



Original Article / 원저

樛根白皮 추출물에 의한 급성 림프성 백혈병 Jurkat Lymphocytes의 세포고사 유도 및 신호기전 연구

이기옥¹, 김애화¹, 임규상^{2,3}, 윤용갑^{1,3*}

¹원광대학교 대학원, ²원광대학교 한의학 전문대학원

³한국전통의학연구소

Study of Signaling Pathway on Apoptotic Cell Death Induced by Extract of *Ailanthus altissima* in Human Jurkat Lymphocytes

Ki Ouk Lee¹, Ae Wha Kim¹, Kyu Sang Lim^{2,3}, Young Gab Yun^{1,3*}

¹Graduate School of Wonkwang University,

²Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

³Korean Traditional Medicine Institute

ABSTRACT

Objectives : We investigated whether the components of *Ailanthus altissima* induced apoptotic cell death in Jurkat acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells.

Methods : Regulation of cell proliferation is a complex process involving the regulated expression and/or modification of discrete gene products, which control transition between different stages of the cell cycle.

Results : Upon treatments with *Ailanthus altissima*, the concentration-dependent inhibitions of cell viability were observed as compared to untreated control group. The capability of *Ailanthus altissima* to induce apoptosis was associated with proteolytic cleavage of specific target proteins such as poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) and beta-catenin proteins suggesting the possible involvement of caspases. *Ailanthus altissima* also caused apoptosis as measured by cell morphology and DNA fragmentation.

Conclusions : These results indicate that the increase of apoptotic cell death by *Ailanthus altissima* may be due to the inhibition of cell cycle in human Jurkat lymphocytes. Conclusively, these current and further findings will provide novel approaches to understanding and treating major diseases.

Key words : *Ailanthus altissima*. Apoptotic Cell Death, Human Jurkat Lymphocytes.

I. 緒論

樗根白皮는 苦木科(소태나무과; Simarubaceae)에 속한 낙엽교목인 가중나무 (혹은 가죽나무, *Ailanthus altissima* Swingle) 및 동속 근연식물의 根 및 樹幹의 內皮를 건조한 것으로, 다른 藥名으로는 大眼桐, 椿根皮, 小白皮, 臭椿根皮, 樗白皮, 虎目樹, 樗皮, 鬼目 등으로 불리우며,^{1~3,5~12,17)} 중국원산으로 우리나라에 들어와 전국 각지의 해발 100-400 m 지역 촌락부근에 자생하고 있는 귀화식물이다.¹⁸⁾ 본 약재의 性味는 寒·苦·澁 無毒하고, 胃·大腸·肝經에 귀경하며, 淸熱燥濕, 澁腸止瀉, 止帶, 止血, 利尿, 殺蛔蟲 등의 효능이 있어 이질과 변혈, 胃炎, 帶下症, 痔疾, 産後血不止, 崩漏, 遺精, 白濁, 枯草熱, 설사를 멈추게 하는 지사제, 살충제 등을 치료하는데 사용되고 있다.^{1~3, 5~12, 18)} 또한 저근백피에는 merosin, tannin, phlobaphene, ailanthone, amarolide, acetylamarolide, quassin, nigakihemiacetal B(neoquassin) 등의 성분이 함유되어 있으며,^{6~8, 11, 12, 10)} 현대 약리 작용에서는 수렴, 항균, 소염, 항원충, 항종류 등의 약리 작용이 있으므로 급성 세균성이질, 위십이지장궤양, 급성습진, 아메바원충, 人體의 鼻咽癌, 子宮頸癌, 肝癌, 腸癌, 淋巴細胞白血病, 小鼠白血病 등을 치료하는데 응용되고 있다.^{5, 7, 8, 11, 12)}

이에 저근백피의 항암작용에 대한 문헌을 근거로 저근백피 물추출물로 급성 림프성 백혈병 세포주인 Jurkat 세포와 급성 골수성 백혈병 세포주인 U937 세포에 대한 항암활성을 조사하였다. 또한 항암 작용이 수동적이고 물리적인 괴사에 의한 것인지, 능동적이고 자발적인 apoptosis에 의한 것인지를 밝히기 위하여 먼저 DNA 분절 현상을 통하여 세포고사를 확인하고 그 기전 연구를 위하여 caspase-3의 기질 단백질인 poly ADP-ribose polymerase (PARP)와 beta-catenin의 변화 및 신호 전달 기전을 구명하고자 p53 관련 유전자와 세포주기 즉 G1 checkpoint와 관

련된 유전자들의 변화를 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 한약재의 효능 검색

백혈병 세포주의 세포사멸을 유도하는 한약재를 검색하기 위하여 Jurkat와 U937 세포를 24 well plates에서 배양하였다. 각각의 한약재를 200 µg/ml 농도로 처리한 후 24시간과 48시간 동안 세포를 배양하였다. 그 후 광학현미경을 통하여 세포들의 형태적 변화를 먼저 관찰하고, trypan blue 용액을 이용하여 혈구계산기로 세포 수를 계산하였다. Jurkat 세포의 경우 한약재 처리 후 24시간 이내에 대조군에 비해 50 % 이상의 세포사멸을 일으키는 한약재를 우선적으로 조사하였고, 세포사멸에 효과를 나타내는 약재 중의 하나인 저근백피를 재료로 이용하여 본 실험을 실시하였다.

2. 시료의 제조

저근백피 200 g을 등근 플라스크에 넣고 증류수 2,000 ml를 넣은 후 3시간 동안 가열, 추출하고 침전물을 3 M 여과지를 이용하여 3회 여과하였다. 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압, 농축하였다. 농축된 용액을 -70 °C deep freezer에서 12시간 동안 방치하고, 30시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 약 10 %의 수율인 20.3 g의 분말을 얻었다.

3. Cell Culture

사람 T 세포성 유래의 급성 림프성 백혈병 세포주인 Jurkat은 미국 세포주 은행인 ATCC (The American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아, 실험실에서 37 °C와 5 % CO₂ 공급 조건을 갖춘 배양기(Sanyo. co.)에서 배양하였다. 부유성 세포인 Jurkat의 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI

* Corresponding author : Young Gab Yun. School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, Republic of Korea.

Tel : +82-63-850-6834, Fax : +82-63-850-6666, E-mail : yunyg@wku.ac.kr

• Received : Aug 17, 2017 / Revised : Aug 24, Aug 29, 2017 / Accepted : Aug 30, 2017

1640 배지에 56 °C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10 % 포함하고, 1 % 항생제 (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)와 NaHCO₃ 2 g을 첨가하여 제조하였다.

4. Cell Death Induction

세포들은 plastic culture dishes에서 사육되었고, 4 x 10⁵/ml 정도의 세포수를 가진 배양 배지에 저근백피 추출물을 투여하였다. Jurkat 세포들은 여러 가지 농도 (20, 40, 60, 80, 100 µg/ml)의 추출물로 24시간 동안 처리되었다. 저근백피 분말은 4 °C에 저장되었고, 사용 직전에 실험에 필요한 농도로 사용배지에 희석하여 사용하였다. 세포고사의 유무는 아래에 기재된 세포성장률의 비교, 세포핵 형태의 변화, PARP 및 beta-catenin 단백질들의 가수분해 패턴을 비교하여 결정하였다.

