

宮頸1號煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
강영금, 최창민, 조한백, 유심근

ABSTRACT

***Kung-Kyung-Ilho-Jeon* on Induced Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells**

Young-Keum Kang, Chang-Min Choe, Han-Back Cho, Sim-Keun Yoo

**Department of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University**

To address the ability of *Kung-Kyung-Ilho-Jeon*(KK) to induce cell death, we investigated the effect of KK on cell viability. Forty-eight hours later, loss of viability occurred following KK exposure in a dose-dependent manner. The treatment of KK, a commonly used herb formulation in Korea and China, caused a decrease in cell viability. KK also resulted in apoptotic morphology a brightly blue-fluorescent condensed nuclei by Hoechst 33258-staining, and reduction of cell volume. Our results show that KK induces caspase-3 and -9 activation in a time-dependent manner. In addition, the translocation of cytochrome c release into cytoplasm has been observed under the presence of 5 mg/ml KK. The subsequent loss of mitochondria membrane potential is collapsed by the addition of KK. Our immunoblotting data show that PARP, a well known caspase-3 and -6 substrate, is cleaved by KK. We show that a pro-apoptotic protein, Bax is increased in the presence of KK but that the amount of Bcl-2 is not changed. We suggest that Bax, a critical protein which can regulate channel of mitochondria to release cytochrome c, is a key protein in KK-induced apoptosis of HeLa human cervical carcinoma cells

Key words : *Kung-Kyung-Ilho-Jeon*(KK), Bax, mitochondria membrane potential, apoptosis, PARP, HeLa cells

I. 緒 論

子宮頸部癌은 子宮頸부에 발생하는 惡性腫瘍으로 우리나라 전체 女性癌의 22%에 달하며 전체 암중에서는 4위, 女性에서 발생하는 암중에서 頻度 1위를 차지한다¹⁾.

子宮頸部癌의 好發 年齡은 35-50세이며 확실한 原因은 밝혀져 있지 않지만 高危險 要素를 살펴보면 民族的 差異, 社會 經濟的 水準이 낮은 群, 早期에 始作된 性的 活動, 多數의 性交 對象者, 性病에 露出, 經口避妊藥 使用, 男性要因, 人유두종바이러스(Human papilloma virus, HPV)감염 등이 있다. 臨床症狀으로는 膣 出血, 특히 閉經 後나 性交 後 間歇的 膣 出血, 惡臭가 나는 膣 分泌物, 骨盤痛, 腰痛, 尿路症狀, 疲勞感, 體重 減少 등이 있다^{2,3)}.

한의학에서의 子宮頸部癌은 ‘崩漏’, ‘帶下’, ‘癥瘕’, ‘血蠱’ 등의 範疇에 속하며^{2,4)}, 이 중 癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로서 腹中腫塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛劇盛하는 症狀을 나타내는 婦人科 疾患이며, 西洋醫學의으로는 子宮頸部癌, 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 卵管癌, 卵巢癌, 絨毛上皮癌, 骨盤 炎症性 腫塊 등이 包含된다^{3,5,6)}.

人體의 正常 組織에서는 組織의 恒常性을 維持하기 위하여 細胞의 增殖(cell proliferation)과 自然的인 細胞枯死(apoptosis)가 相互作用을 하고 있으며, 腫瘍의 경우에서도 腫瘍의 成長을 調節하기 위하여 細胞枯死와 細胞의 增殖이 相互作用하고 있다. 따라서 癌細胞가 될 可能性이 높은 細胞에서 細胞枯死 活性度の 消失은 癌化過程에 影響을 미치게 되며, 細胞枯死의 活性化는 癌細胞로의 轉換을 豫防한다⁷⁾.

細胞枯死(apoptosis)는 計劃된 細胞死滅(programmed cell death)로서 細胞壞死(necrosis)와는 그 過程에 組織學的 및 生化學的으로 差異가 있다. 즉 細胞枯死에서는 細胞膜이 維持되면서 細胞 脫水現狀에 의한 細胞收縮, 細胞膜의 氣泡化 現象, 細胞質內的 칼슘 농도 增加, 염색질 凝縮, 核酸分解酵素(endonuclease)의 活性化에 의한 사다리모양의 DNA 分節 形成, 核 絶斷, 細胞枯死 小體 形成이 동반된다^{8,9)}.

最近에 子宮頸部癌의 發生과 治療 研究에서 藥物 投與에 의한 細胞枯死의 活性도가 활발히 研究되고 있다¹⁰⁻¹²⁾.

이에 著者는 宮頸1號煎이 현재 中國과 韓國에서 使用하고 있는 處方으로 子宮頸部癌 治療에 有效性이 있다는 報告¹³⁻¹⁷⁾를 접하고, 子宮頸部癌 細胞인 HeLa cell에 宮頸1號煎을 投與하여 HeLa cell의 細胞生存도와 細胞枯死에 관련된 caspase-3와 caspase-9의 activity 增加, cytochrome c 遊離, 子宮癌細胞 죽 음시 mitochondria membrane potential collapse(崩壞), PARP (Poly(ADP-Ribose)polymerase) 의 cleavage(分節) 確認, Bcl-2와 Bax의 發現 등을 觀察하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥材

實驗에 사용된 藥材는 圓光大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였으며 處方 內容과 分量은 趙¹³⁾에 準하였고 한 貼의 分量은 다음과 같다.

Prescription of *Kung-Kyung-IHo-Jeon(KK)*

韓藥名	生藥名	重量(g)
魚腥草	HERBA HOUTTUYNIAE	30
丹蔘	RADIX SALVIAE MILTIORRHIZAE	15
當歸	RADIX ANGELICAE GIGANTIS	9
牡蠣	CONCHA OSTREAE	30
白花蛇舌草	HERBA OLDENLANDIAE DIFFUSAE	60
茜草	RADIX RUBIAE	9
白茅根	RHIZOMA IMPERATAE	30
蔓參	RADIX CODONOPSIS	15
白朮	RHIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE	9
赤芍藥	RADIX PAEONIAE RUBRA	9
土茯苓	RHIZOMA SMILACIS GLABRAE	9
大棗	FRUCTUS ZIZYPHI JUJUBAE	10
Total amount		235

2) 試藥

Anti-Bcl-2, Bax or PARP antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 供給받았다. Anti-Cytochrome C antibody는 Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서 購入하였다. Hoechst 33258 dye는 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 購入하였다. 細胞培養시 必要한 培養液 및 試藥들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 購入하였다.

