

# 白芍藥 추출물의 전립선 암세포 고사 유도 효과 및 기전 연구

권강범 · 김은경 · 김경중 · 강길성 · 김영선 · 김인규 · 김인섭 · 김인수 · 이수경<sup>1</sup> · 서은아<sup>2</sup> · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 재활의학교실, 2: 원광대학교 생활과학대학

## Study on Apoptosis-Inducing Effects and Mechanism of *Radix Paeoniae Alba* Extract in DU145 Human Prostate Cancer Cell

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Koyung Jong Kim, Gil Seong Kang, Young Sun Kim, In Kyu Kim, In Seob Kim, In Soo Kim, Su Kyung Lee<sup>1</sup>, Eun A Seo<sup>2</sup>, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, School of Oriental Medicine,

1: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine,

2: Department of Food and Nutrition, School of Human Environmental Science, Wonkwang University

The aim of this study was to investigate the apoptotic effect and its mechanism on *Radix Paeoniae Alba* Extract(RPAE) in DU145 human prostate cancer cell line. RPAE induced apoptosis in a dose-dependent manner in DU145 cells as confirmed by both discontinuous DNA fragmentation using Hoechst33342 staining and poly-(ADP-ribose) polymerase(PARP) cleavage, which are apoptotic signs. To clarify the mechanisms on RPAE-induced apoptosis, we examined the p50(NF-κB subunit), IκBα, PTEN and Par-4 protein expression using Western blotting. Treatment with RPAE resulted in the decrease of p50 expression by IκBα increase, which resulted in Par-4 increase and bcl-2 decrease in DU145 cells. These results suggest that apoptosis of DU145 cells by RPAE involved decreases of NF-κB activation and bcl-2 expression, increase of Par-4 protein expression.

Key words : *Radix Paeoniae Alba*, DU145 human prostate cancer cell, apoptosis, NF-κB, Par-4, bcl-2

### 서 론

전립선암이란 전립선 속에 암세포가 발견되는 병으로서 미국이나 유럽에서는 암으로 인한 사망자의 2번째 요인으로 빈도 높은 암으로<sup>1)</sup> 초기에 국소적인 부위에 국한되어 나타나는 남성호르몬 의존형(androgen dependent)으로 존재하며 이에 대하여 남성호르몬 중지(androgen ablation)법의 치료를 시행하고 있으나<sup>2)</sup> 대부분의 남성호르몬 의존형 전립선암은 3년 이내에 남성호르몬 중지 치료법에 반응하는 세포고사(apoptosis)에 내성을 지니게 되어 남성호르몬 비의존형(androgen independent) 전립선암으로 진행하게 된다<sup>3,4)</sup>.

전립선암을 치료하는데 화학요법이 많이 사용되어 왔는데 화학치료제(chemotherapeutic agent)는 세포고사 또는 계획된 세포사멸(programmed cell death)이라고 알려진 세포사멸 과정을

유도한다는 많은 보고가 있다<sup>5-7)</sup>. 최근 한약재로부터 분리된 많은 물질들이 암세포를 효과적으로 사멸시킨다는 보고가 되고 있다<sup>8,9)</sup>.

白芍藥(*Radix Paeoniae Alba*)은 毛茛科(함박꽃과, Ranunculaceae)에 속하는 多年生 草本인 함박꽃나무의 根으로<sup>10-14)</sup> 氣味는 味 酸 苦, 性 微寒하고 肺·脾·肝에 歸經하고 散熱散瘀·和血緩和·滋養強壯의 效能이 있고 頭痛, 腰痛, 手足拘攣 및 婦人病을 치료하는 것으로 알려져 있다<sup>10-14)</sup>.

이에 저자는 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145 세포를 이용하여 白芍藥 추출물의 세포고사 유도효과를 조사하고 그 기전을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) 약재

본 연구에 사용한 白芍藥은 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2004/09/30 · 수정 : 2004/11/04 · 채택 : 2004/11/30

2) 시약

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Alkaline phosphatase-conjugated mouse and rabbit IgG secondary antibody 등은 Sigma사(Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였으며, Poly-(ADP-ribose) polymerase(PARP), Par-4, p50, IκBα 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 약재의 조제

白芍藥(Radix Paeoniae Alba) 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저 플라스크에 넣고, 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고, 회전 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 41.97g의 분말 시료를 얻었다.

