

麥門冬이 4-HNE에 의해 유도된 Apoptosis에 미치는 영향

박수환[#], 김연섭^{*}

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effects of Liriopis Tuber on 4-HNE-induced Apoptosis in PC-12 Cells

Soo-Hwan Park[#], Youn-Sub Kim^{*}

Department of Anatomy-Pointology, College of Oriental Medicine, Gachon University

ABSTRACT

Objects : Apoptosis leads to the death of a cell. The mitochondrial pathway of apoptosis, a process regulated by the Bcl-2 family of proteins, plays a key role in various biological processes. The tuber of *Liriope platyphylla* Wang et TANG (Liliaceae), also known as Liriopis tuber, is famous in Oriental medicine owing to its tonic, antitussive, expectorant and anti-asthmatic properties. The purpose of this study was to observe the effect of the Liriopis tuber on mitochondrial -mediated apoptosis in PC-12 cells.

Method : A cytotoxic test on Liriopis Tuber water extract was conducted and another MTT assay was conducted to observe the cytoprotective effect against 4-HNE 25 μ M that causes oxidative stress in PC-12 cells for 24 hours. In addition, in order to observe the expression of Bcl-2 and Bax protein involved with apoptosis, western blot was conducted.

Results : The LT water extract had no toxicity for PC-12 cell. In the cytoprotective effect against 4-HNE, both of the group treated with 50 μ g/ml and 100 μ g/ml of LT water extract showed a significant increase in comparison with the control group. In Bax protein expression, all the experimental groups treated with LT water extract showed a decrease in comparison with the control group but had no significance. In Bcl-2 protein expression, all the experimental groups treated with LT water extract showed a significant increase in comparison with the control group.

Conclusion : These results suggest that LT is effective in reducing apoptosis.

Key words : Liriopis Tuber, 4-HNE, MTT assay, Bax, Bcl-2

서론

세포의 죽음은 세포의 손상이 심하면, 세포에서 부종이 일어나고 용해가 일어나 세포 내용물이 밖으로 분출되는 괴사와 죽음을 조절하기 위해 유전적, 생화학적 프로그램을 활성화하는 과정인 apoptosis로 나뉠 수 있다¹⁾.

Apoptosis는 미토콘드리아 내 cytochrome c 등을 미토콘드리아 외막구멍(apoptotic pore)을 통해 세포질로 내보내는 역할을 하여²⁾, 세포질의 수축, 세포와 세포결합 파괴, 세포질 내 부피 감소, 일부 세포 소기관의 수축, 염색질 응축, 핵분

열 및 식세포작용에 의한 탐식 등이 일어나게 한다³⁾.

Apoptosis를 유발하는 경로는 대표적으로 내인성 경로와 외인성 경로로 나뉘는데, 외인성 경로는 Fas, tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis -inducing ligand (TRAIL) receptor 같은 TNF family에 의해서 유발되고, 내인성 경로는 Bcl-2 family에 의해서 조절되며 Bcl-2 family는 크게 proapoptotic과 antiapoptotic 단백질로 나뉜다^{4,5)}.

Bcl-2 family 종류는 단백질의 기능과 특성에 따라 Bcl-2타입 antiapoptotic 단백질과 Bax타입, BH3-only 등

* 교신저자 : 김연섭, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

· Tel : 031-750-5420 · E-mail : ysk5708@hanmail.net

제1저자 : 박수환, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

· Tel : 031-750-5427 · E-mail : sooseng@daum.net

· 접수 : 2013년 2월 4일 · 수정 : 2013년 3월 21일 · 채택 : 2013년 3월 21일

의 proapoptotic 단백질로 나뉜다⁶⁾.

