

龍葵 추출물이 백혈병 세포의 Apoptosis 유도에 미치는 영향

장규태

경희대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Induction of Mitochondria-mediated Apoptosis by Solanum Nigrum in Leukemia Cells

Chang Gyu Tae

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Objectives

In human myeloid leukemia cells, there are no specific features of apoptosis compared with apoptosis in other cell types. *Solanum nigrum* L.(SNL) is a deciduous tree, which is widely distributed in Korea with reported anti-tumor, anti-inflammatory and non-specific immune-enhancing properties. Although the plant has been clinically used for treating a variety of diseases, its bioactive ingredients are unknown and its mode of action potential has never been investigated. Thus anti-tumor property of methanol extract was investigated.

Methods

In this study, anti-tumor property of methanol extract was investigated by determining its *in vitro* growth-inhibitory effects on human myeloid leukemia cells. XTT proliferation assay, DNA fragmentation, immunoblot analysis, densitometric analysis were used.

Results

1. The methanol fraction of the extracts of SNL induced mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia cells.
2. The methanol fraction exhibited relatively higher cytotoxic activity in a dose-dependent manner than chloroform, and hexane fraction.
3. Typical ladder profile of Oligonucleosomal fragments were appeared.
4. The secreted cytosolic cytochrome C level was increased by treatment of methanol fraction.

Conclusions

Methanol fraction of SNL is capable of inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells.

Key words : *Solanum nigrum* L., Mitochondria-mediated apoptosis, human myeloid leukemia cells

■접 수 : 2008년 3월 28일, 채택: 2008년 4월 15일.

■교신저자 : 장규태, 서울시 강동구 상일동 149 경희대 동서신의학병원 한방소아청소년클리닉
(Tel : 02-440-6231, Fax : 02-440-6296, E-mail : gtchang@hanafos.com)

I. 緒 論

Apoptosis는 다양한 다른 자극에 의해서 유발되며 두 가지 주요한 세포내에서 신호표시의 통로가 확인되었는데, 수용체 통로와 mitochondria 통로이다. 수용체 통로는 Fas/CD95, TNF-receptor와 같은 혈장 막의 수용체와 결합하는 리간드를 통해 활성화 되고¹⁾, mitochondria 통로는 넓은 범위의 자극인 저산소증, reactive oxygen species, UV orgamma radiation, grow factor deprivation, cytotoxic compounds에 의해 활성화가 시작되며 Bcl-2족 단백질은 mitochondria 통로를 조절하는 결정적인 역할을 한다. Mitochondria가 apoptosis 과정의 결정적인 조절자라는 것 때문에 mitochondria를 표적으로 삼는 약물의 개발은 백혈병 세포의 apoptosis를 유도하는 새로운 전략을 제공할 수 있다²⁾.

소아 백혈병은 소아기 악성 종양 중 가장 흔하여 15세 이하에서 새로 진단되는 악성 종양의 1/3을 차지한다. 그 중 급성 골수성 백혈병(Acute myelogenous leukemia, AML)은 전체 소아 백혈병의 15-20%로 신생아 또는 선천성 백혈병의 대부분을 차지한다³⁾. AML은 비성숙 골수 세포의 이상 증식으로 골수나 장기 및 말초혈액에 백혈병 세포가 나타나 이로 인한 조혈기능 장애와 백혈병 세포의 조직 침윤을 특징으로 하는 조혈조직의 악성 종양이다⁴⁾. 화학요법이 일반적인 치료로 관해 유도요법과 관해 후 치료로 크게 구분되며³⁾, 관해가 유도되면 재발을 막기 위해 다시 화학요법을 시행하거나 골수이식을 시도한다. 그러나 궁극적으로 상당수의 환자는 재발하여 사망하게 되며 이러한 불량한 예후를 개선하기 위해 다양한 종류의 새로운 백혈병 치료제의 개발이 필요한 상태이다.