5. Antibodies

Monoclonal anti-PARP 항체는 Calbiochem (San Diego, CA, USA) 회사로부터 구입하였고, polyclonal anti-cdk4, polyclonal anti-CPP32, polyclonal anti-Rb, polyclonal anti-Bcl-2, monoclonal anti-Bax, monoclonal anti-E2F1, monoclonal anti-cyclin D1 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였고, monoclonal anti-p21 항체는 PharMingen 회사로부터 구입하였고 monoclonal anti-beta-catenin 항체는 Transduction Laboratories (Lexington, KY) 회사로부터 구입하였다. Peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin과 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Life Sciences (Cleveland, OH, USA) 회사로부터 구입하였다.

6. Cell Viability

세포증식에 대한 저근백피의 영향을 알아보기 위하여 세포를 24-well plate에 배양한 후 저근백피의 추출물을 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml 농도로 24시간 동안 처리하였다. 세포를 1.5 ml tube에 모았으며, 동일 용량의 trypan blue 용액을 tube에 첨가한 후 부드럽게 섞고, 2분 후 살아있는 세포의 숫자를 혈구 측정기를 이용하여 계산하였다.

MTT assay는 생존 암세포의 효소활성을 측정하는

것으로 세포를 96-well plate에 배양한 후 저근백피 추출물을 세포수 측정시와 동일한 조건으로 처리하였다. 그 후 각 well에 5 mg/ml 농도로 제조된 MTT 용액 20 µl를 첨가하고 3시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 well 당 0.1 % isopropanol 15 µl를 첨가하여 30분간 배양 후 570 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 3회의 서로 다른 실험 결과를 종합하여 평균값과 표준편차값을 Figure로 나타내었다.

7. Western Blot Analysis

실험에 이용된 세포를 15 ml tube에 모은 후 냉장 보관하였던 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2~3회 세척한 후 2,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 cell pellet에 EBC lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM sodium chloride, 0.5 % Nonidet P-40)를 넣고, 20분간 얼음 위에 놓아두면서 5분마다 vortexing 하였다. Lysates는 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였고, 상등액은 실험을 위하여 다른 tube에 옮겼다. 단백질 농도는 Bradford 측정법(Bio-Rad)에 의하여 이루어졌고, 표준 단백질로 bovin serum albumin (BSA)을 이용하였다. 각 실험군마다 동일 양의 단백질이 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel 전기영동 장치를 이용하여 분리되었으며, 젤상에 있는 모든 단백질은 nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Co.)으로 옮겨졌다. Membrane들은 0.5 % Tween-20을 포함한 Tris-NaCl-Tween 20 (TNT) buffer를 이용하여 만들어진 5 % nonfat milk 용액에 넣어 전처리하였다. PARP, beta-catenin, Bcl-2, cyclin D1, Cpp32, Rb, cdk4, E2F1, p21과 Bax 일차 항체들을 nonfat milk 용액에 1 µg/ml 농도로 만든 후 1시간 동안 실온에서 membrane을 반응시켰다. 반응 후 Membrane들은 TNT buffer로 10분 동안 3회씩 세척하였고, 이차 항체로 다시 1시간 동안 실온에서 membrane을 반응시켰다. Membrane들은 TNT buffer로 다시 세척한 후 enhanced chemiluminescence reagent (Amersham)을 이용하여 2분간 반응시킨 후 필름을 이용하여 그 강도를 확인하였다.

8. DNA Fragmentation

세포를 PBS 용액으로 세척한 후 원심분리기를 이

용하여 순수 세포만을 모았다. DNAzol reagent 1 ml를 넣고 pipetting하여 세포 pellet을 분쇄하였다. 그 후 10,000 g, 4 °C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 다른 tube에 옮기고 pellet은 버렸다. Lysates에 100 % 에탄올 0.5 ml를 첨가하고, 여러 번 흔들어 DNA를 침전시켰다. 3분 후 DNA pellet만 남기고 상등액을 제거한 후 DNA precipitate를 95 % 에탄올 1 ml에 두 번 세척하고 5 - 15분 정도 실온에서 air dry시켰다. DNA를 Tris-EDTA buffer를 이용하여 녹인 후 분광 광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm의 optical density (OD)값을 측정하여 DNA를 정량하였다. 10 µg의 DNA 표본들을 10 µg/ml 농도의 ethidium bromide를 포함한 1.0 % agarose gel로 2 시간 정도 전기영동 시켰으며, ultraviolet light에서 DNA 절편들을 관찰하였다.

III. 결과

1. 저근백피 추출물에 의한 Jurkat의 세포사멸 유도

급성 림프성 백혈병 세포주인 Jurkat의 세포사멸에 대한 저근백피 추출물의 효과를 알아보기 위하여 추출액을 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하고 trypan blue 용액을 이용하여 세포생존율 변화를 측정하였다. 그 결과 저근백피는 농도 의존별로 세포생존율을 급격히 감소시키면서 세포사멸을 점점 증가시켰다(Figure 1).

세포증식의 유무를 알아보는 또 다른 실험으로서 MTT assay를 실시하였다. 그 결과 대조군에 비해 20 µg/ml 농도로 처리한 실험군에서 26 %의 세포사멸이 일어났으며, 40, 60, 80 및 100 µg/ml 농도로 처리한 실험군에서도 각각 40, 49, 58 및 66 %의 세포사멸이 나타났다 (Figure 2). 또한 저근백피에 노출된 세포들의 형태적인 특징을 고배율의 현미경 하에서 관찰한 결과, 세포막 융기의 돌출현상을 볼 수 있었다. 이는 저근백피의 추출성분이 Jurkat 세포의 성장을 억제시키면서 세포사멸을 유도하는 것으로 보여진다.

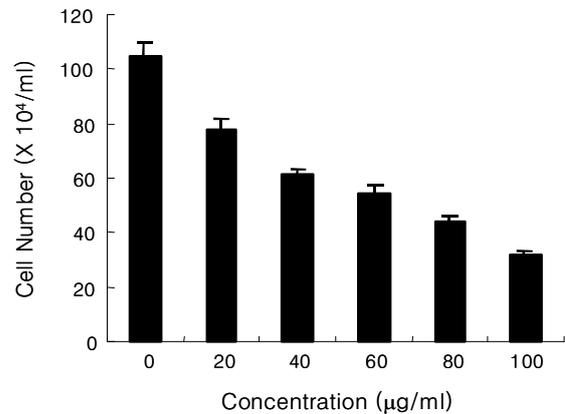


Figure 1. Induction of dose-dependent cell death in Jurkat T cells by the extract of *A. altissima*. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Cells were harvested and resuspended in PBS. Same volume of trypan blue was then added and gently mixed. After 2 min, cells were counted using hemacytometer. The results are expressed as a total cell number and data are means ± SD of three experiments performed in triplicate.