2) 세포배양

사람 전립선암으로부터 유래된 세포주인 DU145(ATCC, USA) 세포는 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 약 48 시간 주기로 배양액을 교체하면서 log phase에 있는 세포에 白芍藥 추출물을 처리한 후 세포고사 효과와 이와 관련된 신호전달 기전을 조사하였다.

3) 세포생존율 측정

DU145 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10<sup>4</sup> cells/ml씩 분주하여 24시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 DU145 세포에 白芍藥 추출물을 24시간 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 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) Hoechst 33342 dye를 이용한 핵 염색

DU145 세포 (1×10<sup>6</sup>cells/ml)를 10%의 FBS가 포함된 RPMI 1640배지를 이용하여 6-well dishes에서 배양하였다. 24시간 후에 1 ml의 세포부유액은 3분 동안 1000 rpm으로 원심분리 하여 세포를 침전시켰다. 세포 침전물은 4%의 중성 완충된 포르말린(100μl)을 첨가하여 고정했다. 고정된 세포부유액 (50μl)을 슬라이드에 옮겼고 실온에서 건조하였다. 고정된 세포는 PBS로 3번 세척했고, 건조시킨 뒤, nucleus-specific Hoechst 33342 염료(1 μg/ml)로 10분간 상온에서 염색한 후 PBS를 이용해 세척했고, 건조시킨 후 90% 글리세롤(glycerol)로 마운트 (연구용 표본이나 슬라이드를 제작하였다. 슬라이드는 형광현미경 (Olympus, Japan)을 이용해 조사했다.

5) Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후

30μg의 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°C에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고, SDS gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm<sup>2</sup>)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차항체(primary antibody)는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고, TBS-T로 10분 3번 세척한 후 이차항체(secondary antibody)인 anti-mouse IgG conjugated horse radish peroxidase(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 반응시킨 후 Bio-Image Analyzer(RAS 3000, Fuji, JAPAN)를 이용하여 발색하였다.

6) 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법<sup>15)</sup>에 의거하여 정량하였다.

7) 통계 처리

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며, 유의성은 ANOVA 검정 후에 Turkey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며, p값이 0.05이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

실험결과

1. 白芍藥 추출물이 DU145 세포독성에 미치는 영향

DU145 세포에 0.5, 1.0, 2.0mg/ml의 농도로 白芍藥 추출물을 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 白芍藥 추출물을 처리한 군의 생존율은 처리한 농도에 비례하여 감소하였으며 0.5mg/ml, 1.0mg/ml의 농도로 처리한 군의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 61.04%, 52.48%로 감소하였다. 또한 2.0mg/ml 白芍藥 추출물을 처리한 결과 세포 생존율은 대조군에 비하여 46.93%로 감소하였다(Fig. 1). 白芍藥 추출물의 DU145 세포에 대한 IC50 값은 1.0mg/ml과 2.0mg/ml 농도 사이인 것으로 나타났다.

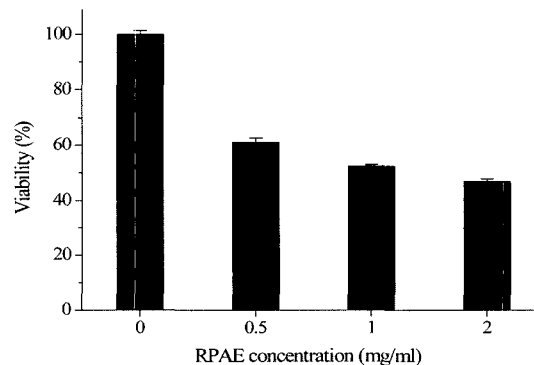


Fig. 1. Effects of Radix Paeoniae Alba Extract(RPAE) on cell viability in DU145 cells. Cells were treated with 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml of RPAE extract for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean ± S.E.M. of four independent experiments.

2. 白芍藥 추출물이 DNA 분절 및 PARP 절단에 미치는 영향

DU145 세포에 대한 白芍藥 추출물의 세포교사 효과를 관찰하기 위하여 0, 0.5, 1.0, 2.0mg/ml의 白芍藥 추출물을 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 세포교사의 특징적인 현상중의 하나인 DNA 분절(fragmentation) 현상과 PARP 절단을 Hoechst33342 염색과 Western blotting을 이용하여 조사하였다. 그 결과 白芍藥 추출물을 처리한 군에서 DNA 분절 현상(Fig. 2A)이 나타났으며 116kDa의 PARP가 감소하였다(Fig. 2B). 이러한 결과로 白芍藥 추출물이 DU145 세포에 교사를 유도하는 것을 확인하였다.

