

지금초 추출물에 의한 TRAIL 저항성 인체위암세포의 세포사멸 유도

이재준 · 신동역¹ · 박상은 · 김원일 · 박동일 · 최영현¹ · 홍상훈*

동의대학교 한의과대학 내과학교실, ¹생화학교실 및 대학원 바이오물질제어학과

Received December 26, 2007 / Accepted January 10, 2008

***Euphorbiae humifusae* Sensitizes Apoptosis of TRAIL-resistant Human Gastric Adenocarcinoma AGS Cells.** Jae Jun Lee, Dong Hyuk Shin¹, Sang Eun Park, Won Il Kim, Dong Il Park, Yung Hyun Choi¹ and Sang Hoon Hong*. *Departments of Internal Medicine and Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine, ¹Department of Biomaterial Control, Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, South Korea* - The death ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/ Apo1L is a cytokine that activates apoptosis through cell surface death receptors. TRAIL has sparked growing interest in oncology due to its reported ability to selectively trigger cancer cell death. *Euphorbiae humifusae* Wind has been used in traditional Oriental medicine as a folk remedy used for the treatment of cancer. However, the mechanism responsible for the anticancer effects of *E. humifusae* not clearly understood. Here, we show that treatment with subtoxic doses of water extract of *E. humifusae* (WEEH) in combination with TRAIL induces apoptosis in TRAIL-resistant human gastric carcinoma AGS cells. Combined treatment with WEEH and TRAIL induced chromatin condensation and sub-G1 phase DNA content. These indicators of apoptosis were correlated with the induction of caspase activity that resulted in the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. Combined treatment also triggered the loss of mitochondrial membrane potential. Furthermore, co-treatment with WEEH and TRAIL down-regulated the protein levels of the anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-xL, XIAP and cIAP-1. Although more study will be needed to examine the detailed mechanisms, this combined treatment may offer an attractive strategy for safely treating gastric adenocarcinomas and the results provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anticancer activity of *E. humifusae*.

Key words : *Euphorbiae humifusae*, TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL), apoptosis, mitochondrial membrane potential, caspase

서 론

Apoptosis (programed cell death)는 개체의 발생이나 항상성 유지 조절에 중요한 역할을 하는 정상적인 생리학적 현상이다. 최근 apoptosis 조절에는 많은 유전자들이 관여하고 있으며, 이들 유전자 산물들의 기능과 특징을 조사함으로써 apoptosis 현상의 분자생물학적 설명이 가능해 지고 있다. 그 중 tumor necrosis factor (TNF) superfamily에 속하는 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)는 trans-membrane 단백질의 일종이다[30]. TRAIL은 세포막에 결합되어 있는 죽음의 수용체(death receptors, DR4 및 DR5)와의 결합을 통하여 세포내 death domains를 경유한 apoptotic signal을 보내는 apoptosis의 extrinsic (death receptor) pathway에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 수용체는 리간드와 결합하게 되면 수용체의 다중화(multimerization)를 통하여 활성화되고, 그 결과로 여러 adapter 단백질들이 수용체와 결합하게 된다. 결합한 adapter 단백질들은 세포사멸에 있어서 중요하게 작용을 하는 다양한 caspase 등과 같은 단

백질들의 활성화를 통해서 apoptosis를 유도하게 된다 [7,27,30]. 따라서 많은 세포에서 TRAIL에 대한 감수성은 세포막에 존재하는 세포막 TRAIL 수용체들 및 caspase-8에 의존적이다. TRAIL에 의해 활성화된 caspase-8은 세포질로 유리되어 caspase-3 및 caspase-7을 포함한 effector caspases를 활성화시키는 protease cascade를 개시한다[1,18,27]. 특히 TRAIL은 정상세포에는 전혀 영향을 주지 않으면서 암세포와 같은 형질 전환된 세포의 치료 전략에 매우 유용하여 임상적 가치가 매우 높다[7,9,27,33].

위암(gastric cancer)은 위장관암(gastrointestinal tract cancer)의 한 종류로서 90% 이상이 adenocarcinomas에 해당된다[16,21]. *In vitro* 위암의 연구 모델로서 가장 널리 사용되어지고 있는 세포가 AGS adenocarcinoma 세포인데[3], 최근 연구에 의하여 AGS 세포를 포함한 많은 종양세포가 TRAIL에 대한 저항성을 획득하고 있는 것으로 알려지고 있다[27]. 이러한 저항성 획득의 원인으로 apoptosis를 조절하는 주요 Bcl-2 family 인자들의 돌연변이 유발 및 비정상적인 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family 인자들의 과발현 등이 밝혀졌다[17,31]. 따라서 AGS 세포와 같은 TRAIL 저항성 암세포들은 TRAIL을 활용한 암치료를 효율적이지 못하여 이를 극복할 수 있는 새로운 항암전략이 요구되어진다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8637, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : shhong@deu.ac.kr

이러한 새로운 항암치료 전략으로 저농도의 항암제를 TRAIL과 동시에 투여할 경우 TRAIL의 저항성을 극복할 수는 있으나 정상세포에 대한 항암제 자체의 세포독성은 여전히 해결되어야 할 문제로 남아있다. 따라서 TRAIL의 저항성을 극복하면서 효율적인 항암 전략으로 정상세포에 세포독성을 지니지 않는 천연물의 이용이 새로운 해결 방안으로 제시되어지고 있다. 최근 연구에 의하면, 정상세포뿐 만 아니라 암세포에도 세포독성을 나타내지 않는 저농도의 대두에서 유래된 생리활성 물질인 genistein의 혼합 처리로 TRAIL 저항성을 극복하면서 효과적으로 apoptosis가 유발되었다는 보고가 AGS 위암세포를 포함한 몇몇 TRAIL 저항성 암세포를 대상으로 발표된 바 있다[12,22]. 이러한 연구 결과들은 암세포에서 genistein을 포함한 다양한 천연물을 활용함으로써 매우 효과적으로 TRAIL의 저항성 극복할 수 있다는 가능성을 보여 주는 것으로서, 많은 연구자들이 TRAIL 저항성을 해결할 수 있는 천연물의 탐색에 관심을 가지게 되었다.