Bax는 자극에 의해 cytochrome c를 미토콘드리아에서 세포질로 내보내며, cytochrome c는 caspases를 자극하여 apoptosis를 촉진하게 하고⁷⁾, Bcl-2는 Bax와 Bak을 억제하여 cytochrome c의 방출을 막아 apoptosis를 지연하는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

Antiapoptotic과 proapoptotic 단백질들 간의 비율이 깨지게 되면 미토콘드리아로부터 cytosol로 cytochrome c를 방출하여 caspase를 활성화하여 apoptosis를 유발시킨다. 따라서 proapoptotic 대 antiapoptotic 분자의 비율은 세포의 운명을 결정한다⁹⁾.

麥門冬(Liriope Tuber, LT)은 백합과(Liliaceae)에 속한 다년생 초본인 맥문동 *Liriope platyphylla* WANG et TANG의 뿌리의 팽대부로 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津한다¹⁰⁾.

맥문동에 대한 실험적 연구로 친식¹¹⁾, 항박테리아¹²⁾, 당뇨¹³⁻¹⁶⁾ 및 학습 기억¹⁷⁾ 등의 연구가 보고되었다.

또한 PC-12세포를 이용하여 맥문동의 butanol 분획물이 신경세포 성장에 기여하고¹⁸⁾, 맥문동의 성분인 spicatoside A가 nerve growth factor (NGF)의 분비를 촉진한다¹⁹⁾는 death receptor (extrinsic) pathway에 의한 연구보고가 있다.

이에 저자는 맥문동에 신경보호 효능이 있어 mitochondrial (intrinsic) pathway를 통한 apoptosis에도 효과가 있을 것으로 생각하여 이를 검증하기 위하여 맥문동물 추출물의 세포독성을 검사하기 위해 세포를 배양하여 MTT 방법으로 세포의 생존율을 측정하였다. 그리고 산화적 스트레스를 일으켜 apoptosis를 촉진하는 4-Hydroxynonenal (4-HNE)^{20,21)}을 투여하여 손상된 PC-12 cell의 세포 생존율을 측정하고, apoptosis에 관여하는 Bax와 Bcl-2 단백질의 발현을 western blot분석으로 관찰한바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에 사용한 PC-12(rat adrenal pheochromocytoma cell) 세포는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포의 배양을 위해 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 2% NaHCO₃가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 37°C의 온도와 5% CO₂가 포함된 공기가 공급되는 CO₂ incubator에서 세포를 배양하였다.

2. 기기 및 시약

1) 기기

본 실험을 위해 사용된 기기는 Clean Bench (Nuair, USA), CO₂ Incubator (Nuair, USA), Microplate Reader (Dynex, USA), Spectrophotometer (Implen, Germany), Water Purification(High-Q, USA), Freezing dryer (Eyela, Japan), Auto clave (sam woo, Korea), Balance (Mettler, Switzerland), Centrifuge (Hanil, Korea), Sonicator (Sonics, USA) 등이다.

2) 시약

본 실험에 사용된 시약은 RPMI Medium 1640 (Gibco, USA), Fetal Bovine Serum (Gibco, USA), Horse Serum (Gibco, USA), 4-Hydroxy Nonenal (Cayman, USA), MTT (Sigma, USA), Sodium Bicarbonate (Sigma, USA), Trizma Base (Sigma, USA), Sodium Chloride (Sigma, USA), Dimethyl Sulfoxide (Amresco, USA) 등을 구입하여 사용하였다.

3. 한약물의 제조

본 실험에 사용한 국산 맥문동(*Liriope platyphylla* WANG et TANG)은 (주)허브메디에서 구입하여 사용하였다. 맥문동 50 g에 물 500 ml를 가하여 환류추출기에서 2시간 동안 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 하였다. 맥문동은 28.5 g의 추출물을 얻어 수율은 57% 이었다.

