

굴피나무 잎 추출물의 위암세포에 대한 세포사멸 유도 효과

이형선*

중원대학교 임상병리학과

Received: February 25, 2021 / Revised: March 30, 2021 / Accepted: April 1, 2021

Induction of Apoptosis in AGS Human Gastric Cancer Cells by *Platycarya strobilacea* Leaf Extract

Hyeong-Seon Lee*

Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, Goesan 28024, Republic of Korea

This study investigated the anticancer activity of methanol extract from *Platycarya strobilacea* leaf in AGS human gastric cancer cells. We determined the cell viability effect of *P. strobilacea* using MTS assay. Apoptosis induction and cell cycle arrest were confirmed by fluorescein isothiocyanate and propidium iodide staining using cellometer K2. The mRNA expression levels of the Bcl-2 family were confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction. The cell viability was decreased in a dose-dependent manner treated with different concentrations of *P. strobilacea*. Total, early, and late apoptotic cells were dramatically increased, and the cell cycle was arrested at the sub-G1 phase. The mRNA expressions of Bcl-2 and Bcl-xL were reduced, whereas pro-apoptotic factors, Bax and Bak, were increased in a dose-dependent manner. These results suggested that *P. strobilacea* leaf extract induced significant apoptotic activity through an intrinsic mitochondria pathway.

Keywords: *Platycarya strobilacea*, AGS human gastric cancer cells, Bcl-2 family, apoptosis

서 론

현대 의학의 발달과 생활환경의 개선으로 전반적인 삶의 질은 높아졌지만, 여전히 암은 전 세계적으로 인간의 생명을 위협하는 질환이다[1]. 전 세계적으로 폐암 다음으로 많이 발생하며 특히 우리나라에서도 전체 암 중에서 항상 상위를 차지하고 있는 암이 위암이다. 현재 위암을 치료하기 위한 방법으로는 수술을 통한 절제, 약물을 이용한 화학요법, 방사선 요법 등을 다양하게 병행하고 있다. 하지만 위암은 조기 발견이 어렵고 수술 후에도 재발의 가능성이 높으며, 항암제에 대한 부작용으로 완치가 어려운 암종의 하나이다[2]. 이러한 어려움을 극복하기 위한 일환으로 부작용이 적으며 정상세포에는 영향을 미치지 않는 항암제의 개발이 절실하며, 암의 발생을 예방할 수 있는 천연물 유래 의약품의 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[3]. 세포사멸은 다양한 특성에 따라 크게 apoptosis와 necrosis로 나뉘어 진다. 강

한 독성 또는 물리적 상해에 의해 나타나는 necrosis와는 달리 apoptosis는 능동적인 세포사멸 과정의 하나로 세포 내부의 신호전달이 정교하게 이루어지면서 사멸한다[4, 5]. Apoptosis는 세포의 비중 감소, 세포막 파괴, 세포질 및 염색질 응축, DNA 단편화 등의 현상이 일어나며 결과적으로 세포를 자살로 유도한다. 항암효과를 가지는 약물들이 암세포에 대하여 apoptosis 유도에 얼마나 효과적인지를 확인하는 것이 암 치료의 새로운 약물개발의 결과물로 강조되고 있다[6]. Apoptosis는 관련된 내인성 경로인 미토콘드리아의 존성 경로와 관련하여 Bcl-2 family의 상호발현과 세포주기 조절에 대한 기능적 조절을 확인하는 것이 매우 중요하다[7]. 굴피나무(*Platycarya strobilacea*)는 가래나무과에 속하는 수목으로, 예로부터 열매와 뿌리는 약용으로 이용되어 왔으며, 뿌리와 수피는 소염작용이 있는 것으로 알려져 왔다. 굴피나무는 항세균, 항진균, 항염증, 항산화 및 항노화 활성 등이 있는 것으로 연구가 보고된 바 있다[8–11]. 굴피나무 수피에서 추출한 성분으로는 quercetin, myricetin의 플라보노이드와 afzelin, quercitrin, myricitrin의 플로보노이드 글리시드를 포함한 플라보노이드류 및 그 배당체들이 함유되어 있다고 연구되었다[12, 13]. 특히, quercetin, quercitrin은 다

*Corresponding author

Tel.: +82-43-830-8861, Fax: +82-43-830-8679

E-mail: biohslee@juw.ac.kr

양한 암세포에서 세포사멸을 유도한 항암 효과가 알려져 있다[14, 15]. 이와 같이 굴피나무 추출물에 대한 활발한 연구에도 불구하고 암세포에 대한 항암 활성이 있는지에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 굴피나무 잎 추출물을 이용하여 암세포의 세포사멸에 대한 활성이 있는지를 확인하고, 세포사멸과 관련된 apoptosis 활성에 관여하는지를 세포의 내인성 경로를 통해 알아보고 항암제로서 가능성이 있는지를 타진하고자 한다.