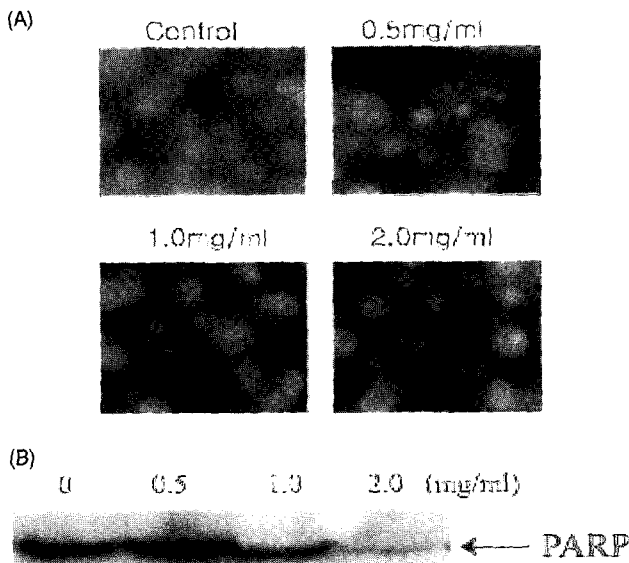


Fig. 2. Effects of *Radix Paeoniae Alba* Extract(RPAE) on DNA fragmentation and PARP cleavage on DU145 cells. DU145 cells were treated with various concentrations of RPAE for 24 hour. Hoechst 33342 staining was analyzed as described in Materials and Methods. Lysate from cells was separated on 10.0% SDS-PAGE. PARP on the nitrocellulose membrane was probed with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP methods.

3. 白芍藥 추출물이 NF-κB 활성화에 미치는 영향

白芍藥 추출물이 DU145 세포에서 NF-κB 활성화에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 0.5, 1.0, 2.0mg/ml 白芍藥 추출물을 24 시간 동안 처리한 후 핵 추출물을 수집하여 p50의 핵내로 이동과 IκBα 분해 정도를 Western blotting을 이용하여 조사하였다. 그 결과 白芍藥 추출물을 처리한 농도에 비례하여 핵내로 이동한 p50의 양이 감소하였으며, 이는 IκBα의 분해 감소로 인한 것을 확인하였다(Fig. 3).

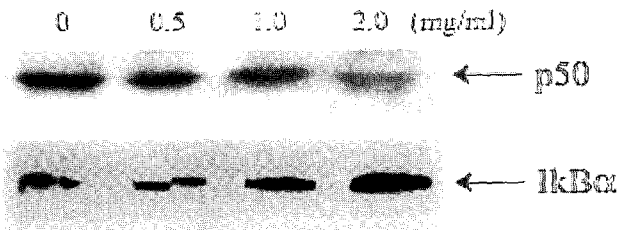


Fig. 3. Effect of *Radix Paeoniae Alba* Extract(RPAE) on translocation of p50 protein from cytosol to the nucleus and IκBα degradation in DU145 cells. Cells were treated with 0.5, 1.0, 2.0mg/ml RPAE extract for indicated periods. Nuclear and cytosolic extracts were prepared and p50, IκBα expressions were analyzed by Western blotting as described in Materials and Methods.

4. 白芍藥 추출물이 Par-4 발현에 미치는 영향

白芍藥 추출물에 의한 DU145 세포의 교사과정에 Par-4의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 0.5, 1.0, 2.0mg/ml 白芍藥 추출물을 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 Par-4에 대한 일차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 白芍藥 추출물을 처리한 농도에 의존적으로 Par-4 단백질의 발현량이 증가하였다(Fig. 4).

