

HepG2 간암세포에 대한 附子 추출물의 고사 유도 효과

권강범, 김은경, 정은실, 심정섭¹⁾, 김강산¹⁾, 신병철²⁾, 송용선²⁾, 류도곤
원광대학교 한의과대학 생리학교실, 간계내과학교실¹⁾, 재활의학교실²⁾

The Apoptosis-inducing Effect of *Radix Aconiti* Extract in HepG2 Human Hepatoma Cells

Kang-Beom Kwon, Eun-Kyung Kim, Eun-Sil Jeong,
Jeong-Sub Sim¹⁾, Kang-San Kim¹⁾, Byung-Cheul Shin²⁾
Yong-Sun Song²⁾, Do-Gon Ryu

Department of Physiology, Internal Medicine¹⁾, Rehabilitation Medicine²⁾,
College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objective : This study investigated the apoptotic effect and its mechanism of *Radix Aconiti* (RA) extract and aconitine, which is a major constituent of RA, in HepG2 human hepatoma cells.

Methods : We used MTT and DNA fragmentation assay to investigate cell viability and apoptotic effect on RA extract-treated HepG2 cells. In addition, to clarify the mechanism of RA extract-induced apoptosis, we applied caspase-3 enzyme activity assay and Western blotting method on poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) protein expression.

Results : Treatment with RA extract resulted in the decrease of cell viability, and this effect was caused from apoptosis as confirmed by discontinuous fragmentation of DNA in HepG2 cells, but aconitine did not. Also, RA extract-treated HepG2 cells induced the activation of caspase-3 enzyme activity in time- and dose-dependent manners, which was accompanied by the cleavage of 116 kD PARP to 85 kD product.

Conclusions : These results suggest that the apoptotic effects of RA extract on HepG2 cells could not be explained by aconitine. Additionally, RA extract induced apoptosis in hepatoma cells through caspase-3 activation and subsequent PARP cleavage.

Key Words: *Radix Aconiti*, aconitine, HepG2 human hepatoma cells, apoptosis, caspase-3, poly-(ADP-ribose) polymerase

서론

附子(*Radix Aconiti*)는 毛茛科(미나리아재비과 ; Ranunculaceae)에 속한 다년생초목인 재배종 바꽃의 塊根에 附生한 子根¹⁾으로 陽微欲絕, 陰毒寒症, 大汗亡陽, 吐利厥逆, 心腹冷痛, 四肢厥冷, 脾泄冷利, 命門火

- 접수 : 2004년 2월 10일 · 논문심사 : 2004년 2월 24일
- 채택 : 2004년 3월 5일
- 교신저자 : 류도곤. 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 생리학교실
(Tel. 063-850-6846, E-mail: tkryu@wonkwang.ac.kr)
- 본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(03-PJ9-PG3-20800-0006)에 의해 지원되었음.

衰, 下元虛冷, 陰寒水腫, 風寒濕痺, 久病嘔噦, 踠蹙拘攣, 陰疽冷瘡及一切沈寒痼冷之疾 등^{1-3,6-7)}을 치료하는 것으로 알려져 있다. 실험적으로 이 등⁸⁾은 附子 추출물의 경구투여 및 족삼리 약침이 백서의 체중을 감소시킨다고 보고하였으며, 류 등⁹⁾은 附子 추출물이 신장기능 개선에 대하여 효과가 있음을 보고하였다. 附子の 성분은 落合英三¹⁰⁾이 aconitine을 대표로 하는 맹독성 alkaloid와 atisine을 대표로 하는 저독성 alkaloid로 나누어 설명하였으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

세포고사(apoptosis)란 apo(off: 분리되다)와 ptosis(falling: 떨어지다)의 합성어로 프로그래밍된 세포의 죽음(programmed cell death)을 일컫는 말로서 11) 지나치게 증식된 세포의 제거를 통하여 조직의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다¹²⁾. 그러나 세포고사-신호전달 기전의 교란 혹은 세포고사의 소멸을 야기하는 유전적인 변화는 발암과정에서 중요하게 인식되고 있어¹³⁾ 암세포에서 세포고사를 유도시키는 약재의 개발이 암을 치료하는데 가치 있게 이용되고 있다¹⁴⁾.

