

Caspase-3을 경유한 동충하초 자실체 유래 4-Acetyl-12, 13-epoxyl-9-trichothecene-3, 15-diol의 방광암 세포주(NBT-II) Apoptosis

김형진, 장선일, 오기수¹, 홍경환¹, 김윤철¹, 배현옥¹, 윤용갑¹, 정헌택¹, 권태오¹
원광대학교 의과대학 미생물 및 면역학교실, ¹원광대학교 의약자원연구센터

Abstract

Apoptosis of 4-Acetyl-12, 13-epoxyl -9-trichothecene-3, 15-diol isolated from the fruiting bodies of *Isaria japonica* Yasuda via Caspase-3 in Bladder cancer Cell line (NBT-II).

H.J. Kim, S.I. Jang, ¹K.S. Oh, ¹K.H. Hong, ¹Y.C. Kim,
¹H.O. Pae, ¹Y.G. Yun, ¹H.T. Chung, ¹T.O. Kwon

Department of Microbiology and Immunology, Wonkwang University,
School of Medicine, Iksan, Chonbug, 570-749, Republic of Korea.

¹Medicinal Resources Research Center of Wonkwang University,
Iksan, Chonbug, 570-749, Republic of Korea.

The fruiting bodies of *Isaria japonica* have been traditionally used in Korea to treat cancer. An apoptosis-inducing compound, 4-Acetyl-12, 13-epoxyl -9-trichothecene-3, 15-diol (AETD), was isolated from the methanol extract of fruiting bodies of *Isaria japonica* Yasuda by bioassay -guided fractionation. The apoptosis of murine bladder cancer cell line (NBT-II) by the compound was accessed by propidium iodide staining flow cytometric analysis, and apoptosis-inducing activity at IC₅₀ concentration (5 nmol/L) was further confirmed by a nuclear morphological change, a ladder pattern of DNA fragmentation, and an activation of caspase-3. These results indicate that

교신저자: 권 태 오

전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 생명자원과학대학

TEL : 063)850-6681

E-mail : agrokto@wonkwang.ac.kr

접수일자 : 2002. 11. 26

수정일자 : 2002. 12. 14

채택일자 : 2002. 12. 21

AETD induces apoptosis of NBT-II cells via expression of caspase-3.

Key word : Murine NBT-II cells, 4-Acetyl-12, 13-epoxyl -9-trichothecene-3, 15-diol (AETD), Caspase-3, Apoptosis.

I. 서 론

그 동안 암을 치료하는데 화학요법이 많이 사용되어 왔는데, 이는 유전자를 손상시켜 세포독성을 유발하는 것으로 알려졌다. 즉, 화학 치료제는 세포사멸(apoptosis) 또는 계획된 세포사멸이라고 알려진 세포사멸 과정을 유도한다는 많은 보고가 있다¹⁻³⁾. 화학요법이 세포사멸 경로를 통해 종양세포들을 죽일 수 있다는 기전에 대한 논쟁의 여지가 있다고 하더라도, 세포사멸을 유도하여 종양을 죽이는 것은 항암제 동정에 새로운 방법으로 인식되고 있다¹⁻³⁾.

Apoptosis는 세포가 죽을 때 분명한 형태적, 생화학적 특징이 나타나는데, apoptosis가 활발한 세포는 인접한 세포에 해를 끼치거나 염증반응을 일으키지 않고 자기 자신만 파괴된다. 이러한 생리적인 심각한 세포 손상과 팽배(swelling) 및 파손(lysis)을 야기하는 괴사(necrosis)와는 다르다⁴⁻⁶⁾. 대부분의 다세포 유기체가 발달하는 동안 apoptosis는 효과적인 기전을 제공하는 반면 바이러스가 감염된 세포(virus-infected cells)와 종양(tumor)같은 원하지 않는 세포는 제거한다¹⁻³⁾.

