

2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid 처리에 의한 인간 간암세포주 HepG2의 apoptosis 유도

유기현 · 이종민 · 황보전 · 송명종 · 양혜정 · 백남인
김성훈¹ · 김대근² · 권병목³ · 박미현⁴ · 정인식*

경희대학교 생명공학원 및 ¹동서의학대학원, ²우석대학교 약학과, ³생명공학연구원, ⁴(주)이롭라이프

2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic Acid Induces the Apoptosis of Human Hepatoma HepG2 Cells

Ki Hyun Yoo, Jong Min Lee, Jeon Hwang Bo, Myoung Chong Song, Hye Joung Yang, Nam In Baek,
Soung Hoon Kim¹, Dae Keun Kim², Byoung Mok Kwon³, Mi Hyun Park⁴ and In Sik Chung*

Graduate School of Biotechnology and ¹Graduate School of East-West Medical Science,
Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

²Department of Pharmacy, Woo Suk University, Jeonju 565-701, Korea

³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Deajon 305-333, Korea

⁴Erom Life Co. Ltd., Seoul 135-825, Korea

Received September 4, 2006; Accepted October 16, 2006

2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid was isolated from *Trapa pseudoincisa* S. et Z. It has a common structure of pentacyclic triterpenes and belongs to the amyirin ursolic acid group. The cytotoxic effect of this compound was investigated in human hepatoma cell line HepG2. 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid showed dose-dependent cytotoxicity in HepG2 cells. Confocal microscopy data showed that green fluorescence was increased in 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid treated-HepG2 cells in a time-dependent manner. 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid also increased the sub-G1 cell population of HepG2 cells as well as ladder-like DNA fragmentation. Taken together, our results indicate that 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid induced apoptosis in HepG2 cells.

Key words: 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid, HepG2, apoptosis, cytotoxicity

서 론

Triterpenes는 다양한 식물의 모든 부분에 널리 존재하는 주요 성분이다. Glycyrrhizin¹⁾, oleanolic acid²⁾, ursolic acid³⁾, β-boswellic acid⁴⁾ 같은 triterpenes는 항 염증, 간 보호, 면역 조절을 포함한 다양한 생물학적 효과를 가지고 있다고 보고되어 있다⁵⁾. 특히 ursolic acid는 피부암 예방⁶⁾, 암 촉진 억제⁷⁾, anti-invasion⁸⁾ 그리고 암세포 apoptosis의 유도⁹⁾ 같은 항암 효과를 가지고 있다고 알려져 있다. 그리고 ursolic acid 구조를 갖는 asiatic acid, triterpene(2α, 3β, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid)는 몇몇 항암세포주에서 활성이 검출된 바 있다¹⁰⁾. Asiatic acid와 비슷한 구조를 갖는 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid, pentacyclic triterpene을 애기마름 식물에서 분리하였다.

그러나 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid의 간암세포주에 미치는 영향에 대한 연구는 현재까지 보고된 바 없다.

Apoptosis는 최근 cancer 화학요법(chemotherapy)에서 중요한 관심사항이 되고 있다. 여러 화학요법 약품들은 암세포주에서 apoptosis 유도를 보여주고, apoptosis는 최근 개발중인 항암 약품의 표적이 되고 있다^{11,12)}. Apoptosis가 일어나면 세포의 수축과 핵, 원형질막 blebbing, 염색질 응축, DNA 분절(fragmentation) 현상을 포함한 형태학적 특성과 기능적인 변화가 나타난다^{13,14)}.

본 연구에서는 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid가 HepG2 간암 세포주에서 apoptosis를 통해 세포사멸을 유도한다는 것을 보여준다.

