

어성초 메탄올 추출물에 의한 A549 인체 폐암세포 사멸유도에 관한 연구

홍수현 · 박 철 · 홍상훈¹ · 최병태² · 이용태³ · 박동일¹ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오품질제어학과(BK21 program), 1:내과학교실, 2:해부학교실, 3:생리학교실

Induction of Apoptotic Cell Death by Methanol Extract of *Houttuynia cordata* Thunb. in A549 Human Lung Carcinoma Cells

Su Hyun Hong, Cheol Park, Sang Hoon Hong¹, Byung Tae Choi², Yong Tae Lee³, Dong Il Park¹, Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, 1:Department of Internal Medicine, 2:Department of Anatomy, 3:Department of Physiology, Donggeui University College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control, Donggeui University Graduate School

Houttuynia cordata Thunb, well known as 'E-Sung-Cho' in Korea, is a traditional medicinal plant generally used in Oriental medicine therapy. We previously reported that the water extract of *H. cordata* inhibited cell proliferation and induced apoptosis in human breast carcinoma cells. In the present study, we investigated the biochemical mechanisms of anti-proliferative effects by the methanol extract of *H. cordata* (MEHC) in human lung carcinoma A549 cells. It was found that MEHC could inhibit the cell growth in a dose-dependent manner, which was associated with morphological change and apoptotic cell death as determined by formation of apoptotic bodies, DNA fragmentation and increased populations of apoptotic-sub G1 phase cells. Apoptosis of A549 cells by MEHC was also connected with a down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 and inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) expression. MEHC treatment induced the proteolytic activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9, and a concomitant inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), β -catenin and phospholipase (PLC)- γ 1 protein expression. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of *H. cordata*.

Key words : *Houttuynia cordata* Thunb, apoptosis, A549, Bcl-2, IAPs, caspases

서 론

Apoptosis에 의한 세포의 죽음은 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 개체의 생존을 위한 방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다^{1,2}. 즉 apoptosis는 개체 보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 세포 증식 조절인자 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다³. Apoptosis의 유발에 종양억제 유전자들, Bcl-2, IAP 및 saspase family 등과 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려져지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고

있다^{4,5}. 따라서 최근 암세포에서의 apoptosis 조절관련 기전해석에 기초를 둔 항암제 개발이 많은 관심을 모으고 있다.

최근 생명공학의 발달에도 불구하고 아직까지 많은 질병들이 난치병으로 분류되고 있다. 그 중 암은 산업의 발달과 생활의 서구화에 따라 급격하게 증가되고 있는 추세이지만, 아직도 암의 발생기전이 명확히 밝혀져 있지 않아서 난치성 질병으로 분류되고 있다. 암의 치료를 위하여 현재 사용되어지고 있는 다양한 종류의 항암제들은 암의 종류에 따라 약리작용이 다르게 나타나고, 독성에 의한 부작용이 문제점으로 지적되고 있다^{6,7}. 따라서 이러한 세포독성의 작용기전을 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며 항암제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위하여 생약 및 천연물을 이용한 치료제의 개발이 시도되어지고 있다.

어성초(*Houttuynia cordata* Thunb)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 한국, 일본, 중국, 히말라야, 자바

* 교신저자 : 최영현, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7413

· 접수 : 2006/09/22 · 수정 : 2006/10/17 · 채택 : 2006/11/16

등에 분포하며 응달진 숲 속에서 자란다. 본초강목에 따르면 어성초는 사열, 해독, 이뇨, 소염 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 이뇨작용, 진통작용 및 지혈작용 등의 다양한 약리작용이 있는 것으로 알려지면서 오래전부터 생약제로 이용되어 왔을 뿐 아니라 최근에는 여러 가지 형태로 제품화되어 건강보조식품으로 이용되고 있다. 최근 연구에 따르면 어성초 추출물은 혈압강하작용, 혈당강하작용, 항균작용, 항바이러스작용, 항암작용, 항염증작용, 항알레르기작용 및 항산화작용등이 있다고 밝혀졌다⁸⁻¹³⁾. 또한 어성초가 마우스 대식세포의 항체생산능력을 향상시키고, 사람의 B 림프구와 T 림프구의 활성을 증가시킨다는 보고가 있다^{14,15)}. 이와 같은 결과는 어성초에 함유되어 있는 aristolactum, piperolactum, splendidine과 같은 alkaroids와 quercitrin, quercetin, kaempferol과 같은 polyphenol류에 의한 작용이라고 추정되어 진다^{16,17)}.