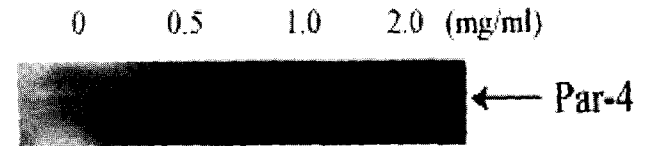


Fig. 4. Effects of *Radix Paeoniae Alba* Extract(RPAE) on Par-4 expression in DU145 cells. Cells were treated with 0.5, 1.0, 2.0mg/ml RPAE for indicated periods. Lysate from cells was separated on 12.0% SDS-PAGE. Par-4 on the nitrocellulose membrane was probed with anti-Par-4 antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP methods.

5. 白芍藥 추출물이 bcl-2 발현에 미치는 영향

白芍藥 추출물에 의한 DU145 세포의 교사과정에 bcl-2의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 0.5, 1.0, 2.0mg/ml 白芍藥 추출물을 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 bcl-2에 대한 일차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 白芍藥 추출물을 처리한 농도에 의존적으로 bcl-2 단백질 발현량이 감소하였다(Fig. 5).

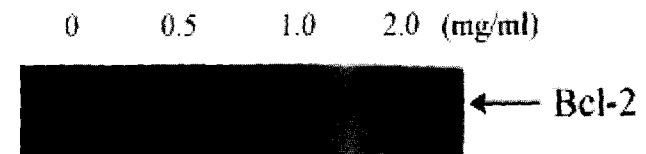


Fig. 5. Effects of *Radix Paeoniae Alba* Extract(RPAE) on PTEN expression in DU145 cells. Cells were treated with 0.5, 1.0, 2.0mg/ml RPAE for indicated periods. Lysate from cells was separated on 12.0% SDS-PAGE. Bcl-2 on the nitrocellulose membrane was probed with anti-bcl-2 antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP methods.

고찰 및 결론

세포교사는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절 받는 생리과정으로 암치료제 개발의 한 수단으로서 이용되고 있다<sup>16-18</sup>. 이러한 세포교사의 특징적인 현상으로 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 세포교사 소체(apoptotic body) 형성 등이 알려져 있다<sup>19,20</sup>.

Fig. 1에서 보여주듯이 白芍藥 추출물은 인간 전립선 암세포인 DU145 세포의 생존율을 처리한 농도에 의존적으로 감소시켰으며 이러한 생존율의 감소는 세포교사에 의한 것으로 Fig. 2의

DNA 분절 현상과 PARP 절단에서 확인되었다. PARP는 정상세포에서 NAD를 nicotinamide로 전환시키는 protein-linked ADP-ribose polymer로서 116kD의 분자량을 유지하다가 caspase-3의 절단 등과 같은 다양한 자극으로 인하여 절단되어 85kD의 cleaved product를 형성하여 DNA의 손상을 회복하지 못하도록 함으로써 세포고사를 촉진시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다<sup>21,22</sup>.

전립선 암세포에서 NF-κB는 세포 생존 기전을 활성화시키는 기능을 가진 전사 인자로서 50kDa(p50)과 65kDa(p65)으로 이뤄져 있으며<sup>23</sup> 불활성화 상태에서 IκB와 같이 복합체를 이루어 적절한 신호가 전달되면 IκB가 인산화 되며 분해 되고 NF-κB는 핵내로 이동하여 활성화되는 것으로 알려져 있다<sup>24</sup>. 다양한 농도의 白芍藥 추출물을 DU145 세포에 처리한 결과 핵 내에서 p50의 발현양이 감소하였으며 이는 IκB-α의 분해의 감소로 인한 것으로 나타났다(Fig. 3).

Par-4(prostate apoptosis response-4)는 전립선 암세포에서 세포고사를 유도하는 유전자로서<sup>25</sup> tumor necrosis factor(TNF)-α 수용체 군중의 하나인 FasL/Fas의 활성화를 통하여 세포고사를 유도하거나 또는 세포 생존을 촉진하는 기전에 관여하는 nuclear factor(NF)-κB의 활성화를 억제하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>24</sup>. Par-4 단백질 발현에 대한 白芍藥 추출물의 효과를 DU145 세포에서 조사한 결과 처리한 농도에 의존적으로 Par-4 단백질의 발현이 증가하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 나타난 白芍藥에 의한 NF-κB 활성도의 감소는 Par-4의 증가에 의한 것으로 사료된다.