한의학에서 암은 체내에 발현되는 腫塊, 質의 堅硬, 岩石과 같은 腫氣 등을 가리키는 것으로 원인은 氣血의 阻滯, 血瘀, 痰凝 등으로 알려졌으며, 치료법은 초기에는 行氣活血 軟堅消積法을 중기에는 攻補兼施法을 말기에는 扶正培本法을 사용하고 있으며¹⁵⁾ 실험적으로 榆根皮, 全蝎 등 한약재의 항암효과에 대하여 발표되었으나¹⁶⁻²¹⁾ 附子에 대한 연구는 접할 수 없었다.

이에 저자는 인간 간암세포종인 HepG2 세포를 이용하여 附子和 附子の 주성분인 aconitine의 세포고사 효과를 조사하였으며, 또한 그 기전을 밝히고자 caspase-3 효소 활성도와 PARP 단백질 발현에 대한 附子 추출물의 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용한 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, Poly-(ADP-ribose) polymerase(PARP) 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diph-enyltetrazolium bromide), Alkaline phosphatase-conjugated mouse IgG secondary antibody, aconitine 등은 Sigma사(Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아 혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 약재의 조제

附子(*Radix Aconiti*) 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저플라스크에 넣고, 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고, 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 27.0g의 분말 시료를 얻었다.

2) 세포배양

사람 간암으로부터 유래된 암세포주인 HepG2(ATCC, USA)는 CO2 세포배양기(37℃, 5% CO2)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

3) 세포생존율 측정

HepG2 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10^4 cells/ml씩 분주하여 24시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 HepG2 세포에 附子 추출물을 48시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세

포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) DNA 분절(fragmentation) 조사

DNA 분절현상을 조사하기 위하여 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하였다. 附子 추출물을 HepG2 세포에 처리한 후 세포를 수확하고 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고, isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액 (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260nm와 280nm의 Spectrophotometer하에서 OD값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 μ g을 2% agarose gel에서 전기영동(100V, 1시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

5) Caspase-3 활성도 측정

세포를 4℃에서 30분 세포파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)과 반응시킨 다음, 14,000rpm으로 15분 원심분리하여 이 때 얻어진 상층액 30 μ g을 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)와 caspase-3의 형광기질인 Ac-DEVD-AFC와 37℃에서 60분 반응시킨 후 fluorometer(F2500, Hitachi, Japan)로 caspase-3 활성도를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(400nm)와 emission wavelength(505nm)를 사용하였다.

6) Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4℃에서 30분 반응시킨 후 30 μ g의 단백질을 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodesyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후 100℃에서 3분 가열하

여 단백질 변성을 유도하고, 10% gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm²)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체 반응을 억제시켰다. PARP에 반응하는 일차항체는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고, TBS-T로 10분 3번 세척한 후 이차항체인 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후 NBT/BCIP 시약을 이용하여 노출시켰다.

7) 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법²³⁾에 의거하여 정량하였다.

8) 통계 처리

실험 결과는 mean \pm S.E.M으로 표시하였으며, 유의성은 ANOVA 검정 후에 Turkey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며, *p*값이 0.05이하인 것 만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 附子 추출물과 aconitine이 HepG2 세포독성에 미치는 영향

HepG2 세포에 附子 추출물을 0.2-5mg/ml의 농도로 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 附子 추출물을 0.2mg/ml, 0.5mg/ml의 농도로 처리한 군의 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 87.4%, 81.7%로 감소하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 附子 추출물을 1, 2, 5mg/ml의 농도로 처리한 군의 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 71.4%(*p*<0.05), 56.2%(*p*<0.01), 40.7%(*p*<0.01)로 유의한 감소를 나타냈으며, IC₅₀ 값은 2.0mg/ml 이하인 것으로 나타났다(Fig. 1). 그러나 附子の 주성분인 aconitine을 5-100 μ g/ml의 농도로 처리한 군의 세포생존율은 변화를 나타내지 못하였다(Fig. 1).

