

Gemcitabine의 세포사멸 기전 연구

설재원 · 이유진 · 강동원 · 강형섭 · 김남수 · 김인식 · 박상열*

전북대학교 수의과대학, 헬스케어 사업단
(게재승인: 2005년 8월 18일)

Mechanism of gemcitabine-induced apoptosis

Jae-Won Seol, You-Jin Lee, Dong-Won Kang, Hyung-Sub Kang, Nam-Soo Kim,
In-Shik Kim, Sang-Youel Park*

Center for Healthcare Technology Development, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University,
Jeonju 561-756, Korea
(Accepted: August 18, 2005)

Abstract : The nucleoside analogue gemcitabine (2', 2-difluorideoxycytide) is potential against a wide variety of solid tumors and considered to be one of the most active drugs in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). In this study, we investigated the signals of gemcitabine-induced apoptosis, especially in point of caspase pathway in A549. We exposed A549 cells to gemcitabine for dose/time dependent manner and the results showed that gemcitabine induced apoptotic cell death in a time/dose-dependent manner. We also treated to gemcitabine and Z-VAD-fmk as a pan-caspase inhibitor for 24 hours. Gemcitabine alone induced 35.3% cell death, and co-treatment with gemcitabine and Z-VAD-fmk induced 15.1% apoptotic cell death. Our results demonstrated that Z-VAD-fmk as a pan-caspase did not completely block the gemcitabine-induced apoptosis. Western blotting analysis showed that gemcitabine increased caspase-3, active caspase-8, p21 and p53 protein expressions in A549. Co-treatment with Z-VAD-fmk completely blocked caspase-3 and active caspase-8 protein expressions, but did not change the level of p21 and p53 protein expressions. Our data indicate that gemcitabine induced apoptosis through caspase-dependent and -independent pathways in A549.

Key words : apoptosis, A549, caspase, gemcitabine

서 론

신체를 구성하고 있는 기본 단위인 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 조절하는데 이 중에서 능동적인 죽음을 세포사멸(apoptosis) 또는 programmed cell death라고 한다. 이러한 세포사멸은 세포내에 본래부터 존재하고 있던 자살 기작이 세포 내부와 외부의 자극에 의하여 활성화되어 계획한 대로 스스로 죽는 현상으로 세포의 괴사(necrosis)와는 달리 죽어가는 세포의 내용물이 세포 외로 유리되지 않아 다른 세포에 손상을 주지는 않는다 [2, 20]. 형태학적으로는 세포의 비중 감소와 세포막의 파괴 및 염색체의 응축과 더

불어 사멸체(apoptotic body) 형성과 함께 식세포 작용을 거치는 작용을 의미하며, 생화학적으로는 염색체 DNA가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 DNA fragmentation을 의미한다 [10, 11].

일반적으로 세포사멸 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해효소에 의해 세포내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는 일련의 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포사멸과 관련되어 있다 [1]. Caspase-8은 TNF- α 또는 Fas ligand와 같은 세포사멸 유도 물질에 의해 활성화되며 일련의 다른 caspase를 활성화 시키면서 세포사멸을 유발시킨다 [4, 13]. 한편 세포사멸 과정에서 cytochrome c는 미토콘드리아 막에 존재하는 통로를 통

이 논문은 교육인적자원부 지방연구중심대학육성사업 헬스케어기술개발사업단 및 한국과학재단(R01-2004-000-10459-0)의 지원에 의하여 연구되었음

*Corresponding author: Sang-Youel Park

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[Tel: +82-63-270-3886, Fax: +82-63-270-3780, E-mail: sypark@chonbuk.ac.kr]

해 방출되며 통로를 구성하고 있는 Bcl-2계 단백질들에 의해 조절된다 [16, 18]. 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9을 활성화 시키고 caspase-9에 의해 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어 있다 [12].