3) 檢液의 製造

宮頸1號煎 10貼 分量에 증류수 8000cc를 가하여 6시간 동안 電熱器로 煎湯한 후 1320cc를 抽出하여 3,000rpm에서 20분간 遠心 分離하고 진공농축기로 減壓, 濃縮한 후 凍結乾燥器에서 凍結乾燥하여 10%의 收率로 건조물 132g을 製造하였다. 이 건조물에 滅菌된 蒸溜水を 첨가, 溶解物을 만들어 實驗에 使用하였다.

2. 方法

1) 細胞柱 培養

사람 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa-cell을 37°C, 5% CO₂ 狀況에서 10% fetal bovine serum

(Hyclone Laboratories)이 包含된 D-MEM (Dulbecco's-Modified Eagle's Modium)에서 培養하는 동안 약 24시간 週기로 培養液을 交替하여 주며 log phase에 있는 細胞에 宮頸1號煎을 처리하여 細胞枯死(apoptosis) 現象을 觀察하였다.

2) 細胞 活性度 測定

細胞 生存度는 crystal violet dye의 uptake 정도를 colorimetric assay로 測定한다. Apoptosis가 일어난 細胞에 crystal violet solution을 넣고 2分 동안 常溫에서 放置하여 staining한다. 바로 tap water로 水洗한 후, staining된 細胞를 10% acetic acid상에 5分 동안 常溫에서 反應하여 ELISA reader로 405 nm에서 OD값을 計算한다. 細胞 生存度 實驗에서 culture media상의 細胞를 100%의 細胞 活性度を 나타낸다는 基準으로 試藥處理群의 細胞 生存度を %로 計算하였다.

3) 細胞 形態 觀察

HeLa cell (1 × 10⁵ cells)을 slide chamber dish에 培養하였다. 核의 染色을 위하여 宮頸1號煎을 24시간 處置한 HeLa cell과 試藥處置를 하지않은 HeLa cell을 3.7% para-form-

aldehyde로 固定하였다. PBS (Phosphate Buffered Saline)로 3번 세척한 후, Hoechst 33258 dye로 染色하였다. 螢光 顯微鏡 (Nikon, Tokyo)으로 觀察, 寫眞 ($\times 100$)을 現象하였다.

4) Caspase 活性度 測定

HeLa cell (2×10^6 cells)을 4°C 에서 15분 동안 lysing buffer (1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 2 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 溶解하고 20,000rpm으로 15분 동안 遠心 分離하여 얻은 上層液은 BCA (Bicinchonic acid, Sigma, St. Louis)方法으로 定量하여 assay buffer (100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH 7.5, 1 mM PMSE, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 2 mM DTT)에 稀釋된 螢光標識된 기질과 37°C 에서 30분간 反應시킨후, fluorometer로 測定하였다. 이 때의 波長은 excitation wavelength (380 nm)와 emission wavelength (460 nm)를 使用하였다. 기질은 CPP32-like caspase의 경우, fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin (AMC)-DEVD를 使用하였으며 proteolytic cleavage를 測定 함으로써 認知하였다.

5) Western blotting

HeLa cell (5×10^6)을 0.5 ml lysis buffer 溶液에 넣은 다음 蛋白質 양은 BCA protein assay 법으로 定量한다¹⁸⁾. 定量한 蛋白質은 sample buffer에서 denaturation 시킨 다음 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 한다. 전기영동 후 gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer 시킨 다음 抗體를 結合시킨 후 peroxidase가 conjugation된 2차 抗體와 結合시킨 후 luminescence를 利用하여 develop 시킨다.

6) Green fluorescent protein(GFP)-Bax transfection

GFP-Bax는 pcDNA-Bax를 digestion하여 C2-GFP-vector (Clonotech)에 ligation하여 使用하였으며 하루 전날 HeLa cell을 24 well plate에 culture하였으며 $0.5 \mu\text{g}$ 의 DNA를 transfection 하여 6시간 incubation한 후 GFP-Bax의 이동 및 expression level을 確認하였다.

7) Immunostaining

Cell을 3.7% para-formaldehyde로 固定시킨 후 PBS로 세척한다. PBS-Triton으로 cell을 permeable한 條件으로 만든 다음, 1%의 bovine serum albumin (BSA)와 2.5%의 fetal bovine serum(FBS)을 PBS-Tween(PBS-T)에 넣은 blotto로 blocking 1시간을 室溫에서 施行하였다. 1차 Ab (anti-cytochrome c)를 blotto에 1: 200으로 稀釋한 후 1시간 동안 室溫에서 反應, PBS-T로 3번 세척한다. 2차 Ab (anti-mouse-TRITC)를 1:500으로 稀釋하여 室溫에서 30분 동안 反應시켰다. PBS-T으로 3번 세척한 후 형광 현미경하에서 觀察하고 寫眞을 現象하였다.

8) 통계처리

표시된 結果는 3번 以上の 獨立的인 結果이며 이들의 平均(mean)과 標準偏差(standard deviation, SD)를 算出하여 結果를 표시하였다. 細胞毒性을 보이는 값의 비교에 있어서는 Students's t-test를 使用하였으며 $p < 0.01$, 혹은 $p < 0.05$ 水準으로 有意性을 檢證하였다.

III. 實驗 結果

1. 宮頸1號煎으로 인한 HeLa cell의 細胞 枯死

宮頸1號煎으로 인한 抗癌效果를 檢索하기 위해 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 宮頸1

號煎을 처리하였다. 宮頸1號煎(0, 1, 2, 5 mg/ml)을 處理시 用量 依存的으로 세포죽음이 惹起됨을 確認하였다(Fig. 1A). 특히 5 mg/ml의 宮頸1號煎을 處理한 48시간 후 細胞生存度의 顯著한 減少를 確認하였다.