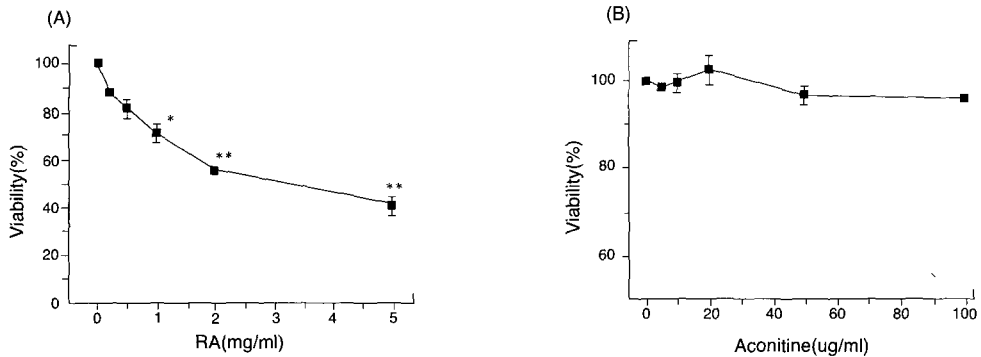


Fig. 1. Effects of *Radix Aconiti*(RA) extract and aconitine on cell viability in HepG2 cells. Cells were treated with various concentrations of RA extract for 48 h. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean \pm S.E.M of four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control.

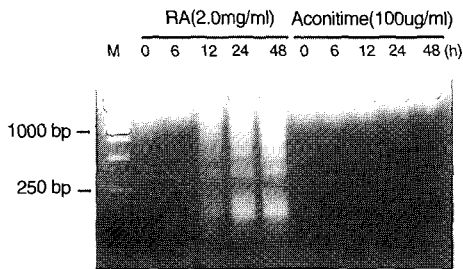


Fig. 2. Effects of *Radix Aconiti* (RA) extract and aconitine on DNA fragmentation on HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 2.0mg/ml RA extract and 100ug/ml aconitine for 48 h. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods.

2. 附子 추출물과 aconitine이 HepG2 세포고사에 미치는 영향

HepG2 세포에 대한 附子 추출물과 aconitine의 세포고사 효과를 관찰하기 위하여 2.0mg/ml의 附子 추출물과 100ug/ml aconitine을 6, 12, 24, 48시간 동안 세포에 노출시킨 후 세포고사의 특징적인 현상중의 하나인 DNA 분절(fragmentation) 현상을 조사하였다. 그 결과 附子 추출물을 HepG2 세포에 노출시킨 후

12시간부터 DNA 분절 현상이 나타났으며, 이 현상은 48시간까지 지속되었다. 그러나 aconitine을 처리한 HepG2 세포에서는 DNA 분절현상이 나타나지 않았다(Fig. 2).

3. 附子 추출물의 caspase-3 활성도에 미치는 영향
 附子 추출물에 의한 HepG2 세포의 고사과정에 caspase-3 활성도의 증가가 관여하는지를 확인하고자 다양한 농도의 附子 추출물을 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 caspase-3에 특정한 형광 염료인 Ac-DEVD-AFC를 이용하여 활성도를 측정하였다. 그 결과 처리한 농도에 의존적으로 활성도가 증가하였으며, 특히 1.0, 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 대조군에 비하여 각각 2.9배($p < 0.05$), 4.5배($p < 0.01$), 4.7배($p < 0.01$)로 나타나 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 3). 또한 2.0mg/ml 附子 추출물을 1, 3, 6, 12, 24시간동안 처리한 후 caspase-3 활성도를 측정한 결과 6시간부터 활성도가 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었으며, 특히 6, 12, 24시간 후에 활성도는 대조군에 비하여 각각 3.1배($p < 0.05$), 3.5배($p < 0.05$), 4.8배($p < 0.01$)로 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 3).