4. 세포 생존율 측정

1) PC-12 cell 에서 LT의 세포 생존율 측정

세포 생존율을 측정하기 위해 MTT (3-[4,5 - Dimethylthiazol - 2-yl]-2,5 - diphenyl - tetrazolium bromide) assay를 사용하였다. 이 방법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 변하여 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. LT의 PC-12 세포 생존율을 측정하기 위해 96 well plate에 각 well당 4 × 10⁴ 개/ml를 성장 배지에 seeding 하고 24시간 후에 serum-free RPMI 1640 배지로 갈아주고 LT를 처리하지 않은 정상군(Normal)과 LT를 각각 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml 의 농도로 24시간 처리한 실험군으로 나누었다. MTT reagent (stock 농도 5 mg/ml)를 96 well에 15 µl 씩 넣어 37°C incubator에서 2시간 동안 배양시켰다. 그 후 media를 제거하고 DMSO 100 µl를 넣은 후 70°C incubator에서 10분간 녹여서 ELISA reader를 이용하여 흡광도 570 nm에서 세포의 생존율을 측정하였다.

2) 4-HNE 손상에 대한 LT의 세포 생존율 측정

4-HNE 손상에 대한 LT의 PC-12 세포 생존율을 측정하기 위해 96 well plate에 각 well당 4 × 10⁴ 개/ml를 성장 배지에 seeding 하고 24시간 후에 serum-free RPMI 1640 배지로 갈아주었다. 그룹은 5개 군으로, 정상군(Normal)과 4-HNE 25 µM을 처리한 대조군(Control), LT를 각각 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml을 24시간 처리 후 4-HNE를 25 µM의 농도로 24시간 동안 처리한 3개의 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. LT가 4-HNE로 자극된 PC-12 cell에서 LT의 세포 생존율 측정을 위해서 MTT Assay를 이용하였다.

5. Western blot 분석

세포는 차가운 PBS (pH 7.4)로 2번 씻어낸 후 원심분리기를 이용하여 1000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 그리고 세포분해용액(iNtRON Biotechnology, Korea)을 넣은 후 초음파 분쇄기로 세포를 균질화 하고 다시 원심분리기를 이용하여 30분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad의 protein assay dye reagent (Bio-Rad, USA)를 사용하여 흡광도로 측정하였다. 80 µg의 단백질을 Mini-PROTEAN® TGXTM Gel (Bio-Rad, USA)에 loading하여 분리한 다음 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)으로 이동시켰다. 1차 항체로 sheep actin antibody (1:500; R&D Systems, USA)와 mouse Bax antibody (1:500; Trevigen, USA), mouse Bcl-2 antibody (1:1500; R&D Systems, USA)를 사용하였다. 2차 항체로는 Bax와 Bcl-2용 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:1000; R&D Systems, USA)를 사용하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질 이동을 제외하고 모든 실험은 실온에서 시행하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질 이동은 4℃ 냉장고 안에서 실시하였다. 단백질 밴드 검출은 ECL detection Reagent (Amersham, UK)를 사용하여 발색시켰다.

6. 통계처리

각 단백질의 발현을 비교하기 위해서 발색된 band의 밀도는 Gel Documentation (Bio-Rad, USA)의 Quantity One Analysis Software (Bio-Rad)로 측정을 하였다. 통계분석은 4-HNE와 4-HNE+맥문동 투여 group 간의 유의성검증 Graphpad Prism (USA)으로 Student's t-test를 사용하였으며, 실험 결과는 평균 ± 평균의 표준오차 [means ± standard error of the mean (SEM)]로 나타내었다. 통계적 유의성 검정은 P < 0.05로 하였다.

결 과

1. 맥문동이 세포 생존율에 미치는 영향

맥문동이 PC-12 cell에 독성이 있는 가를 관찰하기 위해, 세포에 맥문동추출물을 처리하고 세포의 생존율을 측정하였다. 정상군(Normal)의 세포 생존율을 100%로 하였다.

