蘇木 물추출물의 G2/M기 정지를 통한 U937세포의 성장억제 효과

전병제[1] · 주성민[1] · 양현모[1] · 김보현[3] · 김원신[3] · 전병훈[1,2]*

1 : 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 한국전통의학연구소, 3 : 원광대학교 자연과학대학 생명과학부

Caesalpinia sappan L. Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest in Human Lymphoma U937 Cells

Byung Jae Jeon[1], Sung Min Ju[1], Hyun Mo Yang[1], Bo Hyun Kim[3], Won Sin Kim[3], Byung Hun Jeon[1,2]*

1 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 2 : Research Center of Korean Traditional Medicine, 3 : Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Wonkwang Unviersity

Caesalpinia sappan L. (C. sappan) has long been used in traditional medicine as an emmenagogue, hemostatic and anti-inflammatory agent. The present study investigated the effects of water extract of C. sappan in human lymphoma U937 cells. The proliferation of U937 cells was decreased by C. sappan in a dose-dependently manner. Anti-proliferative effect of C. sappan on U937 cells was associated with G2/M phase arrest, which was mediated by regulating the expression of p21 protein. Moreover, phosphorylation of JNK and p38 was increased by C. sappan. Blockade of JNK and p38 was significantly inhibited C. sappan-induced G2/M phase arrest. Taken together, these results suggest that Anti-proliferative effect of C. sappan on U937 is assocated with G2/M phase cell cycle arrest by expression of p21 protein and, JNK and p38 activation.

Key words : *Caesalpinia sappan* L., U937 cells, Cell cycle arrest, G2/M phase, p21, JNK, p38

서 론

蘇木(*Caesalpinia sappan* L.)은 소방목, 소방, 홍자 등으로도 불리며 콩과(Legminosae)에 속한 낙엽소교목 또는 관목인 소방목의 심재이다. 이 식물은 인디아, 말레이시아 반도, 중국 남부 등 열대 아시아지역에 분포하며, 그 높이가 5-10 m에 달하며, 줄기에는 작은 가지가 있고 작은가지는 회록색이며 원형의 돌출된 껍질눈이 있다. 새 가지에는 짧은 부드러운 털이 있으며 잎은 2회 깃꼴 겹잎이며 혀과는 비스듬한 타원형이며 성숙하면 암홍색으로 되고 짧은 가늘고 보드라운 털이 있으며 벌어지지 않고 종자 4-5개가 들어 있다. 개화기는 5-6월이며 결실기는 9-10월이다[1].

중약대사전에는 蘇木의 약리작용으로서 황색포도상 구균을 포함한 여러 종류의 세균에 대한 향균작용, 쥐와 토끼의 중추신경 억제작용, 혈관수축과 같은 심혈관에 대한 작용 등이 기록되어 있다[2]. 국내에서 蘇木에 대한 연구로는 Park[3]등의 위암 세포주에 대한 세포독성 효과와 Lim[4]등의 용매 추출물 분획에 대한 항산화 효과 및 Kim[5]등의 항염 효과와 항균 소취 가공 등에 관한 보고가 있으며, Jeon[6]등은 세포독성효과와topoisomerase I 억제활성에 관한 in vitro 연구를 보고하였다.

蘇木의 주요 성분으로는 flavonoid 구조를 갖는 무색의 원색소인 brazilin이 주성분이며 brazilin은 공기 중에 산화되어 brasilein이 된다[7]. 이와 관련된 연구로는 Moon[8]등이 蘇木의 주성분인 brazilin을 이용하여 고혈압에 효과가 있음을 보고하였고, Hwang[9]등은 brazilin이 혈소판에서 칼슘농도를 조절함을 보고하였으며, Kim[10]등은 혈액에서 brazilin의 혈당저하 작용을 보고하였다. 또 Lee[11]등은 brazilin이 그을음제(tanning agent)로 효과가 있음을 보고하였다.