龍葵는 茄子科 가지 까마중의 地上部로서 苦葵, 天茄子, 天泡子, 黑茄子 등으로도 불리고⁵⁾ 性味는 微苦 鹹無毒하고 肺, 膀胱經에 入하여 清熱解毒, 利水散結하는 效能이 있어 각종 癌腫, 癌性 胸腹水, 水腫 및 小便不利를 治療하고⁶⁾ 항염증 작용과 더불어 항체형성을 촉진시키며, 血糖値를 下降시키고, 鎮咳祛痰 작용이 있으며 임상에서 만성기관지염, 瘧疾 및 消化器系 癌에 사용하여 좋은 효과를 보았다는 보고가 있으며⁷⁾ 실험적 연구로 항암활성과 항전이 작용에 관한 연구⁸⁾, 면역조절 작용에 관한 연구⁹⁾ 등이 존재한다. 최근 항종양작용을 가지는 한약에 대한 실험 및 임상연구가 진행되고 있으며 유효한 결과가 보고되고 있으나 세포 생물학적 연구에서 보고된 apoptosis의 기전¹⁰⁾에 따른 작용연구가 부족한 실정이다. 이에 저자는 임상적으로 抗癌藥物로 알려진 龍葵를 이용하여 백혈병 세포에 진행되는 apoptosis에 미치는 효과를 평가하고 그 유도기전을 확인해 본 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 藥材 및 方法

1. 藥材의 구입 및 분획

龍葵는 茄子科에 속한 1년생 본초인 가지 까마중(*Solanum nigrum* L.)의 地上部로 태원당약업사(대구)에서 구입하였다. 추출물은 분쇄기로 잘게 썬 후 5시간 동안 70°C에서 메탄올로 3회 추출되었고, 추출물은 10 μ m 여과기를 통하여 여과시킨 다음 감압 하에서 동결 건조하였다. 메탄올 추출물(10g)은 500ml의 메탄올에서 현탁되었고 500ml 클로로포름으로 추출하였다. 클로로포름 분획은 제거되고 남겨진

메탄올 분획 상층부는 핵산 500ml에 의해 재추출하였다. 최종적으로 남은 메탄올 분획은 회전 증발기를 사용하여 감압상태에서 농축한 다음 동결 건조하였다. 생물학적 정량 테스트를 위하여 표본은 메탄올에서 용해시킨 다음 배양기에서 희석하였다.

2. 세포 배양 및 처리

백혈병 세포주는 the American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입하였다. 세포는 phosphate-buffered saline(PBS)로 씻어내고 1시간 동안 혈청이 없는 배양기에서 배양되었다. 龍葵 추출물의 메탄올 분획은 3개씩 다양한 용량으로 첨가되어 배양되었고 24시간 뒤 세포를 다시 정제하여 분석하였다.

3. XTT proliferation assay

백혈병 세포주에 대한 龍葵의 메탄올 추출물의 효과를 보기 위하여 proliferation kit(XTT II, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하여 세포 증식을 관찰하였다. 세포는 DMEM 배지가 들어있는 배양기마다 10,000 세포 밀도인 96-well 배양용기에서 배양하여 2시간 동안 보온하였다. 추출물의 메탄올 분획은 triplicates에서 다양한 최종 농도로(대조군은 0 μ g/ml) 희석하였다. 24시간 동안의 배양 후 XTT 반응 용액(sodium 3'-[1-(phenyl-aminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate and N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate; mixed in proportion 50:1) 50 μ l를 각 well에 첨가하였다. XTT가 존재하는 용기를 incubator (37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂-air의 조건) 안에서 4시간 동안 배양한 후 ELISA plate reader에서 490nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 모든 정량분석은 동일한 실험을 최소 3회 이상 실시하였다.