재료 및 실험

세포배양

인간 위암 세포주인 AGS 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였다. AGS 세포는 10% fetal bovin serum (FBS, Korea)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2-3일 간격으로 계대 배양하였다.

굴피나무 잎 추출물 제조

본 추출물은 한국식물추출물은행(Korea Plant Extract Bank, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 굴피나무 잎은 2004년 전라남도 부안군에서 채취하여 건조된 잎(54 g)에 1 L의 메탄올(99.9%)을 넣고 실온에서 30회 추출하였다(1회당 40 KHz, 1,500 W, 15분, Ultrasonication). 필터(Filter paper NO. 2, Whatman, UK)한 여액을 감압 농축하여 최종 4.33 g의 추출물을 얻었다. 세포실험에 사용하기 전 dimethyl sulfoxide (DMSO, USA)에 200 mg/ml로 제조하여 냉동 보관하였다.

세포생존율 측정

AGS 세포주에 대한 굴피나무 잎 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTS 시약(Promega, USA)을 이용하여 세포 생존율 측정을 실시하였다. 96-well plate에 2.5 × 10⁵/ml로 세포를 하루 부착시킨 후 SFM (serum free media Daihan Science, Korea)로 교체하여 24시간 안정화시켰다. 세포에 굴피나무 잎 추출물을 농도별(0, 25, 50, 100, 150, 200 µg/ml)로 24시간 처리하였다. 반응이 끝난 세포의 배지 100 µl 당 MTS 시약을 10 µl씩 추가하여 3시간 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다 (FilterMax F5 Multi-Mode microplate reader, USA).

세포사멸능 측정

Apoptosis에 의한 세포사멸능 측정은 annexin V/FITC-PI staining kit (Biovision, USA)를 이용하여 측정하였다. 6-well plate에 2.5 × 10⁵/ml로 세포를 하루 부착시킨 후 SFM

(serum free media)로 교체하여 24시간 안정화시켰다. 굴피나무 잎 추출물을 농도별(0, 50, 150, 200 µg/ml)로 넣고 15시간 반응시켰다. 세포를 회수하여 1 × PBS로 씻어낸 후 70% 에탄올로 30분간 고정하였다. 1 × binding buffer에 부유된 세포에 annexin V/FITC-PI 시약을 넣어 30분간 어두운 곳에서 반응시키고 세포액 20 µl를 일회용 슬라이드 챔버에 적하하여 Cellometer K2 장비(Nexelom bioscience, USA)로 측정하였다.

세포주기 측정

굴피나무 잎 추출물에 의한 세포주기에 미치는 영향은 cell cycle kit (Biovision)를 이용하여 측정하였다. 6-well plate에 2.5 × 10⁵/ml로 세포를 하루 부착시킨 후 SFM (serum free media)로 교체하여 24시간 안정화시켰다. 굴피나무 잎 추출물을 농도별(0, 50, 150, 200 µg/ml)로 넣고 15시간 반응시켰다. 세포를 1 × PBS로 2번 씻어내고 trypsin/EDTA를 이용하여 회수하였다. 세포는 1 × cell cycle assay (CCA) buffer로 다시 씻어내고 70% 에탄올로 30분간 고정시켰다. 고정된 세포에 PI 시약을 처리하여 DNA를 30분간 염색하여 세포 부유액 20 µl를 슬라이드 챔버에 적하하여 Cellometer K2 장비(Nexelom bioscience)로 측정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 측정

