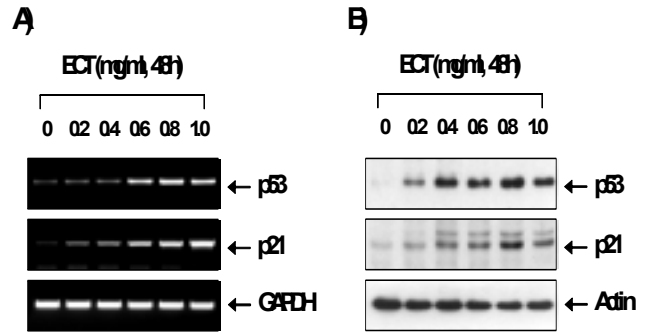


Fig. 9. Effects of ECT on the p53 and p21 in HepG2 human hepatoma cells. (A) After 48 h incubation with ECT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

9. Bcl-2 family의 발현에 미치는 ECT의 영향

HepG2 인체 간암세포에서 ECT에 의한 apoptosis 유발에 이들 유전자가 관련되어 있는지의 여부를 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사한 결과는 Fig. 10에 나타난 바와 같다.

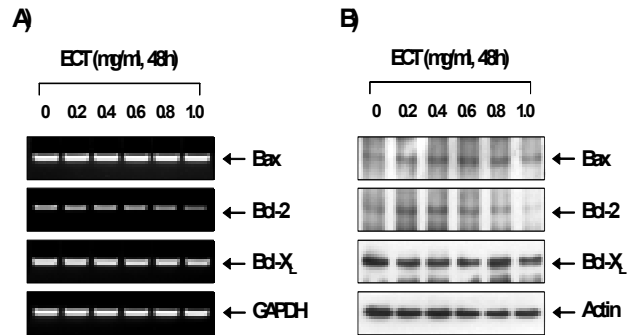


Fig. 10. Effects of ECT treatment on the Bcl-2 family expression in HepG2 human hepatoma cells. (A) After 48 h incubation with ECT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

10. TRAIL, DR4, DR5, Fas 및 FasL 발현에 미치는 ECT의 영향

ECT 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 먼저 death receptor에 속하는 몇 가지 유전자 발현의 정도에 미치는 ECT의 영향을 RT-PCR 및 Western blot analysis 방법으로 조사하였다(Fig. 11).

11. Caspases의 발현 및 활성에 미치는 ECT의 영향

지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발된 대부분의

세포에서 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9이 높은 활성도를 나타내므로 ECT이 이들 caspases의 발현에 미치는 영향을 western bolt analysis를 통하여 조사하였다(Fig. 12, 13).

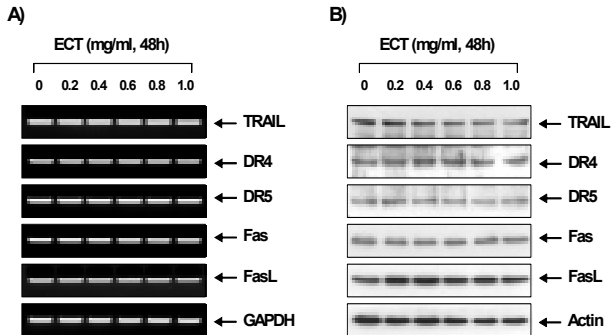


Fig. 11. Effects of ECT treatment on the TRAIL, DR4, DR5, Fas and FasL expression in HepG2 human hepatoma cells. (A) After 48 h incubation with ECT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

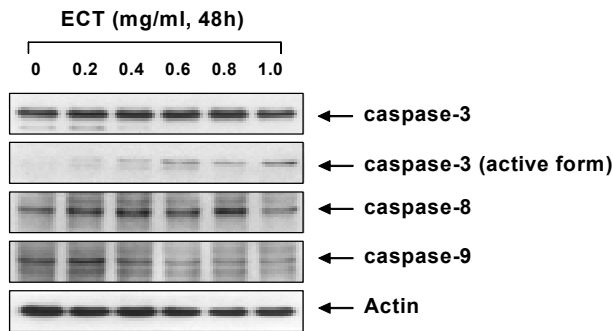


Fig. 12. Effects of ECT in the levels of caspases in HepG2 human hepatoma cells. The cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