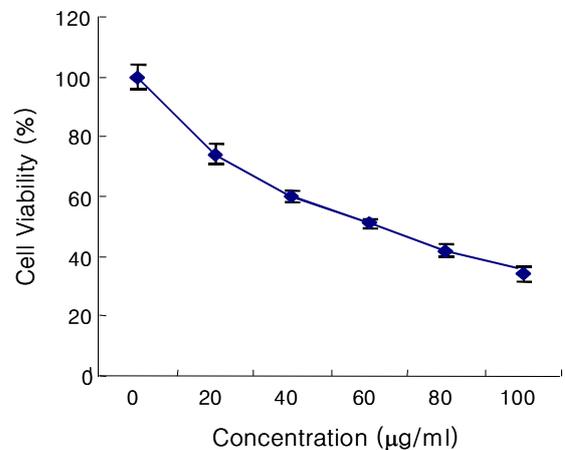


Figure 2. Induction of dose-dependent cell death in Jurkat T cells by the extract of *A. altissima*. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Cell viability by MTT assay was measured as described in Materials and Methods. Results were expressed as the means S.D. of three experiments and presented as a percentage of control values.

2. 저근백피로 세포고사(apoptosis)를 유도한 Jurkat 세포에서 Caspase-3 (CPP32) 활성화도

최근 연구결과에 의하면 세포고사를 유도하는 대부분의 약물들이 cystein 분해효소인 caspase family의 순차적인 신호전달과 활성을 통하여 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{20,21)} 지금까지 밝혀진 사람의 caspase 종류 중에서 특히, caspase-3는 효소학적으로 세포고사를 일으키는데 결정적인 역할을 수행하고 있다. 그러므로, 다양한 농도의 저근백피에 24시간 동안 노출되어 세포사멸이 일어난 Jurkat 세포의 경우에도 caspase-3의 활성화도가 변하는지를 조사하였다. 그 결과 저근백피에 의해 세포사멸이 진행되는 Jurkat T세포에서도 caspase-3의 불활성화된 형태의 32 kDa 크기가 점점 분열되어 그 발현양이 적어졌다(Figure 3). 이는 저근백피에 의한 Jurkat 세포사멸이 caspase family의 신호기전과 관련이 있음을 보여준다.

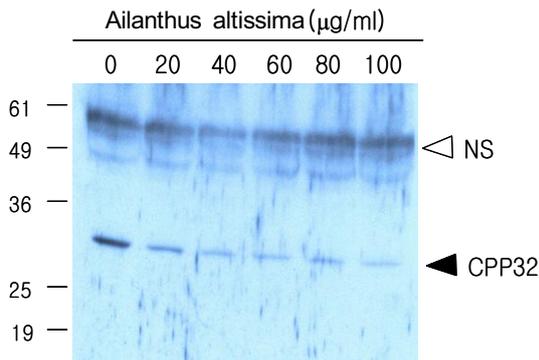


Figure 3. Induction of CPP32 activation during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on 12.5 % SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes, and the blots were probed for CPP32(NS, non-specific band),

3. 저근백피로 유도한 세포고사에서 PARP 및 beta-catenin의 분해양상 조사

많은 종류의 세포성 단백질들이 세포고사가 진행되는 동안 caspase들에 의해 분해되어지는 현상이 일어남을 보여주고 있으며, caspase-3 효소의 특정 기로

알려진 것은 PARP를 비롯하여 Rb, beta-catenin, actin, lamin, fodrin, PKA, presenilin 등 매우 다양하다.^{15,22)} 본 연구에서는 caspase-3의 주요 기질로 알려진 핵 단백질인 PARP와 세포질 및 핵 단백질인 beta-catenin들의 분해 양상을 대표적으로 조사하였다. Jurkat 세포 배양배지에 저근백피를 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml 농도로 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 20 µg/ml 농도에서 116 kDa의 완전한 PARP 단백질 양이 줄어들기 시작하여 40 µg/ml 농도에서는 PARP가 분해되어 나타난 큰 조각의 85 kDa 크기가 검출되었다(Figure 4). 이러한 현상은 저근백피의 처리 농도가 높을수록 그 정도가 증가함을 알 수 있었다. 또한 beta-catenin의 경우에도, 20 µg/ml 농도에서 완전한 크기의 92 kDa 단백질 양이 현저히 줄어들면서 분해됨을 알 수 있었다(Figure 5). 이러한 관점에서 볼 때 저근백피 처리에 의한 Jurkat의 세포고사에서 PARP 및 beta-catenin 단백질들의 분해현상은 caspase-3 활성화의 가장 주요한 증거 중의 하나이며, caspase 관련 신호기전에 의해 세포고사의 현상이 일어남을 보여준다.

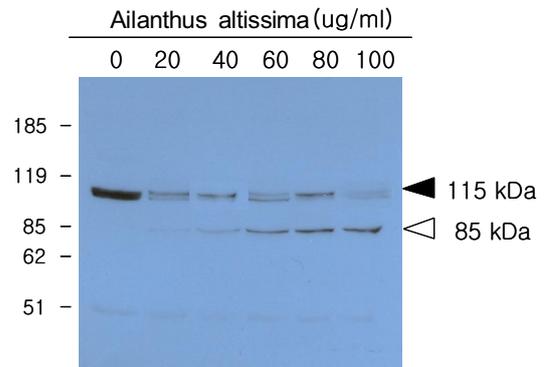


Figure 4. Induction of PARP cleavage during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 7.5 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for PARP. PARP 116 kDa and 85 kDa bands (closed and open triangles, respectively) are shown.

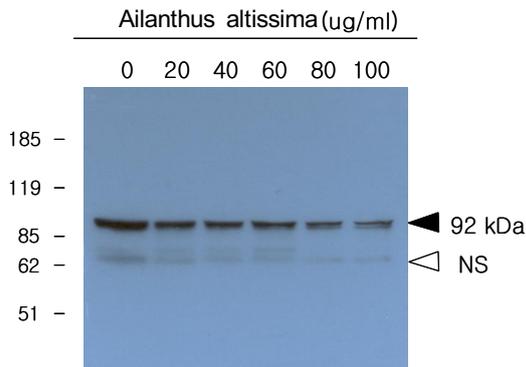


Figure 5. Induction of beta-catenin cleavage during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 7.5 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for beta-catenin. (NS, non-specific band).

4. 저근백피로 유도한 세포고사에서 DNA의 단편화 조사

저근백피에 노출된 Jurkat의 세포사멸이 수동적이고 물리적인 사멸의 necrosis인지, 또는 능동적이고 자발적인 사멸의 apoptosis인지를 확인하기 위하여 Figure 1과 같이 동일한 조건으로 처리하고, 그 표본들을 이용하여 DNA fragmentation 실험을 실시하였다(Figure 6). 정상세포와 세포사멸이 유도된 세포들로부터 total DNA를 추출하여 1 % agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 그 결과 저근백피 추출액을 20 µg/ml 농도로 처리한 실험군에서 고분자량의 DNA (50-300 kb)와 oligonucleosomal 크기의 DNA 분절(180 bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상을 볼 수 있었다(Figure 6). DNA 분절의 정도는 투여된 저근백피의 농도가 높을수록 점차 증가함을 알 수 있었다 (Figure 6). 이러한 현상은 caspase-3에 의해 분해가 일어나는 PARP 및 beta-catenin의 실험결과와 매우 잘 일치함을 보여주었다. 아울러 본 연구의 DNA 분절 양상은 기존의 연구보고²³⁾에 의해 밝혀진 결과처럼, 세포고사가 진행되는 세포에서 internucleosomal DNA cleavage가 초래되어 나타나는 DNA 크기와 일치함을 보여주므로 저근백피에 의

한 Jurkat의 세포사멸은 programmed cell death임을 보여준다.