그러나 蘇木이 인체 백혈병 세포에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 드문 편이다. 따라서 본 연구에서는 다양한 약리작용을 나타내는 蘇木 물추출물을 사용하여 인체 림프종 세포주 U937 세포증식에 미치는 효과에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 전병훈, 익산시 신용동 원광대학교 한의과대학 병리학교실

· E-mail : omdjbh@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6843

· 접수 : 2010/01/11 · 수정 : 2010/02/01 · 채택 : 2010/02/12

재료 및 방법

1. 蘇木 물추출물 제조

蘇木 100 g은 증류수 1 L를 사용하여 100℃에서 3 시간 추출하였다. 추출물은 2,000 rpm에서 15 분 원심분리하여 비수용성 성분을 제거하였다. 상층액은 부크너깔데기 위에 와트만 No. 4 여과지를 통하여 여과하였다. 여과물은 12 시간 -20℃에 보관 후, 동결 건조하였다. 추출물의 수율(W/W)은 약 3.64%였다. 동결 건조된 추출물은 PBS(pH 7.4)에 10 mg/ml 농도로 용해하여 -20℃에 보관하였고, 실험에 사용하기 전에 희석하여 사용하였다.

2. 시약 및 항체

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), Dimethyl sulfoxide(DMSO), propidium iodine(PI), Ribonuclease A(RNase A), protease inhibitor cocktail은Sigma-Aldrich Chemical(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. SB203580, SP600125은 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-p21, anti-p27 항체들은Santa Cruz Biotechnology, INC.(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-JNK, anti-phospho-JNK 항체들은 Cell Signaling Technology INC.(Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포배양

U937 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받았고, 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin이 포함된 RPMI1640 배지(Invitrogen, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 37℃와 5% CO_2 상태에서 배양하였다.

4. 세포독성검사

세포생존율은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. MTT 검사는 미토콘드리아의 숙신산 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 환원되는 원리를 기초로 하고 있다. U937 세포는 2×10^5 cells/ml로 12 well 플레이트에 분주한 후, 蘇木 물추출물을 일정한 농도로 증가시켜 24시간 처리하였다. 처리 후에, 5 mg/ml MTT용액 100 μl를 각각의 well에 첨가하였고, 4 시간 배양하였다. 비수용성의 MTT-formazan 결정들은 등량의 solubilization 용액(10% SDS/0.01 N HCl)을 첨가하여 용해시켰고, 5% CO_2 와 37℃ 조건하에서 12 시간 배양하였다. Formazan의 양은 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 세포생존율 방정식[(mean OD of treated cells/mean OD of control cells) × 100]으로 계산하였다.

5. 세포형태변화관찰

U937 세포는 35-mm 배양접시에 4×10^5 cells/dish로 분주한 후, 蘇木 물추출물을 24 시간 처리하였다. 세포는 cytospin을 사용하여 슬라이드 위에 부착하였다. 부착된 세포는 DAPI-메탄올(1 μg/ml)용액에 세척되고, DAPI-메탄올 용액으로 37℃에서 15 분 염색되었다. 염색된 세포는 메탄올로 세척되고 형광현미경으로 관찰하였다.

6. 세포주기분석

U937 세포는 25 μg/ml의 蘇木 물추출물을 6, 12, 24 시간 처리한 후, 세포 모두를 수확하여 PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 세척한 세포는 냉각된 70% 에탄올로 4℃에서 1 시간 고정하였다. 고정된 세포는 PBS(pH 7.4)로 다시 세척하고 1 ml의 PI(10 μg/ml)/RNase A (100 μg/ml)용액으로 재 부유시켜 37℃에서 암실조건으로 1 시간 배양하였다. DNA 양은 FACS-Calibur(BD Biosciences, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포주기분석은 고정한 후, 염색한 세포로부터 DNA 양을 측정하여 결정하였다.

7. Western blot analysis

세포는 얼음 냉장된 PBS(pH 7.4)로 세척하고 1% protease inhibitor 혼합액이 포함된 얼음 냉장 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium vanadate)으로 부유 시킨 후 얼음 위에서 30분 용해하였다. 세포용해액들은 4℃에서 14,000 rpm으로 20분 원심분리 하였고, 단백질 농도는 Bradford 검사법을 이용하여 측정하였다. 총 30 μg의 단백질 샘플을 SDS-PAGE 젤로 분리하였고 40V에서 3 시간 nitrocellulose 막 위로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 막은 5% BSA가 포함된Tris-buffered saline+Tween-20(20 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 차단시킨 후, 1차 항체를 결합시켰다. 면역 활성은 peroxidase가 붙어있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체를 사용하여 SuperSignal West Pico Chemiluminescent(Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 탐지하였다.