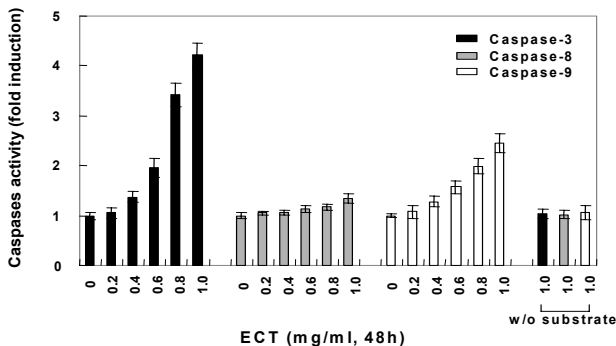


Fig. 13. Activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 by ECT treatment in HepG2 human hepatoma cells. Cells were treated with indicated concentrations of MEHC for 48 h, collected and then lysed. Aliquots (150 μ g proteins) were incubated with DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity, respectively, at 37°C for 3 h. The released fluorescent products were measured. Data represent the mean of two independent experiments.

12. IAP family의 발현에 미치는 ECT의 영향

ECT 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 IAP family가 관여하는지의 여부를 RT-PCR 방법으로 조사하였다(Fig. 14).

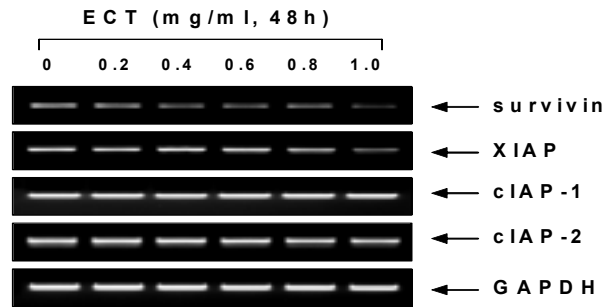


Fig. 14. Effects of ECT on the anti-apoptotic levels of IAP family members in HepG2 human hepatoma cells. (A) After 48 h incubation with ECT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

13. PARP, β -catenin 및 PLC- γ 1의 발현에 미치는 ECT의 영향

ECT에 의한 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질의 발현을 Western blot analysis 방법으로 조사하였다.

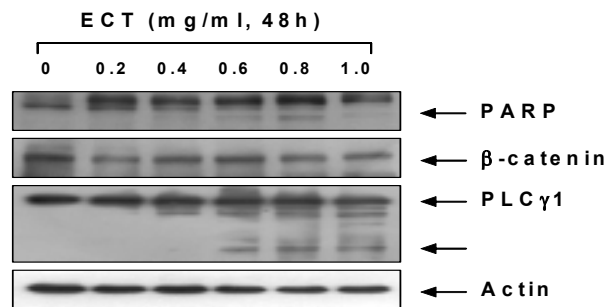


Fig. 15. Effects of ECT in the levels of PARP, β -catenin and PLC γ 1 in HepG2 human hepatoma cells. The cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

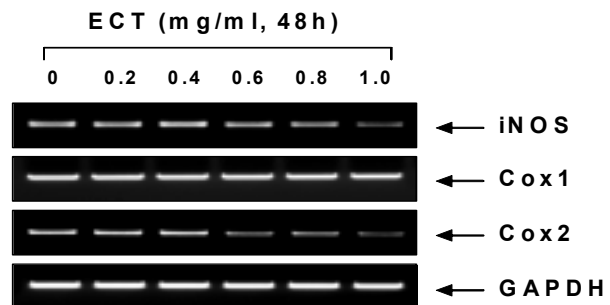


Fig. 16. Effects of ECT treatment on the iNOS, Cox1 and Cox2 expression in HepG2 human hepatoma cells. After 48 h incubation with ECT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control.

14. iNOS 및 COXs의 발현에 미치는 ECT의 영향

따라서 ECT가 처리된 암세포를 대상으로 COXs 및 iNOS의 전사수준에서 발현의 변화 정도를 조사하여 보았다(Fig. 16).

15. Telomerase 관련 조절인자의 발현에 미치는 ECT의 영향

ECT의 처리에 의한 HepG2 인체 간암세포의 증식 억제에 유색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다(Fig. 17).

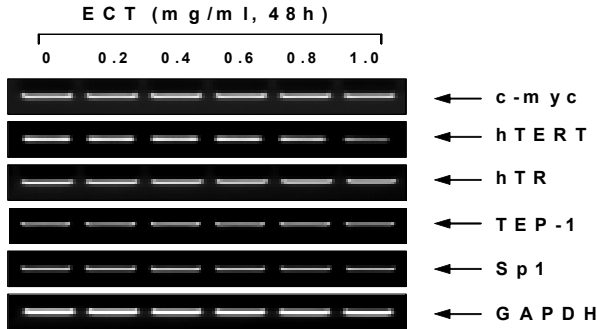


Fig. 17. Effects of ECT treatment on the c-myc, hTERT, hTR, TEP-1 and Sp1 expression in HepG2 human hepatoma cells. After 48 h incubation with ECT, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control.