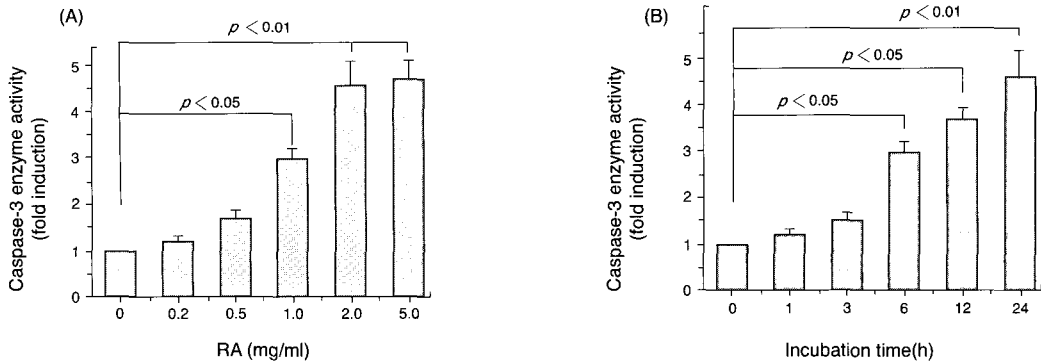


Fig. 3. Effects of *Radix Aconiti*(RA) extract on caspase-3 enzyme activity in HepG2 cells.

(A) Cells were incubated with indicated concentrations of imperatorin for 24 h. (B) Cells were treated with 2.0mg/ml RA extract for indicated periods. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase proteases using fluorogenic peptide, Ac-DEVD-AFC as a substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Values are mean \pm S.E.M. from four experiments.

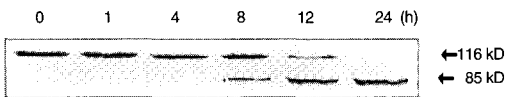


Fig. 4. Effects of *Radix Aconiti* (RA) extract on PARP cleavage in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with various time intervals at a concentration of 2.0mg/ml RA extracts. Lysate from cells was separated on 10.0% SDS-PAGE. PARP on the nitrocellulose membrane was proved with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

4. 附子 추출물이 PARP 절단에 미치는 영향

附子 추출물에 의한 HepG2 세포의 caspase-3 protease의 활성도의 증가를 확인하였으므로 caspase-3 protease의 세포내 기질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP)의 절단에 대한 附子 추출물의 효과를 관찰하고자 PARP 1차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다.

附子 추출물의 처리 농도에 따른 PARP의 절단 효

과를 관찰하기 위하여 HepG2 세포에 1, 4, 8, 12, 24시간 동안 2.0mg/ml의 농도로 노출시킨 후 PARP의 절단 정도를 조사하였다. 그 결과 대조군에서는 85kD의 절단된 PARP가 발견되지 않았다. 그러나 附子 추출물을 처리한 후 8시간부터 85kD의 절단된 PARP가 나타나기 시작하여 그 효과가 24시간까지 지속되었으며, 이에 상응하는 116kD의 PARP가 감소하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 caspase-3 protease 활성도의 증가가 6시간부터 나타난 Fig. 3의 결과와 상응하였다.

고찰

附子(Radix Aconiti)는 aconitine을 위주로 한 맹독성 alkaloid와 atisine을 대표로 하는 저독성 alkaloid 성분을 함유하고 있어¹⁰⁾ 임상적으로 사용 시 주의가 요구되는 한약재 중의 하나로서 다양한 수치를 통하여 aconitine 등의 유독한 물질을 제거한 후 사용하고 있다. 본 연구는 2가지 목표를 달성하고자 수행하였다. 첫째 간암세포종인 HepG2 세포에 대한 附子 추출물의 세포고사 유도효과와 그 기전을 구명하고자 하였으며, 둘째 附子の 세포고사 유도 효과가 aconitine에 의해 일어나는지를 확인하고자 하였다.

Apoptosis(세포고사)는 1980년대 후반기부터 중요 관심분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 세포의 생성, 분화 및 기능발현 등에 중요하게 작용하고 있음이 밝혀졌다^{23,24}. 최근 연구에 의하면 모든 항암제가 암세포에 세포고사를 유발한다는 것을 알게 되었다²⁵. 그러나 이들 항암제는 정상세포에도 거의 같은 정도로 세포고사를 일으켜 부작용이 큰 원인이 되고 있다. 따라서 선택적으로 암세포에만 작용하여 세포고사를 유도하는 것이 항암제 개발의 새로운 목표가 되고 있다²⁶.