현재까지 발표된 연구 결과들을 살펴보면 어성초 추출물이 항암작용을 가지는 것으로 보고되어지고 있으나 구체적인 분자생물학적 기전에 관하여 아직까지 정확하게 알려진 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 물질이 함유된 어성초가 강력한 항암작용을 가질 것으로 예상되어 A549 인체폐암세포를 대상으로 어성초 메탄올 추출물에 의한 암세포의 증식 억제와 연관된 apoptosis 조절 관련 유전자들의 발현 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 어성초는 동의대학교 부속 한방병원에서 제공 받았으며, 100 g을 1,000 ml의 metanol에 48시간 동안 중탕하여 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거 하였다. 이를 다시 0.45 μm의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 동결건조하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 1 g/ml의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하였고 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-GCT GGG TAG GTG CAT-3'
XIAP	Sense	5'-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA-3'
	Antisense	5'-CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T-3'
cIAP-1	Sense	5'-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3'
	Antisense	5'-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3'
cIAP-2	Sense	5'-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3'
	Antisense	5'-CAC TTG CAA GCT GCT CAG G-3'
Fas	Sense	5'-TCT AAC TTG GGG TGG CTT TGT CTT C-3'
	Antisense	5'-GTG TCA TAC GCT TTC TTT CCA T-3'
FasL	Sense	5'-GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA-3'
	Antisense	5'-AGC CCA GTT TCA TTG ATC ACA AGG-3'

mRNA 발현 분석을 위하여 Bioneer (Taejeon, Korea)에서 구입한 primer는 Table 1에 나타난 바와 같고 단백질 발현 분석을 위하여 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc.

(Santa Cruz, CA, USA) 및 CalBiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며 immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 또한 Caspases의 in vitro 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

2. 세포의 배양

실험에 사용한 A549 인체폐암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건하에서 배양하였다. 배지는 매 48시간마다 교환해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정수의 세포를 분주하여 재배양하였다.

3. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 인체폐암세포를 2 X 10⁴개/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 어성초를 배지에 희석하여 각 well 당 적정농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 DMSO를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 μl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

4. 도립 현미경을 이용한 세포의 성장과 형태의 관찰

세포 배양용 100 mm petri dishes에 세포를 5 X 10⁴ 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 어성초 추출물을 적정농도로 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 도립 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동 카메라용 필름을 이용하여 사진을 촬영하였다.

5. Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 암세포를 2 X 10⁴개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 어성초 추출물을 적정농도로 처리하여 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시켜서 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well 당 적정량을 첨가하여 세포를 모은 다음, 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 다시 PBS를 1 ml 첨가하여

잘 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞은 후 2분간 처리한 후 위상차 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였다. 이에 따른 결과를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

6. DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

어성초 추출물 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부 확인을 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1 : 9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 500 μ l 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 PBS 200 μ l 를 넣어서 충분히 섞은 후, slide glass 위에 80 μ l 정도 떨어뜨려 1,000 rpm에서 5분간 cytospin하였다. PBS로 2-3회 washing하고 PBS가 다 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 washing하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Luis, MO, USA) 용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 적당량을 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 상온에서 염색시켰다. 15분 정도 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

7. DNA fragmentation의 분석

특정 세포에 apoptosis가 유발되었을 때 관찰될 수 있는 DNA fragmentation의 분석을 위하여 정상 및 어성초 추출물이 처리된 배지에서 48 시간 동안 배양된 세포를 모아 lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100]를 4°C에서 30분간 처리하였다. 그 후 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하고, 그 상층액에 proteinase K (Sigma)를 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 다음 60°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 그 후 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합 용액(25 : 24 : 1, Sigma)을 첨가하고 30분간 rotate시킨 다음 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 여기서 얻어진 상층액에 적정량의 isopropanol (Sigma)과 5 M NaCl을 첨가하였다. 24시간 정도 냉장 보관한 후, 14,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리시킨 후 상층액을 버리고, RNase A가 적당량 들어있는 TE buffer를 이용하여 pellet을 녹이고 여기에 6X gel loading dye (Bioneer)를 섞어 주었다. 1.5% agarose gel을 만들어서 1시간가량 50 V로 전기영동시킨 후 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색하여 ultraviolet (UV) 하에서 사진 촬영하였다.

8. Flow cytometry 분석

정상 및 어성초 추출물이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양시킨 암세포들을 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포들만 모았다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 씻

은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포에 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

9. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

상기와 동일한 조건에서 준비된 암세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 EtBr를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하고 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

10. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 어성초 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 (5분간 3번)정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 overnight시킨 다음 PBS-T로 세척 (15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다

시 PBS-T로 세척 (10분간 4번)하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다.

11. In vitro caspase-3, -8 및 -9의 activity 측정

정상 및 어성초 추출물이 처리된 배지에서 48 시간 배양된 세포를 모은 뒤 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA 이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 3시간동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결 과

1. 암세포의 증식 및 형태에 미치는 어성초 추출물의 영향

A549 인체폐암세포의 증식에 미치는 어성초 추출물의 영향을 알아보기 위하여 어성초 추출물을 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 조사한 결과, Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 어성초 추출물의 농도가 증가함에 따라 암세포의 증식이 감소하는 것을 알 수 있었다.