고찰 및 결론

최근 생명공학의 발달에도 불구하고 아직 암의 발생기전이 명확히 밝혀져 있지 않아서 난치성 질병으로 분류되고 있으며, 사용되는 항암제들은 암의 종류에 따라 약리작용이 다를 뿐만 아니라 독성에 의한 부작용이 문제점으로 지적되고 있다⁵⁾. 따라서 세포의 암화기전과 항암기전을 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며 항암제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위한 치료제의 개발이 시도되고 있다.

본 연구에서는 ECT가 인체 간암세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고 항암작용에 관여하는 기전의 해석을 시도하였다. 현호색은 唐 陳藏器的 《本草拾遺》에서 처음 玄胡索으로 기재된 이후 宋의 <開寶本草>에서 宋의 眞宗을 避諱하여 玄을 延으로 고쳤는데⁶⁾ 중국에서는 이를 따라 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang의 乾造塊莖 만을 표준품으로 정의하고 있다⁹⁾. 그러나 대한약전에서는 들현호색 또는 기타 동속 근연식물이라 하여 *Corydalis ternata* Nakai를 기준으로 하되 *C. yanhusuo*도 표준품으로 인정하고 있다. 본초학적인 性味에 대해서는 대체로 辛溫無毒⁶⁾ 또는 辛苦溫無毒¹⁰⁾하고 肝脾로 歸經한다고 하였다.

현호색의 약리적 효능에 대해서 <本草學>⁷⁾에서는 血中氣滯와 氣中血滯를 행하여 活血理氣의 要藥이 되며 止痛作用은 乳香、沒藥、五靈脂보다 강하고, 醋炒하면 작용이 더 증강된다고 하였다. 진통효과에 대한 최근 연구로는 Yuan⁸⁾이 농도의존성으로 효능이 증가됨을 보인 임상실험이 있어서 이러한 사실을 확

인해 준다.

또한 <本草綱目>과 <日華子本草> 및 <開寶本草> 등에서는 “破癥癖”, “腹中結塊” 등을 언급하고¹¹⁾ 있는데 이것은 玄胡索이 진통효능 뿐만 아니라 종양성 질환에 대해서도 직접적인 치료효능을 가질 개연성을 나타낸 것으로 생각되며 현대 중국의 癌症臨床에서도 여러 처방에 사용되고 있다¹²⁾.

본 실험에서는 인체 간암세포인 Hep3B 및 HepG2 세포를 이용하여 *C. yanhusuo* 추출물에 의한 암세포 성장억제 효과를 조사하였으며, Hep3B 세포보다 큰 증식억제 효과를 보인 HepG2 인체 간암세포에서 apoptosis의 유발에 관여하는 중요한 유전자들의 발현 변화를 조사하였다. 또한 염증발현에 중요한 역할을 하는 cyclooxygenases (COXs)의 발현 및 유색체 말단의 telomere의 조절에 관여하는 유전자들의 발현에 미치는 ECT의 영향을 조사하였다.

인체 간암세포의 생존에 미치는 ECT의 영향에 대해서는 Fig.1의 결과에서 알 수 있듯이 ECT를 48시간 동안 처리한 결과, Hep3B 세포의 경우 저농도 처리군에서는 거의 변화가 나타나지 않다가 고농도 처리군에서 약간의 생존율의 감소가 나타났지만, HepG2 세포의 경우는 처리농도 의존적으로 세포의 생존율이 현격히 감소하였음을 알 수 있었다. 특히 ECT의 처리 농도가 0.8 mg/ml 이상부터는 생존율이 50% 배지에서 배양된 세포보다 약 30% 이하로 줄어들었다. 따라서 ECT가 Hep3B 세포에 비해서 HepG2 세포의 생존율에 많은 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

인체 간암세포의 증식에 미치는 영향에 대해서는 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 Hep3B 세포의 경우는 0.8 mg/ml의 농도에서 약 30%의 증식억제효과가 나타났고 1.0 mg/ml의 농도에서는 약 40% 정도의 증식억제 효과 나타났다. 그러나 HepG2 세포의 경우는 0.8 mg/ml의 농도에서 약 65%의 증식억제효과가 나타났고 1.0 mg/ml의 농도에서는 약 80% 정도의 증식억제 효과가 나타났다. 이상의 결과에서 ECT가 Hep3B 세포에 비해서 HepG2 세포에서 처리농도 의존적으로 암세포의 증식을 강하게 억제한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 hemocytometer count에 의한 결과와 유사한 경향성을 보임을 알 수 있었다.