4. DNA fragmentation

24시간 동안 龍葵 추출물의 메탄올 분획으로 처리한 후 백혈병 세포들을 모아서 5분 동안 2,000 \times g로 원심 분리하고 얼음으로 차갑게 한 PBS로 세척하였다. 이러한 단계의 모든 과정은 얼음 위에서 실시되었다. 세포 pellets는 500 μ l의 lysis buffer(50mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.0), 1% NP-40, and 20 μ l of 10% SDS)로 조심스럽게 재현탁되었고 30분 동안 65 $^{\circ}$ C에서 배양되었다. 그 후 100 μ l의 8M potassium acetate를 현탁된 혼합물에 첨가하였고 1시간 동안 ice bath에서 배양하였다. 이 용해물은 10,000 \times g로 10분 동안 원심 분리되었고, 上清液은 새로운 eppendorf tube로 옮겨졌다. 마지막으로 DNA는 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1 (v/v/v))로 추출하였으며 DNA fragmentation assay를 시행하기 위해서 20 μ l의 TE buffer(10mM Tris-HCl and 1mM EDTA, pH 8.0)에서 이를 용해한 후 1 μ l의 RNase A(10 μ g/ml)와 1 μ l의 proteinase K(100 μ g/ml)를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. DNA는 5 μ l/ml ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 분리하여 분석하였고 UV condition에서 촬영하였다.

5. Western blotting analysis

Anti-cytochrome c (Pharmingen, San Diego, CA) 항체는 쥐의 단일 클론성 면역혈청이다. Western blotting analysis는 세포 용해 산물을 준비하여 전기영동으로 단백질을 분리한 후 항체로 반응시켜 immunoblotting하였다. Band 대역은 ECL Western Blotting Detection Reagent(Amersham Bioscience, USA)로 시각화하여 X-ray film으로 촬영하였다.

6. 밀도 측정과 통계처리

Western blotting 연구를 통해 얻어진 Band의 농도는 Gel-print System(Core Bio Corp., Seoul, KOREA)으로 측정되었다. 모든 측정결과는 Mean±SE로 표시하였고 통계처리는 student's t-test 법으로 대조군과 비교하여 사용하였으며 p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 研究結果

1. 龍葵의 추출과 분류

龍葵는 메탄올을 사용하여 전술한 설명한 재료와 방법에 따라 추출하였다. 메탄올 추출물의 수율은 약 3.05%였다. 메탄올 추출물(50g)은 chloroform(CHCl₃, yield: 15g)과 hexane (yield: 8.5g)으로 재추출되었다. 마지막으로 hexane 추출물은 ethylacetate(yield: 5.5g)로 더 추출되었다. 모든 분획은 DMSO로 용해하여 사용하였다.

2. 백혈병 세포에 대한 각 분획의 세포독성측정

다양한 농도의 메탄올 분획이 세포에 미치는 영향은 다음의 백혈병 세포들을 가지고 표준화된 시험관 세포 독성 검사로 평가하였다. 추출물의 농도를 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100, 200 μg/ml로 하여 96-well microplates (200 μl/well)에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 살아남은 세포의 수는 microtiter plate reader에서 색도 XTT 검사를 사용하여 정량 분석하였다. chloroform, ethylacetate, hexane 분획도 같은 조건에서 50 μl/ml의 농도로 실험하였다. 각각의 분획이 백혈병 세포에 미치는 세포 독성 영향은 Fig. 2와 같다. 메탄올 분획

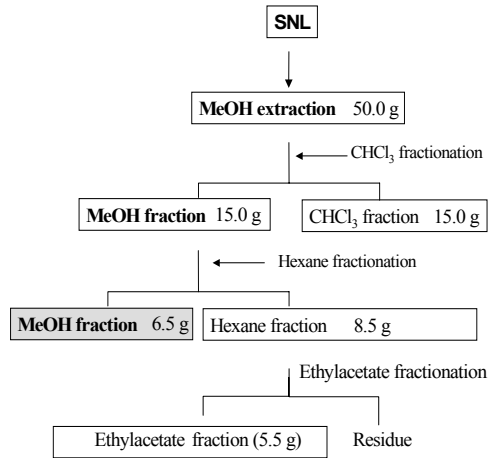


Fig. 1. Schematic extraction of *Solanum nigrum* L.