재료 및 방법

재료. 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid와 9개 화합물은 경희대학교 생명공학원 천연물 연구실로부터 확보하였으며, 추출방법을 요약 기술하면 다음과 같다. 애기마름 1.1 kg

*Corresponding author
Phone: 82-31-201-2436, Fax: 82-31-202-9885
E-mail: ischung@khu.ac.kr

(생체 중)에 80% MeOH 용액(2 l × 3)을 가하여 50°C 이하에서 5시간씩 3회 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 여액을 45°C에서 감압농축하고, 이 농축물을 물(1 l)과 ethyl acetate (EtOAc, 1 l × 2)로 분배 추출하였으며, 물 층은 다시 *n*-butanol (*n*-BuOH, 1 l × 2)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 EtOAc 분획(30 g), *n*-BuOH 분획(5 g) 및 물 분획을 얻은 후, 이들 중 EtOAc 분획(TIE, 30 g)을 silica gel column chromatography(c.c.)를 실시하여 분획물을 얻었다. 자세한 추출 분리방법 및 구조분석은 문헌¹⁵⁾에 기술되어 있다. Modified Eagle Medium(DMEM) 배지와 Penicillin-Streptomycin은 GIBCO사의 제품을 그리고 EGM-2 배지는 CAMBREX사의 제품을 이용하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사의 제품을 그리고 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), dimethyl sulfoxide(DMSO)와 Propidium iodide(PI), RNase A는 Sigma사의 제품을 이용하였다. 또한 YO-PRO-1 iodide는 Molecular Probes사의 제품을 이용하였다.

세포배양. 사람 간암세포인 HepG2(한국세포주은행)는 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂ 농도가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지 안에 10% FBS와 100 unit/ml 농도로 penicillin-streptomycin과 sodium carbonate가 첨가되었다. 사람 태반 내피 세포인 HUVEC(primary human umbilical vein endothelial cell, Mordern Tissue Technology, Korea)은 EGM-2 배지를 이용하여 5% CO₂ 농도가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지 안에 2% FBS와 hydrocortisone, hFGF, VEGF, R3-IGF-1, ascorbic acid, hEGF, GA-1000 그리고 heparin이 첨가되었다. 세포를 배양 후 회수하기 위해 약 2분 정도 0.25% trypsin을 처리하였다. 회수된 세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후에 각종 실험에 사용하였다.

세포독성검사. 에기마름으로부터 추출된 다양한 화합물들의 세포독성은 MTT colorimetric assay를 이용해 측정하였다. 실험에 사용할 화합물을 DMSO에 녹였다. 간암세포와 태반 내피세포는 well 당 배지 100 μl 안에 1 × 10⁴ cells의 초기세포 농도로 96-well microplate에 분주하였다. 37°C에서 약 2시간 배양시킨 후에 혈청이 없는 배지에 각각의 화합물을 50 μg/ml 농도로 처리를 하였다. 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid의 경우에도 다양한 농도로 분주한 세포에 처리하여 실험을 수행하였다. 세포를 분주한 후 24시간 배양한 후에 각각의 well에 MTT solution(5 mg/ml in PBS)을 50 μl씩 첨가하였다. 그리고 37°C에서 약 2시간 배양한 후에, 배지를 제거하고 약 5분간 DMSO 100 μl를 처리해 주었다. Optical density(OD)는 550 nm 파장에서 microplate reader(BIO-TEK Inc.)를 사용하여 측정하였다. 세포의 생존율은 다음의 식에 따라서 화합물을 처리한 그룹과 대조군 그룹 내에 있는 생존세포의 비율로써 측정하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{[\text{OD}(\text{compound}) - \text{OD}(\text{Blank})]}{[\text{OD}(\text{Control}) - \text{OD}(\text{Blank})]} \times 100$$

Confocal laser microscopy를 이용한 apoptosis의 확인. 간암 세포는 well 당 1 × 10⁶ cells의 농도로 6-well plate에 분주하였다. 24시간 뒤에 다양한 시간으로 화합물을 처리하였고, 회

수 한 뒤 PBS로 두 번 세척했다. 세포들은 PI(2 μM) 1 μl와 YO-PRO-1(1 μM) 1 μl를 첨가하여 암조건 얼음상에서 20분 동안 염색하였다. 염색된 세포의 형광은 488 nm Aragon laser, 543 nm HeNe laser 그리고 633 nm HeNe laser를 사용하여 Zeiss confocal laser scanning microscope(Zeiss LSM 510)로 분석하였다.