맥문동추출물 50 µg/ml주입군(LT50)에서 PC-12 cell 생존율은 101 ± 6.83%였고, 맥문동추출물 100 µg/ml주입군(LT100)의 PC-12 cell 생존율은 105 ± 5.21%이었다. 맥문동추출물 200 µg/ml주입군(LT200)의 PC-12 cell 생존율은 109 ± 6.35%였고, 맥문동추출물 400 µg/ml주입군(LT400)의 PC-12 cell 생존율은 101 ± 6.87%로 실험군 모두 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig 1).

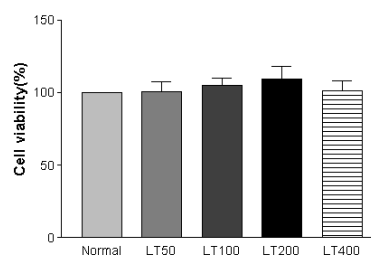


Fig 1. Effect of Liriois tuber on the cell viability. Normal ; only media-treated group. LT50 ; 50 µg/ml LT-treated group. LT100 ; 100 µg/ml LT-treated group. LT200 ; 200 µg/ml LT-treated group. T400 ; 400 µg/ml LT-treated group. Data are represented by mean ± SEM (n=8 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Normal group.

2. 맥문동이 4-HNE 손상에 대한 세포보호 효과

맥문동이 4-HNE 손상에 의한 PC-12 cell에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 세포에 맥문동추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 생존율을 측정하였다. 정상군(Normal)의 세포율을 100%로 하였으며 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 PC-12 cell 생존율은 63.37 ± 2.82%이었다.

맥문동추출물 50 µg/ml 과 4-HNE를 주입한 군(LT50)의 PC-12 cell 생존율은 69.75 ± 4.56%였으며, 맥문동추출물 100 µg/ml과 4-HNE를 주입한 군(LT100)의 PC-12 cell 생존율은 70.25 ± 3.10%로 두 군 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

맥문동추출물 200 µg/ml과 4-HNE를 주입한 군(LT200)의 PC-12 cell 생존율은 69.75 ± 5.16%로 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig 2).

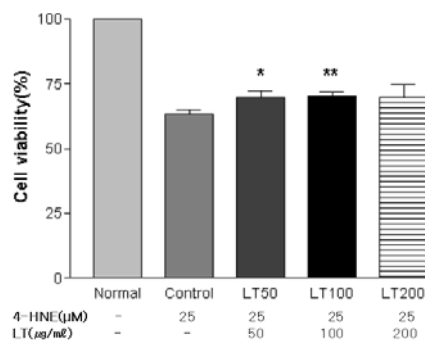


Fig 2. Effect of Liriois tuber on the cell viability with 4-HNE. Normal ; only media-treated group. Data are represented by mean ± SEM (n=4 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group (*, p<0.05; **, p<0.01).

3. 맥문동이 Bax 단백질 발현에 미치는 영향

맥문동이 proapoptosis 인자인 Bax에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 맥문동추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 Bax 단백질 발현양을 측정하였다. 정상군(Normal)의 Bax 단백질 발현양을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 Bax 단백질 발현양은 132 ± 22.19%이었다.

맥문동물추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT50)에서 Bax 단백질 발현량은 $119 \pm 5.76\%$, 맥문동물추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT100)에서 Bax 단백질 발현량은 $123 \pm 14.17\%$ 및 맥문동물추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT200)에서 Bax 단백질 발현량은 $108 \pm 6.97\%$ 로 실험군 모두 대조군에 비해 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다(Fig 3).

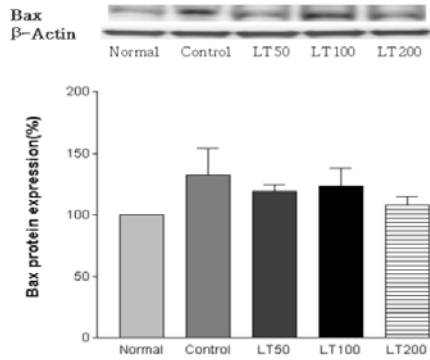


Fig 3. Effect of Liriopsis tuber on Bax expression. Normal ; only media-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group.

