

*Paecilomyces tenuipes*로부터 분리한 Acetoxyscirpendiol의 세포사멸작용

한희창 · 김미정 · 김종수 · 김하원#
서울시립대학교 생명과학과 분자면역학실
(Received March 8, 2004; Revised April 9, 2004)

Cytotoxicity of Acetoxyscirpendiol from *Paecilomyces tenuipes*

Hee Chang Han, Mi Jeong Kim, Jong Soo Kim and Ha Won Kim#

Laboratory of Molecular Immunology, Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

Abstract — *Paecilomyces tenuipes* is one of the famous Chinese medicinal entomopathogenic fungi that parasite in the larvae of silkworm. A cytotoxic compound, 4 β -acetoxyscirpendiol (ASD) was isolated from a methanolic extracts of *Paecilomyces tenuipes*. The ASD compound belongs to scirpenol subfamily of trichothecene mycotoxin. In a continuation of the elucidation of the mechanism of ASD, we report here the evidences of induction of apoptosis by ASD in human Jurkat T cell line. In MTT reduction assay for monitoring cell viability, ASD showed strong toxicity. The 50 percent inhibitory concentrations of ASD against human T lymphoid Jurkat cell was 59.5 ng/ml. Phosphatidylserine externalization was increased by ASD at 3 and 6 hrs when compared with that of 6 hrs in the cell line showing in a time-dependent manner. When whole lysates of cells treated with ASD were subjected to western blot assay, 113 kDa poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) was significantly cleaved to 89 kDa fragment. Time-dependent DNA fragmentation was also observed when Jurkat T cells were treated with ASD at 100 ng/ml for 6 hrs and 18 hrs at the ratios of 8.5% and 15.0%, respectively. From these data, Jurkat T lymphocytes treated with ASD from *Paecilomyces tenuipes* underwent typical cascades of apoptotic cell death.

Keywords □ *Paecilomyces tenuipes*, 4 β -acetoxyscirpendiol, apoptosis, PARP, phosphatidylserine

동충하초는 맥각균목의 동충하초과에 속하는 버섯으로써 다양한 곤충의 몸에 기생하다가 여름에 발아하여 자실체를 형성하는 특이한 버섯이다.^{1,2)} 동충하초는 고대로부터 약용으로 많이 사용되기도 하였으며, 그 용도에 대해서는 1757년 청나라시대에 쓰이진 본초종신에 뱀, 신, 피, 가래, 결핵성 기침 등에 유효한 것으로 기록하고 있다.³⁾ 동충하초는 항암작용이 잘 알려져 있으며,⁴⁾ 그 중에서 순수분리되어 연구가 오랫동안 진행되어온 성분으로는 cordycepin이 있으며 항세균, 항진균, 항바이러스⁵⁾ 및 항암작용⁶⁾ 등이 있으며, 최근에 중국에서는 노환에서 오는 만성기침, 천식을 치료하며, 신체의 정력증강과 조절제로써 사용되고 있다.

동충하초는 국내에서도 꾸준히 미기록종이 보고되어 왔으며, *Paecilomyces tenuipes*도 그 중의 하나이며, 초기 발견시에는 *Paecilomyces japonica*로 분류되었지만 지금은 *Paecilomyces tenuipes*로 변경되어 지금까지 사용되고 있으며 눈꽃동충하초로 통용되고 있다. 본 연구팀은 눈꽃동충하초의 자실체에서 4 β -

acetoxyscirpendiol(ASD)라는 세포독성성분을 분리하여 이미 보고한 바가 있다.^{7,8,9)}

ASD는 trichothecene mycotoxin중의 scirpenol의 C-4 위치에 acetyl 기를 1개 가지는 구조이다. Trichothecenes 계열은 ribosome의 peptidyl transfer site에 결합하여 단백질의 합성을 억제한다고 보고되어 있으며,¹⁰⁾ 이 계열은 매우 독성이 강하지만 scirpenol의 유도체는 이와 같은 경향을 따르지 않는데 이는 acetyl 기의 수가 적기 때문으로 보인다.¹¹⁾

