

췌장암 세포주 MIA PaCa-2에서 황백 물 추출물에 의한 Apoptosis 유도 및 작용기전

이인영¹ · 정황산¹ · 원진희^{1,2,*}

1: 원광대학교 한의과대학 내과학교실, 2: 한국전통의학연구소

Apoptotic Effect of Phellodendri Cortex Water Extract on MIA PaCa-2 Cells

In Young Lee¹, Hwang San Jeong¹, Jin Hee Won^{1,2,*}

1: Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, 2: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study is to investigate the apoptotic effect of Phellodendri Cortex water extract (PCWE) on pancreatic cancer cells and to find out the regulating mechanisms. Human-derived pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2 cells were treated by PCWE with various concentrations and the cytotoxicity was determined by MTT assay. The activation of Annexin V, DNA fragmentation, cell cycle arrest and caspase activation were observed to investigate the role of PCWE in pancreatic cancer cells. Also, to find out the regulating mechanisms, we examined the ROS production. The treatment of PCWE induced the cell death in both concentration and time dependent manner. The treatment of PCWE also increased the expression of Annexin V, DNA fragmentation, cell cycle arrest, and cleavage of caspase, which means cell-death PCWE induced was apoptosis but not necrosis. The ROS production was increased by PCWE treatment and the blockade of ROS inhibited the PCWE-induced cell death. These results could suggest that PCWE induced apoptosis via ROS release in pancreatic cancer cell.

Key words : Phellodendri Cortex water extract, pancreatic cancer, MIA PaCa-2, apoptosis, ROS

서 론

인체 암 중에서도 예후가 불량한 췌장암은 후복막강에 위치하는 해부학적인 특징으로 인해 조기진단과 외과적 접근이 어려우며 초기에 주위 림프절로 전이가 발생하여 절제 가능한 예가 적다^{1,3)}. 화학요법에 대한 저항성이 강하여 치료가 어렵고 항암제 처리 후 암세포의 약제 민감성 및 신호전달 기전에 대해 뚜렷하게 밝혀져 있지 않아 연구에 제약이 많았다^{4,5)}.

지난 수십 년간 췌관 선암종의 발암과정에 대한 많은 관심을 기울여 왔음에도 불구하고 췌장암의 치료율은 변화가 없으며 오히려 부작용으로 인한 만족도 저하로 인해 전 세계적으로 암환자들의 보완대체 의학에 대한 관심이 증가하고 있다^{6,7)}.

이런 추세에 따라 최근에는 단순히 암의 크기를 줄이거나 생존 기간을 늘리는 치료를 암에 대한 절대적인 치료라고 평가하지

않고 치료 후에 환자의 삶의 질을 유지시키는 것 또한 암 치료 평가에 있어 중요한 지표로 부각되고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 이에 따라 최근 부작용은 적으면서 안정적인 식물유래 천연물을 이용한 암 예방 및 치료 물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있으므로 향후 임상에서 한의학이 기여할 수 있는 부분이 많을 것으로 기대된다^{11,12)}.

본 연구에 사용된 황백(Phellodendron amurense Ruprecht)은 황백나무의 껍질을 말린 것으로서 우리나라 전역에서 자생되고 있다. 性味が 苦寒 沈降하여 腎火를 瀉하고 下焦의 濕熱을 清熱燥濕시키는 特徵이 있어 濕熱로 인한 瀉痢, 黃疸, 淋濁, 足腫과 濕熱瘡毒 등 症을 치료하는 要藥이 된다¹³⁻¹⁵⁾. 황백은 전통적으로 호흡기 질환이나 만성 염증 질환을 치료하기 위해 많이 사용되었다¹⁶⁾. 황백과 황백의 주요성분인 berberine은 중추신경계의 염증과 당뇨 등에 유효하다고 보고되고 있다^{17,18)}. 황백과 berberine은 항염증 효과에 그치지 않고 다양한 세포에서 항암효과를 나타낸다. 구체적으로 황백과 황백의 분획물이 전립선암과 혈액암에서 apoptosis를 유도하여 항암효과가 있다고 보고되어 있다^{19,21)}.

그러나 황백 물 추출물 (Phellodendri Cortex water extract,

* 교신저자 : 원진희, 광주시 남구 주월동 원광대학교 광주한방병원 3내과

· E-mail : wonjh@wku.ac.kr, · Tel : 062-670-6417

· 접수 : 2013/03/06 · 수정 : 2013/03/29 · 채택 : 2013/04/11

PCWE)의 췌장암세포에서 항암효과는 아직 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 췌장암 세포주에서 황백 물 추출물이 apoptosis를 유도하여 췌장암을 억제할 수 있는지를 목표로 진행하였다. 저자는 황백 물 추출물이 췌장암 세포주에 미치는 영향을 알아보기 위하여 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 세포의 생존율 및 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하고 그와 관련하여 황백 물 추출물의 항암 작용 기전을 규명하기 위하여 세포 사멸에 관여하는 reactive oxygen species (ROS)의 활성을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

실험에 사용한 黃柏은 음니허브(경북 영천)에서 구입 후 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 精選하여 사용하였다.

2) 세포주

Human-derived pancreatic adenocarcinoma cell line인 MIA PaCa-2와 pancreatic acinar cell인 266-6은 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다.

3) 시약

Fetal bovine serum (FBS), DMEM medium, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (NY, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 chloroform, Tris-HCl, sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, DCF-DA, n-acetyl cystein (NAC) 등은 Sigma (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, Trizol은 Invitrogen (Carlsbad, USA)사에서, ECL detection 용액은 Amersham (Buckinghamshire, UK)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

황백 물 추출물 (Phellodendri Cortex water extract, PCWE)은 3차 증류수 1 L에 황백 100 g을 넣고 2 시간 30 분 동안 전탕한 액을 -80°C에서 동결 건조시켜 얻어진 분말을 3차 증류수에 녹여서 filter로 여과하여 사용하였다. 동결 건조시킨 후 나오는 가루는 12.3 g으로 수율은 12.3 %였다.

2) 세포배양

5% CO₂, 37°C incubator 조건하에서 10% FBS와 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 배양하였으며 2 일 마다 100 mm dish에 분주하였다.