지금초(地錦草, *Euphorbia humifusae* Wind)는 대극과(大戟, *E. peginensis*)에 속하는 한해살이 식물로서 비단풀 또는 지면(地綿), 초혈갈(草血竭), 혈견수(血見愁), 오공초(蜈蚣草), 선도초(仙挑草) 등으로도 부른다[6]. 지금초는 민간요법에서 항암작용과 해독작용, 항균작용, 진정작용 등이 뛰어나서 다양한 암, 염증, 천식, 당뇨병, 심장병, 신장질환, 악성 두통, 정신 불안 등의 치료와 예방에 사용되고 있으나[5] 이에 관한 구체적인 실험적 근거는 아직 제시된 바가 없다. 그러나 지금초에는 tannin을 포함한 polyphenol이 다량 함유되어 있어[32] 강력한 항암 작용이 있을 것으로 추정되므로 이에 관한 구체적인 연구의 가치는 매우 높다. 따라서 본 연구에서는 TRAIL에 대해서 저항성을 가지고 있는 AGS 인체 위암세포의 항암전략에 지금초 사용의 가능성을 조사하였다. 이를 위하여 세포독성을 보이지 않는 저농도의 지금초 열수 추출물(water extract of *Euphorbiae humifusae*: WEEH)을 TRAIL과 혼합 처리하여 apoptosis 유도 가능성을 조사하였으며, 이와 연관된 기전 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

암세포의 배양 및 TRAIL의 처리

AGS 위암세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간마다 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리

접시로 옮겨 배양하였다. TRAIL (KOMA Biotech Inc, Seoul, Korea)은 PBS에 적정 농도로 녹여 배지에 희석하여 처리하였다.

지금초 수용액의 추출 및 처리

본 실험에 사용된 지금초는 경상남도 진주시 판문동 및 근처 남강둔치 일대에서 채취하였으며 WEEH을 얻기 위하여 100 g의 지금초를 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 µm의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. WEEH와 TRAIL의 단독 혹은 혼합 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터 부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에 6×10⁵ 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. WEEH는 세포에 처리하기 직전 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 µm의 pore size를 가진 주사기용 필터 유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포배양용 6 well plate에 well 당 1×10⁵개의 AGS 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 WEEH와 TRAIL을 단독 혹은 혼합 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하여 3시간 동안 반응시켰다. 3시간 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 100 µl씩 분주하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정상 배지에서 배양된 암세포와 지금초 추출물이 처리된 배지에서 배양된 세포들의 성장률을 비교하였다. 실험 결과는 3번의 측정값을 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석하였다.

세포형태 관찰 및 DAPI 염색에 의한 핵의 형태 관찰

준비된 세포를 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution으로 실온에서 10분 정도 고정한 후, PBS로 2~3회 세척하고 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 암하에서 염색시켰다. 15분 가량 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 1차 증류수로 재빠르게 세척한 다음 absolute ethanol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리하고 cover glass를 덮었다. 그 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 조건에 따른 AGS 세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

정상 및 WEEH와 TRAIL의 단독 및 혼합 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액(70% ethyl alcohol, 0.5% Tween 20)을 첨가하여 4°C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 mg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4°C에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 두 번 씻어낸 후, nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP) 변화의 측정

6 well plate에 1×10^5 개/ml 정도로 AGS 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 WEEH 및 TRAIL을 48시간 동안 처리하였다. 48시간 처리 후, 세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모인 세포를 대상으로 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)의 변화 측정을 위하여 lipophilic cationic probe인 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-V-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma)을 이용하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. JC-1은 ratiometric한 dual-emission fluorescent dye로서 정상세포의 미토콘드리아는 590 nm (red) 파장에서, 미토콘드리아에 손상을 입은 세포의 경우 527 nm (green)에서 흡광도가 높게 나타난다. 이를 위하여 정상배지나 WEEH 및 TRAIL이 처리된 배지에서 배양된 AGS 세포를 PBS로 수세 후 37°C에서 10 μ M의 JC-1을 20분간 염색을 실시한 후 flow cytometry를 이용하여 흡광도에 따른 세포 분포도를 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

준비된 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 이렇게 모아진 세포에 protease inhibitor cocktail이 포함된 적당량의 lysis buffer [250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 M 1,4-dithio-DL-threitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 30분간 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 (β -mercapto-methanol 5%, Laemmli sample buffer 95%, Bio-Rad)를 섞어

서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. Western blot analysis를 위하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 단백질을 분리한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 이동시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20 in PBS) 용액을 이용하여 상온에서 1시간 이상 반응시켜 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, PBS-T 용액을 이용하여 5분 간격으로 최소 3회 이상 세척하였다. 세척 후 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 상온에서 1시간 이상 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 3회 이상 수세한 후, 특정 항체에 대한 이차 항체를 적용시켜 상온에서 1시간 이상 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

