

천화분이 MCF-7 유방암 세포주의 G2M 세포주기 억제에 미치는 영향

정승민 · 정미경 · 고성규¹ · 최유경 · 박종형 · 전찬용*

경원대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 경희대학교 한의과대학 예방의학교실

Effect of Arresting MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell at G2/M Phase of Trichosanthes Kirilowii

Seung Min Jeong, Mi Kyung Jeong, Seong Gyu Ko¹, You Kyung Choi, Jong Hyeong Park, Chan Yong Jun*

Department of Orinetal Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyungwon University,
1; Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

The purpose of this study is to investigate the anti-proliferative mechanism by Trichosanthes kirilowii (TCK) in MCF-7 human breast carcinoma cell. In this study, we used human breast cancer cell line, Michigan cancer foundation-7 cells (MCF-7 cells). They were co-incubated with 30~200 µg/ml TCK for 48 hours, and cell viability was measured by Water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) assay. After MCF-7 cells were exposed to 60 µg/ml of TCK for 0, 3, 6, 12, 24, 48 hours, We performed flow analysis cytometry sorting(FACS) and western blot analysis. We investigated the effect of dose-dependent cell growth inhibition by TCK, which could be proved by WST-1 assay. Also, flow cytometry analysis showed that TCK increased percentage of subG1 phase and G2/M phase cell cycle. In addition, TCK induced apoptosis through the expression of caspase-9, -3 and poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) activation. Moreover, we showed that ATM-dependent G2/M phase arrest by DNA damage and phosphorylation of chk2, cdc25C, cdc2(Tyr15). Taken together, these results suggest that by G2/M phase arrest through DNA damage and inducing of apoptosis through intrinsic pathway, TCK may have potential tumor suppressor in breast cancer.

Key words : Trichosanthes kirilowii(TCK), MCF-7 cell, G2/M phase arrest, apoptosis

서 론

암에 의한 사망률은 국내에서 사망원인 1위로, 매년 그 수가 증가하고 있다¹⁾. 그 중 유방암은 산업화 사회가 진행될수록 현대인들의 식습관이 고단백, 고지방식으로 변화함에 따라 발병률이 더욱 증가하고 있다²⁾. 서양에서 여성들의 암에 의한 사망원인으로 높은 순위를 차지하고 있는 유방암은 우리나라 여성들에게도 매년 증가하여 현재 여성 암 중 1위를 차지하고 있다^{3,4)}. 이러한 유방암을 치료하기 위한 항암제 중 식물 추출물 및 성분이 유방암의 예방과 치료에 긍정적인 효과를 나타내고 있다고 보고되고 있다⁵⁻⁸⁾.

천화분(Trichosanthes kirilowii, 이하 TCK)은 葫蘆科(박과,

Cucurbitaceae)에 속한 다년생 攀援性草質藤本인 하늘타리 및 동속 근연식물의 괴근으로 淸熱生津, 淸肺化痰, 消腫排膿의 효능을 지닌 것으로 알려져 있으며⁹⁾, 최근 천화분을 이용한 항암연구로는 암세포의 증식억제 및 세포사멸 유발, 혈관신생억제 등에 관한 일부 보고가 있다¹⁰⁻¹³⁾.

이에 본 연구에서는 천화분의 에탄올 추출물을 MCF-7 human breast carcinoma cell에 처리하여 microscope, WST-1 assay, FACS, western blot analysis를 통해 관찰한 결과 세포 억제에 대한 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

본 실험에서 사용한 약제인 천화분은 대표적 한약공급업체

* 교신저자 : 전찬용, 인천시 남구 구월동 1200-1, 경원대학교 부속 길한방병원

· E-mail : joncy@kyungwon.ac.kr, · Tel : 070-7120-5007

· 접수 : 2011/07/20 · 수정 : 2011/08/11 · 채택 : 2011/08/26

인 옴니허브(Korea)에서 구입하였으며, 100 g 정량 후 1 ℓ의 80% 에탄올에 30분 동안 sonication하였다. 3 mm 여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과한 후, 여과된 에탄올 추출물은 감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 농축한 후, 동결 건조하여(Freezedryer, Matsushita, Japan) 얻은 분말을 3차 증류수에 200 mg/ml로 녹인 후 stock으로 사용하였다.