은 용량 의존적 방식으로 비교적 높은 세포독성 (IC₅₀=57.3 μg/ml)을 나타내었다(Fig. 2A). 물 추출물 또한 용량 의존적 방식으로 비교적 높은 세포독성(IC₅₀=68 μg/ml)을 나타내었다(data not shown). 클로로포름, 헥산, 에틸아세테이트 분획도 동일한 조건에서 50 μg/ml의 농도로 조정하여 실험하였다. 백혈병 세포에 대한 메탄올과 다른 각각의 분획의 세포독성 효과는 메탄올 분획과 물 추출액을 제외하고 50 μg/ml의 동일한 농도에서는 약한 세포독성 효과를 나타내었다. 클로로포름과 헥산 분획은 메탄올 분획과 비교해서 약한 세포독성을 나타내었다(Fig. 2B).

3. 龍葵의 메탄올 분획에 의해 유도된 DNA fragmentation과 mitochondria에서 유리된 cytochrome C

Apoptosis의 특징인 DNA fragmentation과 cytochrome C의 유리에 대한 龍葵의 메탄올 분획 효과를 측정하기 위해서 세포들을 FBS 없이 DMEM 배양기에 24시간 동안 50 μg/ml의 메탄올 분획으로 처리하였다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 메탄올 분획이 처리된 세포들에서 200에서

1400 bp에 이르는 oligonucleosomal 단편의 세포고사의 특징인 ladder profile을 나타낸 반면에 대조군에서는 DNA fragmentation이 나타나지 않았다.

龍葵의 메탄올 분획이 mitochondria에서 세포질 내로 cytochrome C를 유리를 유도하여 세포고사를 활성화시키는지 조사하기 위해 인간 골수

성 백혈병 세포를 龍葵의 메탄올 분획으로 처리하였고 위에서 기술한 것처럼 cytochrome C의 유리에 대한 효과측정은 immunoblotting 방법으로 분석하였다. 오염되지 않은 mitochondria를 포함한 세포질 분획을 분리해내고 cytochrome C의 검출을 분석하였다. 분비된 세포질 cytochrome C 수준은 龍葵의 메탄올 분획 처리에 의해 증가되어 나타났으며 이는 cytochrome C가 mitochondria

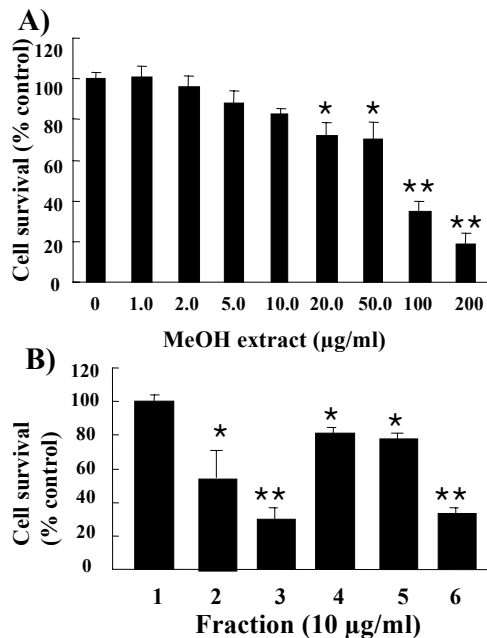


Fig. 2. Effects of methanol extract, fraction and further fractions of *Solanum nigrum* L. on human myeloid leukemia cell growth.

A; The cytotoxic effects of the methanol fraction at various concentrations were determined using XTT assay kit.

B; Cell viability in the control (1) and presence of the water extract (2) methanol fraction (3) or chloroform fraction (4) hexane fraction (5) and ethylacetate fraction (6) are measured as described in the Material and Methods section. Data levels are calculated by percentage of control and expressed as mean \pm SE.

(* , $p < 0.05$, ** , $p < 0.01$ vs. control)

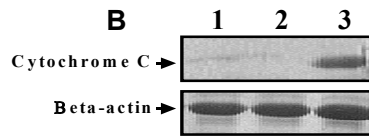
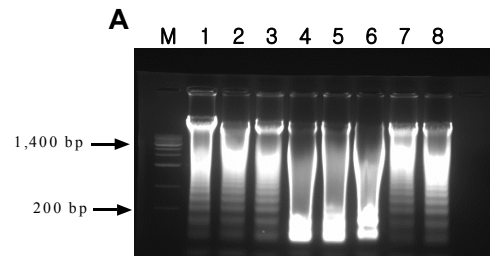


Fig. 3. Effects of methanol fraction of *Solanum nigrum* L. on the DNA fragmentation and cytochrome C release from mitochondria of human myeloid leukemia cells.