In vitro caspase activity 분석

Caspase의 활성화 정도를 정량적으로 비교하기 위하여 상기와 동일한 조건에서 배양된 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하여 Bio-Rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따라 정량하였다. 이렇게 만들어진 sample 50 μ l를 96 well plate에 분주한 다음 1%의 1 M DTT가 함유된 2x reaction buffer 50 μ l를 첨가하였다. 다시 5 μ l의 caspase colorimetric substrate [Asp-Glu-Val-Aasp (DEVD), Ile-Glu-Thr-Asp (IETD) and Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA for caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity]를 첨가하여 37°C에서 2시간 정도 반응을 시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

AGS 인체 위암세포의 증식에 미치는 WEEH와 TRAIL의 영향

WEEH와 TRAIL의 단독 및 혼합 처리에 의한 AGS 위암

세포의 세포 생존율을 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 AGS 세포에 WEEH를 0.02 및 0.04 mg/ml의 농도를 처리를 하였고, TRAIL은 200 ng/ml의 농도로 단독 혹은 WEEH와 혼합 처리하였다. 본 실험의 조건에서 WEEH와 TRAIL을 단독으로 처리 하였을 경우 AGS 세포의 생존율에 큰 변화가 없었으나, WEEH와 TRAIL를 혼합 처리하였을 경우 각각을 단독 처리를 하였을 때보다 세포의 생존율이 매우 감소되었음을 알 수 있었다 (0.04 mg/ml의 WEEH 및 200 ng/ml TRAIL 동시 처리의 경우 약 43% 이상 억제). 이러한 결과는 WEEH나 TRAIL이 단독으로 처리 되었을 때보다 두 가지의 약물을 동시에 처리하였을 경우 AGS 위암세포의 증식을 보다 효과적으로 억제할 수 있음을 의미한다.

WEEH와 TRAIL의 혼합 처리의 의한 apoptosis의 유발

Fig. 1의 결과에서 WEEH와 TRAIL의 혼합 처리에 의한 AGS 세포의 증식억제가 apoptosis 유도과 연관성이 있을 것으로 추정되어 flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 일어난 세포의 집단에 해당되는 세포주기 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도를 측정하여 apoptosis의 정량화를 실시하였다. Fig. 2에 제시된 것과 같이 AGS 세포에 WEEH가 단독으로 처리된 경우 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도는 대조군 (3.01%)에 비하여 약간 증가되었으며, 200 ng/ml의 TRAIL 단독 처리군(2.67%)에서는 대조군과 유사하였다. 그러나 WEEH와 TRAIL이 혼합 처리된 경우 대조군에 비하여 매우 높은 sub-G1기 빈도를 보여 WEEH와 TRAIL의 단독 처리보다는 혼합 처리가 AGS 세포에서 apoptosis 유발에 매우 효과적이었으며, 이러한 경향성은 MTT assay의 결과와도 잘 일치하였다.

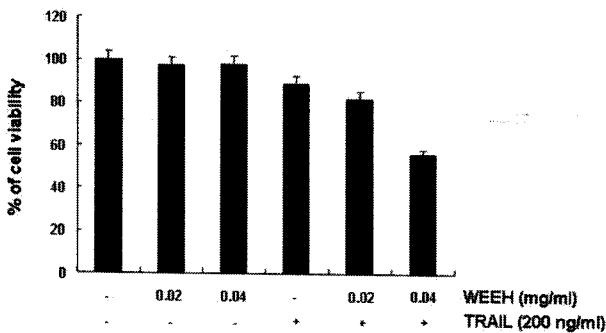


Fig. 1. Combined treatment with water extract of *Euphorbiae humifusae* (WEEH) and TRAIL inhibits the proliferation of AGS human gastric carcinoma cells. AGS cells were seeded at an initial density of 1×10^5 cells per 60 mm plate and treated with the indicated concentrations of WEEH, TRAIL or WEEH+TRAIL for 48 hr. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Each point represents the mean±S.E. of three independent experiments.

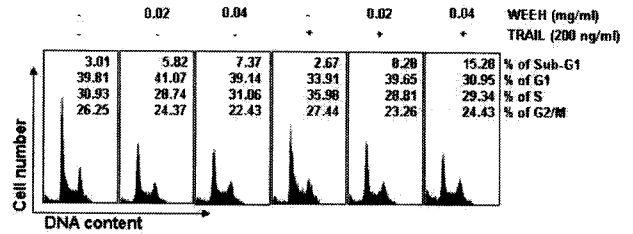


Fig. 2. Combined treatment with WEEH and TRAIL increases the sub-G1 population of the cell cycle in AGS human gastric carcinoma cells. AGS cells were treated with the indicated concentrations of WEEH, TRAIL or WEEH+TRAIL for 48 hr and then harvested. The cells were collected, stained with PI and DNA content was analyzed by flow cytometry. The results were from one representative experiment of three experiments performed that showed similar patterns. Each point represents the mean±S.E. of three independent experiments.

WEEH와 TRAIL의 혼합 처리에 의한 세포 형태 변화 유발

WEEH와 TRAIL의 단독 처리 보다 혼합 처리에 의한 AGS 세포의 증식억제와 연관된 apoptosis 유발의 직접적인 증거를 제시하기 위하여 WEEH와 TRAIL의 단독 및 혼합 처리에 따른 세포의 형태변화를 관찰하였다. Fig. 3A는 도립 현미경하에서 관찰된 AGS 세포의 전체적인 형태의 변화를 보여 주는 결과로서, WEEH와 TRAIL이 혼합 처리된 경우 각각의 단독 처리에서는 관찰되지 않았던 세포 밀도의 감소에 따른 membrane shrinking을 동반한 세포 내 과립 형성과 같은 apoptosis가 유발되었을 경우 관찰되는 세포변형 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 단독 처리군에 비하여 혼합 처리군의 경우 세포의 길이가 길어지고 dendrite와 같은 분지의 형성이 많아졌다.