Apoptosis 혹은 예정된 세포 사멸은 독성물질 및 다른 요인에 의해 상처를 입은 세포를 제거하기 위한 방편이기도 하지만 암 세포 제거에도 중요한 과정이다. Apoptosis가 일어나면 형태학적 변화와 생화학적 변화가 일어난다. FITC-annexin V와 PI를 이용한 Flow cytometric assay를 통해 necrosis와 apoptosis를 구별할 수 있다.¹²⁾ Annexin V는 칼슘 의존적으로 인지질에 결합하는 단백질로 phosphatidylserine(PS)에 강한 친화성을 갖고 있는데 이 물질은 apoptotic 세포 사멸의 초기 단계에 세포 표면에 나타난다.¹³⁾

Apoptosis에 의한 세포 사멸은 caspase cascade를 거치며 apoptosis의 마지막 단계는 공통된 effector caspase에 의해 일어

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2210-2480 (팩스) 02-2210-2888
(E-mail) hwkim@uos.ac.kr

난다. Apoptosis에 의해 활성화된 caspase-3나 caspase-7은 113 kDa의 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)를 89 kDa과 24 kDa의 질편으로 절단하는데 PARP 효소의 N 말단의 DNA 결합 부위와 C 말단의 촉매 부위로 분리되는 DEVD↓G 서열이 절단된다. PARP는 113 kDa의 nuclear DNA binding protein으로써 전체 핵 단백질 중 1%를 차지하고 있으며 진핵생물에서 주로 발견된다.¹⁴⁾ DNA 손상이 약할 때에는 PARP 활동이 apoptosis로부터 세포를 보호하는데 이는 PARP가 poly(ADP) ribosylation을 통한 pro-apoptotic Ca^{2+}/Mg^{2+} endonuclease를 억제하기 때문이다.¹⁵⁾

Apoptosis에 의해 절단된 DNA의 양은 TdT-mediated dUTP nick-end labeling(TUNEL) assay로 측정할 수 있다. TUNEL assay에서는 FITC로 label된 dUDP가 terminal nucleotide transferase에 의하여 template가 없어도 절단된 DNA의 3'-OH에 결합한다.¹²⁾

본 연구에서는 곤충유래 진균류로 중국에서 의학제로 가치있는 것 중의 하나인 눈꽃동충하초의 자실체에서 순수분리한 ASD가 Jurkat T 임파구 세포에서 phosphatidylserine의 노출, PARP 효소의 절단, DNA 분절화 등을 유발시켜 독성 작용을 나타내며, 이러한 독성작용은 apoptosis의 일환으로 일어남을 증명하였기에 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 재료

Staurosporine, Bradford reagent, Tween 20, MTT 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였으며 4 β -acetoxyscirpenol(ASD, C₁₇H₂₄O₆, MW 324)은 methanol을 이용하여 *Paecilomyces tenuipes*의 자실체에서 순수분리하였다.⁷⁾ Annexin-V/FITC(fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V) kit, Apo-DirectTM(DNA fragmentation detection) kit, mouse anti-human PARP monoclonal antibody는 BD Biosciences Pharmingen(San Diego, USA)에서 구입하였다. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody는 Southern Biotechnology Associates, Inc.(Birmingham, USA)에서 구입하였다. ECL은 Amersham Pharmacia Biotech(USA)에서 구입하였다. Nitrocellulose는 Schleicher & Schuell Inc.(Germany)에서 구입하였다.

세포 배양

Human T-lymphoid Jurkat 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, USA)에서 구입하였다. 이 세포를 10% heat inactivated fetal bovine serum(JRH Biosciences Co., Lenexa, USA)과 penicillin(100 μ g/ml)/streptomycin(100

U/ml)이 함유된 RPMI 1640 배지(Life Technologies, Inc., Eggenstein, Germany)에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 T-25 flask에 배양하였다.

MTT assay

ASD는 소량의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시킨 후 RPMI 1640으로 희석시켜 사용하였다. 시료첨가시와 세포배양시 배지 중의 DMSO 농도는 1.0% 이하로 하였다. 세포 생존율을 측정하기 위해 Jurkat T 세포를 96-well plate에서 ASD와 함께 배양하며 매일 현미경으로 관찰하였으며 3일 후에는 최종적으로 세포생존율을 MTT 법으로 측정하였다. 즉, 5 mg/ml의 MTT 10 μ l를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 추가 배양하여, 0.04 N HCl-isopropanol 100 μ l를 가하여 반복적으로 pipetting하여 모든 crystal을 녹인 후 microplate reader로 측정하였다. reference는 655 nm의 파장을 이용하였으며, test는 540 nm의 파장을 사용하였다.