4. 맥문동이 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향

맥문동이 antiapoptosis 인자인 Bcl-2에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 맥문동물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 Bcl-2 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군(Normal)의 Bcl-2 단백질 발현량을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 Bcl-2 단백질 발현량은 $78 \pm 7.88\%$ 이었다.

맥문동물추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT50)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 $105 \pm 6.30\%$, 맥문동물추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT100)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 $109 \pm 7.26\%$ 및 맥문동물추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT200)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 $106 \pm 6.31\%$ 로 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다(Fig 4).

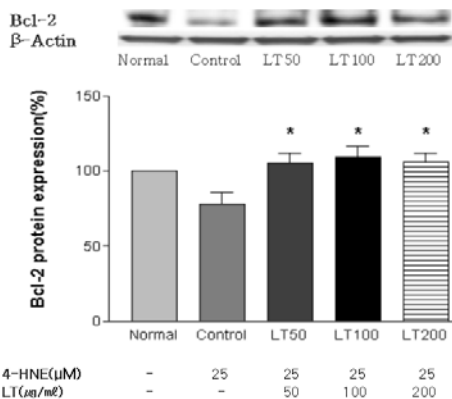


Fig 4. Effect of Liriopsis tuber on Bcl-2 expression. Normal ; only media-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group (*, p<0.05).

고찰

맥문동(*L. platyphylla*)은 북반구의 온대지방에 널리 분포하며 근경과 종자를 통해 번식할 수 있는 다년생식물로²²⁾, 본 연구에서 mitochondrial pathway를 통한 apoptosis에 대한 효과를 검증하였다.

MTT assay는 대사 작용으로 활성화된 세포의 생존력을 분석하는데 사용되는 평가 방법 중 하나로²³⁾, 실험결과가 신속하며 검사에 필요한 세포수가 dye exclusion이나 세포 집락 측정기법보다 적어도 되므로, 임상 적용이 용이한 장점을 가진다²⁴⁾.

PC-12 cell에서 맥문동의 세포 생존율을 측정된 결과 맥문동물추출물을 처리한 실험군 모두 세포독성이 없었다.

4-HNE는 apoptotic 및 necrotic 세포 죽음을 유도하는 것으로 알려져 있다. 4-HNE의 이런 유도 수준은 세포 증식, 분화 및 세포주기 조절, 산화 스트레스 그리고 하류 신호 단백질과 관련된 유전자 변화에 의한 apoptosis에 영향을 미치며 PC-12세포에서 apoptosis의 실행에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다²⁵⁾.

4-HNE는 지질과산화의 최종 생성물질로 산화 스트레스와 다양한 스트레스 관련 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며²⁶⁾, mitogen activated protein kinases (MAPK), stress activated protein kinase, c-Jun N-terminal protein kinase cascades의 활성화로 인해 세포내 신호를 조절하며, k-bactivity를 억제하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾.

맥문동이 4-HNE에 의한 PC-12 cell 손상에 미치는 영향을 관찰한 결과, 맥문동물추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 두 군에서만 대조군에 비해 유의한 증가를 보여 4-HNE에 대한 세포손상에 대해 보호 효과가 있는 것으로 나타났다.

Apoptosis는 programmed cell death라고 불리는 생리학적 과정이며 대부분의 조직에서 손상을 입었거나 감염된 세포들을 제거하는 중요한 과정으로서 이러한 apoptosis 과정이 실패하게 되면 암과 같은 여러 가지 질병의 원인이 된다²⁸⁾.

Apoptosis는 산화성 스트레스의 증가나 세포 내 Ca^{++} 의 증가에 의해 미토콘드리아의 내막과 외막에 존재하는 cytochrome c가 세포질로 분비되어 dATP 및 apoptotic protease 활성화 인자와 결합하여 apoptosome을 형성하며 cytochrome c의 분비는 Bcl-2 단백질의 균형에 의해 조절된다²⁹⁾.