세포죽음에는 自然的인 細胞枯死(apoptosis)와 物理的인 刺戟이나 滲透壓 등으로 인한 壞死(necrosis)가 있다. Apoptosis시 細胞膜의 blebbing(水泡形成)이나 核의 condensation(凝縮), fragmentation(分節) 등이 일어나므로 이의 形態를 觀察하여 apoptosis와 necrosis를 區別하고자 하였다. 核을 染色하기위하여 Hoechst 33258 dye를 利用하였으며 螢光현미경으로 觀察하였다. 5 mg/ml의 宮頸1號煎이 處置된 條件에서 細胞의 分節과 核의 凝縮을 확인하였다(Fig. 1B).

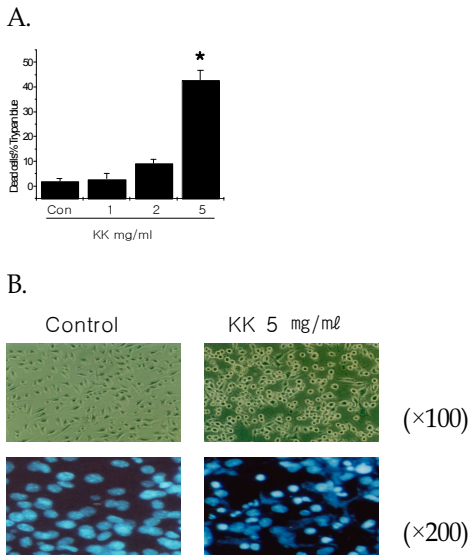


Fig.1. KK induces death in HeLa cells.

(A) Cell death was assessed by crystal violet staining. HeLa cells were incubated with 0, 1, 2 or 5 mg/ml KK for 24 h followed by measurement of crystal violet staining. Data were the mean S.E. of three experiments. *Significantly different from control, $P < 0.05$. KK: *Kung-Kyung-IlHo-Jeon*.

(B) HeLa cells were incubated with 5 mg/ml KK for 48 hrs. The cells were taken a picture ($\times 100$) using a light microscope. The cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde and then were washed with PBS. The cells were stained with 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 dye for 10 min. The cells were taken a picture ($\times 200$) using a fluorescence microscope.

2. 宮頸1號煎으로 인한 caspase-3와 caspase-9의 activity 增加

Caspase cysteine protease는 apoptosis의 主要 酵素로 그의 activity 確認은 apoptosis의 主要 機轉을 보여줄 수 있으므로 많은 研究에서 시행되고 있다¹⁹). Caspase 가운데 initiator caspase에는 caspase-3 과 caspase-9가 屬하며, 이는 비교적 upstream의 caspase로 分類된다. caspase-9은 mitochondria를 經由하는 apoptosis pathway에 屬하며 caspase-3은 receptor를 經由하는 pathway에 屬하고 TNF-alpha, Fas로 인한 apoptosis에 主要한 役割을 하는 것으로 알려져 있다²⁰).

이 가운데 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置시 時間 依存的으로 caspase-3와 caspase-9의 activity가 增加하는 것을 確認할 수 있었다(Fig. 2A, B).

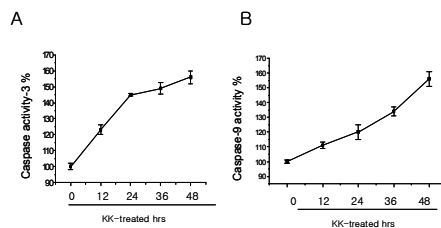


Fig. 2. KK induces caspase-3 and -9 activation in HeLa cells.

HeLa cells were subjected to 5 mg/ml KK for 0, 12, 24, 36 and 48 hrs. The cell lysates were prepared for caspase activity assay. The caspase-3 (A) and caspase-9 (B) activity was measured as described in materials and methods.

3. 宮頸1號煎으로 인한 cytochrome c 遊離
 Cytochrome C는 mitochondria에서 遊離되어 細胞質에서 Apaf-1, caspase-9 등과 結合하여 apoptosome을 形成하고 apoptosis를 惹起하는 主要 molecule로 알려져 있다. 5 mg/ml 宮頸1號煎을 處置한 24시간 이후 cytochrome c가 遊離되는 것을 確認할 수 있었으며 細胞의 凝縮現狀이 뚜렷하게 일어난 48시간 이후에는 cytochrome c가 細胞質內에 location됨을 보다 鮮明히 觀察할 수 있었다 (Fig. 2C).

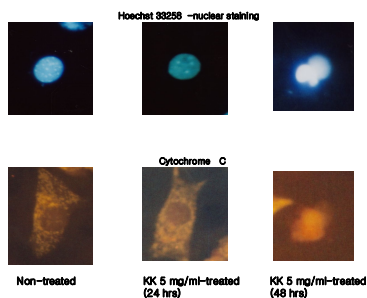


Fig. 2(C) HeLa cells were treated with 5 mg/ml KK for 24 or 48 hrs.

The cells were fixed with 3.7% para-formaldehyde and immunostaining with cytochrome c was performed as described in materials and methods. Upper panel: Hoechst staining, Down panel: cytochrome c staining.

4. 宮頸1號煎으로 인한 HeLa cell 죽음시 mitochondria membrane potential collapse 分析

Mitochondria membrane potential에 대해서는 mitochondria-pathway를 經由하는 apoptosis 機轉에 대하여 많은 報告가 있었다^{21,22}. 既存 報告에서 細胞枯死시 mitochondria membrane permeability transition에 影響을 미쳐 mitochondria에서 pore를 形成하고 cytochrome c release를 惹起하게 된다^{23,24}. 이러한 cytochrome c release로 caspase 活性이 惹起

되고 세포죽음이 招來되는 科程에서 membrane potential도 collapse된다는 結果가 發表된 바 있으나 각각의 條件이나 細胞마다 差異를 보여주어 왔다²⁵⁻²⁷. HeLa cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置시 有意性있는 mitochondria membrane potential collapse를 보여주고 있다 (Fig. 3).