인체 간암세포의 형태에 미치는 ECT의 영향에 대해서는 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 Hep3B 세포의 경우는 고농도 처리군에서 세포의 형태적 변형이 조금 관찰되었지만 HepG2 세포의 경우는 ECT의 농도 증가에 따라 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 농도가 증가될수록 전체적으로 세포질이 응축되면서 배양접시의 바닥에 낮게 부착되는 듯한 모습을 보였다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였고, 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다. 이는 ECT에 의한 암세포 생존율의 감소 및 증식억제와 부합되는 결과였다.

세포주기 분포에 미치는 ECT의 영향에 대해서는 Fig. 4 및 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 Hep3B 세포의 경우 ECT를 처리하지 않았을 경우 G1, S 및 G2/M기의 분포가 각각 65.91, 11.35 및 22.74% 였지만 1.0 mg/ml 처리군에서는 70.86, 13.46 및

15.68%로 나타나 세포주기에는 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 한편 HepG2 세포의 경우는 ECT를 처리하지 않았을 경우 G1, S 및 G2/M기의 분포가 각각 72.37, 10.50 및 17.13% 였지만 1.0 mg/ml 처리군에서는 60.91, 10.75 및 28.34%로 나타나 G2/M기에서 약간의 세포주기의 억제가 나타나는 것으로 관찰되었지만 생존율 감소 및 증식억제에 큰 영향을 주지는 못하는 것으로 생각된다.

세포핵의 형태에 미치는 ECT의 영향에 대해서는 Fig. 6을 보면 Hep3B 세포의 경우는 처리농도의 증가에 따른 핵의 형태가 크게 변하지 않았지만 HepG2 세포의 경우는 ECT가 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 ECT가 처리된 암세포의 경우, 처리농도가 증가할수록 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 처리농도 의존적으로 증가되었다. 이는 HepG2 세포에서 ECT에 의한 암세포의 생존율 감소와 증식억제 및 형태변화가 apoptosis와 연관이 있음을 알 수 있었다.

Apoptosis 유발에 미치는 ECT의 영향에 대해서는 Fig. 7A에 나타난 결과에서도 알 수 있듯이 Hep3B 세포에 비해서 HepG2 세포에서 ECT의 처리 농도의 증가에 따라 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도가 증가함을 알 수 있었다. 먼저 Hep3B 세포의 경우는 처리농도에 따라 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도가 소폭 증가하여 최고 농도에서는 약 25% 정도가 관찰된 반면 HepG2 세포의 경우는 처리농도 의존적으로 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도가 큰 폭으로 증가하여 최고 농도에서는 약 65%로 나타나 Hep3B 세포에 비해서 sub-G1기의 세포가 약 2.6배 정도 많이 관찰되었다. 이상의 실험에서 사용한 인체 간암세포 중 HepG2 세포가 ECT 처리에 의해 현저한 변화를 나타내었으므로 이하의 실험 과정은 HepG2 인체 간암세포만을 대상으로 하였다.

한편 apoptotic body 형성과 함께 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 Fig. 7B에 보였는데, ECT가 처리된 암세포에서는 apoptosis가 일어난 세포들에서 볼 수 있는 전형적인 DNA laddering을 관찰할 수 있었다. 이는 결국 ECT의 처리에 의하여 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 것이다. 따라서 ECT 처리에 의한 HepG2 인체 간암세포의 생존율 감소 및 증식억제와 같은 현상들이 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

살아있는 세포에서 mitochondrial membrane potential (MMP)의 측정은 lipophilic cationic probe인 JC-1을 이용하였다. Dual-emission fluorescent dye인 JC-1은 mitochondria의 호흡기작에 의해서 흡수되고 집중되어 살아있는 세포에서 MMP의 변화를 나타낸다¹³⁾. JC-1은 green fluorescence인 527 nm의 monomer form과 red fluorescence인 590 nm의 J-aggregate form과 같은 두 가지의 파장을 가진다. Mitochondria의 기능이 정상적일 경우는 MMP는 증가하고 red fluorescence가 우세하게 나타나지만 mitochondria가 손상을 입었을 경우에는 MMP는 감소하고 green fluorescence가 증가하는 것으로 나타난다¹⁴⁾. 즉

mitochondria가 손상을 입었는지에 대한 평가는 red 와 green fluorescent의 정도로 알아볼 수 있다.