Gemcitabine HCl [2'-deoxy-2', 2'-difluorocytidine monohydrochloride]은 다양한 고형암(solid tumors)에 대해 세포사멸 효과를 가지는 새로운 pyrimidine nucleoside analog로, 세포내에서 deoxycytidine kinase에 의해 인산화 되어 활성형인 gemcitabine diphosphate, gemcitabine triphosphate로 전환되며, DNA합성과 복구과정에서 다수의 억제작용을 나타낸다 [14, 17, 21-23]. 최근 연구에 따르면 비소세포폐암에서 이러한 gemcitabine의 세포 독성 효과는 세포사멸을 유도하고 p53의 기능을 결정하는데 중요하며, 부분적으로 Bcl-2에 관여되어 세포사멸을 일으킨다는 것을 보여주었다 [7]. 또한 gemcitabine에 의한 세포 사멸의 후기에는 세포사멸의 억제 인자로 알려진 nuclear factor- κ B(NF- κ B)의 활성 증가와 관련해 anti-apoptotic protein인 inhibitor of apoptosis-1(IAP-1)의 발현이 유사하게 증가된다는 것을 보여주었다 [3]. 그러나 gemcitabine에 의한 세포사멸 유도가 어떤 경로를 통하여 일어나는지 아직 정확히 밝혀져 있지 않으며, 본 연구는 gemcitabine에 의해 유도되는 세포사멸의 특성을 확인하고자 수행하였으며, 특히 세포사멸 과정에서 중요한 역할을 담당하는 caspase와의 연관성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Cell culture

본 실험에서 사용된 A549 세포주는 ATCC (The Global Bioresource Center)로부터 공급받아 사용하였다. 세포의 성장 유지를 위해서 100 μ g/ml gentamicin, 100 μ g/ml penicillin-streptomycin과 10%(V/V) fetal bovine serum이 첨가된 RPMI배지에 5% CO₂를 공급하고 37°C로 배양시켰다.

Cell viability

암세포의 생존능을 측정하기 위해서 세포를 12-well plate에 1.0 \times 10⁴ 이 되게 각 well에 넣은 다음 5% CO₂, 37°C 상태에서 24시간 배양시켰다. 12-well plate에서 증식한 세포에 농도(0, 25, 50, 100, 200 μ M)와 시간(0, 3, 6, 12, 24 hrs)별로 gemcitabine (Lilly France, USA)을 처리하여 배양하였고, gemcitabine (100 μ M)과 Z-VAD-fmk (100 μ M; BD Pharmingen, USA)를 동시에 처리한 후에 24시간 동안 배양하였다. 세포의 생존능 측정은 crystal

violet 염색 방법에 의해 검사할 수 있었고 세포의 형태를 현미경에서 검사한 후 사진 촬영을 하였다. 세포의 생존능 측정은 세포를 30% ethanol과 3% formaldehyde가 들어있는 0.5% crystal violet으로 실온에서 10분간 염색하고 흐르는 물에서 4회 세척한 후 건조하였다. 건조된 후에 세포를 1% SDS 용액으로 용해시켜서 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군을 100%로 정하고 세포의 생존능을 결정하였다.

Western blotting

Tissue culture dish(100 \times 20 mm)에 배양된 세포를 scraper를 이용하여 모은 다음 PBS로 세척한 후 2000 rpm에서 10분간 원심분리해서 상층액을 제거하였다. 모아진 세포에 용해액(25 mM HEPES(pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, and protease inhibitor mixture)을 넣어 부유시킨 후 얼음에 30분간 방치하고 sonication 하였다. 단백질의 분자량에 맞게 10~15% SDS gel을 이용하였으며 단백질 정량을 통해 시료에서 일정한 양의 단백질을 취한 후 단백질 분자량 marker와 함께 gel lane에 넣었다. SDS-PAGE에 전기영동을 해서 단백질을 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer 시켰다. Nitrocellulose membrane의 비특이성 항체 결합을 막기 위하여 non-fat dry milk blocking 용액을 넣은 후 1시간 정도 반응시키고 PBS 완충용액으로 2~3회 세척해주었다. 다음으로 immunoblot을 실시하기 위해 primary antibody를 blocking 용액과 1:100 ~ 1:1000의 비율로 희석하고 상온에서 1시간 정도 흔들어서 주었다. 다시 2~3회 PBS 완충용액으로 세척하고 탐식자가 결합된 secondary antibody를 1:2000의 비율로 희석하고 1시간 정도 흔들어서 주었다. 다시 2~3회 세척 후 ECL solution(Pierce, USA)을 처리하여 측정하였다. 본 실험에 사용한 antibody인 caspase-3, caspase-8, cytochrome-c와 Bax는 BD Pharmingen(San Diego, USA)에서, p21과 p53은 Santa Cruz(Santa Cruz, USA)에서 구입하여 사용하였다.