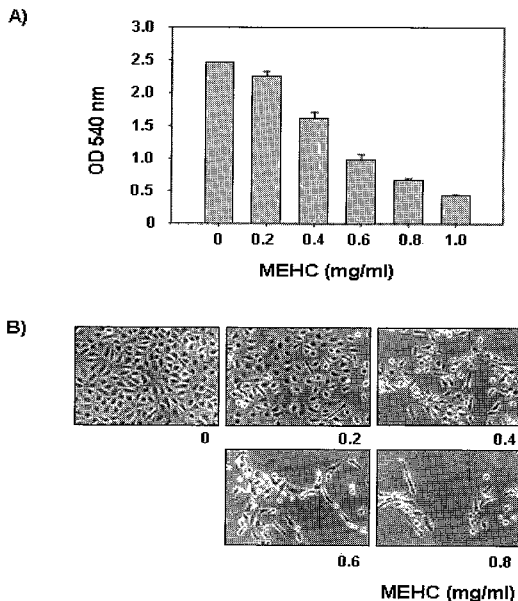


Fig. 1. (A) Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells after treatment with the methanol extract of *H. cordata* (MEHC). Cells were seeded at 2×10^4 /ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of MEHC for 48 h. The growth inhibition was measured by the metabolic-byte-based MTT assay. The data shown are means \pm SD of three independent experiments. (B) Morphological changes of human lung carcinoma A549 cells after treatment with MEHC. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

특히 어성초 추출물을 0.6 mg/ml 처리하였을 경우 약 60%의 증식억제 효과가 나타났고, 0.8 mg/ml의 농도에서는 약 70% 정도의 증식억제 효과가 나타났다. 이상의 결과로 어성초 추출물이 처리농도 의존적으로 암세포의 증식을 강하게 억제한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 어성초 추출물에 의한 증식억제에 따른 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 48시간 동안 처리한 후 도립 현미경을 이용하여 정상 및 어성초 추출물이 처리된 조건에서 배양된 인체폐암세포의 모양을 관찰하였다. Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 어성초 추출물의 농도 증가에 따라 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 농도가 증가될수록 전체적으로 세포질이 응축되면서 배양접시의 바닥에 낮게 부착되는 듯한 모습을 보였다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였고, 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다. 이는 어성초 추출물에 의한 암세포의 증식억제와 부합되는 결과였다.

2. 암세포의 생존 및 핵의 형태에 미치는 어성초 추출물의 영향

어성초 추출물의 처리에 따른 암세포의 생존율을 알아 보기 위하여 어성초 추출물을 적정농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후, hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하여 어성초 추출물이 처리되지 않은 대조군과 비교한 결과는 Fig. 2A에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 처리된 어성초 추출물의 농도가 증가될수록 생존율은 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었으며, 이와 같은 결과는 어성초 추출물에 따른 암세포의 증식억제와 유사한 것으로 나타났다.

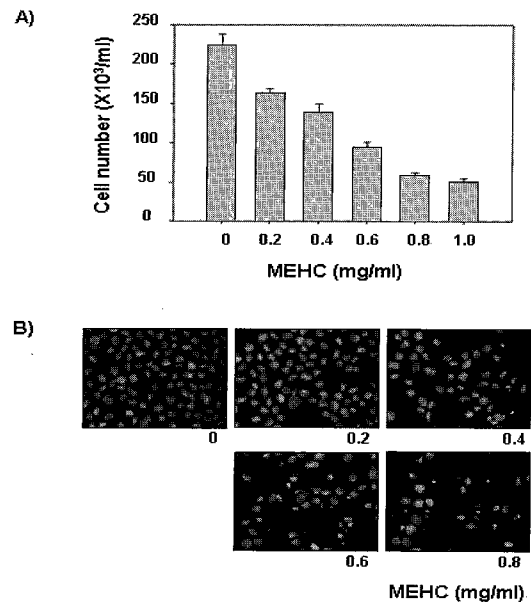


Fig. 2. (A) Effects of MEHC on the viability of A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded at 2×10^4 /ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of MEHC for 48 h. The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. The data shown are means \pm SD of three independent experiments. (B) Formation of apoptotic bodies by MEHC treatment in human lung carcinoma A549 cells. Cells were treated with MEHC for 48 h and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

다음으로 어성초 추출물의 처리에 따른 핵의 형태적 변화를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 어성초 추출물이 처리된 배지에서 배양된 암세포를 고정시킨 후 DAPI 염색을 실시하여 형광 현미경하에서 관찰한 결과는 Fig. 2B에 나타난 바와 같다. 어성초 추출물이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 어성초 추출물이 처리된 암세포의 경우, 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 처리 농도의 존적으로 증가되었다. 이는 어성초 추출물에 의한 암세포의 증식 억제, 형태변화 및 생존율의 감소가 apoptosis와 연관이 있음을 알 수 있었다.