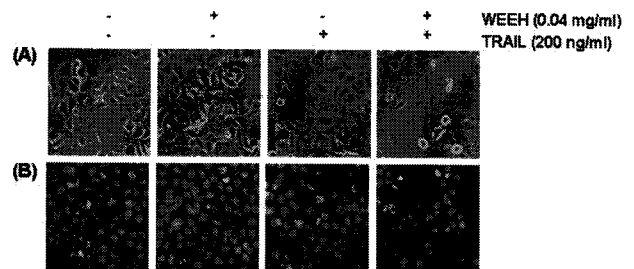


Fig. 3. Morphological changes and chromatin condensation by combined treatment with WEEH and TRAIL in AGS human gastric carcinoma cells. (A) Cells were seeded at an initial density of 1×10^5 cells per 60 mm plate and treated with 0.04 mg/ml WEEH, 200 ng/ml TRAIL or WEEH+TRAIL for 48 hr. Cell morphology was visualized by inverted microscope. Magnification, $\times 200$. (B) The cells were stained with DAPI solution. Stained nuclei were then observed under fluorescent microscope using blue filter. Magnification, $\times 400$.

Apoptosis가 일어난 세포에서 가장 일반적으로 관찰되는 현상이 DNA의 절단에 의한 염색질의 응축이기 때문에[8,26] WEEH와 TRAIL 혼합 처리에 따른 AGS 세포 핵의 형태적 변화를 DAPI 염색을 통하여 이를 확인하였다. Fig. 3B에 나타난 바와 같이 정상배지에서 배양된 AGS 세포나 WEEH 및 TRAIL가 단독 처리된 배지에서 배양된 AGS 세포의 경우 핵의 전체가 완전한 형태로 염색이 되는 양상을 보였으나, WEEH와 TRAIL이 혼합 처리된 배지에서 배양된 AGS 세포의 경우 DNA 절단에 의한 염색질의 응축된 형태인 apoptotic body의 형성이 매우 증가되었다. 이는 Fig. 1 및 2에서 제시된 WEEH 및 TRAIL 단독 및 혼합 처리에 의한 AGS 세포의 증식 억제효과가 apoptosis 유발에 의한 것임을 뒷받침하여 주는 결과이다.

WEEH와 TRAIL의 혼합 처리에 의한 미토콘드리아 기능 손상

세포의 생존에 가장 중요한 소기관인 미토콘드리아는 apoptosis 유도 신호가 발생할 경우 가장 먼저 손상 받음으로서 apoptosis를 촉진하는 다양한 미토콘드리아 내 물질들을 세포질로 방출시킨다[26]. 따라서 WEEH 및 TRAIL의 단독 및 혼합 처리에 의한 apoptosis 유발이 미토콘드리아의 기능 손상과 연관성이 있는지를 JC-1 염색에 의한 MMP 손실의 정도를 flow cytometry analysis를 통하여 조사하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 MMP 손실의 정도가 WEEH 또는 TRAIL의 단독 처리군의 경우 대조군에 비해서 약간 증가되었으나, WEEH 및 TRAIL의 혼합 처리군에서는 대조군에 비하여 약 3배 이상 증가되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 WEEH와 TRAIL의 단독 처리 보다는 혼합 처리에 의한 AGS 세포의 apoptosis 유도는 미토콘드리아의 기능 손상과 연관성이 있음을 보여주는 것이다.

Caspases 및 PARP의 발현에 미치는 WEEH와 TRAIL의 영향

Cysteine-related protease인 caspase들은 세포의 apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 효소로서 핵과 미토콘드리아의 외막에 불활성 상태로 존재하다가 apoptosis를 유도하는 자극에 의하여 활성화 될 수 있다. 이러한 caspase들은 활성화 되어 정상적인 세포의 DNA repair나 genomic stability의 유지에 중요한 역할을 하는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)를 포함한 세포의 생존에 중요한 다양한 기질 단백질들을 분해함으로써 apoptosis를 유발하게 된다 [28]. Fig. 4의 결과에서 WEEH와 TRAIL 혼합 처리에 의한 apoptosis 유도는 미토콘드리아 기능 소실과 연계성이 있었기 때문에, 지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 활성에 미치는 WEEH와 TRAIL의 단독 및 혼합

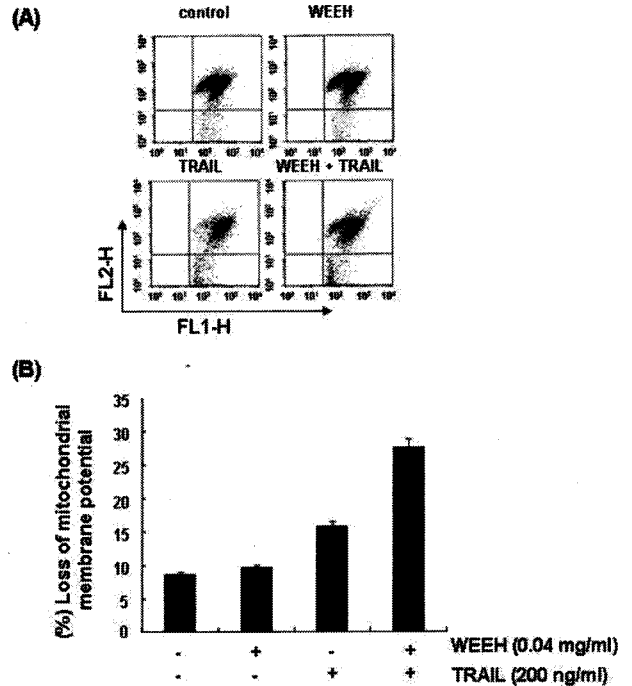


Fig. 4. Loss of mitochondrial membrane potential (MMP) by combined treatment with WEEH and TRAIL in AGS human gastric carcinoma cells. The cells were cultured for 48 hr in the absence (control) or presence of WEEH (0.04 mg/ml), TRAIL (200 ng/ml) or WEEH+TRAIL and stained with JC-1 at 37°C for 20 min. Mean JC-1 fluorescence intensity was detected by flow cytometer. Data are means±S.E. from representative experiments performed at least three times.