2) 세포주

인간 유방암 세포주 MCF-7은 한국세포주은행을 통해 구입하였으며, DMEM 배지에 10% (v/v) 혈청과 1% 항생제를 넣어 5% CO₂가 든 37°C humidified incubator에서 배양한다. 각 실험에 사용된 세포는 70% 정도의 밀도로 준비하였다.

3) 시약 및 항체

WST-1 assay kit는 Roche에서 구입하였으며, Propidium Iodide 염색 시약은 Sigma-Aldrich (Michigan, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 antibody인 ATM, phospho-ATM, phospho-chk2, phospho-cdc25C, phospho-cdc2 (Thy15), cyclin B는 cell signaling technology (MA, USA)에서 구입하였으며, cleaved-caspase-9, cleaved-caspase-8, procaspase-3, cleaved-caspase-3, actin, poly-(ADP-ribose) polymerase(이하 PARP)는 santa cruz biotechnology (CA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 DMEM 배지 및 fetal bovine serum (FBS)과 antibiotic- antimycotic은 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다.

2. 방법

1) WST-1 assay를 이용한 세포 생존율 측정

MCF-7 세포를 하루 전날 96 well plate에 1x10⁵/well로 6 well씩 8개의 群으로 갈아놓은 후 세포가 하루 동안 plate 바닥에 붙도록 배양한다. 다음날 100 μl의 천화분을 각각의 농도(0 μg/ml, 30 μg/ml, 40 μg/ml, 50 μg/ml, 60 μg/ml, 70 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml)에 맞게 넣어준 후 배양기에서 48시간 동안 배양한다. 48시간 후 WST-1 solution을 10 μl씩 각각의 well에 넣고 2시간 동안 배양한 후 물에 녹아져 나온 formazan (water-soluble formazan)을 ELISA reader 기기(Molecular devices, VersaMax microplate reader, USA)로 440 nm 필터에서 값을 측정하였다.

2) FACS를 이용한 세포사멸 및 세포주기 분석

flow analysis cytometry sorting (FACS)를 통해 세포사멸을 보기 위해 4x10⁵의 세포를 60 mm culture plate에 배양하고, 다음날 60 μg/ml의 천화분을 처리한 후 0, 3, 6, 12, 24, 48시간 동안 3 ml의 95% ethanol(0.5% Tween-20 첨가)에 세포를 고정시켰다. 48시간 동안 샘플이 다 모아질 때까지 나머지 샘플은 -20°C에서 보관하였다. 샘플을 다 모은 후 에탄올에 고정시켜둔 세포는 차가운 PBS로 두 번 washing한 후 암상태에서 10 mg/ml propidium iodide(이하 PI)로 염색하여 FACStar flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)와 ModFit LT V 2.0 software를 이용하여 분석하였다.

3) Western blot analysis

MCF-7 세포를 100 mm culture plate에 7x10⁵/plate로 10%

FBS DMEM에 12시간 동안 안정화 하였다. 안정화 후 세포는 각 조건에 맞게 천화분을 처리한 후 시간에 맞게 샘플을 모았다. 샘플을 모을 때는 plate에 붙어있는 세포뿐만 아니라 붙어있지 않은 세포까지 튜브에 다 모은 후 원심분리(2000 RPM, 5 min)cell down한 후 그 상층액을 버리고, 차가운 PBS로 2번 washing하여 cell pellet만 남겼다. 각 시간별로 모아진 세포는 protein lysis buffer를 이용하여 단백질만 분리하고, 단백질의 정량은 bradford(bio-rad protein assay kit) 시약으로 하였으며, SDS-PAGE gel에 동량의 단백질을 loading하여 분리한 후, nitrocellulose membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 1% BAS+1% skim milk가 섞인 PBST(1xPBS in 0.1% Tween-20)로 상온에서 1시간 동안 blocking한 후, 여러 가지 1차 항체를 4°C에서 over night(O/N)으로 반응시킨 후, PBST로 washing후 HRP-conjugated 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 역시 PBST를 사용하여 washing과정을 거친 다음에 Electrochemiluminescence detection system (Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 이용하여 X-ray film으로 결과를 확인하였다.