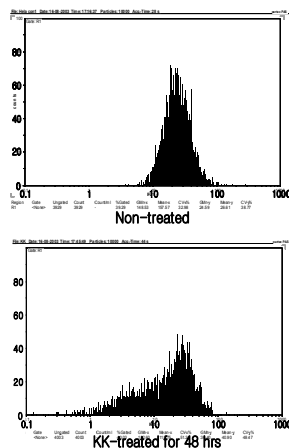


Fig. 3. KK induces mitochondria membrane potential collapse in HeLa cells. HeLa cells were subjected to 5 mg/ml KK for 48 hrs. The cells were incubated with 100 nM DiO6 dye for 20 min. And then the cells were washed with PBS for 2 times. The cells were harvested and mitochondria membrane potential was measured using FACSCaliber. KK: Kung-Kyung-IlHo-Jeon.

5. HeLa cell에서 宮頸1號煎으로 인한 PARP (Poly(ADP-Ribose)polymerase)의 cleavage (分節) 確認

PARP는 caspase-6와 caspase-3의 기질로 apoptosis 觀察시 主要한 蛋白質로 研究된 바 있다²⁸. 따라서 PARP cleavage는 caspase-3의 活性을 間接的으로 보여줄 수 있다. HeLa cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置시 caspase-3 活性 增加와 비슷한 樣相으로 PARP의 cleavage pattern이 보여지고 있음을 確認할 수 있었다(Fig. 4).

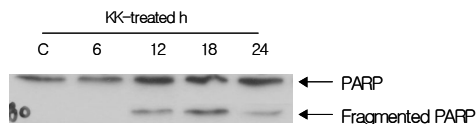


Fig. 4. KK induces PARP cleavage in HeLa cells.

HeLa cells were subjected to 5 mg/ml KK for 0, 6, 12, 18 and 24 hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. PARP was visualized by western blot analysis. KK: *Kung-Kyung-IIHo-Jeon*.

6. HeLa cell에서의 宮頸1號煎으로 인한 Bax의 發現

最近 Bcl-2 family proteins이 多樣한 經路의 枯死에 關聯됨을 證明하는 研究 結果가 많이 발표된 바 있다²⁹⁾. Bcl-2는 癌細胞에서 expression(發現)이 增加되어 있으며 이의 發現을 癌의 positive marker로 看做하는 發表도 있다³⁰⁾. 5 mg/ml 宮頸1號煎 단독 處理시, Bcl-2 protein 發現은 별다른 變化가 없는 반면, pro-apoptotic protein인 Bax의 發現은 增加되는 것을 確認할 수 있었다(Fig. 5).

最近 mitochondria-dependent apoptosis pathway와 receptor-dependent pathway의 endoplasmic reticulum-associated pathway에서의 apoptosis가 새로 究明되고 있다^{31,32)}. 이러한 ER-dependent pathway에 經由하고 있는지를 나타내주는 marker인 GRP protein을 確認하여 보았으나 宮頸1號煎 處理로 인한 細胞 枯死에는 GRP protein의 變化는 없었다. 이는 ER-dependent pathway를 經由하고 있지 않는 것으로 보이며, mitochondria pathway에서 중요한 比重을 차지하는 Bcl-2 protein 중, Bcl-2의 發現調節 效果는 없었지만 Bax의 量的 增加는 宮頸1號煎으로 인한 세포죽음시 主要한 現狀으로 看做되어질 수 있다.

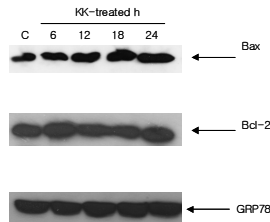


Fig. 5. KK regulates the expression of Bax in HeLa cells.

HeLa cells were subjected to 5 mg/ml KK for 0, 6, 12, 18 and 24 hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Bcl-2, Bax, and GRP78 were visualized by western blot analysis. KK: *Kung-Kyung-IIHo-Jeon*.

IV. 考 察

子宮頸部癌은 우리나라의 婦人癌 중에서 가장 높은 發生 頻度를 보이는 腫瘍으로 每年 約 5,000여명의 새로운 子宮頸部癌 환자가 發生하고 있고 全世界의 으로는 約 43만 명의 새로운 子宮頸部癌 患者가 發生하고 있다³³⁾.

子宮頸部の 上皮內癌은 浸潤性 子宮頸部 癌보다 10年 정도 빠른 35-40세 정도에서 好發하며 浸潤性 子宮癌은 30세 이후부터 增加하기 始作하여 50대에 頂點을 달한 後 急激히 減少하는 傾向을 보인다. 最近 20대에 子宮頸部癌이 發病하는 境遇도 적지않고 또한 뚜렷치 않은 理由로 35세 以前에 子宮頸部癌이 發病할 境遇 5年 生存率이 顯著히 減少하는 것을 볼 수 있다¹⁴⁾. 나이를 除外하고는 前癌 病變인 上皮內癌과 浸潤性 癌의 疫學的 特性이 매우 類似하므로 두 病變을 同一한 疾病의 一環으로 看做한다¹⁾.

子宮頸部癌의 確實한 原因은 밝혀져 있지 않았지만 高危險 要素를 살펴보면, 民族의 差異, 社會 經濟的 水準이 낮은 群, 農村人, 早期에 始作된 性的 活動, 多數의 性交 對

象者, 性病에 露出, 經口避妊藥 使用, 男性 要因, 人유두종바이러스(Human papilloma virus, HPV)感染 等이 있으며, 이 중 수많은 實驗的, 疫學的 研究를 통하여 HPV가 子宮頸部癌 發生의 가장 有力한 發生 因子로 밝혀지고 있다^{1,3)}.

子宮頸部癌의 臨床症狀은 初期 상태에서는 症勢가 없는 境遇가 頻繁하며 첫 症勢는 주로 輕微한 出血인데 特徵的으로 性交後 혹은 閉經 後에 發生하며 대개 初期에는 鮮紅色의 室 分泌物이 增加하며 病이 進行될 수록 出血과 分泌가 甚해지고 潰瘍이 深化되며 2次 感染을 招來할 시 惡臭를 發散한다. 病이 더 進行되어 주위 臟器를 侵犯하면 尿路症狀, 直腸不快感, 骨盤痛, 腰痛, 淋巴浮腫, 尿管閉鎖 등의 증상이 나타난다. 肉眼의 所見 및 診察 所見으로 子宮頸部의 外經口 부위에 硬化된 顆粒性 突出, 또는 꽃양배추 模樣의 突出形 腫塊 또는 潰瘍 등이 보이며 接觸性 出血이 보인다¹⁴⁾.