3) MTT Assay

MIA PaCa-2 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 세포들을 DMEM 배지에서 2×10^5 cells/well의 밀도로 현탁하여 농도(10, 100, 500, 1000 µg/ml)별 시간(24, 48, 72 h)별로 PCWE를 처리하였다. 배

양 후 5 mg/ml의 농도로 MTT 용액을 첨가하고 다시 30 분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO 200 µl를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 해액(解液)을 96-well plate에 loading하여 spectrophotometer (Molecular devices, Palo Alto, USA)를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다. [즉, viability(%) = $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$]

4) FACS analysis

(1) Annexin V-FITC

Annexin V의 발현은 Annexin V-FITC 염색법으로 확인하였다. MIA PaCa-2 세포에 PCWE를 농도별로 처리하여 24 시간 배양한 후, 부착된 세포를 trypsin으로 처리하고 회수하여, PBS (Phosphate buffered saline pH 7.4)로 1회 세척하였다. Binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) 85 µl에 세포를 부유시킨 후 10 µl의 Annexin V-FITC로 15 분간 암반응 시켰다. Binding buffer를 300 µl를 첨가하여 flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, USA)로 분석하였다.

(2) PI (propidium iodide)

세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 PI로 DNA를 염색한 후에 flow cytometry를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. MIA PaCa-2 세포에 PCWE를 처리하여 24 시간 배양 후 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척한 세포(1×10^6 cells)의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20 µg/ml PI, 200 µg/ml RNase)을 600 µl로 20 분 반응하였다. Flow cytometry를 통해 DNA 용적히스토그램을 얻고 sub G1기의 세포수 백분율을 구하여 세포 주기를 분석하였다.

(3) DCF-DA (dichlorofluorescein diacetate)

PCWE에 의한 세포 내 활성화 산소의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포내 hydrogen peroxide (H₂O₂)와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. MIA PaCa-2 세포에 PCWE를 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하기 전에 10 µM DCF-DA를 처리하여 37°C에서 20분 동안 배양하였다. 배양한 세포는 PBS로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고 다시 PBS로 세척하여 flow cytometry로 형광을 측정하였다. 정보의 분석은 Cell Quest software (BD Biosciences, San Jose, USA)를 이용하였다.

5) Fluorescence microscopy method

(1) DCF-DA

FACS analysis와 마찬가지로 DCF-DA를 처리한 후 Fluorescence microscopy로 관찰하였다.

6) DNA fragmentation analysis

(1) DNA laddering

Apoptotic DNA ladder kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 이용하여 DNA ladder를 관찰하였다.

(2) DNA fragmentation assay

DNA Activity Detection Kit (Millipore, Bedford, USA)를 이용하여 DNA의 분절 정도를 측정하였다.

7) Western blot analysis

MIA PaCa-2 세포를 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/dish로 세포를 현탁하고 serum free media (DMEM)로 12 시간 starvation 시킨 후 PA을 여러 농도(10, 100, 500, 1000 µg/ml)로 24 시간 동안 전처리 하였다. cold PBS로 3 회 세척한 후, 농도별로 cell을 수확한 뒤 원심분리(5,000 rpm, 5 분)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 µl + protease inhibitor 10 µl)를 넣어 단백질을 lysis시키고 원심분리(15,000 rpm, 20 분)하여 찌꺼기를 가라앉힌 뒤 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4×)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 5% skim milk로 2 시간 blocking 하였다. 1차 항체와 9시간동안 반응을 시키고 PBS로 4회 세척했다. 그 후 2차 항체로 1시간 반응 시킨 후 caspase-3,8,9의 변화를 관찰하였다.

3. 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean ± S.D. 로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 Oneway ANOVA에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. PCWE가 MIA PaCa-2에 미치는 생존율 감소 및 증식억제효과
 항백 물 추출물 (PCWE)이 췌장암 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MIA PaCa-2 세포에 PCWE를 농도 의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 그 결과 PCWE는 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰고 IC₅₀ 값은 500 ug/ml 로 계산되었다(Fig. 1A). 동시에 췌장의 99%를 구성하는 선방세포인 266-6에서는 독성을 보이지 않았다. 이는 PCWE가 췌장의 정상 세포에는 영향을 주지 않으면서 췌장암 세포에 특이적으로 작용함을 보여준다. 또한 췌장암 세포주의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MIA PaCa-2 세포에 PCWE를 처리한 후 24, 48, 72 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 항백 물 추출물은 시간 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 증식을 억제하였다(Fig. 1B).

2. PCWE가 MIA PaCa-2에서 Annexin V 발현 증가 유도

항백 물 추출물 (PCWE)이 유발한 MIA PaCa-2 세포의 세포 사멸이 apoptosis 임을 확인하기 위하여 apoptosis의 여러 가지 지표중의 하나인 Annexin V의 발현을 조사하였다. MIA PaCa-2 세포에 PCWE를 24 시간 동안 처리한 뒤 세포를 순수하게 분리하여 Annexin V를 염색하여 flow cytometer로 분석하였다. 분석

결과 PCWE는 농도 의존적으로 Annexin V의 발현을 증가시켰다(Fig. 2A). 이를 수치로 나타내면 아래의 그림과 같다(Fig. 2B). 100 µg/ml이상의 PCWE에서는 유의성있게 Annexin V의 발현이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 2B). 이 결과는 PCWE에 의한 췌장암 세포의 사멸이 apoptosis와 관련이 있음을 보여준다.

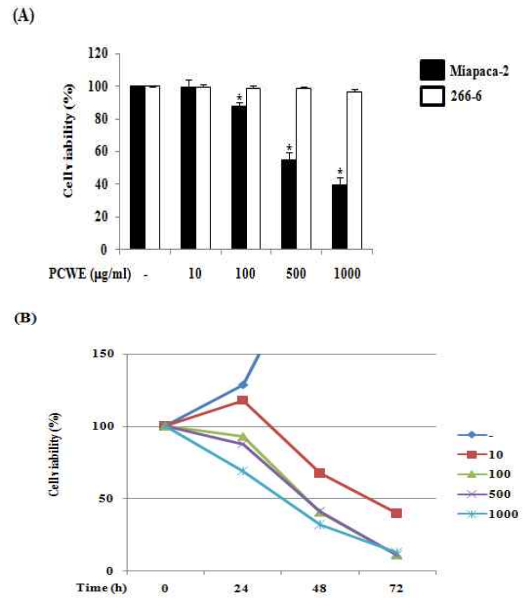


Fig. 1. The cytotoxic effects of PCWE on human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. MIA PaCa-2 and 266-6 cells were incubated with or without PCWE as indicated concentration for (A) 24 h and (B) 24-72 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. *P < 0.05 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