결 과

최근의 연구보고에 의하면 gemcitabine이 다양한 고형암세포에서 세포사멸을 유도한다고 보고되었으나 그 세포사멸 유도 기전에 관해서는 아직 정확한 기전이 보고되어있지는 않아 그 기전을 규명하기 위하여 본 연구를 시작하였다. 먼저 A549 세포에 대한 gemcitabine의 세포사멸 효과를 측정하였다. A549세포에 대한 gemcitabine의 농도 및 시간별 세포사멸 효과를 확인하기 위하여 A549 세포에 gemcitabine을 100 μ M의 농도로 0, 12, 24,

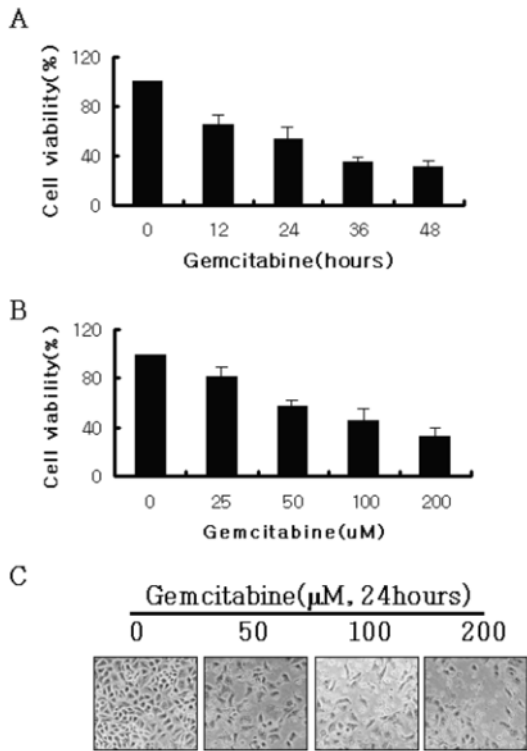


Fig. 1. Gemcitabine induces apoptotic cell death in a time/dose-dependent manner. (A) A549 cells plated in 12-well were treated with gemcitabine (100 μM/m) for the indicated time. Cell viability was determined by crystal violet staining method. Viability of control cells was set at 100%, and viability relative to the control was presented. The experiments were performed in triplicated at least twice. (B) A549 cells plated in 12-well were treated with gemcitabine (24hours) for the indicated dose. Cell viability was determined as described in A. (C) Cell morphology under the conditions as described in (B) was photographed.

36, 48시간동안 그리고 0, 25, 50, 100, 200 μM의 농도로 24시간 동안 처리한 후 세포생존율을 측정하였다(Fig. 1). 측정 결과는 gemcitabine의 처리 농도가 증가할수록 그리고 처리 시간이 증가할수록 A549 세포의 사멸은 증가하였음을 알 수 있었다. 100 μM gemcitabine을 24시간 처리하였을 때 대조군에 비해 약 50% 이상의 세포 사멸 효과를 보였으며, 시간별 처리와 농도별 처리에 의존적인 경향을 보였다.

세포사멸시 조절인자로 작용하는 단백질 분해효소인 caspase의 활성화와 gemcitabine이 유도하는 세포사멸의 기전에 어떠한 관련성이 있는지를 조사하기 위하여 gemcitabine을 처리한 A549 세포에서 단백질의 발현 정도를 조사하였다. 먼저 gemcitabine의 처리가 caspase-8