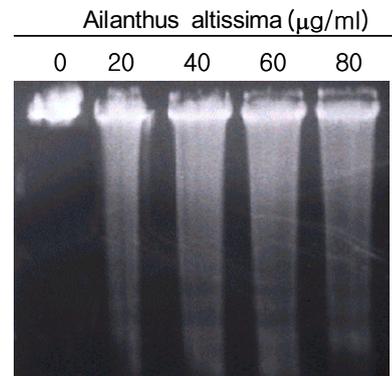


Figure 6. Induction of apoptotic DNA fragmentation by the extract of *A. altissima* in Jurkat T cells. Genomic DNA was extracted from control and treated samples. Ten micrograms of DNA samples were separated on a 1.0 % agarose gel containing 10 µg/ml ethidium bromide for 2 h and visualized under ultraviolet light.

5. 저근백피로 유도한 세포고사에서 p21(Waf1) 단백질의 상관성 조사

p21은 PCNA와 결합하여 DNA 복제를 억제하고, cyclin-cdk 복합체에 결합하여 이들 복합체의 활동을 억제함으로써 세포주기를 정지시키거나 진행을 방해하여 결국에는 세포의 사멸을 초래한다.²⁴⁾ 이러한 기능을 가진 p21 단백질은 암 억제 유전자인 p53에 의해 전사적으로 상승 조절되어 G1기에 발현양이 증가하기도 하며, 다른 여러 가지 신호에 의해서도 발현양이 증가하기도 한다. 본 실험에서는 저근백피에 의해 유도되는 Jurkat 세포고사가 p21의 신호기전과 관련이 있는지를 알아보려고 하였다. 저근백피 추출물을 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml 농도로 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. 그 후 p21의 단백질 발현양을 확인하기 위하여 Western blot analysis를 실시한 결과 처리 농도가 높을수록 그 발현양이 증가하다가 100 µg/ml 농도에서는 그 증가폭이 감소되기 시작하였다 (Figure 7). 이는 저근백피에 노출된 Jurkat 세포고사는 최소한 p21의 신호기전과 연관되어 있음을 보여준다.

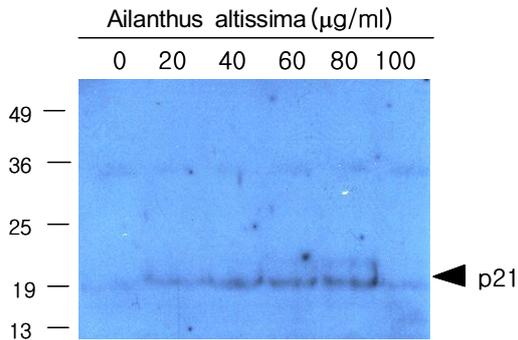


Figure 7. Induction of p21 expression level during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for p21.

6. 저근백피로 유도된 세포고사에서 Bcl-2 및 Bax 단백질과의 상관성 조사

Bcl-2는 다양한 자극으로 유발되는 세포사멸을 억제시키는 유전자로 알려져 있으며, Bax는 IL-3 의존성 세포에서 cytokine 결핍에 의해 유도되는 세포사멸을 촉진시키므로 Bcl-2 유전자와는 상반되는 역할을 한다.³⁹⁾ 그러므로, 세포고사가 일어나는 세포에는 일반적으로 Bcl-2 단백질 양이 감소하고, Bax 단백질 양이 증가하는 것으로 관찰된다. 이러한 신호기전은 세포고사가 진행되는 세포들에서 p53 단백질 발현량이 증가하며, 증가된 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고, Bax의 단백질 발현량을 증가시키는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 본 실험은 wild type-p53가 결핍된 Jurkat 세포들이 저근백피에 노출되어 세포고사를 일으킬 때 Bcl-2 및 Bax들의 관련성이 있는지를 알아보려고 하였다. 다양한 농도로 저근백피를 처리하여 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 Bcl-2 및 Bax의 단백질 발현정도를 Western blot으로 조사하였다. 그 결과 대조군의 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현정도와 비교해 볼 때 저근백피를 처리한 실험군들에서 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현정도에 차이점을 발견할 수 없었다(Figure 8, 9). 이는 Jurkat 세포에는 p53가 결핍되어 있기 때문에 세포고사가 일어

나더라도 Bcl-2 및 Bax 유전자를 조절할 수 없었음을 보여준다. 최소한 저근백피로 유도되는 Jurkat 세포 사멸에서는 이 두 유전자와의 관련성은 없는 것으로 판단된다.

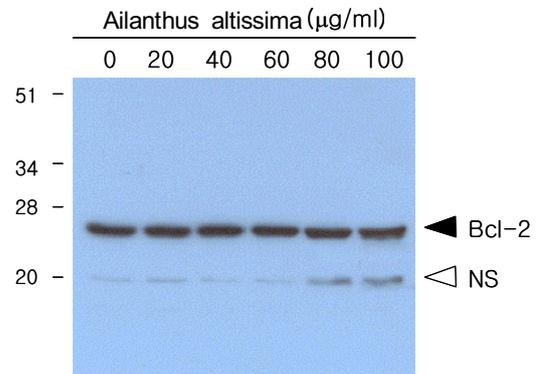


Figure 8. Expression level of Bcl-2 protein during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for Bcl-2. (NS, non-specific band).

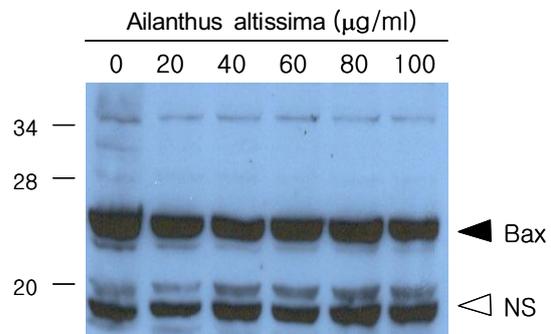


Figure 9. Expression level of Bax protein during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for Bax. (NS, non-specific band).