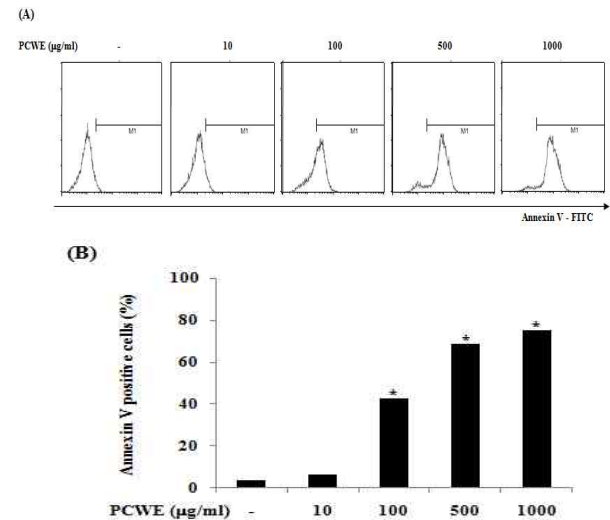


Fig. 2. The effects of PCWE on Annexin V expression in MIA PaCa-2 cells. MIA PaCa-2 cells were incubated with or without PCWE as indicated concentration for 24 h and stained with Annexin V-FITC. (A) The apoptotic positive cells were measured by flow cytometry analysis as described in materials and methods. (B) And the percentage of apoptotic positive cells number was expressed in graph. Data are means of three independent experiments. *P < 0.05 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

3. PCWE가 MIA PaCa-2에서 DNA 분절 유도

황백 물 추출물 (PCWE)이 췌장암 세포주의 apoptosis를 유도하여 세포사멸을 초래함을 더 확실하게 검증하기 위해 세포 내 핵의 DNA 분절을 관찰하였다. PCWE를 MIA PaCa-2 세포에 처리한 후 24시간 뒤에 DNA 분절을 관찰하였다. 그 결과 PCWE를 처리 하지 않은 군과 다르게 PCWE를 처리한 군에서는 DNA의 분절이 일어나 ladder의 형태를 띠는 것을 관찰하였고(Fig. 3A), DNA의 분절정도에 따라 보이는 형광 발현을 측정된 결과 DNA의 분절이 PCWE의 농도 의존적으로 유의성 있게 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 이 결과 (Fig. 3)와 Fig. 2의 결과를 종합해보면 황백 물 추출물이 apoptosis를 유도하고 있음을 알 수 있다.

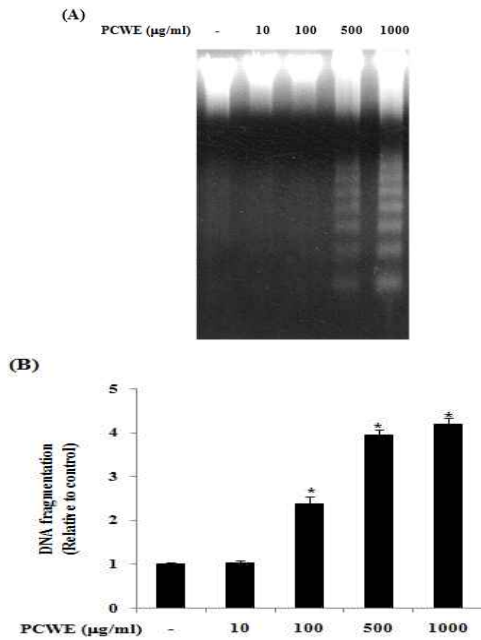


Fig. 3. The effects of PCWE on DNA fragmentation in MIA PaCa-2 cells. MIA PaCa-2 cells were incubated with or without PCWE as indicated concentration for 24 h. (A) The DNA laddering and (B) DNA fragmentation amount were measured as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. *P < 0.05 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

4. PCWE가 MIA PaCa-2에서 세포주기의 sub G1 증가 유도

황백 물 추출물 (PCWE)이 apoptosis를 유발함에 따라서 cell cycle arrest에 영향을 주는지 알아보았다. PCWE를 MIA PaCa-2 세포에 24 시간 처리한 후 순수한 세포를 얻어 세포를 고정시켰다. 고정 후 PI로 염색하여 cell cycle을 측정하였다. PCWE를 처리한 군에서는 그렇지 않은 군에 비해서 sub G1 구간이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이 결과는 PCWE의 췌장암 세포 apoptosis 유도는 cell cycle distribution에 영향을 주어 proliferation을 억제하였음을 보여준다.

5. PCWE가 MIA PaCa-2에서 caspase activation 유도

Caspase의 activation은 apoptosis를 유도한다. 활성화된 초기 caspase 즉 caspase-8, 9는 효과기 caspase인 caspase-3에 작용하여 활성화시킨다. 최종적으로 활성화된 caspase-3는 DNA 분

절화 현상과 핵의 응축을 유도하면서 세포사멸을 일으키는 것으로 알려지고 있다. 따라서 caspase의 활성을 측정하는 것은 apoptosis의 신호 전달에서 아주 중요하다. PCWE를 MIA PaCa-2 세포와 24시간 배양한 결과 caspase-8, 9, 3의 분절이 일어났다(Fig. 5). 이는 PCWE의 apoptosis 유도 기전이 caspase에 의존적임을 보여준다.

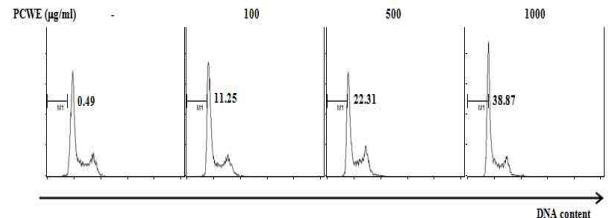


Fig. 4. The effects of PCWE on cell cycle distribution in MIA PaCa-2 cells. MIA PaCa-2 cells were incubated with or without PCWE as indicated concentration for 24 hrs and stained with PI. (A) The number of sub G1 phase cell was measured by flow cytometry analysis. Data are means of three independent experiments. *P < 0.05 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

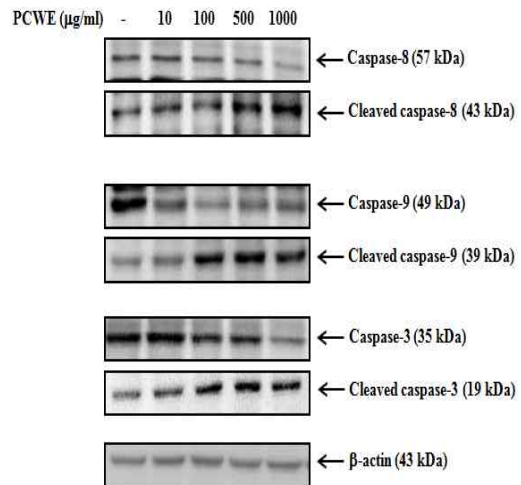


Fig. 5. The effects of PCWE on caspase expression in MIA PaCa-2 cells. MIA PaCa-2 cells were pre-treated with PCWE as indicated concentrations for 24 h. Caspase-8, 9, and 3 cleavage were estimated by Western blot analysis. β-Actin was used as an equal loading control. Detail methods were described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. *P < 0.05 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