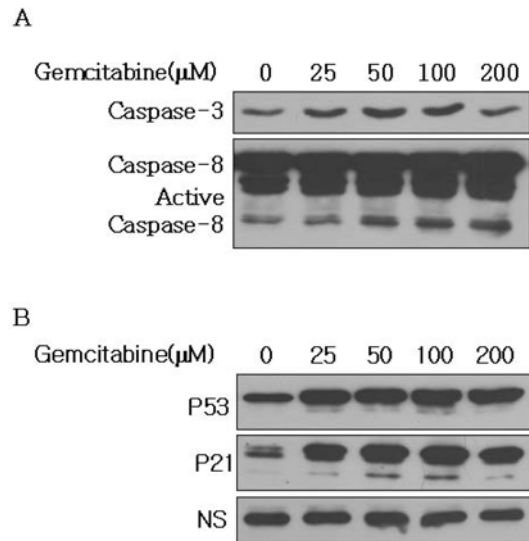


Fig. 2. Western blotting analysis showing expression pattern of various proteins in A549 cells exposed to gemcitabine. (A) Gemcitabine activates caspase-3, -8 and its downstream signaling molecules. A549 cells treated with gemcitabine (24 hours) for the indicated dose. Whole cell lysates were prepared and protein sample (40 μg) were separated on SDS gel, analyzed for apoptotic proteins by Western blotting analysis. (B) Expression of apoptotic proteins were analyzed by Western blotting as described in (A). NS indicates a nonspecific protein band that was used to ensure equal protein loading.

과 caspase-3의 발현 및 활성화를 유도하는지 확인하기 위하여 배양된 A549 세포에 gemcitabine을 0, 25, 50, 100, 200 μM의 농도로 24시간 처리한 후에 Western blotting을 실시하여 caspase 단백질 발현 및 활성화의 변화상을 조사하였다(Fig.2). Fig.2A에서와 같이 gemcitabine을 농도별로 처리한 결과 세포사멸(apoptosis)의 주요 조절 단백질인 caspase-3와 caspase-8의 발현 및 활성도가 gemcitabine 처리농도의 증가에 따라 점차적으로 증가되는 것을 볼 수 있었다. 본 결과는 A549 세포에 대한 gemcitabine의 세포사멸 유도는 caspase의 활성화에 의해 진행되었으며, 이는 gemcitabine이 caspase에 의존적으로 세포사멸을 유도 할 수 있음을 보여준 결과이다.

세번째 실험으로 paclitaxel, decetaxel 그리고 vinorelbine 등과 같은 화학요법 제제들에 의해 발현 증가를 보이는 것으로 보고 되어진 p21과 p53의 세포사멸과 관련된 단백질들의 발현 변화를 측정하였다(Fig.2B). 이들 단백질들은 전사조절인자로서 활성화 되면, 다양한 단백질들의 전사를 조절함으로써 세포사멸에 관여하는 것으로 보고되었다. 특히 p21 단백질은 세포의 cell cycle을

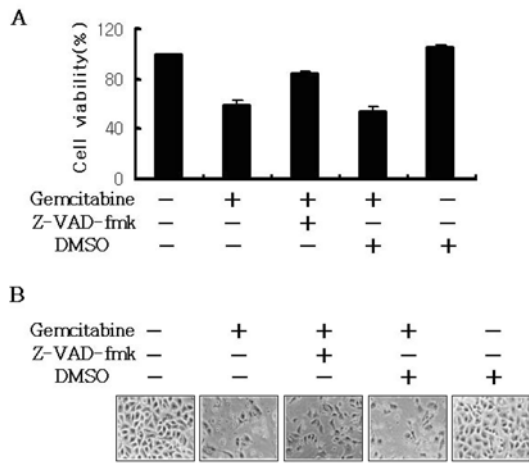


Fig. 3. Effect of Z-VAD-fmk on gemcitabine-induced apoptosis. (A) A549 cells plated in 12-well exposed to gemcitabine (100 μ M/ml) or Z-VAD-fmk (100 μ M/ml) for 24 hours. Cell viability was determined by crystal violet staining method. Viability of control cells was set at 100%, and viability relative to the control was presented. The experiments were performed in triplicated at least twice. (B) Cell morphology under the conditions as described in (A) was photographed.