Annexin V assay

1 $\times 10^6$ 세포를 PBS로 2회 세척 후 annexin V binding buffer를 처리하는데 이 때 1 $\times 10^6$ cell/ml 농도로 하였다. Cell solution 100 μ l에 annexin V-FITC 5 μ l와 50 μ g/ml의 propidium iodide 2 μ l를 처리한 후 암실에서 15분간 실온 상태로 반응시켰다. Annexin V binding buffer 400 μ l를 첨가 후 세포를 flow cytometry로 측정하였다.

유세포분석

Flow cytometric 분석을 위해 FACSCaliburTM를 사용하였다. Annexin V-FITC로 염색한 샘플의 경우 propidium iodide를 처리하였는데 이는 apoptotic cell과 necrotic cell 구별을 위한 것이다. Apoptotic cell은 annexin V-FITC와 결합하고 PI와 결합하지 않은 cell의 %를 취하였다.¹⁶⁾ Apoptosis에 의하여 세포막의 phosphatidylserine의 역전은 반응 초기에 일어나므로 ASD 처리 3시간과 6시간 후에 annexin-V와의 결합율을 측정하였다. 양성대조군으로는 staurosporine을 사용하였으며 매 측정시마다 10,000 세포를 분석하였다.

Western blot 분석

ASD에 의하여 PARP 효소가 절단된 것을 측정하기 위하여 Jurkat T 세포 1 $\times 10^6$ cell에 ASD를 가하여 18시간 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하여 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40, 2 μ g/ml pepstatin A, 2 μ g leupeptin, 104.4 μ g/ml PMSE, 2 μ g/ml aprotinin)를 가하여 30분간 얼음에서 반응시켜 12,000 g에서 원심분리한 후 SDS-PAGE

로 분석하였다. 단백질의 농도는 Bradford 법으로 측정하였다. Lysis시킨 단백질을 30 µg씩 8% SDS-PAGE에 의해 분리 후 nitrocellulose에 electroblot을 하였다. 5% non-fat 우유 분말과 0.1% Tween 20이 첨가된 TBS-T buffer(10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl)에서 2시간 blocking하였다. PARP 단백질의 검출은 mouse anti-PARP monoclonal antibody(1:500)와 goat anti-mouse IgG antibody(1:5000)를 반응시켜 ECL법으로 암실에서 film에 감광시켰다.

TUNEL Assay

Jurkat T 세포를 100 ng/ml의 ASD를 가하여 배양한 후 6시간과 18시간 후에 절단된 DNA의 정량을 TUNEL 법으로 측정하였다. 세포는 2×10^6 cells/ml 농도가 되게 1% paraformaldehyde가 들어있는 PBS를 처리 후 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 5분간 300 g에서 원심분리 후 pellet을 2회 세척하였다. 세포에 PBS를 처리한 후 가볍게 vortexing한 후 1 ml의 빙냉 70% 에탄올을 첨가한 후 -20°C에서 overnight 시켰다. 에탄올 제거를 위해 cell을 wash buffer로 2회 세척 후 50 µl의 staining solution (reaction buffer, TdT enzyme, FITC-dUTP 포함)을 처리하였다. 37°C에서 60분 간 배양 후 cell을 rinse buffer로 2회 세척 후 PI/RNase staining buffer 0.5 ml를 처리한 후 실온에서 30분간 암실에서 배양하였다. 마지막으로 PI/RNase solution에 있는 세포를 flow cytometry로 측정하였다.^{12,17)}