3. 통계처리

실험결과의 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 Mean(평균) ± S.E.(표준오차)로 요약하였으며, Student t-test method로 분석하여 p-value가 0.05미만일 경우 유의성을 인정하였다.

결 과

1. MCF-7 세포 모양에 미치는 효과

먼저 세포에 천화분을 농도별로 처리한 후 세포 모양에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과 천화분의 농도가 증가할수록 세포의 밀도도 낮아지며, apoptosis의 전형적인 모양인 apoptotic body를 세포 표면에 형성하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

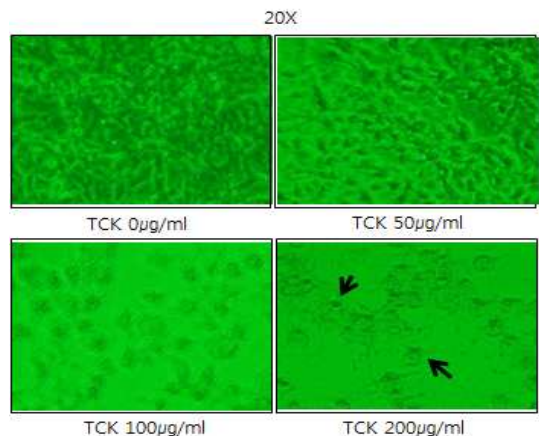


Fig. 1. Effect of TCK on cell morphology in MCF-7 cell. Cell density of MCF-7 cell decreased dose-dependently after TCK. Also, TCK increased apoptotic bodies(arrows) on MCF-7 cell surfaces. Cells were treated with 50~200 μg/ml TCK for 48 hours. Cell morphology was observed with microscope.

2. MCF-7 세포 생존율에 미치는 효과

WST-1 assay 결과, MCF-7 세포에 30~200 $\mu\text{g/ml}$ 의 천화분을 처리한 후 48시간 후에 농도 의존적으로 세포생존율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

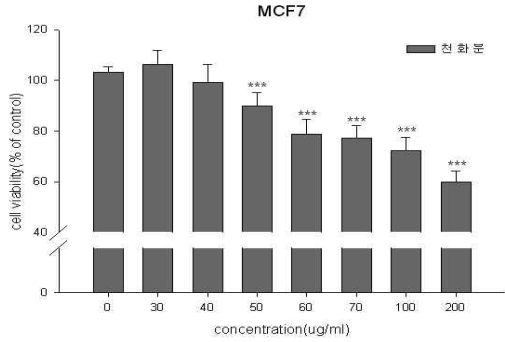


Fig. 2. Effect of TCK on cell proliferation in MCF-7 cell. It shows growth inhibition of MCF-7 cell by TCK. Cells were treated with 30~200 $\mu\text{g/ml}$ TCK for 48 hours, and cell viability was measured by WST-1 assay. The shown data is representative of three independent experiments. (Error bars were shown in mean \pm standard error means(SEM)). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. MCF-7 세포사멸에 미치는 효과

FACS 결과, 천화분(60 $\mu\text{g/ml}$)을 처리한 지 48시간째 약 20% 가량 subG1 값이 높아지는 것을 확인하였으며, 이로써 천화분에 의해 세포사멸이 유도됨을 확인하였다(Fig. 3).