3. 어성초 추출물에 의한 apoptosis의 유발

한편 apoptotic body 형성과 함께 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 어성초 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 조사한 결과는 Fig. 3A에 나타난 바와 같다. 즉 어성초 추출물이 처리된 암세포에서는 apoptosis가 일어난 세포들에서 볼 수 있는 전형적인 DNA laddering을 관찰할 수 있었다. 이는 결국 어성초 추출물의 처리에 의하여 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 것이다.

이상의 형태적 분석에서 어성초 추출물에 의한 암세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 직접적인 관련이 있었기에 어성초 추출물 처리에 따른 apoptosis 유발의 정도를 flow cytometry를 이용하여 정량적인 분석을 한 결과는 Fig. 3B와 같다. 즉 정상 배지에서 자란 암세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 매우 낮았지만 어성초 추출물의 처리 농도가 증가될수록 apoptosis의 유발 정도가 증가하여 0.6 mg/ml 농도에서부터 sub-G1의 비율이 50% 이상으로 나타났다. 이상의 결과에서 어성초 추출물 처리에 의한 A549 인체폐암세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

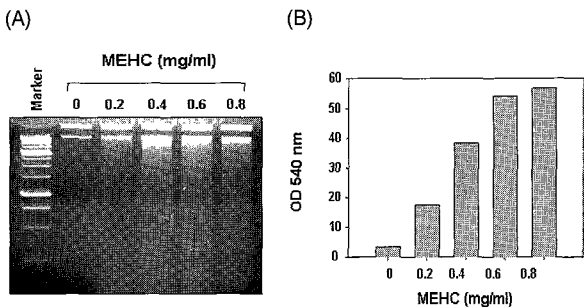


Fig. 3. MEHC induced apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with variable concentrations of MEHC for 48 h, then collected and DNA was extracted. The DNA fragmentations were separated on 1% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr. (B) Cells were exposed for 48 h with increasing concentration of MEHC and then the cells were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. Data are means average of two separate experiments.

4. Bcl-2 family의 발현에 미치는 어성초 추출물의 영향

어성초 추출물 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 관여

하는 유전자의 탐색을 위하여 먼저 Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 유전자 발현의 정도에 미치는 어성초 추출물의 영향을 RT-PCR 및 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. Fig. 4A 및 B에 나타난 바와 같이 어성초 추출물 처리 농도 의존적으로 apoptosis 유도에 관여하는 Bax 유전자의 발현은 거의 변화가 관찰되지 않은 반면, apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-2의 발현은 전사 및 번역수준 모두에서 어성초 추출물 처리 농도 의존적으로 매우 감소되었다. 이는 어성초 추출물 처리에 의한 apoptosis이 유발에는 최소한 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것이며, 특히 Bcl-2의 발현 감소로 인한 apoptosis 유발 관련 효소들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다.

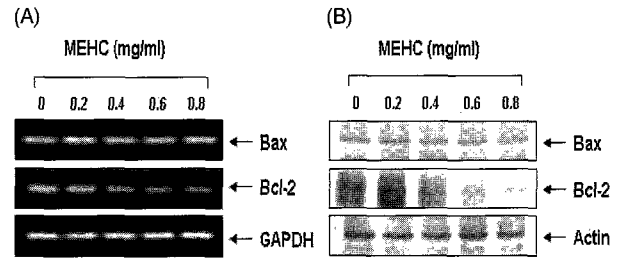


Fig. 4. Effects of MEHC treatment on the Bcl-2 family expression in A549 human lung carcinoma cells. (A) After 48 h incubation with MEHC, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with Bax and Bcl-2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

5. IAP family의 발현에 미치는 어성초 추출물의 영향

다음은 어성초 추출물 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 IAP family가 관여하는지의 여부를 조사하였다. Fig. 5A 및 B에 나타난 바와 같이 어성초 추출물에 의한 apoptosis 유발에 이르는 IAP family의 관여 여부를 조사한 결과, XIAP, cIAP-1 및 cIAP-2 유전자가 전사와 번역수준 모두에서 발현이 감소하였다. 이는 어성초 추출물 처리에 의한 apoptosis이 유발에서 IAP family가 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다.