세포고사를 유도할 때 bcl-2는 감소하고 bax는 증가하므로 bcl-2와 bax의 ratio가 중요한 의미를 가진다고 알려져 있으며<sup>26</sup>, bcl-2는 세포의 독성 또는 고사를 저해하는 단백질로, bax는 세포고사 또는 독성을 유도하는 단백질로 보고 되고 있으며 전사인자인 NF-κB에 의해 발현이 조절 되는 것으로 알려져 있다<sup>27-29</sup>. 白芍藥 추출물을 DU145 세포에 처리한 결과 처리한 농도에 의존적으로 bcl-2 단백질의 발현을 감소시켰다(Fig. 5). 이는 Fig. 3에서 보여준 NF-κB 활성의 감소에 의한 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해보면 白芍藥 추출물은 DU145 세포에 고사효과를 나타냈으며 그 기전은 Par-4 발현의 증가, NF-κB 핵내로 이동 감소, bcl-2 단백질 발현의 감소 기인한 것으로 생각된다. 앞으로 白芍藥 추출물의 전립선암 치료제로의 개발을 위하여 정확한 기전 연구와 in vivo 연구가 필요하리라 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행됨.

## 참고문헌

1. Greenlee RT, et al. : Cancer statistics, CA Cancer J Clin, 51(1):15-36, 2001.
2. Lu-Yao GL, et al. : An assessment of radical prostatectomy.

- Time trends, geographic variation, and outcomes. The Prostate Patient Outcomes Research Team. *Jama*, 269(20):2633-2636, 1993.
3. Walsh PC, Partin AW, Epstein JI : Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol*, 152(5 Pt 2): 1831-1836, 1994.
4. Isaacs JT, et al. : Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl*, 13(6):457-464, 1992.
5. Smets LA : Programmed cell death(apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs*. 5:3-9, 1994.
6. Watson AJ : Review article: manipulation of cell death--the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 9:215-226, 1995.
7. Panchal RG : Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 55:247-252, 1998.
8. Zhang DY, et al. : Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res*, 63(14):4037-4043, 2003.
9. Hsieh TC, et al. : Effects of herbal preparation Equiguard on hormone-responsive and hormone-refractory prostate carcinoma cells: mechanistic studies. *Int J Oncol*, 20(4):681-689, 2002.
10. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.356-365, 1973.
11. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.166-168, 221, 224, 504, 1986.
12. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.720-721, 726-727, 1989.
13. 李時珍 : 本草綱目(上), 北京, 人民衛生出版社, pp.699-710, 832-837, 848-851, 1982.
14. 人民衛生出版社 編 : 原色中國本草圖鑑, 京都, 雄渾社, (一卷) pp.16-17, (二卷) pp.144-145, (三卷) pp.136-137, 1982.
15. Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*. 72:248-254, 1976.
16. Janus TJ, Kyritsis AP, Forman AD, Levin VA : Biology and treatment of gliomas. *Ann Oncol*, 3(6):423-433. Review, 1992.
17. Yoshida T, Kawano N : Clinical cure of glioblastoma-two case reports. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 40(4):224-229, 2000.
18. Madajewicz S, Chowhan N : Therapy for patients with high grade astrocytoma using intraarterial chemotherapy and radiation therapy. *Cancer*, 88(10):2350-2356, 2000.
19. Wyllie AH, Kerr JF : Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68:251-306, 1980.
20. Widmann C, Gibson S : Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis: a turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J. Biol. Chem*, 20;273(12):7141-7147, 1998.

21. Lazebnik YA : Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature* 371:346-347, 1994.
22. Wang ZQ : Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease, *Genes Dev.* 9:509-520, 1995.
23. Beg AA, et al. : Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*, 9(22):2736-2746, 1995.
24. Baeuerle PA, Henkel T : Function and activation of NF-κB in the immune system. *Annual Review of Immunology* 12:141-179, 1994.
25. Chakraborty M, et al. : Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res*, 61(19):7255-7263, 2001.
26. Condorelli G, Morisco C, Stassi G, Notte A, Farina F, Sgaramella G, de Rienzo A, Roncarati R, Trimarco B, Lembo G : Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 99(23):3071-3078, 1999.
27. Vander Heiden MG, Thompson CB : Bcl-2 proteins : regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology*. 1(8):E209-216, 1999.
28. Kroemer G : The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine*. 3(6):614-620, 1997.
29. Brady HJ, Gil-Gomez G : Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *International Journal of Biochemical Cell Biology* 30(6):647-650, 1998.