8. 통계처리

모든 데이터의 결과는 마이크로소프트 오피스 엑셀(EXCEL) 2003 프로그램을 통하여 통계처리 하여 mean±standard deviation(SD)로 기록하였다.

결 과

1. 蘇木 물추출물의 세포독성에 대한 효과

U937 세포의 蘇木 물추출물에 대한 세포독성의 효과를 조사하기 위해 蘇木 물추출물을5, 10, 15, 20, 25 μg/ml 농도로 24 시간 처리하였다. 세포생존율은 MTT assay로 측정하였다. 蘇木 물추출물은 농도 의존적으로 U937 세포의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1).

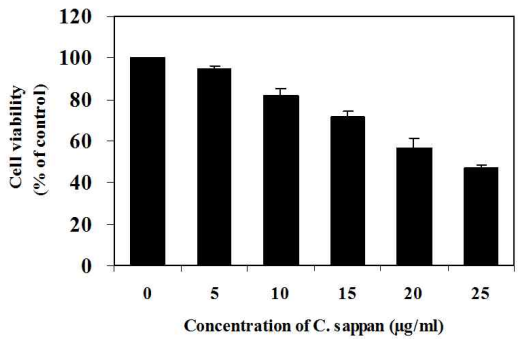

Fig. 1. Effects of C. sappan on cell viability in U937 cells. The cells were incubated with 5, 10, 15, 20 and 25 μg/ml C. sappan for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay.Value are means ± SD, N = 3.

2. 蘇木 물추출물의 세포형태변화에 대한 효과

蘇木 물추출물의 세포독성에 대한 세포형태변화를 관찰하기 위하여 蘇木 물추출물을 5, 10, 15, 20, 25 μg/ml 농도로 24 시간 처리한 후, DAPI 염색하였다. 세포형태변화는 형광현미경으로 관찰하였다. 蘇木 물추출물은 약간의 세포형태변화를 일으켰지만, 농도의존적으로 세포수가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

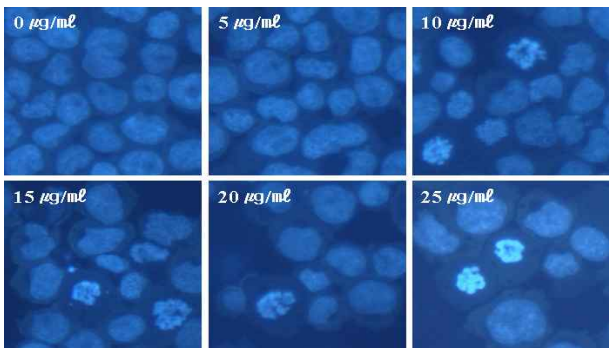

Fig. 2. Effect of C. sappan on cell morphology in U937 cells. The cells were incubated with 5, 10, 15, 20 and 25 μg/ml C. sappan for 24 h. Cells were subjected to cytospin, stained with DAPI-MeOH and observed under a fluorescence microscope.

3. 蘇木 물추출물의 세포주기변화에 대한 효과

蘇木 물추출물의U937 세포의 증식억제 효과를 조사하기 위해 유세포 분석을 통하여 세포주기를 분석하였다. U937 세포는 25 μg/ml 농도의 蘇木 물추출물을 6, 12, 24 시간 처리 후, PI 염색하여 세포주기를 분석하였다. 蘇木 물추출물 처리 후, 6 시간에서는 G0/G1기가 40.20%에서 38.12% 감소하였고, G2/M기를 26.32%에서 30.30% 증가하였다. 12시간에서는 G0/G1기가 48.02%에서 20.64% 감소하였고, G2/M기가 26.72%에서 45.58% 증가하였다. 24시간에서는 G0/G1기가 40.44%에서 18.53% 감소하였고, G2/M기는 28.28%에서 39.44% 증가하였다. SubG1은 시간의존적으로 2.41%, 5.05%, 12.42%로 증가하였다.