처리의 영향을 비교 조사하였다. Fig. 5A의 결과에서 보여주듯이 WEEH와 TRAIL의 단독 처리에 비해서 혼합 처리에 의한 3 종류의 caspase 모두에서 활성형 단백질의 발현 증가가 뚜렷하게 관찰되었으며, 이러한 효소들의 활성 정도를 정량적으로 조사한 결과(Fig. 5B)에서도 WEEH와 TRAIL 혼합 처리군에서 단독 처리군에 비하여 유의적으로 증가되었음을 알 수 있었다.

Apoptosis가 일어나는 대부분의 경우 PARP 단백질은 caspase-3의 활성에 의하여 부분적으로 잘리는 분해과정이 나타나는데, 정상세포의 경우는 116 KDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우는 85 KDa 크기의 단편을 관찰할 수 있다[15,19]. 따라서 PARP 단백질의 단편화는 apoptosis가 유발된 세포에서 특이적으로 관찰되는 대표적인 biomarker 중의 하나이다[28]. Fig. 5A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 WEEH와 TRAIL 단독 처리군에 비하여 혼합 처리에 의한 caspase-3 효소의 가장 중요한 표적 단백질인 PARP의 분해 현상이 뚜렷하게 관찰되어 AGS 세포에서 WEEH와 TRAIL 혼합 처리에 의한 apoptosis의 유발은 caspase-3 의존적인 현상임을 알 수 있었다.

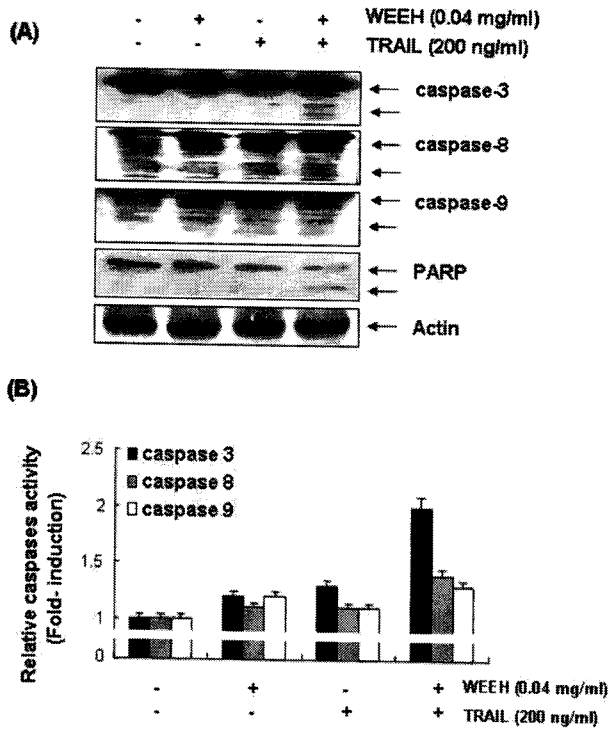


Fig. 5. Activation of caspases and degradation of PARP by combined treatment with WEEH and TRAIL in AGS human gastric carcinoma cells. (A) The cells were cultured for 48 hr in the absence (control) or presence of WEEH, TRAIL or WEEH TRAIL and lysed. The cellular proteins were separated by 10% or 13% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-caspase-9 and anti-PARP antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control. (B) The cell lysates from the cells treated with WEEH, TRAIL or WEEH+TRAIL for 48 hr were assayed for the *in vitro* caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity using DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA, respectively, as substrates. The concentrations of the fluorescent products released were measured. The results are expressed as the mean±S.E. of three independent experiments.

Bcl-2 family의 발현에 미치는 WEEH와 TRAIL의 영향

Apoptosis 조절에 관여하는 대표적인 유전자군의 하나가 Bcl-2 family에 속하는 인자들인데, 이중 Bcl-2 member에 속하는 Bcl-2 및 Bcl-xL 등은 apoptosis 유발을 억제하는 anti-apoptotic 분자이며, Bax member에 속하는 Bax, Bad 및 Bak 등은 apoptosis 유발을 촉진하는 pro-apoptotic 분자이다[2,14]. Bcl-2 member에 비하여 Bax member의 상대적 발현이 증가될 경우 미토콘드리아에서 cytochrome c를 유리시켜 caspase의 활성화 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 증가시킨다. Bcl-2/Bcl-xL과 Bax는 서로