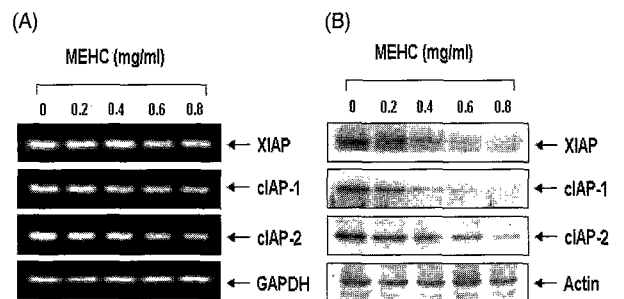


Fig. 5. Effects of MEHC on the anti-apoptotic levels of IAP family members in A549 human lung carcinoma cells. (A) After 48 h incubation with MEHC, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

6. Caspases의 발현 및 활성에 미치는 어성초 추출물의 영향

지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3, -8 및 -9의 발현에 미치는 어성초 추출물의 영향을 조사하였다. Fig. 6의 결과에서 볼 수 있듯이 어성초 추출물의 처리에 의하여 불활성형인 pro-caspase-3, pro-caspase-8 및 pro-caspase-9 단백질의 발현은 농도 의존적으로 감소되었으나 뚜렷한 활성형의 단백질 발현 증가를 정확히 관찰하기는 어려웠다. 따라서 caspases의 활성 정도를 직접 분석한 결과, 어성초 추출물이 처리된 암세포에서는 처리 농도 의존적으로 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 활성이 모두 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 6).

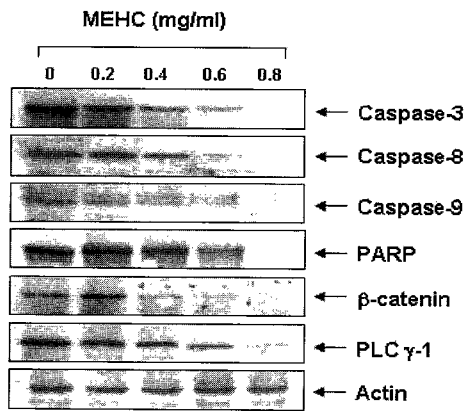


Fig. 6. Effects of MEHC in the levels of caspases, PARP, β -catenin and PLC γ 1 in A549 human lung carcinoma cells. The cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

7. PARP, β -catenin 및 PLC- γ 1의 발현에 미치는 어성초 추출물의 영향

다음은 어성초 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발을 생화학적으로 증명하기 위하여 apoptosis가 유발되었을 경우 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는 어성초 추출물의 영향을 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. Fig. 7에서 볼 수 있듯이 어성초 추출물의 처리 농도 증가에 따라 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질 및 세포내 골격 유지와 세포 유착에 관여하는 β -catenin의 발현의 감소가 나타났으며, 세포의 성장과 증식에 중요한 역할을 하는 phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) 단백질의 발현 또한 어성초 추출물의 처리 농도 의존적으로 발현이 감소했다.

8. Fas 및 FasL의 발현에 미치는 어성초 추출물의 영향

마지막으로 어성초 추출물에 의한 apoptosis 유발에 death receptor가 관여하는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 실험 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사한 결과는 Fig. 8에 나타난 바와 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 Fas 및 FasL 모두에서 전사 및 번역수준에서의 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 이는 어성초 추출물을 처리하였을

경우 나타나는 암세포의 apoptosis에서 death receptor 중 Fas 및 FasL를 통한 apoptosis는 일어나지 않았음을 보여주는 결과라고 생각된다.

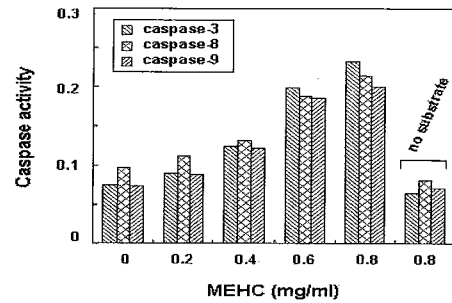


Fig. 7. Activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 by MEHC treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with indicated concentrations of MEHC for 48 h, collected and then lysed. Aliquots (150 μ g proteins) were incubated with DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity, respectively, at 37°C for 3 h. The released fluorescent products were measured. Data represent the mean of two independent experiments.