세포 주기 분석. 간암세포들은 well 당 1 × 10⁶ cells의 농도로 6-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 다양한 시간으로 화합물을 처리한 후 회수하여 차가운 PBS로 두 번 세척하였다. 세포덩어리는 차가운 70% 에탄올로 용해시키고 -20°C에서 16시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포는 원심분리 후 세척한 뒤 PBS 100 μl로 용해한 후에, RNase A(1 mg/ml) 100 μl를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 세포들은 PI(50 μg/ml) 400 μl를 첨가하여 염색하였다. 나이론 그물(40 μm)로 세포를 여과한 후, 염색된 DNA 함유량은 FACS Vantage SE와 CellQuest program(Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)를 이용하여 분석하였다.

DNA 분절(fragmentation) 현상 분석. 간암세포에 화합물 100 μM 농도로 24시간 동안 처리하고, 회수한 뒤 PBS로 두 번

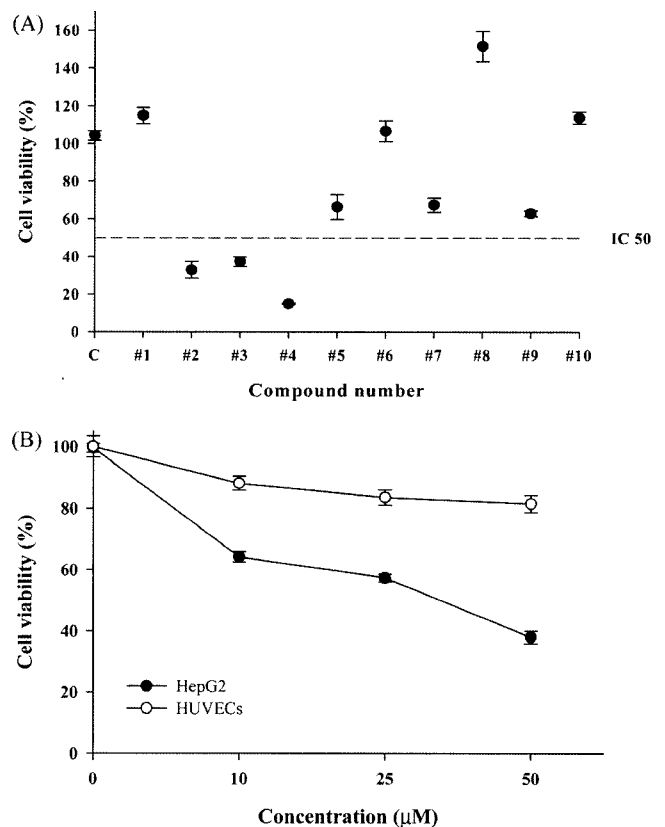


Fig 1. Effect of various compounds extracted from *Trapa pseudoincisa* S. et Z. on the cytotoxicity against HepG2 cells (A). The cells were treated with 50 μg/ml of each compound for 24 hrs. Effect of compound 2β, 3α, 23-trihydroxyrus-12-ene-28-oic acid on the cytotoxicity against HepG2 cells and HUVECs (B). The cells were treated with various concentrations of compound for 24 hrs and cell viability was determined by MTT assay. All data were represented as mean ± S.D. of triplicates (IC₅₀: reports the concentration of compound that inhibits the growth of cells by 50%).

세척하였다. QIAamp® DNA Mini Kit(QIAGEN)의 사용설명서에 따라 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA 시료는 1.8% agarose gel로 1.5시간 동안 50 V에서 전기영동 하였다. Gel은 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator (WEALTEC)를 사용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid의 독성. 애기마름에서 분리한 Table 1에 열거된 여러 화합물을 24시간 동안 간암 세포주에 처리하여 MTT assay로 확인한 결과 3가지 화합물의 세포 생존율이 50% 이하로 감소하였다(Fig. 1A). 독성이 있는 3가지 화합물 중 #4는 asiatic acid(2 α , 3 β , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid)와 비슷한 형태였으나 NMR 분석결과 C2, C3에 위치한 hydroxyl기 배향이 각각 2 β , 3 α 인 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid 구조라는 것을 확인하였다⁵⁾. 간암 세포주에 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 다양한 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, 약 30 μ M 이상부터 세포 생존율이 50% 이하로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid가 정상세포에도 독성이 있는지 확인하기 위해 사람 태반 내피세포를 대조군으로 실험을 수행하였다(Fig. 1B). 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 태반 내피세포에 다양한 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 세포 생존율이 크게 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid가 간암 세포주 HepG2에 독성이 있다는 것을 의미한다. 그리고 추후 실험에 사용할 화합물의 농도는 50 μ M 또는 100 μ M로 결정하였다.