Apoptosis를 유도하기 위한 화학요법을 연구하기 위해서 apoptosis에 대한 정확한 정의가 필요하다. 이와 같은 목적에 부합하기 위해서 다음과 같은 전통적인 기준이 제안되어 왔다. 첫째, 일반적으로 염색질

응축과 핵분열을 포함한 전형적으로 형태적인 변화가 반드시 광학 현미경으로 관찰할 수 있어야만 하고, 둘째, DNA절편화가 한천 겔(agarose gel) 전기영동에 의해 반드시 증명되어야만 한다. 현재 apoptosis를 확인하기 위한 새로운 방법들은 apoptosis와 관련된 생화학적 결과를 기초로 하여 발달하고 있다⁶⁻⁸⁾.

한편 천연물로부터 분리된 많은 물질들은 암세포를 효과적으로 사멸시킨다는 보고가 많다⁹⁾. 한국을 비롯한 동양에서는 전통적으로 천연물을 이용해 암을 치료해왔다¹⁰⁾. 특히 눈꽃동충하초 곰팡이의 자실체는 한국에서 암을 포함한 수많은 질병 치료에 이용되었지만, 의약적인 특성과 생물작용 성분은 아직까지 규명되지 않고 있다. 최근에 저자들은 백혈병 세포주(HL-60)를 대상으로 눈꽃동충하초의 자실체로부터 분리한 4-Acetyl-12, 13-epoxyl -9-trichothecene-3, 15-diol (AETD)가 강력한 항암효과가 있음을 밝혔다¹⁰⁾.

본 연구는 천연약물(natural medicine)의 apoptosis 유도성분에 대해 연구하는 일환으로 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* YASUDA)의 자실체를 메탄올로 추출한 후 백서 방광암 세포주(NBT-II)를 대상으로 apoptosis의 유도 성분 및 특성과 그 기전을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

DMEM과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, U.S.A)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-L]-2,5-dephenyltetrazolium bromide(MTT), trypan blue, DAPI와 propidium iodide(PI)은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. 모든 용매는 분석 등급으로 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2. 세포배양

백서 유래 방광암 세포주인 NBT-II은 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되는 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였고, 세포의 생존성은 trypan blue를 이용하여 측정하였다.

3. 눈꽃동충하초의 수집 및 배양

본 연구에 사용된 균류는 한국의 전라북도 에 있는 모악산에서 분리하였으며, 한국 우석대 생물학과 조덕현 교수에 의해서 동정되었다. 분리된 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*, voucher No. CHO-6133)는 감자 포도당 배지에 접종하였으며, 25°C에서 균 집락의 직경이 5cm가 될 때까지 배양하였

다. 보통 10일 정도 걸렸으며, 그 때 균 집락은 회색으로 변했다. 배양된 것은 대략 4°C에서 유지하면서 다음 시험 배양에 사용하였다. 계대배양은 1L플라스크에 500 ml의 배지를 채우고 121°C 에서 20분간 소독한 뒤 15°C로 냉각시킨 후 농축 배양에서 얻은 4개의 5 mm agar plugs를 가지고 접종하였다. 플라스크 배양은 25°C에서 3일간 140 rpm하에서 배양하였고, 그런 뒤 4일간 160 rpm으로 배양하였다. 배지는 감자(200g/L), 설탕(30g/L)으로 구성했다. 모든 배양은 암실에서 수행했다. 세 번째 무사 분열은 누에(100g)의 번데기에서 수행되었다. 무사 분열 배지는 121°C에서 40분간 멸균하였다. 배지가 15°C로 냉각된 후에 5ml의 포자용액을 접종하였으며, 25°C의 암실에서 8일간 배양하였다. 8일간 배양 후에 배양 조건을 60%의 습도로 바꾸어서 10일간 암실에서 배양한 뒤, 80%습도에 20°C 2000 lux의 밝기로 30일간 배양했다. 배양 후에 균의 자실체를 수확하였고, 앞으로의 화학적, 생물학적 연구를 위해서 메탄올로 추출했다.