세포사멸의 내인성 경로와 관련된 타겟 mRNA의 수준은 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 6-well plate에 2.5 × 10⁵/ml로 세포를 하루 부착시킨 후 SFM (serum free media)로 교체하여 24시간 안정화시켰다. 굴피나무 잎 추출물을 농도별(0, 50, 150, 200 µg/ml)로 넣고 24시간 반응시켜 세포를 회수하였다. 세포에 1 ml의 Trizol 시약(Ambion, USA)를 첨가하여 10분간 반응시키고 200 µl의 클로로포름을 첨가하여 5분 간격으로 3번 강하게 흔들어준 후 14,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층의 맑은 액을 새로운 시험관으로 옮기고 500 µl의 이소프로판올을 섞어 10분간 다시 반응 후 원심분리하여 아래에 pellet을 얻었다. 40 µl의 DEPC-DW로 pellet을 녹여 총 RNA 1 µl 당 농도값을 측정하여 AccuPower RT Premix kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하고 AccuPower Taq PCR Premix kit (Bioneer)와 준비된 타겟 프라이머(Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL)을 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR이 끝난 뒤에는 EtBr이 첨가된 1.5% 아가로즈 겔에 흘려 이미지 분석 장치(Davinch-K Imaging System, Korea)로 결과를 분석하였다.

통계처리

본 연구의 모든 실험은 3회 이상 반복하여 평균 ± 표준편

차를 구하였다. 실험 농도간의 통계적 유의성은 Student's t-test를 이용하여 *p*-value를 구하여 검증하였고, *p* < 0.05, *p* < 0.01, *p* < 0.001 이하인 경우 *, **, ***로 표기하였다.

결과 및 고찰

굴피나무 잎 추출물이 위암세포 AGS의 증식에 미치는 영향 굴피나무 잎 추출물이 위암세포 AGS 생존에 미치는 영향

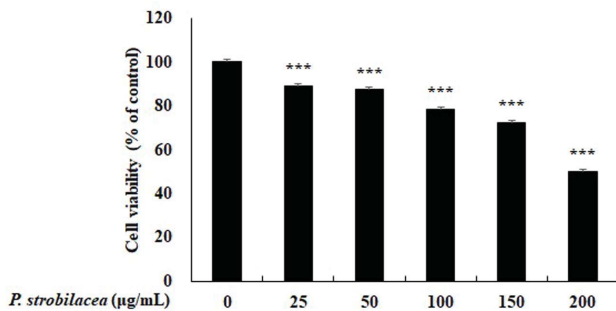


Fig. 1. Cell viability of AGS cells by MTS assay. The cells were treated with PSE for 24 h and added with MTS solution for 3 h. Significant evaluation was indicated from control by t-test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

을 확인하기 위해 농도별(0, 25, 50, 100, 150, 200 µg/ml)로 처리하여 MTS assay를 수행하였다. 굴피나무 잎 추출물을 24시간 처리하였을 때 암세포의 생존율은 대조군에 비해 89.3, 87.3, 78.4, 72.2, 50.0%로 농도 의존적으로 유의적인 감소를 보였다(Fig. 1). 이러한 세포 생존율의 감소가 apoptosis에 의한 세포자멸사 인지를 확인하기 위해 annexin V/FITC-PI 염색 방법을 이용하여 그 양상을 관찰하였다.

굴피나무 잎 추출물이 위암세포 AGS에서의 apoptosis 유도

굴피나무 잎 추출물을 위암세포 AGS에 처리하였을 때 세포의 증식이 현격하게 감소된 것을 확인하고 이러한 결과가 세포의 apoptosis 유발로 이어지고 있는지 여부를 확인하기 위해 세포를 형광 염색하여 분석을 실시하였다. Apoptosis 신호를 받은 암세포는 세포 표면으로 phosphatidylserine (PS)이 노출되고 annexin V/FITC 형광 시약과 특이적으로 강하게 결합하게 된다. 또한, 세포의 사멸이 일어나면 세포막을 통과한 PI 시약이 DNA와 결합하여 초기(early)와 후기(late) apoptosis의 양상을 확인할 수 있다[16, 17]. 굴피나무 잎 추출물을 농도별(0, 50, 150, 200 µg/ml)로 처리하여 세포를 Cellometer K2로 형광의 양상을 확인한 결과 Fig. 2와 같은 결과를 확인할 수 있었다. 초기 apoptosis 세포의 양상이