실험결과 및 고찰

ASD의 세포 독성

Jurkat T 세포에 다양한 농도의 ASD를 처리한 결과 농도의존적으로 세포 성장이 억제되었다. ASD를 0, 25, 50, 100, 250, 500 ng/ml로 처리하여 72시간 후에 540 nm에서 MTT에 의한 흡광도가 각각 1.40 ± 0.01 , 1.14 ± 0.07 , 0.78 ± 0.02 , 0.36 ± 0.01 , 0.38 ± 0.01 , 0.38 ± 0.03 이었다. 양성대조군으로 사용된 staurosporine도 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 Jurkat T 세포에 대한 ASD와 staurosporine에 의한 50% 억제 농도인 IC₅₀는 각각 59.5 ng/ml과 20.9 ng/ml이었다(Fig. 1). 또한 Jurkat T 세포에 50 ng/ml의 ASD를 가하여 시간 경과에 의한 세포의 증식을 분석한 결과 6시간까지는 무처리한 대조군과 유사한 증식을 보이다가 6시간 이후에는 증식이 억제되기 시작하였으며, 24시간 이후에는 무처리한 대조군에 비하여 증식이 크게 차이가 났다(data not shown).

ASD는 scirpenol 계열이다. Scirpenol 계열의 구조적 특징은 C-12와 C-13 위치에 epoxide group이 있으며 C-3,4,5 위치에 3개의 hydroxyl group이 있다. ASD는 구조적으로 *Fusarium*, *Cordyceps*, *Paecilomyces*와 같은 불완전균류에 의해 생성되는

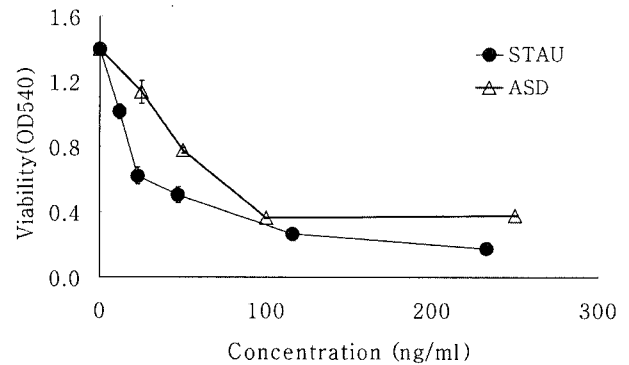


Fig. 1 - Cell viability in response to 4β-acetoxystaurosporine in Jurkat T cells. Jurkat T cells were incubated with staurosporine (STAU) and 4β-acetoxystaurosporine (ASD) for 72 hrs at various concentrations at 37°C in a humidified 5% CO₂ environment. The measurement of cell viability were performed through MTT reduction assay. The means ± S.D. of 3 determinations are presented.

sesquiterpenoid 대사물질이다. 일부 trichothecene 계열 화합물은 진핵세포의 60S ribosome subunit에 결합하여 peptidyl transferase 활성을 억제함으로써 단백질 합성을 차단한다.¹⁸⁾ 그들은 또한 c-Jun N-terminal kinase(JNK)와 p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)를 활성화시킴으로써 apoptosis를 일으킨다. 단백질합성을 억제시킬 경우에도 apoptosis를 일으킨다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 따라서 ASD는 단백질합성 차단과 MAPK를 활성화시킴으로써 apoptosis를 유발시킬 수도 있다.

세포막의 역전

Apoptosis가 유도되면 초기 현상 중의 하나로써 세포막의 역전이 일어난다. 따라서 세포막 내부를 향하고 있던 phosphatidylserine(PS)가 세포막 외부에 노출된다. Annexin V는 PS와 친화력이 강하므로 annexin V-FITC를 반응시켜 세포막 역전 현상을 FACSCalibur로 측정하였다. Jurkat T 세포에 50 ng/ml의 ASD를 처리한 후 3시간과 6시간 후에 PS가 세포 외부로 노출된 세포의 비율은 각각 9.3%와 11.7%이었다(대조군은 각각 4.7%와 3.3%이었음). 양성대조군인 staurosporine을 93 ng/ml 농도로 처리한 경우에 3시간과 6시간 후에는 각각 23.3%와 28.3%의 세포에서 세포막의 역전이 일어났다(Fig. 2). ASD 또는 staurosporine을 처리한 후 3시간 후에 이미 PS의 세포외 노출 현상은 ASD에 의하여 necrosis가 아닌 apoptosis가 유도되기 시작하였음을 시사한다.