이로써 MMP에 미치는 ECT의 영향에 대해서는 Fig. 8에 나타난 바와 같이 ECT를 처리하지 않았을 경우에는 MMP의 변화가 거의 관찰되지 않았으며 green fluorescence의 세포가 약 10%로 나타났지만 처리농도 의존적으로 mitochondria가 손상을 입었을 경우에 나타나는 green fluorescence가 증가하여 0.8 mg/ml의 농도에서는 약 40%로 나타났고 1.0 mg/ml의 농도에서는 약 45%로 관찰되었다. 즉 ECT에 의해서 유도되는 apoptosis에서 MMP에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

Cdk inhibitors는 진핵세포에서 cyclin/Cdk complex와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G2/M기의 진행을 억제하기도 한다¹⁶⁾. p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포주에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화된다고 알려져 있다¹⁷⁾. p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 ECT의 영향에 대해서는 Fig. 9의 결과에서 볼 수 있듯이 종양억제 유전자인 p53과 Cdk inhibitors인 p21 유전자의 발현이 전사 및 번역수준에서 모두 증가하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과를 살펴볼 때 HepG2 세포가 ECT에 의하여 G2/M기에서 약간의 세포주기의 억제가 나타나는 것은 p53에 의해서 활성화된 p21이 어느 정도 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 Cdk inhibitor인 p21은 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서¹⁸⁾ ECT의 처리에 의하여 p21 유전자가 증가되었다는 점은 매우 흥미로운 결과라고 사료된다. 그러나 본 연구의 결과만으로 ECT에 의한 세포주기 교란에 관한 명확한 증거는 제시할 수 없으며, 세포주기 분석과 관련된 유전자들의 kinase 활성화도 검사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다¹⁹⁾. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다¹⁹⁾. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 따라서 Fig. 10에서 알 수 있듯이 Bax 및 Bcl-XL 유전자의 발현은 전사 및 번역수준에서는 거의 변화가 관찰되지 않은 반면, Bcl-2의 발현은 전사 및 번역수준 모두에서 처리 농도 의존적으로 감소되었다. 이상의 결과로 ECT 처리에 의한 apoptosis이 유발에는 최소한 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있으며, Bcl-2의 발현 감소로 인한 apoptosis 유발 관련 효소들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다.

Apoptosis를 유발하는 경로는 크게 mitochondrial pathway

와 death receptor pathway의 두 가지로 구분할 수 있는데, death receptor는 세포사멸의 기능을 갖는 tumor necrosis factor (TNF) 수용체군을 의미한다²⁰. 현재 가장 잘 알려진 다섯 종류 중 하나가 APO-1 또는 CD95라고도 알려진 Fas에 의한 신호전달 체계이다. 그리고 TNF 수용체군에 작용하는 대표적인 리간드 (ligand) 중의 하나가 FasL이다²¹.

FasL은 type II transmembrane protein으로서 tumor necrosis factor receptor super-family인 Fas에 결합하여 immune homeostasis에 중요한 역할을 하고 apoptosis를 유발한다. 한편 Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL 또는 Apo2L)은 10 여 년 전에 최초로 발견되었다²². Tumor necrosis factor (TNF) superfamily에 속하는 TRAIL은 암 세포에 있어서 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다²³.

TRAIL은 모두 다섯 종류의 ligand와 결합을 하는데 정상세포의 경우는 osteoprotegerin, DcR1 (TRAIL-R3) 및 DcR2 (TRAIL-R4)와 같은 세 종류의 decoy receptor와 결합을 함으로서 apoptosis를 일으키지 못하지만 암세포에서는 DR4 (TRAIL-R1) 및 DR5 (TRAIL-R2)와 결합을 하여 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다²⁴. TRAIL이 DR4 및 DR5와 결합을 하면 procaspase-8과 Fas Associated Death Domain (FADD)을 포함하는 Death Inducing Signaling Complex (DISC)을 형성함으로써 apoptosis를 유도한다²⁵. 즉 TRAIL은 정상세포에서는 독성을 가지지 않고 암세포에서만 독성을 가지므로 새로운 항암물질로서의 가능성을 인정받고 있다²⁶.

그런데 Fig. 11의 결과에서 볼 수 있듯이 death receptor에 속하는 여러 유전자들 모두에서 전사 및 번역수준에서의 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 이는 HepG2인체 간암세포에서 ECT를 처리하였을 경우 유발되는 apoptosis에서 death receptor가 관여하지 않는다는 것을 보여주는 결과라고 생각된다.