Bcl-2 family 단백질들은 주로 mitochondria 외막에 존재하다가 mitochondria에서 cytosol로의 cytochrome c나 apoptosis inducing factor (AIF)의 이동을 억제함으로써 apoptosis를 조절한다³⁰⁾. Bcl-2 family는 antiapoptotic 단백질로는 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w 등이 있으며 proapoptotic 단백질로는 Bax, Bak, Bok 등이 있다³¹⁾.

Bcl-2는 원종양유전자(proto-oncogene)로 apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시키고 Bax 유전자는 Bcl-2 유전자와 구조적으로 비슷하며 Bcl-2 유전자와 상호 경쟁적으로 반응하여 과발현 시 Bcl-2 유전자의 apoptosis 억제 기능에 대하여 상반되는 작용을 하여 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되고 있다³²⁾. Bcl-2는 산화 스트레스와 4-HNE에 의해 유도되어 PC-12세포의 apoptosis를 차단

하는 것으로 알려져 있다³³⁾.

맥문동이 proapoptosis 인자인 Bax에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 맥문동물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 Bax 단백질 발현양을 측정한다. 결과 맥문동물추출물 50, 100 및 200 µg/ml 실험군 모두 대조군에 비해 유의성은 없었으나 감소를 나타내었다.

맥문동이 proapoptosis 인자인 Bcl-2에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 맥문동물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 Bcl-2 단백질 발현양을 측정한다. 결과 맥문동물추출물 50, 100 및 200 µg/ml 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 보면 맥문동은 세포손상으로 인한 Bax 단백질양의 증가를 억제시키고 Bcl-2 단백질양의 감소를 회복시키는 작용이 있다.

결론

본 연구에서 맥문동이 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하였다. 맥문동의 세포독성에 대한 검사를 하고 산화스트레스를 일으키는 4-HNE에 대한 세포보호 효과를 관찰하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 Bcl-2와 Bax 단백질의 발현을 관찰하기 위해 western blot을 실시한 결과 다음과 같다.

1. 맥문동물추출물은 PC-12 cell에 대한 세포 독성이 없었다.
2. 맥문동물추출물 50 µg/ml과 100 µg/ml을 주입한 군 모두 4-HNE만 투여한 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.
3. 맥문동물추출물을 주입한 실험군 모두 대조군에 비해 Bax 단백질 발현양 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다.
4. 맥문동물추출물을 주입한 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 Bcl-2 단백질 발현양 증가를 나타내었다.

이상의 결과들로 보아 맥문동이 세포손상에 의한 apoptosis를 억제하는 효능이 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 가천대학교 지원(GCU-2013-R081)에 의한 결과임

참고문헌

1. Kim HR, Chae HJ. Apoptosis. 1st ed, Seoul, :

Worldscience, 2006 : 3-7.