실험적으로 세포고사는 빠른 세포 탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질내의 칼슘농도 증가, 염색사 응축(chromatin condensation), 핵의 분절(nuclear fragmentation), endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절(ladder pattern DNA fragmentation, 200 base pairs)형성, transglutaminase의 활성화 및 세포고사 소체(apoptotic body)형성 등과 같은 특징적인 현상을 수반하게 된다²⁷⁻²⁹.

Fig. 1에서와 같이 附子 추출물은 인간 간암세포인 HepG2 세포의 생존율을 처리한 농도에 의존적으로 감소시켰으며 IC₅₀ 값은 약 2.0mg/ml인 것으로 나타났다. 그러나 附子の 독성을 일으키는 주성분인 aconitine은 100 μ g/ml의 농도까지 세포에 처리하였을 경우에도 세포에 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 또한 附子 추출물의 세포고사 유도효과를 확인하기 위하여 IC₅₀ 값인 2.0mg/ml 附子 추출물을 다양한 시간 동안 처리한 후 세포고사의 특징적인 현상 중의 하나인 DNA 분절현상을 확인한 결과 附子 추출물을 처리한 후 12시간부터 사다리 모양의 분절현상이 나타나 48시간까지 지속되었다(Fig. 2). 그러나 aconitine을 처리한 군에서는 분절현상이 나타나지 않아 세포고사를 유도하지 못하는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 附子 추출물의 HepG2 세포에 대한 증식 억제효과는 세포고사 유도 효과에 의한 것으로 추측할 수 있으며, 이러한 附子の 효과는 주성분인 aconitine에 의한 것은 아닌 것을 알 수 있었다. 그러나 aconitine 이외에 다른 성분이 附子 추출

물의 세포고사 유도효과를 주도하는지 여부는 완전히 배제할 수 없었다.

최근 세포고사 유도 기전으로 중요시되고 있는 caspase(cystein aspartate specific proteinase) protease family는 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화되어 세포의 구조와 기능 유지에 필요한 단백질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP), inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease(ICAD), 그리고 actin, fodrin, lamin 등과 같은 단백질들을 절단하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다³⁰⁻³⁹. 14종류의 caspase family 중 caspase-3가 세포고사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{30,37}.

附子 추출물은 HepG2 세포에 대해 농도와 시간에 의존적으로 caspase-3 효소의 활성도를 증가시켰으며, 특히 2.0mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리할 경우 대조군에 비하여 4.8배 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). 附子 추출물에 의한 caspase-3 활성도의 증가는 116kD의 DNA 복구 효소인 PARP를 85kD으로 절단하여 caspase-3 protease 활성도의 증가와 상응하였다(Fig. 4). 이러한 결과로 附子 추출물에 의한 간암세포의 고사 유도 효과는 caspase-3 활성도의 증가에 따른 PARP의 절단에 기인한 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 附子 추출물은 HepG2 세포에 고사효과를 나타내었으며, 이는 附子の 주성분인 aconitine에 의한 것은 아닌 것으로 나타났다. 또한 附子 추출물의 세포고사효과는 caspase-3 활성도의 증가에 의한 PARP의 절단과 관련이 있는 것으로 사료된다.

결론

인간의 간암세포종인 HepG2 세포를 이용하여 附子 추출물과 aconitine의 세포고사 효과와 그 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 附子 추출물은 HepG2 세포의 생존율을 농도 의존적으로 감소시켰으나 aconitine은 생존율에 변화를 나타내지 못하였다.

2. 附子 추출물은 HepG2 세포의 DNA 분절 현상 시간 의존적으로 유도하였으나 aconitine은 DNA 분절 현상을 유도하지 못하였다.
3. 附子 추출물의 HepG2 세포에 대한 고사효과는 caspase-3 활성도의 증가에 의한 PARP 절단에 기인하였다.