子宮頸部癌의 西洋醫學的 治療는 臨床 病期別로 나누어 治療하는데 근지적 자궁적 출술 등의 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 등이 使用되고 있으며, 이 들을 併합하기도 한다¹⁾.

子宮頸部癌에 해당하는 韓의학적인 症狀과 治療는 ‘崩漏’, ‘帶下’, ‘癥瘕’, ‘血蠱’ 등의 範疇에서 찾아볼 수 있다. 이 중 接觸性 出血과 月經後 不定期的인 出血 및 血性 白帶下 등의 早期 症狀에는 ‘崩漏’나 ‘帶下’가 해당하며, 出血, 惡臭나는 帶下, 排尿困難, 積塊物 觸知 等の 晚期 症狀은 ‘癥瘕’나 ‘血蠱’의 範疇로 볼 수 있다^{4,5)}.

癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로서 腹中腫塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛劇盛하는 症狀을 나타내는 婦人科 疾患이며^{5,6,34)} 血蠱는 癥瘕의

甚者로서 肚腹이 堅硬한 것이 들과 같다고 하였다⁴⁾.

癥瘕의 病因과 病理를 살펴보면 《靈樞·百病始生編》³⁵⁾에서는 外感寒邪와 七情所傷을 主된 原因으로 보았고, 巢³⁶⁾는 外感寒邪와 食傷을 主된 原因이라고 하였고, 孫³⁷⁾은 正氣虛로 因해 發生한다고 하였다. 그 외에 李³⁸⁾는 傷食과 瘀血로, 薛³⁹⁾은 瘀血로, 朱⁴⁰⁾는 痰과 食積, 死血에 起因한다고 하였다. 以上을 綜合해보면 癥瘕는 外感寒邪, 七情所傷, 正氣虛, 傷食, 瘀血, 痰濕 등이 原因이 되어 胞中の 血行이 妨害를 받아 血瘀 狀態가 誘發되어 硬塊를 形成하는 것으로 理解하고 있음을 알 수 있다.

治法을 살펴보면 《素問·至眞要大論》⁴¹⁾에서 “堅者削之 客者除之 勞者溫之 結者散之 留者攻之”라 하여 攻, 消, 散, 補의 治法을 提示하였고, 張⁴²⁾은 “養正邪自除”의 原則을 主張하여 眞氣를 實하게 하면 胃氣가 強해져 積이 저절로 消滅된다고 하여 正氣를 補養시키는 治法을 主張하고 大毒之劑의 濫用을 警告하였다. 한편 龔⁴³⁾은 消痰, 活血, 順氣, 健脾를 爲主로 治療하였으며, 吳⁴⁴⁾는 理氣를 基本으로 消導, 活血의 治法을 活用하였고, 王⁴⁵⁾은 桃仁·紅花·當歸 등으로 活血化瘀하는 膈下逐瘀湯을 사용하는 등, 諸家에 따라 方法의 差異는 있었으나 대체적으로 “養正則邪自除”의 原則下에 發病原因에 따라 活血, 理氣, 導滯, 消痰의 治法을 使用하였다.

宮頸1號煎은 현재 中國과 韓國 등의 腫瘍 關聯 文獻에서 子宮頸部癌의 治療에 活用되는 處方으로 되어있다. 湖北醫學院附屬第二醫院에서 子宮頸部癌 31例의 治療에 宮頸1號煎을 使用하여 短期治療 14例, 著效 8例, 無效 4例, 總有效率 87.1%의 結果를 얻었다고 報告하고 있다¹³⁻¹⁷⁾.

宮頸1號煎의 構成藥物의 性味와 效能을 살펴보면, 魚腥草는 辛·寒하며 清熱解毒·

治癰腫瘡毒의 效能이 있고, 丹蔘은 苦·微寒하며 活血祛瘀의 效能이 있고, 當歸는 甘·辛溫하며 補血和血의 效能이 있고, 牡蠣는 鹹澁·涼하고 軟堅散結·破積聚의 效能이 있고, 白花蛇舌草는 苦甘·寒하며 消癰解毒·抗癌의 效能이 있고, 茜草는 苦·寒하며 行血祛瘀·通經活絡의 效能이 있고, 白茅根은 甘·寒하며 清熱利水の 效能이 있고, 蔓參은 甘·平하며 補中益氣의 效能이 있고, 白朮은 甘苦·微溫하며 補裨益氣·燥濕利水の 效能이 있고, 赤芍藥은 酸苦·涼하며 消癰散腫·破積聚의 效能이 있고, 土茯苓은 甘淡·平하며 清熱解毒의 效能이 있고, 大棗는 甘·溫하며 補裨和胃·益氣生津의 效能이 있다⁴⁶⁾. 이상을 綜合하면 宮頸1號煎은 活血祛瘀·消癰散結·抗癌의 效能으로 瘀血로 인한 癥瘕의 治療에 適合할 것으로 思料된다.

이에 著者는 癥瘕의 治療에 사용되어 온 宮頸1號煎의 子宮頸部癌에 對한 抗癌效果를 究明하고자 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에 宮頸1號煎을 處理하고, HeLa cell의 生存度 및 細胞枯死에 關聯된 細胞의 形態變化와 細胞蛋白質 發現 等の 生化學的인 變化를 觀察하였다.

癌의 發生過程은 여러 가지 複合的인 機轉이 作用하는데 특히 遺傳學的으로는 癌遺傳子(oncogenes)와 癌抑制遺傳子(tumor suppressor genes)의 役割에 의하여 細胞의 增殖과 消滅이 變化를 일으키게 되며, 이러한 遺傳學的인 機能의 障導로 정상적으로는 消滅되어야 할 損傷된 細胞들의 壽命이 延長되고 결국 腫瘍으로 發展하게 된다. 이때 癌細胞가 될 可能性이 높은 細胞에서 細胞枯死 活性化度(apoptotic activity)의 消失은 癌化 過程에 影響을 미치게 되며, 細胞枯死의 活性化는 癌細胞로의 轉換을 豫防할 수 있게 된다⁷⁾.