정지시킴으로써 세포 성장 및 증식에 깊이 관여하는 것으로 보고되어 있다. p21과 p53의 단백질 발현 변화를 조사하기 위하여 A549 세포에 gemcitabine을 0, 25, 50, 100, 200 μ M의 농도로 24시간 처리한 후에 Western blotting을 실시하였으며, 그 결과 p21 그리고 p53 단백질 모두 gemcitabine을 처리함에 따라 발현량이 증가되었음을 알 수 있었다. 특히 gemcitabine의 처리 농도가 증가함에 따라 발현량 역시 증가되었으며, 이러한 경향은 p21 단백질의 경우에 더욱 두드러짐을 보여주었다. 본 실험결과 gemcitabine은 A549 세포에서 palclitaxel, decetaxel 그리고 vinorelbine과 같은 다른 화학요법 제제들과 동일하게 p21과 p53의 단백질 발현량을 증가시켰으며, 이는 gemcitabine이 caspase의 세포사멸 전달경로와 다른 경로인 p21과 p53의 세포사멸 신호전달 경로로 진행 될 수 있음을 보여주는 것이었다.

마지막으로 gemcitabine의 세포사멸이 caspase에 의존적인지 확인하기 위하여 pan-caspase inhibitor를 이용하여 caspase의 활성을 차단한 후 세포생존성과 단백질 발현 정도를 조사하였다. A549 배양 세포에 gemcitabine (100 μ M)을 단독 또는 Z-VAD-fmk(100 μ M), Z-VAD-fmk를 용해시킬때 사용한 DMSO (50 μ M)를 24시간 동안 처리한 후에 세포 생존성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과

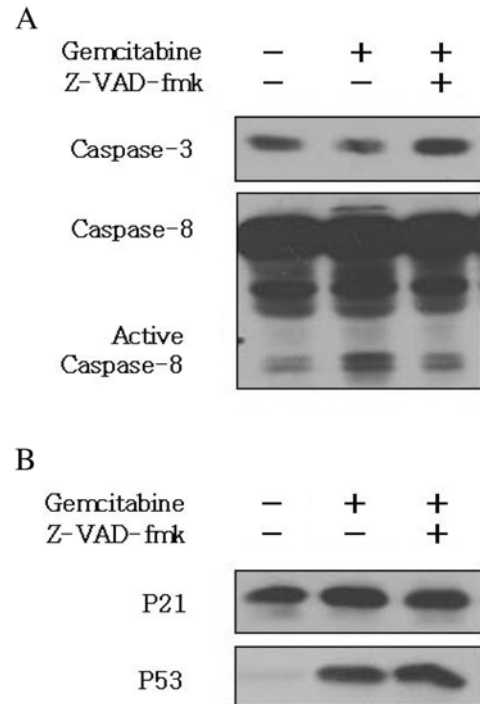


Fig. 4. Western blotting analysis in A549 cells exposed to gemcitabine and Z-VAD-fmk. (A) Expression of caspase-3, caspase-8 protein in gemcitabine and/or Z-VAD-fmk-treated A549 cells. A549 cells treated with gemcitabine and/or Z-VAD-fmk for 24 hours. Whole cell lysates were prepared and protein sample (40 μ g) were separated on SDS gel, analyzed for apoptotic protein by Western blotting analysis. (B) Expression of p21 and p53 proteins were analyzed by Western blotting as described in (A).

Fig. 3에서와 같이 gemcitabine을 단독 처리한 세포에서는 대조군에 비해 35.3% 정도의 세포사멸을 보였고, gemcitabine과 Z-VAD-fmk를 동시에 처리한 세포에서는 15.1% 정도의 세포사멸을 보였다. 또한 gemcitabine과 DMSO와의 동시 처리에서는 세포사멸이 gemcitabine 단독 처리한 것과 유사하였다. 이 실험의 결과는 gemcitabine이 유도하는 세포사멸은 caspase에 완전 의존적으로 일어나는 것이 아니라는 점을 보여주었다. 또한 이러한 결과에 따른 세포내의 단백질 발현 변화를 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다(Fig. 4). Fig. 4A에서와 같이 활성 caspase-3와 8의 발현이 gemcitabine의 처리에 의해 대조군 보다 증가하였으며, gemcitabine에 Z-VAD-fmk를 처리하였을 때 다시 감소하였다. 그러나 p21과 p53의 단백질은 Z-VAD-fmk의 처리와 관계없이 gemcitabine의 처리에 의해 그 발현이 상당히 증가되었다. 본