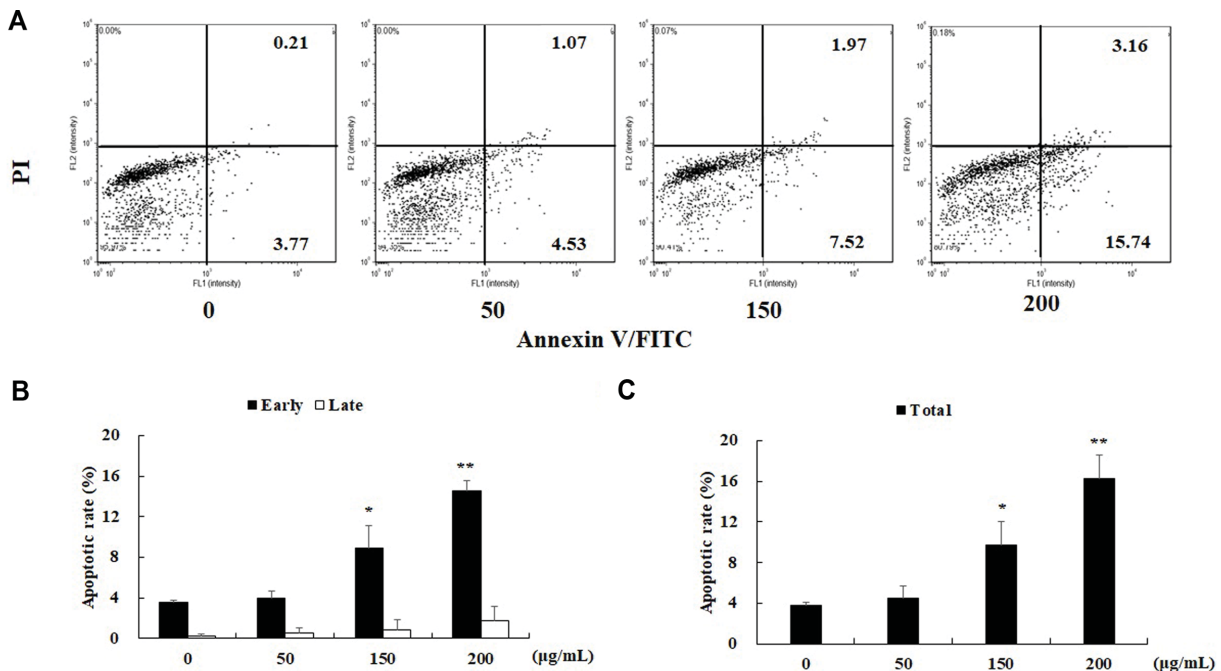


Fig. 2. Apoptotic activity of AGS cells by annexin V/FITC-PI stain. The cells were treated with PSE (0, 50, 150, and 200 µg/ml) for 15 h, and stained with annexin V/FITC-PI solution for 0.5 h. (A) The cells were determined by cellometer K2. (B) and (C) Percent of early, late and total apoptosis was indicated using bar charts. Significant evaluation was indicated from control by t-test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *n* = 6).

대조군에 비해 4.53, 7.53, 15.74%로 농도 의존적으로 유의미한 증가를 보이고 있다. 또한, 후기 apoptosis 세포의 양상도 대조군에 비해 증가하고 있으나 통계적인 유의성을 뚜렷하게 보이지는 않았다. 결과적으로 굴피나무 잎 추출물의 처리가 전체 적으로 위암세포를 apoptosis 세포로 유도하여 생존율이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

굴피나무 잎 추출물이 위암세포 AGS에서의 세포주기에 미치는 영향

세포주기는 하나의 세포가 두 개의 딸 세포로 적절한 분열이 일어나는 조직화된 과정이다. 세포 성장에 필수적인 G1 (합성준비기), S (DNA 합성기), G2 (분열준비기), M (분열기) 기의 순차적인 4단계 세포주기를 거친다. 각 단계별 주기에는 cyclin-dependent kinases (CDKs) 효소가 작용하여 세포 활성을 조절한다. 비정상적인 암세포는 각 단계별 주기에 관련된 효소가 정상적으로 조절되지 못하고 무한 증식이 초래된다[18-20]. 다수의 항암 연구에서와 같이 세포 증식 억제제는 세포주기조절과 관련성이 있으며 apoptosis가 유도되면 세포주기의 다양한 단계에서 증식이 멈추는 것을 알 수 있다[21]. 이에 따라 본 연구에서는 굴피나무 잎 추출물의 처리에 의한 세포증식 억제 결과가 세포주기 정지에 의한 것이기 알아보기 위해 굴피나무 잎 추출물을 농도별(0, 50, 150,