6. PCWE가 MIA PaCa-2에서 ROS generation 유도(1)

황백 물 추출물 (PCWE)이 유발한 apoptosis의 원인을 알아보기 위해 reactivity oxygen species (ROS)를 측정하였다. ROS는 기존 보고에서 과산화 상태를 유발하여 세포 사멸을 유도하는 물질로 알려져 있다. PCWE를 24 시간 동안 MIA PaCa-2 세포에 배양한 뒤 세포를 순수하게 분리하였다. DCF-DA 염색 후 ROS의 변화(Fig. 6A and B) flow cytometer와 (Fig. 6C) fluorescent microscopy으로 분석하였다. 분석 결과 PCWE는 농도 의존적으로 ROS의 발현을 증가시켰다(Fig. 6). 이를 통해 황백 물 추출물이 췌장암 세포주에서 ROS를 분비하여 세포 사멸을 유도할 가능성을 시사하였다.

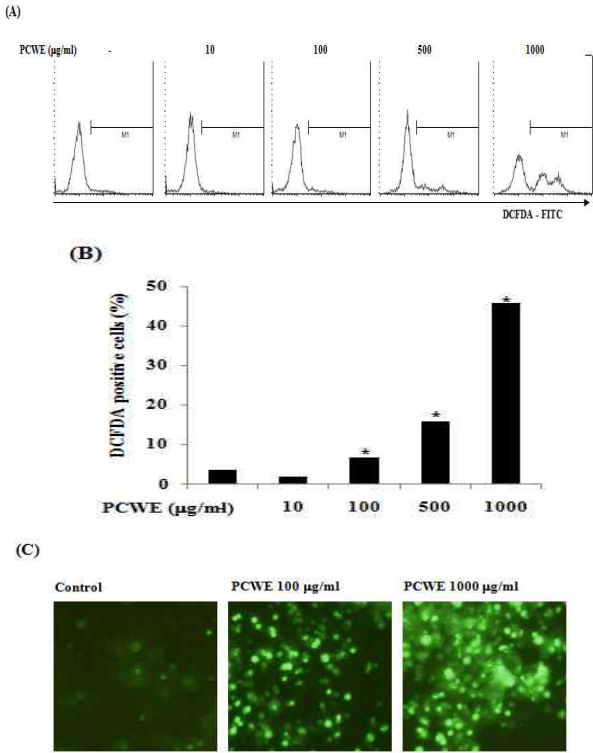


Fig. 6. The effects of PCWE on ROS production in MIA PaCa-2 cells. MIA PaCa-2 cells were incubated with or without PCWE as indicated concentration for 24 h and stained with DCF-DA. (A) The number of DCF-DA positive cells were measured by flow cytometry analysis. And (B) the percentage of DCF-DA positive cells number was expressed in graph. (C) The DCF-DA positive cells were measured by fluorescent microscopy as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. *P < 0.05 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

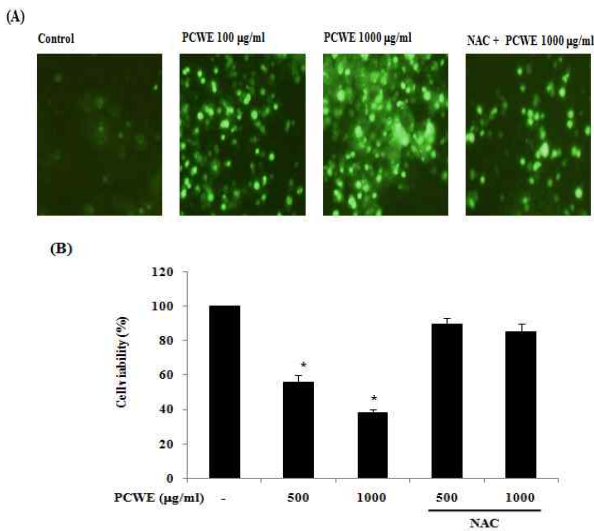


Fig. 7. The role of ROS in PCWE-induced apoptosis in MIA PaCa-2 cells. MIA PaCa-2 cells were pre-treated with or without NAC for 1 hr, and incubated with or without PCWE extract for 24 h. NAC(10 mM) was used as ROS scavenger. All of them stained with DCF-DA. The DCF fluorescence intensity was measured by fluorescent microscopy as described in materials and methods (A). Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods (B). Data are means of three independent experiments. *P < 0.05 : in comparison with saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

7. PCWE가 MIA PaCa-2에서 ROS generation 유도(2)

황백 물 추출물 (PCWE)을 MIA PaCa-2 세포 처리 시 ROS 발현이 증가되는 것을 관찰하였다(Fig. 6). 이렇게 분비된 ROS가 PCWE가 유도한 apoptosis의 주요 원인인지 알아보기 위해 ROS scavenger인 NAC을 처리하여 세포 독성을 파악하였다. Fig. 7A에서 보면 NAC 처리 시 ROS의 발현이 억제됨으로써 NAC이 ROS 저해제로 유효함을 먼저 증명 하였다. ROS 억제 시 세포독성을 파악한 결과 PCWE로 인해 일어난 세포 사멸이 거의 회복되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 7B). 이의 결과로 보아 황백 물 추출물이 유도한 ROS가 췌장암 세포의 apoptosis에 주요한 작용을 함을 알 수 있었다.

고 찰

췌장암은 예후가 아주 불량한 암으로 전 세계적으로 증가하는 추세이며 우리나라도 지난 20년 사이 발병률이 8배 이상 급증하여 보건학적 관심으로 대두되고 있다²²⁻²⁴.

췌장암의 치료는 정²⁵의 연구에 의하면 지난 수년간 시행된 신약의 제 2상 연구결과상 20% 이상의 반응율을 나타낸 약제는 없으며 여러 연구에서 반복적으로 15% 이상의 반응율을 나타내는 약제도 5-fluorouracil (이하 5-FU)를 제외하고는 없었다. 그런데 5-FU 자체도 반응율이 0-60%까지 매우 다양하게 나타나고 있어 표준 함양 치료에 대해 논란이 있음을 보고하였다.

따라서 다른 어떤 암보다 췌장암의 조기발견은 치료와 예후 개선에 아주 중요하나 아직까지는 조기진단의 확실한 방법이 없으며 현재까지 근치 절제술이 최선의 치료 방법이다. 그러나 대부분의 경우 진단 당시 근치 절제가 불가능하여 전신화학요법, 방사선 치료 또는 보존 치료에 의존 한다²⁶⁻²⁸. 그 중에서도 화학요법이 가장 많이 이용되고 있으나 정상세포에 대한 독성을 수반하여 골수조혈기능을 억제하고 소화기관 및 전신에 반응하여 부작용을 유발하여 삶의 질을 저하시키는 문제점들이 지적되고 있다^{29,30}.