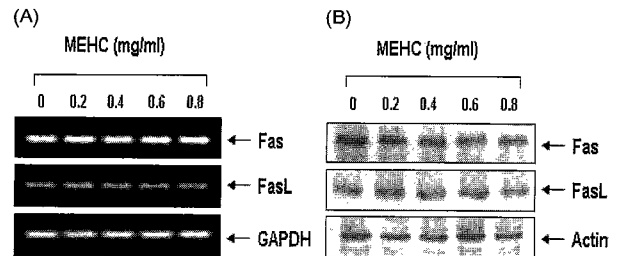


Fig. 8. Effects of MEHC treatment on the Fas and FasL expression in A549 human lung carcinoma cells. (A) After 48 h incubation with MEHC, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

고찰

본 연구에서는 인체폐암세포주인 A549 세포를 대상으로 어성초 메탄을 추출물의 항암기전을 조사하였다. 이를 위하여 먼저 정상배지 및 어성초 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포의 증식의 정도 및 형태 변화를 비교하였다. Fig. 1A 및 B에서 알 수 있듯이 어성초 추출물의 처리 농도 의존적으로 암세포의 증식이 감소되었으며, 세포질의 응축 및 부착 능력의 상실에 따라 배지 위로 부유하는 세포가 증가하는 등의 심한 형태적 변형을 유발하였다. 이러한 증식의 억제 및 형태 변화가 암세포의 생존율에 어떠한 영향을 주는지 알아본 결과는 Fig. 2A에 나타난 바와 같이 어성초 추출물의 농도가 증가할수록 암세포의 생존율 또한 감소하였다. 이러한 어성초 추출물의 처리에 의한 암세포 증식 억제, 형태 변화 및 생존율 감소가 apoptosis 유발과 밀접한 관련성이 있을 것으로 기대되어 이에 대한 증거를 제시하기 위하여 암세포의 핵 형태 변화를 관찰한 결과, Fig. 2B에 나타난 바와 같이 대조군의 경우 모든 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 어성초 추출물이 처리된 암세포의 경우, 처리 농도 의존적으로 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로

관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body의 증가 현상을 관찰할 수 있었다^{18,19}). 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 어성초 추출물의 처리에 의한 암세포의 증식억제, 형태적 변형 및 생존율의 감소가 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 시사하여 주는 것으로 생각된다. 한편 apoptotic body 형성과 함께 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사하였다²⁰). 이를 위하여 정상 및 어성초 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 조사한 결과는 Fig. 3A에 나타난 바와 같다. 즉 어성초 추출물이 처리된 암세포에서는 apoptosis가 일어난 세포들에서 볼 수 있는 전형적인 DNA laddering을 관찰할 수 있었다. 이는 어성초 추출물의 처리에 의하여 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 것이다. 아울러 Fig. 3B에 나타난 바와 같이 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도 역시 어성초 추출물 처리 농도 의존적으로 증가되어 어성초 추출물 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 어성초 추출물 처리에 의한 암세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다^{21,22}). 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하며^{21,23}), 서로 dimer의 형태로 존재하지만 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다^{21,24}). Fig. 4A 및 B는 다양한 농도의 어성초 추출물이 함유된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 전사 및 번역수준을 조사한 결과로서, 전사와 번역수준 모두에서 pro-apoptotic 유전자인 Bax의 증가가 관찰되었다. 즉 어성초 추출물에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현의 차이가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 IAP family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지니는 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁷). 그리고 이들 중 어떤 IAPs는 caspases와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀져 IAP family들의 잠재적인 역할에 대한 관심이 높아지고 있다²⁶⁻²⁸). 따라서 어성초 추출물 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 IAP family가 관여하는지의 여부를 조사한 결과 Fig. 5A 및 B에서 나타난 바와 같이 어성초 추출물의 처리 농도 의존적으로 전사 및 번역수준 모두에서 XIAP, cIAP-1 및

cIAP-2 발현의 감소가 관찰되었다. 이는 어성초 추출물 처리에 따른 apoptosis 유발에서 IAP family가 caspases의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다.

한편 caspase protease라는 효소 역시 apoptosis 유발에 중요한 조절인자로서 작용하는데, 이들 family에 속하는 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2/Bax family와 같은 apoptosis 유도를 활성화 시키는 신호에 의해 활성화된 protease로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁹⁻³¹). Caspase의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 또 다른 증거가 될 수 있으며 많은 선행연구 등에서 검증되어 왔지만 많은 경우에 apoptosis는 이러한 유전자들의 발현이나 세포주기 비의존적으로도 일어날 수 있다. 지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발된 대부분의 세포에서 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9가 높은 활성도를 나타내었으므로 어성초 추출물이 이들 caspases의 발현에 미치는 영향을 Western blot analysis를 통하여 조사하였다. Fig. 6 및 Fig. 7의 결과에서 볼 수 있듯이 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9 모두에서 단백질의 발현이 감소하였으나 활성화된 단백질은 관찰할 수 없었지만 caspases의 활성 정도는 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9 모두에서 처리 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 살펴보면 어성초 추출물에 의한 암세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2/Bax family의 발현 변화와 연관된 caspase의 활성화와 직접 관련이 있음을 알 수 있었다.