4. 蘇木 물추출의 p21과 p27 단백질 발현에 대한 효과

蘇木 물출물의 G2/M기 정지에 관여하는 CDK활성 조절인자인 p21과 p27 단백질의 발현을 조사하였다. 蘇木 물추출물 처리 후, p21 단백질은 6시간에서 발현량이 증가하기 시작하여 12 시간에서 최대로 증가하였다(Fig. 4). 그러나 p27 단백질의 발현에는 蘇木 물추출물이 아무런 영향을 미치지 못하였다.

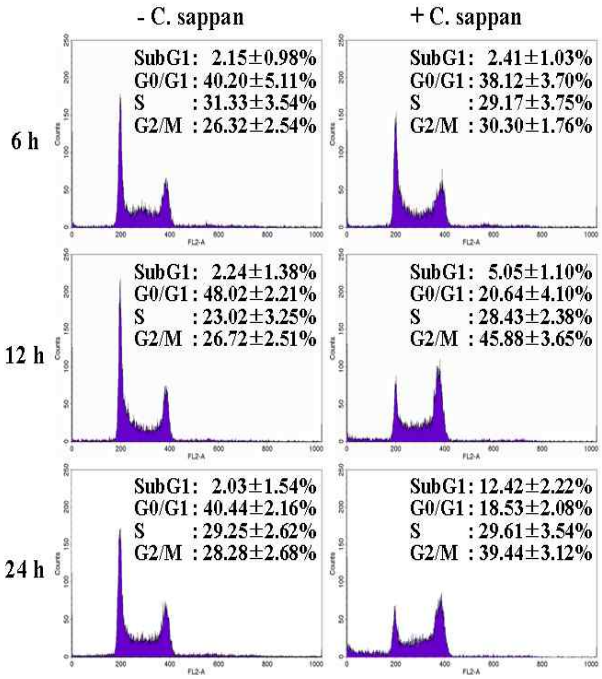

Fig. 3. Effect of C. sappan on cell cycle in U937 cells. The cells were incubated with or without 25 μg/ml C. sappan for 6, 12 and 24 h. The cells were fixed and stained with PI and the DNA content was analyzed by flow cytometry.

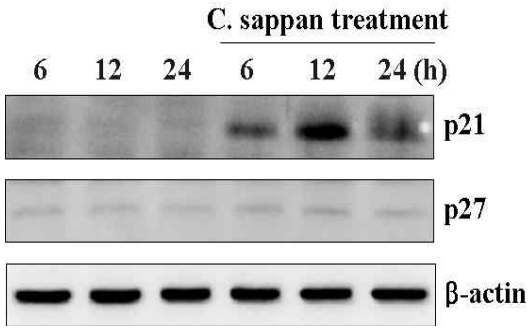

Fig. 4. Effect of C. sappan on expression of p21 and p27 protein in U937 cells. The cells were treated with or with C. sappan (25 μg/ml) for 6, 12 and 24 h. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with anti-p21 and anti-p27 antibodies.

5. 蘇木 물추출물의 MAPKs 활성에 대한 효과

MAPKs 신호전달기전은 세포증식에 있어서 중요한 역할을 수행하고 있다. U937 세포의 세포증식에서 MAPKs와 관련하여 蘇木 물추출물의 ERK, JNK, p38의 활성에 대한 효과를 조사하였다. 蘇木 물추출물은 처리 시간별로 음성대조군과 비교하여 JNK와 p38 활성은 증가하였지만, 반대로 ERK활성은 감소하였다(Fig. 5).

6. 蘇木 물추출물의 G2/M기 정지에 대한 JNK와 p38 억제제의 효과

蘇木 물추출물의 JNK와 p38 활성 증가가 G2/M기 정지에 미치는 효과를 조사하였다. U937 세포는 蘇木 물추출물을 처리하기 3시간 전에 JNK 억제제(SP60125)와 p38 억제제(SB2035850)을 처리하였다. JNK와 p38 억제제는 蘇木 물추출물 처리군(44.10%)과 비교하여 G2/M기를 각각 38.32%와 37.13% 감소시켰다(Fig. 6).