실험의 결과는 gemcitabine의 처리가 caspase 활성화를 유도할 뿐만 아니라 p53 단백질의 발현을 유도하는 것을 보여주고 있다. 본 연구 결과를 종합하면 항암 화학요법제로 사용되고 있는 gemcitabine은 A549 세포의 세포사멸 유도시 caspase 의존 및 비의존의 경로로 이루어지는 것으로 확인되었다.

고 찰

최근 연구에서 gemcitabine은 staurosporin, paclitaxel 그리고 cisplatin 등과 같은 화학요법 약물들과 같이 난소암세포에서 세포사멸을 유도하는데 고려되어지며 [5], 췌장암세포에서 시간과 농도별로 p38 MAPK(mitogen-activated protein kinase)를 활성화 시켜서 세포사멸을 유도하고 [9] 비소세포폐암에서 p53의 기능을 결정하는데 중요하며 부분적으로 Bcl-2에 의존적인 caspase-9의 활성화경로와 관련되어 세포사멸을 일으킨다는 것을 보여주었다 [7]. Gemcitabine은 최근 연구에서 비소세포폐암에 잠정적인 효과를 나타내는 항암제로 알려져 있다. 그러나 gemcitabine의 단독 처리가 폐암세포 유래인 A549에서 어떤 경로를 통하여 세포사멸을 일으키는지는 아직 정확하게 연구 되어지지 않았다.

본 연구에서 gemcitabine이 A549 세포에 대해 시간과 농도에 의존적으로 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였고, gemcitabine의 농도별 처리에 의해 세포사멸의 주요 조절 단백질인 caspase-3 및 8의 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 이것은 gemcitabine이 췌장암세포 유래인 BxPC-3 세포에서와 다양한 골수종 세포(myeloma cell) 유래인 MM1.S 세포에서 caspase가 활성화 됨으로써 세포사멸이 유도된다 [6, 19]는 보고와 동일한 결과를 보여주었다. 이러한 결과는 gemcitabine이 A549 세포에서 세포사멸의 조절 단백질인 caspase의 경로를 통해 세포사멸을 유도할 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

또한 세포 사멸시 중요한 조절인자로 작용하는 caspase와 gemcitabine의 연관성을 조사하기 위하여 세포 침투성 pan-caspase 억제제인 [15] Z-VAD-fmk를 gemcitabine과 동시에 처리 하였다. 그 결과 gemcitabine의 처리가 caspase의 활성화에 의한 세포사멸 뿐만 아니라 caspase에 의존하지 않는 다른 경로를 통해 세포사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다. Chen M 등[8]은 대장암을 유발하는 RKO-E6 세포에서 gemcitabine이 p53의 발현을 유도하고 시간에 따라서 세포사멸 전구체인 bax 유전자의 발현이 증가되어 세포사멸을 유도한다고 보고하여 본 실험에서 gemcitabine이 caspase에 의존하지 않는 세포사멸을 유도한다는 결과를 뒷받침 해주고 있다.

이상의 실험에서 폐암 세포 유래인 A549 세포에서

gemcitabine의 처리 농도와 시간에 의존적으로 세포사멸을 유도하였음을 알 수 있었으며, caspase에 의존적인 경로를 통해 세포사멸을 유도함과 동시에 caspase에 비의존적인 경로를 통해 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였다. 본 연구를 통하여 gemcitabine의 처리에 의한 세포내 세포사멸 관련 인자들의 변화 경향을 확인하였으며, 이는 비소세포폐암에 gemcitabine의 적용시 효과를 극대화할 수 있는 다양한 방법을 모색하는데 기초자료가 될 수 있을것으로 판단된다.