4. AETD의 분리 및 구조결정

눈꽃동충하초(*I. japonica*)의 단편으로부터 건조된 자실체(226g)를 48시간 동안 메탄올(MeOH)로 추출하였다. 메탄올 추출물은 농축하여 물에 현탁시켰다. 그리고 연속적으로 n-hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate (EtOAc)로 분리하였다. EtOAc 용해성 물질(247.5mg)은 증류수에다가 메탄올을 30%에서 100%(v/v)까지 농도 구배 시켜 가면서 C18 flash column chromatography를 시행하였다. 증류수(36.8mg)에 30%-40%의 메탄올을 용출 시킨 분획을 화합하여

증류수에다가 15-35%로 농도를 맞춘 후 CH₃CN을 40분 이상 처리함으로써 HPLC를 예비 역시기(preparative reversed-phase)에 있게 했다. 그런 뒤 화합물 1(12.3mg)을 얻기 위해서 100%의 CH₃CN 10분간 (Alltech HS Hyperprep 100 BDS C18(1.0×25cm;8- μ m 입자크기;2ml/min; 210nm에서 자외선 검출))처리했다. 화합물 1의 구조는 문헌에서 보고된 MS와 MMR자료에 비교해 볼 때 4-acetyl-12,13-epoxy-9-trichothecene-3,15-diol(AETD)로 규명되었다. 이 물질의 순도는 95%이상이었다.

5. 핵 자기 공명 스펙트로메트리

NMR 스펙트라는 Jeol Eclipse-500MHz 분광기를 사용해서 CD₃OD에 기록하였다. 그리고 화학적 변화는 상대적으로 상응하는 잔류 용매 신호(3.30/49.0)를 참조하였다.

6. 질량 스펙트로메트리

MS자료는 전자 부사 이온화 방법에 의한 micro mass Quattro LC에 의해서 획득했다.

7. MTT 분석

NBT-II 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 간단히 말해서 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서 1×10⁶cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간동안 배양한 뒤 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의

용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH4.7))을 첨가함으로써 용해했다. 그리고 계속해서 20-24시간동안 배양하였다. formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

8. DAP/PI를 이용한 핵 염색

NBT-II 세포(1×10⁶cells/ml)는 10 nmol의 AETD를 주입 또는 주입하지 않고 10%의 FBS가 포함된 RPMI 1640배지를 이용하여 6-well dishes에서 배양하였다. 4시간 후에 1 ml의 세포부유액은 3분 동안 1000 rpm으로 원심분리 하여 세포를 침전시켰다. 세포 침전물은 4%의 중성 완충된 포르말린(100 μ l)을 첨가하여 고정했다. 고정된 세포부유액(50 μ l)을 슬라이드에 옮겼고 실온에서 건조하였다. 고정된 세포는 PBS로 3번 세척했고, 건조시킨 뒤, DNA-specific fluorochrom DAPI/PI으로 1분간 염색했다. 부착된 세포는 PBS를 이용해 세척했고, 건조 시킨 후 90% 글리세롤(glycerol)로 마운트(연구용 표본이나 슬라이드를 제작하는 것)시켰다. 슬라이드는 형광현미경을 이용해 조사했다.

9. 흐름세포분석

약물이 처리된 후 HL-60세포(1×10⁶ cells/well)는 원심침전하고 PBS로 세척한 뒤 수확되었다. 세포는 80% 냉장 에탄올로 30분간 고정시켰고, PBS로 세척한 뒤, 1mg/ml RNAses A가 포함된 0.5% Triton X-100 용액 0.25ml로 37℃로 30분간 처리했다. 마지막으로 50mg/ml PI 0.25ml을 첨가하고 암실에서 30분간 방치했다. 표본으로부터 세포 수는 FACS Vantage(Becton

Dickinson, San Jose, CA, U.S.A)로 계산하였다.

10. DNA 절편화 분석

NBT-II 세포(1×10^6 cells/ml)는 6시간 동안 여러 가지 농도의 AETD로 처리했다. 세포는 3분간 1000 rpm으로 원심 분리하고 PBS로 세척한 뒤 수확하였다. 세포침전물은 실온에서 30분간 용출 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5 mg/ml proteinase K, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)을 주입하고 용해했다.