Confocal laser microscopy를 이용한 apoptosis 확인. Apoptosis와 necrosis는 세포사멸의 주요한 두 가지 형태이다.

DNA-binding fluorescent molecules인 YO-PRO-1과 PI를 사용하여 apoptosis와 necrosis를 구별할 수 있다. 녹색 형광 probe인 YO-PRO-1은 투과성질 때문에 원형질막을 통과하여 세포 안으로 들어 갈 수 있다^{6,18)}. Apoptosis가 일어나는 세포의 세포막은 정상세포와는 다르게 약간의 투과성을 가지게 되므로, 투과성질을 가지고 있는 녹색 형광 probe인 YO-PRO-1을 이용해 apoptosis가 일어난 세포 안으로 YO-PRO-1이 자유롭게 들어가 핵산에 표지 된다. 붉은 형광 probe인 PI는 necrosis를 위한 표지에 사용한다. 따라서 apoptotic 세포 초기 상태에서는 녹색 형광이 관찰되고, 후기 상태와 necrotic 세포에서는 붉은 형광이 관찰된다. 그리고 살아있는 세포의 세포막은 YO-PRO-1과 PI가 투과할 수 없기 때문에 살아 있는 세포에서는 형광이 관찰되지 않는다. 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 간암 세포주에 시간별로 처리 하였을 때, 화합물을 처리하지 않은 대조군에 비해 6시간부터 녹색 형광이 나타나기 시작하였고 12시간 이후부터 붉은 형광 보다는 녹색 형광의 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 간암 세포주에서 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid에 의해 apoptosis가 유도된다는 것을 의미한다.

Flow cytometric analysis를 이용한 세포 주기 분석. 세포주기 분석 실험은 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid가 처리된 HepG2 세포의 sub-G1 apoptotic부분을 확인하기 위해 수행하였다. Fig. 3의 (A)와 (C)는 control 세포로서 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 처리하지 않은 세포들을 PI로 염색하여 분석한 세포주기 그림이며, (B)와 (D)는 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 처리한 세포들을 PI로 염색하여 분석한 세포 주기 그림으로 sub-G1의 변화를 확인하였다. Fig. 3의 M1이 sub-G1이며 이 부분의 증가는 apoptosis에 의한 세포사멸을 의미한다. Apoptosis가 일어나는 동안에는 calcium-and magnesium-dependent nuclease들이 activation 되면

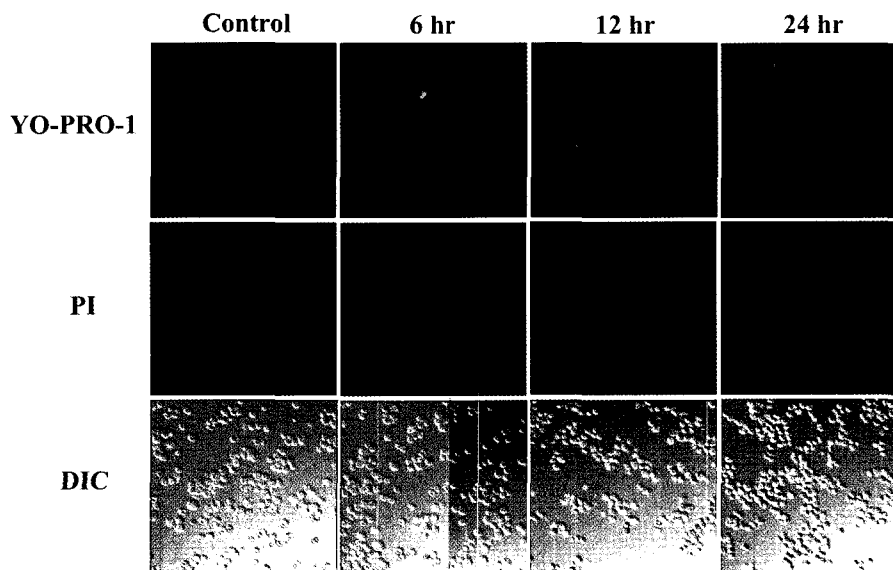


Fig 2. Confocal microscope data of 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid treated-HepG2 cells. Marker for necrosis (propidium iodide staining) and apoptosis (YO-PRO-1) were used to stain control HepG2 cells and treated HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 50 μ M of compound for time course (6 hrs, 12 hrs, 24 hrs).