결 론

본 연구는 gemcitabine에 의해 유도되는 세포사멸의 기전을 확인하고자 수행 하였으며, 특히 세포사멸 과정에서 중요한 역할을 담당하는 caspase와의 연관성을 조사하고자 하였다. gemcitabine이 폐암 유래 세포주인 A549 세포에 대해 시간과 농도에 의존적으로 세포사멸을 유도함을 확인하였고, gemcitabine 처리 농도의 증가에 따라 caspase-3 및 8 단백질의 활성화와 p21 및 p53 단백질의 발현량이 증가됨을 확인할 수 있었다. Caspase 활성화 차단제의 처리 결과로 gemcitabine의 처리가 caspase의 활성화에 의존적으로 세포사멸을 유도하였으며, 동시에 caspase에 비의존인 형태의 세포사멸도 유도할 수 있음을 알 수 있었다. 결론적으로 A549 세포에서 gemcitabine에 의해 유도되는 세포사멸은 caspase 의존적 및 비의존적인 경로를 통하여 진행됨을 확인하였다.

참고문헌

1. **Alnemri ES.** Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997, **64**, 33-42.
2. **Ashkenazi A, and Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998, **281**, 1305-1308.
3. **Bandala E, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J.** Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol* 2001, **62**, 13-19.
4. **Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D.** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996, **85**, 803-815.
5. **Cartee L, Kucera GL, Willingham MC.** Induction of apoptosis by gemcitabine in BG-1 human ovarian

- cancer cells compared with induction by staurosporine, paclitaxel and cisplatin. *Apoptosis* 1998, **3**, 439-449.
6. **Chandler NM, Canete JJ, Callery MP.** Caspase-3 drives apoptosis in pancreatic cancer cells after treatment with gemcitabine. *J Gastrointest Surg* 2004, **8**, 1072-1078.
 7. **Chang GC, Hsu SL, Tsai JR., Wu WJ, Chen CY, Sheu GT.** Extracellular signal-regulated kinase activation and Bcl-2 downregulation mediate apoptosis after gemcitabine treatment partly via a p53-independent pathway. *Eur J Pharmacol* 2004, **502**, 169-183.
 8. **Chen M, Hough AM, Lawrence TS.** The role of p53 in gemcitabine-mediated cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000, **45**, 369-374.
 9. **Habiro A, Tanno S, Koizumi K, Izawa T, Nakano Y, Osanai M, Mizukami Y, Okumura T, Kohgo Y.** Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **316**, 71-77.
 10. **Kerr JF.** Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971, **105**, 13-20.
 11. **Kerr JF, Wyllie AH., Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, **26**, 239-257.
 12. **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**, 479-489.
 13. **Lim ML, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, Nagley P.** On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci* 2002, **9**, 488-506.
 14. **Lobo F, Virizueta JA, Dorta FJ, Florian J, Lomas M, Jimenez E, Lopez P, Casado V, Leon A, Estevez LG, Domine M.** Gemcitabine/vinorelbine in metastatic breast cancer patients previously treated with anthracyclines: results of a phase II trial. *Clin Breast Cancer* 2003, **4**, 46-50.
 15. **Maier D, Jones G, Li X, Schonthal AH, Gratzl O, Van Meir EG, Merlo A.** The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res* 1999, **59**, 5479-5482.
 16. **Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB.** Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997, **385**, 353-357.
 17. **Mosconi AM, Crino L, Tonato M.** Combination therapy with gemcitabine in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1997, **33 Suppl 1**, S14-17.
 18. **Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW.** X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996, **381**, 335-341.
 19. **Nabhan C, Gajria D, Krett NL, Gandhi V, Ghias K, Rosen ST.** Caspase activation is required for gemcitabine activity in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2002, **1**, 1221-1227.
 20. **Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell* 1997, **88**, 355-365.
 21. **Noble S, Goa KL.** Gemcitabine. A review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lung cancer and pancreatic cancer. *Drugs* 1997, **54**, 447-472.
 22. **Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, Yu S, Pon RT, Gmeiner WH, Pommier Y.** Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res* 2002, **8**, 2499-2504.
 23. **Silver DF, Piver MS.** Gemcitabine salvage chemotherapy for patients with gynecologic malignancies of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Am J Clin Oncol* 1999, **22**, 450-452.