그 후 RNase A(25 mg/ml)를 주입하고 30분간 37°C로 처리한 뒤 모든 단백질을 침전시키기 위해서 단백질 침전 용액을 첨가했다. 그리고 10분간 4°C에서 1300 rpm으로 원심분리 시켰다. 그 후 표면에 떠오르는 것을 표본으로 만들었고 phenol-chloroform(1:1 v/v)로 추출했으며, 그 다음 aqueous phase가 chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v)로 추출했다. DNA는 2배의 isopropanol을 주입하고 침전시켰다. 원심침전으로 얻은 DNA 침전물은 70% 에탄올로 세척했고 건조시킨 후에 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)과 1 mM EDTA로 구성된 TE 완충액으로 용해시켰다. DNA (10 µg)을 1.5%의 한천 겔(5v/cm)에서 전기영동 시킨 후 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색한 후에 자외선 아래에서 관찰했다. apoptosis는 대략 다발 180-200 염기쌍(base pairs, multiples)쯤 되는 올리고뉴클레오타이드 DNA 절편화로 확인했다. 표준 DNA는 1 kbp DNA를 사용하였다.

11. Western blot

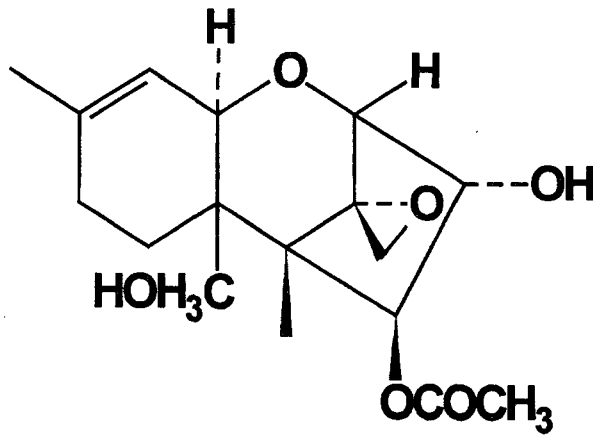
AETD가 처리된 NBT-II 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 µg을 10% SDS-PAGE에 로딩(loading)하여 분리한 다음 transfer solution (20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 T-TBS로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 T-TBS로 3회 세척하고 anti-caspase-3 antibody (1: 1,000)를 주입하여 3 시간 동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG(1 : 100)을 주입하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 T-TBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL 방법으로 발색시켰다.

12. 통계 분석

각각의 실험들은 적어도 3번 이상 실행되었다. 결과는 평균값 ± 표준편차로 표현했다. 통계 분석은 Student's t-test를 이용했다. 유의성의 한계는 p 값이 < 0.05를 기준으로 정했다.

III. 결과 및 고찰

눈꽃동충하초(*I. japonica*)를 발효한 후 자연 건조시킨 자실체를 2일 동안 메탄올(MeOH)로 추출하였다. 메탄올 추출액의 분획으로부터 얻은 AETD를 백서 방광암 세포주(NBT-II)에 넣고 apoptosis이 진행되는지 확인하기 위해서 DAPI/PI 염색, propidium iodide(PI) 염색, DNA



4-Acetyl-12,13-epoxy-9-trichothecene-3,15-diol

Fig. 1. Chemical Structure of 4-Acetyl-12,13-epoxy-9-trichothecene-3,15-diol (AETD) isolated from *Isaria japonica* Yasuda.