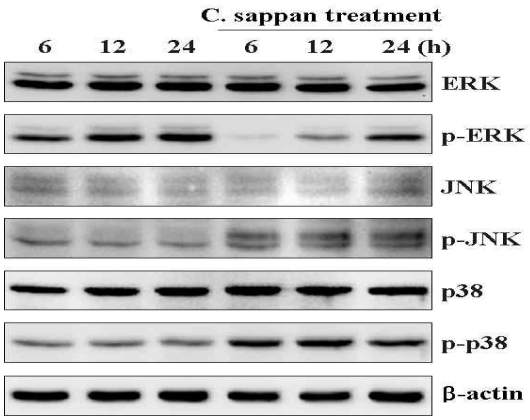

Fig. 5. Effects of C. sappan on phosphorylation of ERK, JNK and p38 in U937 cells. The cells were treated with or with C. sappan (25 μg/ml) for 6, 12, and 24 h. Cells were the lysed, and the supernatants were subjected to Western blot analysis using anti-ERK, anti-p-ERK, anti-JNK, anti-p-JNK, anti-p38 and anti-p-p38 antibodies.

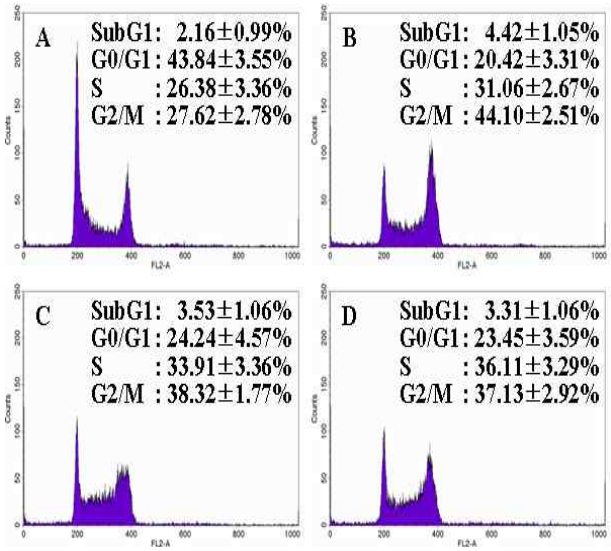

Fig. 6. Effect of JNK and p38 inhibitors on C. sappan-induced G2/M phase arrest in U937 cells. The cells were preincubated with 10 μM SP60125 or 10 μM SB203580 for 3 h, and then treated with C. sappan for 12 h. DNA contents were analyzed by flow cytometry after PI staining. A; Control, B; C. Sappan, C; C. sappan+SP60125, D; C. sappan+SB2035850.

고 찰

燒木의 辛味는 走散하여 心 肝 脾三經의 血分에 들어가 活血去瘀시켜 消腫止痛의 작용이 있어 外科의 要藥이 되고, 또한 婦女의 血瘀로 인한 病症에 적용하여 치료한다. 주로 外傷 및 婦人科 영역에서 사용한다[12]. 그러나 성이 走散動血하므로 血虛無瘀者는 복용을 피하고, 사용할때는 薄片 또는 細切하여 사용한다[13].

많은 종류의 암들이 세포의 비정상적인 분화 혹은 분화의 중지에 의해 발생되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 암의 특징을 이용하여 암세포에만 특이적으로 작용하는 암세포 분화 유도물질에 의한 항암제 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포분화와 증식은 서로 상반되는 관계가 있으며 증식이 진행될수록 분화는 저해를 받는다[14,15].

본 논문에서 蘇木 물추출물의 U937 세포에 대한 세포증식억제 및 세포주기정지효과에 대하여 확인하였다. 蘇木 물추출물은 U937 세포의 세포생존율을 농도의존적으로 감소시켰고, 세포형태에 큰 변화 없이 세포수를 감소시켰다. 이 결과들은 蘇木 물추출물이 U937 세포의 증식억제에 효과가 있다는 것을 보여주고 있다.