이에 따라 최근 부작용은 적으면서 암세포에 특이적 효과를 나타내는 안정적인 천연물을 이용한 치료법의 개발이 요구되고 있으며 향후 임상에서 한의학이 기여할 수 있는 부분이 많을 것으로 기대 된다^{31,32}.

췌장암은 한의학적으로 伏梁, 積聚, 黃疸 등의 범주에 속한다³³. 姜³⁴등은 일반적으로 암은 正氣先虛 留滯邪氣 滯血瘀 邪毒積聚 成塊所形成的 機轉으로 發生된다고 보았다. 따라서 췌장암의 경우 초기에는 活血化瘀, 軟堅散結, 清熱利濕 爲主의 치법으로 접근하나 진행될수록 암환자 대부분이 陰陽氣血이 偏虛한 상태를 나타내므로 환자의 상태에 따라 攻補兼施 혹은 扶正爲主의 방법을 사용하는 것을 중요시하였다³⁵⁻³⁷.

본 실험에 사용된 황백(Phellodendron amurense Ruprecht, PA)의 성분에는 berberine, obaculactone, obacunone, dictamnolactone 등이 포함되어 있으며 주요 약리작용으로는 抗菌作用, 抗炎作用, 降血壓作用등이 있으며 최근에는 면역 활성화와 종양억제에 대한 연구 결과들이 보고되고 있다³⁸⁻⁴³.

저자는 본 연구에서 췌장암 세포주에 있어서 황백 물 추출물의 항암 효과와 그 기전을 실험적으로 규명하고자 하였다. 실험 결과들을 종합해보면 황백 물 추출물은 췌장암 세포주의 생존을 감소 및 증식 억제를 통하여 유효한 효과를 보여주었다. Annexin-V 발현증가, DNA fragmentation, cell cycle arrest 와 caspase activation 등의 실험 결과들로 미루어 보아 췌장암 세포주의 사멸은 apoptosis로 인한 것으로 보였다. 이러한 apoptosis는 황백 물 추출물의 ROS의 생성을 통하여 발생하였으며 ROS의 생성 억제가 췌장암 세포주의 사멸을 억제하였다.

과거에는 항암제의 치료 기전이 단순히 독성에 의한 세포사망이라고 여겨졌으나 발암 과정이 apoptosis와 연관이 있음이 확인되면서 1990년대부터 apoptosis에 대한 연구가 활성화 되었다^{44,47}. 이후 apoptosis 유도 및 관련 유전자를 이용하여 항암효과를 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 항암치료에 대한 내성 발현이나 감수성 저하 등도 apoptosis 신호전달 기전과 밀접한 관계가 있다고 보고 되었다^{46,48}.

Apoptosis란 외부인자의 자극이나 내적인 변화에 의해서 원래 가지고 있던 세포사의 경로가 활성화되어 그 세포가 자발적으로 죽음으로써 개체의 항상성 유지와 손상세포의 제거를 효율적으로 수행하는 자발적이고 능동적인 사망기전이다⁴⁹.

통상적으로 비특이적 세포사멸을 가리키는 세포의 괴사와는 형태학적, 생리학적으로 뚜렷하게 구분된다. 세포 괴사는 직접적으로 독성이 있거나 물리적 상해 등 갑작스런 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정으로 세포막의 붕괴로 인하여 염증을 유발하고 주위 조직과 장기에 손상을 준다^{50,51}. 이와 대조적으로 apoptosis는 세포의 비중감소, 세포막의 파괴, 염색체의 condensation, DNA fragmentation 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체라는 포낭을 형성하면서 단백 분해 효소들이 활성화 되어 식세포 작용이 진행된다⁵².

따라서 정상 조직의 세포 밀도 유지에 중요한 apoptosis에 문제가 생기면 세포의 과잉적 성장에 의해 암을 유발할 수 있으므로 항암치료에 있어 apoptosis 유도 능력이 중요하게 되었다^{44,47}.

본 연구에서도 췌장암 세포주에 대하여 황백 물 추출물이 apoptosis를 유발하는지를 실험적으로 확인한 결과 유의한 결과를 얻었다.

먼저 황백 물 추출물이 인간 췌장암 세포주 MIA PaCa-2의 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. MIA PaCa-2 세포에 황백 물 추출물을 10, 100, 500, 1000 µg/ml를 처치하고 각각 24, 48, 72시간 동안 배양한 후 세포 증식을 관찰한 결과 황백 물 추출물은 농도 의존적으로 MIA PaCa-2 세포의 생존율을 감소시켰으며 시간에 따른 세포의 증식도 유의하게 감소시켰다(Fig. 1).

정상세포에 대한 독성 정도를 파악하기 위하여 췌장 선방세포인 266-6 세포에 대한 세포독성 측정 결과 비교적 독성이 없는 안전한 항암제로서의 가능성이 있는 것으로 나타났다.

다음으로 이러한 생존률 및 증식률의 감소가 apoptosis에 의한 것인지 확인하였다. Apoptosis는 세포가 축소되면서 시작된다. Endonuclease의 활성화로 염색질이 농축되고 세포 소기관들이 뭉쳐서 apoptotic body가 형성되어 탐식되기까지 각 단계별

로 생물학적, 형태학적 지표들을 측정하여 apoptosis 검출에 이용한다⁵³⁻⁵⁵.

본 연구에서는 Annexin V 발현증가, DNA fragmentation, cell cycle arrest 와 caspase activation 등 4가지를 측정하여 apoptosis 지표로 제시하고자 한다.

세포의 apoptosis시 일어나는 변화들 중 세포막의 변화는 그 세포가 완전히 파괴되기 전 탐식세포에 의해 인지되어 처리되도록 하는 아주 결정적인 과정이라고 할 수 있다. 정상적인 세포막은 인지질의 비대칭 구조로 이루어지는데 phosphatidylcholine 과 sphingomyelin이 바깥쪽으로 향하고 phosphatidyl ethanolamine과 phosphatidyl serine (PS)이 안쪽으로 향하고 있다⁵⁶. Apoptosis시에 PS의 전이가 일어나 세포막 안쪽으로 향하던 PS가 바깥쪽으로 향하게 된다. Annexin V는 PS에 친화력이 있는 Ca²⁺ 의존성 인지질 결합단백질로 apoptosis가 시작된 세포막의 PS에 결합됨을 이용하여 조기 apoptosis의 지표로 쓰인다⁵⁷. 따라서 전위된 PS를 형광색소와 공유 결합된 Annexin V로 염색한 후 flow cytometry로 분석한다면 세포막의 구조 변화를 파악할 수 있다.