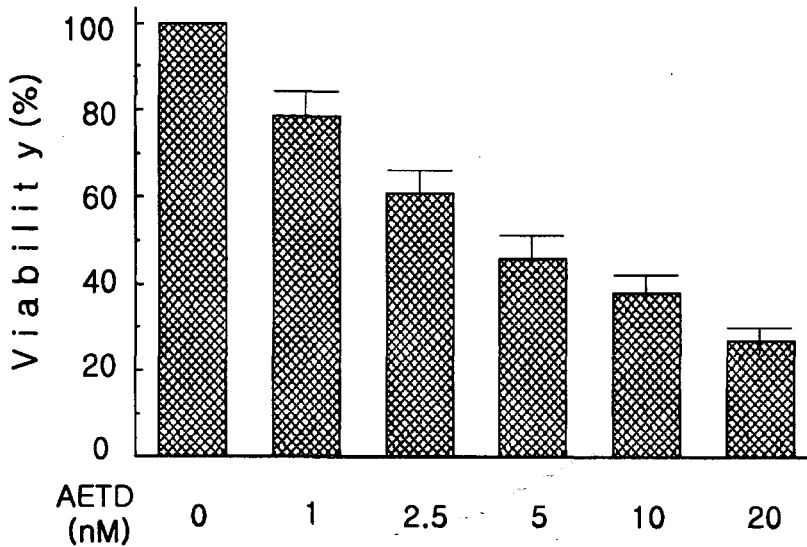


Fig. 2. Dose-dependant cell viability in AETD-treated NBT-II cells. NBT-II (1×10^6 /well plate) with or without AETD for 24 h at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means \pm SD of three independent experiments.

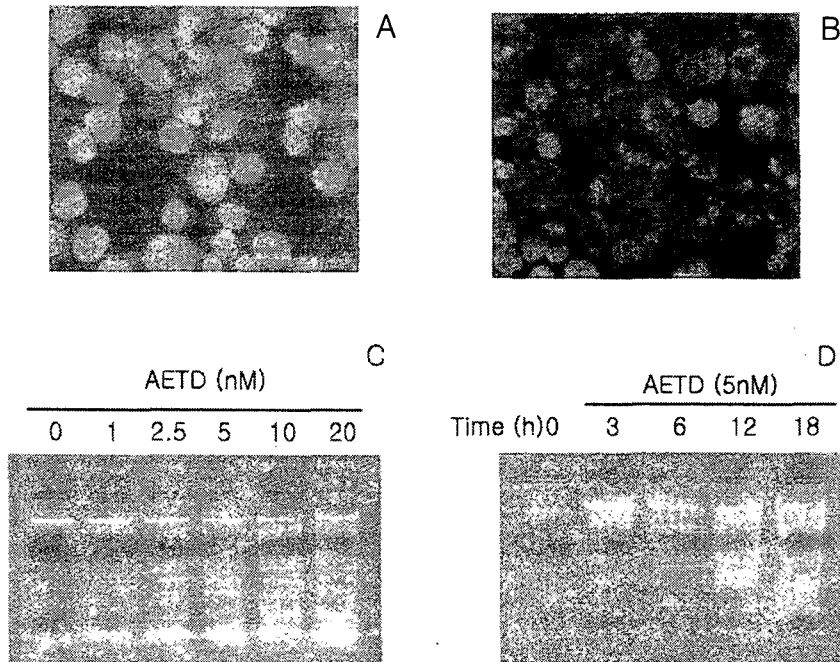


Fig. 3. Apoptotic Effects of AETD on the murine bladder cancer cells (NBT-II). B) Morphological features of the cell nuclei after incubation with 10 nmol/L of AETD for 6 h. Asterisks indicate apoptotic bodies. C) DNA fragmentation in NBT-II cells treated for 5 nmol/L with indicated times. D) DNA fragmentations in NBT-II cells treated for 6 h with indicated concentrations of AETD.

fragmentation 및 caspase 발현 등으로 확인하였다. AETD는 Roush 등¹¹⁾의 문헌과 비교해서 스펙트럼 자료로부터 규명하였다 (Fig. 1).

AETD가 NBT-II 세포에 독성을 나타내는지 알아보기 위해서 MTT 분석을 하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 AETD의 농도가 증가될수록 세포의 생존율이 현저히 억제되었다. 특 AETD의 세포독성은 매우 낮은 농도(IC₅₀값이 5 nM)에서 나타나 암세포 사멸에 큰 가치가 있다는 것을 시사해 주고 있다.