蘇木 물추출물의 세포증식억제는 유세포분석에 의해 G2/M기 정지와 관련되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 蘇木 물출출물 처리 6시간에서 G2/M기가 증가하기 시작하여 12시간에서는 최대 20%정도 증가하였다. 24시간에서도 G2/M기가 10%정도 증가하였지만, apoptotic peak인 SubG1또한 10%정도 증가하였다. 이 결과들은 蘇木 물추출물이 G2/M기 정지를 통하여 U937 세포의 증식을 억제하지만, 처리 시간이 길어질수록 apoptosis가 유도되는 것을 보여주고 있다.

세포주기정지는 증식과 분화에 있어 중요한 역할을 수행한다. 세포주기는 cyclin-dependent kinases(CDKs)에 의해 양성적으로 조절되지만[16], CDK활성을 억제하는 CDK 억제제(CKIs)에 의해 음성적으로도 조절된다[17]. 현재 포유동물세포의 CKIs는 2가지 종류가 있다. 하나는 CIP/KIP 패밀리로 p21WAF/Cip1, p27Kip1, p57 등이 있고, 모든 CDK활성에 광범위하게 작용을 한다[17,18]. 또 다른 종류는 INK4 패밀리인 p15INK4B, p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D로 CDK4와 CDK6의 활성을 조절한다[17]. 이러한 세포주기조절 기전은 세포증식을 조절하는 기본이 되고, 세포분화에도 관련되어 있다[18-22]. 특히, p21 단백질은 세포의 분화나 노화에 관련이 있는 것으로 보고되어 있다[23-25]. 蘇木 물추출물은 U937 세포의 증식억제에서 p21 단백질의 발현을 증가시켰지만, p27 단백질 발현에는 영향을 주지 못하였다. 이 결과는 p21 단백질만이 蘇木 물추출물에 의한 U937 세포의 G2/M기 정지에 관여한다는 것을 보여주고 있다.

Mitogen-activated protein kinases(MAPKs)는 세포증식, 분화, apoptosis와 같은 다양한 세포반응들의 조절에 관여하는 serine/threonin kinases이다[26]. 구조적인 차이를 기본으로 하여 MAPKs는 세가지로 분류된다(ERK, JNK/SAPK, p38 kinase)[26]. ERK 경로는 mitogen과 growth factor들에 의해 활성화되고 세포성장 및 생존과 분화의 조절에서 중요한 역할을 수행한다[26,27]. 대조적으로, JNK와 p38 경로는 화학적 또는 환경적 스트레스에 대한 반응에 의해 활성화되고, 종종 apoptosis의 유도에 관련되어있다[28-32]. 蘇木 물추출물의 U937 세포의 증식억제에 대한 기전연구에서 蘇木 물추출물은 ERK 활성을 감소시키고, JNK와 p38 활성을 증가시켰다. 이 결과는 JNK와 p38 활성이 蘇木물추출물의 U937세포의 증식억제에 밀접한 관련이 있을 것으로 보여주고 있다.

MAPKs는 세포주기 조절에 관여한다. ERK는 정상적인 세포주기의 G2/M기 진행과 DNA 손상에 의해 유도된 G2/M기 정지에 필요하다[33,34]. p38은 G2/M기의 DNA 손상과 관련된 세포주기검사점에 작용하는 것으로 알려졌고[35,36], JNK 또한 화학적 스트레스에 의한 G2/M기 정지에 관여하는 것으로 보고하였다[37,38]. U937 세포에서 蘇木 물추출물에 의한 세포증식억제는 JNK와p38 활성 증가와 관련되어 있을 것으로 사료된다. JNK과 p38 억제제는 蘇木 추출물에 의해 증가된 G2/M기를 각각 6-7% 정도 감소시켰다. 이 결과는 蘇木 물추출물에 의한 U937 세포의 G2/M기 정지를 통한 증식억제가 JNK와 p38 활성과 관련되어 있다는 것을 보여주고 있다.