본 연구에서 황백 물 추출물은 농도 의존적으로 Annexin V의 발현을 증가시켰다. 황백 물 추출물 100 µg/ml 이상에서 유의성 있게 apoptotic positive cells가 있는 것으로 관찰되었고 이는 황백 물 추출물이 췌장암 세포주의 세포막에 구조 변화를 일으켰으며 apoptosis로 이어질 것으로 예측할 수 있었다(Fig. 2).

또한 위의 결과를 뒷받침 하기 위해 DNA를 추출하여 DNA가 분절되었는지를 측정하였다. DNA 분절 분석은 손상된 DNA 양을 측정하는 실험으로 가장 고전적인 apoptosis 분석 방법이다. Apoptosis가 일어나는 동안 nucleosome 사이의 linker region에서 double strand DNA가 절단되어 180-200 base pair 길이의 배수로 절단된 조각이 만들어진다. 이는 agarose gel electrophoresis에서 특징적인 ladder pattern의 band 형태로 나타나는데 괴사에서 나타나는 무작위적인 DNA 분해에 의한 diffuse smear pattern 과 비교된다⁵⁸. 본 연구에서 황백 물 추출물은 농도 의존적으로 DNA 분절을 유도하였음을 알 수 있었다(Fig. 3).

정상세포와 암세포는 모두 세포 주기 조절에 의해 증식과 사멸이 결정된다. 세포주기는 G1, S, G2, M기로 구성되는데 정상세포의 경우에는 어떤 원인에 의하여 DNA가 손상 받으면 세포주기는 G1 phase에서 멈추고 DNA를 복구한 후 S phase로 진행된다. 만일 손상이 심하여 복구가 불가능하면 apoptosis 기전이 작동하여 비정상적인 세포의 증식을 막게 된다. 그러나 암세포는 유전자 변형으로 인하여 세포 주기 조절이 제대로 이루어지지 않아 비정상적인 증식이 발생한다^{59,60}.

따라서 세포 주기의 변화가 나타난다면 apoptosis 여부를 유추해 볼 수 있으므로 황백 물 추출물이 췌장암 세포의 cell cycle 및 proliferation에도 영향을 주는지 알아보았다. 황백 물 추출물을 MIA PaCa-2 세포와 24 시간 배양한 후 순수한 세포를 얻어 고정시켰다. 고정 후 PI를 염색하여 cell cycle을 측정하였다. Apoptosis가 일어나는 세포는 세포막의 투과성 증가로 인해

DNA 양이 소실되어 G0/G1기의 세포들보다 적으므로 PI 용액으로 염색하면 용적 histogram에서 G0/G1기의 세포들보다 더 왼쪽에 나타나는데 이것을 sub-G1이라 한다⁶¹). Apoptosis시 세포 증식은 억제되어 세포주기의 sub-G1 구간이 늘어나게 되는데 황백 물 추출물을 처리한 군에서는 그렇지 않은 군에 비해서 sub-G1 구간이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

본 연구에서 제시할 apoptosis 지표의 마지막은 caspase 활성화로 caspase (cystinyl aspartate-specific protease)는 apoptosis 신호에서 가장 기본이 되는 protein이다. 일반적으로 initiator caspase와 effector caspase로 구분되며 핵과 미토콘드리아 외막에 pro-form으로 존재하고 있다가 신호에 의하여 active-form으로 변화하여 apoptosis가 진행된다^{62,63}). Caspase activation 경로는 세포막 표면에 있는 Fas receptor 같은 막단백질을 통한 신호 (death receptor-induced extrinsic pathway), 미토콘드리아를 매개하여 진행되는 경로(mitochondria-mediated intrinsic pathway) 그리고 endoplasmic reticulum stress에 의한 경로가 연구되어 지고 있으며 면역세포의 granule속의 효소 및 단백질에 의한 경로도 존재한다고 보고되었다^{64,65}). Mitochondria-mediated intrinsic pathway는 caspase-9를 활성화하고 death receptor-induced extrinsic pathway는 Fas/Fas ligand를 통해 caspase-8을 활성화 한다^{31,32}). 그리고 두개 모두 말미에는 effector caspase-3을 통해 apoptosis 기전을 전달한다. 따라서 caspase의 활성을 측정하는 것은 apoptosis 분자적 기전을 조사한다고 볼 수 있다^{66,67}).

이 연구에서 황백 물 추출물은 처리 농도가 증가함에 따라 caspase-3, 8, 9의 분절 및 활성을 유도하였고 이는 황백 물 추출물의 apoptosis 유도 기전이 caspase에 의존적임을 보여준다(Fig. 5).

이상의 4가지 지표들로 미루어 보아 황백 물 추출물 처리로 인한 췌장암 세포주의 사멸은 apoptosis로 인한 것으로 보였다. 다음으로 이러한 apoptosis가 세포내의 ROS (reactive oxygen species)발생 증가와 연관이 있는 지를 확인하기 위하여 ROS의 발현을 측정하였다.

ROS는 유기호흡을 하는 생물에게 있어 필수적인 대사 산물로 생산이 과잉되면 생체에 대한 독성 즉 산화적 손상(oxidative stress)을 야기한다고 인식되어 왔다^{68,69}). 이렇게 노화나 발암의 주요 인자로 인식되어 왔던 ROS가 최근 연구가 진행됨에 따라 새로운 기능들이 밝혀지고 있다. 낮은 농도에서는 세포내 신호전달 반응에 관여하는 2차 신호전달 물질로서 작용하고 많은 양의 ROS는 apoptosis에 관여한다는 사실이 밝혀졌다⁷⁰). 암세포에 있어서도 마찬가지로 ROS는 암세포의 정상생리를 교란시켜 apoptosis를 유발하거나 cell cycle arrest 효과를 나타내어 암세포의 증식을 억제할 수도 있음이 밝혀짐에 따라 ROS는 발암과 항암 매커니즘에 공통으로 관여하는 양면성을 지니고 있다고 볼 수 있다^{71,72}).

본 연구에서는 황백 물 추출물의 항암 효과와 ROS와의 연관성을 확인하였다. 황백 물 추출물을 24 시간 동안 MIA PaCa-2 세포와 배양한 뒤, 세포를 순수하게 분리하여 DCF-DA를 처리한

후 flow cytometer로 ROS의 변화를 분석하였다. 분석 결과 황백 물 추출물은 농도 의존적으로 ROS의 발현을 증가시켰다(Fig. 6). Flourescence microscopy을 통한 관찰에서도 ROS의 발현 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 ROS의 활성 증가와 억제가 세포 사멸과 연관이 있는지를 확인하기 위하여 MIA PaCa-2 세포에 NAC을 1시간 전에 전처리하고 황백 물 추출물을 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포 생존률을 측정한 결과 황백 물 추출물에 의해 나타났던 MIA PaCa-2 세포의 사멸이 ROS 저해제인 NAC에 의해 억제되었다(Fig. 7). 이는 황백 물 추출물의 apoptosis 유도 능력은 ROS에 의존함을 보여준다.