독성물질이나 병원성 환경에 의해 일어나는 apoptosis나 necrosis는 완전히 다른 것으로 간주된다. 세포사멸의 2가지 일반적인 형태는 같은 자극에 같은 세기로 자주 노출시 조직이나 세포에서 동시에 일어날 수 있는데 이는 apoptosis나 necrosis 중의 하나이며, 유세포분석기로 구별할 수 있다.¹⁹⁾ 최근에는 FITC-

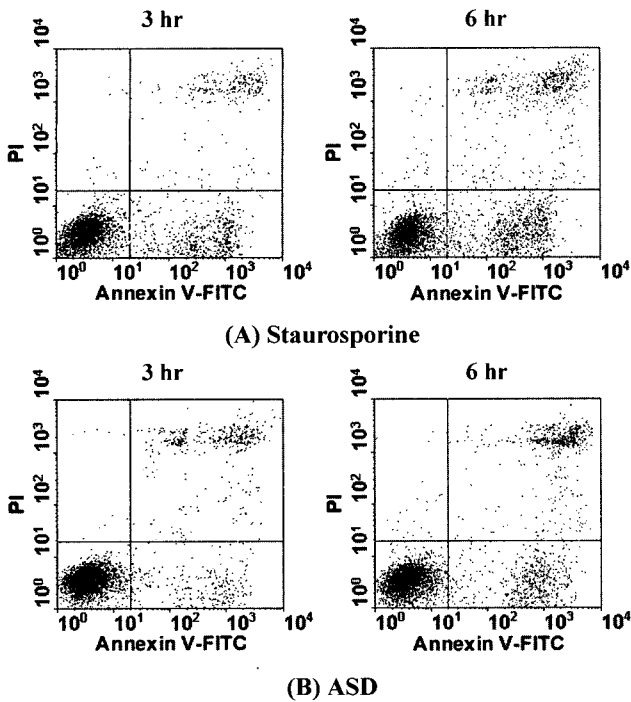


Fig. 2 - Redistribution of phosphatidylserine to the outer surface on Jurkat T cells induced by 4β-acetoxyscirpentiol. Cells were treated with (A) staurosporine (93 ng/ml) and (B) 4β-acetoxyscirpentiol (50 ng/ml) followed by flow cytometric analysis after 3 and 6 hrs incubations. Propidium iodide (PI) was used as a counterstain.

annexin V와 PI를 이용한 flow cytometric assay를 통해 necrosis와 apoptosis를 구별할 수 있다.¹²⁾ Annexin V는 칼슘 의존적으로 인지질에 결합하는 단백질로 phosphatidylserine(PS)에 강한 친화성을 갖고 있는데 이 물질은 apoptotic 세포 사멸의 초기 단계에 세포 표면에 나타나므로,¹³⁾ ASD에 의해 PS가 세포 외로 전이된 것은 necrosis가 아닌 apoptosis가 진행됨을 시사한다.

PARP의 분절화

Apoptosis가 유도되면 세포질에서 caspase가 활성화되어 PARP를 절단시킨다. 113 kDa의 PARP가 89 kDa과 24 kDa의 조각으로 분해되며 이는 caspase-3과 caspase-7에 의하여 PARP의 DNA 결합 부위와 촉매 부위의 경계 부위 중에서 DEVD↓G 사이가 절단된다. Jurkat T 세포에 100 ng/ml의 ASD를 처리하였을 경우 18시간 후에 PARP의 분절화를 관찰할 수 있었다. 아무 처리하지 않은 대조군에서는 113 kDa의 PARP가 분해되지 않았으나 ASD를 처리한 경우에는 13%의 PARP가 분해되었다. ASD에 의한 PARP의 분절화는 농도 의존적일 뿐만 아니라 시간 의존적으로 나타났으므로(data not shown), ASD에 의하여 caspase가 활성화되었음을 시사한다.

DNA 분절화

Apoptosis와 관련된 DNA 분절화는 DNA fragmentation factor(DFF)에 의해 유도되는데 이는 caspase의 활동, 특히 caspase-3에 의한 것이다. DFF는 2개의 protein subunit인 40 kDa의 caspase-activated nuclease(DFF40/CAD)와 45 kDa의 억제인자(DFF45/ICAD)로 구성되어 있다. Caspase-3에 의해 DFF45/ICAD가 절단되면 DFF40/CAD가 활성화되어 *in vitro* 상에서 nuclease의 활성화, 핵응축, DNA 분절화 등을 유도된다.²⁰⁾ dUTP는 terminal deoxynucleotide transferase(TdT)에 의해 절단된 3'-OH 말단에 결합하므로 apoptosis에 의한 DNA 분절화 현상은 FITC tagged dUTP로 정량화할 수 있다. Jurkat T 세포에 100 ng/ml의 ASD를 6시간, 18시간 처리하였더니 DNA 분절화를 보인 세포는 각각 8.5%, 15.7%였다. DNA가 분절된 세포의 양은 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 4). ASD를 처리한