결 론

본 연구에서는 蘇木 물추출물의 U937세포의 증식억제에 대한 효과를 알아보고자 하였다. 蘇木 물추출물에 의한 세포증식억제 및 기전을 분자생물학적 방법을 통하여 유의한 결과를 얻었으며, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

蘇木 물추출물은 U937 세포의 증식을 억제하였다. 蘇木 물추출물은 U937 세포의 G2/M기 정지상태 세포와 p21 단백질 발현량을 증가시켰다. 蘇木 물추출물은 U937 세포에서 JNK와 p38 활성을 증가시켰으며, JNK와 p38 활성억제는 蘇木 물추출물에 의해 증가된 G2/M기 정지상태의 세포를 감소시켰다.

이상의 결과를 종합하면, 蘇木 물추출물에 인체 림프종 세포주인 U937 세포의 증식억제가 이루어졌다. 그 증식억제기전은 p21 단백질 발현 및 MAP kinases의 일부인 JNK와 p38 단백질 활성을 통하여 G2/M기 정지가 나타나고, 이로 인하여 증식억제가 유도됨을 확인 할수 있었다. p21 단백질은 세포분화에 관련되어 있으므로 蘇木 물추출물에 의한 p21 단백질 발현이 U937 세포의 분화에 미치는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비 지원에 의해 수행됨.

참고문헌

1. 장진섭, 신민교. 도해. 생약대사전, pp 666-667, 1990.
2. 김창민 외. 중약대사전. 청담출판사, pp 2420-2423, 1997.
3. Park, K.J., Kim, E.H., Eun, Y.A., Kang, B.J. and sung, H.J. Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines. Kor. J. Pharmacogn. 28: 233-238, 1997.
4. Lim, D.K., Choi, L.U. and Shin, D.H. Antioxidative activity of some solvent extract from Caesalpinia sappan L. Kor. J. Food Sci. Technol. 28: 77-82, 1996.
5. Kim, Y.S., Noh, Y.K., Lee, G.I., Kim, Y.K., Lee, K.S. and Min, K.R. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. Kor. J. Pharmacogn. 26: 265-272, 1995.
6. Jeon, W.K., Park, K.J., Kim, S.Y., Ma, J.Y. and Sung, H.J. In vitro studies on the anticancer effect and topoisomerase I inhibition activity of Caesalpinia sappan L. extract. Kor. J. pharmacogn. 30: 1-6, 1999.
7. Moon, C.K., Chung, J.H., Lee, Y.M., Lee, S.H., Hwang, G.S., Park, K.S., Mook, M.S., Kim, S.G., Ahn, Y.S. and Ann, J.H. Effects of Brazilin on erythrocyte deformability and its regulated biochemical factors in streptozotocin induced diabetic rats, Arch. Pharm, Res. 11: 149-154, 1988.
8. Moon, C.K., Park, K.S., Kim, S.G., Won, H.S. and Chung, J.H. Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl3-induced toxicity. Drug Chem. Toxicol. 15: 81-91, 1992.
9. Hwang, G.S., Kim, J.Y., Chang, T.S., Jeon, S.D., SO, D.S. and Moon, C.K. Effects of Brazilin on the phopholipase A2 activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelets. Arch. Pharm. Res. 21: 774-778, 1998.
10. Kim, S.G., Kim, Y.M., Khil, L.Y., Jeon, S.D., So, D.S., Moon, C.H. and Moon, C.K. Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver. Arch. Pharm. Res. 21: 140-146, 1998.
11. 이강대, 김정하. brazilin as a new sunless tanning agent. 대한화장품학회지 23: 81-85, 1997.
12. 전국한의학과대학 본초학 교수 공편저(강병수 외). 본초학. 도서출판 영림사, p 299, 2000.
13. 이상인 외. 한약임상응용. 전통의학연구원, p 438, 1998.
14. Koeffler, H.P. Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: Therapeutic implication. Blood, 62: 709-721, 1983.
15. Kim, J.I., Lee, S.H., Park, J.H., Park, H.J. and Lee, K.T. Induction of differentiation on the human histocytic lymphoma cell line U-937 by Costunolide. Kor. J. Pharmacogn. 30: 7-11, 1999.
16. Covacci, V., Bruzzese, N., Sgambato, A., Di Francesco, A., Russo, M.A., Wolf, F.I. and Cittadini, A. Magnesium restriction induces granulocytic differentiation and expression of p27Kip1 in human leukemic HL-60 cells. J. Cell Biochem. 70: 313-322, 1998.
17. Sherr, C.J. and Roberts, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev. 9: 1149-1163, 1995.
18. Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G.J. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. Nature 377: 552-557, 1995.
19. Furukawa, Y., Uenoyama, S., Ohta, M., Tsunoda, A., Griffin, J.D. and Saito, M. Transforming growth factor-beta