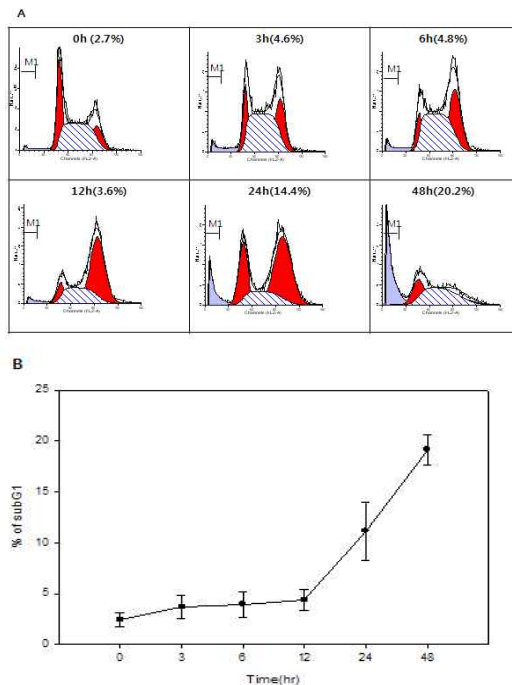


Fig. 3. TCK increases subG1 phase in MCF-7 cell. SubG1(M1) increased after TCK. MCF-7 cells were exposed to 60 $\mu\text{g/ml}$ of TCK for indicated periods of time. DNA content distribution was analyzed using a FACStar flow cytometer and percentage of subG1 phase cells was determined based on a DNA content histogram(A) and graph(B).

4. MCF-7 세포주기에 미치는 효과

FACS를 이용하여 MCF-7 세포에 천화분(60 $\mu\text{g/ml}$)을 처리

한 후, cell cycle의 변화를 관찰한 결과, G2/M phase arrest가 일어나는 것을 확인하였다. G2/M phase arrest는 천화분 처리 12시간째에 약 60%, 24시간째에 약 50%가량 증가하였다(Fig. 4).

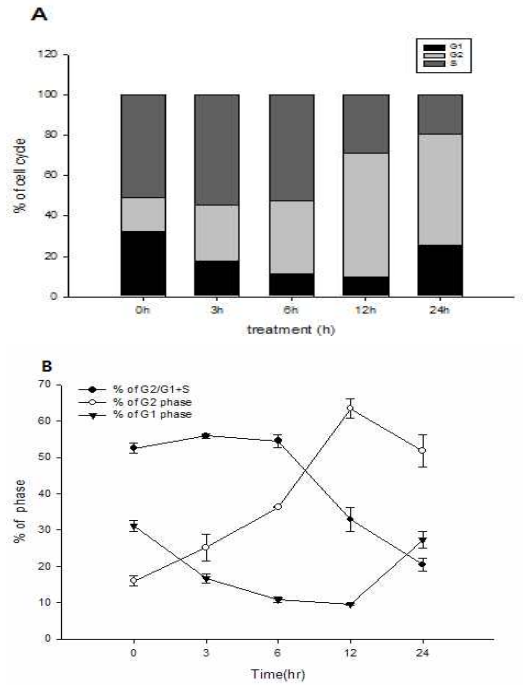


Fig. 4. TCK induces G2/M phase arrest in MCF-7 cell. TCK(60 $\mu\text{g/ml}$) treatment significantly increased G2/M phase arrest time-dependently in MCF-7 cell. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was obtained by MODFIT software. A and B are graphs of different type.

5. Caspase 발현 및 활성화에 미치는 효과

Western blot analysis 결과, MCF-7 cell에 천화분(60 $\mu\text{g/ml}$) 처리 후 caspase-8은 변화가 없었으나, caspase-9는 12시간 후부터 활성이 미미하게 증가하는 것을 확인하였으며, caspase-3의 활성은 24시간, 48시간 후에 높게 나타나는 것을 확인하였다. 직접적인 세포사멸의 marker인 PARP의 활성도 확인하였다(Fig. 5).