Caspase protease라는 효소 역시 apoptosis 유발에 중요한 조절인자로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 이들 family에 속하는 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2/Bax family와 같은 apoptosis 유도를 활성화 시키는 신호에 의해 활성화된 protease로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다²⁷. Caspase의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 또 다른 증거가 될 수 있으며 많은 선행연구 등에서 검증되어 왔지만 많은 경우에 apoptosis는 이러한 유전자들의 발현이나 세포주기 비의존적으로도 일어날 수 있다²⁸.

Fig. 12의 결과에서 볼 수 있듯이 ECT의 처리에 의한 caspase-8 단백질 발현의 변화가 없었지만 caspase-3의 경우는 처리 농도 의존적으로 활성화된 단백질의 발현이 증가하였고 caspase-9의 경우는 단백질의 발현은 감소되었으나 뚜렷한 활성화 형태의 단백질 발현 증가를 정확히 관찰하기는 어려웠다. 따라서 in vitro caspase activity assay를 통하여 caspases의 활성화 정도를 직접 분석한 결과, Fig. 13에 나타난 바와 같이 caspase-3 및 caspase-9의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 살펴보면 ECT에 의한 암세포의 apoptosis 유발은

Bcl-2/Bax family의 발현 및 mitochondrial membrane potential의 변화와 연관된 caspase의 활성화와 직접 관련이 있음을 알 수 있었다. 특히 death receptor들의 변화 및 caspase-8의 활성이 나타나지 않았으므로 ECT에 의한 apoptosis는 mitochondrial pathway를 통해 이루어진다고 사료된다.

Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 IAP family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지니는 것으로 알려져 있다²⁹. 그리고 이들 중 어떤 IAPs는 caspases와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있는 것으로 밝혀져³⁰, IAP family들의 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한 IAP family의 발현은 전사 조절인자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B)에 의해 조절 받는 것으로 밝혀져 apoptosis의 신호전달 연구에서의 새로운 영역을 제시하여 주고 있다³⁰. Fig. 14에 나타난 바와 같이 ECT에 의한 apoptosis 유발에 이러한 IAP family의 관여 여부를 조사한 결과, 번역 수준에서 cIAP-1 및 cIAP-2의 발현의 정도는 큰 차이가 없었지만 survivin 및 XIAP의 발현은 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 ECT 처리에 의한 apoptosis이 유발에서 IAP family가 caspases의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다.

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질 중 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 활성화된 caspases에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다³¹. 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다³². 그리고 catenin family에 속하는 단백질(α , β 및 γ)은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다. 특히 β -catenin은 세포 내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다³³. 정상 세포의 경우 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어나는 것으로 알려져 있다³⁴. 또한 최근 연구에 의하면 epidermal growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor-1 및 cytokine 등과 같은 세포 성장을 촉진하는 인자들이 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 보고되어지고 있는데, 이들 성장인자의 수용체들은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), G-protein 및 phospholipase C- γ (PLC- γ) 등과 같은 주요 신호 전달 분자들을 활성화시킬 수 있다. PI3K에 의해 생산되는 phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3)는 protein kinase B (PKB)/Akt 및 PLC- γ 를 활성화시킨다. 특히 PLC- γ 는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 hydrolyze시켜 protein kinase C (PKC) activator인 diacylglycerol 및 세포 내 Ca^{2+} 조절

에 중요한 역할을 하는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)를 생산한다. 따라서 PI3K나 Ras와 같은 세포성장 신호분자와 같이 PLC- η 1 역시 세포의 증식에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁵). 그러나 apoptosis가 유발될 경우 활성화된 caspase 효소에 의하여 PLC- η 1 단백질은 분해될 수 있기 때문에 상기 두 종류의 단백질과 함께 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 되고 있다³⁶).

그런데 Fig. 15에서 나타난 바와 같이 PARP의 경우는 정상 배지에서 배양된 세포들은 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있었고 ECT의 처리 농도 의존적으로 85 kDa의 단편이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. PLC- η 1 단백질의 경우도 ECT의 처리 농도가 증가에 따라 단편화 현상이 관찰되었다. 이는 ECT 처리에 의한 HepG2 세포에서의 apoptosis 유발은 Bcl-2 family의 발현 변화 및 mitochondrial membrane potential의 변화와 그에 따른 caspases의 활성화와 연관된 caspase 기질 단백질의 분해에 의해서 발생한다는 것을 의미하는 결과로서 ECT의 apoptosis 유발 경로가 mitochondria pathway를 통하는 유전자들의 발현에 전반적으로 영향을 미쳤음을 의미하는 것으로 추정된다.