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질 중 PARP 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며, apoptosis 유발과정 중 활성화된 caspases에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다³⁰). 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다^{37,38}). 그리고 catenin family에 속하는 단백질(α , β 및 γ)은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다. 특히 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다^{39,40}). 정상 세포의 경우 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다⁴¹). 또한 최근 연구에 의하면 epidermal growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor-1 및 cytokine 등과 같은 세포 성장을 촉진하는 인자들이 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다. 이들 성장인자의 수용체들은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), G-protein 및 PLC- γ 1 등과 같은 주요 신호전달 분자들을 활성화시킬 수 있다. PI3K에 의해 생산되는 phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3)는 protein kinase B (PKB)/Akt 및 PLC- γ

1을 활성화시킨다. 특히 PLC- γ 1은 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 hydrolyze시켜 protein kinase C (PKC) activator인 diacylglycerol 및 세포 내 Ca^{2+} 조절에 중요한 역할을 하는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)를 생산한다. 따라서 PI3K나 Ras와 같은 세포성장 신호분자와 같이 PLC- γ 1 역시 세포의 증식에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴²⁾. 그러나 apoptosis가 유발될 경우 활성화된 caspase 효소에 의하여 PLC- γ 1 단백질은 분해될 수 있기 때문에 상기 두 종류의 단백질과 함께 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 가능하다^{43,44)}. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 여성초 추출물의 처리 농도 증가에 따라 PARP, β -catenin 및 PLC- γ 1 단백질의 발현이 모두 감소하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과는 여성초 추출물 처리에 의한 암세포에서의 apoptosis 유발은 Bcl-2 family의 발현 변화와 그에 따른 caspases의 활성화와 연관된 caspase 기질 단백질의 분해에 의해서 발생한다는 것을 의미하는 결과로서 여성초 추출물의 apoptosis 유발 경로가 mitochondria 경로를 통하는 유전자들의 발현에 전반적으로 영향을 미쳤음을 의미하는 것으로 추정된다.

Apoptosis를 유발하는 경로는 크게 mitochondrial pathway와 death receptor pathway의 두 가지로 구분할 수 있는데, death receptor는 세포사멸의 기능을 갖는 tumor necrosis factor (TNF) 수용체군을 의미한다⁴⁵⁾. 현재 가장 잘 알려진 다섯 종류 중 하나가 APO-1 또는 CD95라고도 알려진 Fas에 의한 신호전달계이다. 그리고 TNF 수용체군에 작용하는 대표적인 리간드 (ligand) 중의 하나가 FasL이다^{46,47)}. FasL는 type II transmembrane protein으로서 tumor necrosis factor receptor super-family인 Fas에 결합하여 immune homeostasis에 중요한 역할을 하고 apoptosis를 유발한다. 따라서 여성초 추출물에 의한 apoptosis 유발에 death receptor 중 Fas 및 FasL가 관여하는지의 여부를 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사하였다. Fig. 8A 및 B에 나타낸 바와 같이 Fas 및 FasL 모두에서 전사 및 번역 수준에서의 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 여성초 추출물에 의하여 death receptor에 의하여 활성을 나타내는 caspase-8의 활성이 증가하였지만 Fas 및 FasL의 변화가 관찰되지 않았다는 것은 death receptor pathway 중 Fas 및 FasL를 통한 apoptosis는 일어나지 않았음을 보여주는 결과라고 생각된다.

이상의 결과에서 여성초 추출물에 의한 A549 인체폐암세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었다. 이러한 apoptosis 유발에는 Bcl-2 family 및 IAP family의 발현 변화와 그에 따른 caspase-9 및 caspase-3의 활성화에 의한 표적 단백질들의 발현 저하와 직접적인 연관성이 있음을 관찰할 수 있었다. 또한 Fas 및 FasL가 아닌 다른 death receptor에 의한 caspase-8의 활성화도 여성초 추출물에 의한 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 그러나 본 연구의 결과만으로 여성초 추출물의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기에는 매우 어렵기 때문에, 암세포의 증식 억제와 연관된 다양한 추가적인 실험이 필수적으로 수행되어야 할 것이다. 또한 본 연구의 결과는 향후 수행될 추가 실험을 위한 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2006년도 동의대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

1. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136:593-608, 1990.
2. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17:461-476, 1993.
3. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science.* 263:1143-1145, 1994.
4. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88: 355-365, 1997.
5. Chiarugi, V., Magnelli, L., Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:603-612, 1994.
6. Chung, Y.T., Park, S.T., Mun, J.Y., Kim, J.M., Choi, M.K., Han, D.S., Kim, B. Cytotoxic effects of actinomycin D, adriamycin and puromycin in the development stage of early mouse embryos. *J. Wonkwang Medical Sci.* 3:13-334, 1987.
7. Seo, J.D., Lee, D.K. and Um, I.W. An experimental study of the cytotoxic effects of cis-diamine-dichloroplatinum (cispatin) and vincristine on cultured human oral fibroblast. *J. Wonkwang Dental Research Institute.* 2:55-68, 1992.
8. 姜允皓. 數種의 韓藥物이 白鼠의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響. *慶熙韓醫大論文彙.* 9:217-240, 1987.
9. 吉村永星. 魚腥草 및 桑菊飲이 免疫機能에 미치는 影響. *大韓韓醫學會誌.* 16:295, 1995.
10. Song, J.H., Kim, M.J., Kwon, H.D., Park, I.H. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32:1055-1058. 2003.
11. Hayashi, K, Kamiya, M., Hayashi, T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta. Med.* 61: 237-241, 1995.
12. Chung, C.K., Ham, S.S., Lee, S.Y., Oh, D.H., Choi, S.Y., Kang, I.J., Nam, S.M. Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat die. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28:205-211, 1999.
13. Choi, Y.H., Kim, E.Y., Park, E.Y., Rhee, S.H., Lee, W.H. Antimutagenic effects of the juice and boiling water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 23:916-921, 1994.
14. Kim, H.J. Biological effects of *Houttuynia cordata* Thunb extract on murine and human immune system. MS Thesis. Seoul National University. 2000.
15. Chun, E.Y. Partial purification of *Houttuynia cordata* Thunb

- extract and characterization of its immunological activities in human. MS Thesis. Seoul National University. 1997.
16. Kim, S.K., Ryu, S.Y., No, J., Choi, S.U., Kim, Y.S. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. Arch. Pharm. Res. 24: 518-521, 2001.
 17. Lee, S.T., Lee, Y.H., Choi, Y.J., Shon, G.M., Lee, H.J., Hoe, J.S. Composition of quercetin and soluble tannin in *Houttuynia cordata* Thunb according to growth stages and plant parts. Korean J. Medicinal Corp. Sci. 10:12-16, 2002.
 18. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. Cell Biol. Int. 17:461-476, 1993.
 19. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. Science. 263:1143-1145, 1994.
 20. Fabian, D., Koppel, J., Maddox-Hyttel, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. Theriogenology. 64:221-231, 2005.
 21. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature. 391: 496-499, 1998.
 22. Osford, S.M., Dallman, C.L., Johnson, P.W., Ganesan, A., Packham, G. Current strategies to target the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer cells. Curr. Med. Chem. 11: 1031-1039, 2004.
 23. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell. 74:957-967, 1993.
 24. Donovan, M., Cotter, T.G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. Biochim. Biophys. Acta. 1644:133-147, 2004.
 25. Holcik, M., Gibson, H., Korneluk, R.G. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. Apoptosis. 6:253-261, 2001.
 26. Cheng, J.Q., Jiang, X., Fraser, M., Li, M., Dan, H.C., Sun, M., Tsang, B.K. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. Drug Resist. Updat. 5:131-146, 2002.
 27. Salvesen, G.S., Duckett, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3: 401-410, 2002.
 28. LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., MacKenzie, A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene. 17:3247-3259, 1998.
 29. Nagata, S. Apoptosis by death factor. Cell. 88: 355-365, 1997.
 30. Allen, R.T., Cluck, M.W., Agrawal, D.K. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. Cell Mol. Life Sci. 54:427-445, 1998.
 35. Rao, L., White, E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection. Curr. Opin. Genet. Dev. 7:52-58, 1997.
 36. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell. 81:801-809, 1995.
 37. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res. 53:3976-3985, 1993.
 38. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature. 371: 346-347, 1994.
 39. Johnson, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev. 18:345-357, 1999.
 40. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. Br. J. Surg. 87:992-1005, 2000.
 41. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of beta-catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31:519-529, 1999.
 42. Chang, J.S., Noh, D.Y., Park, I.A., Kim, M.J., Song, H., Ryu, S.H., Suh, P.G. Overexpression of phospholipase C-gamma1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. Cancer Res. 57:5465-5468, 1997.
 43. Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T., Smeland, E.B. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. Exp. Hematol. 30: 990-1000, 2002.
 44. Bae, S.S., Perry, D.K., Oh, Y.S., Choi, J.H., Galadari, S.H., Ghayur, T., Ryu, S.H., Hannun, Y.A., Suh, P.G. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. FASEB. J. 14:1083-1092, 2000.
 45. Sheikh, M.S., Huang, Y. Death receptors as targets of cancer therapeutics. Curr. Cancer Drug Targets. 4:97-104, 2004.
 46. Klas, C., Debatin, K.M., Jonker, R.R., Krammer, P.H. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. Int. Immunol. 5:625-630, 1993.
 47. Daniel, P.T., Krammer, P.H. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. J. Immunol. 152:5624-5632, 1994.