악성 질병 치료에 세포독성 치료제의 하

나의 문제는 심각한 부작용이다. 괴사와 apoptosis은 서로 다른 apoptosis 기전을 가지지만 모든 세포의 세포가 죽어갈 때는 이중 하나의 과정을 거치게 된다¹²⁻¹⁴⁾. AETD에 의한 세포사의 과정을 알아보기 위해서 NBT-II에 5 nmol의 AETD넣은 후 6시간동안 처리하였으며 DAPI/PI로 염색하여 형태 변화를 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3B와 같이 nuclear chromatin의 응축, nuclear fragmentation 및 apoptotic bodies와 같은 apoptosis의 형태적인 특징들이 명확히 관찰되었다. Apoptosis의 생화학적인 특징은 180-200

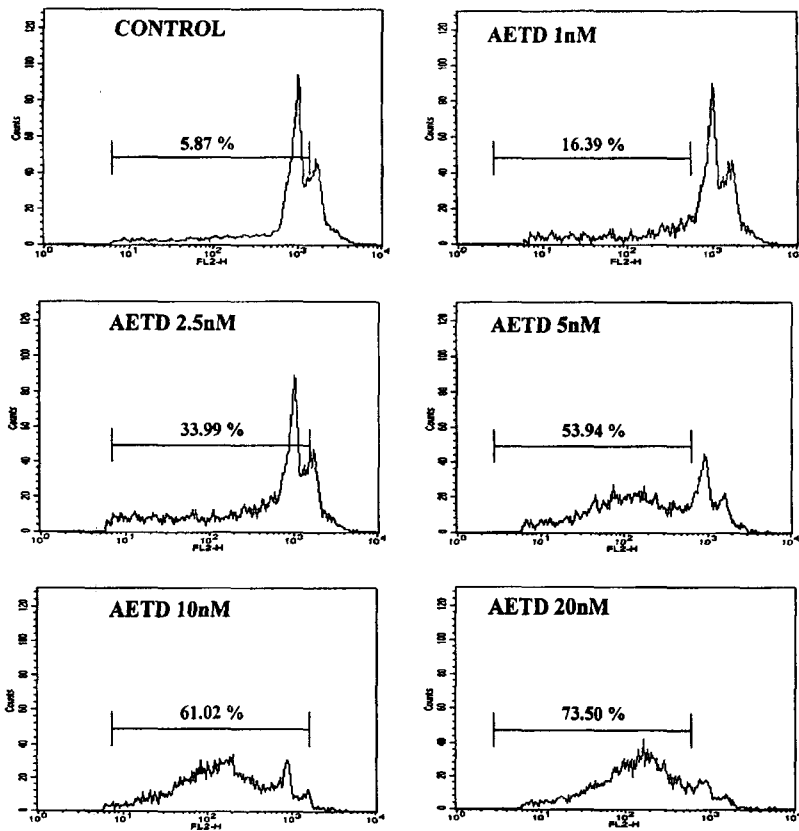


Fig. 4. Flow cytometry analysis for DNA fragmentation after the treatment of the cells with indicated concentrations of AETD for 6h. Percentages indicate fragmented DNA contents (apoptotic peak).

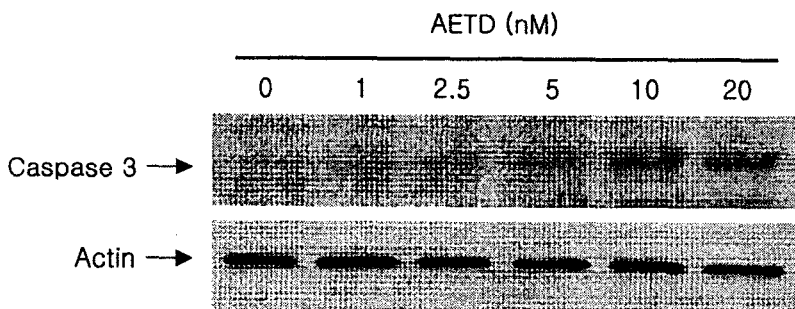


Fig. 5. Immunoblot analysis for caspase-3 expression in the AETD-induced apoptosis. NBT-II (1×10^6 /well plate) with or without AETD for 6 h at indicated doses. Caspase-3 was visualized by western blot analysis as described in materials and methods.

base pair의 이중 나선 DNA 절편속에 internucleosomal region을 자르는 내인성 (endogenous) DNase에 의해 DNA를 절편시킨다¹²⁾⁻¹⁴⁾. 본 연구에서도 이러한 apoptosis의 생화학적 특징을 규명하기 위해서 AETD의 농도와 시간에 따른 DNA의 절편화를 분석한 결과 Fig. 3C와 D에서 나타낸 바와 같이 농도가 증가할수록 DNA 절편화가 가속화 되었으며, 5 nmol (IC₅₀)의 농도에서 3시간부터 DNA 절편이 나타났고 시간이 증가될수록 그 절편화가 가속되었다. 이러한 결과는 apoptosis의 전형적인 생화학적인 특징으로 세포 사멸과 (Fig. 2)과 상관관계가 있는 것을 확인했다.