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포 분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다³⁷). Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다³⁸). 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다³⁷). 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관 신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 특이적 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방 전략이 대두되고 있다³⁹). 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨병과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자 발현을 유도하는 nuclear factor kappa B에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다⁴⁰). 이러한 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다.

Fig. 16의 결과에서 볼 수 있듯이 ECT의 처리에 의한 COX-1의 발현에는 아무런 영향이 없었으나, iNOS 및 COX-2의 경우 처리 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 ECT는 HepG2 인체 간암세포에서 mitochondria pathway를 통한 apoptosis 유발 외에도 염증반응의 억제를 통한 암세포의 성장억제에도 관여하는 것으로 생각되어 진다.

Telomere는 염색체의 말단 부위에 repeat sequences

(TTAGGG)로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다⁴¹). 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 hTERT가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행도 이들과 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다⁴¹). 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현증가로 인한 cell cycle arrest 유발로 설명되어지고 있다⁴²). 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사조절인자의 결합부위를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다⁴¹). 그런데 Fig. 17의 결과에서 알 수 있듯이 ECT의 처리에 의하여 hTERT 유전자의 전사수준은 처리 농도 의존적으로 많이 감소되는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과로 ECT가 mitochondria pathway를 통한 apoptosis 및 염증반응의 억제 와 더불어 염색체 말단의 telomere의 길이를 조절함으로써 HepG2 인체 간암세포의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

이상의 연구내용을 종합해 보면 조사된 인체 간암세포들 중 Hep3B 세포보다 HepG2 세포에서 생존율 감소, 증식억제, 핵의 형태변화 및 sub-G1의 발현 정도가 높게 나타났다. 또한 세포주기의 변화를 관찰한 결과 HepG2 세포에서 G2/M기에서의 억제가 조금 관찰되었다. 이는 종양 억제 유전자인 p53의 발현 증가 및 이에 따른 Cdk inhibitor p21의 발현 증가가 원인이라고 생각된다.

다음으로 Hep3B 세포보다 큰 효과를 보인 HepG2 인체 간암세포에서 apoptosis의 유발에 관여하는 중요한 유전인자들의 발현 변화를 조사하여 본 결과에서 death receptor에 속하는 인자들의 발현에는 아무런 변화가 없었지만 apoptosis 억제에 관여하는 중요한 인자인 Bcl-2의 단백질 발현이 ECT 처리에 따라 감소되었음을 확인하였고 mitochondrial membrane potential의 교란이 일어나는 것을 확인하였다.

그리고 caspase-9 및 caspase-3의 활성화와 IAP family 인자들의 발현 저하가 유도되었으며, 활성화된 caspase 효소에 의하여 분해되는 것으로 알려진 PARP 및 PLC- η 1 단백질의 분해가 유발되었다. 또한 염증반응 및 telomere의 길이의 조절에 관여하는 유전자들의 발현에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이로써 玄胡索이 <本草綱目>과 <日華子本草> 등에 기록된 “破癥癖하는 효능은 Hep3B와 HepG2를 이용한 항종양실험에서 유의한 in vitro 수준의 효과를 확인할 수 있었다. 즉 醫書에 기술된 活血理氣止痛하는 약리작용은 통증을 유발하는 신경전달물질에 관련된 뿐만 아니라 종양성 통증과도 유관함을 알 수 있다. 따라서 氣滯血瘀로 인한 단순한 염증성 통증을 목적으로 하는 것이 아니라 더라도 癌에 기인된 痛症 혹은 일반적인 癌症에 대해서도 다른 항암효능을 가진 처방이나 本草 약물을 배합하여 유용하게 사용

될 수 있을 것으로 추정된다.