200 µg/ml)로 15시간 처리하여 PI 염색을 통해 세포주기를 측정하였다. 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 16.3, 20.4, 21.4%로 sub-G1기에 세포가 머물러 굴피나무 잎 추출물에 농도 의존적으로 증가하는 수치를 확인할 수 있었다(Fig. 3). Sub-G1기는 DNA의 양이 정상세포보다 적은 상태의 세포들이 측정되는 단계로 굴피나무 잎 추출물에 의해 apoptosis 과정이 일어나고 있는 세포가 더 이상 분열이나 성장하지 못하고 분해되는 과정에서 sub-G1기의 증가 양상이 뚜렷하게 관찰되고 있다. 결과적으로 굴피나무 잎 추출물 처리에 의해 위암 세포는 sub-G1기에 머물러 세포사멸이 유도되어 암세포의 증식이 억제 될 것으로 판단된다.

굴피나무 잎 추출물이 Bcl-2 family 발현에 미치는 영향

세포의 사멸은 death receptor (DR)에 의한 외인성 경로 또는 내인성 경로 두 가지로 인해 일어난다. 그 중 내인성 경로는 미토콘드리아를 경유하며 Bcl-2 family 단백질의 상호작용이 중요하다[22, 23]. Bcl-2 family는 anti-apoptosis에 속하는 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w와 pro-apoptosis에 속하는 Bax, Bak, Bid, Bad, Noxa, PUMA 등으로 구성되어 있다[24]. 세포사멸이 유도되면 Bcl-2 family 인자의 상호작용에 의해 미토콘드리아 내의 cytochrome c가 방출되어 caspase-3의 활성화를 통해 DNA의 응축과 분해를 유발한다[25]. 굴피나무

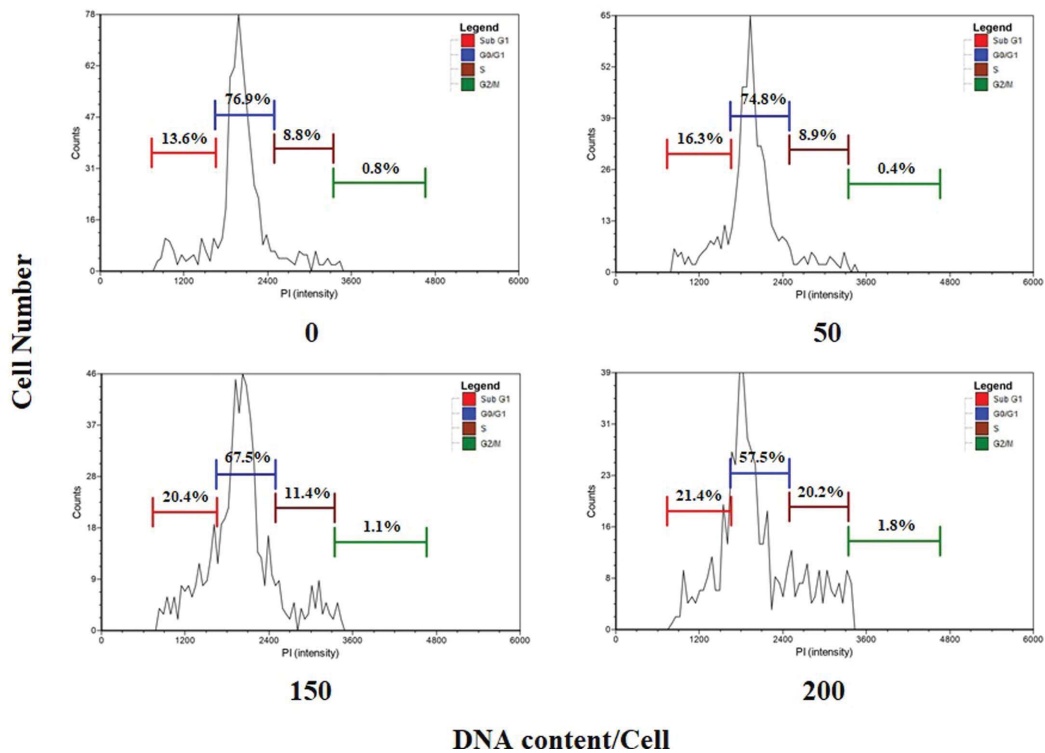


Fig. 3. Cell cycle analysis in AGS cells by PI stain. The cells were treated with PSE (0, 50, 150, and 200 µg/ml) for 15 h, fixed in 70% ethanol, and stained with PI solution for 0.5 h.