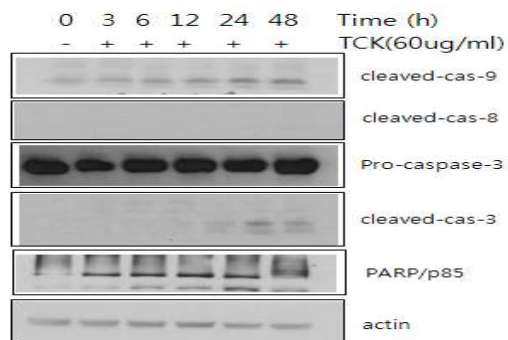


Fig. 5. Effect of TCK on caspase expression and activation. After 3~46 hours of incubation with TCK(60 $\mu\text{g/ml}$), the cells were lysed, and cellular proteins were western blotted. Caspase-9 activity was up-regulated in TCK treatment time 12 hours to 48 hours. Cleaved procaspase-3, subsequently PARP in MCF-7 cell. Significant cleavage of PARP was observed at 12 hours after TCK treatment.

6. G2/M phase 조절단백질에 미치는 효과

Western blot analysis 결과, ATM 인산화 level이 천화분 처리 후 24~48시간까지 증가하였으며, ATM에 의해 조절되어지는 그 하위단계에 있는 chk2의 인산화 level 역시 48시간째 확연히 증가하는 것을 확인하였다. Chk2의 하위단계에 있는 cdc25C 역시 24시간째 미미하게 증가하였고, cdc2(Tyr15)의 인산화 잔기가 천화분 처리 후 48시간째 증가하였으며, 결국 cyclin B의 level을 조절하였다(Fig. 6).

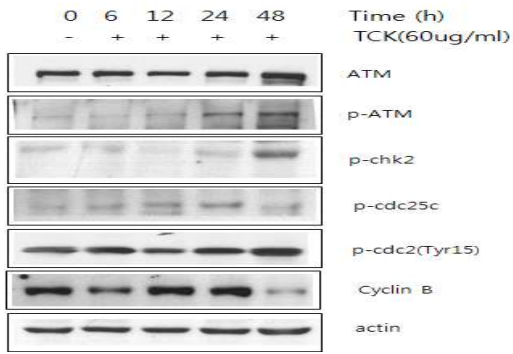


Fig. 6. G2/M phase arrest is dependent on ATM pathways. After 6~48 hours of incubation with TCK(60 μ g/ml), the cells were lysed and cellular proteins were western blotted. TCK induced ATM, chk2, cdc25C phosphorylation in MCF-7 cell for indicated periods. In addition, cdc2 phosphorylation and cyclin B level were regulated by interaction with cdc25C.

고찰

Apoptosis와 세포주기 억제는 무수히 많은 연구에서 항암제 개발에 높은 빈도로 target이 되고 있다. Apoptosis는 조직의 항상성이나 발생 과정에서 일어나는 것으로 세포가 이겨낼 수 없는 자극이 가해질 때 개체를 보호하기 위해 진화적으로 생겨난 과정이라고 알려져 있다¹⁴⁾. Apoptosis 메커니즘의 핵심요소는 caspase라는 proteolytic system으로¹⁵⁾ extrinsic pathway를 통한 caspase-8과 intrinsic pathway와 관련된 caspase-9는 다른 downstream effector caspase인 caspase-3, -6, -7들을 활성화시킨다. 그 중 caspase-3의 활성화는 apoptosis 과정에서 핵심적인 역할을 하며 세포 내 많은 단백질 poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP), gelsolin, retinoblastoma (Rb)와 b-catenin 등을 분해시킨다¹⁶⁾.

Ataxia telangiectasia mutated kinase(ATM)은 serine/threonine kinase이며 세포주기와 DNA의 복구를 조절하는데 이것의 인산화는 두 가닥의 DNA사슬에 손상을 가져 온다¹⁷⁾. 이 ATM에 의해 조절되어지는 protein들 중 세포주기와 관련된 protein들로 p53, Chk2, Chk1, CtlP, 4E-BP1, BRCA1, RPA3, H2AX, SMC1, FANCD2 및 Rad17과 같은 것들이 있다¹⁸⁾.