AETD의 처리 농도에 따른 사세사멸의 정도를 결정하기 위해서 세포를 PI로 염색한 후 flow cytometry로 분석하였다. 즉 apoptosis가 증가되면 세포주기 상 sub-G1 peak(apoptotic peak)가 증가된다^{5), 10)}. 따라서 sub-G1시기의 양을 측정함으로써 apoptosis율을 계산할 수 있다. 본 연구 결과 Fig. 4와 같이 AETD 농도가 증가됨에 따라 apoptotic peak도 증가하였다. 이러한 결과는 AETD가 NBT-II의 apoptosis을 일으킨다고 주장할 수 있다.

한편 세포는 안팎으로부터 수많은 자극에 반응하여 세포가 죽을 것인지 살 수 있는지에 caspase family가 중요한 역할을 한다는 여러 보고가 있다. 그러므로 apoptosis는 caspase family의 활성화로 이루어질 수 있으며 그 중 중요한 인자는 caspase-3으로 알려졌다¹³⁾⁻¹⁶⁾. 본 연구에서는 AETD가 유도하는 apoptosis의 기전을 알아보기 위하여 본 연구에서는 caspase-3와 caspase-8의 발현을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 AETD의 농도가 증가될

수록 caspase-3의 발현이 크게 증가되었다. 그러나 caspase-8의 발현은 전혀 되지 않았다. 따라서 AETD가 유도하는 세포 사멸 기전은 caspase-3을 경유하는 것을 알 수 있었다.

AETD는 scripenetriol의 부산물로서 알려져 있으며, scripenetriol은 trichothecene의 과에 속하는 이차 대사산물로서 *Fusarium* 곰팡이에 의해 생산된 mycotoxin로서 인식되어져 왔다¹⁰⁾⁻¹⁷⁾. Trichothecene은 진핵 세포의 60S ribosomal 소단위에 결합함으로써 단백질 합성을 저해한다^{17), 18)}. 단백질 합성의 저해는 종양 세포의 사멸을 일으킨다.

이러한 사실로 볼 때 AETD에 의한 apoptosis의 유도는 단백질 합성의 저해의 결과라 사료된다. 눈꽃동충하초 (*I. japonica*)의 자실체를 의약적으로 이용하여 암을 치료하는데 있어서, 한국 민간 의학으로 오랜 기간동안 사용되어졌으나, 그 작용 기전에 관한 지식은 충분치 않다. 많은 항암제는 표적세포의 apoptosis을 유도함으로써 그들의 항암기능을 달성한다고 알려져 왔으며, 본 연구에서 조사된 눈꽃동충하초 (*I. japonica*)로부터 분리된 AETD는 apoptosis를 유도하는 항암효과가 뛰어난 의약적 가치를 가질 수 있는 중요한 기전을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다. 저자들은 최근 AETD를 눈꽃동충하초 자실체로부터 분리하여 인간 백혈병세포 (HL-60)을 대상으로 apoptosis를 유도한다는 사실을 확인하였고, AETD가 유도하는 apoptosis는 caspase-3의 활성화를 통해 일어난다는 기전을 밝힌 바 있다¹⁰⁾.

이상의 결과를 요약하면, 백서 방광암 세포주(NBT-II)에서 눈꽃동충하초(*I. japonica*)

로부터 분리된 AETD가 apoptosis를 유도하는 기전은 caspase-3의 발현과 관계가 있음을 밝힘으로써, AETD는 암을 치료할 수 있는 화학요법제로 사용할 수 있을 것이라 사료된다.