宮頸1號煎으로 인한 抗癌效果를 檢索하기

위해 HeLa cell에 宮頸1號煎을 處理하여 세포죽음을 惹起하는지 與否를 알아보았다. 宮頸1號煎(0, 1, 2, 5 mg/ml)을 處理시 用量依存的으로 세포죽음이 惹起됨을 確認하였다(Fig. 1A). 특히 5 mg/ml 宮頸1號煎을 處理한 48시간 후 細胞生存度의 顯著한 減少를 確認하였다.

세포죽음에는 자연적인 細胞枯死(apoptosis)와 物理的인 刺戟이나 滲透壓등으로 인한 壞死(necrosis)가 있다. 細胞枯死(apoptosis)는 計劃된 細胞死滅(programmed cell death)로서 그 過程이 細胞의 壞死(necrosis)와는 組織學的 및 生化學的으로 差異가 있으며, 이것은 細胞分裂(mitosis)과 함께 正常組織塊(normal tissue mass)의 調節과 維持에 중요한 役割을 한다. 細胞枯死는 細胞內 信號體系와 放射線, 化學療法 및 호르몬과 같은 外因性 因子들에 의해 誘發되며, 細胞에서 細胞枯死가 誘導될 때 나타나는 形態學的 特徵을 보면 核의 分節, 細胞의 收縮 및 細胞破裂로 인한 小體(apoptotic body)形成 등이 나타난다⁴⁷⁾.

Apoptosis시 細胞膜의 blebbing(水泡形成)이나 核의 condensation(凝縮), fragmentation(分節)등이 일어나므로 본 實驗에서 apoptosis와 necrosis를 區別하기위해 이의 形態를 觀察하였다. 核을 染色하기 위하여 Hoechst 33258 dye를 이용하였으며 형광현미경으로 觀察하였다. 그 結果 5 mg/ml의 宮頸1號煎이 處置된 조건에서 細胞의 分節과 核의 凝縮을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

Caspase cysteine protease cascade는 여러 生理的인 system에서 apoptosis의 主要 經路로 認識되어 왔으며, caspase family는 pro-form으로 만들어지고 apoptosis 경우 cleavage가 일어나 活性化된다고 알려져 왔다⁴⁷⁾. Apoptosis가 일어나는 경우 caspase-3는 어떤 種類의 刺戟에도 活性化되는 主要 pool로 알려져 있으며, 최근 활발히 進行되고 있는 여러 實

驗研究에서는 apoptosis가 進行되는 細胞에서 caspase-3, 6, 8 및 9가 주된 caspase經路라고 報告되고 있다⁴⁸⁻⁵⁰. 즉 caspase cascade는 다양한 生理的인 모델에서의 枯死機轉에서 거의 共通的으로 나타나는 信號傳達酵素라고 할 수 있다.

따라서 caspase cysteine protease는 apoptosis의 主要 酵素로 그의 activity確認은 apoptosis의 主要 機轉을 보여줄 수 있으므로 많은 研究에서 시행되어지고 있다. caspase 가운데 initiator caspase로 caspase-3 과 caspase-9가 屬하며, 이는 比較的 upstream의 caspase로 分類되어지고 caspase-9은 mitochondria 經由하는 apoptosis pathway에 屬하며 caspase-3은 receptor 經由하는 pathway에 屬하고 TNF-alpha, Fas로 인한 apoptosis에 主要한 役割을 하는 것으로 알려져 있다²⁰. 이 가운데 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置시 時間 依存的으로 caspase-3와 caspase-9의 活性이 增加하는 것을 確認할 수 있었다(Fig. 2A, B).

Cytochrome c는 mitochondria에서 遊離되어 細胞質에서 Apaf-1, caspase-9 등과 結合하여 apoptosome을 形成하여 apoptosis를 惹起하는 主要 molecule로 알려져 있다. caspase 酵素가 活性化되면 Poly(ADP-Ribose)polymerase(PARP), lamin 및 다른 caspase 등의 여러 標的蛋白質에 作用해서 細胞內的 여러 信號傳達活性을 調節한다⁵¹. 그리고 미토콘드리아에 影響을 미쳐 細胞質內로 cytochrome c의 放出을 통해 下部經路의 caspase등의 蛋白質을 活性化시켜 細胞枯死에 이르게 한다.

따라서 HeLa cell에 宮頸1號煎의 投與로 cytochrome c의 遊離가 일어나 apoptosis가 惹起되는지 알아보려고 하였다. 5 mg/ml 宮頸1號煎을 處置한 24시간 이후에 cytochrome c를 遊離하는 것을 確認할 수 있었으며 細胞의 凝縮現狀이 뚜렷하게 일어난 48시간 이후에는 cytochrome c가 細胞質 內에 location됨

을 보다 鮮明히 觀察할 수 있었다(Fig. 2C).

Mitochondria membrane potential에 대해서는 mitochondria-pathway를 經由하는 apoptosis 機轉 研究시 많은 報告가 있었다^{21,22}. 既存 報告에서 mitochondria membrane permeability transition에 影響을 미쳐 mitochondria에서 pore를 形成하여 cytochrome c release를 惹起하게 된다^{23,24}. 이러한 cytochrome c release로 caspase活性이 惹起되어 세포죽음이 招來되는 科程에서 membrane potential도 collapse된다는 結果가 發表된 바 있으나 각각의 條件이나 細胞마다 差異를 보여주어 왔다²⁵⁻²⁷. 宮頸1號煎로 인한 子宮癌細胞 죽음이 mitochondria membrane potential collapse가 發生하는지 알아보았다. Hela cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置시 有意性있는 mitochondria membrane potential collapse를 보여주었다(Fig. 3).

PARP(Poly(ADP-Ribose)polymerase)는 caspase-6와 caspase-3의 기질로 apoptosis 觀察시 主要한 蛋白質로 研究된 바 있으며²⁸, PARP cleavage(分節)는 caspase-3의 活性을 間接적으로 보여줄 수 있다. 細胞枯死 信號傳達系의 下部 經路에 해당하는 PARP의 分節은 細胞枯死의 特徵으로 나타나고 있다. 刺戟에 의하여 損傷된 DNA의 回復은 PARP의 分節로 인하여 沮害됨으로서 genomic DNA의 分節이 規則적으로 일어나게 된다. 따라서 活性化된 caspase-3 protease에 의해 細胞內 기질 蛋白質인 PARP蛋白質이 分節되는지 알아보려고 하였다. 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置시 caspase-3 活性 增加와 비슷한 樣相으로 PARP의 cleavage pattern이 보여지고 있음을 確認할 수 있었다(Fig. 4).