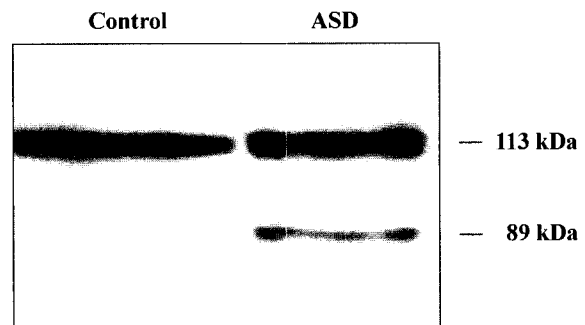


Fig. 3 - PARP cleavage induction by 4β-acetoxyscirpentiol in Jurkat T cell that was treated with 4β-acetoxyscirpentiol (100 ng/ml) for 18 hrs. The cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-PARP mAb after 10% SDS-PAGE. The positions of full-length 113 kDa PARP and of its proteolytic 89 kDa fragment are indicated.

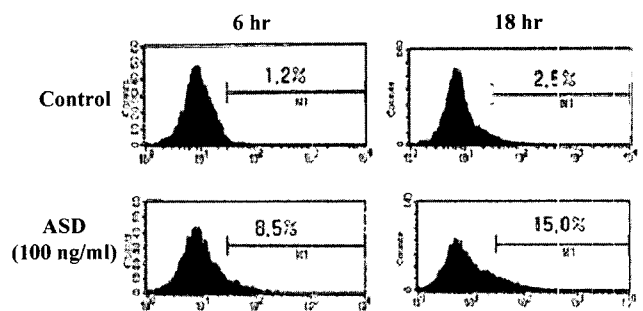


Fig. 4 - DNA fragmentation assay by using FITC-dUTP incorporation. Jurkat T cells were treated with 4β-acetoxyscirpentiol (100 ng/ml) for 6 hrs and 18 hrs. Cells were first fixed in 1% paraformaldehyde in order to fix the small fragments of DNA into the cell and then fixed in 70% ethanol. Fixed cells were stained with FITC-dUTP and PI as described under "Materials and Methods," and incorporation of FITC-dUTP into the apoptotic cells was measured by flow cytometry.

Jurkat T 임파구에서 TUNEL(TdT-mediated dUTP nick-end labeling) assay에 양성을 나타내는 세포의 비율이 증가하였으므로 ASD는 caspase-3을 활성화시켰기 때문으로 여겨진다.

눈꽃동충하초에서 분리한 ASD는 Jurkat T 임파구에서 상기와 같은 전형적인 apoptosis 현상을 나타냈으므로 ASD의 세포독성 작용은 apoptosis에 의한 것으로 여겨진다. 따라서 눈꽃동충하초에서 순수 분리한 ASD는 human T lymphoid Jurkat 임파구의 세포생존을 감소, 세포내막의 PS가 세포외막으로 이동, PARP의 분절화, DNA의 절단현상 등과 같은 apoptosis의 특징을 일관되게 나타내므로 ASD의 세포독성 작용이 apoptosis에 의한 것으로 여겨진다.

결 론

눈꽃동충하초는 항암제로 유명하지만 아직 그 작용기전은 규명되어 있지 않은 형편이다. 본 연구에서는 눈꽃동충하초에서 순수분리한 ASD의 세포 독성 작용 기전을 규명하기 위하여 Jurkat T 세포에 대하여 세포독성, 세포막의 phosphatidylserine의 역전, PARP의 분절, DNA의 절단 현상 등을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 눈꽃동충하초의 ASD는 Jurkat T 세포에 대하여 매우 강력한 세포 독성을 나타내며 IC₅₀ 농도는 59.5 ng/ml이었다.
2. ASD는 시간 의존적으로 Jurkat T 세포막 내의 PI를 세포 외로 역전시키는 작용을 나타내었다.
3. ASD는 PARP의 분절화를 유도시켰다.
4. ASD는 DNA 절단을 유도시켰다.