IV. 결 론

동충하초(*Isaria*) 곰팡이의 자실체는 전통적으로 한국에서 암 치료에 이용되어왔다. Apoptosis를 유도하는(apoptosis-induced)성분인 4-아세틸-12, 13-에폭실-9-트리코테신-3, 15-디올(4-acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3,15-diol)은 생물분석 유도 분획(bioassay-guided fractionation) 방법을 이용해서 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* YASUDA)의 자실체를 메탄올(methanol)로 추출하여 분리하였다.

4-아세틸-12, 13-에폭실-9-트리코테신-3, 15-디올에 대한 백서 방광암 세포주(NBT-II)의 사멸은 프로피디움 아이오디드 염색(propidium iodide-staining)에 의한 흐름세포분석기(flow cytometric analysis)를 이용하여 측정했고, IC₅₀농도(5 nmol/L)에서 apoptosis를 유도하는 활성은 핵형태 변화(nuclear morphological change), 핵내 DNA 절편의 레더(ladder) 유형과 caspase-3의 활성을 측정함으로써 다시 확인하였다.

이상의 결과를 요약하면, 백서 방광암 세포주(NBT-II)에서 눈꽃동충하초(*I. japonica*)로부터 분리된 AETD가 apoptosis를 유도하는 기전은 caspase-3의 발현과 관계가 있음을 밝힘으로써, AETD는 암을 치료할 수 있는 화학요법제로 사용할 수 있을 것

이라 사료된다.

참 고 논 문

1. Panchal R.G.. Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55: 247-252.
2. Smets L.A.. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs.* 1994; 5: 3-9.
3. Watson A.J.. Review article: manipulation of cell death--the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1995; 9: 215-226.
4. Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E.. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death.
5. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C.. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods.* 2000; 243: 167-190.
6. Loo D.T., Rillema J.R.. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol.* 1998; 57: 251-264.
7. Allen R.T., Hunter W.J. 3rd., Agrawal D.K.. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1997; 37: 215-228.
8. Matsuda S., Minowa A., Suzuki S., and Koyasu S.. Differential activation

- of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 pathways during FTY720-induced apoptosis of T lymphocytes that is suppressed by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Immunol.* 1999; 162: 3321-3326.
9. Zheng S., Yang H., Zhang S., Wang X., Yu L., Lu J., and Li J.. Erratum. *J Cell Biochem.* 2000; 77: 125.
10. Oh G.S., Hong K.H., Oh H., Pae H.O., Kim I.K., Kim N.Y., Kwon T.O., Shin M.K., and Chung H.T.. 4-Acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3,15-diol isolated from the fruiting bodies of *Isariajaponica* Yasuda induces apoptosis of human leukemia cells (HL-60). *Biol Pharm Bull.* 2001; 24: 785-789.
11. Roush W.R., Hagadorn S.M.. Synthesis of mycarose and epi-axenose from non-carbohydrate precursors. *Carbohydr Res.* 1985; 136: 187-193.
12. Shimizu C., Li X., Kimura M., Hashimoto K., Sugaya K., Kubo M., Suzuki S., and Nakayama T.. A novel immunosuppressant, FTY720, increases the efficiency of a superantigen-induced peripheral T-cell deletion whilst inhibiting negative selection in the thymus. *Immunology.* 1998; 94: 503-512.
13. Blagosklonny M.V.. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia.* 2000; 14: 1502-508.
14. Counis M.F., and Torriglia A.. DNases and apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 2000; 78: 405-414.
15. Mak T.W., Yeh W.C.. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res.* 2002; 4 Suppl 3: S243-52.
16. Truong-Tran A.Q., Carter J., Ruffin R.E., and Zalewski P.D.. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals.* 2001; 14: 315-30.
17. Claridge C.A., Schmitz H., and Bradner W.T.. Antitumor activity of some microbial and chemical transformation products of anguidine (4,15-diacetoxyscirpene-3-ol). *Cancer Chemother Pharmacol.* 1979; 2: 181-182.
18. Shifrin V.I., and Anderson P.. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1999; 274: 13985-13992.