dimer를 이루며, 만일 Bax가 주종단백질로 heterodimer를 만들면 apoptosis를 촉진시키고, Bcl-2/Bcl-xL이 주종이면 apoptosis가 억제된다[20,25]. 따라서 이들 두 유전자의 발현에 미치는 WEEH 및 TRAIL의 단독 및 혼합 처리 영향을 조사하기 위하여 WEEH와 TRAIL의 단독 및 혼합 처리된 배지에서 배양된 AGS 세포의 단백질을 대상으로 Western blot analysis를 실시하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 WEEH와 TRAIL의 단독 및 혼합 처리에 의해서는 Bax 단백질의 발현 수준에서는 큰 변화가 없었지만, anti-apoptotic Bcl-2 및 Bcl-xL 단백질의 발현은 WEEH 및 TRAIL 혼합 처리군에서 단독 처리군에 비하여 매우 유의적으로 감소되었다. 또한 BID의 단백질의 발현도 WEEH 및 TRAIL 혼합 처리군에서 매우 감소되었다. 본 실험의 조건에서 BID의 분절에 의한 tBID 형태의 발현은 검출이 되지 않았으나, BID 자체의 감소는 tBID의 발현을 증가시켰을 것으로 추정되며, 이는 아마도 미토콘드리아로 이동되어 apoptosis 유발 촉진 인자로 작용되었을 것으로 추정된다.

IAPs family의 발현에 미치는 WEEH와 TRAIL의 영향

Apoptosis 유발 조절에 관여하는 또 다른 유전자군인 IAPs family는 곤충 세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군으로 알려졌으며,

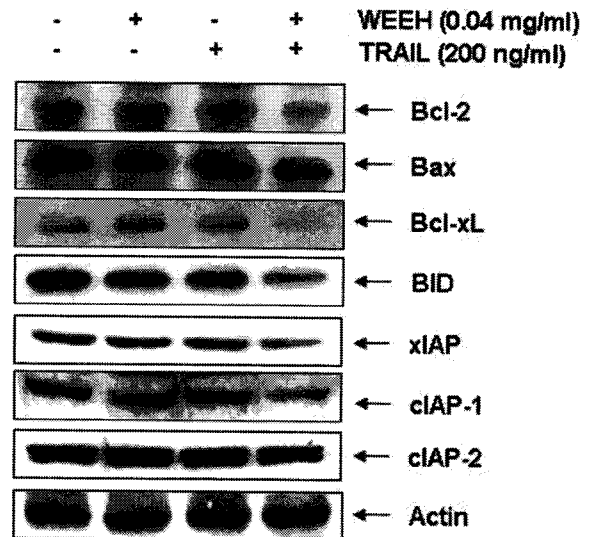


Fig. 6. Effects of combined treatment with WEEH and TRAIL on the levels of Bcl-2 and IAP family members in AGS human gastric carcinoma cells. The cells were cultured for 48 hr in the absence (control) or presence of WEEH, TRAIL or WEEH+TRAIL and lysed. The cellular proteins were separated by 10% or 13% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지니는 것으로 알려져 있다. 그들은 caspase의 활성화와 연관된 조절인자이며, caspase와 직접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 억제할 수 있다[10,11]. 따라서 WEEH와 TRAIL의 단독 및 혼합 처리에 의한 apoptosis 유도에 이들 인자들이 관여하는지의 여부를 XIAP, cIAP-1 및 cIAP-2를 대상으로 Western blot analysis로 조사하였다. Fig. 6의 결과에서 알 수 있듯이 WEEH 또는 TRAIL의 단독 처리군에서는 대조군에 비하여 큰 유의적인 발현의 변화를 관찰할 수 없었으나, 혼합 처리군에서 특히 XIAP 및 cIAP-1의 발현이 매우 감소되었다.

고 찰

본 연구의 결과는 지금초 열수 추출물(WEEH)과 TRAIL의 혼합 처리가 WEEH 및 TRAIL 단독 처리 의한 세포증식 억제에 큰 영향을 주지 않는 조건의 인체 위암세포 AGS에서 매우 효율적으로 암세포의 증식 억제 및 apoptosis를 유도하였음을 보여준다. AGS 세포에 세포독성을 보이지 않는 WEEH의 농도 범위 내에서 TRAIL과 혼합 처리하였을 경우 관찰되는 apoptosis는 caspase 활성화 및 미토콘드리아 기능 손상과 연계성이 있었으며, WEEH와 TRAIL의 혼합 처리는 Bcl-2 및 Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic 인자들 및 IAPs family의 발현 감소와도 연관성이 있었다.

TRAIL은 최근 발견된 apoptosis 유도 인자로서, 정상세포에는 영향을 주지 않으며 암세포와 형질 전환된 세포 및 바이러스가 감염된 세포들을 포함한 비정상적인 세포들에서만 apoptosis를 유발할 수 있기 때문에 임상적 유용 가치가 매우 높은 인자이다[7,27,31]. 그러나 TRAIL의 효능에 대한 잠재적 유효성에 관해 여전히 많은 연구가 요구되어지고 있다. TRAIL에 의한 caspase-8의 활성화는 세포의 종류에 따라 두 가지의 서로 다른 apoptotic pathway를 유도한다[27]. TRAIL은 caspase-8에 의한 caspase-3과 같은 downstream effector caspase의 활성화를 통한 미토콘드리아 비의존성 apoptosis를 유도하거나[7], caspase-9의 활성화를 매개하는 미토콘드리아 의존성 apoptosis를 유도할 수도 있다[7,27]. 본 연구의 결과에서 보여준 WEEH와 TRAIL 동시 처리에 의한 apoptosis 유발에는 미토콘드리아 의존성(caspase-9의 활성화)과 미토콘드리아 비의존성(caspase-8의 활성화)이 동시에 관여하는 것으로 추정된다.