To evaluate of effects of methanol fraction of *Solanum nigrum* L. on the DNA fragmentation(A) and cytochrome C release(B), cells were treated with 50µg/ml methanol fraction for 24 hr. as described in the Material and Methods, its effects on the release of cytochrome C were analyzed by immunoblotting. As a control for protein amount, Beta- actin was measured.

A) lane 1, 10µg/ml; lane 2, 20µg/ml; lane 3, 50µg/ml; lane 4, 100µg/ml; lane 5, 150µg/ml; lane 6, 200µg/ml; lane 7, 20µg/ml; lane 8, 50µg/ml methanol fraction.

B) lane 1, 0µg/ml; lane 2, 1µg/ml; lane 3, 50µg/ml

에서 세포질로 유리되었다는 것을 나타낸다(Fig. 3B).

IV. 考 察

프로그램된 세포의 죽음인 apoptosis는 정상 발달의 한 부분으로써 세포수를 조절하는 중요한 조절기전이다¹¹⁾. 그리고 암의 발생은 apoptosis의 조절이 잘 되지 않는 것과 밀접한 연관이 있는 병적인 상태로 생각되어져 왔으며¹²⁾ apoptosis의 신호전달과정을 목표로 한 연구가 암 치료에서 초점이 되어왔다.

Apoptosis는 세포질 응축, apoptotic 몸체형성, loss of cell membrane phospholipid asymmetry, internucleosomal fragmentation of genomic DNA 등과 같은 특정한 형태와 생화학적인 형태에 의해 다른 형태와 구별되어 진다¹³⁾.

염색질 응집과 세포 수축에 의해 형태학적으로 특성화된 apoptosis는 다양한 신호 체계의 교체에 의해 유도되어지고 항상성을 유지하기 위한 세포수의 조절을 위해 복잡하게 조절되어지는 과정이다¹⁴⁾. 그러나 대부분의 세포 라인에서 mitochondria 경로에 의해 죽음 신호의 확대에 apoptosis가 일어난다. mitochondria는 세포질로 apoptosis를 일으키는 단백질을 배출함으로써 포유류 세포의 apoptosis에서 중추적 역할을 한다¹⁵⁾. 한편 apoptosis의 진행은 조직된 신호체계에 의해 조절되어지는데 dATP의 존재 하에서 cytochrome c는 세포 단백질의 결합을 유도한다. Apaf-1 oligomerizes, pro-caspase-9, caspases 등의 단백질 분해 효소가 자극되어 활성화되면 caspase-9는 caspase-3와 같은 작동체인 caspases를 분할한 후 활성화를 진행시켜 다양한 세포 단백질을 분해하고

apoptosis를 일으킨다¹⁶⁾.

백혈병 세포에서는 다른 세포 형태에서의 apoptosis와 비교하여 특정한 형태가 없는 것이 특징이다¹⁷⁾. 또한 천연 추출물의 세포독성 활성은 아직까지 검증되지 않은 상태이며 그에 따른 기전에 대한 연구도 부족한 실정이다.

龍葵는 동북아시아가 원산지이며 茄子科(Solanaceae)에 속한 일년생 가지 까마중(*Solanum nigrum* L.)의 全草로 苦葵, 天茄子, 天泡子, 黑茄子 등으로도 불리며, 性味는 苦寒無毒하며 肝, 膽, 肺, 膀胱經으로 入하여 清熱解毒, 利水通淋, 祛濕止痒하여 咽喉腫痛, 癰腫疔毒, 濕熱로 인한 小便不利, 熱淋, 水腫, 濕疹, 皮膚瘙癢 등의 증상을 다스리며 근래에 와서는 각종 癌腫에 응용되고 있다⁶⁾.