Chk2가 포함하고 있는 amino-terminal domain으로는 7개의 serine 또는 threonine잔기(Ser19, Thr26, Ser28, Ser33, Ser35, Ser50 and Thr68)가 있는데, 이것은 ATM/ATR kinase에 의해 쉽게 인산화 된다^{19,20)}.

Cdc25는 인산화효소에 반응하는 단백질로 dephosphorylating되거나 cdc2를 activation시킴으로써 진핵세포

의 체세포분열을 조절하는데 중요한 역할을 한다²¹⁾. 또한 이것은 세포주기 간기에서 c-TAK1에 의해 Ser261잔기가 인산화 되며, 이것은 DNA 손상에 의한 G2/M phase arrest와 관련된다²²⁾.

Cdc2는 이것의 kinase 활성화에 의해 진핵세포의 체세포분열을 조절하는 단백질로 세포주기를 도는데 중요한 protein인 cyclin의 binding을 조절하며, cdc2의 두 가지 잔기인 Tyr14와 Tyr15의 인산화는 cell cycle을 조절하는데 중요한 것으로 나타난다²³⁾. 이 두 잔기의 인산화는 Wee1과 Myt1과 같은 protein을 억제할 수 있다^{24,25)}.

과루의 뿌리를 봄이나 가을에 채취하여 외피를 벗겨내고 작게 토막내 건조시킨 것이 천화분으로 이것의 유효성분은 다종의 단백질 혼합성분인 trichosanthin이다. 천화분은 淸熱生津, 淸肺化痰, 消腫排膿의 효과가 있어 口渴, 消渴, 黃疸, 咳血, 癰腫 등을 치료한다²⁶⁾.

천화분을 이용한 항암연구로는 HepA-H cell과 HeLa cell의 MTT assay와 현미경 분석 결과 HeLa cell만 세포증식억제효과가 있다는 연구¹⁰⁾와 ME-180 cell에서 caspase-3을 활성화시켜 세포 사멸을 일으킨다는 연구¹¹⁾ 및 B16/F10 melanoma cell의 tyrosinase activity와 melanin synthesis를 억제한다는 연구¹²⁾, B16-F10 melanoma cell, CT-26 cell, Hep-G2 cell, HT1080 cell, SNU-1 cell에서 HUVEC(혈관신생 내피세포)을 억제하고 Anchorage dependent colony assay를 통해 세포증식이 억제된다는 연구¹³⁾가 있다.

본 연구에서는 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포를 이용하여 세포증식억제 및 기전, 혈관신생억제에 대한 효과를 알아보았다. 이에 세포증식억제와 관련된 apoptosis의 유발과 경로, 세포주기의 변화 및 세포주기조절에 관련된 인자들의 단백질 변화 여부를 조사하였다.

먼저 천화분이 MCF-7 세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 WST-1 assay와 microscope 관찰을 하였다. 그 결과 천화분을 처리한 그룹에서 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제되는 것을 WST-1 assay로 확인하였고, 농도가 증가할수록 세포의 부착력 상실이 늘어나고 apoptotic body가 나타나는 것을 현미경으로 확인하였는데, 이는 세포질의 응축으로 인해 세포의 부착력을 상실한 것으로, 세포질의 응축변화는 천화분 처리 후 1시간 만에 눈으로 확인되었다.

이러한 차이를 수치로 나타내기 위해서 FACS 실험을 통한 PI 염색방법을 이용해 apoptosis 수치를 나타내는 subG1의 양의 변화를 확인해보았다. PI 염색결과 천화분 처리 48시간 후에 subG1이 약 20% 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포주기의 변화를 관찰한 결과 G2/M phase arrest가 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 그 정도가 12시간째에 약 60%가량 증가하였고, 24시간째에는 50%가량을 유지하는 것으로 봐서 시간이 지나면서 효과가 떨어지는 것을 짐작케 하였다.