비록 TRAIL이 암의 치료에 생물학적으로 안전하고 효과적이지만, AGS 위암 세포를 포함한 어떤 암세포에서는 300 ng/ml 이상의 농도에 효과를 보이고 있어 TRAIL에 매우 큰 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있다[31]. 따라서 암세포에 세포 독성을 보이지 않는 다양한 천연물의 처리 농도 범위에서 TRAIL과 함께 처리함으로써 암세포의 증식억제 및 apoptosis 유도의 향상성 증진은 암세포의 종류에 따른

TRAIL 저항성을 극복하기 위한 방법으로 최근 다양하게 시도되어지고 있다[12,13,17]. 본 연구에서도 AGS 세포에 대한 세포독성이 약하거나 apoptosis 유도 효과가 미비한 WEEH 및 TRAIL의 단독 처리 조건의 혼합 처리에 의하여 AGS 세포에서 TRAIL 저항성을 극복할 수 있음을 제시하였다. 또한 WEEH 및 TRAIL의 혼합 처리에 의하여 apoptosis의 대표적인 특징인 cell shrinkage 및 chromatin 응축 등의 관찰은 WEEH 및 TRAIL의 혼합 처리에 의한 AGS 세포의 증식억제가 apoptosis 유도와 연관성이 있음을 보여주었다(Fig. 2 및 3). 최근 TRAIL 저항성 암세포에서 천연물과의 동시 처리에 의한 apoptosis 유도는 caspases 활성화와 대부분 연관성이 있는 것으로 보고되어져, caspases가 apoptosis 유도에 매우 필수적인 인자로서 작용함이 알려지고 있다[12,13,17,22,23]. 본 연구의 결과에서도 WEEH 및 TRAIL의 동시 처리에 의한 apoptosis 유도는 caspases 활성화와 밀접한 연관성이 있었으며, 특히 caspase-3의 가장 중요한 기질 단백질인 PARP의 단편화 유도는 WEEH 및 TRAIL 혼합 처리에 의한 apoptosis 유도는 caspase-3 의존적이라는 것을 뒷받침하여 주는 결과이다(Fig. 5).

Apoptosis 동안 caspases의 활성화는 Bcl-2 및 IAPs family를 포함한 많은 단백질들에 의하여 조절 받는데 [2,10,11,20,24,25], WEEH와 TRAIL 동시 처리군에서 WEEH 또는 TRAIL의 단독 처리 조건에서 큰 변화를 보이지 않았던 anti-apoptotic Bcl-2 및 Bcl-xL 단백질의 발현 저하로 인한 상대적인 pro-apoptotic Bax의 발현 증가는 미토콘드리아 기능 손상을 야기할 것으로 추정되었으며, 이는 JC-1을 이용한 MMP 변화의 결과로 확인하였다(Fig. 4). 아울러 WEEH와 TRAIL 동시 처리에 의한 pro-apoptotic BID 단백질의 발현 감소는 BID의 truncation에 의한 tBID 발현의 증가로 연계될 수 있기 때문에 WEEH와 TRAIL 혼합 처리에 의한 미토콘드리아 기능 손상에 대한 추가적인 자료로 제시될 수 있었다. 또한 TRAIL은 anti-apoptotic 단백질인 IAPs family의 활성을 억제함으로써 apoptosis의 유도에 기여할 수 있는 것으로 보고되어지고 있는데[13,17], 본 연구의 결과에서는 XIAP를 포함하여 cIAP-1의 발현도 WEEH 및 TRAIL의 동시 처리에 의하여 매우 억제되었음을 확인하였다(Fig. 6). 즉 WEEH와 TRAIL의 혼합 처리에 의한 AGS 세포의 apoptosis의 유발은 caspase-8의 활성을 통한 미토콘드리아 경로를 경유하여 caspase-9 및 caspase-3을 활성화시킴으로써 일어나는 것으로 생각되어진다.

암치료의 전략에서 가장 극복해야할 장애 요소가 apoptosis의 저항성을 극복하는 것이다. 비록 TRAIL이 *in vitro* model에서 다양한 암세포의 효과적인 apoptosis 유도를 할 수는 있으나, 많은 암세포가 TRAIL에 대하여 저항성을 보이고 있기 때문에 TRAIL을 암치료 전략에 효율적으로 사용하기 위해서는 이러한 저항성을 극복하는 것이 우선적으로 해

결해야할 과제이다. 본 연구의 결과에서 제시한 TRAIL과 WEEH의 동시 처리에 의한 효율적인 apoptosis 유도는 TRAIL 단독 처리에서 저항성을 보이는 다양한 암세포의 증식억제를 해결할 수 있는 매우 유의적인 결과라고 생각되어 진다. 그러나 본 연구의 결과만으로 WEEH 및 TRAIL 동시 처리에 의한 apoptosis 유도 기전의 모두를 제시할 수는 없으며, 특히 death receptor와 연관된 부가적인 실험과 지금초 열수 추출물 내에 함유되어 있는 leading compound의 확인 및 이를 이용한 지속적인 연구가 요구되어 진다.