또한 인체 간암세포의 증식억제 결과는 종양세포 사멸작용에서도 일치하여 임상에서 암성 통증에 사용하는 근거로 인정될 수 있었으며 韓醫 臨床에서도 독립적 혹은 보조적으로 유의하게 사용될 수 있을 것이다. 향후 현호색의 항암작용에 대한 추가적인 연구가 진행된다면, 본 연구결과는 현호색의 보다 구체적인 암세포 증식억제 기전을 밝히는 데에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254: 439-459, 1998.
- Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M. and Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol. Biol Res.* 40: 603-612, 1994.
- 윤시진, 김연섭. 현호색 홍화 적작약이 관절염 흰쥐의 염증과 간에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 19(2):475-480, 2005.
- Lee, K.H., Huh, J.W., Choi, M.M., Yoon, S.Y., Yang, S.J., Hong, H.N., Cho, S.W. Regulation of glutamate level in rat brain through activation of glutamate dehydrogenase by *Corydalis ternata*. *Exp Mol Med.* 37(4):371-377, 2005.
- Chung, Y.T., Park, S.T., Mun, J.Y., Kim, J.M., Choi, M.K., Han, D.S. and Kim, B. Cytotoxic effects of actinomycin D, adriamycin and puromycin in the development stage of early mouse embryos. *J. Wonkwang Medical Sci.* 3: 13-34, 1987.
- 李時珍. 本草綱目. 고문사, 서울, p 467, 1973.
- 전국한의대본초학교수 공편. 本草學. 영림사, 서울, pp 413-414, 1998.
- Yuan, C.S., Mehendale, S.R., Wang, C.Z., Aung, H.H., Jiang, T., Guan, X., Shoyama, Y. Effects of *Corydalis yanhusuo* and *Angelica dahuricae* on cold pressor-induced pain in humans: a controlled trial. *J Clin Pharmacol.* 4(11):1323-1327, 2004.
- 國家藥典委員會編. 中華人民共和國藥典. 化學工業出版社, 北京, p 108, 2000.
- 식품의약품안전청 홈페이지, http://herbmed.kfda.go.kr/herb/search_details.jsp?code=KP-056.
- 江蘇新醫學院編, 中藥大辭典上. 上海科技出版社, 上海, p 921, 1978.
- 홍성범. 임상항암중초약. 정보사, 서울, pp 236-238, 265, 1998.
- Cossarizza, A., Cooper, E.L., Quaglino, D., Salvioli, S., Kalachnikova, G. and Franceschi, C. Mitochondrial mass and membrane potential in coelomocytes from the earthworm *Eisenia foetida*: studies with fluorescent probes in single intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 503-510, 1995.
- Guo, W.X., Pye, Q.N., Williamson, K.S., Stewart, C.A., Hensley, K.L., Kotake, Y., Floyd, R.A. and Broyles, R.H. Mitochondrial dysfunction in choline deficiency-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 641-665, 2005.
- Elledge, S.J. and Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 847-852, 1994.
- Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A. and Xiong, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*, 9: 2261-2268, 1994.
- Datto, M.B., Yu, Y. and Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* 270: 28623-28628, 1995.
- Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374: 131-134, 1995.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391: 496-499, 1998.
- Sheikh, M.S. and Huang, Y. Death receptors as targets of cancer therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets*, 4: 97-104, 2004.
- Klas, C., Debatin, K.M., Jonker, R.R. and Kramer, P.H. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int. Immunol.* 5: 625-630, 1993.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith T.D., Rauch, C., Smith, C.A., et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3: 673-682, 1995.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z. and Schwall, R.H. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104: 155-162, 1999.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-1308, 1998.
- Tibbetts, M.D., Zheng, L. and Lenardo, M.J. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat. Immunol.* 4: 404-409, 2003.
- Fulda, S. and Debatin, K.M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochem. Biophys. Acta.* 1705: 27-41, 2004.
- Allen, R.T., Cluck, M.W. and Agrawal, D.K. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 427-445, 1998.

28. Vegran, F., Boidot, R., Oudin, C., Riedinger, J.M. and Lizard-Nacol, S. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull Cancer*, 92: 219-226, 2005.
29. Holcik, M., Gibson, H. and Korneluk, R.G. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*. 6: 253-261, 2001.
30. Cheng, J.Q., Jiang, X., Fraser, M., Li, M., Dan, H.C., Sun, M. and Tsang, B.K. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug Resist*. 5: 131-146, 2002.
31. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 81: 801-809, 1995.
32. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 53: 3976-3985, 1993.
33. Johnson, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 18: 345-357, 1999.
34. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of beta-catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int, J, Biochem, Cell Biol*. 31: 519-529, 1999.
35. Chang, J.S., Noh, D.Y., Park, I.A., Kim, M.J., Song, H., Ryu, S.H. and Suh, P.G. Overexpression of phospholipase C-gamma1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res*. 57: 5465-5468, 1997.
36. Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T. and Smeland, E.B. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp, Hematol*. 30: 990-1000, 2002.
37. Giercksky, K.E. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. 15: 821-833, 2001.
38. Vainio, H. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer*. 94: 613-614, 2001.
39. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S. and Hori, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest*. 79: 1469-1477, 1999.
40. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K. and Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res*. 480: 243-268, 2001.
41. Poole, J.C., Andrews, L.G. and Tollefsbol, T.O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. 269: 1-12, 2001.
42. Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G. and Benchimol, S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J*. 16: 6018-6033, 1997.