7. 저근백피로 유도된 세포고사에서 Cyclin D1 및 cdk4 단백질의 관련성 조사

저근백피 추출물이 Jurkat 세포의 세포주기 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 추출물을 20, 40, 60, 80 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. 진행세포의 증식은 G1기에서 S기 또는 G2기에서 M기와 같이 세포주기의 특정 전이단계에서 조절되어진다. 그런데 Cyclin D1은 cdk4 또는 cdk6와 결합하여 세포주기 중에서도 G1 checkpoint 단계에서 S기로 전이되는데 중요한 역할을 하므로 이들 단백질 발현양을 알아보기 위하여 Western blot analysis를 시행하였다. 그 결과 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리 하였을 때는, 대조군에 비교하여 차이점이 적었으나, 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 처리하였을 때는, 대조군에 비해 현저한 차이를 보이면서 cyclin D1의 발현양은 저근백피의 처리 농도에 의존하여 점점 감소되는 현상을 나타내었다 (Figure 10). Cdk 단백질들은 cyclin들과 협력하여 세포주기 진행의 각 단계에 관련된 주요 기질을 인산화시키는 작용을 한다.²⁶⁾ 특히 cdk4는 D-type cyclin들과 복합체를 형성하여 세포주기의 G1 동안에 세포성장을 조절한다(Figure 11).²⁷⁾ 저근백피 처리 후 Jurkat 세포에서 Cdk4의 단백질 양상을 조사해 본 결과 처리 농도가 높을수록 단백질 발현양은 감소하는 것을 보여 주었다(Figure 12). 이러한 결과는 저근백피의 추출물이 Jurkat 세포의 세포고사를 촉진시키는 작용이 cyclin D1과 cdk4 단백질을 발현을 억제시킴으로써 이루어진다는 것을 의미한다.

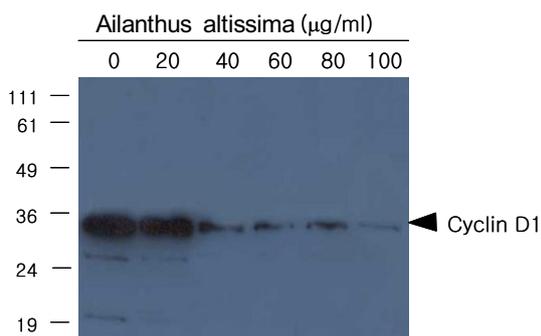


Figure 10. Decrease of cyclin D1 protein level during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of the extract.

Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for cyclin D1.

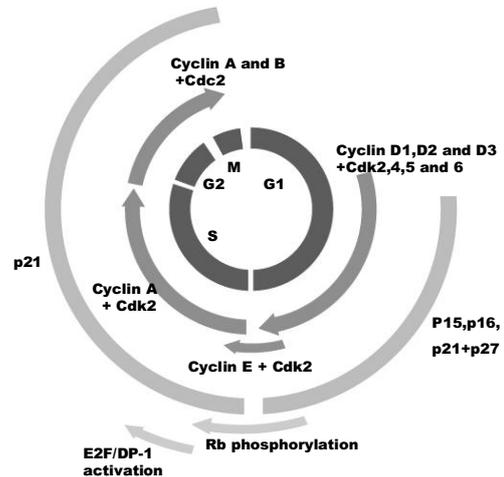


Figure 11. Schematic view showing the four phases of the cell cycle and some of the many molecules important for progression.

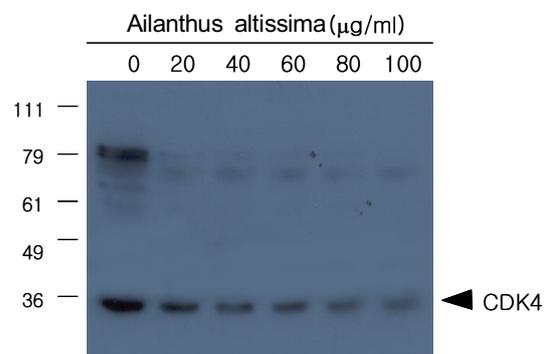


Figure 12. Decrease of cdk4 protein level during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for cdk4.

8. 저근백피로 세포고사(apoptosis)를 유도한 Jurkat 세포에서 pRB 및 E2F1 단백질 발현 조사

세포주기 진행에 있어 cyclin-cdk가 복합체를 이루어 활성화되면 pRB 단백질을 인산화시키게 된다. pRB 단백질은 초기 G1기에서 전사인자인 E2F1과 결합하고 있다가 cyclin-cdk 복합체에 의해 인산화되면 E2F1을 유리시킨다. 유리된 E2F1은 S기에서 DNA 복제에 필요한 여러 유전자들을 합성하면서 세포주기를 진행시킨다(Figure 11, 13). 이처럼 세포주기 조절에 중요한 역할을 수행하는 또 다른 유전자의 변화를 살펴보기 위하여 저근백피 추출물의 농도를 20, 40, 60, 80 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시키면서 Jurkat 세포 배양배지에 24시간 동안 처리하

였다. 실험 결과 pRB 단백질은 대조군에 비해 발현양이 감소하였으며 pRB의 상태도 인산화된 상태에서 점점 탈인산화가 유도되는 현상을 나타내었다(Figure 14). 이러한 결과는 저근백피의 처리 농도가 높을수록 점점 증가하는 것으로 보여진다. 마찬가지로 전사인자인 E2F1의 단백질 발현양도 저근백피의 농도가 높을수록 점점 감소하는 현상이 나타났다(Figure 15). 이는 pRB 단백질이 가수분해 효소에 의해 분해 정도가 심하여지고 탈인산화된 RB 단백질들이 전사인자인 E2F1을 유리시키지 못하기 때문에 DNA합성에 관여하는 유전자들의 발현이 억제되어 결국에는 세포고사가 진행됨을 알 수 있다.

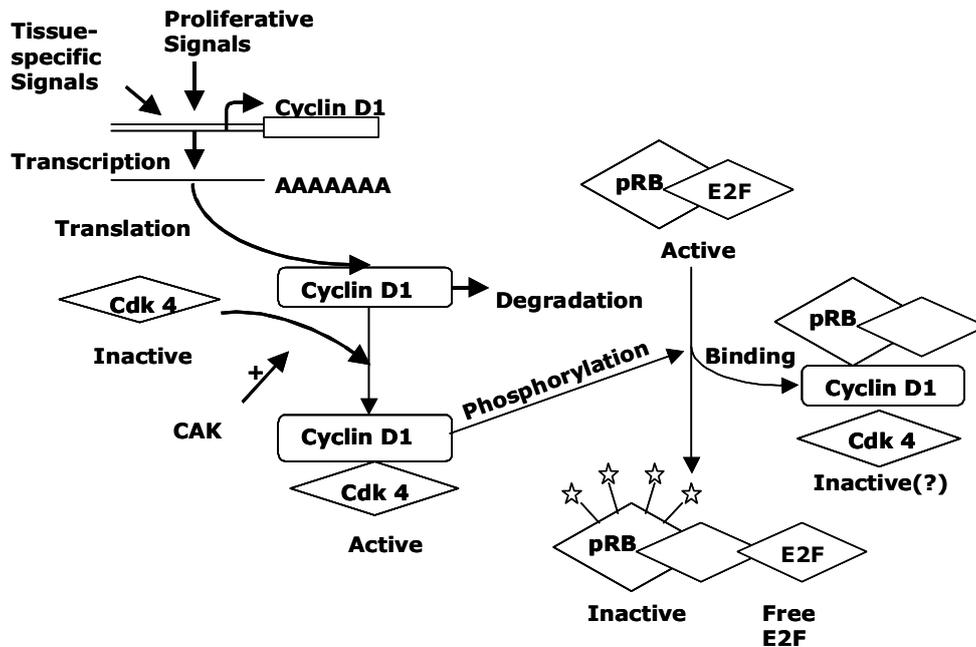


Figure 13. Regulation of cyclin D1 expression and activity.