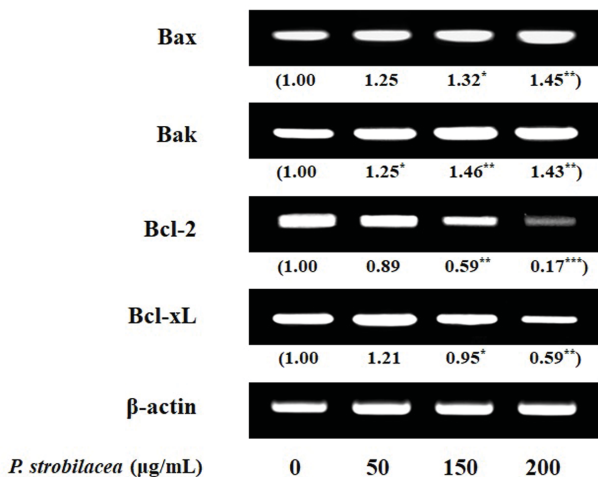


Fig. 4. mRNA level analysis in AGS cells treated with *P. strobilacea* extract (0, 50, 150, and 200 µg/ml). And, density of mRNA band was expressed as a value compared to the control. Significant evaluation was indicated from control by t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$).

잎 추출물을 처리하였을 때 Bcl-2 family의 발현 변화를 관찰하기 위해 RT-PCR을 통해 결과를 확인하였다. 실험 결과 Bax는 농도의존적으로 증가하였고 또한, Bak도 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하는 경향을 보이는 반면에 Bcl-2, Bcl-xL은 농도의존적으로 감소하는 양상을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이들 결과를 종합해보면 pro-apoptosis 인자의 증가와 anti-apoptosis 인자의 감소가 상호적으로 이루어지며 미토콘드리아의 막 투과성이 야기되어 내인성 세포사멸의 신호전달 경로가 진행됨을 알 수 있다. 굴피나무 잎 추출물의 처리는 내인성 경로를 통한 세포사멸 활성을 주도하여 위암에 대한 항암 활성을 보이는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 굴피나무 잎 추출물로부터 사람 위암세포주인 AGS 세포에 대한 apoptosis가 유도되어 항암 활성을 가지는지를 확인하고자 한다. AGS 세포에 굴피나무 잎 추출물을 농도별(0, 50, 150, 200 µg/ml)로 처리하여 세포에서 나타나는 양상들을 확인하였다. MTS 측정으로 암세포 생존율을 확인한 결과 굴피나무 잎 추출물에 따라 농도의존적으로 세포에 독성을 보였으며, 이러한 세포 죽음이 apoptosis 유도에 의한 것인지를 annexin V/FITC-PI 염색을 통해 확인하였다. 그 결과, early apoptosis를 보이는 세포의 양상이 유의성 있게 증가하였다. 굴피나무 잎 추출물의 처리는 세포주기에서 sub-G1기의 증가로 암세포가 더 이상 분열하지 못

하고 증식이 억제됨을 보여준다. 내인성 경로에 관여하는 Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL의 증감을 mRNA 수준에서 RT-PCR로 확인한 결과, Bax, Bak가 증가하고, Bcl-2, Bcl-xL이 감소를 동반하며 미토콘드리아를 통한 세포사멸의 신호전달 경로가 진행되고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하면 굴피나무 잎 추출물은 사람 위암세포에 대한 항암 활성을 가지는 효능적 가치가 있음에 가능성을 제시할 수 있을 것으로 생각되며, 추가적인 동물실험을 통한 인체적용시험의 효능 검증을 통해 의약품 개발 가능성을 확인해야 한다.