이러한 현상은 모두 apoptosis의 전형적인 현상으로 ASD의 세포독성 기전은 apoptosis에 의한 것으로 추정되며, 항암제로 개발될 가능성이 높음을 보여주었다.

감사의 말씀

본 연구는 2002년도 서울시립대학교 교내 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 성분분석은 2003년도 서울시립대학교 학술연구용 첨단장비사업계획에 의하여 지원 받았으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Zhu, J. S., Halpern, G. M. and Jones, K. : The scientific rediscovery of an ancient chinese herbal medicine : Cordyceps sinensis Part I. *J. Alternative Complementary Med.* **4**, 289 (1998).
- 2) Zhu, J. S., Halpern, G. M. and Jones, K. : The scientific rediscovery of a precious ancient chinese herbal regimen : Cordyceps sinensis Part II. *J. Alternative Complementary Med.* **4**, 429 (1998).
- 3) 溝口勝 : 健康を蘇らせる奇蹟の菌食・神祕の冬蟲夏草, 八重岳書房, 東京 (1999).
- 4) Yoshida, J., Takamura, S., Yamaguchi, N., Ren, L. J., Chen, H., Koshimura, S. and Suzuki, S. : Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines. *Jpn. J. Exp. Med.* **59**, 157 (1989).
- 5) Richardson, L. S., Ting, R. C., Gallo, R. C. and Wu, A. M. : Effect of cordycepin on the replication of type-c RNA tumor viruses. *Int. J. Cancer* **15**, 451 (1975).
- 6) Cory, J. G., Suhadolnik, R. J., Resnick, B. and Rich, M. A. : Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid of human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **103**, 646 (1965).
- 7) Nam, K. S., Jo, Y. S., Kim, Y. H., Hyun, J. W. and Kim, H. W. : Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sci.* **69**, 229 (2001).
- 8) Chung, E. J., Choi, K., Kim, H. W. and Lee, D. H. : Analysis of cell cycle related gene expression responding to acetoxyscirpenediol isolated from *Paecilomyces tenuipes*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 32 (2003).
- 9) Han, H. C., Lindequist, U., Hyun, J. W., Kim, Y. H., An, H. S., Lee, D. H. and Kim, H. W. : Apoptosis induction by 4beta-acetoxyscirpenediol from *Paecilomyces tenuipes* in human leukemia cell lines. *Pharmazie* **59**, 42 (2004).
- 10) 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.* **4**, 13985 (1999).
- 11) Richardson, K. E. and Hamilton, P. B. : Comparative toxicity of scirpenetriol and its acetylated derivatives. *Poult. Sci.* **69**, 397 (1990).
- 12) Ormerod, M. G. : Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **265**, 73 (2002).
- 13) Tidd, D. M., Spiller, D. G., Broughton, C. M., Norbury, L. C., Clark, R. E. and Giles, R. V. : Oligodeoxynucleotide 5mers containing a 5'-CpG induce apoptosis through a mitochondrial mechanism in T lymphocytic leukaemia cells. *Nucleic Acids Research* **28**, 2242 (2000).
- 14) Alvarez-Gonzalez, R., Spring, H., Muller, M. and Burkle, A. : Selective loss of poly(ADP-ribose) and the 85 kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylation-induced apoptosis of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 32122 (1999).
- 15) Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M. and Garewal, H. : DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA

- repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research* **511**, 145 (2002).
- 16) Singh, N. P. : Rapid communication : A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Experimental Cell Research* **256**, 328 (2000).
- 17) Li, X., Traganos, E., Melamed, M. R. and Darzynkiewicz, Z. : Single step procedure for labeling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY- conjugated deoxynucleotides. Detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry* **20**, 172 (1995).
- 18) Iglesias, M. and Ballesta, J. P. : Mechanism of resistance to the antibiotic trichothecin in the producing fungi. *Eur. J. Biochem.* **223**, 447 (1994).
- 19) Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. : A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* **184**, 39 (1995).
- 20) Widlak, P. : The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta. Biochimica. Polonica.* **47**, 1037 (2000).