細胞의 能動的 死亡을 의미하는 細胞枯死의 概念이 導入되면서 이것이 發癌過程과 癌의 進行 및 癌 治療에 미치는 影響에 대한 研究가 關心을 끌면서 最近에 인간의 여러

癌種에서 細胞枯死를 調節하는 遺傳子가 발견되었다. 細胞枯死의 誘導 및 調節에는 많은 遺傳子들이 關與하는데, 代表的인 것들이 BCL-2 遺傳子 家系에 屬하는 BCL-2, BAX, MCL-1 遺傳子가 있으며, 그 외에 p53, c-myc 및 APO/Fas 등이 細胞枯死 過程에 關與하는 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾.

Bcl-2 및 Bax를 포함한 Bcl-2 family proteins은 多様な 經路로 apoptosis에 關聯된다는 研究 結果가 最近 發表되었다^{52,53)}. Bcl-2는 癌細胞에서 expression이 增加되어 있으며 이의 發現을 癌의 positive marker로 看做하는 發表도 있었다.

Bcl-2 遺傳子는 세포사망을 촉진하는 Bax 遺傳子와 相互 比率에 의해 細胞枯死에 關與하는 것으로 報告되었으며⁵⁴⁾ Bcl-2는 mitochondria로부터 cytochrome c와 細胞枯死 誘發因子와 같은 caspase 活性 物質이 誘導되어 apoptosis가 發生하는 科程에서 이를 抑制하여 細胞枯死를 遮斷하고, Bax는 이 科程을 促進시켜 細胞枯死를 誘發하는 것으로 알려져 있다⁵⁵⁾.

子宮癌 細胞에서의 宮頸1號煎으로 인한 Bax의 發現 變化를 알아보았다. 5 mg/ml 宮頸1號煎 단독 處理시 Bcl-2 protein 發現은 별다른 變化가 없는 반면, pro-apoptotic protein인 Bax의 發現은 增加되는 것을 確認할 수 있었다(Fig. 5).

最近 mitochondria-dependent apoptosis pathway와 receptor-dependent pathway의 endoplasmic reticulum-associated pathway에서의 apoptosis가 새로 究明되고 있다^{31,32)}. 이러한 ER-dependent pathway에 經由하고 있는 지를 나타내주는 marker인 GRP protein을 確認하여 보았으나 宮頸1號煎 處理로 인한 세포죽음에는 GRP protein의 變化는 없었다. 이는 ER-dependent pathway를 經由하고 있지 않는 것으로 보이며, mitochondria pathway에

서 중요한 比重을 차지하는 Bcl-2 protein중 Bcl-2의 發現調節 效果는 없었지만 Bax의 量的 增加는 宮頸1號煎으로 인한 세포죽음시 主要한 現狀으로 看做되어질 수 있다.

以上の 實驗 結果로 볼 때 宮頸1號煎은 HeLa cell의 細胞枯死를 誘導하였으며, 그 科程에서 caspase-3, 9의 活性化, mitochondria membrane potential collapse, cytochrome c의 遊離, PARP의 分節, Bax의 發現 增加 등의 變化가 일어나고 있음이 밝혀졌다. 따라서 宮頸1號煎은 癥瘕의 範疇에 屬하는 子宮頸部癌의 治療에 적극 活用될 수 있으리라 思料된다.

V. 結 論

宮頸1號煎을 이용해서 子宮頸部癌 細胞柱인 HeLa cell의 細胞枯死를 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. HeLa cell에 宮頸1號煎 (0, 1, 2, 5 mg/ml)을 處置時 用量 依存的으로 세포죽음이 惹起됨을 確認하였으며, 5 mg/ml의 宮頸1號煎이 處置된 條件에서 細胞枯死의 形態學的 變化인 細胞의 分節과 核의 凝縮現狀을 볼 수 있었다.
2. HeLa cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置時 時間 依存的으로 caspase-3와 caspase-9의 活性이 增加하였다.
3. HeLa cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置時 24시간 이후에 cytochrome c를 遊離하는 것을 確認할 수 있었으며, 細胞의 凝縮現狀이 뚜렷하게 일어난 48시간 이후에는 cytochrome c가 細胞質內에 location 됨을 보다 鮮明히 觀察할 수 있었다.
4. HeLa cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置時 有意性 있는 mitochondria membrane potential collapse를 보여주었다.
5. HeLa cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處置時

caspase-3 活性 增加와 비슷한 樣相으로 PARP의 分절이 나타났다.

6. HeLa cell에 5 mg/ml 宮頸1號煎 處理時 Bcl-2 protein 發現은 別다른 變化가 없는 한편, pro-apoptotic protein인 Bax의 發現은 增加되었다.

以上の 實驗 結果로 볼 때 宮頸1號煎은 HeLa cell의 細胞枯死를 誘導하였으며, 그 과정에서 caspase-3, 9의 活性化, mitochondria membrane potential collapse, cytochrome c의 遊離, PARP의 分節, Bax의 發現 增加 等の 變化가 일어나고 있음이 밝혀졌다. 따라서 宮頸1號煎은 癥瘕의 範疇에 屬하는 子宮頸部癌의 治療와 豫防에 적극 活用될 수 있으리라 思料된다.