FACS 결과를 바탕으로 천화분에 의한 MCF-7 세포의 감소는 G2/M phase arrest가 apoptosis를 유발하여 감소된다는 사실을 알 수 있었으며, 이를 확인하기 위해 apoptosis 및 G2/M phase 관련 인자들을 western blot analysis를 통해 살펴보았다.

Apoptosis pathway는 일단 미토콘드리아를 통한 intrinsic pathway와 death receptor를 통해 caspase-8의 활성을 일으키는 extrinsic pathway가 있다²⁰⁾. 이러한 apoptosis pathway가 활성화 되면, 최종적으로 caspase의 최하위 단계이며, 세포사멸 과정에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 caspase-3이 활성화 되고, 세포내에서 PARP나 retinoblastoma (Rb)와 같은 단백질을 분해시킨다²¹⁾. 이에 먼저 caspase-3과 PARP의 발현 및 활성 정도를 확인하였는데 천화분에 의해 이 두 단백질의 활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 천화분에 의한 apoptosis의 활성이 intrinsic pathway를 통한 것인지 또는 extrinsic pathway를 통한 것인지 알아보기 위해 caspase-8과 caspase-9의 활성을 관찰한 결과 caspase-9의 활성은 증가한 반면 caspase-8은 변하지 않는 것으로 보아 천화분이 intrinsic pathway를 통해 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

또한 ATM, chk2 인산화 level을 천화분이 조절한다는 결과를 바탕으로, DNA damage에 의해 G2/M phase arrest를 유발시킨다는 사실을 확인할 수 있었으며, 이는 결국 cdc25C 인산화와 cdc2/cyclin B의 interaction에 의해 세포주기를 arrest시킨다고 할 수 있겠다.

이상의 결과로, 천화분을 MCF-7 세포에 처리하였을 경우 세포의 증식을 강하게 억제하는 것으로 나타났고 세포의 형태도 변화시켰다. 이러한 세포의 증식억제는 천화분이 DNA damage를 통해 G2/M phase arrest를 유발하여 결국 intrinsic pathway를 통한 apoptosis를 유도시켜 나타나는 결과였다. 그러나 천화분이 어떤 pathway를 통해 cell cycle arrest를 시키고 세포의 활성을 억제시키는지, 뿐만 아니라 다른 유전학적 특성을 가지고 있는 인체 유방암 세포에서의 효과 및 혈관신생억제를 통한 암전이 억제에 대한 보충 연구 역시 향후 추가로 연구해 보아야 할 것이다.

결 론

본 실험은 MCF-7 인체 유방암 세포주에서 천화분의 항암효과 및 기전을 확인하고자 수행하였으며, 세포증식억제 확인을 위해 WST-1 assay를 시행하였고, FACS 및 western blot analysis를 이용하여 세포사멸, 세포주기변화 및 cell cycle 관련 인자와 caspase의 활성을 확인하였다.

WST-1 assay 결과 천화분을 MCF-7 세포에 48시간 동안 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포증식이 감소하였다.

천화분 처리후 FACS 결과 subG1 부분이 약 20%까지 증가하는 것을 확인하였으며, G2/M phase arrest가 나타났다.

Western blot analysis를 통해 caspase-9, caspase-3 및 PARP의 활성화를 확인하였고, ATM에 의존적으로 Chk2 및 cdc25C의 인산화가 일어나는 것을 확인하였으며, 결국 cyclin B가 감소하였다.

이와 같은 결과로 볼 때, 천화분에 의한 MCF-7 인체 유방암 세포주의 세포증식 억제기전은 DNA damage에 의해 G2/M phase arrest가 일어나고, 결국 intrinsic pathway를 통해 apoptosis를 유도시켜 세포증식이 억제된다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 경원대학교의 지원을 받아 수행되었음에 감사드립니다(과제번호 2011-R233).