inhibits phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human monocytic leukemia cell line JOSK-I. J. Biol. Chem. 267: 17121-17127, 1992.

20. Hui, E.K. and Yung, B.Y. Cell cycle phase-dependent effect of retinoic acid on the induction of granulocytic differentiation in HL-60 promyelocytic leukemia cells. Evidence for sphinganine potentiation of retinoic acid-induced differentiation. FEBS Lett. 318: 193-199, 1993.
21. Cooper, S. Revisiting the relationship of the mammalian G1 phase to cell differentiation. J. Theor. Biol. 208: 399-402, 2001.
22. Wang, Q.M., Jones, J.B. and Studzinski, G.P. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. Cancer Res. 56: 264-267, 1996.
23. Futamura, M., Monden, Y., Okabe, T., Fujita-Yoshigaki, J., Yokoyama, S. and Nishimura, S. Trichostatin A inhibits both ras-induced neurite outgrowth of PC12 cells and morphological transformation of NIH3T3 cells. Oncogene 10: 1119-1123, 1995.
24. Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W. and Elledge, S.J. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. Science 267: 1024-1027, 1995.
25. Zhang, W., Grasso, L., McClain, C.D., Gambel, A.M., Cha, Y., Travali, S., Deisseroth, A.B. and Mercer, W.E. p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. Cancer Res. 55: 668-674, 1995.
26. Wada, T. and Penninger, J.M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 23: 2838-2849, 2004.
27. Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N.J. Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2. Role in cell survival following oxidant injury. J. Biol. Chem. 271: 4138-4142, 1996.
28. Yoshizumi, M., Tsuchiya, K. and Tamaki, T. Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease. J. Med. Invest. 48: 11-24, 2001.
29. Ramachandiran, S., Huang, Q., Dong, J., Lau, S.S. and Monks, T.J. Mitogen-activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells. Chem. Res. Toxicol. 15: 1635-1642, 2002.
30. Dabrowski, A., Boguslowicz, C., Dabrowska, M., Tribillo, I. and Gabryelewicz, A. Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. Pancreas 21: 376-384, 2000.
31. Kannan, K. and Jain, S.K. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology 7: 153-163, 2000.
32. Feuerstein, G.Z. and Young, P.R. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. Cardiovasc. Res. 45: 560-569, 2000.
33. Guadagno, T.M., Ferrell, J.E.Jr. Requirement for MAPK activation for normal mitotic progression in Xenopus egg extracts. Science 282: 1312-1315, 1998.
34. Wright, J.H., Munar, E., Jameson, D.R., Andreassen, P.R., Margolis, R.L., Seger, R., Krebs, E.G. Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11335-11340, 1996.
35. Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., Fornace, A.J.Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. Nature 411: 102-107, 2001.
36. Wang, X., McGowan, C.H., Zhao, M., He, L., Downey, J.S., Fearns, C., Wang, Y., Huang, S., Han, J. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. Mol. Cell. Biol. 20: 4543-4552, 2000.
37. Lee, S.J., Kim, S.K., Choi, W.S., Kim, W.J. and Moon, S.K. Cordycepin causes p21WAF1-mediated G2/M cell-cycle arrest by regulating c-Jun N-terminal kinase activation in human bladder cancer cells. Toxicol. Lett. 189: 145-151, 2009.
38. Zhu, N., Shao, Y., Xu, L., Yu, L. and Sun, L. Gadd45-alpha and Gadd45-gamma utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G2/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells. Mol. Biol. Rep. 36: 2075-2085, 2009.