IV. 고찰

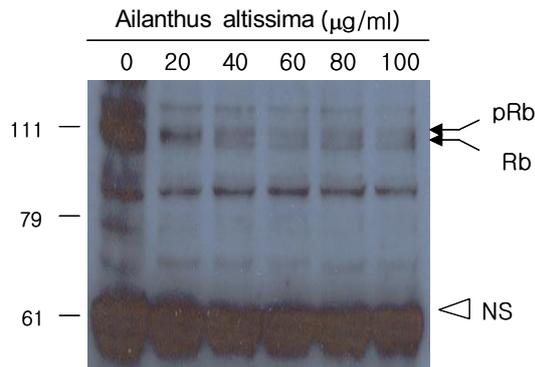


Figure 14. Decrease of pRb protein level during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for Rb.

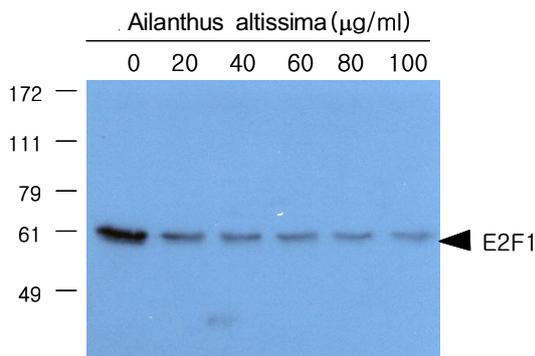


Figure 15. Decrease of E2F1 protein level during apoptosis induced by *A. altissima* in Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11 % SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for E2F1

종양이란 세포 자체가 어떠한 기작에 의하여 비정상적인 세포로 변화된 다음, 다른 조직으로 전이되는 일종의 조직의 過乘的 성장을 말하며, 한의학에서는 체내에서 발현되는 質이 堅硬하며 암석과 같은 종괴 등을 암이라고 한다.²⁸⁾ 암은 오늘날 인류를 위협하는 주요 난치성 질환의 하나로 암의 발생원인에 대하여 서양의학에서는 내적인자로서의 유전, 인종과 지리학적 요인, 연령, 면역학적 요인에 의하여, 외적인자로서 화학적 발암인자와 자외선조사, 석면, 방사선 등과 같은 물리적 발암인자와 바이러스성 발암인자 등으로 유전자가 손상을 받아 돌연변이 되어 발생하는 것으로 보고 있다.²⁹⁾ 혈액암인 백혈병(leukemia)은 백혈구(white blood cells)를 생산하는 조직인 골수 또는 림프관내계에서 발생한 암세포 즉, 백혈병세포가 비정상적으로 증식하여 모든 장기에 침윤하면서 다식 증식하여 일어나는 것으로 알려져 있다. 성인의 백혈병은 전체 암 중 약 10 %를 차지하고 있으며, 급만성 림프구성 백혈병(ALL, CLL)과 급만성 골수성 백혈병(AML, CML)으로 나뉘어진다.^{4, 38)} 백혈병세포들은 조혈계를 침범하여 정상적인 혈구형성을 파괴하므로 백혈병 환자들은 호중구 감소증, 혈소판 감소증, 빈혈에 의한 감염, 출혈, 피로 등이 발생한다. 1998년 보건복지부 통계 자료에 의하면 백혈병은 인구 10,000명당 남성 4명, 여성 3명 정도로 추정되며 그 발생 빈도가 점차 높아지고 있으므로 백혈병에 대한 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것이다. 백혈병은 한의학에서 熱勞, 急勞, 血證, 溫病, 骨蒸, 癥結, 痰核 등의 범주에 속하며 그 주요한 病因病機를 살펴보면 內因으로는 勞倦, 饑飽, 房欲, 七情所傷, 外因으로는 溫熱毒邪侵襲으로 熱毒이 蘊結되고, 營分이 傷하여 血이 動함으로서 발생한다고 파악하고 있다.^{4,35)} 급성 림프구성 백혈병은 소아의 경우 보통 4-5세에 발생하며 일반적인 징후로는 골수 침윤 때문에 일어나는 빈혈, 혈소판 감소증, 감염 그리고 특히 장골에서 발생하는 골통(bone pain) 등이다. 성인의 경우 임상적 특징은 종격종괴(mediastinal mass)를 지닌 환자가 많은 비율을 차지한다는 것을 제외하고는 소아와 유사하다.³⁸⁾ 현재 암의 치료법은 분자생물학 등의 학문발전과 더불어 더욱 발전되면서 많은 치료효과를 거두고 있지만, 정상세포에도 독성을 나타내어



다양한 부작용을 초래하는 단점이 있고, 약물에 대한 내성이 증가되고 있는 실정이기 때문에 새로운 방식의 항암제 개발이 요구되고 있다.^{30,34)} 따라서 면역기능을 높여주고 암세포에만 선택적으로 작용하는 천연 항암제를 생약제로부터 개발하려는 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 천연 자생식물 및 약용식물을 이용하여 항암 효능을 가진 식물을 분류하고 그 식물의 생리활성 물질을 검색하는 기술을 개발하고 연구하던 과정에서 소태나무과에 속하는 낙엽교목인 가중나무(가죽나무)의 수피를 건조한 저근백피¹⁸⁾가 급성 림프성 백혈병 세포주인 Jurkat에 대한 항암효능이 관찰되어 이에 대한 기전을 연구하였다.

Jurkat 세포의 배양매지에 저근백피 추출물을 Figure 1과 같이 농도별로 처리한 후 Trypan blue 용액으로 세포생존율 변화를 측정하고, MTT assay를 통하여 세포 증식율을 Figure 2에서 비교하였다. 그 결과 Jurkat 세포의 사망률이 저근백피의 농도에 의존하여 점점 증가하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 66 %의 생존율을 보여 주었다. 또한 저근백피에 노출된 세포들의 외부 형태적인 특징을 현미경 하에서 관찰한 결과 세포막이 파괴되어 작은 소체를 이루는 것을 배지 속에서 볼 수 있었다. 이러한 결과는 저근백피의 추출물을 이루는 구성성분이 Jurkat T lymphocytes의 성장을 억제하고 세포독성을 일으켜 세포사멸을 유도하는 효과가 있음을 보여준다. 아울러 세포사멸의 원인이 necrosis인지 apoptosis에 의한 것인지를 규명하고 apoptosis에 의한 세포사멸일 경우 그 신호기전을 규명할 필요가 있으며 이러한 신호기전의 규명은 저근백피를 백혈병 치료를 위한 한약제의 성분으로 이용할 경우 그 과학적인 근거를 제시하게 될 것이다.