참고문헌

1. 통계청. Death Rate, 2008.
http://kosis.kr/themes/themes_02List.jsp
2. Wu, C., Ray, R.M., Lin, M.G., Gao, D.L., Horner, N.K., Nelson, Z.C., et al. A case-control study of risk factors for fibrocystic breast conditions: Shanghai nutrition and breast disease study, China, 1995-2000. *Am J Epidemiol.* 160(10):945-960, 2004.
3. Horner, M.J., Ries, L.A.G., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlader, N., et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. National Cancer Institute, 2009.
4. Soung, M.G., Joo, S.M., Song, A.R., Sung, N.D. QSAR on the inhibition activity of flavopiridol analogues against breast cancer MCF-7. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 147-153, 2007.
5. Chen, W.F., Huang, M.H., Tzang, C.H., Yang, M., Wong, M.S. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease.* 1638(2):187-196, 2003.
6. Lozoya, M. Hypoglycaemic activity of *Opuntia streptacantha* throughout its annual cycle. *Am J Chin Med.* 17: 221-224, 1989.
7. Park, C., Moon, D.O., Ryu, C.H., Choi, B., Lee, W., Kim, G.Y., Choi, Y. Beta-sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin.* 29(3):341-348, 2008.
8. Woyengo, T.A., Ramprasath, V.R., Jones, P.J. Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr.* 63(7):813-820, 2009.
9. 신민교. 원색임상분초학. 서울, 영림출판사, pp 241-242, 250-252, 283-284, 1983.
10. Dou, C.M., Li, J.C. Effect of extracts of trichosanthes root tubers on HepA-H cells and HeLa cells. *World J Gastroenterol.* 10(14):2091-2094, 2004.
11. 이현희, 임은미. 자궁경부암세포에 대한 天花紛의 성장억제 및 세포사멸효과. *대한한방부인과학회지* 18(3):77-91, 2005.
12. Oh, H., Mun, Y.J., Im, S.J., Lee, S.Y., Song, H.J., Lee, H.S., Woo, W.H. Cucurbitacins from *Trichosanthes kirilowii* as the inhibitory components on tyrosinase activity and melanin synthesis of B16/F10 melanoma cells. *Planta Med.* 68(9):832-833, 2002.
13. 김동우, 이종훈, 유화승, 조정효, 이연월, 손창규, 조종관. 천화분 추출물이 혈관신생 및 암세포 성장에 미치는 영향. *대한한*

- 방내과학회지 29(2):490-499, 2008.
14. Steller, H. Mechanism and genes of cells suicide. *Science*. 267: 1145-1149, 1995.
 15. Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 17(32): 37-45, 1998.
 16. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 278: 294-298, 1997.
 17. Lee, J.H., Paull, T.T. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*. 26(56):7741-7748, 2007.
 18. Tang, X., Hui, Z.G., Cui, X.L., Garg, R., Kastan, M.B., Xu, B. A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 28(8):2559-2566, 2008.
 19. Kastan, M.B., Lim, D.S. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Dec;1(3):179-186, 2000.
 20. Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., Elledge, S.J. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. Sep 12;97(19):10389-10394, 2000.
 21. Jesus, C., Ozon, R. Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis. *Cell Cycle Res*. 1: 215-228, 1995.
 22. Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., Piwnica-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. Sep 5, 277(5331):1501-1505, 1997.
 23. Atherton-Fessler S., Liu, F., Gabrielli, B., Lee, M.S., Peng, C.Y., Piwnica-Worms H. Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. *Mol Biol Cell*. Sep;5(9):989-1001, 1994.
 24. McGowan, C.H., Russell, P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J*. Jan, 12(1):75-85, 1993.
 25. Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A., Hunter, T. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J Cell Sci*. Oct, 112(19):3361-3371, 1999.
 26. 전국한의학대학교 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림출판사, pp 165-166, 2007.