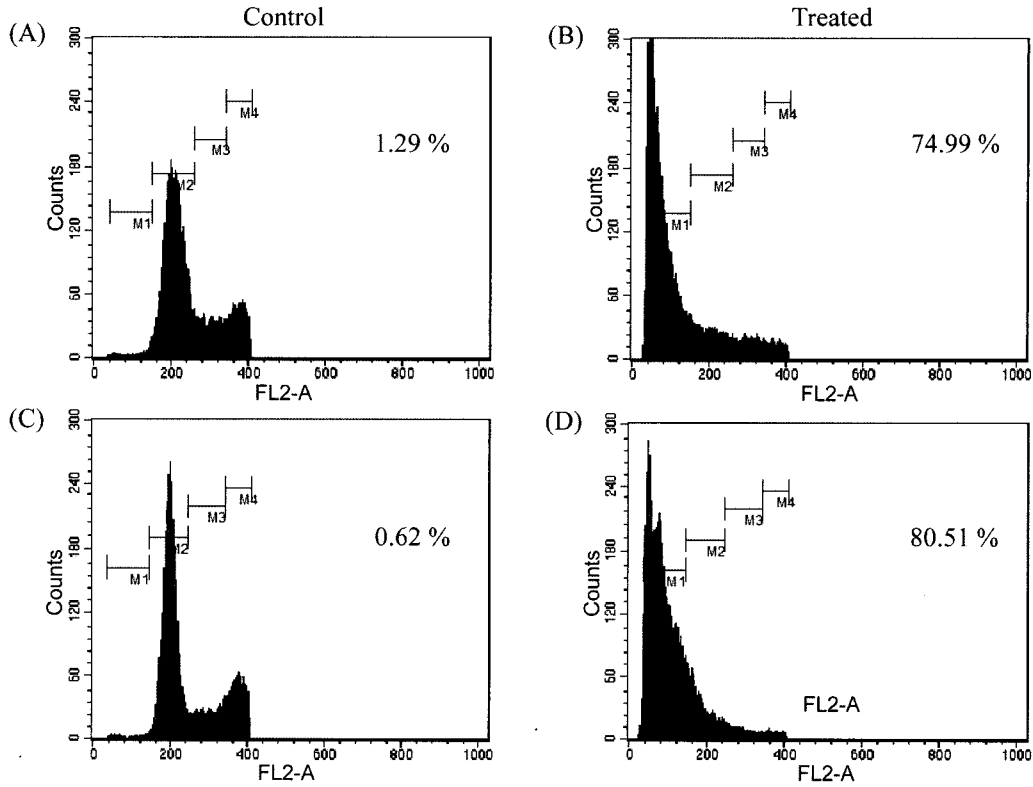


Fig 3. Exposure to 2β, 3α, 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid increased sub-G1 cell population by cell cycle analysis. Cell cycle analysis was performed in HepG2 cells exposed to 0 μM of compounds for 24 hrs (A) and 48 hrs (C), 100 μM of compound for 24 hrs (B) and 48 hrs (D), respectively. DNA contents were analyzed using CellQuest Software with a flow cytometry system.

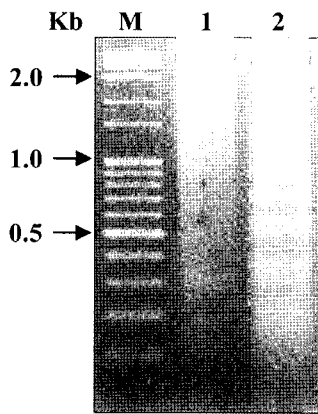


Fig 4. Exposure to 2β, 3α, 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid induced DNA fragmentation in HepG2 cells. HepG2 cells (1×10^6 cells/ml) were treated with 100 μM of compound for 24 hrs. Fragmented DNA was separated by 1.8% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light. Lane 1, 100 bp Marker; lane 2, 0 μM; lane 3, 100 μM treatment.