Acknowledgments

This work was supported by the Jungwon University Research Grant (No. : 2020-003).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Song M, Shin GY. 1987. Efficacy of progressive muscle relaxation training in reducing nausea and vomiting, anxiety and symptom distress of cancer chemotherapy. *J. Nurs. Acad. Soc.* **17**: 195-203.
- Shin SA, Lee HN, Choo GS, Kim SJ, Kim HJ, Park YS, et al. 2016. Induction of apoptosis and inhibition of growth in human gastric cancer by piperine. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**: 1589-1594.
- Kim EJ, Park H, Lim SS, Kim JS, Shin HK, Yoon JH. 2008. Effect of the hexane extract of *Saussurea lappa* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **40**: 207-214.
- Hsu HF, Hwang JY, Kuo CF, Tsao N, Wu YC. 2008. Glossogin, a novel phenylpropanoid from *Glossogyne tenuifolia*, induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **46**: 3785-3791.
- Kim GM, Lee AR, Lee KW, Park JY, Chun J, Cha J, et al. 2009. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from chenggukjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 997-1004.
- Kim SR, Lee HH, Kim MJ, Seo MJ, Hong SH, Choi YH, et al. 2010. Induction of apoptosis by ethanol extracts of fermented agaveans in AGS human gastric carcinoma cells. *J. Life Sci.* **20**: 1872-1881.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**: 1053-1058.
- Yang HJ, Kim EH, Kang ST, Park SN. 2009. Antibacterial activity of *Platycarya strobilacea* extract and stability of the extract-containing cream. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 170-175.

9. Choi YH, Chae SG, Kim JH, Gang SJ, Baeg NI, Han JT. 2003. Isolation of an antifungal compound from aerial parts of *Platycarya strobilacea*. *J. Korea Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 268-270.
10. Babu D, Lee JS, Park SY, Thapa D, Choi MK, Kim AR, et al. 2008. Involvement of NF-kappaB in the inhibitory actions of *Platycarya strobilacea* on the TNF-alpha-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells and chemokine expression. *Arch. Pharm. Res.* **31**: 727-735.
11. Yang HJ, Park SN. 2008. Antioxidative and antiaging effects of *Platycarya strobilacea* extract and clinical trial. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **34**: 275-286.
12. Lee HJ, Lee SK, Choi YJ, Jo HJ, Kang HY, Choi DH. 2007. Extractives from the bark of *Platycarya strobilacea*. *J. Korean Soc. Forest Sci.* **96**: 408-413.
13. Lee JH, Kwon YS, Kim CM. 1998. Flavonoids from the stem bark of *Platycarya strobilacea*. *Korean J. Pharmacogn.* **29**: 353-356.
14. Hashemzaei M, Far AD, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM, et al. 2017. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **38**: 819-828.
15. Cincin ZB, Unlu M, Kiran B, Bireller ES, Baran Y, Cakmakoglu B. 2014. Molecular mechanisms of quercitrin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer. *Arch. Med. Res.* **45**: 445-454.
16. Ryu DS, Kim SH, Kwon JH, Lee DS. 2014. *Orostachys japonicus* induces apoptosis and cell cycle arrest through the mitochondria-dependent apoptotic pathway in AGS human gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* **45**: 459-469.
17. Kaufmann SH, Henqartner MO. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* **11**: 526-534.
18. Li B, Geo Y, Rankin GO, Rojanasakul Y, Cutler SJ, Tu Y, et al. 2015. Chaetoglobosin K induces apoptosis and G2 cell cycle arrest through p53-dependent pathway in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* **356**: 418-433.
19. Buolamvini JK. 2000. Cell cycle molecular targets in novel anti-cancer drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* **6**: 379-392.
20. Diaz-Moralli S, Tarrado-Casterllamau M, Miranda A, Cascante M. 2013. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **138**: 255-271.
21. Bae JT, Chang JS, Lee KR. 2002. Effect of *Sarcodon aspratus* extract on expression of cell cycle174 associated proteins in HepG2 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 329-332.
22. Xie QC, Yang YP. 2014. Anti-proliferative of physcion 8-O-beta-glucopyranoside isolated from *japonicus* Houtt. on A549 cell lines via inducing apoptosis and cell cycle arrest. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**: 377.
23. Fulda S, Debatin KM. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-4811.
24. Lavrik IN. 2010. Systems biology of apoptosis signaling networks. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 551-555.
25. Moon DO, Kim MO, Choi YH, Kim ND, Chang JH, Kim GY. 2008. Bcl-2 overexpression attenuates SP600125-induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett.* **264**: 316-325.
26. Park C, Hyun SK, Shin WJ, Chung KT, Choi BT, Kwon HJ, et al. 2009. Esculetin induces apoptosis through caspase-3 activation in human leukemia U937 cells. *J. Life Sci.* **19**: 249-255.