이상의 결과들로 附子 추출물은 인간 간암세포인 HepG2 세포에서 세포고사 효과를 나타내었으며, 이러한 효과는 caspase-3 활성도 증가에 의한 PARP 절단에 기인하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 申估求. 申氏本草學名論. 서울:壽文社. 1982:23-29.
2. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:南山堂. 1986:263-5.
3. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1980:384,446,732.
4. 高本劉. 新編中藥大辭典. 台北:新文豐出版公司. 1984:270-4,322,545,1166-9.
5. 中華人民共和國衛生部藥典委員會. 中華人民共和國藥典(一部). 北京:人民衛生出版社. 1985:157-8.
6. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大辭典(第3卷). 東京:講談社. 1982:268-71.
7. 繆希雍. 神農本草經疏. 서울:驪江出版社. 1986:579-82.
8. 이진목, 김경식, 장종덕, 김기영. 附子 경구투여 및 죽삼리 약침이 정상 백서의 체중, 혈청 변화에 관한 연구. 침구과학회지. 1999;16(1):269-82.
9. 류도곤, 강순수. 附子 전탕액이 가토의 부신피질 및 신장기능과 혈장 Renin 활성도에 미치는 영향. 대한동의생리학회지. 1989;3(2):25-48.
10. 落合英三. トリカブト根の鹽基成分に就して. 日本東洋醫學會誌. 1968;19(2):1-11.
11. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. Annu Rev Physiol. 1998;60:533-73.
12. Nayfield SG, Karp JE, Ford LG, Dorr FA, Kramer BS. Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 1991;83:1450-59.
13. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. Cancer Metastasis Rev. 1995;14:3-15.
14. Schulte-Hermann R, Bursch W, Low-Baselli A, Wagner A, Grani-Kraupp B. Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis. Cell Biol Toxicol. 1997;13:339-48.
15. 文九. 암 동서의 결합치료(1권). 익산:원광대학교 출판국. 1999:1-22, 255-58,381-6,413-9,477,488.
16. 하지용, 정병익, 이선구, 유병길. 大七氣湯이 항암, 면역조절작용 및 apoptosis에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(1):111-24.
17. 진선두, 신상우, 양재하, 권영규, 김광중. 녹차의 주성분인 epigallocatechin gallate의 항암활성과 apoptosis 기전에 관한 분자생물학적 연구. 동의생리병리학회지. 2001;15(4):611-20.
18. 한상일. 유근피 추출액이 HepG2 간암세포에 미치는 항암효과 및 기전에 대한 연구. 원광대학교 대학원. 1999.
19. 전영세. 간암세포에 미치는 전갈 전탕액의 사멸효과 및 기전에 대한 연구. 원광대학교 대학원. 2003.
20. 백경현. 금은화 Ethyl acetate분획이 인체 구강유상피암종세포에 미치는 항암효과. 원광대학교 대학원. 1998.
21. 박명오. 소엽의 가용성 부탄올 분획이 인체 구강유상피암종세포에 미치는 항암효과. 원광대학교 대학원. 1998.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
23. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. Science. 1993;262:695-700.
24. Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267:1456-62.
25. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nature Review Cancer. 2002;2:277-88.
26. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell. 2002;108:153-64.
27. Wyllie AH, Kerr JF. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980;68:251-306.
28. Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis: a turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. J Biol Chem. 1998;273(12):7141-7.
29. Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today. 1993;14:126-

- 30.
30. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90:405-13.
31. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*. 1997;275:1122-6.
32. Vaux DL. CED-4-the third horseman of apoptosis. *Cell*. 1997;90:389-90.
33. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.
34. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994;371:346-7.
35. Wang ZQ. Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribose)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev*. 1995;9:509-20.
36. Chang LC, Tsai TR, Wang JJ, Lin CN, Kuo KW. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(1):21-5.
37. Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene*. 1997;14:1007-12.
38. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997;278:294-8.
39. Zhivotovsky B, Burgess DH, Vanags DM, Orrenius S. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;230:481-8.