서 DNA를 절단하게 된다. 그것으로 인해 잘려진 작은 DNA 절편들은 실험과정 중 PBS와 같은 washing buffer에 녹아 나와 washing 단계에서 제거되게 된다. 그러므로 apoptosis가 일어난 세포를 정량적인 DNA-binding dye인 PI를 사용하여 염색해 보면 apoptosis에 의한 DNA fragmentation 현상에 의해 세포내에 존재하는 DNA양이 줄어들어 덜 염색되고 세포주기의

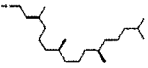
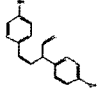
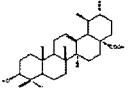
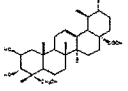
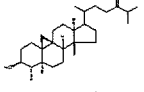
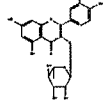
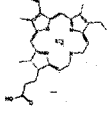
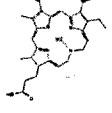
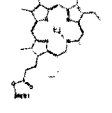
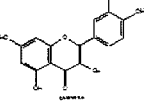
G1 peak 왼쪽에 sub-G1 peak를 형성하게 된다. Sub-G1 peak 변화는 FACS를 이용하여 관찰을 할 수 있다. 2β, 3α, 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 간암세포에 24시간, 48시간 처리한 후 flow cytometric analysis를 수행한 결과 화합물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 sub-G1부분이 각각 74.97%, 80.51%로 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 이러한 HepG2 세포의 sub-G1부분의 증가는 apoptosis에 의한 세포 사멸임을 보여주고 있다.

DNA 분절(fragmentation) 현상의 확인. 간암 세포주에서 2β, 3α, 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid 100 μM을 24시간 동안 처리한 결과 DNA의 분절(fragmentation) 현상이 발생하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 2β, 3α, 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid는 apoptosis의 특징인 DNA 분절(fragmentation) 현상에 의한 apoptosis를 통하여 간암 세포주인 HepG2에 대하여 독성을 미친다.

Asiatic acid에 의한 암세포에서의 apoptosis 연구는 몇몇 연구자에 의해 보고되어 있다^{10,19-21}). 그러나 asiatic acid와 비슷한 구조를 가진 2β, 3α, 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid는 곤충세포 성장 요소를 조절²²)한다는 보고 외엔 암세포주의 apoptosis 관련 연구는 국내의적으로 보고된 바가 없다.

이 연구의 결과들을 종합해 볼 때 2β, 3α, 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid는 asiatic acid와 비슷하게 간암 세포주인 HepG2 세포에서 apoptosis를 통한 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1. Compounds extracted from *Trapa pseudoincisa* S. et Z.

번호	시료번호	시료명	구조
#1	TIE-10-6	Phytol	
#2	TIE-13-9	(Z)-hinokiresinol	
#3	TIE-13-23-6	Ursolic acid	
#4	TIE-15-9-8-7	2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid	
#5	TIE-11-5-5	Cycloeucalenol	
#6	TIE-21-3	Quercitrin	
#7	TIE-12-16	Chlorophyll A	
#8	TIE-15-4-14-13	Chlorophyll B	
#9	TIE-15-4-14-8	Chlorophyll A-phytol	
#10	TIE-15-9-2	Quercetin	

초 록

Triterpenoid를 포함하고 있는 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 애기마름으로부터 분리하였다. 이것은 pentacyclic triterpenes의 공통 구조를 가지며 ursolic acid 그룹에 속해 있다. 본 연구에서는 이 화합물의 독성 영향을 인간 간암 세포주인 HepG2에서 조사하였다. 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid는 처리한 양에 비례하여 HepG2 세포주에서 독성을 보였다. 그리고 Confocal microscopy 결과는 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid를 HepG2 세포에 처리한 시간에 비례하여 녹색 형광의 증가를 보여주었다. 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid는 또한 HepG2 세포의 sub-G1 cell population 뿐만 아니라 DNA 분절(fragmentation) 현상의 증가를 보여 주었다. 이러한 결과는 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid가 HepG2 세포에서

apoptosis를 통한 세포 사멸 유도를 의미한다.