2. Kutuk O, Basaga H. Apoptotic Pathways in Mitochondria : Victor R, Preedy. Apoptosis. 1st ed, Enfield : Science Publisher, 2010 : 3-18.
3. Basanez G, Soane L, Hardwick JM. A new view of the Lethal Apoptotic pore. PLoS Biol. 2012 ; 10(9) : doi : 10.1371.
4. Yoo NJ, Lee JW, Soung YH, Kim HS, Park WS, Lee JY, Lee SH. Mutational Analysis of Proapoptotic Bcl-2 Family Members in Gastric Carcinomas. J Kor Gast Canr Assoc. 2003 ; 3(2) : 84-7.
5. Monian P, Jiang X. Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis : regulation post cytochrome C release. Experimental oncology. 2012 ; 34(3) : 185-191.
6. Giam M, Okamoto T, Mintern JD, Strasser A, Bouillet P. Bcl-2 family member Bcl-G is not a proapoptotic protein. Cell Death Dis. 2012 ; doi : 10.1038
7. Lee HY, Naha N, Kim JH, Jo MJ, Min KS, Seong HH, Shin DH, Kim MO. Age- and Area-Dependent Distinct Effects of Ethanol on Bax and Bcl-2 Expression in Prenatal Rat Brain. J Microbiol Biotechnol. 2008 ; 18(9) : 1590-8.
8. Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. Cell Death Differ. 2012 ; 19 : 1733-40.
9. Raj PV, Nitesh K, Prateek J, Sankhe MN, Rao JV, Rao CM, Udupa N. Effect of Lecithin on D-Galactosamine Induced Hepatotoxicity Through Mitochondrial Pathway Involving Bcl-2 and Bax. Ind J Clin Biochem. 2011 ; 26(4) : 378-84.
10. Kang BS, Ko WC, Kim KY, Kim SH, No SH, Park YK, Seo BI, Seo YB, Song SJ, Sin MK, An DK, Lee SI, Lee YJ, Lee KH, Joo YS, Choi HY. Herbal Medicine. Seoul. : Younglimsa 1999 : 588-9.
11. Lee YC, Lee JC, Seo YB, Kook YB. Liriope tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. J Ethnophar. 2005 ; 101 : 144-52.
12. Kim SW, Chang IM, Oh KB. Inhibition of the Bacterial Surface Protein Anchoring Transpeptidase Sortase by Medicinal Plants. Biosci Biotechnol Biochem. 2002 ; 66(12) : 2751-4.
13. Kim JH, Kim JE, Lee YK, Nam SH, Her YK, Jee SW, Kim SG, Park DJ, Choi YW, Hwang DY. The extracts from Liriope platyphylla significantly stimulated insulin secretion in the HIT-T15 pancreatic β -cell line. J Life Sci. 2010 ; 20(7) : 1027-33.
14. Lee YK, Kim JE, Nam SH, Goo JS, Choi SI, Choi YH, Bae CJ, Woo JM, Cho JS, Hwang DY. Differential regulation of the biosynthesis of glucose transporters by the PI3-K and MARK