결론적으로 이 실험에서 황백 물 추출물은 ROS 생성을 유도하여 apoptosis를 일으키므로써 췌장암 세포주에 대하여 항암 효과가 있음을 보여주었다. 이는 향후 황백을 통한 추가적인 췌장암 천연물 항암제 개발에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 앞으로 추가적인 실험을 통하여 ROS와 관련된 apoptosis 유도의 정확한 경로에 대한 연구가 수행되어야 할 것이며 황백의 어떤 성분이 항암 작용이 있는 지에 대한 근거를 마련해야 하고 임상 적용 연구가 충분히 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

황백 물 추출물(PCWE)을 인간 유래 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 세포에 처리하여 이들의 apoptosis 과정을 MTT assay, FACS analysis, Flourescence microscopy, DNA laddering assay, Western blot analysis 등으로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

PCWE는 농도, 시간 의존적으로 인간 유래 췌장암 세포주 MIA PaCa-2의 생존율을 감소시켰다(IC50 =500 µg/ml). PCWE는 MIA PaCa-2에서 Annexin V 발현을 증가시켰다. PCWE는 MIA PaCa-2에서 DNA 분절을 유도하였다. PCWE는 MIA PaCa-2에서 세포 주기 중 sub-G1 증가를 유도하여 proliferation을 억제하였다. PCWE는 apoptosis 유도 단백질 caspase-3, 8, 9의 활성을 증가시켰다. PCWE는 농도 의존적으로 ROS 생성을 증가시켰고 이는 apoptosis를 유도하였다.

이상의 실험 결과로 볼 때 황백 물 추출물은 ROS 생성으로 인한 caspase activation을 통해 apoptosis를 유도함으로써 인간 유래 췌장암 세포주 MIA PaCa-2에 유의한 효과를 나타냈음을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2012년 원광대학교의 교비지원에 의하여 수행됨.

참고문헌

1. Bond-Smith, G., Banga, N., Hammond, T.M., Imber, C.J. Pancreatic adenocarcinoma. *BMJ*. 344: e2476, 2012.
2. Hariharan, D., Saied, A., Kocher, H.M. Analysis of

- mortality rates for pancreatic cancer across the world. *HPB* 10(1):58-62, 2008.
3. Song, K.J., Kim, M.Y., Min, J.S. The problems of surgical management in pancreatic cancer. *J Korean Surg Soc.* 38: 583-594, 1990.
 4. Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Pino, M.S., Highshaw, R.A., Dunner, K. Jr, Huang, P., Abbruzzese, J.L., McConkey, D.J. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 65(24):11658-11666, 2005.
 5. Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Dunner, K. Jr, Boise, L.H., Chiao, P.J., Huang, P., Abbruzzese, J.L., McConkey, D.J. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 65(24):11510-11519, 2005.
 6. Ernst, E., Cassileth, B.R. The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: a systematic review. *Cancer* 83: 777-782, 1998.
 7. 보건복지가족부. 우리나라 암 환자가 이용하는 대체보완요법 분류 및 비용 분석. 2005.
 8. Katsumasa Kuroi, Kojiro Shimozuma, Shozo Ohsumi, Hirohisa Imai, Michikazu Ono. Current status of health outcome assessment of medical treatment in breast cancer. *breast cancer.* 14(1):74-80, 2007.
 9. Johnson, J.R., Temple, R. Food and Drug Administration requirement for approval of new anticancer drugs. *Cancer Treat Rep.* 69: 1155-1157, 1985.
 10. 최철민. 간, 담도, 췌장의 진행암으로 내원한 환자의 삶의 질에 대한 분석. *대한한의학회지* 29(4):30-38, 2008.
 11. Surh, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 768-780, 2003.
 12. Lopez-Lazaro, M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents.* 2: 691-714, 2002.
 13. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編著. 本草學. 서울, 영림사, pp 201-203, 221-223, 2007.
 14. 신민교. 임상본초학. 서울, 영림사, pp 367-369, 405-407, 2000.
 15. 안세영, 김순일. 본초정의. 서울, 청흥, pp 113-117, 2009.
 16. Park, E.K., Rhee, H.I., Jung, H.S., Ju, S.M., Lee, Y.A., Lee, S.H., Hong, S.J., Yang, H.I., Yoo, M.C., Kim, K.S. Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis* in animal models of inflammation. *Phytother Res.* 21: 746-750, 2007.
 17. Zhang, J., Yang, J.Q., He, B.C., Zhou, Q.X., Yu, H.R., Tang, Y., Liu, B.Z. Berberine and total base from rhizoma *coptis chinensis* attenuate brain injury in an aluminum-induced rat model of neurodegenerative disease. *Saudi Med J.* 30: 760-766, 2009.
 18. Bhutada, P., Mundhada, Y., Bansod, K., Tawari, S., Patil, S., Dixit, P., Umathe, S., Mundhada, D. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin induced diabetes. *Behav Brain Res.* 220: 30-41, 2011.
 19. Ghosh, R., Graham, H., Rivas, P., Tan, X.J., Crosby, K., Bhaskaran, S., Schoolfield, J., Banu, J., Fernandes, G., Yeh, I.T., Kumar, A.P. *Phellodendron amurense* bark extract prevents progression of prostate tumors in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate: potential for prostate cancer management. *Anticancer Res.* 30(3):857-865, 2010.
 20. Muralimanoharan, S.B., Kunnumakkara, A.B., Shylesh, B., Kulkarni, K.H., Haiyan, X., Ming, H., Aggarwal, B.B., Rita, G., Kumar, A.P. Butanol fraction containing berberine or related compound from nextrutine inhibits NFkappaB signaling and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Prostate.* 69(5):494-504, 2009.
 21. Nishida, S., Kikuichi, S., Yoshioka, S., Tsubaki, M., Fujii, Y., Matsuda, H., Kubo, M., Irimajiri, K. Induction of apoptosis in HL-60 cells treated with medicinal herbs. *Am J Chin Med.* 31(4):551-562, 2003.
 22. Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E., Thun, M.J. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 53: 5-26, 2003.
 23. 보건복지가족부, 암등록통계, 2007.
 24. 통계청. 사망원인계연보-인구동태신고 집계, 2006.
 25. 정현철. 췌장암-항암치료가 필요한가. *대한내과학회지* 57(4):740-749, 1999.
 26. 정성우, 박재연, 김용식, 진윤태, 이홍식, 전훈재, 엄순호, 이상우, 최재현, 김창덕, 류호상, 현진해. 췌장암의 치료방법에 따른 생존분석. *대한소화기학회지* 46(2):120-128, 2005.
 27. 강순호, 최창수, 최영길, 백낙환, 췌장암의 예후. *대한외과학회지* 64(4):332-337, 2003.
 28. 송시영. 췌장암의 원인 및 발암기전. *대한소화기학회지* 51(2):71-83, 2008.
 29. 김동희, 김성훈. 항암제 및 방사선 부작용에 대한 한방요법. *동의병리학회지* 9(1):239-263, 1994.
 30. Chung, Y.T., Park, S.T., Mun, J.Y., Kim, J.M., Choi, M.K., Han, D.S., Kim, B. Cytotoxic effects of actinomycin D, adramycin and puromycin in the development stage of early mouse embryos. *J. Wonkwang Medical Sci.* 3: 13-34, 1987.
 31. Surh, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 768-780, 2003.
 32. Lopez-Lazaro, M. Flavonoids as anticancer agents:

- structure-activity relationship study. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents.* 2: 691-714, 2002.
33. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울, 杏林出版社, pp 19-100, 1995.
 34. 姜延良. 六味地黃湯防法 腫瘤의 害驗研究. 北京, 中醫雜誌. pp 471-474, 1983.
 35. 김한섭, 유봉하, 박동원, 유기원. 암의 치법 처방 및 치료약물에 관한 문헌적 고찰. *대한한의학회지* 10(1):161-166, 1989.
 36. 조영기, 이성균, 이정섭, 남상규, 정현애, 문구, 문미현. 인간 신경모세포종 세포주 LAN5에 대한 부정항암탕(扶正抗癌湯)의 항종양효과. *동의생리병리학회지* 20(6):1548-1555, 2006.
 37. 배원식. 암의 한양방병용치료에 대한 보고. *대한한의학회지* 7(2):53-57, 1986.
 38. 박영순. 한방의 약리해설. 서울, 아카데미서적, p 173, 2002.
 39. 盛腸能, 抗癌治驗本草, 重慶出版社, pp 538-541, 1994.
 40. 서정범. 黃柏 추출물이 대식세포의 면역단백질 생성에 미치는 영향. *경원대학교*. 2010.
 41. 이문조, 박진우, 김동수, 김준기, 최달영, 김철호, 금동수, 김준기, 김철호. 황백 열수추출물의 항산화활성과 아질산염 소거작용에 관한 연구. *동의병리학회지* 13(1):112-119, 1999.
 42. 김의근, 김동일, 이태균, 금의근. 黃柏의 腫瘍抑制 및 免疫活性에 관한 研究. *대한한방부인과학회지* 15(2):19-30, 2002.
 43. 권영모. 황백이 사람 대장암 세포주 HCT116의 Apoptosis 유도 및 MMP-9 발현에 미치는 영향. *동국대학교*. 2007.
 44. Wyllie, A.H. Apoptosis; Cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153: 313-316, 1987.
 45. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1461, 1995.
 46. Raff, M.C., Bares, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishiazki, Y., Jacobson, M.D. Programed cell death and the control of cell survival. *Science.* 262: 695-700, 1993.
 47. Williams, G.T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097-1098, 1991.
 48. 김인경. 아포토시스와 종양성장억제. *대한의학협회지* 37: 1222-1229, 1994.
 49. Kim, W.H. Apoptosis and disease. *Med Postgrad.* 6(24):275-288, 1996.
 50. Amaravadi, R.K., Thompson, C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 13(24):7271-7279, 2007.
 51. Searle, J., Kerr, J.F., Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 17: 229-259, 1982.
 52. Cohen, J.J. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp. Pract.* 28: 35-43, 1993.
 53. Zeng, H., Kong, X., Peng, H., Chen, Y., Cai, S., Luo, H., Chen, P. Apoptosis and Bcl-2 family proteins, taken to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 16(6): 711-727, 2012.
 54. Aluyen, J.K., Ton, Q.N., Tran, T., Yang, A.E., Gottlieb, H.B., Bellanger, R.A. Resveratrol: potential as anticancer agent. *J Diet Suppl.* 9(1):45-56, 2012.
 55. Wang, H., Cho, C.H. Effect of NF- κ B signaling on apoptosis in chronic inflammation-associated carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 10(6):593-599, 2010.
 56. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pals, S.T., van Oers, M.H.J. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420, 1994.
 57. Manon van Engeland, et al. Reutelingsperger : A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cell in culture. *Cytometry.* 24: 131-138, 1996.
 58. Sang-Gyung Kim, Dong-Kun Shin, Jung-Yoon Choe, Jongwon Lee, Eun-Jung Suh, and un-Suk Suh. Quantitation of the Early Apoptotic Cells Using Flow Cytometry. *Korean J Clin Pathol.* 9(1):108-113, 1999.
 59. Muñoz-Pinedo, C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol.* 738: 124-143, 2012.
 60. Ishikawa, K., Ishii, H., Saito, T. DNA damage-dependent cell cycle checkpoints and genomic stability. *DNA Cell Biol.* 25(7):406-411, 2006.
 61. Pardee, A.B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 246: 603-608, 1989.
 62. Mishra, N.C., Kumar, S. Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death. *Indian J Exp Biol.* 43(1):25-34, 2005.
 63. Mita, M., Tolcher, A.W. Novel apoptosis inducing agents in cancer therapy. *Curr Probl Cancer.* 29(1):8-32, 2005.
 64. Gruter, M.G. caspases: Key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 10: 649-655, 2000.
 65. Reed, J.C. Apoptosis and cancer: Strategies for integrating programmed cell death. *Semin Hematol.* 37: 9-16, 2000.
 66. Mocarski, E.S., Upton, J.W., Kaiser, W.J. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat Rev Immunol.* 12(2):79-88, 2011.
 67. Kaufmann, T., Strasser, A., Jost, P.J. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 19(1):42-50, 2012.
 68. Cook, J.A., Gius, D., Wkbk, D.A., Krishna, M.C., Russo, A., Mitchell, J.B. oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *seminars radiat. oncol.* 14: 259-266, 2004.
 69. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. 3rd Edition. 1999.
 70. Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. Reactive oxygen species

- (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 24(5):981-990, 2012.
71. Pelicanl, H., Carney, D., Huang, P. ROS stress in cancer cells and theraputic implications. *drug resist. updates.* 7: 97-110.
72. Valko, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84, 2007.