먼저 저근백피에 노출된 백혈병 세포주인 Jurkat의 세포사멸이 necrosis가 아니고 생리적 사멸인 apoptosis와 관련되어 있을 가능성을 증명하기 위하여 Figure 1과 동일한 조건하에서 처리된 표본들을 이용하여 여러 가지 실험을 실시하였다. 세포독성을 유발하여 세포사멸을 일으키는 자극물질들은 세포 내에서 수많은 단백질들 간의 상호작용인 정밀한 신호기전을 통하여 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 그 증거 중 하나는 단백질 분해기능을 가지면서 세포사멸의 신호를 실행하는 caspase family 효소들이 활성화되어 세포사멸을 유도한다고 보고되어 있다.^{20,21)} 또한

caspases-3라는 효소는 비활성화된 zymogen 상태로 존재하다가 세포사멸의 신호를 받아 활성화된 여러 subunit으로 분해되는 것으로 알려져 있는데 활성화된 caspase-3는 세포내의 생존신호에 관련된 단백질을 분해하여 불활성화 시키고, 세포골격 단백질을 절단하여 구조적인 변화를 유발하여 세포사멸을 실행한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 저근백피를 투여한 후의 caspases-3의 불활성화된 형태가 발현양이 줄어들었다(Figure 3). 한편 많은 종류의 세포성 단백질들이 세포고사가 진행되는 동안 caspase-3에 의해 쪼개짐 현상이 일어남을 보여주고 있지만, 본 연구에서는 핵 속에 존재하는 PARP와 핵과 세포질에 존재하는 beta-catenin을 대상으로 Jurkat 세포 배양매지에 저근백피를 농도별로 처리하고 분해 패턴을 조사하였다. 그 결과 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 116 kDa의 완전한 PARP 단백질이 85 kDa 크기로 분해되는 양상이 유도되었으며, 처리 농도가 높을수록 PARP 분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Figure 4). 이러한 실험 결과는 beta-catenin이 분해되어지는 양상과 일치하였다(Figure 5). 저근백피에 의해 유도된 세포고사의 경우 위의 2종류를 제외한 다른 기질 단백질들도 어떤 결과를 나타낼지는 계속 연구해야 될 것으로 생각한다. 저근백피 처리에 의한 PARP 및 beta-catenin 단백질들의 분해 현상은 caspase-3 활성화의 가장 주요한 증거 중의 하나이며 이를 통하여 apoptosis를 통한 세포사멸의 현상이 일어남을 보여주었다.

Apoptosis에서 일어나는 생화학적인 변화는 chromatin의 고차구조가 변환된 후 chromatin DNA가 몇 종류의 endonuclease에 의해 100-200 bp 크기로 절단되어 버리는 소위 DNA 단편화 현상이 나타난다. 그러므로 세포에서 분절된 DNA가 검출되거나 intact DNA의 함량이 줄어드는 현상이 나타나면 그 세포에서 apoptosis가 진행되는 것으로 최근 보고되고 있다.^{31, 32)} 그러므로 본 연구에서는 정상세포와 세포사멸이 유도된 세포들로부터 total DNA를 추출하여 agarose gel에 전기영동을 실시하였다. DNA fragmentation 실험을 실시한 결과 대조군에 비해 저근백피를 처리한 실험군에서 oligonucleosomal 크기의 DNA 분절(180 bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Figure 6). 세포의 종류에 따라서 DNA ladder 현상이 선명한 것도 있고 그렇지 못한 것도 있으며, ladder 자체가 나오지 않는 세포

종류가 있다는 사실에 비추어 볼 때, 얻어진 DNA ladder 결과는 백혈병 세포주인 Jurkat이 저근백피에 노출되어 일어나는 세포사멸은 물리적인 necrosis가 아니고 생리적인 apoptosis에 의한 세포사멸인 것을 보여주는 또 다른 예이다.

Apoptosis가 진행되는 세포는 수많은 신호기전의 경로를 통하여 결국 DNA의 손상에 이르게 되고, 수선할 수 없을 정도로 손상이 많이 일어난 세포는 세포사멸이라는 순서를 거치게 된다. 세포사멸 과정에서 p53와 관련된 유전자들 즉 p21, Bcl-2 및 Bax 등의 발현이 직간접적으로 apoptosis와 밀접히 관련된 유전자로 잘 알려져 있다. 암 억제 유전자인 p53의 일반적인 기능은 세포가 손상을 입으면 G1 또는 G2 checkpoint에서 세포주기를 정지시키는데 이것은 p53의 축적에 의한 p21 단백질의 증가를 유도함으로써 이러한 기능을 수행한다. p21은 세포주기의 G1기 또는 G2기에서 RB 단백질을 불활성화시키기 위하여 cyclin dependent kinase의 기능을 억제시키는 작용을 한다. 이러한 cell cycle arrest와 직접 관련이 있는 p21은 p53-dependent pathway 또는 p53-independent pathway 2가지 경로로부터 유도될 수 있다. 본 연구에서는 저근백피의 처리 후 p21 단백질 발현이 농도에 의존적으로 점점 증가하는 현상을 보여 주었다 (Figure 7). 즉 저근백피에 노출된 Jurkat 세포는 어떤 신호기전의 경로에 의해 p21이 증가하여 cdk에 결합함으로써 세포주기를 정상적으로 진행시키지 못하기 때문에 결국 세포사멸을 초래하게 되었고, Jurkat 세포는 p53가 결핍되어 있으므로 p21의 증가는 p53-independent pathway에 의한 것임을 알 수 있었다. 앞서 언급하였듯이 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고, Bax의 단백질 발현량을 증가시킴으로써 apoptosis에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있으나¹⁶⁾ 본 실험에서는 저근백피에 노출된 Jurkat cell이 세포고사가 진행됨에도 불구하고 Bcl-2 및 Bax 단백질들의 발현이 대조군에 비해 전혀 차이가 없었다(Figure 8, 9). 이 현상은 백혈병 세포주인 Jurkat cell이 wt p53가 결핍되어 있기 때문에 저근백피 처리 후 apoptosis가 진행되는 동안에도 Bcl-2와 Bax를 직접적으로 조절하지 못한 것으로 사료된다. 결국 저근백피에 의해 초래되는 Jurkat 세포의 생리적 사멸은 p53와 무관한 다른 신호기전의 경로를 통하여 일어남을 의미하고 p21은 관

련성이 있으나 Bcl-2와 Bax는 관련성이 없음을 알 수 있었다.