- pathways of insulin signaling by treatment with novel compounds from *Liriope platyphylla*. *Int J Mol med*. 2011 ; 27(3) : 319–27.
15. Choi SI, Lee HR, Goo JS, Kim JE, Nam SH, Hwang IS, Lee YJ, Park SH, Lee HS, Lee JS, Jang IS, Son HJ, Hwang DY. Effects of Steaming Time and Frequency for Manufactured Red *Liriope platyphylla* on the Insulin Secretion Ability and Insulin Receptor Signaling Pathway. *Lab Anim Res*. 2011 ; 27(2) : 117–26.
 16. Lee HR, Kim JE, Goo JS, Choi SI, Hwang IS, Lee YJ, Son HJ, Lee HS, Lee JS, Hwang DY. Red *Liriope platyphylla* contains a large amount of polyphenolic compounds which stimulate insulin secretion and suppress fatty liver formation through the regulation of fatty acid oxidation in OLETF rats. *Int J Mol Med*. 2012 ; 30(4) : 905–13.
 17. Jiang T, Huang BK, Zhang QY, Han T, Zheng HC, Qin LP. Effect of *Liriope platyphylla* total saponin on learning, memory and metabolites in aging mice induced by D-galactose. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2007 ; 5(6) : 670–4.
 18. Hur JY, Lee PJ, Kim JM, Kim AJ, Kim HC, Kim SY. Induction of Nerve Growth Factor by Butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and Primary Astrocyte Cells. *Biol Pharm Bull*. 2004 ; 27(8) : 1257–60.
 19. Hur JY, Lee PJ, Moon EJ, Kang IS, Kim SH, Oh MS, Kim SY. Neurite outgrowth induced by spicatoside A, a steroidal saponin, via the tyrosine kinase A receptor pathway. *Eur J Pharmacol*. 2009 ; 620 : 9–15.
 20. Chung SW, Yee SB, Lee JY, Hossain MA, Kim DH, Yoon JH, Chung HY, Kim ND. 4-Hydroxynonenal Induces Endothelial Cell Apoptosis via ROS and Peroxynitrite Generation. *J Life Sci*. 2011 ; 21(7) : 961–8.
 21. Kang DY, Lee JY, Kim MS, Kim CH, Kim HK, Lee SM, Kwon YM, Lee JW, Baik HS, Yu BP, Chung HY. 4-Hydroxynonenal Induces Endothelial Apoptosis through Mitochondrial Depolarization. *J Life Sci*. 2008 ; 18(11) : 1513–20.
 22. Huh MK, Huh HW, Choi JS, Lee BK. Genetic diversity and population structure of *Liriope platyphylla* (Liliaceae) in Korea. *J Life Sci*. 2007 ; 17(3) : 328–33.
 23. Jang HY, Lee HY, Cheong HT, Kim JT, Park IC, Park CK, Yang BK. Development of sperm MTT Assay for its Application in Boar Semen. *J Emb Trans*. 2010 ; 25(4) : 229–35.
 24. Kim JE, Kim MS, Kang CM, Kim JI, Shin HK, Choi CW, Seo YS, Ji YH. The Use of MTT Assay, In Vitro and Ex Vivo, to Predict the Radiosensitivity of Colorectal Cancer. *Kor inst radiol Med Sci*. 2008 ; 26(3) : 166–72.
 25. Sissiqui MA, Kashyap MP, Kumar V, Al-Khedhairi AA, Musarrat J, Pant AB. Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC-12 cells. *Toxicol in Vitro*. 2010 ; 24 : 1592–8.
 26. Chen ZH, Saito Y, Yoshida Y, Sekine A, Noguchi N, Niki E. 4-Hydroxynonenal induces Adaptive Response and Enhances PC-12 Cell Tolerance Primarily Through induction of Thioredoxin Reductase 1 via Activation of Nrf2. *J Biol Chem*. 2005 ; 280(51) : 41921–7.
 27. Siddiqui MA, Kumar V, Kashyap MP, Agarwal M, Singh AK, Khanna VK, Al-Khedhairi AA, Musarrat J, Pant AB, Jahan S. Short-term exposure of 4-hydroxynonenal induces mitochondria-mediated apoptosis in PC-12 cells. *Hum Exp Toxicol*. 2011 ; 31(4) : 336–45.
 28. Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and Apoptosis. *Am J Surg* 2006 ; 191 : 517–26.
 29. Kim KB, Kim YA, Park JJ. Effects of 8-week Exercise on Bcl-2, Bax, Caspase-8, Caspase-3 and HSP70 in Mouse Gastrocnemius Muscle. *J Life Sci*. 2010 ; 20(9) : 1409–14.
 30. Lee YW, Oh SO, Cho WH, Lee SH. Underlying Mechanism of cisplatin-induced apoptosis in PC-12 cells. *J Korean Neurosurg Soc*. 1998 ; 27 : 1475–80.
 31. Kouri FM, Jensen SA, Stegh AH. The Role of Bcl-2 Family Proteins in Therapy Responses of Malignant Astrocytic Gliomas: Bcl2L12 and Beyond. *Scientific World Journal*. 2012 ; doi : 10.1100
 32. Chung WY, Lee HK, Baik SY, Park CS. Significance of nm23, Bcl2 and Bax Expression in Papillary Thyroid Carcinoma. *Kor J Head Neck Oncol*. 2000 ; 16(2) : 161–6.
 33. Kruman I, Annadora J, Keller B, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. Evidence that 4-Hydroxynonenal Mediates Oxidative Stress induced Neuronal Apoptosis. *J Neurosci*. 1997 ; 17(3) : 5089–100.