龍葵는 산화매개 분해 억제효과¹⁸⁾, 직장암, 전립선암, 유방암 세포주에 대한 항암효과¹⁹⁾, 만성기관지염, 유선염 및 여성암에 대한 효과⁵⁾가 밝혀졌으며, 면역증강 및 항 알레르기 효과⁹⁾, Vero 세포의 gentamicin 유도 독성에 대한 세포 보호 작용²⁰⁾, 유방암, 난소암, 피부암 등에서 세포독성과 종양증식 억제효과, 폐암 전이 억제효과⁸⁾, 자궁경부암세포의 증식억제와 세포고사 유도효과²¹⁾가 밝혀졌다. 이외 열매도 CCl₄ 유도 간 손상에 대한 세포 보호 작용²²⁾, Sarcoma 180으로 암을 유발시킨 마우스 및 백혈병계 암세포주 L1210세포에 대한 항암효과²³⁾, MCF-7 유방암세포 증식 억제²⁴⁾, HCT-116 대장암 세포고사 유도효과²⁵⁾, U14 자궁경부암에 항암 작용과²⁶⁾ HepG2 간암 세포고사 유도 작용²⁷⁾등에 대한 연구 결과가 있다.

본 실험에서는 龍葵의 인간 백혈병 세포주에 대한 작용과 그 기전을 XTT 증식 분석, DNA fragmentation 조사 및 immunoblotting 방법으로 cytochrome C의 유리 변화를 통해서 龍葵가 백혈병 세포주에 대해 apoptosis 작용을 함에 있어

mitochondria 경로를 매개한다는 것에 대한 실험적 연구를 진행하였다. 먼저 龍葵를 물, 메탄올로 추출하였으며 메탄올 추출방법은 Fig. 1에 나타내었다. 메탄올 분획을 세분화하여 클로로포름, 핵산, 에틸아세테이트로 각각 분획하여 대조군과 함께 XTT 증식 분석을 통해서 세포독성 효과를 비교해보았다. 결과는 Fig. 2에서와 같이 다양한 농도의 龍葵 메탄올 추출물 처리에 의해 용량 의존적으로 세포독성 효과를 나타냈으며, 여러 분획 중 메탄올 분획의 세포독성 효과가 가장 뚜렷이 나타났다.

또한 메탄올 분획에 의한 세포독성 효과의 기전이 apoptosis에 의한 것임을 확인하고자 DNA fragmentation이 Fig. 3에서처럼 ladder profile의 특징적인 형태가 나타나 apoptosis가 일어난다는 것을 알 수 있었다. 이러한 apoptosis가 알려진 어떤 경로로 일어나는지 알아보기 위해 immunoblotting 방법으로 cytochrome C의 유리를 조사하였다. 만약 mitochondria 경로가 관여한다면 위에서 설명한 것과 같이 mitochondria 내의 cytochrome C가 세포질로 유리되어 증가하게 될 것이다. 결과는 Fig. 3에서와 같이 龍葵 메탄올 추출물을 처리에 대해서 cytochrome C가 유리되었다. 즉 龍葵의 메탄올 추출물 처리에 의해 백혈병 세포주의 apoptosis가 일어나며 이는 mitochondria를 통해 일어난다는 것을 알 수 있다.

이상의 결과를 보면 감소된 세포 생존능력, DNA fragmentation의 발현양상에 있어서의 변화, cytochrome C의 유리는 모두 龍葵의 백혈병 세포주 apoptosis 유도가 가능하다는 것을 나타낸다. 이는 실제 전임상적으로 가치가 있는 연구결과로 사료되며 향후 이를 활용하는 천연항암제 개발 등 임상적 적용을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

龍葵의 메탄올 추출물의 투여로 인간 골수 단핵구성 백혈병 세포에 대한 세포독성 및 Apoptosis에 미치는 영향과 그 기전을 알아보기 위해 세포의 형태 및 유리된 cytochrome C의 양을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 龍葵 메탄올 추출물은 U937 세포에서 mitochondria가 매개된 세포고사를 유도하였다.
2. 龍葵 메탄올 추출물은 용량 의존적으로 세포독성을 나타내었다.
3. 클로로포름 및 핵산 분획 보다는 메탄올 분획이 비교적 높은 세포 독성을 나타내었다.
4. Apoptosis의 특징인 사다리형 DNA fragmentation 결과를 나타내었다.
5. 龍葵 메탄올 분획에 의해 cytochrome C 유리량이 증가되었다.