세포증식 촉진인자인 mitogen들의 최종 표적 중의 하나가 cyclin D이며 cyclin E도 관여할 것으로 보인다.³⁶⁾ Mitogen들에 의해 cyclin D의 발현이 촉진되어 일정량에 이르면 cyclin D는 cdk4 혹은 6와 결합하고, cdk activating kinase가 cdk의 threonine을 인산화시켜서 cdk가 활성을 띠게 된다. Cdk는 pRb를 인산화시켜 불활성화 시킨다. Cyclin E-cdk2 복합체가 활성화됨으로써 cyclin D에 의한 pRb의 인산화를 더욱 가속화시키게 되고 결국은 pRb에 의해 억제되고 있던 E2F1, E1f-1, c-abl 등의 transcription factor들이 활성을 띠어 S기로 이행하게 된다.³³⁾ 이처럼 세포주기의 진행을 이루는 주요 G1 checkpoint 관련 유전자들의 발현 정도를 Western blot analysis를 통하여 살펴보았다. 그 결과 저근백피 처리 후 모든 실험군에서 cyclin D1, cdk4, Rb, E2F1의 단백질 발현이 줄어들었다(Figure 10, 12, 14, 15). 비록 cdk4의 경우는 단백질 발현뿐만 아니라 kinase activity도 조사를 하여 그 활성이 떨어졌는지를 살펴보아야 할 것이지만 관련 유전자들의 기능이 현저히 떨어지는 점으로 비추어 볼 때 G1 checkpoint와 관련된 기능이 올바르게 수행되지 못하여 세포주기가 정지되는 것을 알 수 있다. 즉 저근백피에 노출된 Jurkat 세포는 적어도 세포주기의 G1 checkpoint 관련 유전자의 변화에 의한 세포주기의 정지로 인해 결국 사멸하게 되는 기전을 보여준다.

V. 결론

본 연구는 저근백피의 항암효과와 기전을 파악하기 위하여 저근백피 물추출물을 급성 림프성 백혈병 세포주인 Jurkat 세포의 배양배지에 처리한 후 세포사멸을 유도하는지 조사하였고, 아울러 세포 주기와 관련된 유전자 변화를 조사함으로써 세포사멸의 신호기전을 밝혀 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 저근백피 추출물을 20-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여 시 Jurkat 세포는 농도 의존적으로 세포사멸을 점점 증가시켰다.
2. 저근백피 추출물은 caspase-3의 활성도 및 PARP, beta-catenin의 분해 및 DNA 단편화가 대조군에 비해 농도 의존적으로 증가하였으며, p21의 단백질



발현 또한 대조군에 비해서 점점 증가하였다.

- 저근백피 추출물은 농도에 관계없이 Bcl-2와 Bax의 단백질 발현에 영향을 미치지 않았으며, cyclin D1, Cdk4, pRb, E2F1의 단백질 발현은 대조군에 비해서 농도 의존적으로 감소하였다.

이러한 실험 결과는 저근백피 추출물이 Jurkat 세포에서 세포사멸을 유도하는데 효과적이었음을 보여 주었으며, PARP 및 beta-catenin 단백질 변화 패턴과 DNA를 조사한 결과들은 저근백피에 노출된 Jurkat 세포들이 apoptosis에 의한 세포사멸을 보여주는 좋은 예이다. 그 신호기전으로서는 Bcl-2와 Bax 유전자와는 무관하며, p53 신호 전달기전이 아닌 다른 여러 가지 신호기전에 의해 유도된 p21 단백질의 증가가 세포사멸을 초래하는 것으로 사료된다. 또한 세포주기와 관련된 여러 가지 유전자들의 변화 양상도 나타났으며 특히, G1 checkpoint와 관련된 유전자의 변화는 저근백피에 노출된 Jurkat 세포가 정상적인 세포주기를 진행시키지 못하여 결국에는 세포 사멸이 초래되어지는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2017학년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행됨

References

- Oriental medicine dictionary editing committee. Supplemental Oriental medicine dictionary, Seoul, Jeongdam, 1998:1354.
- Kim JS. Standard Galenicalpharmacy, Seoul, Jinmyung publishing company, 1975:353.
- Ouh ER. Bonchoujongshin, Seoul, Hanglimseswon, 1972:120.
- Mun G et al. East & West Combine Treatment of Cancer II, Iksan, Wonkwang Univ, 1999:741-93.
- Chung BS et al. Illustrated Herb dictionary, Seoul Youngrimsa, 1990:775-7.
- Gae WB. Pharmacology & application of Anticancer Herb, Harbin, Hukrunggang Science technology publishing company, 1999:1200, 1268-9.
- Oriental Herb dictionary editing committee. Supplemental Oriental Herb dictionary(8), Seoul, Jeongdam, 1997:3711-4.
- Shin KG. Shinssi Hebal Medicine, Seoul, Sumunsa, 1982:160-1.
- Lee SJ. Bonchougangmok, Beijing, Human Health publishing company, 1988:1987-91.
- Shin MG. Clinical Galenicalpharmacy, Seoul, Youngrimsa, 1988:591-592.
- Chai YM. New Pharmacology & application of Chinese Herb, Beijing, Hwaha publishing company, 1999:521.
- Rae JK et al. Chinese Clinical Galenicalpharmacy(ha), Beijing, Human Health publishing company, 1998:1856-8.
- Pathology Society of Korea. Pathology, Seoul, Komunsa, 1990:179-86.
- Bang YJ. Practical Chinese internalmedicine, Shànghǎi, Shànghǎi science technology publishing company, 1986:12-6, 621-35.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1993;53:3979-85.
- Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J. Biol. Chem.* 1998;273:1-4.
- Korean Health Organization. : Korean herb standard book, Seoul, 1984:111.
- Gangsou New medicine academy. Chinese Herb dictionary I(ha), Shànghǎi, Shànghǎi science technology publishing company, 1979:2587-9.
- Tang W, Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag, New York, 1992:51-7.
- Martin SJ et al. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem*, 1995;270:6425-8.
- Alnemri ES et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996;87:171.
- Hwang SG et al. Proteolysis of beta-catenin in apoptotic Jurkat cells. *Journal of Life Science*, 2000;10:57-63.

23. Bicknell GR, Snowden RT, Cohen GM. Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukemic cell line. U937. *J. Cell Sci*, 1994;107:2483-9.
24. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, 1995;11:211-19.
25. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993;74:609-619.
26. Driks PB, Rutka JT. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle. *Neurosurgery*, 1997;40:1000-13.
27. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993;366:704-7.
28. Baek HR. *Byunjeongshidhi outline*, Unnam, Human publishing company, 1984:502.
29. Ashall F, Bramwell ME, Harris H. A new marker for human cancer cells. *Lancet*, 1982;2:1-6.
30. Suffness M, Douros J. Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod*, 1982;45:1-14.
31. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol*, 1991;139:271-9.
32. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Bio*, 1992;119:493-501.
33. Wang JY, Knudsen ES, Welch PJ. The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv. Cancer Res*, 1994;64:25-85.
34. Ruddon RW. Chemical carcinogenesis. In principles of drug action (3rd.), Churchill Livingstone, 1999:735.
35. Son GW. *Chinese Treatment of Leukemia*, Hongkong, Haebong publishing company, 1990:112-3.
36. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol*, 1995;15:2612-24.
37. An WG, Hwang SG, Trepel JB, Blagosklonny MV. Protease inhibitor -induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia*, 2000;14:1276-83.
38. School of Medicine Seoul national univ. *Oncology*, Seoul national univ publishing part, 1992:1-3, 78-90, 137-43, 225-34.
39. Moran P. Cellular effects of cancer chemotherapy administration. *J. Intraven. Nurs*, 2000;23:44-51.