- 투 고 일 : 2004년 07월 28일
- 심 사 일 : 2004년 08월 02일
- 심사완료일 : 2004년 08월 07일

參考文獻

1. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회, 부인과학, 서울: 칼빈출판사, 1997; 980-1027.
2. 문구 등, 암 동서의결합치료, 益山: 圓光大學校出版局, 1999; 379-421.
3. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會, 韓醫婦人科學(상), 서울: 정담, 2001; 319-26.
4. 최승훈, 東醫腫瘍學, 서울: 杏林出版, 1995; 229-34.
5. 宋炳基, 韓方婦人科學, 서울: 행림출판, 1998; 249-57.
6. 李鍾華, 韓方婦人科 臨床診療, 서울: 癸丑文化社, 1982; 264, 274.
7. 김태진 등, 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성, 대한부인종양학포스토회지, 1999; 10(2): 138-47.
8. Cohen JJ, Apoptosis. Immunol Today, 1993; 14: 126-30.
9. Searle J, Kerr JF, Necrosis and apoptosi

- s: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, Pathol Annu, 1982; 17 Pt 2: 229-59.
10. 金修敬, 加味溫經湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 圓光大學校大學院, 碩士學位論文, 2001.
11. 朴경미 등, 濟川煎이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 2003; 16(2): 161-76.
12. 朴중문 등, 六合湯이 子宮頸部癌細胞(HeLa Cell)에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 16(3): 128-46.
13. 周國平, 癌症秘方驗方偏方大全, 北京: 中國醫藥科技出版社, 1992; 386.
14. 趙鍾寬, 한방임상중양학, 대전: 주민출판사, 2001; 799-818.
15. 李佩文, 中西醫臨床腫瘤學, 北京: 中國中醫藥出版社, 1996; 869.
16. 郎偉君, 抗癌中藥一千方, 北京: 中國醫藥科技出版社, 1996; 424.
17. 王冰, 許世厚, 抗癌 中藥方選, 北京: 人民軍醫出版社, 1993; 181.
18. Walker JM, The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. Methods, Mol. Biol, 1994; 32: 5-8.
19. Yuan JY et al, The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. Cell, 1993; 75: 641-52.
20. Petak I, Houghton JA, Shared pathway s: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy, Pathol. Oncol. Res, 2001; 7(2): 95-106.
21. SS Smaili et al, Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential, Cell Death and Differentiation, 2001; 8: 909-20.
22. Zamzami G et al, Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to Bax and Bcl-xL, Mol. Cell Biol, 2000; 20: 3125-36.
23. Marchetti P et al, Mitochondria permeability transition is a central coordinating event of apoptosis, J. Exp. Med, 1996; 184: 1155-60.

24. Marzol et al, The permeability transition pore complex: A target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2 related proteins, *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 1261-71.
25. Kitanaka C et al, Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-XL on Bax-induced caspase activation and apoptosis, *Oncogene*, 1997; 15: 1763-72.
26. Jurgensmeier JM et al, Bax indirectly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1998; 95: 4997-5002.
27. Pastorino JG et al, The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition, *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 7770-5.
28. Belizario et al, Cleavage of caspase-1, -3, -6, -8, -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia, *Br. Journal Cancer*, 2001; 84(8): 1135-40.
29. Hockenberry DM et al, Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death, *Nature*, 1990; 348: 334-6.
30. Reed JC, Double identity for proteins of the Bcl-2 family, *Nature*, 1997; 387: 773-6.
31. Kitamura et al, Possible involvement of both endoplasmic reticulum-and mitochondria-dependent pathways in thapsigargin-induced apoptosis in human neuroblastoma in SH-SY5Y cells, *J. Pharmacol. Sci.*, 2003; 92(3): 228-36.
32. Nakagawa et al, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta, *Nature*, 2000; 403(6765): 98-103.
33. 김용범 등, 자궁경부암에서 Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA 단백질의 발현 및 apoptosis 양상과 선행항암화학요법 반응도와의 상관관계에 관한 연구, 대한부인종양학포스토회지, 2000; 11(1): 24-37.
34. 李熙祥, 鄭鎮鴻, 柳同烈, 癥瘕의 治方에 對한 文獻的 考察, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 1998; 6(2): 417-35.
35. 楊維傑 編, 黃帝內經譯解(靈樞), 서울: 成輔社, 1980; 473.
36. 巢元方, 巢氏諸病源候論, 서울: 大星文化社, 1992; 150-2.
37. 孫思邈, 華陀神醫秘傳, 서울: 東醫輔, 1976; 20.
38. 李梴, 編註醫學入門 婦人門, 서울: 大星文化社, 1990; 40-3.
39. 薛己, 校注婦人良方注釋, 서울: 一中社, 1989; 157-60.
40. 方廣編著, 丹溪心法附餘(下), 서울: 大星文化社, 1982; 626-38.
41. 楊維傑 編, 黃帝內經譯解(素問), 서울: 成輔社, 1980; 664.
42. 張介賓, 張氏景岳全書, 서울: 成輔社, 1983; 734-8.
43. 龔廷賢, 萬病回春, 서울: 醫聖堂, 1993; 176-81.
44. 吳謙, 醫宗金鑑, 서울: 大星文化社, 1983; 452-8.
45. 王清任, 醫林改錯評譯, 서울: 成輔社, 1998; 129-32.
46. 辛民教, 臨床本草學, 서울: 永林社, 2000; 168, 172, 174, 221, 300, 307, 328, 336, 364, 372, 435, 688.
47. 이규완 등, 자궁경부암 상피내 종양 및 자궁경부암 조직에서 p53, MIB-1, 및 세포고사(apoptosis)에 관한 연구, 대한산부인과학회지, 2001; 44(6): 1115-22.
48. Chae HJ et al, Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblast: possible role for ceramide, *Endocrinology*, 2000; 141(8): 2904-13.
49. Takahashi H et al, Fas antigen modulates ultraviolet B-induced apoptosis of SVHK cells: sequential activation of caspase 8, 3, and 1 in the apoptotic process, *Exp Cell Res*, 1999; 242(2): 291-8.
50. Perry DK et al, Zinc is a potent inhibitor of protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis, *J*

- Biol Chem, 1997; 272: 18530-3.
51. 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.
 52. Hattori T et al, Heterodimerization of Bcl-2 and Bcl-X(L) with Bax and Bad in colorectal cancer, Acta Oncologica, 2000; 39(4): 495-500.
 53. Tudor G et al, Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels, Cell Death & Differentiation, 2000; 7(6): 574-86.
 54. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death, Cell, 1993; 74: 609-19.
 55. Yang J et al, Prevention of apoptosis by Bcl-2 release of cytochrome c from mitochondrial blocked, Science, 1997; 275: 1129-32.