VI. 감사의 글

“이 연구는 2006년도 경희대학교 연구비지원에 의한 결과임.”(KHU-20060471)

參考文獻

1. Antonsson B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. Mol. Cell. Biochem. 2004;256-257(1-2):141-55.
2. Cheung JY, Onq RC, Suen YK, Ooi V,

- Wong HN, Mak TC, Fung KP, Yu B, Kong SK. Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells. *Cancer Lett.* 2005;217(2):203-11.
3. 안효섭편. 소아과학 제8판. 서울:(주)대한교과서. 2004:889-94
 4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med.* 1985;103(4):626.
 5. 洪性範. 臨床抗癌中草藥. 서울:成輔社. 1990:108-10.
 6. 辛民敎. 臨床本草學. 서울:永林社. 1986: 576-7.
 7. 안덕균. 中藥大辭典. 서울:도서출판정담. 1998:4101-5.
 8. 김미정, 이정은, 정진홍, 유동렬. 龍葵의 抗腫瘍 效果에 對한 實驗的 研究. 大韓 韓方婦人科學會誌. 2003;16(2):98-111.
 9. 서부일, 김선희, 박순달, 이극로. 白朮, 黃芪, 龍葵의 免疫調節作用 및 알레르기 低減化에 關한 研究. 大韓方劑學會誌. 1997;5(1):184-202.
 10. Martinou JC and Green RD. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev.* 2001; 2(1):63-7.
 11. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(3): 178-94.
 12. Chan SL, Yu VC. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(3):119-28.
 13. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184(1):39-51.
 14. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88(3):355-65.
 15. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box open. *Nature Rev.* 2001;2(1):67-71.
 16. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998;281(5381):1312-6.
 17. Steinbach JP, Weller M. Apoptosis in gliomas: molecular mechanism and therapeutic implications. *J. Neurooncol.* 2004;70(2):245-56.
 18. Sultana S, Perwaiz S, Iqbal M, Athar M. Crude extracts of hepatoprotective plants, *Solanum nigrum* and *Cichorium intybus* inhibit free radical-mediated DNA damage. *J Ethnopharmacol.* 1995;45(3):189-92.
 19. Hu K, Kobayashi H, Dong A, Jing Y, Iwasaki S, Yao X. Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. *Planta Med.* 1999;65(1):35-8.
 20. Prashanth Kumar V, Shashidhara S, Kumar MM, Sridhara BY. Cytoprotective role of *Solanum nigrum* against gentamicin-induced kidney cell (Vero cells) damage in vitro. *Fitoterapia.* 2001;72(5):481-6.
 21. 고유미, 조정훈, 장준복, 이경섭. 龍葵가 Hela cell의 증식억제와 apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2005;18(2): 1-11.
 22. Raju K, Anbuganapathi G, Gokulakrishnan V, Raj Kapoor B, Jayakar B, Manian S. Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* LINN

- against CCl₄-induced hepatic damage in rats. Biol Pharm Bull. 2003;26(11):1618-9.
23. Yen GC, Chen HY, Peng HH. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. Food Chem Toxicol. 2001;39(11):1045-53.
24. Son young ok. Cytotoxic and antioxidative effects of glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. on MCF-7 cells. Graduate School of Chonnam National University. 2003.
25. Lee sei jung. 150 kDa glycoprotein isolated solanum nigrum L. kills the HCT-116 (colorectal cancer) cells through activation of apoptotic signals. Graduate School of Chonnam National University. 2005.
26. Li J, Li Q, Feng T, Zhang T, Li K, Zhao R, Han Z, Gao D. Antitumor activity of crude polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on U14 cervical carcinoma bearing mice. Phytother Res. 2007;21(9):832-40.
27. Lin HM, Tseng HC, Wang CJ, Chyau CC, Liao KK, Peng PL, Chou FP. Induction of autophagy and apoptosis by the extract of *Solanum nigrum* Linn in HepG2 cells. J Agric Food Chem. 2007;55(9):3620-5.