요 약

본 연구에서는 지금초 열수 추출물(WEEH)의 처리에 의한 TRAIL 저항성 인체 위암세포의 증식 억제와 연관된 apoptosis 유발에 관한 기전 해석을 시도하였다. 이를 위하여 AGS 세포주가 사용되었으며 다음과 같은 결과를 얻었다. 본 연구에서 조사된 범위 내에서의 TRAIL (200 ng/ml) 및 WEEH (0.04 mg/ml)의 단독 처리에 의한 AGS 세포에 유의적인 세포 독성을 나타내지 않았다. 그러나 TRAIL 및 WEEH의 혼합 처리는 WEEH의 처리 농도에존적으로 AGS 세포의 증식을 억제하였으며, 이는 apoptosis 유발에 의한 것임을 MTT assay, 핵의 염색질 응축 및 세포주기 sub-G1기에 속하는 세포빈도의 증가 등으로 확인하였다. TRAIL 및 WEEH 혼합 처리에 의한 apoptosis 유발 기전의 해석을 위하여 다양한 생화학적 분석법에 의하여 조사된 결과에 의하면, TRAIL 및 WEEH 혼합처리에 의한 caspase-8의 활성화에 의한 BID의 truncation화 및 이와 연관된 미토콘드리아 기능의 손상에 따른 caspase-9의 활성화와 연관성이 있었다. 이러한 미토콘드리아 기능 손상 및 caspase-9의 활성화는 Bcl-2, Bcl-xL, XIAP 및 cIAP-2 등과 같은 anti-apoptotic 인자들의 발현 저하와 연관성이 있는 것이며, 이로 인한 caspase-3의 활성화에 의한 PARP 단백질의 단편화 유도로 apoptosis가 일어난 것으로 예측되어 진다. 비록 부가적인 연구들이 요구되어 지지만, 본 연구의 결과는 TRAIL 저항성 암세포의 항암 전략에 지금초 추출물의 적용 가능성을 보여주는 것으로서 지금초의 항암작용의 규명에 중요한 자료를 제공하여 줄 것으로 생각된다.

References

- Anderson, D. M., E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman and L. Galibert. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175-179.
- Antonsson, B. and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50-57.
- Barranco, S. C., C. M. Townsend, Jr. C. Casartelli, B. G. Macik, N. L. Burger, W.R. Boerwinkle and W. K. Gourley. 1983. Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **43**, 1703 - 1709.
- Bodmer, J. L., K. Burns, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, M. Thome, T. Bornand, M. Hahne, M. Schroter, K. Becker, A. Wilson, L. E. French, J. L. Browning, H. R. MacDonald and J. Tschopp. 1997. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). *Immunity* **6**, 79-88.
- Choi J. G. 2006. *The medicine of grasses flowers and trees* 2, pp. 193-201, Hanmunwha, Seoul.
- Chu, X. L., C. S. Fan and Y. Z. Luo. 1997. Identification of *Euphorbia humifusa* Wind, and *E. maculata* Raf. from its confused species *E. thymifolia* L. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **19**, 325-357.
- French, L. E. and J. Tschopp. 1999. The TRAIL to selective tumor death. *Nat. Med.* **5**, 146-147.
- Gerschenson, L. E. and R. J. Rotello. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* **6**, 2450-2455.
- Griffith, T. S. and D. H. Lynch. 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 559-563.
- Holcik, M., H. Gibson and R. G. Korneluk. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
- Hussein, M. R., A. K. Haemel and G. S. Wood. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J. Pathol.* **199**, 275-288.
- Jin, C. Y., C. Park, J. H. Cheong, B. T. Choi, T. H. Lee, J. D. Lee, W. H. Lee, G. Y. Kim, C. H. Ryu and Y. H. Choi. 2007. Genistein sensitizes TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells through activation of caspase-3. *Cancer Lett.* **257**, 56-64.
- Jung, E. M., J. H. Lim, T. J. Lee, J. W. Park, K. S. Choi and T. K. Kwon. 2005. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5). *Carcinogenesis* **26**, 1905-1913.
- Jurgensmeier, J. M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen and J. C. Reed. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4997-5002.
- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson and G. G. Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
- Kelley, J. R and J. M. Duggan. 2003. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J. Clin. Epidemiol.* **56**, 1-9.
- Kim, Y. H., J. W. Park, J. Y. Lee and T. K. Kwon. 2004. Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter

- through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **25**, 1813-1820.
18. Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim and A. Ashkenazi. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**, 611-620.
 19. Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.
 20. Miyashita, T. and J. C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
 21. Myong, Y.H. and Y.H. Choi. 2007. Gastric cancer; Epidemiology and causes. *Cancer Prev. Res.* **12**, 143-153.
 22. Nozawa, F., A. Itami, M. Saruc, M. Kim, J. Standop, K. S. Picha, K. H. Cowan and P. M. Pour. 2004. The combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) and genistein is effective in inhibiting pancreatic cancer growth. *Pancreas* **29**, 45-52.
 23. Park, S. Y. and D. W. Seol. 2002. Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 515-518.
 24. Reed, J. C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236.
 25. Rosse, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen and C. Borner. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome *c*. *Nature* **391**, 496-499.
 26. Schultz, D. R. and W. J. Harrington Jr. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.* **32**, 345-369.
 27. Srivastava, R. K. 2001. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* **3**, 535-546.
 28. Tewari, M., L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen and V. M. Dixit. 1995. Yama/ CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809.
 29. Walczak, H., R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, P. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh and D.H. Lynch. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat. Med.* **5**, 157-163.
 30. Wang, S. and S. W. El-Deiry. 2003. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **22**, 8628-8633.
 31. Yang, L. Q., D. C. Fang, Q. R. Wang and S. M. Yang. 2004. Effect of NF- κ B, survivin, Bcl-2 and caspase-3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J. Gastroenterol.* **10**, 22-25.
 32. Yoshida, T., Y. Amakura, Y. Z. Liu and T. Okuda. 1994. Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants. XI. Three new hydrolyzable tannins and a polyphenol glucoside from *Euphorbia humifusa*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **42**, 1803-1807.
 33. Zhang, X. D., A. Franco, K. Myers, C. Gray, T. Nguyen and P. Hersey. 1999. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* **59**, 2747-2753.