Key words: 2 β , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid, HepG2, apoptosis, cytotoxicity

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업에서 지원하는 연구비로 수행하였음.

참고문헌

- Dai, J. H., Iwatani, Y., Ishida, T., Terunuma, H., Kasai, H., Iwakura, Y., Fujiwara, H. and Ito, M. (2001) Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology* **103**, 235-243.
- Liu, J., Liu, Y., Mao, Q. and Klaassen, C.D. (1994) The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **22**, 34-40.
- Hsu, H. Y., Yang, J. J. and Lin, C. C. (1997) Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett.* **111**, 7-13.
- Huan, M. T., Badmaev, V., Ding, Y., Lui, Y., Xie, J. G. and Ho, C. T. (2000) Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid. *Biofactors* **13**, 225-230.
- Mahato, S. B., Sarkar, S. K. and Poddar, G. (1988) Triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **27**, 3037-3067.
- Huang, M. T., Ho, C. T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Lou, Y. R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J. D. and Conney, A. H. (1994) Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* **54**, 701-708.
- Konoshima, T., Takasaki, M., Toduda, H., Masuda, K., Arai, Y., Shiojima, K. and Ageta, H. (1996) Anti-tumor promoting activities of triterpenoids from ferns I. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 962-965.
- Cha, H. J., Bae, S. K., Lee, H. Y., Lee, O. H., Sato, H., Seiki, M., Park, B. C. and Kim, K. W. (1996) Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* **56**, 2281-2284.
- Baek, J. H., Lee, Y. S., Kang, C. M., Kim, J. A., Kwon, K. S., Son, H. C. and Kim, K. W. (1997) Intracellular Ca²⁺ release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Int. J. Cancer* **73**, 725-728.
- Lee, Y. S., Jin, D. Q., Kwon, E. J., Park, S. H., Lee, E. S., Jeong, T. C., Nam, D. H., Huh, K. and Kim, J. A. (2002) Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. *Cancer Lett.* **186**, 83-91.
- Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell. Res.* **256**, 42-49.
- King, K. L. and Cidowski, J. A. (1998) Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 601-617.

13. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Rev. Cytol.* **68**, 251.
14. Kidd, V. J. (1998) Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 533-573.
15. Yang, H. Y. (2005) Isolation of bioactive secondary metabolites from the *Trapa pseudoincisa* S. et Z. MS. Thesis, KyungHee University, Graduate School of Biotechnology, Seoul.
16. Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F. and Ameisen, J. C. (1995) YO-PRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* **185**, 249-258.
17. Boffa, D. J., Waka, J., Thomas, D., Suh, S., Curran, K., Sharma, V. K., Besada, M., Muthukumar, T., Yang, H., Suthanthiran, M. and Manova, K. (2005) Measurement of apoptosis of intact human islets by confocal optical sectioning and stereologic analysis of YO-PRO-1-stained islets. *Transplantation* **79**, 842-845.
18. Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T. and Takata, K. (1997) DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 49-53.
19. Park, B. C., Bosire, K. O., Lee, E. S., Lee, Y. S. and Kim, J. A. (2005) Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Lett.* **218**, 81-90.
20. Bunpo, P., Kataoka, K., Arimochi, H., Nakayama, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnien, U. and Ohnishi, Y. (2005) Inhibitory effects of Asiatic acid and CPT-11 on growth of HT-29 cells. *J. Med. Invest.* **52**, 65-73.
21. Hsu, Y. L., Kuo, P. L., Lin, L. T. and Lin, C. C. (2005) Asiatic acid, a Triterpene, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Human Breast Cancer Cells. *JPET.* **313**, 333-344.
22. Srivastava, U. S. and Neraliya, S. (1995) An insect growth regulatory factor from the plant *Nepeta hindostana* (Roth) Haines (Labiatae). *Nat. Acad. Sci. Lett.* **18**, 9-10.